



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Modificación química *ex-situ* del grupo hemo
de la peroxidasa versátil de *Bjerkandera adusta*
y el efecto en su actividad enzimática”

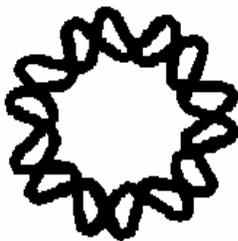
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA

I.BQ. JUAN CARLOS CANUL TEC

TUTOR: DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT



CUERNAVACA, MORELOS

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A mis padres Antonio e Irene, por su amor y dedicación sin límites.

A mis hermanos, Antonio, Candi, José, Lupita, Miguel y Tomás, por el ejemplo y apoyo que me han dado.

A Liliana, cuya presencia y cariño me motivan todos los días.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por su asidua enseñanza, apoyo y paciencia durante mis estudios de maestría.

Al Dr. Enrique Rudiño Piñera por su dedicada participación en mi comité tutoral.

Al Dr. Michael A. Pickard por proporcionarnos gentilmente la peroxidasa versátil.

Al M. en B. Raunel Tinoco Valencia por la capacitación y el apoyo técnico que me ha otorgado constantemente.

A mis compañeros y amigos del grupo RVD: Raunel, Rosa, Marcela, Tere, Lety, Doña Silvia, Jorge, Adriana, Blanca, Lizette, Dayanira, Alexis, Marco y Toño.

A mis ex-compañeros y amigos Brenda, Rosalía, Nuria, Paloma, Gaby, Gustavo y Alina.

A mis amigos Gaby, Gina, Nadia, Hernán, Fabian y Saúl.

A toda mi familia, especialmente a mis tías Hilda y Nidelvia.

A Dios, por poner en mi camino a todas estas personas.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rafael Vázquez Duhalt. Durante la realización de este trabajo se contó con la beca de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

INDICE GENERAL

	Página
INDICE GENERAL	I
INDICE DE FIGURAS	III
INDICE DE TABLA	IV
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. ANTECEDENTES	4
1.1 Hemoproteínas	4
1.2 Peroxidasas	4
<i>1.2.1 El grupo hemo</i>	<i>5</i>
1.3 Propiedades espectroscópicas del grupo hemo y de las hemoproteínas	7
1.4 Características estructurales y funcionales de las peroxidasas	8
<i>1.4.1 Mecanismo de reacción de las peroxidasas</i>	<i>8</i>
<i>1.4.2 El ambiente de la cavidad del hemo de las peroxidasas</i>	<i>9</i>
<i>1.4.3 El Potencial de reducción de las peroxidasas</i>	<i>11</i>
1.5 El sistema ligninolítico de los hongos de la “podredumbre blanca”	14
<i>1.5.1 La lignino peroxidasa y la manganeso peroxidasa</i>	<i>15</i>
<i>1.5.2 La peroxidasa versátil</i>	<i>16</i>
<i>1.5.3 Ciclo catalítico de la peroxidasa versátil</i>	<i>18</i>
1.6 Sitios de unión al sustrato en las peroxidasas fúngicas	19
<i>1.6.1 Sitio de oxidación del manganeso</i>	<i>19</i>
<i>1.6.2 Sitios de oxidación de sustratos aromáticos</i>	<i>20</i>
1.7 Aplicaciones ambientales de las peroxidasas	22
<i>1.7.1 Oxidación biocatalítica de hidrocarburos poliaromáticos</i>	<i>22</i>
1.8 Modificación de proteínas	24
<i>1.8.1 Ingeniería de proteínas</i>	<i>25</i>
<i>1.8.2 Modificación química de proteínas</i>	<i>26</i>
<i>1.8.3 Modificación química ex-situ del grupo hemo</i>	<i>27</i>
2. HIPÓTESIS	30

