



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DE LA LACASA DE *Corioloopsis gallica*
DURANTE LA OXIDACIÓN DE FENOLES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:
JOAQUÍN RAMÍREZ RAMÍREZ

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. MARCELA AYALA ACEVES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. GLORIA SAAB RINCÓN
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

DR. AGUSTÍN LÓPEZ MUNGUÍA CANALES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

CUERNAVACA, MOR., SEPTIEMBRE, 2014



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 laboratorio de Diseño e Ingeniería de Proteínas bajo la dirección de la Dra. Marcela Ayala Aceves, que pertenece al departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante la realización de este trabajo se contó con una beca de estudios de maestría que otorgó el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Asimismo se agradece el financiamiento otorgado por el CONACyT 179241 para la asistencia al congreso de Oxizymes in Vienna 2014.

Agradecimientos

A la doctora Marcela Ayala Aceves, por todo el apoyo y orientación durante la realización del proyecto. Gracias por presentarme el mundo de la ciencia experimental y por su profesionalismo.

A la bióloga Rosa Román Miranda, por todo el apoyo técnico que aportó a mi formación y por su valiosa labor en el día a día del laboratorio.

A los miembros del jurado, Dra. Claudia Rodríguez, Dra. Denhi Schnabel, Dr. Mauricio Trujillo, Dr. Leobardo Serrano y Dr. Edmundo Castillo, por sus comentarios para mejorar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, por su amistad.

Al Dr. Rafael Vázquez y al Dr. Lorenzo Segovia, por permitirme desarrollar este proyecto en su laboratorio.

Al laboratorio del Dr. Enrique Galindo, por permitirme amablemente utilizar su espectrómetro de masas.

Al personal docente y administrativo del Instituto de Biotecnología, por su colaboración en todo lo que se necesita para el óptimo funcionamiento de la institución y por el apoyo económico para la asistencia al Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.

A mi madre y a mi padre, por supuesto, ya que sin ustedes, literalmente, yo no estaría aquí.

A Mayra Guadalupe Avelar Frausto, por su valiosa amistad. Gracias por cuidar mi lugar y alimentarme en los momentos de escasez.

A Estefanía Sierra Ibarra, por mostrarme que el etanol es refrescante y por la deliciosa comida colombiana.

A Joaquín Moreno Contreras, por hacerme reír con sus frases célebres y por ser el mejor amigo de San Mateo Texcalyacac que uno puede tener.

Al CONACyT, por la beca otorgada durante los estudios de maestría.

Al Instituto de Biotecnología, por el apoyo económico para asistir al XV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.

Índice

Resumen.....	6
Introducción.....	7
Antecedentes.....	8
1-Estructura, función y aplicación de las lacasas.....	8
2-La relación entre el potencial redox y la actividad de las lacasas.....	13
3-Pérdida de actividad en las lacasas.....	15
4-Pérdida de actividad en otras oxidorreductasas.....	18
5-Lacasa de <i>Corioloopsis gallica</i>	19
Hipótesis y objetivos.....	23
Materiales y métodos.....	24
Resultados.....	29
Discusión.....	41
Conclusiones.....	48
Perspectivas.....	49
Referencias.....	50
Figuras suplementarias.....	56

Anexo

-Póster presentado en el XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.....60

-Póster presentado en el congreso Oxizymes Vienna 2014.....61

Resumen

Las lacasas son oxidorreductasas capaces de oxidar compuestos fenólicos mediante la reducción del oxígeno molecular a agua. La oxidación del sustrato genera radicales libres fenoxilo que pueden polimerizar hasta formar grandes moléculas insolubles. Las lacasas tienen un potencial importante en diversas áreas biotecnológicas, como la biorremediación de compuestos tóxicos, pero su estabilidad operacional ha limitado la aplicación del biocatalizador a un costo razonable. En este trabajo, se estudió la inactivación de la lacasa de *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 durante la oxidación de fenoles con el fin de obtener información útil para diseñar estrategias racionales que aumenten su estabilidad.

El mecanismo general de inactivación de las lacasas durante la oxidación de fenoles no se conoce. En este trabajo, se estudió cinéticamente la inactivación de la lacasa de *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 durante la oxidación de fenol, 4-clorofenol, 4-bromofenol, 4-metilfenol y 4-metoxifenol, sustratos con diferente potencial redox.

Los resultados obtenidos señalan que la lacasa estudiada se inactiva principalmente por la reacción de los radicales libres producidos durante el recambio con la enzima. Se observó que la velocidad de inactivación dependía tanto de la concentración de radicales como del potencial redox del sustrato. En una reacción con la misma concentración inicial de sustrato, el 4-metoxifenol fue el sustrato más inactivante. Sin embargo, la concentración de radicales libres era mayor que en el caso del fenol. En un análisis donde la concentración de radicales era igual para fenol y 4-metoxifenol, la velocidad de inactivación era un orden de magnitud mayor para la reacción con el fenol, un sustrato de mayor potencial redox.

Una gran cantidad de esta lacasa se une al polímero polifenólico que se produce durante la reacción, pero esto no parece ser importante en la inactivación de la enzima. Se propone una estrategia de ingeniería de proteínas que contienda con ambos fenómenos para desarrollar un biocatalizador robusto con aplicación ambiental.

Introducción

Las lacasas son oxidasas multicobre capaces de catalizar la oxidación de compuestos aromáticos mediante la reducción del oxígeno molecular a agua (Mot y Silaghi-Dumitrescu, 2012). Son glicoproteínas producidas principalmente por hongos que degradan polímeros recalcitrantes, como la lignina (Baldrian, 2006). Estas enzimas son capaces de oxidar una gran diversidad de sustratos: fenoles, anilinas, colorantes industriales, pesticidas e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Morozova *et al.*, 2007a). Debido a su amplia especificidad de sustrato y a que utilizan sólo oxígeno molecular como agente oxidante, son biocatalizadores con gran potencial biotecnológico en diversas áreas, como la biorremediación, industria del papel, producción de etanol, industria textil, cosmética y bioanalítica (Gianfreda *et al.*, 1999).

Uno de los factores que ha limitado la aplicación generalizada de las lacasas en procesos biotecnológicos ha sido su estabilidad operacional; es decir, durante la catálisis de la reacción química de interés. La actividad enzimática de las lacasas disminuye rápidamente durante la oxidación de diferentes fenoles (Kurniawati y Nicell, 2008). A este fenómeno se le denomina inactivación. Se han desarrollado varias estrategias para aumentar la estabilidad operacional de la enzima; por ejemplo: inmovilización en diversos soportes, evolución dirigida e ingeniería de solventes (Kunamneni *et al.*, 2008). Aunque estas estrategias han logrado un avance importante, el mecanismo molecular de la inactivación no se ha dilucidado. Es importante comprender este mecanismo para realizar un diseño más racional de las estrategias que pretendan incrementar la estabilidad. De esta manera se podrían desarrollar procesos biotecnológicos más eficientes.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el fenómeno de inactivación de la lacasa. Se utilizó como modelo la lacasa del basidiomiceto *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 en la reacción de oxidación de diferentes fenoles, compuestos tóxicos que se encuentran en las aguas residuales de diversas industrias, principalmente la del petróleo.

Antecedentes

1-Estructura, función y aplicación de las lacasas

Las lacasas pertenecen a la familia de las oxidasas multicobre (Messerschmidt y Huber, 1990). Otros miembros de esta familia son la oxidasa de ascorbato de plantas y la ceruloplasmina de mamíferos (figura 1). Todas estas enzimas contienen por lo menos cuatro iones de cobre en su sitio activo, los cuales se diferencian entre sí por sus características espectroscópicas y por su papel en la catálisis (Solomon *et al.*, 1996). Las lacasas fueron descritas por primera vez en plantas (Yoshida, 1883), pero han sido las lacasas de hongos las más estudiadas debido a su capacidad de transformar eficientemente una gran variedad de compuestos, principalmente del tipo fenólico, y a la facilidad de aislar estas enzimas, ya que son secretadas por las células fúngicas al medio extracelular (Thurston, 1994). Las lacasas de hongos forman un grupo monofilético (Valderrama *et al.*, 2003). Tienen una masa molecular promedio de 50-130 kDa y un punto isoeléctrico (pI) alrededor de 4.0. Estas enzimas pueden encontrarse en forma de monómeros, dímeros (tanto homodímeros como heterodímeros) o incluso tetrámeros; esto depende de la especie de la que haya sido aislada la enzima. La mayoría de las lacasas llevan a cabo la catálisis de manera óptima en disoluciones acuosas con pH ácido. La temperatura óptima de reacción varía en las diferentes lacasas, pero en promedio tienen la máxima actividad alrededor de los 50 °C (Morozova *et al.*, 2007a).

Las lacasas tienen funciones diversas en cada tipo de organismo: en las plantas, están involucradas principalmente en la biosíntesis de la lignina; en los hongos, participan junto con otras enzimas oxidantes (peroxidasas) en la degradación de la lignina para invadir plantas, en la morfogénesis de las esporas, en la patogénesis y en la transformación de compuestos xenobióticos. Se han descrito lacasas también en bacterias e insectos, con funciones como la homeostasis del cobre y la esclerotización de la cutícula, respectivamente (Baldrain, 2006).

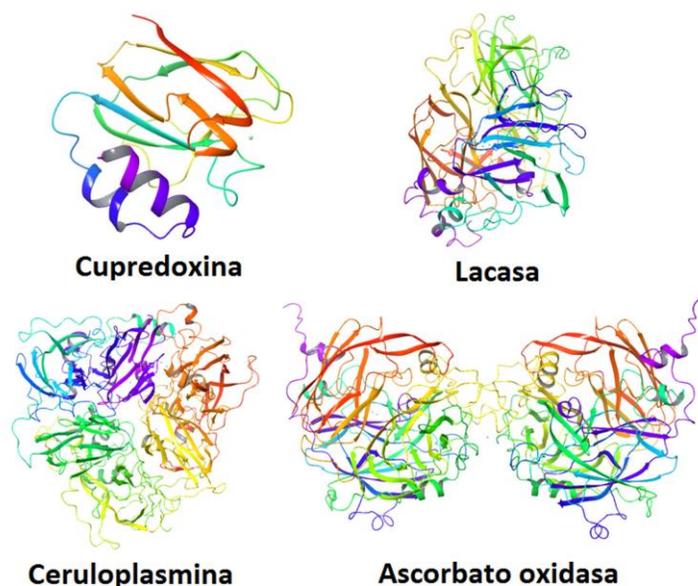
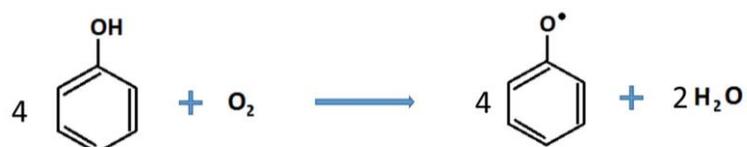


Figura 1. Estructura tridimensional de la proteína pequeña cupredoxina y las oxidasas multicobre. El plegamiento de la cupredoxina es la unidad estructural de los dominios de las oxidasas multicobre. La lacasa tiene tres dominios de este tipo. Modelos obtenidos del Protein Data Bank (PDB: cupredoxina, 1PAZ; lacasa, 4A2E; ceruloplasmina, 4ENZ; ascorbato oxidasa, 1AOZ).

La reacción general que catalizan las lacasas consiste en la oxidación de cuatro moléculas de un compuesto con la reducción conjunta de una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua:



El producto de la oxidación es un radical libre fenoxilo. Esta especie altamente reactiva puede tener varios destinos: (1) reaccionar con otro radical libre fenoxilo para formar un dímero (reacciones sucesivas de este tipo llevan a la formación de polímeros insolubles), (2) formar un aducto con una molécula orgánica (v.g., otra molécula de sustrato, un residuo de aminoácido de la enzima, etc.), o (3) cuando tiene sustituyentes como grupos hidroxilo o amino primario, sufre una segunda oxidación enzimática o química para formar una quinona. En la mayoría de las reacciones con fenoles y aminas se observa la formación de polímero. Se ha caracterizado parcialmente el tipo de polímero que se forma. Las estructuras químicas de algunos de estos compuestos se muestran en la figura 2. La capacidad de catalizar la

formación de estos polímeros le confiere a las lacasas un atractivo como agente descontaminante, ya que el fenol precipitado se puede eliminar fácilmente de la fase soluble por filtración (Bollag *et al.*, 1988).

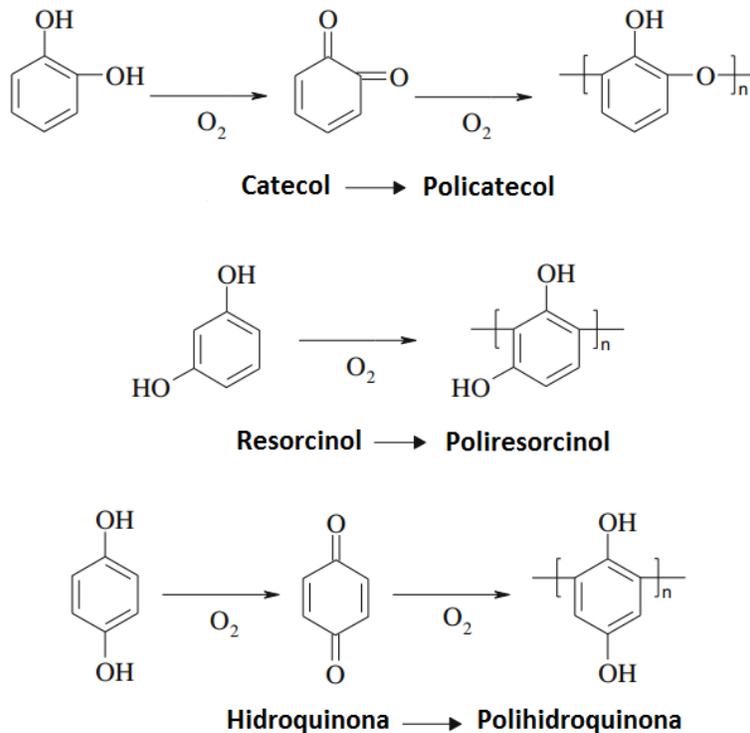


Figura 2. Algunos polímeros que se forman a partir de la catálisis de la oxidación de compuestos difenólicos por la lacasa. Modificado de Sun *et al.*, 2013.

La actividad oxidante de las lacasas se puede incrementar si se utilizan moléculas pequeñas llamadas mediadores (Morozova *et al.*, 2007b). Estas moléculas son sustratos de las lacasas y sus formas oxidadas son suficientemente estables para difundir al seno de la solución y oxidar a otra molécula que la lacasa no es capaz de transformar. Estos mediadores se usan para oxidar compuestos con un potencial redox (E°) mucho mayor que el de la lacasa (sección 2) o que por su estructura presentan un impedimento estérico en el sitio activo de la enzima; por ejemplo, mediante el uso de mediadores se ha logrado oxidar un componente no fenólico de la lignina: el alcohol veratrílico (Bourbonnais y Paice, 1990). Los mediadores más estudiados han sido el 1-hidroxibenzotriazol (HBT), el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y el 2,2,6,6-tetrameil-1-piperidiniloxil (TMPO), (Widsten y Kandelbauer, 2008). La estructura química de algunos mediadores sintéticos se muestra en la figura 3.

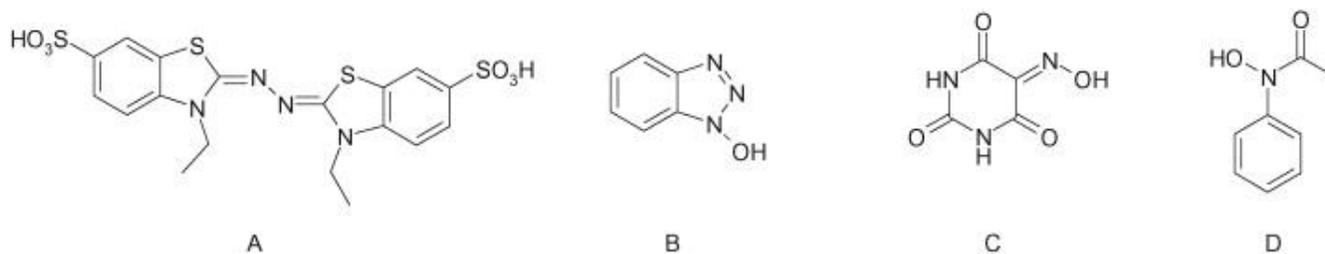


Figura 3. Algunos mediadores sintéticos que se utilizan en conjunto con las lacasas para oxidar compuestos que la enzima no es capaz de transformar por sí misma. A) ABTS, B) HBT, C) Ácido violúrico, D) N-hidroxiacetanilida. Modificado de Widsten y Kandelbauer (2008).

Como se mencionó anteriormente, el sitio activo de las lacasas está compuesto por cuatro iones de cobre (figura 4). El ion de cobre que se encuentra en el sitio denominado T1 tiene un número de coordinación de 3 o 4, donde los ligantes principales son residuos de histidina, cisteína y metionina. Este ion tiene una absorbancia máxima a una longitud de onda de 610 nm y presenta señal por espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR), ya que en el estado oxidado (número de oxidación: 2+) tiene un electrón desapareado. Además, es el primer aceptor de electrones durante la oxidación del sustrato y es el responsable de conferirle un color azul a la enzima en disolución acuosa, debido a una transferencia de carga del grupo tiolato de la cisteína al ion de cobre (Solomon *et al.*, 1996). El electrón captado por el ion de cobre T1 se transfiere a través de un motivo conservado de histidina-cisteína-histidina para llegar a los tres iones de cobre restantes, los cuales se encuentran formando un complejo trinuclear (TNC). Allí ocurre la reducción del oxígeno molecular a dos moléculas de agua por la transferencia de cuatro electrones (Farver y Pecht, 2011). El TNC está conformado por un ion de cobre denominado T2, que puede ser detectado por EPR, mas no por espectrofotometría de UV-Visible, y dos iones de cobres T3 que están unidos mediante un ion hidroxilo y pueden ser detectados por su absorbancia a 330 nm (Morozova *et al.*, 2007a).