3. OBJETIVOS.....	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
4.1 Enzima	31
4.2 Reactivos.....	31
4.3 Equipo.....	31
4.4 Métodos	32
4.4.1 Caracterización enzimática.....	32
4.4.2 Determinación de proteína.....	32
4.4.3 Métodos para la extracción del grupo hemo de la enzima	33
4.4.4 Modificación química de la ferritoporfirina IX.....	34
4.4.5 Espectro de infrarrojo de la hemina nativa y modificada.....	35
4.4.6 Reconstitución de la enzima	35
4.4.7 Determinación de los parámetros cinéticos	36
4.4.8 Actividad específica contra hidrocarburos poliaromáticos	36
4.4.9 Construcción del modelo de la peroxidasa versátil con las heminas modificadas	37
4.4.10 Análisis estadístico	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1 Preparación de la apoenzima.....	38
5.1.1 Extracción del grupo hemo de la peroxidasa de rábano blanco.....	38
5.1.2 Extracción del grupo hemo de la peroxidasa versátil.....	41
5.2 Modificación química de la ferritoporfirina IX.....	44
5.2.1 Espectros de infrarrojo de la hemina sin modificar y las heminas modificadas	44
5.2.2 Espectros UV/vis de la hemina sin modificar y de las heminas modificadas	49
5.3 Reconstitución de la peroxidasa versátil	50
5.3.1 Espectros UV/vis de la peroxidasa versátil nativa y modificada.	51
5.3.2 Constantes cinéticas de la peroxidasa versátil nativa y modificada.....	53
5.3.3 Oxidación de hidrocarburos poliaromáticos por la peroxidasa versátil.....	57
6. CONCLUSIONES	60
7. PERSPECTIVAS.....	61
8. REFERENCIAS.....	62

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de la ferriprotoporfirina IX	6
Figura 2. Mecanismo catalítico de las hemoperoxidasas	9
Figura 3. El sitio catalítico de la LiP, la MnP y la CPO	10
Figura 4. Representación molecular de la VP de <i>Bjerkandera</i>	17
Figura 5. Esquema del mecanismo catalítico de la peroxidasa versátil	18
Figura 6. Aminoácidos que conforman la RTEL de la VP de <i>Bjerkandera adusta</i>	21
Figura 7. Oxidación de hidrocarburos poliaromáticos con diferentes hemoproteínas	24
Figura 8. Modificación química <i>ex-situ</i> del grupo hemo y reconstitución de la apoenzima	27
Figura 9. Mecanismo de la esterificación del grupo carboxilo con carbodiimida	28
Figura 10. Espectro UV/vis de la VP, su apoenzima y de la VP reconstituída con hemina	42
Figura 11. Espectro de infrarrojo de la hemina no modificada	45
Figura 12. Espectro de infrarrojo de la hemina esterificada con BF ₃ /metanol	46
Figura 13. Espectro de infrarrojo de la hemina modificada con PEG de 350 Da	47
Figura 14. Espectro de infrarrojo de la hemina modificada con PAB y PNB	48
Figura 15. Espectro UV/vis de la hemina nativa y modificada con CH ₃ , PEG, PAB y PNB	50
Figura 16. Espectros UV/vis de la VP nativa y modificada	52
Figura 17. Representación del sitio de unión a Mn ²⁺ de la VP con a) Hemo-MET, b) Hemo-PEG, c) Hemo-PAB y d) Hemo-PNB	55

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Actividad específica de la apoHRP preparada con butanona ácida y a diferentes pH de extracción	39
Tabla II. Variables y condiciones de reconstitución ensayadas con la apoHRP preparada con butanona ácida	40
Tabla III. Actividad tipo MnP de la apoVP preparada con butanona ácida y de la VP reconstituida con hemina	41
Tabla IV. Variables y condiciones de reconstitución ensayadas con la apoVP preparada con acetona ácida	43
Tabla V. Absorción en el infrarrojo de los principales grupos funcionales de la hemina modificada y no modificada	49
Tabla VI. Actividades específicas de la VP nativa y VP reconstituida con hemina modificada y no modificada	51
Tabla VII. Constantes cinéticas de las actividades tipo MnP y LiP de la VP nativa y modificada	54
Tabla VIII. Actividad específica en ausencia de Mn ²⁺ de la VP nativa y VP modificada contra hidrocarburos poliaromáticos	57

RESUMEN

La peroxidasa versátil es un híbrido estructural de la lignino peroxidasa y la manganeso peroxidasa, que puede oxidar una amplia variedad de sustratos de alto potencial redox, incluyendo diferentes compuestos xenobióticos. En este trabajo se empleó la modificación química del grupo hemo de la peroxidasa versátil con la intención de mejorar sus propiedades catalíticas. La estrategia *ex-situ* implicó la extracción del grupo prostético de la enzima, la modificación química de la hemina (análogo del grupo hemo) y la reconstitución de la enzima con la hemina modificada.

Se estudiaron dos métodos para extraer el grupo prostético de la peroxidasa versátil, el método de la butanona ácida y el de la acetona ácida. Ambos métodos fueron adecuados para extraer el grupo hemo de la enzima, sin embargo, después de reconstituir la apoenzima con hemina, sólo la apoenzima preparada con acetona ácida recuperó parcialmente la actividad. La reconstitución de la apoenzima se realizó a diferentes condiciones de temperatura, pH y en presencia de urea y Tween 80, ninguna de las variables aumentó la recuperación de actividad.

Se realizaron cuatro modificaciones químicas en los propionatos de la hemina. La esterificación con grupos metilo se realizó con trifluoruro de boro como catalizador, mientras que el polietilenglicol, el alcohol *p*-amino-bencílico y el alcohol *p*-nitro-bencílico se acoplaron a la hemina por medio de la química de la carbodiimida. La naturaleza de las modificaciones se comprobó a través de espectroscopía de infrarrojo y de UV/vis.

La peroxidasa versátil reconstituida con hemina no modificada presentó propiedades catalíticas ligeramente diferentes a las de la enzima nativa. La apoenzima pudo reconstituirse con las heminas modificadas. Las enzimas modificadas presentaron afinidades similares por el alcohol veratrílico, Mn^{2+} y peróxido de hidrógeno, pero menores eficiencias catalíticas.

Finalmente, se ensayó la oxidación de cuatro hidrocarburos poliaromáticos de diferente potencial redox con las enzimas modificadas. Ninguna de las heminas modificadas favoreció la actividad de la peroxidasa versátil contra estos compuestos puesto que las velocidades de oxidación de los hidrocarburos poliaromáticos permanecieron invariables.

INTRODUCCIÓN

La calidad de vida en la tierra está unida inexorablemente a la calidad global del ambiente. Actualmente, existen dos problemas fundamentales relacionados con la contaminación: la disposición de la gran cantidad de desechos que están siendo producidos continuamente y la restauración de sitios que han sido contaminados con compuestos tóxicos.

La biotecnología es una herramienta esencial para resolver los dos problemas anteriores debido a la habilidad de algunos organismos y sus enzimas para transformar contaminantes en sustancias menos tóxicas. En las últimas décadas, se ha explorado el uso de las enzimas producidas por los hongos ligninolíticos para degradar contaminantes tóxicos. Dentro de estas se encuentran la veratril alcohol oxidasa, la peroxidasa versátil y la lacasa. La estructura de la lignina implica que las enzimas ligninolíticas poseen la habilidad de oxidar sustratos de alto potencial redox en una manera no específica. *In vivo*, las enzimas catalizan una gran variedad de reacciones como oxidaciones, rompimiento de enlaces, hidroxilaciones, polimerizaciones y desmetilaciones (Pointing, 2001). Ya es bien conocida la habilidad de las peroxidasas fúngicas para degradar un gran número de compuestos xenobióticos, como hidrocarburos poliaromáticos, colorantes tipo azo, y pesticidas organofosforados. Se ha enfocado un gran esfuerzo en el desarrollo de tecnologías para el tratamiento de compuestos tóxicos, que complementen o sustituyan a las convencionales (Field *et al.* 1993).

Además de su aplicación ambiental, las peroxidasas son potencialmente útiles en varias aplicaciones industriales y analíticas. Existen varios campos en donde las peroxidasas podrían reemplazar las técnicas oxidativas químicas usadas actualmente en diversos procesos industriales, a fin de hacerlos más eficientes y amigables con el ambiente (Regalado *et al.* 2004). Algunas de las aplicaciones que están siendo estudiadas incluyen la decoloración de colorantes sintéticos, la síntesis de polímeros conductores, el desarrollo de biosensores e inmunoensayos, el tratamiento de aguas residuales, en la industria del papel, etc. A pesar de su evidente valor como biocatalizadores, las peroxidasas están limitadas por su estabilidad y funcionalidad operacional en las condiciones comúnmente requeridas, principalmente en presencia de su sustrato activador que es el peróxido de hidrógeno (Torres *et al.* 2003).