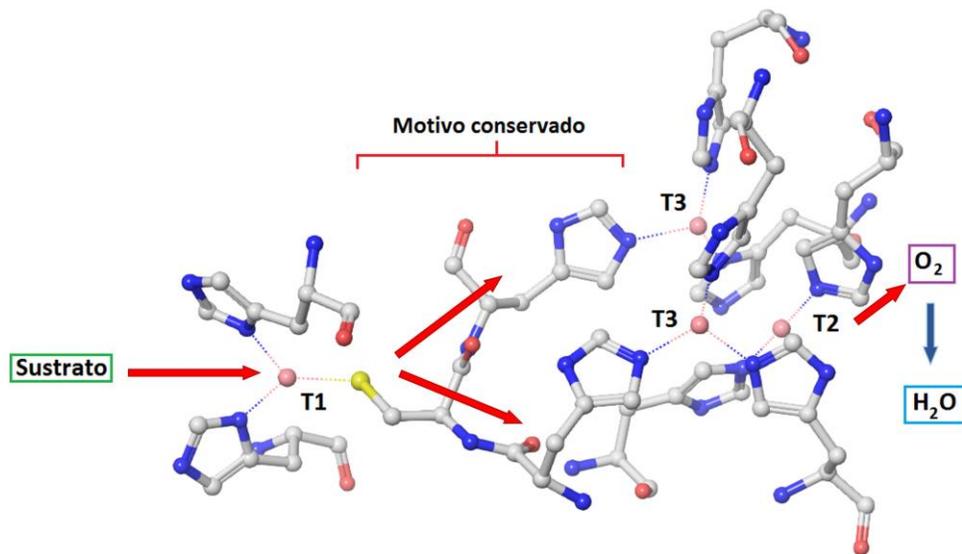


Figura 4. Sitio activo de la lacasa de *Coriolopsis gallica* a pH 5.5. Las esferas rosas representan los iones de cobre; las flechas rojas, el flujo de electrones. El motivo conservado en muchas lacasas consiste en dos residuos de histidina y uno de cisteína. Cuatro moléculas de sustrato son oxidadas para reducir una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua (no se muestran los coeficientes estequiométricos). Figura modificada de De la Mora *et al.*, 2012 (PDB: 4A2E).

Las lacasas de hongos están conformadas por tres dominios; cada uno de ellos tiene una arquitectura de barril beta de llave griega (figura 1). Este tipo de plegamiento es parecido al de la proteína pequeña cupredoxina, por lo que comúnmente se hace referencia a los dominios de las lacasas como “tipo cupredoxina”. Cada dominio cuenta con dos láminas beta con topología de sándwich de cuatro hebras. El TNC se encuentra en la intersección entre el dominio 1 y 3, mientras que el cobre T1 se encuentra claramente en el dominio 3. El dominio 2 no tiene un contacto directo con el sitio activo, pero se cree que tiene un papel importante en la estabilidad de la proteína durante el plegamiento (Mot y Silaghi-Dumitrescu, 2012).

Las lacasas tienen una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas. Un área donde estas enzimas tienen un gran potencial es en la biorremediación, pues son capaces de transformar compuestos contaminantes con gran eficiencia y tienen requerimientos simples de reacción: un sustrato orgánico y oxígeno molecular (Durán y Esposito, 2000). Las lacasas tienen esta ventaja con respecto a otras enzimas oxidantes, como las peroxidasas, ya que estas últimas requieren peróxido de hidrógeno como agente oxidante (Welinder, 1992). Además, las lacasas se han expresado con mayor facilidad de manera heteróloga que las peroxidasas, lo

cual representa una ventaja en aplicaciones industriales (Ayala *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha demostrado que las lacasas son capaces de transformar hidrocarburos policíclicos aromáticos, fenoles, aminofenoles, colorantes industriales, pesticidas organoclorados y diaminas (Gianfreda *et al.*, 1999). Estas transformaciones las pueden realizar solubles o unidas a un soporte (inmovilizadas). Además de su potencial en la descontaminación del ambiente, las lacasas tienen aplicación en la deslignificación de la madera, biosensores, celdas de biocombustible, decoloración de efluentes textiles, síntesis orgánica y la industria de alimentos (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2006).

2-La relación entre el potencial redox y la actividad de las lacasas

Un factor importante que determina la capacidad catalítica de las lacasas es el potencial redox (E°) del ion de cobre T1 (figura 5). El E° es la tendencia de una molécula a reducirse; es decir, a captar un electrón. Xu (1996) realizó un estudio cinético donde demostró que la velocidad de oxidación de un sustrato es función de la diferencia de E° entre el cobre T1 de las lacasas y el sustrato (ΔE°); esto es, los sustratos de bajo E° eran oxidados con mayor velocidad (4 veces más rápido) que los de alto E° . Aunque el E° no es el único factor que modula la velocidad de reacción, sí es la fuerza motriz en los procesos de transferencia electrónica. Esta relación entre ΔE° y la velocidad de reacción se deriva de la teoría de Marcus de transferencia electrónica y se puede describir con la ecuación 1. La ecuación de Marcus es la teoría que mejor describe hasta la fecha otros procesos biológicos y enzimáticos que involucran la transferencia de electrones, tanto intra como intermoleculares (Marcus, 1956).

$$k_{ET} = k(r) v e^{(-\Delta G^*/(RT))} \quad (1)$$

$$\Delta G^* = 0.25\lambda ([1 + \Delta G^\circ] / \lambda)^2 \quad (2)$$

$$\Delta G^\circ = -n F \Delta E^\circ \quad (3)$$

donde los términos de energía tienen unidades de eV, n es el número de electrones transferidos, el potencial redox E° se mide en V, F es la constante de Faraday en $eV \text{ mol}^{-1} \text{ V}^{-1}$, R es la constante de los gases en $eV \text{ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, T es la temperatura absoluta en K y los términos $k(r)$ y v se consideran constantes en los procesos de catálisis enzimática.

La constante de velocidad de transferencia de electrones (k_{ET}) depende de factores termodinámicos que pueden determinarse experimentalmente. Por ejemplo, la energía de reorganización, λ (la energía debida al movimiento espacial de los átomos durante el proceso de transferencia de electrones) y la diferencia del potencial redox entre el sustrato y la enzima, E° (ecuaciones 2 y 3). La diferencia de potencial redox es el factor dominante en la velocidad de transferencia de electrones en las oxidorreductasas (Vázquez-Duhalt *et al.*, 2014).

Se ha propuesto que el E° del cobre T1 depende de la distancia que hay entre este y uno de sus ligantes (histidina). Así, la distancia es mayor en las lacasas de alto E° (Piontek *et al.*, 2002; Shleev *et al.*, 2005). Sin embargo, existen otros factores que modulan el E° de la enzima, como la identidad del ligante o sustituyente axial en el sitio T1. En las lacasas de bajo E° el sustituyente axial por lo general es un residuo de metionina. Por otro lado, en las lacasas de alto E° el sustituyente es un residuo de fenilalanina o de leucina.

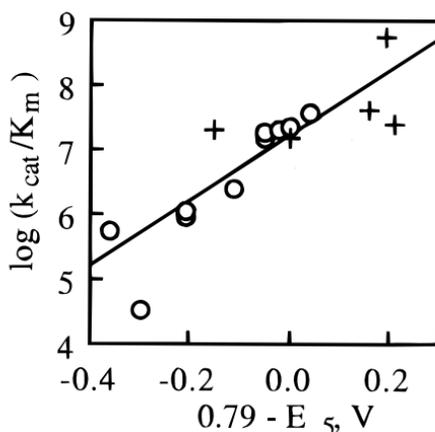


Figura 5. Dependencia semilogarítmica entre la eficiencia catalítica de la lacasa recombinante de *Polyporus pinsitus* y la diferencia del potencial redox entre el ion de cobre T1 y el potencial redox de diferentes fenoles sustituidos en posición *para* a pH 5.0. A mayor diferencia de potencial redox, mayor eficiencia catalítica. Modificado de Xu, 1996.

Se han realizado mutaciones puntuales en algunas lacasas para evaluar el efecto de la identidad del sustituyente en el E° del T1. En algunos casos, por ejemplo en el cambio de una fenilalanina por una metionina, se observó una disminución importante del E° ; no obstante, en otras lacasas el cambio de sustituyente axial no tuvo un efecto significativo con

relación al E° del T1. Más aún, en algunos casos el cambio del sustituyente tuvo un efecto positivo en la actividad (Xu *et al.*, 1998). En suma, la identidad del sustituyente axial no es el único factor que determina el E° del T1, pero puede ser un factor importante en algunas lacasas.

Por otra parte, se ha propuesto que el E° depende de la geometría del complejo de coordinación del T1. Las geometrías distorsionadas (planas) hacen más deficiente de electrones al ion de cobre, lo que explica su “avidez” por captar un electrón. Es evidente, pues, que el E° del T1 está modulado por diversos factores, donde la contribución relativa de cada uno de ellos da como resultado el potencial característico del T1 para cada lacasa.

Lo discutido anteriormente resulta importante en el contexto de la inactivación de la lacasa. En una reacción con compuestos fenólicos, el E° de los sustratos podría determinar la velocidad de inactivación de la enzima. Como se discutirá en la siguiente sección, es posible que la pérdida de actividad en las lacasas esté asociada con la reacción de los radicales libres fenoxilo que se producen durante la reacción. Si la diferencia de E° determina la velocidad de transferencia de electrones, la cantidad de radicales libres que se produzcan por unidad de tiempo dependerá del E° del sustrato. En este sentido, la velocidad de oxidación de los sustratos de bajo E° sería mayor que la de los sustratos de alto E° . Esto traería como consecuencia una mayor cantidad de radicales libres para un sustrato de bajo E° . Por otra parte, la velocidad de oxidación de un sustrato de alto E° sería menor, pero los radicales serían más reactivos que los correspondientes a un sustrato de bajo E° , por lo que el radical reaccionaría más rápido con algún residuo de la enzima. Estos dos efectos (la concentración de radicales y su poder oxidante) podrían estar determinando la velocidad de inactivación en las lacasas.

3-Pérdida de actividad en las lacasas

Existen algunos trabajos donde se reporta que las lacasas pierden actividad durante la reacción con diferentes sustratos y que esto podría estar relacionado con la producción de radicales libres fenoxilo, al igual que en el caso de las peroxidasas (Huang *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009), Muchas enzimas se inhiben por la formación de los productos de reacción, pero

la información disponible sobre la inactivación de las peroxidases resulta útil para tratar de explicar los mecanismos involucrados en la pérdida de actividad de las lacasas. Aunque las peroxidases son enzimas muy diferentes a las lacasas (contienen un grupo hemo en su sitio activo y utilizan peróxido de hidrógeno como agente oxidante), también oxidan compuestos fenólicos para producir radicales libres fenoxilo capaces de inactivar a la enzima. A continuación, se discuten algunos trabajos relacionados con la inactivación de las lacasas y peroxidases (sección 4).

Gianfreda y colaboradores (1998) observaron que la lacasa de *Cerrena unicolor* perdía actividad durante la reacción con 2,4-diclorofenol, cuyo producto era un polímero, como normalmente se observa tras la oxidación de fenoles. Determinaron que la lacasa era capaz de transformar el 96% del sustrato a bajas concentraciones (0.03 mM), mientras que sólo era capaz de transformar el 50% a altas concentraciones (0.34 mM). Aunque el recambio (cantidad máxima de sustrato transformado) fue mayor en la reacción con alta concentración inicial de sustrato (0.1720 mM contra 0.0288 mM), la actividad específica fue menor en esta condición. Es decir, se necesitaba una mayor cantidad de enzima para convertir grandes cantidades de sustrato. Además, en ensayos de actividad residual (medida con ABTS) durante la reacción con 2,4-diclorofenol, encontraron que a mayor concentración inicial de sustrato, menor actividad residual en el ensayo con ABTS. Esta observación era válida tanto para las mediciones sólo del sobrenadante como de la mezcla íntegra (sin retirar el polímero que se formaba durante la reacción). Con estos datos, los autores hipotetizaron que la enzima quedaba atrapada en la fracción insoluble (polímeros), lo que ocasionaba su inactivación. Sin embargo, no descartaron que los primeros productos de la reacción (radicales libres) sean los responsables de la inactivación.

En un estudio realizado por Li y colaboradores (1999) con cuatro lacasas diferentes (*Trametes villosa*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Botrytis cinerea* y *Myceliphthora thermophila*), observaron que los mediadores ácido violúrico y 1-hidroxibenzotriazol (HBT) inactivaban a las enzimas. En una reacción con 10 mM de ácido violúrico, las enzimas perdían más del 90% de su actividad en dos horas. La adición de compuestos que podrían reaccionar con los radicales libres formados a partir de los mediadores, por ejemplo dímeros de lignina no fenólicos, disminuía significativamente la inactivación: las enzimas se inactivaban al 90%

después de 5 horas. Los autores proponen que los radicales libres producidos tras la oxidación del mediador son los responsables de inactivar a las enzimas. Así, la presencia de otra molécula orgánica disminuía la probabilidad de que el radical libre reaccionara con la enzima.

En otro trabajo, se estimó que la lacasa recombinante de *Myceliophthora thermophila* pierde irreversiblemente más del 60% de su actividad después de 40 minutos de reacción con 1 mM de metil-siringato (Kulys *et al.*, 2002). Se observó que la adición de 50 μ M de seroalbúmina humana aumentaba la capacidad de recambio de la enzima en un orden de magnitud. Los autores proponen que la seroalbúmina captura los radicales libres que se forman durante la reacción, lo cual evita que reaccionen con la lacasa para inactivarla. Por otra parte, Kulys y colaboradores (2003) demostraron que el consumo de oxígeno en la reacción de la lacasa recombinante de *Polyporus pinsitus* con 1-naftol aumentaba en presencia de ciertos aditivos. Por ejemplo, al añadir seroalbúmina bovina (50 ppm) aumentaba la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de la enzima al doble y se disminuía la inactivación (k_{in}) casi a la mitad. Además, estudiaron si intermediarios del 1-naftol era capaces de interaccionar con los diferentes polímeros (v.g., N-vinilpirrolidona, etil acrilato, hidroxietil celulosa, dextrán 500, polietilenglicol), mediante cambios en el espectro de fluorescencia del sustrato para obtener evidencia relacionada con el mecanismo de protección de los aditivos. Los resultados obtenidos les permitieron sugerir que los polímeros pueden interaccionar con los radicales libres producidos durante la reacción y de esta manera evitan que los radicales reaccionen con la enzima. Observaron que la naturaleza química del polímero era determinante para el efecto de protección, pues no cualquiera podía proteger a la lacasa. Por ejemplo, polímeros con cargas positivas como el dietil-aminoetil-dextrano no tenían un buen efecto protector, puesto que en su presencia no aumentaba el consumo de oxígeno y sí disminuía la velocidad inicial de oxidación del sustrato (se inactivaba la enzima) con respecto a las reacciones con polímeros protectores, como el polietilenglicol. De acuerdo con los autores, lo anterior podría deberse a que los polímeros de este tipo interaccionan preferentemente con la propia enzima y no son capaces de interaccionar con los radicales libres.

Kurniawati y Nicell (2009) desarrollaron un modelo matemático que pudiera explicar los perfiles de oxidación de sustrato, consumo de oxígeno y pérdida de actividad obtenidos

experimentalmente para las lacasas. Su modelo consideró diversos factores durante la reacción que pudieran llevar a un estado inactivo (proceso irreversible) a la enzima; estos fueron la inactivación causada por los radicales libres, la adsorción de la enzima al polímero, la temperatura (25°C) y el pH (6.0). Sus mediciones experimentales se realizaron utilizando a la lacasa de *Trametes versicolor* en la reacción de oxidación de fenol. Encontraron que su modelo describía con gran precisión los datos experimentales y que sólo era necesario incluir el término correspondiente a la inactivación por radicales libres, pues las otras variables no contribuían significativamente a la reducción del error entre los datos experimentales y el modelo propuesto. No obstante, los autores señalan que su modelo podría ser válido sólo con las concentraciones bajas de fenol utilizadas (hasta 3 mM) y que sería necesario incluir los demás factores de inactivación en el modelo para explicar mejor los datos que se obtuviesen para concentraciones mayores de sustrato. A pesar de esto, este trabajo aporta evidencia cinética sobre el papel de los radicales libres en la estabilidad operacional de la lacasa.

4-Pérdida de actividad en otras oxidorreductasas

Con respecto a otras oxidorreductasas, se ha visto que los radicales fenoxilo (productos de la reacción) inactivan a la ascorbato peroxidasa, lactoperoxidasa, peroxidasa tiroidea, dopamina β -hidroxilasa y la peroxidasa de *Coprinus cinereus* a concentraciones iguales o menores a 1mM de diferentes fenoles (Aitken y Heck, 1998). Se ha observado que la naturaleza electro-donadora o electro-atrayente del sustituyente en posición *para* del fenol influye en la velocidad de inactivación de estas enzimas; los fenoles con menor E° (grupos electro-donadores) tienden a inactivar más lento a las enzimas. Sin embargo, los fenoles sustituidos con los grupos electro-donadores $-\text{OH}$ y $-\text{NH}_2$ se comportan distinto (tienden a inactivar a las enzimas rápidamente), quizás por un mecanismo de formación de quinonas.

En el caso de la peroxidasa de rábano blanco, se ha observado que a concentraciones bajas de fenol (<50 mM) el 6% de la pérdida de actividad se debe a que la enzima se adsorbe a los polímeros que forma por la reacción, mientras que el resto de la actividad se debe a la destrucción del grupo hemo por el ataque de radicales fenoxilo (Huang *et al.*, 2005).

Un estudio reciente muestra que las peroxidases de *C. cinereus* y una isoenzima de la peroxidasa de rábano blanco tienen residuos de fenilalanina en el sitio activo propensos a formar aductos con los radicales fenoxilo, lo cual lleva a la inactivación de las enzimas. En la peroxidasa de rábano blanco, se realizaron mutaciones puntuales (F68A/F142A/F143A/F179A) que hicieron a la enzima 40 veces más estable durante la oxidación de fenoles (figura 6). Por otro lado, en la peroxidasa de *C. cinereus* una sola mutación (F230A) ocasionó un aumento de hasta 80 veces la estabilidad de la enzima durante la reacción (Kim *et al.*, 2012). Los autores proponen que un residuo de fenilalanina cerca del sitio activo de las enzimas es un residuo clave para el ataque de los radicales fenoxilo. La lacasa tiene residuos de fenilalanina en la zona del sitio activo y oxida diferentes fenoles para formar radicales libres por un mecanismo similar a otras oxidorreductasas. Es posible que estos radicales fenoxilo estén involucrados en el mecanismo de inactivación de la enzima en este tipo de reacciones (figura 7).

Por otra parte, se ha propuesto que la formación del polímero polifenólico puede inactivar a las peroxidases (Kim *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 1998), aunque no en todos los casos. Por una parte, Wu y colaboradores (1998) reportan hasta un 60 % de pérdida de actividad al incubar a la peroxidasa de rábano blanco (que no ha reaccionado con fenol), con polímero formado durante la reacción con fenol. Determinaron que el polímero tiene un límite de saturación y esto depende del tiempo de reacción de la enzima con los fenoles. Sin embargo, Kim y colaboradores (2009) determinan que la peroxidasa de *C. cinereus* no se inactiva al incubarse con el polímero, pero sugieren que es necesario evaluar cada caso particular, ya que en cada enzima las interacciones con el polímero podrían ser diferentes.