En general, las peroxidasas están constituidas por una matriz peptídica y un grupo hemo. La funcionalidad (actividad, especificidad, estabilidad, etc.) de las peroxidasas puede ser controlada mediante cambios asociados a alguno de estos componentes. Se ha reportado que la modificación de las cadenas laterales del grupo hemo de varias hemoproteínas ha tenido un efecto positivo en sus propiedades catalíticas.

La peroxidasa versátil ha sido objeto de un creciente interés en años recientes debido a su capacidad para oxidar un amplio rango de sustratos recalcitrantes. Esta enzima es un híbrido estructural y funcional de la ligninasa y la manganeso peroxidasa. El hecho de que presente dos tipos de actividades enzimáticas permite estudiarla como ligninasa o manganeso peroxidasa. En este trabajo se realizó la modificación química *ex-situ* del grupo hemo de la peroxidasa versátil. La estrategia *ex-situ* consiste en el reemplazo del grupo prostético de la enzima con una hemina modificada covalentemente.

Los propionatos de la hemina se modificaron con grupos metilo y polietilenglicol para incrementar la hidrofobicidad del sitio activo y la afinidad por sustratos hidrofóbicos. También fueron modificados con grupos opuestos en su carácter electrón atrayente, el alcohol *p*-amino-bencílico (donador de electrones) y el alcohol *p*-nitro-bencílico (aceptor de electrones). Estas modificaciones se realizaron para modular el potencial de reducción de la enzima.

Después de reconstituir la peroxidasa versátil con la hemina modificada, se estudió el efecto de la modificación en las propiedades catalíticas de la peroxidasa versátil contra sus sustratos típicos y con hidrocarburos poliaromáticos. Con el fin de tener un punto de comparación y de evaluar el efecto del proceso de extracción y reincorporación del grupo hemo sobre su actividad catalítica, la enzima también fue reconstituida con hemina sin modificar.

1. ANTECEDENTES

1.1 Hemoproteínas

El grupo hemo es el grupo prostético de varias familias de proteínas y enzimas que realizan una gran variedad de funciones básicas para la supervivencia de los sistemas biológicos. El origen de las funciones individuales en las hemoproteínas reside en las interacciones específicas del grupo hemo con la apoproteína, junto con las propiedades inherentes de cada componente (Dunford, 1999). Algunas funciones son la transferencia de electrones, el transporte y almacenamiento de moléculas pequeñas, la conversión de dioxígeno a agua, la oxidación de sustancias orgánicas y el metabolismo enzimático (Wijesekera y Dolphin, 1994). Por ejemplo, la hemoglobina y la mioglobina son responsables del transporte de oxígeno de los pulmones a todas las partes de un organismo y de su almacenamiento en los tejidos del músculo, respectivamente. Otras hemoproteínas relacionadas estructuralmente, median la transferencia de electrones (citocromos *b* y *c*), la producción de energía celular en la mitocondria por medio de la reducción del oxígeno a agua (citocromo *c* oxidasa), la biosíntesis de esteroides y la detoxificación de xenobióticos (sistema del citocromo P450) y la utilización o destrucción de peróxido de hidrógeno (catalasas y peroxidases, respectivamente).

1.2 Peroxidasas

Las peroxidasas son una familia de oxidoreductasas que catalizan la oxidación de una gran variedad de moléculas orgánicas e inorgánicas a expensas del peróxido de hidrógeno, el aceptor final de electrones. Las peroxidasas están ampliamente distribuidas entre los organismos y tienen la capacidad de catalizar un gran número de reacciones bioquímicas. El elemento que tienen en común estas enzimas es su grupo prostético: un grupo hemo.

Las peroxidasas se dividen en dos superfamilias: la de mamíferos y la de plantas. Además de las peroxidasas que son secretadas por plantas, la superfamilia de las peroxidasas de plantas incluye peroxidasas de origen no vegetal. Los miembros de esta superfamilia se han agrupado en tres clases, la división se realizó con base en la homología de las secuencias disponibles y se confirmó después, a través del análisis de las estructuras cristalográficas que se han ido resolviendo para estas enzimas (Welinder, 1992)