5-Lacasa de *Coriolopsis gallica*

En este trabajo se usará como modelo la lacasa de *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 (CgL). Esta lacasa fue aislada de un basidiomiceto capaz de decolorar aguas residuales de la industria del papel (Calvo *et al.*, 1998). Presenta una de las eficiencias catalíticas más altas con respecto a otras lacasas ($46.2 \text{ U L mg}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$ contra $25.0 \text{ U L mg}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$ de la

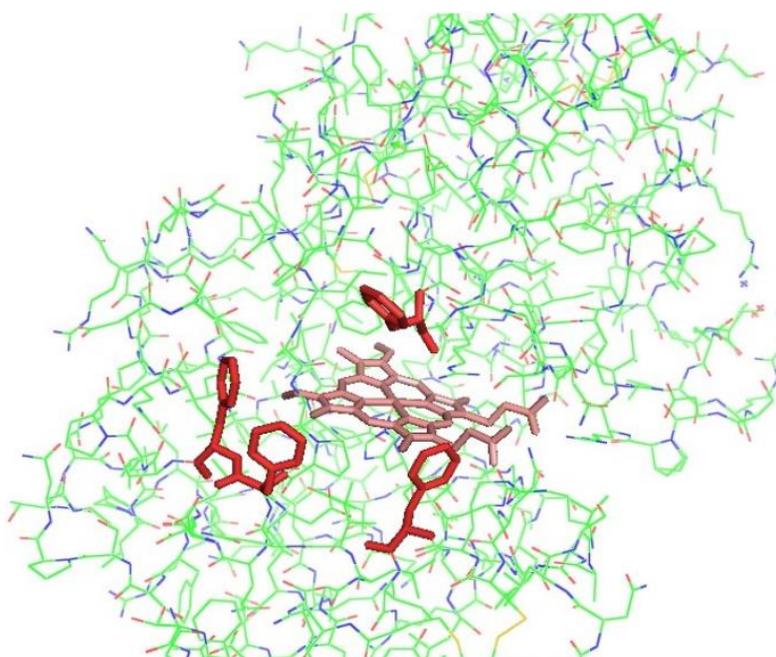


Figura 6. Sitio activo de la peroxidasa de rábano blanco donde en rosa se muestra el grupo hemo de la enzima y en rojo los residuos de fenilalanina que forman aductos con los radicales libres, de acuerdo con Kim *et al.*, 2012. Estos residuos alrededor del sitio activo fueron mutados y se obtuvo una variante más estable.

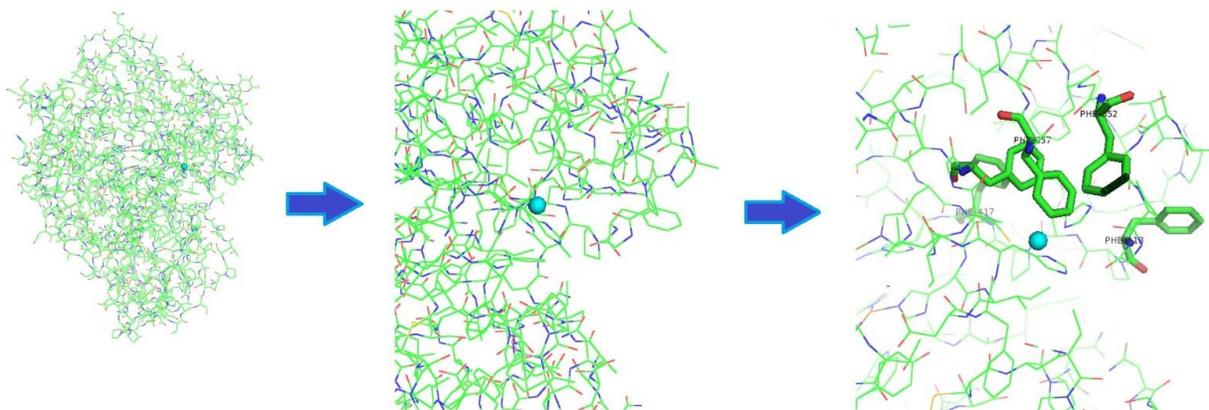


Figura 7. Lacasa de *Corioloopsis gallica* donde se muestra la localización del sitio activo en una cavidad de la enzima. El ion de cobre T1 está rodeado por varios residuos de fenilalanina (F352, 357, 413, 417, 481) que podrían ser el blanco del ataque de los radicales libres.

lacasa de *Trametes versicolor* UAMH 8272 o 32.0 U L mg⁻¹ μmol⁻¹ de la lacasa de *Pleurotus ostreatus* UAMH 7988 evaluada con el ensayo de oxidación de siringaldazina) (Tinoco *et al.*, 2001). Esta lacasa tiene una masa molecular de 66 kDa (SDS-PAGE) o de 56.6 kDa (MALDI-TOF), un punto isoeléctrico de 3.4 y está glicosilada en un 21% (Vandertol-Vanier *et al.*, 2002). Posee dos dímeros de *N*-acetilglucosamina unidas a residuos de asparagina (Asn75 y Asn 454) (PDB: 4A2E).

La glicosilación en las lacasas es importante en la resistencia de la enzima ante la actividad de proteasas, la termoestabilidad, la secreción de la enzima al medio extracelular y existen algunos estudios que indican que también afecta la actividad oxidante de la enzima (Rodgers y colaboradores, 2009). Por una parte, se sabe que la lacasa de *Pycnoporus sanguineus* CelBMD001 tiene una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) igual en la forma nativa y desglicosilada enzimáticamente (Vite-Vallejo *et al.*, 2009). Sin embargo, en este mismo trabajo se observó que a bajas temperaturas (20°C) la actividad con ABTS era un 20% menor en la lacasa desglicosilada. Además, a pH 3 la actividad era un 23% menor en la lacasa desglicosilada. Asimismo, la vida media de esta enzima a 20°C era tan solo 15 h, comparada con la lacasa nativa que tiene una vida media de 35 h. Por último, la actividad de la enzima desglicosilada era 30% menor en la presencia de 1 M de urea con respecto a la lacasa nativa. Los autores proponen que esta diferencia de actividad y estabilidad se debe a variaciones locales de la estructura de la enzima, sobre todo cerca del sitio activo. Sin embargo, es necesario estudiar con detalle cuáles podrían ser esas variaciones estructurales. Otro trabajo muestra que la lacasa de *Trametes trogii* expresada heterológicamente en una cepa de *Kluyveromyces lactis* es capaz de transformar en un 30% más el colorante azul índigo en presencia del mediador HBT (1 mM) con respecto a la lacasa silvestre (aislada directamente de *T. trogii*) (Ranieri *et al.*, 2009). Esta lacasa recombinante está hiperglicosilada con respecto a la lacasa silvestre. Los autores sugieren que esta diferencia en el grado de glicosilación permite que la lacasa tenga un plegamiento distinto, lo cual ayuda a mejorar la actividad de una manera impredecible. No obstante, sería importante ahondar más en este aspecto para caracterizar esos posibles cambios en el plegamiento. Para el caso de la CgL, experimentos en nuestro laboratorio han mostrado que la actividad con siringaldazina es igual en la CgL, tanto en la forma glicosilada como en la desglicosilada enzimáticamente con PNGasa F de *Flavobacterium meningosepticum*.

Se ha demostrado que la CgL puede oxidar fenoles y también compuestos recalcitrantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, así como carbazol, N-etil-carbazol, dibenzofurano y fluoreno con la ayuda de mediadores. El modelo de la estructura tridimensional obtenido a partir de datos cristalográficos de la lacasa comercial de *C. gallica* se encuentra disponible en el Protein Data Bank (De la Mora *et al.*, 2012). Un análisis de este modelo muestra que existen residuos de fenilalanina cercanos al sitio T1 que podrían ser el

blanco de la reacción de los radicales libres. Si un radical fenoxilo formase un aducto con alguno de estos residuos, el espacio en el sitio activo se reduciría y esto causaría un impedimento estérico para una molécula de sustrato. Esta modificación en la estructura de la lacasa sería inactivante; es decir, no sería posible que la enzima recuperase su actividad original. Aunque es posible que los radicales reaccionen con otros residuos de bajo E° , como tirosinas o triptófanos, estos se encuentran en regiones alejadas del sitio activo, por lo que en principio no causarían la inactivación de la enzima.

Con toda esta información, es posible que el mecanismo de inactivación de la lacasa esté relacionado directamente con la reacción de los radicales libres con residuos específicos de la enzima, que son claves para su correcto funcionamiento. Asimismo, el polímero podría tener un papel importante en la inactivación durante la reacción (figura 8). Ambos eventos no son mutuamente excluyentes y es importante determinar la contribución relativa de cada fenómeno. En ese sentido, se planteó la hipótesis de trabajo para este proyecto.

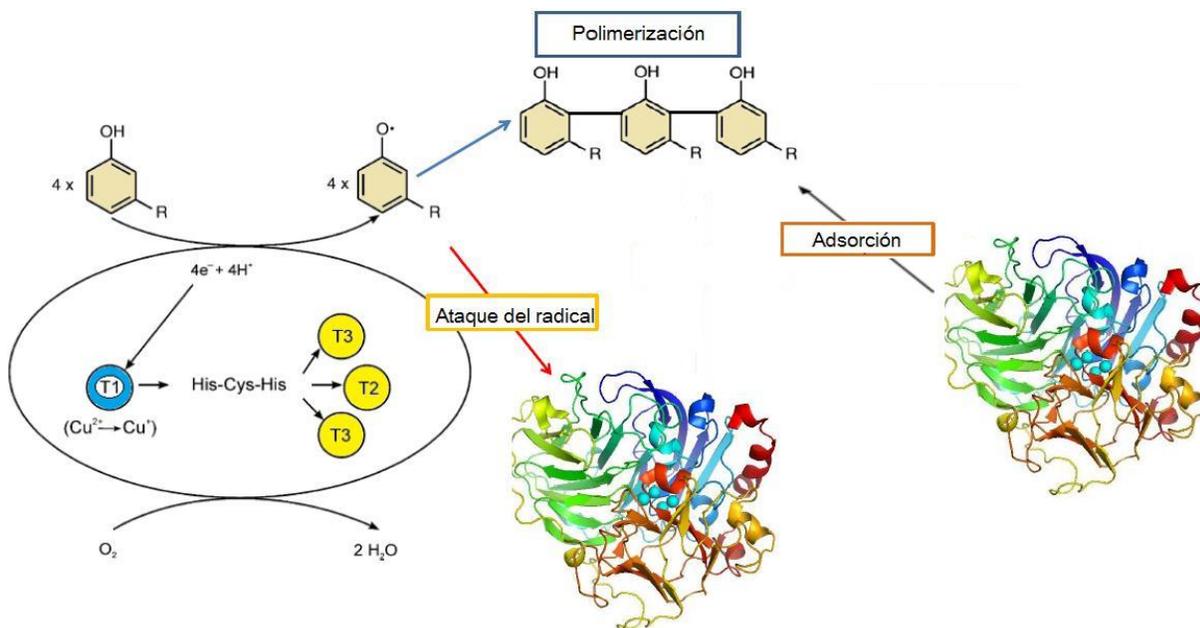


Figura 8. Mecanismo propuesto de inactivación de la CgL durante la oxidación de fenoles. La oxidación del sustrato en el sitio T1 genera un radical libre que podría reaccionar con residuos importantes en el sitio activo de la enzima. Por otra parte, el producto de polimerización de los radicales libres podría atrapar a la enzima, lo que causaría su inactivación. Modificado de Baldrain, 2006.

Hipótesis

La pérdida de actividad en la lacasa de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 durante la oxidación de fenoles se debe a la reacción química de los radicales libres con la enzima y a la adsorción de la misma con el polímero.

Objetivos

Estudiar el fenómeno de inactivación de la lacasa de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 durante la oxidación de fenoles.

Como objetivos particulares:

- Estudiar cinéticamente la pérdida de actividad de esta lacasa con fenoles de diferente potencial redox.
- Estudiar la adsorción e inactivación de esta enzima durante su interacción con el polímero.
- Proponer un mecanismo de pérdida de actividad de esta lacasa durante la oxidación de fenoles.

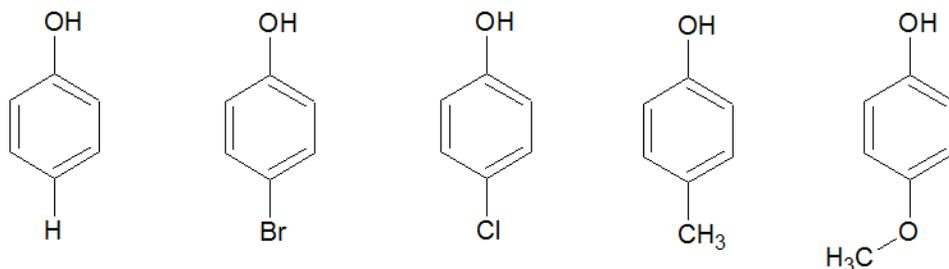
Materiales y métodos

Lacasa de *Corioloipsis gallica* UAMH 8260 y fenoles

La cepa de *C. gallica* UAMH 8260 fue donada amablemente por el Dr. Michael A. Pickard de la Universidad de Alberta, Canadá. La lacasa se obtuvo mediante el método desarrollado por Román y colaboradores (2010). Se realizó un cultivo del hongo en un fermentador con 100 L de cultivo a base de Bran Flakes (Kellogg's), adicionado con sulfato de cobre para inducir la producción de lacasa. El medio extracelular se concentró y la lacasa se precipitó con sulfato de amonio. Posteriormente se realizó una cromatografía de intercambio iónico débil en una columna con DEAE-Celulosa (Sigma-Aldrich®), donde se utilizó una disolución de NaCl para eluir a la lacasa. Después se realizó una cromatografía de intercambio iónico fuerte en una columna con la resina High Q (Bio-Rad). La enzima utilizada en este trabajo provino de un lote realizado por la técnico académico Biól. Rosa Román Miranda.

La enzima se mantuvo en reserva a -20°C en amortiguador de fosfatos 60 mM a pH 6.0 con 50% de glicerol. Para la realización de los experimentos, la enzima se dializó en una membrana de celulosa reconstituida (Spectrum®, punto de corte: 10 kDa) contra un amortiguador de fosfatos 60 mM a pH 6.0. La lacasa se mantuvo a 4°C antes de utilizarla.

Los diferentes sustratos (fenol, 4-bromofenol, 4-clorofenol, 4-metilfenol y 4-metoxifenol) se prepararon en disolución acuosa a una concentración de 100 mM y se mantuvieron a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Todos los fenoles fueron obtenidos de Sigma-Aldrich®.



Ensayos de actividad enzimática y concentración de proteína total

La actividad enzimática de la lacasa se determinó mediante un ensayo espectrofotométrico donde se midió la velocidad de oxidación de siringaldazina (Harkin y Obst, 1973). Las mediciones se realizaron en un equipo DU[®]730 Life Science Spectrophotometer de la marca Beckman Coulter[®]. En este ensayo se mide el cambio de absorbancia (abs) del producto de la reacción (coeficiente de extinción molar, $\epsilon=64 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) con respecto al tiempo a $\lambda=530 \text{ nm}$. Las reacciones se realizaron en una celda de cuarzo de 1 mL con 1 cm de espesor (distancia que recorre la luz a través de la celda) a temperatura ambiente. Una unidad de actividad enzimática (U) corresponde a la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de siringaldazina por minuto. En un ensayo típico se utilizaron 890 μL de un amortiguador de succinatos 60 mM pH 4.5, 100 μL de siringaldazina disuelta en etanol 0.5 mM (concentración final: 0.05 mM), y 10 μL de enzima. Dadas las condiciones del ensayo, el valor de actividad enzimática por unidad de volumen se calculó mediante una simplificación práctica de la ley de Beer-Lambert:

$$\text{U/mL} = (\Delta\text{abs}/\text{min}) / \epsilon * (\text{factor de dilución})$$

donde el coeficiente de extinción molar tiene unidades de $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La concentración de proteína total se midió con el método de Bradford (Kruger, 2009). Se elaboró una curva de calibración con seroalbúmina bovina (BSA) a pH 4.5 con un amortiguador de succinatos 60 mM. Las concentraciones de proteína usadas fueron 1.2, 3, 5, 7 y 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se midió por triplicado la absorbancia de las muestras (volumen final: 1 mL) a $\lambda=595 \text{ nm}$ después de incubarse por 5 minutos con 200 μL del colorante para ensayo de proteínas (Biorad[®]). Se obtuvo la ecuación de la recta ($y=0.0356x + 0.0023$, $R^2=0.9971$) que se ajustó a los diferentes valores en la gráfica de absorbancia contra concentración de proteína. El rango de detección óptimo se encontraba entre 1.2-10.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Estabilidad de la lacasa a pH 4.5

Se incubaron 0.7 U mL^{-1} de CgL en 5 mL de solución amortiguadora de succinatos, pH 4.5,

60 mM a 23°C en agitación constante en el nivel 5 de una plancha Cimarec (Thermo Scientific®). Se tomaron alícuotas de 10 µL para realizar la medición de actividad residual con siringaldazina cada 30 min. Se evaluó la estabilidad de la CgL hasta las 2 h. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Perfiles de pérdida de actividad de la lacasa en la oxidación de fenoles

Se realizaron reacciones de 5 mL en viales transparentes de policarbonato de 15 mL. La mezcla de reacción contenía amortiguador de succinatos 60 mM, pH 4.5, sustrato (0.5, 0.75 y 1 mM), y lacasa (0.08, 2 U mL⁻¹). La reacción se realizó a 23±1 °C en agitación constante en el nivel 5 de una plancha Cimarec (Thermo Scientific®). La temperatura se registraba al inicio y al final del experimento. Cada determinado tiempo se tomó una alícuota de 200 µL y se centrifugó en un microtubo de 1.5 mL a 14,000 x g durante 2 minutos en una centrífuga MiniSpin Plus de Eppendorf®. Se tomaron alrededor de 10 µL del sobrenadante del microtubo para transferirlos a una reacción en la celda de cuarzo para medir actividad residual con el ensayo de siringaldazina. Se tomaron alícuotas hasta que la actividad con siringaldazina ya no se detectó o no cambió después de varias mediciones.