La clase I comprende peroxididasas intracelulares de origen procariótico como la citocromo *c* peroxidasa de levadura (CCP) y la ascorbato peroxidasa (APX). En la clase II se encuentran las peroxididasas extracelulares de hongos. Ejemplos de esta clase son la lignino y manganeso peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* y la peroxidasa de *Coprinus cinereus* (CIP), nombre alternativo *Arthromyces ramosus*. La clase III abarca las peroxididasas extracelulares de plantas. El miembro más representativo de la clase es la peroxidasa de rábano blanco isoenzima C (HRP). Los miembros de la clase I presentan pocas modificaciones postraduccionales, mientras que las peroxididasas de las clases II y III presentan una secuencia señal para secreción en el amino terminal, dos iones de calcio estructurales y cuatro puentes disulfuro conservados, cuya localización varía en cada enzima. Las peroxididasas de ambas clases se encuentran glicosiladas en su superficie, en diferente proporción (Welinder, 1992).

Las haloperoxidasas son peroxididasas que no encajan en ninguna de las clasificaciones anteriores y catalizan la halogenación de compuestos orgánicos a través de la oxidación de haluros con peróxido de hidrógeno. Algunas de estas enzimas, como la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* (CPO), tienen un grupo hemo en su sitio activo aunque otras no presentan un heterogrupo, sino elementos como vanadio como la vanadio bromoperoxidasa de las algas marinas *Ascophyllum nodosum* y *Corallina officinalis* o la vanadio cloroperoxidasa del hongo *Curvularia inaequalis* (Butler, 1998).

1.2.1 El grupo hemo

El grupo hemo es el complejo que forma el hierro con una porfirina. El hierro puede existir en varios estados de oxidación (de -II a +VI). En las hemoproteínas, los estados de oxidación son II (d^6) y III (d^5). El Fe^{III} es un ácido duro que prefiere formar complejos con ligantes fuertes con el oxígeno, mientras que el Fe^{II} favorece la formación de complejos con ligantes con el nitrógeno y el azufre. El número de coordinación más frecuente es seis, aunque también existen complejos tetra y pentacoordinados. En los complejos hexacoordinados se pueden observar dos estados de espín diferentes (complejos de bajo espín con ligantes fuertes y complejos de alto espín con ligantes débiles). Los complejos de alto espín son cinéticamente lábiles, mientras que los de bajo espín son inertes (Frausto da Silva y Williams, 1991; Lippard y Berg, 1994).

La protoporfirina IX es un macrociclo de 20 carbonos que contiene dobles enlaces conjugados y que está formada por cuatro anillos pirrólicos (I, II, III, IV) unidos por puentes metinos. La porfirina dianiónica, formada durante la remoción de los protones internos del NH, actúa como ligante tetradentado que une al Fe^{III} en el centro de la molécula y forma la ferriprotoporfirina IX, también llamada hemo *b* o protohemo. Uno o dos ligandos axiales completan la coordinación de pirámide de base cuadrada alrededor del hierro (Dunford, 1999). El término hemo se refiere específicamente a la ferriprotoporfirina IX (Fe^{2+}), mientras que el complejo de ferriprotoporfirina IX Fe-Cl se conoce como hemina.

La identidad del grupo hemo está diferenciada por los grupos laterales β -pirrólicos. En la nomenclatura desarrollada por Hans Fisher, las posiciones de los anillos pirrólicos se numeran del uno al ocho, en el sentido de las manecillas del reloj (Dunford, 1999). Los átomos de carbono de los puentes metinos (meso) están numerados con las letras α , β , γ y δ , con el carbono α localizado entre las posiciones dos y tres de las cadenas laterales (Figura 1). La ferriprotoporfirina IX tiene ocho posiciones pirrólicas laterales (β): cuatro grupos metilo (posiciones 1, 3, 5 y 8), dos vinilos (2 y 4) y dos propionatos (6 y 7).

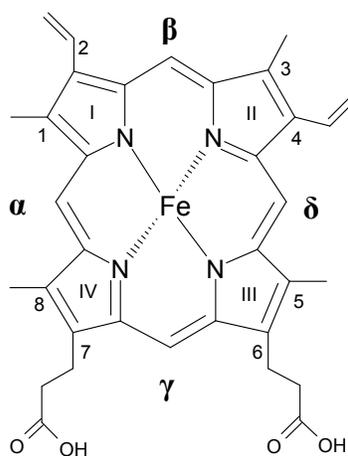


Figura 1. Estructura de la ferriprotoporfirina IX.