Para el análisis de datos se graficó el valor de actividad residual (U mL⁻¹) contra el tiempo. Se tomaron los primeros puntos (donde la pendiente de la recta era diferente de cero) para ajustar los valores a un modelo de pérdida de actividad de primer orden. Así, se construyó una gráfica del logaritmo natural de la actividad residual contra el tiempo y se calculó la pendiente de la recta para los puntos. El valor de esta pendiente se definió como la constante de inactivación (k_{inact}):

$$\ln(\text{actividad}) = k_{inact} \times (\text{tiempo}) + \ln(\text{actividad en el } t=0)$$

donde la actividad se mide en U mL⁻¹, la k_{inact} tiene unidades de min⁻¹, y el tiempo se mide en minutos.

Efecto protector de la seroalbúmina bovina en la reacción de oxidación

Se realizó un experimento donde se añadió 10 μM de seroalbúmina bovina (BSA) a una mezcla de reacción de lacasa con 1 mM de fenol. Esto se hizo con el fin de evaluar el efecto protector de otras proteínas en la lacasa y determinar si la reacción de los radicales libres es inespecífica (Kulys *et al.*, 2002). Se midió la actividad residual de la enzima a lo largo del tiempo como en los ensayos anteriores.

Consumo de sustrato en las reacciones de oxidación de fenoles

Se realizaron reacciones como las del punto anterior para medir la conversión de sustrato. Cada determinado tiempo se tomó una alícuota de 300 μL y se agregaron 3 μL de ácido clorhídrico al 30% y se colocó la muestra en hielo para detener la reacción. Se centrifugó la muestra de la misma manera que en el punto anterior y se inyectó 100 μL al equipo de HPLC (Agilent Technologies® 1220 Infinity LC), donde se realizó una cromatografía de fase reversa a 30°C. Se utilizó una columna Ascentis® C18 (25 x 2.1 mm, 5 μm). La fase móvil consistió en una mezcla de agua y etanol con un flujo constante; el gradiente utilizado se muestra en la figura 9. El detector se estableció a $\lambda=270$ nm para el análisis de fenol y a 288 nm para el 4-metoxifenol (modificado de Bollag *et al.*, 1988). Se obtuvieron los valores del área bajo la curva del cromatograma de absorbancia contra tiempo. Los valores de concentración de sustrato residual se determinaron relativos a la concentración inicial de sustrato.

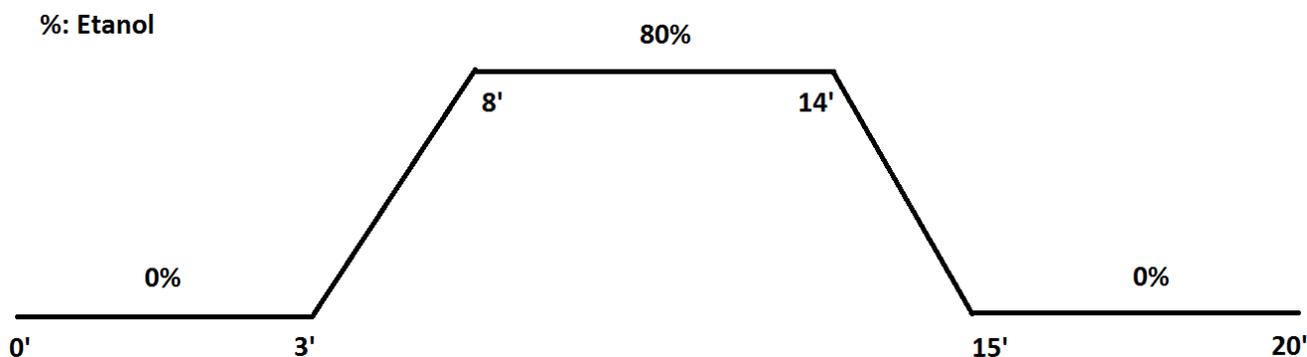


Figura 9. Gradiente utilizado para la separación y medición de la concentración de fenol y 4-metoxifenol en la reacción con la lacasa. El flujo se mantenía constante a 0.4 mL min⁻¹.

Cuantificación de proteína residual en la reacción de fenol y 4-metoxifenol

Se prepararon reacciones como las mencionadas en la sección de “Perfiles de pérdida de actividad de la lacasa en la oxidación de fenoles” y se midió la cantidad de proteína total en el sobrenadante antes y después de una hora de reacción de la lacasa con fenol y 4-metoxifenol. La concentración inicial de cada sustrato fue 1 mM y se utilizó 1 U mL⁻¹ de lacasa. Ambas reacciones se realizaron por triplicado a temperatura ambiente.

Ensayo de adsorción de la enzima al polímero

Se generó polímero de fenol y 4-metoxifenol mediante una reacción con exceso de enzima (10 U mL⁻¹) para 1 mM de cada sustrato durante 1.5 horas. Se centrifugó la mezcla de reacción durante 10 minutos a 14,100 revoluciones por minuto (rpm) para recuperar el polímero. Se analizó la presencia de la enzima en la fracción insoluble mediante una electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para cuantificar la afinidad de la enzima nativa por el polímero, se incubó lacasa (10 µg mL⁻¹) en presencia del polímero (1 mM, lavado con SDS al 0.5%) durante dos horas con agitación en un Labquake Shaker Rotisserie® a temperatura ambiente. Se midió la cantidad de proteína total en el sobrenadante antes y después de la incubación.

Finalmente, para cuantificar si la enzima unida al polímero tenía actividad, se lavó el polímero con amortiguador de succinatos y se agregó SDS al 0.1%. La muestra se calentó 10 min a 60°C y se recuperó el sobrenadante para realizar el ensayo de actividad con siringaldazina.

Resultados

Lacasa de Corioloipsis gallica UAMH 8260

La lacasa (CgL) utilizada para los experimentos de este trabajo tuvo un 70% de pureza de acuerdo con un análisis de imagen realizado con el software ImageJ de una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (figura 10). La actividad específica de la CgL se encontró entre 125-139 U mg⁻¹. Esta variación correspondió a diferentes muestras de CgL que fueron dializadas previo a la realización de los experimentos. La actividad de la CgL dializada disminuía considerablemente (50%) al estar almacenada a 4°C durante 3 meses. Para asegurar que la actividad específica de la enzima utilizada en los experimentos era la misma, se dializó lacasa de la que se encontraba en reserva con glicerol. La actividad específica se verificó antes de realizar un experimento mediante el ensayo de actividad con siringaldazina y la cuantificación de proteína por el método de Bradford.

Se realizaron varios intentos para purificar la enzima mediante cromatografías de intercambio iónico (DEAE-Sefarosa y High Q, Bio-Rad) e interacción hidrofóbica. No se logró aumentar significativamente la actividad específica de la lacasa con estos métodos. Por ejemplo, los mejores resultados se obtuvieron con la cromatografía de interacción hidrofóbica y se logró aumentar la actividad específica tan solo en un 4%. Por otra parte, un zimograma donde se añadió siringaldazina mostró una sola banda con actividad lacasa, que correspondía a la del tamaño esperado para la lacasa de *Corioloipsis gallica* UAMH 8260 (Suplementaria 1).

Cinética de inactivación de la lacasa durante la oxidación de fenoles

Los datos de actividad residual de la CgL durante la reacción con diferentes fenoles mostraron una disminución de la actividad con siringaldazina a lo largo del tiempo evaluado (20-40 min). Se realizó un control para determinar que la disminución de actividad de la enzima se debía a la reacción con el fenol y no por la presencia misma del fenol, ya que este es un agente desnaturalizante muy utilizado en el área bioquímica. Como se observa en la figura 11, la actividad de la lacasa no disminuyó por la presencia del fenol con respecto al control, incluso la actividad fue ligeramente mayor (1.56 ± 0.05 U mL⁻¹ de la enzima con fenol,

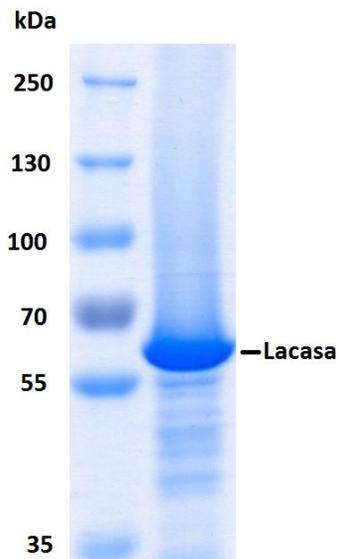


Figura 10. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de la lacasa de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260. Esta enzima tiene una masa molecular de 60 kDa y una actividad específica de 125-139 U mg⁻¹ medida con el ensayo de siringaldazina a pH 4.5 en solución amortiguadora de succinatos, 60 mM.

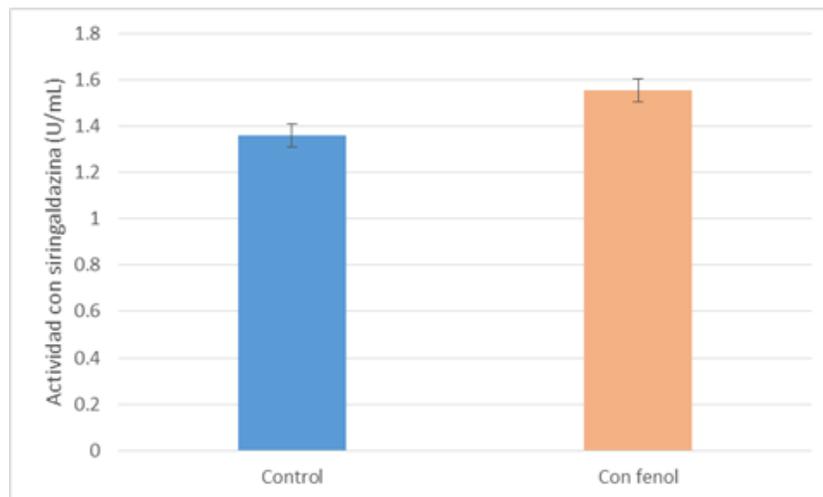


Figura 11. Actividad de la CgL (1 U mL⁻¹) con siringaldazina a pH 4.5 después de la incubación a pH 7 con fenol (1 mM, barra naranja) y sin fenol (control, barra azul) durante 1 h a 23°C. Se muestra el promedio de 3 experimentos. La actividad de la lacasa no disminuye por la presencia del fenol y este sustrato no interfiere en la medición en el ensayo con siringaldazina.

contra 1.36±0.05 U mL⁻¹). Este experimento también fue útil para corroborar que el fenol que pudiera estar presente en la medición de actividad residual no interfiere en el ensayo. La estabilidad de la CgL a la temperatura de reacción ya había sido descrita anteriormente (Vandertol-Vanier *et al.*, 2002). La CgL también es estable en la solución amortiguadora utilizada (Suplementaria 2).

El perfil de inactivación de la CgL con los sustratos evaluados (4-bromofenol, 4-clorofenol, 4-metilfenol y 4-metoxifenol), se muestra en la figura 12. La velocidad de inactivación (en $\text{U L}^{-1} \text{min}^{-1}$) de la enzima fue mayor en el caso de los sustratos de bajo potencial redox. Por ejemplo, la velocidad de inactivación para la reacción con fenol (alto E°) fue de $0.3 \text{ U L}^{-1} \text{min}^{-1}$, mientras que para la reacción con 4-metoxifenol fue de $3.5 \text{ U L}^{-1} \text{min}^{-1}$ (desviación estándar menor al 5% en ambos casos); esto es, la enzima se inactiva con una velocidad de un orden de magnitud mayor con 4-metoxifenol con respecto al fenol. No se observa una diferencia tan drástica entre el 4-bromofenol, 4-clorofenol y 4-metilfenol (figura 12). Es posible que esto se deba a que el E° de estos sustratos no es tan diferente entre sí: 870-960 mV (tabla I), mientras que la diferencia entre el fenol y el 4-metoxifenol es más amplia: 720-970 mV (tabla I). Para poder observar diferencias significativas en la inactivación de la CgL, los siguientes experimentos se realizaron sólo con el sustrato de mayor E° (fenol) y el de menor E° (4-metoxifenol).

Se evaluaron diferentes concentraciones (0.5, 0.75 y 1 mM) de fenol y 4-metoxifenol para observar el efecto de la concentración de sustrato en la inactivación. A concentraciones iniciales más altas de sustrato, la velocidad de inactivación era mayor. Por ejemplo, para el caso del fenol, la velocidad de inactivación en la reacción con 0.5 mM de fenol fue de $10.7 \pm 1.1 \text{ U L}^{-1} \text{min}^{-1}$, mientras que para la reacción con el doble de sustrato (1 mM), fue de $18.9 \pm 0.7 \text{ U L}^{-1} \text{min}^{-1}$ (Suplementaria 3). Este mismo comportamiento ocurrió con el 4-metoxifenol: $3.1 \pm 0.7 \text{ U L}^{-1} \text{min}^{-1}$ para la reacción con 0.5 mM, contra $4.0 \pm 0.1 \text{ U L}^{-1} \text{min}^{-1}$ para la reacción con 1 mM (Suplementaria 4). En este caso, el incremento en la velocidad de inactivación fue tan solo del 29%, comparado con un incremento del 76% en el caso de la reacción con fenol. Esta información sugiere que la CgL es más sensible a la concentración de radicales libres de fenol que a la de radicales libres de 4-metoxifenol.

Los datos de los perfiles de inactivación se ajustaron a un modelo de primer orden, donde una relación semilogarítmica permite obtener el valor de la constante de inactivación (k_{inact}). Este valor corresponde a la pendiente de una ecuación lineal, donde el logaritmo natural de la actividad residual de la CgL depende de una constante de inactivación en un tiempo dado de reacción y del logaritmo natural de la actividad inicial de la enzima:

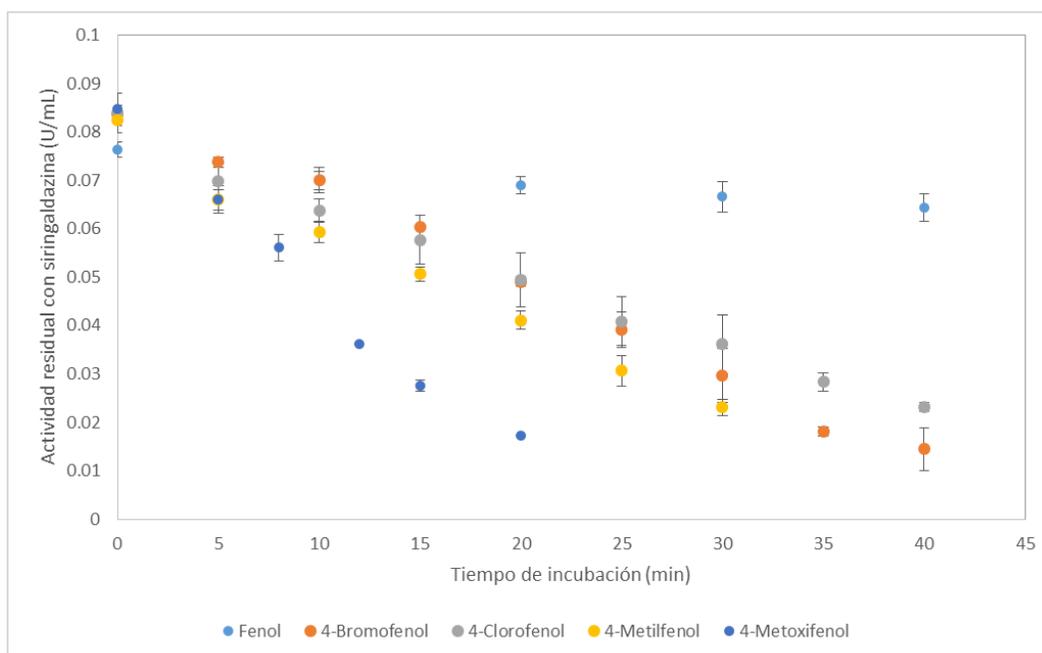


Figura 12. Perfil de inactivación de la CgL con fenol, 4-bromofenol, 4-clorofenol, 4-metilfenol y 4-metoxifenol para la reacción con 1 mM de sustrato, 0.08 U mL⁻¹ de CgL en solución amortiguadora de succinatos, pH 4.5, 60 mM, a 23°C. Las mediciones se realizaron por triplicado. La velocidad de inactivación es más alta con los sustratos de menor potencial redox.

$$\ln(\text{Actividad residual}) = -k_{inact} \times \text{tiempo} + \ln(\text{Actividad en el } t=0)$$

donde la actividad residual se mide en U mL⁻¹, la k_{inact} tiene unidades de min⁻¹ y el tiempo se mide en min. Las constantes de inactivación calculadas se muestran en la figura 13 para los cinco sustratos evaluados (fenol, 4-bromofenol, 4-clorofenol, 4-metilfenol y 4-metoxifenol) con una concentración de enzima de 0.08 U mL⁻¹ (actividad específica: 139 U/mg). El valor de R² para el ajuste semilogarítmico al modelo de primer orden fue mayor a 0.9 para todos los sustratos evaluados. El E° de cada sustrato se presenta en la tabla I (Ayala *et al.*, 2007).

De acuerdo con los datos obtenidos, se observa una relación inversa entre el E° del sustrato y la constante de inactivación (figura 14). Sin embargo, las mediciones de consumo de sustrato indicaron que una cantidad muy pequeña de fenol se transformaba con respecto al 4-metoxifenol; por ejemplo, para la condición de 1 mM de sustrato, se transformó más del 30% de 4-metoxifenol, mientras que en el caso del fenol se transformó menos del 17%

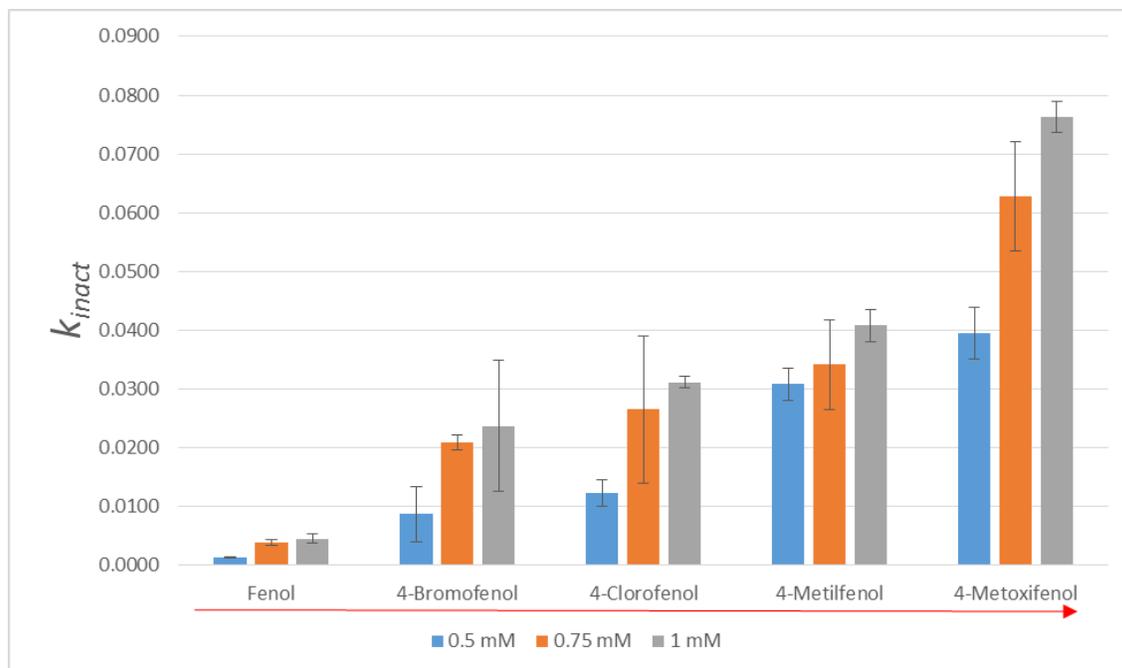


Figura 13. Constantes de inactivación para la reacción de la CgL (0.08 U mL^{-1}) con 0.5, 0.75 y 1 mM de fenoles de diferente E° en solución amortiguadora de succinatos, 60 mM, pH 4.5, a 23°C . Se muestra el promedio de tres experimentos. Los sustratos de menor E° inactivan más rápido a la enzima. La flecha roja indica la disminución del E° de los sustratos.