La flexibilidad proporcionada por los tres estados de oxidación biológicamente accesibles del Fe, la modulación de estos estados y sus propiedades químicas por los cuatro ligandos de nitrógeno, más uno o dos ligandos axiales, y la interrelación del sistema π de la porfirina con los orbitales d del Fe, hacen posible la rica química asociada con el grupo hemo.

1.3 Propiedades espectroscópicas del grupo hemo y de las hemoproteínas

Las porfirinas exhiben propiedades características de absorción en la región UV-vis. El sistema electrónico π altamente conjugado del anillo de porfirina es responsable de su intenso color. Las bandas de absorción típicas de los espectros de las metaloporfirinas se deben a dos transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$. Sus longitudes de onda indican el estado de oxidación, espín y coordinación del hemo. Alrededor de los 400 nm se detecta la banda Soret o banda B , con un coeficiente de extinción molar (ϵ) $\approx 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En la región visible, se observan dos bandas de menor intensidad que la Soret ($\approx 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Estas bandas se conocen como bandas β - α o Q . La banda α corresponde a la transición singulete $Q_0 \pi \rightarrow \pi^*$ más baja de la porfirina y la banda β a la envoltura vibracional Q_v (Gouterman, 1959). Las posiciones e intensidades de las bandas Soret, β y α dependen de la configuración electrónica del metal de la porfirina y de sus grupos periféricos, pues las energías de transición varían como consecuencia del acoplamiento entre los orbitales del metal y de la porfirina. En las porfirinas con metales trivalentes, la naturaleza del ligando aniónico axial altera sensiblemente el espectro UV-vis (Wijesekera y Dolphin, 1994). Normalmente, las bandas Soret, α y β de las metaloporfirinas se encuentran alrededor de 400, 570 y 530 nm, respectivamente. En el espectro de la ferriprotoporfirina IX, las bandas $\pi \rightarrow \pi^*$ muestran un cambio significativo hacia el rojo y varias bandas extras de transferencia de carga debido a la configuración electrónica del Fe^{III} (Lombardi *et al.* 2001).

El espectro UV-vis de las hemoproteínas muestra patrones de absorción similares a los de las metaloporfirinas libres y es muy sensible al estado de oxidación y espín del hierro, que a su vez son modulados por el ambiente de la proteína. Además de las bandas $\pi \rightarrow \pi^*$, se observan dos bandas adicionales, asignadas a transiciones de transferencia de carga de la porfirina al hierro, alrededor de 500 a 700 nm. La longitud de onda de la banda CT1 (600-650 nm) es sensible al ambiente del hemo, en particular al sexto ligando axial. La CT1 sólo se observa en las hemoproteínas de alto espín y se ha asignado a las transiciones de transferencia de carga de la porfirina al hierro [$a'_{2u}(\pi) \rightarrow e_g(d_\pi)$]. La energía de los orbitales (d_π) del hierro está correlacionada con la naturaleza del ligando axial, por medio de las interacciones electrónicas p y π con los orbitales del hierro. En las proteínas hexacoordinadas que contienen un grupo imidazol como quinto ligando, la CT1 va de 600 a 637 nm (Smulevich *et al.* 1996).

1.4 Características estructurales y funcionales de las peroxidasas

Desde un punto de vista mecanístico y estructural, las hemo peroxidasas están muy bien caracterizadas. Gracias a que ya se ha resuelto la estructura tridimensional de un considerable número de peroxidasas (Poulos *et al.* 1980; Piontek *et al.* 1993; Sundaramoorthy *et al.* 1994; Poulos *et al.* 1995; Gajhede *et al.* 1997) se ha podido elaborar un cuadro consistente de estas enzimas: las hemoperoxidasas tienen sitios activos muy similares que han sido diseñados para llevar a cabo un mecanismo catalítico que favorece la formación de intermediarios comunes de alto estado de oxidación.