Tabla I. Potencial redox de los sustratos evaluados en la reacción con lacasa (Ayala, M. *et al.*, 2007).

Sustrato	E° (mV)
Fenol	970
4-Bromofenol	960
4-Clorofenol	940
4-Metilfenol	870
4-Metoxifenol	720

durante el tiempo que la enzima fue activa (30 min para la reacción con 4-metoxifenol y 2 h para la reacción con fenol). Puesto que la hipótesis del trabajo es que el potencial redox del sustrato puede influir en la inactivación de la enzima, se comparó la velocidad de inactivación con respecto a la cantidad de sustrato transformado; es decir, la velocidad de inactivación (U

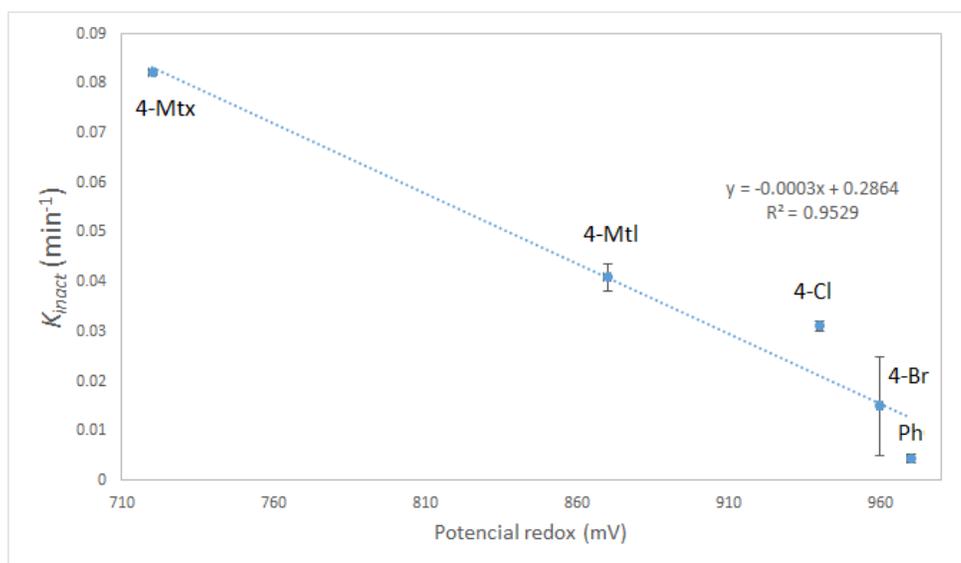


Figura 14. Relación entre el potencial redox del sustrato y la constante de inactivación (k_{inact}) obtenida para la reacción de la CgL con 1 mM de fenol, 4-bromofenol, 4-clorofenol, 4-metilfenol y 4-metoxifenol (figura 13). Se observa una relación inversa entre el potencial redox del sustrato y la constante de inactivación.

$\text{mL}^{-1} \text{min}^{-1}$) contra la velocidad de conversión inicial de sustrato (mM min^{-1}). Este análisis se realizó para el sustrato con mayor E° (fenol) y para el de menor E° (4-metoxifenol). La concentración de enzima para los ensayos de fenol fue de 2 U mL^{-1} y de 0.08 U mL^{-1} para el 4-metoxifenol. Para poder comparar los datos entre ambos sustratos, se dividieron las velocidades por la cantidad de enzima utilizada. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 15.

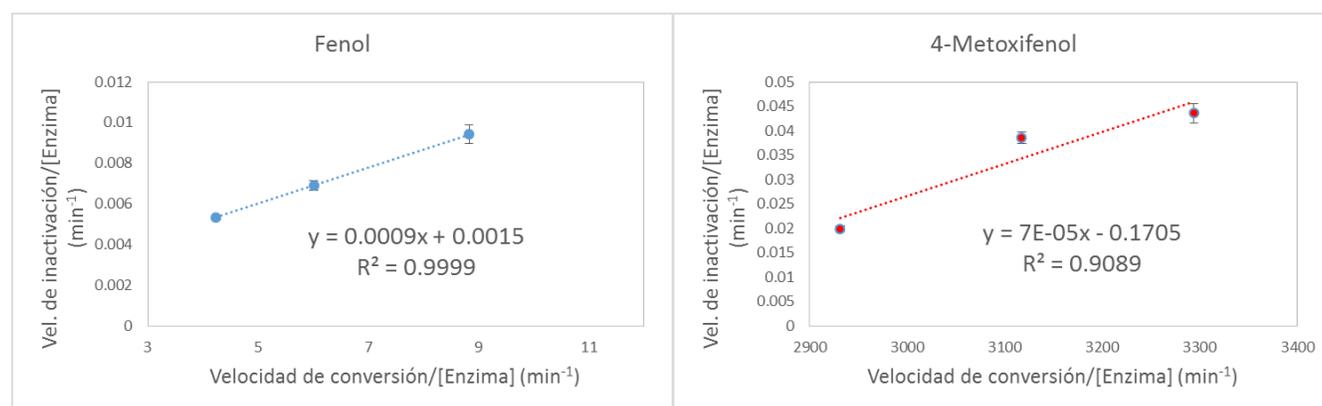


Figura 15. Relación entre la velocidad de inactivación y la velocidad de conversión de fenol y 4-metoxifenol para las reacciones de la CgL (2 U mL^{-1} y 0.08 U mL^{-1} , respectivamente) con 0.5, 0.75 y 1 mM de sustrato a 23°C en solución amortiguadora de succinatos, pH 4.5, 60 mM. Se muestra el resultado de tres experimentos. La pendiente de la recta para esta razón (k_{ij}) es un orden de magnitud mayor para el fenol.

La pendiente de la recta para las ecuaciones obtenidas fue denominada k_{ir} (constante de inactivación real, adimensional). La velocidad de inactivación por concentración de enzima tiene unidades de min^{-1} ; estas surgen de convertir la actividad volumétrica (U mL^{-1}) en concentración molar (mM) de enzima a partir del dato de actividad específica (U mg^{-1}) y la masa molecular de la CgL. La k_{ir} para el fenol es un orden de magnitud más grande con respecto a la del 4-metoxifenol. Los datos obtenidos experimentalmente se ajustan muy bien a una ecuación lineal ($R^2 > 0.90$). Cada ecuación representa un modelo que explica la relación entre la velocidad de conversión y la velocidad de inactivación de la enzima. Así, para la condición donde las velocidades de conversión son iguales, la velocidad de inactivación es siempre mucho mayor para el caso del fenol.

En un experimento donde se añadió BSA ($10 \mu\text{M}$) a la reacción de la CgL con fenol se observó que la actividad residual de la enzima se mantuvo prácticamente invariable durante el tiempo de incubación evaluado (160 min). La reacción control (sin BSA) mostró la típica disminución de actividad para la reacción con fenol. La presencia de la BSA en la mezcla de reacción no interfirió con la oxidación de fenol, pues se observó la formación de polímero fenólico. Incluso una medición en el HPLC de la fracción soluble a los 160 min mostró que la concentración de fenol era prácticamente cero. El perfil de actividad residual para este experimento se muestra en la figura 16. Además, un SDS-PAGE de la fracción insoluble de esta reacción muestra una gran cantidad de BSA, por lo que se infiere que se encontraba asociada al polímero (Suplementaria 5).

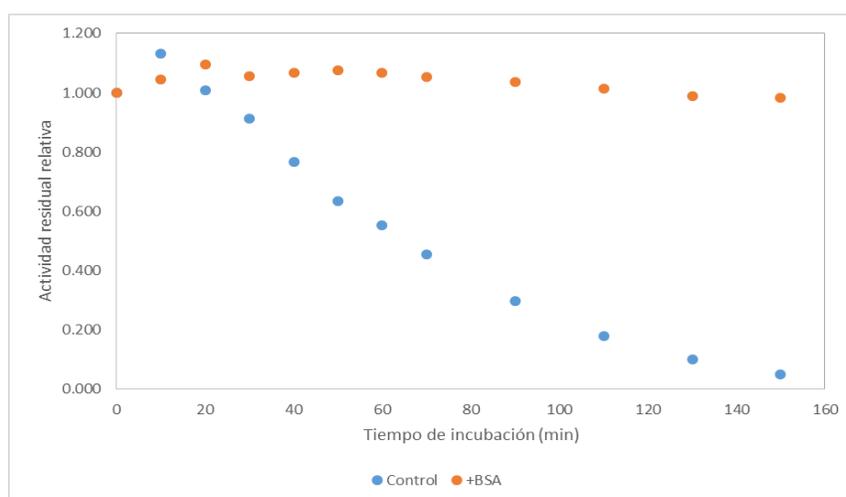


Figura 16. Actividad residual relativa de la CgL (2 U mL^{-1}) en la reacción con fenol (1 mM , control) y BSA ($10 \mu\text{M}$) con fenol en solución amortiguadora de succinatos, $\text{pH } 4.5$, 60 mM , a 23°C . Se muestra un solo experimento. La actividad de la CgL se mantiene en la reacción donde se añade BSA.

Con el fin de identificar las posibles modificaciones en aminoácidos cercanos al sitio T1 (figura 7), por ejemplo la formación de aductos entre los radicales fenólicos y los residuos de fenilalanina presentes en la cavidad del sitio activo, se intentó recuperar la enzima de la mezcla de reacción y del polímero para analizar su composición mediante espectrometría de masas. Con este tipo de experimentos se esperaba observar una disminución en la proporción relativa de ciertos aminoácidos susceptibles a oxidarse, como fenilalaninas y tirosinas, de acuerdo con lo que se ha observado en otras oxidorreductasas. Sin embargo, nuestros intentos no fueron exitosos, principalmente debido a la pequeña cantidad de proteína que se podía recuperar del sobrenadante.

La composición de aminoácidos de la lacasa nativa, hidrolizada con HCl, derivatizada con N-tert-butil-dimetilsilil-N-metiltri-fluoroacetamida y analizada por GC-MS, de acuerdo con el método de Dauner y Sauer (2000), se muestra en la tabla II. Se observa una buena correspondencia entre la abundancia relativa de aminoácidos en la lacasa y las áreas relativas de los picos observados en el GC. Si bien el espectro de masas mostró muchos contaminantes, se lograron detectar al menos 60% de los residuos; los aminoácidos restantes no fueron detectados posiblemente debido a que son poco abundantes en la CgL. De acuerdo con la abundancia de los residuos graficada en la figura 17, se detectaron los residuos desde la isoleucina hacia la izquierda, con excepción de la prolina. Con el fin de mejorar la eficiencia de recuperación, se probaron diversos métodos. Se realizó la recuperación de la enzima inactiva por diversos métodos. Por ejemplo, en el caso de la enzima adsorbida a polímero, se hizo un tratamiento del mismo con SDS y temperatura; también se intentó cortar la banda correspondiente a la lacasa en un SDS-PAGE. Sin embargo, no se obtuvo suficiente proteína para poder detectar los residuos en el GC-MS. Por otra parte, se intentó recuperar a la enzima inactiva en solución mediante una precipitación con acetona o con metanol-cloroformo-agua. Ninguna de estas estrategias permitió la visualización de los picos esperados en el espectro de GC-MS para la muestra inactiva.

Tabla II. Iones moleculares identificados en la muestra de lacasa nativa.

Tiempo de elución (min)	M ⁺	Residuo de aminoácido	Área del pico en GC	Área relativa	Abundancia relativa
16.05	260	Ala	7,570,501	0.14	0.11
16.40	246	Gli	3,599,221	0.07	0.08
18.37	302	Ile	6,316,840	0.12	0.13
22.15	390	Ser	1,160,249	0.02	0.07
22.50	404	Tre	463,133	0.01	0.08
23.32	336	Fen	1,868,361	0.04	0.05
24.07	418	Asp+asn	761,766	0.01	0.13

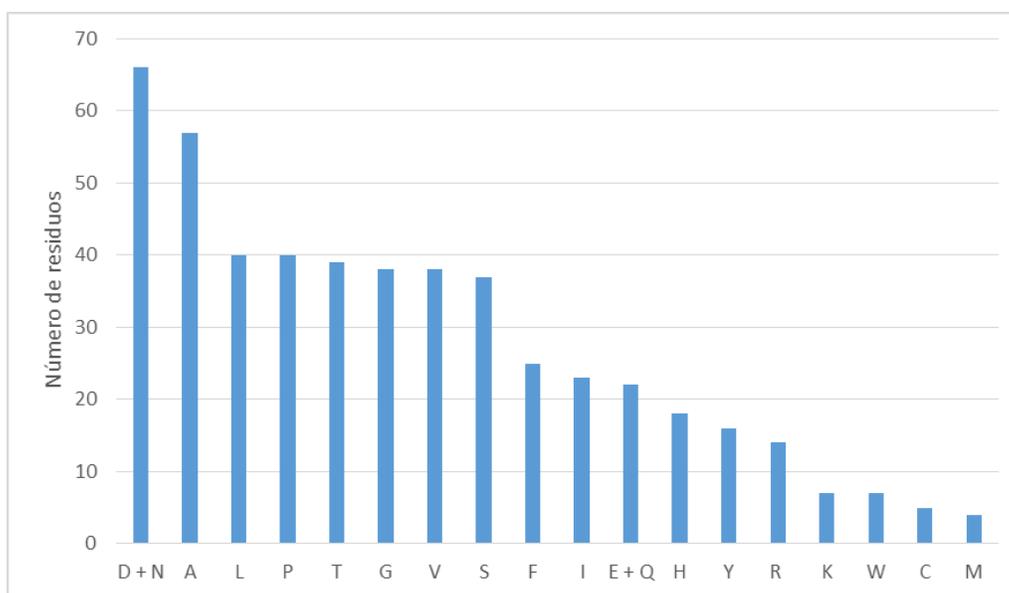


Figura 17. Abundancia de aminoácidos en la lacasa de *Corioloopsis gallica*. Se logró identificar por GC-MS a los residuos desde la isoleucina hacia la izquierda.

Estudio sobre el papel del polímero en la inactivación

Para estudiar el papel del polímero (producto de la reacción entre los radicales libres) en el mecanismo de inactivación, primero se realizaron reacciones donde se midió la actividad residual de la enzima en la mezcla de reacción (sin centrifugar la muestra) y también sólo en la fracción soluble. En la figura 18 se muestran los resultados para la reacción con fenol (1 mM) con 1.5 U mL⁻¹ de lacasa. Se observa que la actividad en el sobrenadante y en la

mezcla total (sobrenadante + polímero) va disminuyendo con el tiempo y además hay alrededor del 30% de la actividad inicial asociada al polímero. Se puede suponer que la diferencia del valor de actividad entre estas dos condiciones corresponde a la actividad de la enzima asociada a la fracción insoluble, como propuso Wu *et al.* (1998). De acuerdo con esta suposición, la lacasa interacciona con el polímero pero no pierde por completo la actividad, al menos durante los primeros 70 min. En los tiempos finales de reacción tanto la actividad total como en el sobrenadante tiende a cero, por lo que concluimos que la enzima asociada al polímero ya no es activa. Una observación interesante es que las pendientes de las curvas de actividad total ($17.0 \pm 2.6 \text{ U L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) y actividad en el sobrenadante ($20.3 \pm 2.6 \text{ U L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) no parecen ser muy diferentes. Esto sugiere que la inactivación por la interacción de la enzima con el polímero polifenólico no es significativa en estas condiciones de reacción.

Se realizó un SDS-PAGE para corroborar que la enzima se encontraba asociada a la fracción insoluble al final de la reacción. En la figura 19A se observa la presencia de una gran cantidad de enzima en la fracción insoluble, comparada con la fracción soluble. Para comprobar esto cuantitativamente se realizó un experimento donde se cuantificó la cantidad de proteína inicial y final (2 h después) en el sobrenadante de la reacción de la lacasa con 1 mM de fenol y 4-metoxifenol. Como se muestra en la figura 19B, en ambas reacciones se asocia una gran cantidad de proteína a la fracción insoluble. Para el caso del fenol, más del 90% de la proteína desaparece de la fracción soluble; para el 4-metoxifenol, es casi el 80%. Para poder comparar la adsorción de la enzima a los diferentes polímeros, se calculó la cantidad de enzima que se une por cierta cantidad de polímero formado. Para el caso del fenol, se estimó que se unen $0.266 \mu\text{g}$ de proteína por μg de polímero de fenol; para el 4-metoxifenol, se unen sólo $0.0352 \mu\text{g}$ de proteína por μg de polímero de 4-metoxifenol. Es importante resaltar el hecho de que la enzima logra separarse del polímero con un tratamiento térmico y con un detergente a baja concentración (0.5% de SDS y 60°C durante 30 min), lo que indica que la asociación de la enzima al polímero no es covalente; sin embargo, se observó que la enzima que estaba unida al polímero ya no se encontraba activa. Un control donde se incubó CgL con 0.5% de SDS y 60°C sin la presencia del polímero indicó que la enzima no se inactiva por el tratamiento.

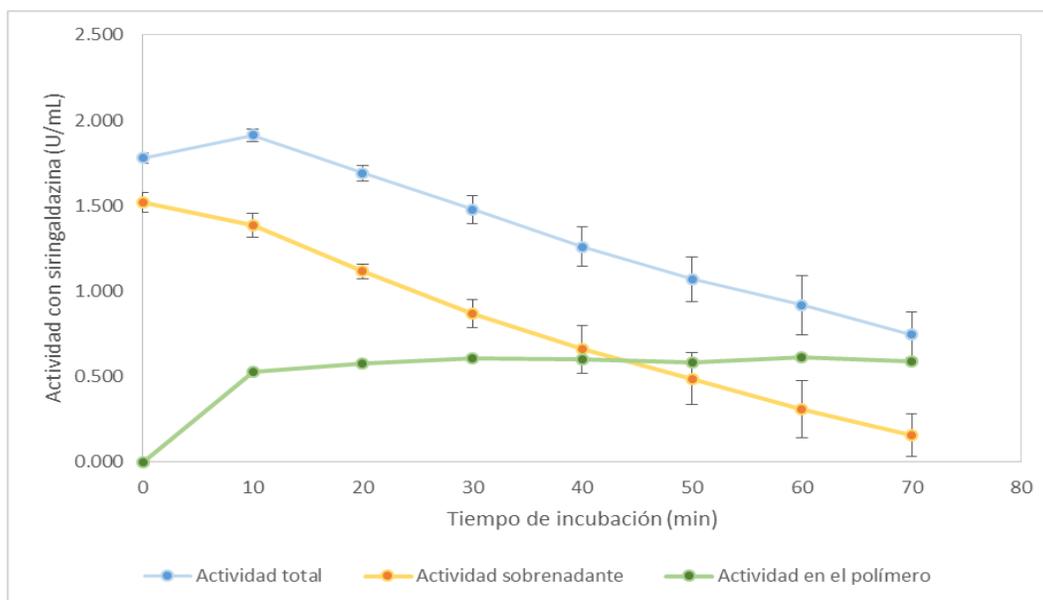


Figura 18. Perfil de inactivación de la lacasa (1.5 U mL^{-1}) con 1 mM de fenol donde se muestra la actividad total de la mezcla de reacción y sólo de la fracción soluble. El ensayo se realizó por triplicado a 23°C en una solución amortiguadora de succinatos, $\text{pH } 4.5$, 60 mM . La actividad asociada al polímero se calculó como la diferencia entre la actividad total y la de la fracción soluble.

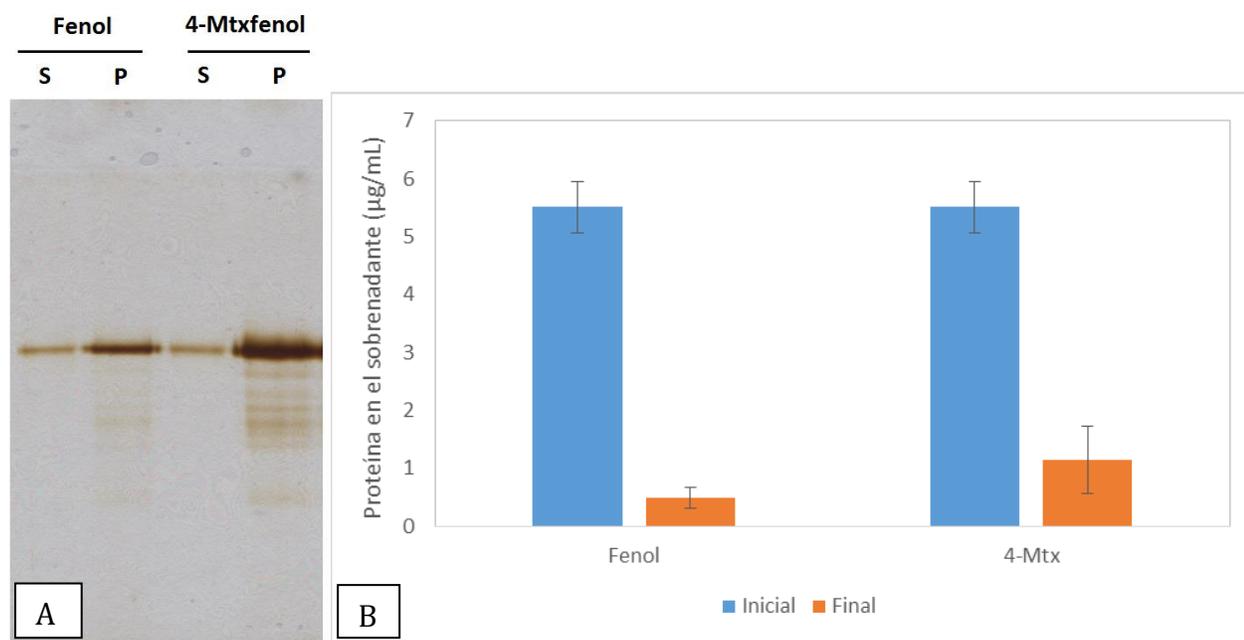


Figura 19. A) SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble de una reacción de la CgL ($5.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) con fenol y 4-metoxifenol (1 mM) después de 2 h de incubación en solución amortiguadora de succinatos, $\text{pH } 4.5$, 60 mM , a 23°C . S: Fracción soluble, P: Fracción del polímero. B) Concentración de proteína en el sobrenadante antes y después de la reacción. Esta medición se realizó por triplicado.

Una posibilidad es que la enzima se encuentre en la fracción insoluble debido a que se desnaturaliza durante la inactivación por la acción de los radicales libres, de manera que tras la centrifugación se recupera en la fracción insoluble. Para explorar esta posibilidad, se generó polímero de fenol y 4-metoxifenol en una reacción con un exceso de enzima (10 U mL^{-1}) para garantizar la conversión total del sustrato. El polímero recibió un tratamiento de incubación con SDS (0.5%) y alta temperatura (90°C) para separar la enzima. Una vez con el polímero libre de enzima se incubó CgL ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) con el polímero. Los datos de proteína total antes y después de la incubación se muestran en la figura 20. Se observa que la enzima es capaz de unirse al polímero en un porcentaje significativo. Para la reacción con fenol, se une un 54% de la proteína total, mientras que en la reacción con 4-metoxifenol se une un 38%. Esto demuestra que la adsorción de la enzima al polímero puede ocurrir en la reacción, tanto si la enzima se encuentra activa o inactiva.

Por otra parte, se midió si la enzima asociada al polímero en el ensayo anterior aún mantenía su actividad tras romper la interacción con el polímero. Esto se realizó para comprobar si el hecho de interaccionar con el polímero causaba la inactivación. El tratamiento con 0.5% de SDS y 90°C inactiva completamente a la enzima, por lo que se ensayó un tratamiento más suave que consistió en agregar 0.1% de SDS y 50°C por 5 min. Un control mostró que este tratamiento no inactiva apreciablemente a la enzima en solución. Sin embargo, no se detectó actividad en el sobrenadante mientras que el polímero se colorea rápidamente en presencia de la siringaldazina, lo que indica que la enzima no se separó con el tratamiento pero sigue activa, aunque no se pudo establecer cuantitativamente la actividad retenida.

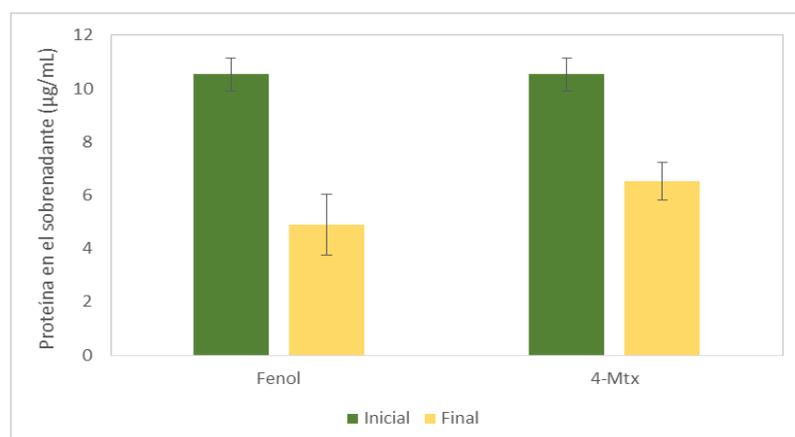


Figura 20. Proteína en el sobrenadante después de incubar $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la CgL con polímero libre (1 mM de fenol) durante 2 h a 23°C en amortiguador de succinatos, pH 4.5, 60 mM . El experimento se realizó por triplicado. La CgL es capaz de unirse al polímero independientemente de la reacción con los fenoles.

Discusión

La lacasa de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 fue estudiada en la reacción de oxidación de diferentes fenoles con el fin de entender el fenómeno de inactivación de la enzima para poder diseñar estrategias racionales para aumentar su estabilidad operacional. Se utilizó enzima dializada que tuviera siempre la misma actividad específica, ya que la que tenía almacenada a -4°C más de un mes perdía hasta el 50% de actividad volumétrica, posiblemente por la formación de agregados proteicos (Shleev *et al.*, 2006). Por otra parte, la lacasa utilizada en los experimentos no se encontraba muy pura, ya que en el SDS-PAGE se observaba la presencia de otras bandas de menor tamaño que la CgL (figura 10). Se ha descrito en la peroxidasa de *Coprinus cinereus* que muestras con impurezas (otras proteínas) tenían una eficiencia catalítica mayor que muestras puras (Masuda *et al.*, 2001). Los autores proponen que la presencia de otras proteínas durante la reacción ayuda a proteger a la peroxidasa de la adsorción de la enzima a los polímeros. Como se discutirá más adelante, lo mismo podría estar pasando en el caso de esta lacasa. Para una potencial aplicación ambiental sería deseable reducir los pasos de purificación y sería conveniente que las impurezas contribuyeran a mantener la estabilidad del catalizador sin perjudicar otros aspectos de la reacción (Torres *et al.*, 2003). Finalmente, se identificó una sólo banda con actividad lacasa mediante un zimograma, por lo que el comportamiento cinético de las reacciones con fenol podía atribuírsele a la acción de un solo tipo de enzima.

En los experimentos de la cinética de inactivación de la CgL se realizaron varios controles para asegurar que la disminución de la actividad se debía al recambio del sustrato (evaluado con fenol). Se demostró que la disminución de la actividad durante la reacción con fenol se debía a la transformación del sustrato y no por la acción desnaturalizante del fenol. En este ensayo la enzima se incubó a pH 7 con el fenol, una condición donde la enzima es muy poco activa (Xu, F., 1996), posiblemente por la presencia de iones hidroxilo que interaccionan con el sitio T2/T3 que impiden la entrada del oxígeno molecular a este sitio. Por otra parte, se sabe que la CgL es estable a 60°C por 24 h (Vandertol-Vanier *et al.*, 2002), y a pH 4.5 por 2 h, por lo que las condiciones de reacción usadas en los ensayos de actividad residual (pH 4.5, 23°C por 2 h) no afectaron la actividad de la CgL. Además, se observó que el fenol no interfería con las mediciones de actividad con siringaldazina por un efecto competitivo, pues

con la máxima concentración de fenol posible en el ensayo no disminuía la actividad.

La diferencia entre los sustratos evaluados se encontraba en el sustituyente en *para* o la posición 4. Estos grupos químicos (-H, -Br, -Cl, -CH₃ y -OCH₃) se eligieron porque otorgan diferente E° a las moléculas y no son grupos que ocasionen algún impedimento estérico durante la catálisis, a diferencia de otros grupos en posición *orto* o *meta* (Ayala *et al.*, 2007; Xu, 1996). Se evaluó la velocidad de inactivación de la lacasa con estos sustratos para buscar una relación con el E° del sustrato.

De acuerdo con la hipótesis planteada en este trabajo, la inactivación de la lacasa puede deberse a dos factores principalmente: inactivación por radicales libres y adsorción al polímero. Este último fenómeno, no tendría que ser necesariamente inactivante, sino que podría contribuir a la disminución de la actividad en solución. El modelo cinético más simple sería el siguiente:

$$dE/dt = -k_{rad} E P_t - k_{ads} Pol_t$$

donde dE/dt es la velocidad de pérdida de actividad en solución, k_{rad} es la constante de inactivación por radicales libres, E es la concentración de enzima activa, P_t es la concentración de producto (radicales libres) que varía con el tiempo, k_{ads} es la constante de inactivación por adsorción de la enzima al polímero y Pol_t es la concentración de polímero en un tiempo dado. En algunas condiciones de reacción el modelo puede simplificarse; por ejemplo, si consideramos una reacción con un fenol de alto potencial redox, la cantidad de polímero que se produce es baja debido a la baja conversión del sustrato (<20%) y además el tiempo de reacción evaluado en este trabajo es corto (< 1 h). Así, el término de inactivación por radicales libres se vuelve importante (figura 13). Para el caso de una reacción con un fenol de bajo potencial redox (v.g., 4-metoxifenol), el término de adsorción sí es importante, ya que la conversión es muy alta (>50%). Lo mismo ocurriría en el caso de una reacción con un sustrato de alto potencial redox (fenol) pero con una gran cantidad de enzima (>10 U mL⁻¹) o una alta concentración de sustrato inicial (>4 mM). De hecho, en este trabajo se observó que en una reacción con 10 U mL⁻¹ de CgL con 1 mM de fenol se transformaba por completo el fenol en polímero. En una reacción con una menor cantidad de

enzima ($<0.01 \text{ U mL}^{-1}$) se esperaría tener una menor velocidad de conversión y, por lo tanto, una menor velocidad de inactivación, pero estaría descrito por la misma constante de inactivación, ya que esta no cambia de acuerdo al modelo propuesto.

Al ajustar los datos de actividad residual a un modelo de inactivación de primer orden, se observa que las constantes son mayores para los sustratos de bajo E° ; sin embargo, cuando se toma en cuenta la conversión, los sustratos de bajo E° tienen porcentajes de conversión mucho mayores. Por ejemplo, para una reacción con 1 mM de fenol y 0.08 U mL^{-1} de CgL se transforma menos del 5% del sustrato en 40 min, mientras que para el 4-metoxifenol se transforma el 32% en el mismo tiempo.

Cuando se compara la relación entre la velocidad de inactivación y la velocidad de conversión, se obtienen dos ecuaciones lineales que explican esta relación (figura 15). Se pueden igualar estas ecuaciones para la velocidad de conversión y calcular una velocidad de inactivación con uno de los sustratos. Este análisis muestra que en efecto un sustrato de alto E° es más inactivante que uno de bajo E° , pues la pendiente de la recta es un orden de magnitud mayor para el fenol (9×10^{-4} para el fenol, contra 7×10^{-5} para el 4-metoxifenol). Esto implica que la lacasa se inactiva con una baja cantidad de radicales libres de un sustrato de alto E° , aunque sea un sustrato difícil de oxidar; se transforman una cantidad pequeña de sustrato, pero es suficiente para inactivar a la enzima, lo que ocasiona que ya no se siga transformando más sustrato. Por otra parte, la lacasa transforma con una gran eficiencia un sustrato de bajo E° y no es hasta que se acumula una gran cantidad de radicales libres cuando la enzima se inactiva, por lo que se obtiene una conversión muy alta. Esto se observa cuantitativamente al calcular la cantidad de moléculas de sustrato que se necesitan para inactivar una molécula de lacasa. Para una reacción de CgL (2 U mL^{-1}) con fenol (1 mM), la enzima se inactiva a los 70 min. A este tiempo se ha convertido el 20% del sustrato, lo que resulta en una razón de 707 moléculas de fenol transformado por molécula de lacasa. En contraste, en la reacción de la CgL (0.08 U mL^{-1}) con 4-metoxifenol (1 mM) la enzima se inactiva en 25 min, por lo que se ha transformado el 30% del sustrato. Esto arroja una razón de 29,412 moléculas de 4-metoxifenol transformado por molécula de lacasa.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el E° influye directamente en la

velocidad de inactivación de la enzima (figura 14). El efecto observado es una combinación de la concentración de radicales libres fenoxilo que se producen y el poder oxidante del radical. Por un lado, se demostró que la velocidad de inactivación aumenta si la concentración inicial de sustrato es mayor. Esta relación directa de la inactivación con la concentración de sustrato se ha observado en la peroxidasa de rábano blanco (Baynton *et al.*, 1994). En ese trabajo también se observó que el recambio del sustrato era necesario para que ocurriera la inactivación, algo que se demostró en este trabajo con la CgL con el experimento de incubación de la enzima con el fenol en una condición donde la enzima no es activa (pH 7). En general, una mayor concentración inicial de sustrato implica una velocidad de transformación más alta, por lo que se produciría una mayor cantidad de radicales libres capaces de inactivar a la enzima.

Por otra parte, Kurniawati y Nicell (2009), observaron que a concentraciones altas de fenol la sensibilidad de la enzima aumentaba con respecto a la inactivación. Esto se observa en la lacasa de CgL para el caso del 4-metoxifenol, donde las altas velocidades de conversión conllevan una velocidad de inactivación muy grande (figura 13). Los autores antes mencionados compararon la constante de inactivación por radicales de la lacasa de *T. versicolor* con la de la peroxidasa de rábano blanco y determinaron que la constante de la peroxidasa era ocho órdenes de magnitud mayor que la de la lacasa. Esto podría deberse a que las peroxidasas en general tienen un potencial redox mayor, lo cual representa una conversión de sustrato más alta.

Los experimentos de la abundancia de aminoácidos no fueron exitosos para las muestras de lacasa inactiva, porque la cantidad de enzima no fue suficiente para poder detectarla en el GC-MS. El proceso de separación de la enzima del polímero involucra la adición de SDS que debe ser eliminado después mediante una precipitación con solventes orgánicos. La manipulación de la muestra en varios pasos ocasiona pérdidas en la cantidad de proteína. No fue posible cuantificar por el método de Bradford cuánta enzima se perdía en cada paso por la presencia de SDS. Después de la eliminación de este detergente con solventes orgánicos, no fue posible detectar proteína con el método de Bradford (la absorbancia de la muestra era igual al blanco). Realizar una reacción enzimática más concentrada (10 veces más) para obtener más proteína no fue una opción viable, pues dificultaba aún más la

separación de la enzima del polímero, pues se formaba una solución muy viscosa. Una opción para obtener la cantidad de proteína necesaria podría ser mediante una reacción de gran volumen (por lo menos 10 veces más grande: 50 mL) para posteriormente concentrar la muestra. De esta manera se podría cuantificar cuánta enzima se pierde en cada paso de preparación para el análisis de GC-MS. Aunque se sacrificaría una cierta cantidad de enzima, valdría la pena para poder determinar si la inactivación ocurre por la oxidación de ciertos residuos únicamente. Por otra parte, un experimento de MS-MS podría indicarnos el residuo preciso en el que ocurre una modificación química por la reacción con los radicales libres, ya que permite obtener la secuencia de la proteína e identificar la posición de ciertas modificaciones (Shevchenko *et al.*, 1996). Esta información sería muy útil para el diseño racional de enzimas más estables.

Las enzimas son susceptibles a la oxidación por diferentes radicales libres y sus derivados, como el óxido nítrico (NO), ión superóxido (O_2^-) o el radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Dröge, 2002). La inactivación por radicales libres puede ser aminorada con el uso de aditivos, como antioxidantes (v.g., vitamina C) o polímeros como el polietilenglicol. El perfil de inactivación de la CgL en presencia de BSA apoya esta idea. La estabilidad de la lacasa no disminuyó durante el tiempo de reacción con respecto a la reacción control (figura 16). La BSA podría estar funcionando como un captor de radicales libres, lo que disminuye la probabilidad de que los radicales reaccionen con la CgL. Esto concuerda con lo propuesto por Kulys *et al.* (2002) para las lacasas recombinantes de *Polyporus pinsitus* y *Myceliophthora thermophila* en la oxidación de siringatos. La adición de BSA a la mezcla de reacción aumenta su capacidad de recambio al igual que en el caso de la peroxidasa de rábano blanco (Masuda *et al.*, 2001). Experimentos realizados en este trabajo también muestran que la velocidad de conversión del fenol es mayor cuando se utiliza una lacasa con una menor pureza. A nivel molecular la lacasa con baja pureza es una mezcla de lacasa activa con proteínas que no participan en la reacción de oxidación y sólo funcionan como proteínas espectadoras que también pueden ser el blanco de los radicales libres. En una aplicación ambiental, quizá sea más conveniente utilizar una mezcla impura de lacasa para tener una estabilidad operacional mayor. De esta manera, se omiten pasos costosos de purificación y se reduce el tiempo para la obtención de un biocatalizador con características deseadas. Sin embargo, la adición de BSA tal vez no sea una opción viable económicamente, aunque a escala laboratorio

(reacciones de volúmenes pequeños, como 5-10 mL) tiene resultados positivos (Kulys *et al.*, 2003; este trabajo). Existen otros polímeros, como dextrán, polivinilpirrolidona, hidroxietilcelulosa, entre otros, que tienen potencial en este sentido y ya han sido estudiados por Kulys *et al.* (2003), y Modaressi *et al.* (2005). Por ejemplo, estos autores han observado el efecto protector del polietilenglicol y el alcohol polivinílico en la reacción de la lacasa con bisfenol-A, que también resulta en la formación de radicales libres que posteriormente polimerizan.

Con respecto a la interacción de la enzima con el polímero, es posible que la formación del polímero ocurra lejos del sitio activo, ya que la enzima es capaz de interaccionar con un polímero previamente sintetizado; aunque no se puede descartar que si la formación del polímero ocurre cerca de la enzima, esto facilita su adsorción. Este fenómeno fue descrito también para la peroxidasa de rábano blanco y para la peroxidasa de *Coprinus cinereus* (Wu *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2009). No obstante, el hecho de que la BSA también se pueda unir al polímero sugiere que la interacción ocurre después de que se formó el mismo y no durante el proceso inmediato de formación, pues la BSA no tiene actividad de oxidación de fenoles. En este trabajo no se cuantificó la cantidad de BSA que se unió al polímero, pero resulta interesante obtener este dato para compararlo con la cantidad de CgL que se une al polímero y así confirmar que la unión es inespecífica.

La unión al polímero no parece ser un mecanismo importante de inactivación en el caso de la CgL, pues las mediciones de actividad residual en la mezcla total de reacción indican que la actividad asociada al polímero también disminuye en el tiempo. Además, el experimento de incubación de la enzima fresca con polímero lavado sugiere que la interacción con el polímero por sí misma no es capaz de inactivar. Así, aunque puede asociarse enzima activa al polímero durante la reacción, la mayor parte de la enzima que se une ya se encuentra inactiva por el efecto de los radicales libres. Esto no se puede generalizar para todas las enzimas que catalizan oxidaciones mediante la formación de radicales fenólicos, pues se ha demostrado que en el caso de la peroxidasa de rábano blanco la inactivación se debe a la interacción de la enzima con el polímero polifenólico en reacciones donde la concentración inicial de sustrato es mayor a 50 mM (Huang *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 1998). Para el caso de otras lacasas, es posible que la adsorción al polímero no sea inactivante, pero resulta

interesante evaluar cada caso particular, ya que existen lacasas de otros organismos con diferente potencial redox en el sitio T1 (Rodgers *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 1998) y esto afecta la velocidad de transformación del sustrato y por lo tanto el efecto de los radicales libres en la enzima, como se ha visto en este trabajo.

No es deseable que la enzima soluble se una al polímero, puesto que representa una pérdida de catalizador. Si se crean variantes de la CgL más estables al ataque de los radicales libres (mediante técnicas de ingeniería de proteínas, por ejemplo), la conversión será mayor y la enzima será estable pero seguirá uniéndose al polímero y se perderá en el proceso de separación de la fracción insoluble. Esto es crítico, pues se perdería una gran cantidad de enzima perfectamente activa. Por ejemplo, en reacciones de la CgL con 1 mM de fenol que duraban más de 2 h, toda la enzima se observaba en la fracción insoluble en un SDS-PAGE (Suplementaria 6). Así, el problema de la actividad operacional de la lacasa debe contender con ambos aspectos: que sea robusta para resistir el ataque de los radicales y que se evite la adsorción de esta al polímero.

Un aspecto que no se exploró en este trabajo fue el de los cambios conformacionales de la enzima tras la inactivación. Aunque no se tienen antecedentes de cambios en la estructura terciaria de las lacasas tras la inactivación, resulta interesante analizar si las posibles modificaciones en los residuos oxidables generan un cambio en la estructura de la CgL. Esto se podría analizar mediante dicróismo circular o si se obtienen cristales de la CgL inactiva, mediante cristalografía de rayos X. En otras enzimas que también oxidan fenoles mediante la formación de radicales libres, como peroxidasas, tampoco se han encontrado evidencias de que se afecte la estructura terciaria tras la inactivación (Ayala *et al.*, 2011).

Conclusiones

La pérdida de actividad en la lacasa de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 ocurre durante la oxidación de fenol, 4-bromofenol, 4-clorofenol, 4-metilfenol y 4-metoxifenol. La velocidad de inactivación depende de la concentración inicial de sustrato y del potencial redox del mismo. A concentraciones más altas de sustrato, la velocidad de inactivación es mayor. El fenol, de mayor potencial redox, es un orden de magnitud más inactivante que el 4-metoxifenol, de menor potencial redox.

El polímero polifenólico de los cinco sustratos evaluados es capaz de adsorber a la CgL durante la reacción, pero no parece ser el mecanismo principal de inactivación, para el caso de fenol y 4-metoxifenol; sin embargo, para una aplicación ambiental debe considerarse este fenómeno para no perder al biocatalizador en el proceso de filtración de los polímeros fenólicos. El polímero de fenol es capaz de adsorber un orden de magnitud mayor de CgL que el polímero de 4-metoxifenol.

El mecanismo de inactivación de la lacasa de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 durante la reacción de oxidación con los fenoles evaluados en este trabajo involucra una reacción con los radicales libres producidos durante la catálisis, donde el potencial redox del sustrato determina la velocidad de inactivación de la enzima. La adsorción de la enzima al polímero es significativa en el caso del fenol y el 4-metoxifenol, pero no parece ser inactivante.

Perspectivas

Realizar un análisis de espectrometría de masas acoplado a masas (MS-MS) para identificar los residuos específicos que oxidan los radicales libres (por ejemplo, fenilalaninas) y mutarlos por residuos de bajo potencial redox, como alaninas.

Evaluar diferentes aditivos de bajo costo para la reacción de la lacasa con fenoles para disminuir la velocidad de inactivación; por ejemplo, polímeros con capacidad antioxidante sintetizados enzimáticamente.

Estudiar la inactivación en medios con solventes orgánicos o líquidos iónicos que favorezcan la partición de los oligómeros y polímeros fenólicos hacia otra fase donde no puedan interactuar tan fácilmente con la enzima.

Estudiar otros sustratos de la CgL con diferente potencial redox; por ejemplo, moléculas estructuralmente diferentes a los fenoles pero con potencial redox similar.

Evaluar otras lacasas con los fenoles utilizados en este trabajo para comprobar o ampliar el modelo de inactivación y encontrar aquellas diferencias estructurales que podrían estar determinando el mecanismo de inactivación en cada caso particular.

Estudiar las modificaciones estructurales que podría sufrir la CgL tras la inactivación mediante dicroísmo circular o cristalografía de rayos X.

Referencias

1. Aitken, M. D., y Heck, P.E. (1998) Turnover capacity of *Coprinus cinereus* peroxidase for phenol and monosubstituted phenols. *Biotech. Prog.*, **14**, 487-492.
2. Ayala, M., Batista, C. V., y Vázquez-Duhalt, R. (2011) Heme destruction, the main molecular event during the peroxide-mediated inactivation of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **16**:1, 63-68.
3. Ayala, M., Pickard, M. A., y Vázquez-Duhalt, R. (2008) Fungal enzymes for environmental purposes, a molecular biology challenge. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **15**, 172-180.
4. Ayala, M., Román, R., y Vázquez-Duhalt, R. (2007) A catalytic approach to estimate the redox potential of heme-peroxidases. *BBRC*, **357**, 804-808.
5. Baldrain, P. (2006) Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.*, **30**, 215-242.
6. Baynton, K. J., Bewtra, J. K., Biswas, N., y Taylor, K. E. (1994) Inactivation of horseradish by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation. *Bioch. Biophys. Acta*, **1206**, 272-278.
7. Bollag, J. M., Shuttleworth, K. L., y Anderson, D. H. (1988) Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**:12, 3086-3091.
8. Burbonnais, R., y Paice, M. G. (1990) Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS*, **267**:1, 99-102.
9. Calvo, A. M., Copa-Patiño, J. L., Alonso, O., y González, A. E. (1998) Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Coriolopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. *Arch. Microbiol.*, **171**, 31-36.
10. Dauner, M., y Sauer, U. (2000) GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. *Biotechnol. Prog.*, **16**, 642-649.

11. De la Mora, E., Lovett, J. E., Blanford, C. F., Garman, E. F., Valderrama, B., y Rudino-Pinera, E. (2012) Structural changes caused by radiation-induced reduction and radiolysis: the effect of X-ray absorbed dose in a fungal multicopper oxidase. *Acta Cryst.* **D68**, 564-577.
12. Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, **82**:1, 47-95.
13. Durán, N., y Esposito, E. (2000) Potential applications of oxidative enzymes and phenoxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Cat. B: Environmental*, **28**, 83-99.
14. Farver, O., y Pecht, I. (2011) Electron transfer in blue copper proteins. *Coord. Chem. Rev.*, **255**, 757-773.
15. Gianfreda, L., Sannino, F., Filazzola, M. T., y Leonowicz, A. (1998) Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain *Cerreña unicolor*. *Mol. Cat. B: Enzymatic*, **4**, 13-23.
16. Gianfreda, L., Xu, F., y Bollag, J. M. (1999) Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Biorem. J.*, **3**:1, 1-26.
17. Harken, J. M., y Obst, J. R. (1973) Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia*, **29**:4, 381-387.
18. Huang, Q., Huang, Q., Pinto, R. A., Griebenow, K., Schweitzer-Stenner, R., Weber, Jr., y W. J. (2005) Inactivation of horseradish peroxidase by phenoxyl radical attack. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1431-1437.
19. Johannes, C., y Majcherczyk, A. (2000) Laccase activity tests and laccase inhibitors. *J. Biotech.*, **78**, 193-199.
20. Kim, H., Cho, D., Won, K., y Kim, Y. (2009) Inactivation of *Coprinus cinereus* peroxidase during the oxidation of various phenolic compounds originated from lignin. *Enz. Microb. Technol.*, **45**, 150-155.

21. Kim, S., Joo, J., Kim, H., Kwon, I., Yoo, Y., Song, K., y Kim, Y. (2012). Oxizymes congress 2012 in Marseille.
22. Kruger, N. J. (2009) The Bradford method for protein quantitation. *The protein protocols handbook. Springer protocols handbooks*, 17-24.
23. Kulys, J., Krikstopaitis, K., Ziemys, A., y Schneider, P. (2002) Laccase-catalyzed oxidation of syringates in presence of albumins. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **18**, 99-108.
24. Kulys, J., Vidziunaite, R., y Schneider, P. (2003) Laccase-catalyzed oxidation of naphtol in the presence of soluble polymers. *Enz. Microb. Technol.*, **32**, 455-463.
25. Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A. y Alcalde, M. (2008) Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*, **7**:32, 1-17.
26. Kurniawati, S., y Nicell, J. A. (2008) Characterization of *Trametes versicolor* laccase for the transformation of aqueous phenol. *Bioresource Technology*, **99**, 7825-7834.
27. Kurniawati, S., y Nicell, J. A. (2009) A comprehensive kinetic model of laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Biotechnol. Prog.*, **25**:3, 763-773.
28. Li, K., Xu, F., y Eriksson, K. L. (1999) Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**:6, 2654-2660.
29. Marcus, R.A. (1956) On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer. I. *J. Chem. Phys.*, **24**:5, 966-978.
30. Masuda, M., Sakurai, A., y Sakakibara, M. (2001) Effect of enzyme impurities on phenol removal by the method of polymerization and precipitation catalyzed by *Coprinus cinereus* peroxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 494-499.
31. Messerschmidt, A., y Huber, R. (1990) The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modeling and structural relationships. *Eur. J. Biochem.*, **187**, 341-352.

32. Modaressi, K., Taylor, K. E., Bewtra, J. K., y Biswas, N. (2005) Laccase-catalyzed removal of bisphenol-A in water: protective effect of PEG on enzyme activity. *Wat. Res.*, **39**:18, 4309-4316.
33. Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., y Yaropolov, A. I. (2007a) "Blue" laccases. *Biochemistry (Moscow)*, **72**:10, 1136-1150.
34. Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Shleev, S. V., y Yaropolov, A. I. (2007b) Laccase-mediator systems and their applications: a review. *Appl. Biochem. Microb.*, **43**:5, 523-535.
35. Mot, A. C., y Silaghi-Dumitrescu, R. (2012) Laccases: complex architectures for one-electron oxidations. *Biochemistry (Moscow)*, **77**:12, 1395-1407.
36. Piontek, K., Antorini, M., y Choinowski, T. (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.*, **277**:40, 37663-37669.
37. Ranieri, D., Colao, M. C., Ruzzi, M., Romagnoli, G., y Bianchi, M. M. (2009) Optimization of recombinant fungal laccase production with strains of the yeast *Kluyveromyces lactis* from the pyruvate decarboxylase promoter. *FEMS Yeast Research*, **9**, 892-902.
38. Rodgers, C. J., Blanford, C. F., Giddens, S. R., Skamnioti, P., Armstrong, F. A., y Gurr, S. J. (2009) Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes. *Trends in Biotech.* **28**:2, 63-72.
39. Rodríguez-Couto, S., y Toca-Herrera, J. L. (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol. Adv.*, 500-513.
40. Román, R., Torres-Duarte, C., Ayala, M., y Vázquez-Duhalt, R. (2010) Producción a escala piloto de lacasa de *Coriolopsis gallica*. *Rev. Mex. Micol.*, **32**, 19-27.
41. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., y Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, **68**, 850-858.

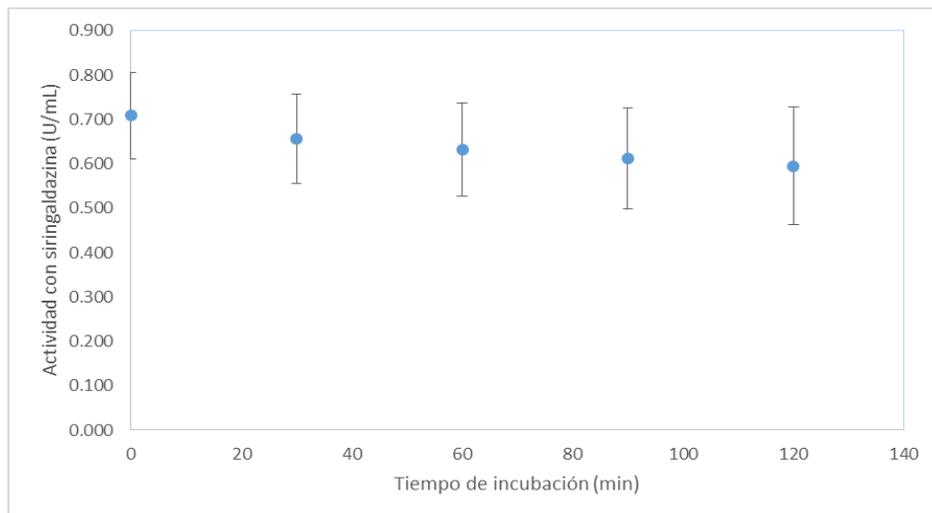
42. Shleev, S., Jarosz-Wilkolazka, A., Khalunina, A., Morozova, O., Yaropolov, A., Ruzgas, T., y Gorton, L. (2005) Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. *Bioelectrochemistry*, **67**:1, 115-124.
43. Shleev, S., Reinmann, C. T., Serezhenkov, V., Burbaev, D., Yaropolov, A. I., Gorton, L., y Ruzgas, T. (2006) Autoreduction and aggregation of fungal laccase in solution phase: possible correlation with a resting form of laccase. *Biochimie*, **88**, 1275-1285.
44. Solomon, E. I., Sundaram, U. M., y Machonkin, T. E. (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.*, **96**, 2563-2605.
45. Sun, X., Bai, R., Zhang, Y., Wang, Q., Fan, X., Yuan, J., Cui, L., y Wang, P. (2013) Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenolic compounds. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **171**, 1673-1680.
46. Thurston, C. F. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, **140**, 19-26.
47. Tinoco, R., Pickard, M. A., y Vázquez-Duhalt, R. (2001) Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Lett. Appl. Microbiol.*, **32**, 331-335.
48. Torres, E., Bustos-Jaimes, I., y Le Borgne, S. (2003) Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Cat. B: Environmental*, **46**, 1-15.
49. Valderrama, B., Oliver, P., Medrano-Soto, A., y Vázquez-Duhalt, R. (2003) Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Antonie van Leeuwenhoek*, **84**, 289-299.
50. Vandertol-Vanier, H. A., Vázquez-Duhalt, R., Tinoco, R., y Pickard, M. A. (2002) Enhanced activity of poly(ethylene glycol) modification of *Corioloropsis gallica* laccase. *J. Ind. Microb. Biotech.*, **29**, 214-220.
51. Vázquez-Duhalt, R., Águila, S. A., Arrocha, A. A., y Ayala, M. (2014) QM/MM molecular modeling and Marcus theory in the molecular design of electrodes for enzymatic fuel cells. *Chem. Electro. Chem.*, **1**, 1-19.

52. Vite-Vallejo, O., Palomares, L. A., Dantán-González, E., Ayala-Castro, H. G., Martínez-Anaya, C., Valderrama, B., y Folch-Mallol, J. (2009) The role of *N*-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enz. Microb. Technol.*, **45**, 233-239.
53. Welinder, K. G. (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, **2**, 388-393.
54. Widsten, P., y Kandelbauer, A. (2008) Laccase applications in the forest products industry: a review. *Enz. Microbiol. Tech.*, **42**:4, 293-307.
55. Wu, Y., Taylor, K. E., Biswas, N., y Bewtra, J. K. (1998) A model for the protective effect of additives on the activity of horseradish peroxidase in the removal of phenol. *Enz. Microb. Technol.*, **22**, 315-322.
56. Xu, F. (1996) Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*, **35**, 7608-7614.
57. Xu, F., Berka, R. M., Wahleithner, J. A., Nelson, B. A., Shuster, J. R., Brown, S. H., Palmer, A. E., y Solomon, E. I. (1998) Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochem. J.*, **334**, 63-70.
58. Yoshida, H. (1883) Chemistry of lacquer (Urushi). *J. Chem. Soc.*, **43**, 472-486.

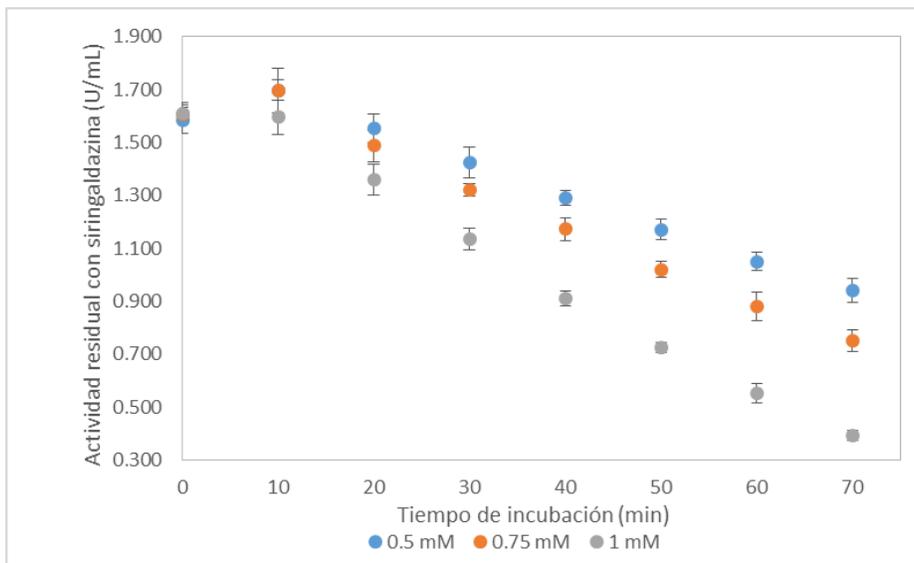
Figuras suplementarias



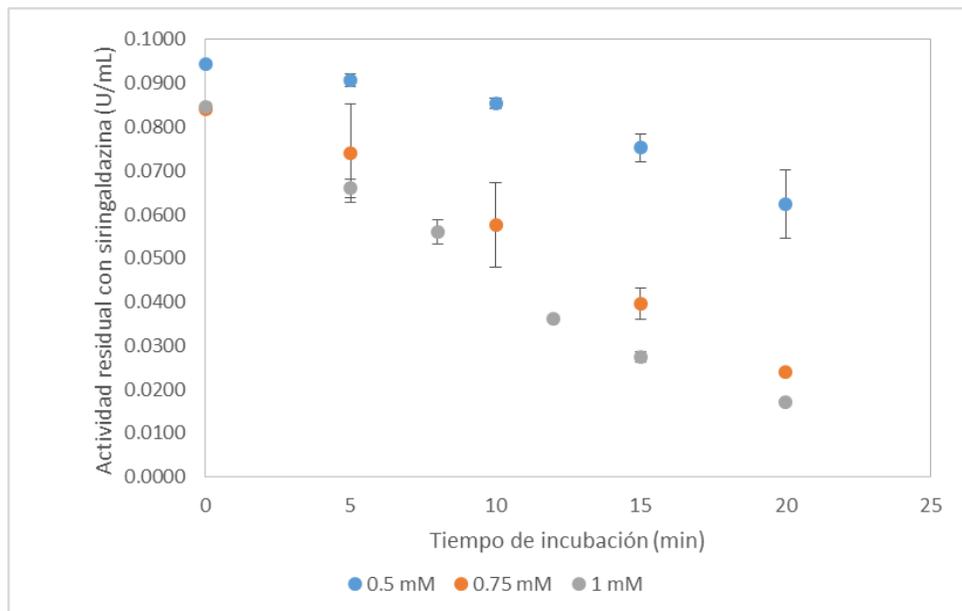
S1. Zimograma de la CgL en solución amortiguadora de succinatos, pH 4.5, 60 mM, con siringaldazina. Se observa la coloración rosada de una sola banda, lo que indica la presencia de actividad lacasa.



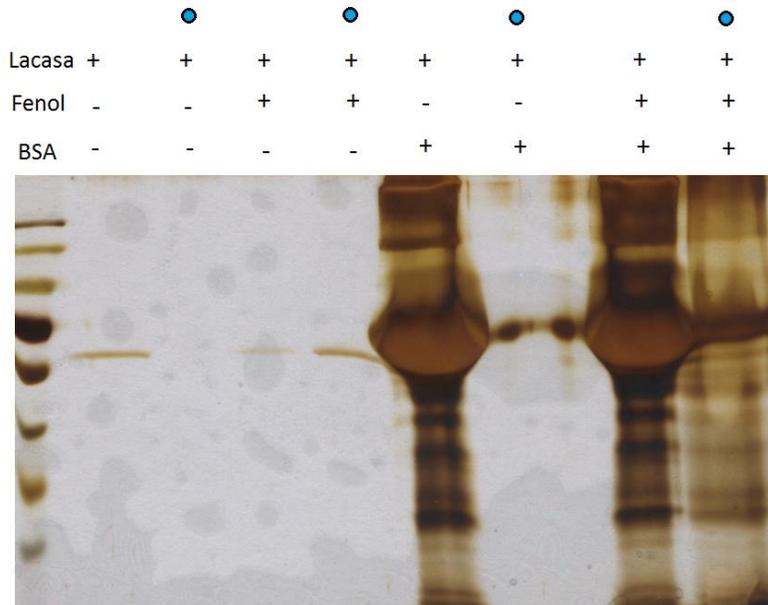
S2. Estabilidad de la CgL (0.7 U mL^{-1}) en solución amortiguadora de succinatos, pH 4.5, 60 mM, a 23°C . El experimento se realizó por triplicado. Se observa que la enzima es estable en a pH 4.5 por lo menos durante 2 h.



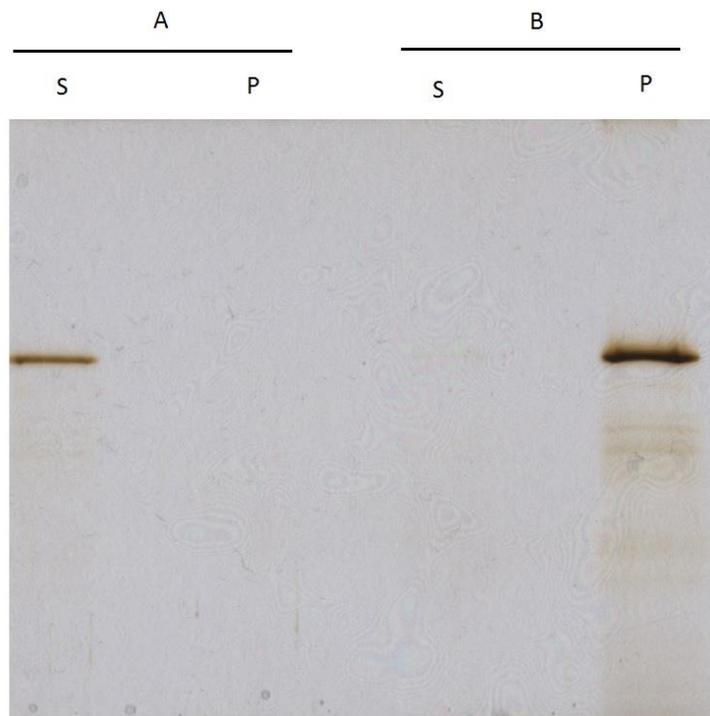
S3. Efecto de la concentración inicial de sustrato en la reacción de la CgL (2 U mL^{-1}) con fenol (0.5, 0.75 y 1 mM) en solución amortiguadora de succinatos, 60 mM, pH 4.5 a 23°C . Se observa un incremento en la velocidad de inactivación a concentraciones mayores de sustrato



S4. Efecto de la concentración inicial de sustrato en la reacción de la CgL (0.08 U mL^{-1}) con 4-metoxifenol (0.5, 0.75 y 1 mM) en solución amortiguadora de succinatos, 60 mM, pH 4.5, a 23°C . Se observa un incremento en la velocidad de inactivación a concentraciones mayores de sustrato.



S5. SDS-PAGE teñido con nitrato de plata para la reacción de la CgL con 1 mM de fenol y 10 μ M de BSA. Se muestra la fracción soluble (sin círculo azul) y la fracción insoluble (círculo azul). Se observa la presencia de BSA asociada a la fracción insoluble.



S6. SDS-PAGE de la reacción de la CgL con 1 mM de fenol en un tiempo mayor a 2 h. Se muestra la fracción soluble (S) e insoluble (P) al inicio de la reacción (A) y después de 2 h (B). Se observa la presencia de la CgL sólo en la fracción insoluble.

Anexo

Póster presentado en el XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Centro de convenciones de Cancún. Cancún, Quintana Roo. 23-28 de junio de 2013.

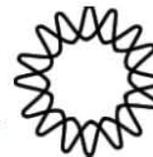
Póster presentado en el congreso Oxizymes Vienna 2014.
Viena, Austria. 1-4 de julio de 2014.



Inactivation of a fungal laccase by free phenoxyl radicals

Joaquín Ramírez Ramírez, Rafael Vázquez Duhalt, Marcela Ayala Aceves

Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México. E-mail: joako@ibt.unam.mx (J. Ramírez)



Introduction

Laccases are oxidoreductases that contain copper ions capable of simultaneously catalyzing the reduction of oxygen to water and the oxidation of phenolic compounds following a free radical mechanism (1). Their application in the bioremediation of polluted water and soil has been considered (2). However, the enzyme quickly becomes inactivated during the reaction with different phenols. The mechanism of inactivation is poorly understood. In other oxidoreductases that catalyze the same reaction, the inactivation is related to free radical attack to the enzyme and/or to adsorption of the enzyme to the polymer formed (3) (fig. 1).

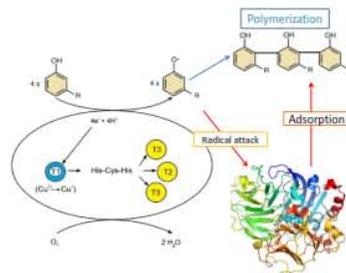


Fig. 1. Laccase catalyzed reaction with phenols and hypothetical inactivation pathways.

Objective

The objective of this work is to study the mechanism of inactivation of a fungal laccase during the oxidation of phenols with different redox potential (E).

Methods

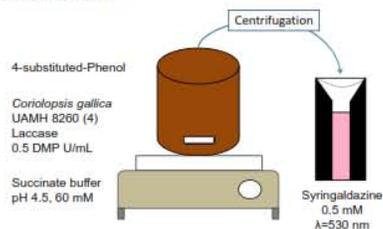


Fig. 2. Batch reaction of laccase with phenols and residual activity measurement.

Table I. Substrates tested, redox potential and activity.

Substrates	Redox potential (V)	Activity (min^{-1})
Phenol	0.97	12.3
4-Bromophenol	0.96	68.2
4-Chlorophenol	0.94	97.2
4-Methoxyphenol	0.72	1641

Results

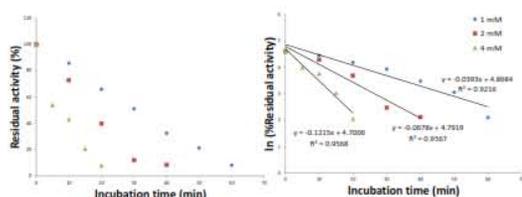


Fig. 3. Residual activity profile of laccase during the reaction with phenol (left) and semilogarithmic fit of data to a first order inactivation model (right).

Discussion

Laccase inactivation profiles were obtained for 4 different substrates with redox potential ranging from 0.72-0.97 V (table I). A first order inactivation model was used to calculate the inactivation constants (fig. 3). As expected, laccase inactivation occurs faster as initial concentration of substrate increases. Moreover, low E phenols inactivate faster than high E ones (fig. 4). This could be due to the higher concentration of radicals produced with low E substrates, as activity values indicate (table I). SDS-PAGE analysis (fig. 5) showed that part of the enzyme is associating with the phenolic polymer. No protein was detected in the supernatant.

In order to evaluate the effect of E in the inactivation rate, batch reactions should be conducted with similar substrate transformation rates.

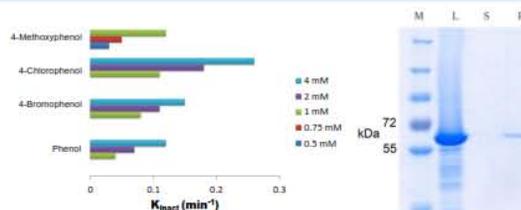


Fig. 4. Inactivation rate constants of laccase with different phenols. Lower redox potential substrates inactivate faster than high redox potential ones.



Fig. 5. Fractions of laccase reaction with 4-MeOPh. Native laccase (L), supernatant fraction (S) and polymer fraction (P).

Conclusions

- Our data suggest an inverse correlation of inactivation rate with substrate redox potential, which could be due to higher concentration of radicals for the low redox potential phenols.
- SDS-PAGE analysis and total protein measurements show that the enzyme is also associating with the phenolic polymer.
- A combined inactivation mechanism may be responsible for activity loss.

References

1. Baldrian, P. (2006). *FEMS Microbiol Rev* 30: 215-242.
2. Strong, P.J., Claus, H. (2011). *Critical Rev Environ Sci Tech* 41: 373-434.
3. Huang, Q., et al. (2005). *J Am Chem Soc.* 127: 1431-1437.
4. Román, R., Torres-Duharte, C., Ayala, M., Vázquez-Duhalt, R. (2010). *Rev Mex Micología* 32: 19-27.

Acknowledgements

This work has the financial support of the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT) and PAPIIT IN201612. The authors thank Rosa Roman for her technical assistance.

Objective: to study the inactivation of laccase during the oxidation of a series of *p*-phenols, and to establish the influence of the polymer and the free radical reactivity (related to redox potential, E°) (Fig. 1).

Substrate	E° (mV)
Phenol (Phe)	970
4-bromo Phe	960
4-chloro Phe	940
4-methyl Phe	870
4-methoxy Phe	720

Experimental strategy: A high redox potential laccase from *Corioloopsis gallica* was produced and purified in our laboratory. Soluble, residual activity during the oxidation of phenols (in pH 4.5 succinate buffer) was determined for the duration of the reaction, as well as the interaction of the enzyme with the polymer.

Results: The enzyme was inactivated during the reaction with all tested phenols; the residual activity at various phenol concentration was adjusted to a first-order rate model, obtaining the inactivation rate constants shown in Fig. 2.

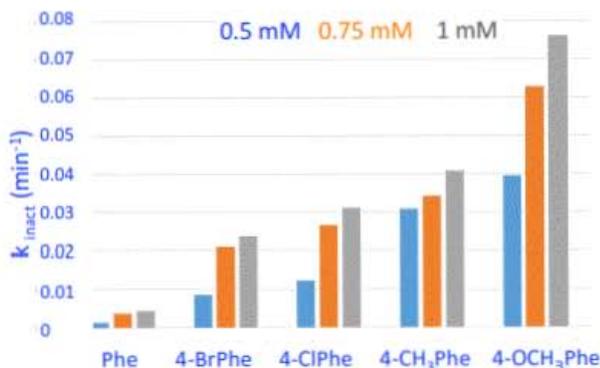


Figure 2. First-order rate constant for laccase inactivation during oxidation of *p*-phenols

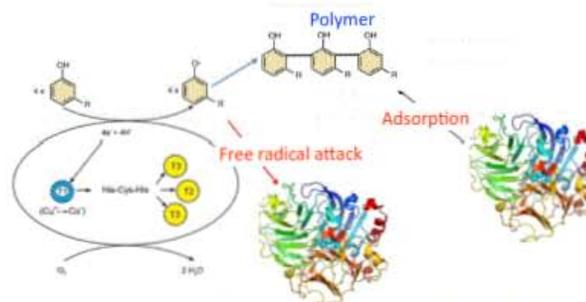


Figure 1. Proposed model for laccase inactivation during phenol oxidation

•Conversion and inactivation rates are related. When accounting for substrate conversion, it becomes apparent that the high E° free radicals from phenol are more inactivating than the low E° free radicals from 4-methoxyphenol (Fig. 3).

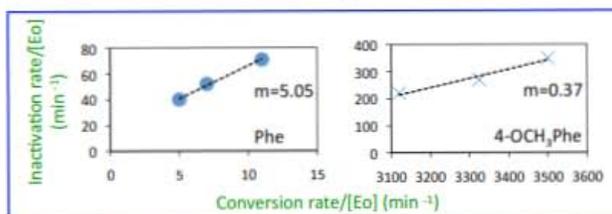


Figure 3. Inactivation is more dependent on conversion for high E° free radicals

•The enzyme is adsorbed into the insoluble polymer, both during the reaction (Fig. 4) and also when fresh enzyme is incubated with the polymer. The polymer-enzyme complex retains activity, suggesting the interaction may lower the enzymatic activity, but not necessarily lead to inactivation.



Figure 4. Residual laccase in the reaction supernatant (SN) but also adsorbed to the insoluble polymer (Pol)

Conclusions: The main laccase-inactivating factor during phenol oxidation is free radicals; free radicals concentration plays a role, however the E° of the free radicals may influence the inactivation by one order of magnitude.

Acknowledgements. This work was supported by Conacyt 179241.