1.4.1 Mecanismo de reacción de las peroxidasas

Todas las peroxidasas estudiadas hasta la fecha comparten un ciclo catalítico común que consta de tres pasos (Figura 2). El proceso inicia con la rápida reacción entre el hemo férrico de la enzima y el peróxido de hidrógeno. En este paso se produce un intermediario (ferrilo) de elevado estado de oxidación denominado compuesto I. Durante este paso, la proteína transfiere intramolecularmente dos electrones al peróxido de hidrógeno, se produce el rompimiento heterolítico del enlace O–O del peróxido de hidrógeno y se libera una molécula de agua. El compuesto I es un intermediario oxidado en dos electrones, que contiene un oxoferrilo [$\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$] porque uno de los electrones que se transfieren proviene del Fe^{III} . En la mayoría de las peroxidasas, el electrón restante lo pierde la porfirina, sin embargo, este electrón también puede provenir de alguno de los residuos aromáticos de la proteína. En ambos casos se forma un radical π -catiónico (Banci, 1997). En la CCP, el segundo electrón proviene del triptófano vecino a la histidina proximal (Sivaraja *et al.* 1989). La formación del compuesto I es seguida por su reducción en un electrón al compuesto II por una molécula de sustrato, este intermediario conserva el centro oxoferrilo coordinado a la porfirina. Simultáneamente, el compuesto II oxida una segunda molécula de sustrato y como resultado, el compuesto II regresa de nuevo al estado férrico que corresponde a la forma basal de la enzima. Las características estructurales precisas que favorecen la estabilización del ferrilo en el hemo no se entienden completamente, aunque ya se sabe que algunos residuos invariables en la cavidad del hemo de la peroxidasa activa tienen un papel relevante en la catálisis.

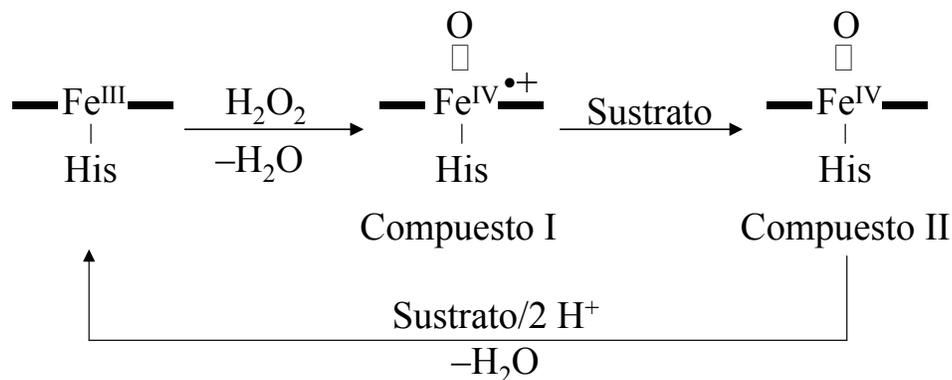


Figura 2. Mecanismo catalítico de las hemoperoxidasas. Las líneas más gruesas representan el anillo de porfirina.

Las peroxidases muestran el comportamiento cinético de una desactivación suicida cuando son expuestas a un exceso de peróxido de hidrógeno. En ausencia de un sustrato orgánico oxidable, la adición de peróxido de hidrógeno convierte el compuesto II en un radical peroxiferró(III)-porfirínico llamado compuesto III. Cuando una molécula extra de peróxido alcanza a este radical libre, la transferencia de electrones del estado ferroso a la molécula de peróxido de hidrógeno produce un radical hidroxilo altamente reactivo que puede atacar la estructura tetrapirrólica del grupo hemo y producir la desactivación irreversible de la enzima. La oxidación ataca los puentes metino que unen los anillos tetrapirrólicos, produce la escisión del macrociclo y la formación de una estructura tetrapirrólica de cadena abierta (Valderrama *et al.* 2002).

1.4.2 El ambiente de la cavidad del hemo de las peroxidases

En las peroxidases en estado basal, el hierro es de alto espín y se encuentra pentacoordinado por el N^ε del grupo imidazolato de una histidina en posición axial que está ubicada por debajo del plano del hemo. Esta histidina se llama proximal por ser la que está más cercana al hierro (por extensión, los dominios inferior y superior se llaman proximal y distal). En la CPO, el quinto ligando es un tiolato (Figura 3). La sexta posición de coordinación, ubicada por arriba del plano (en el dominio distal), puede encontrarse vacante o asociada a una molécula de agua, lo que determina el estado de espín del hierro. En el estado basal, el hierro sobresale del plano del anillo debido a que el residuo proximal lo empuja hacia fuera de la cavidad de la porfirina (Wijesekera y Dolphin, 1994).

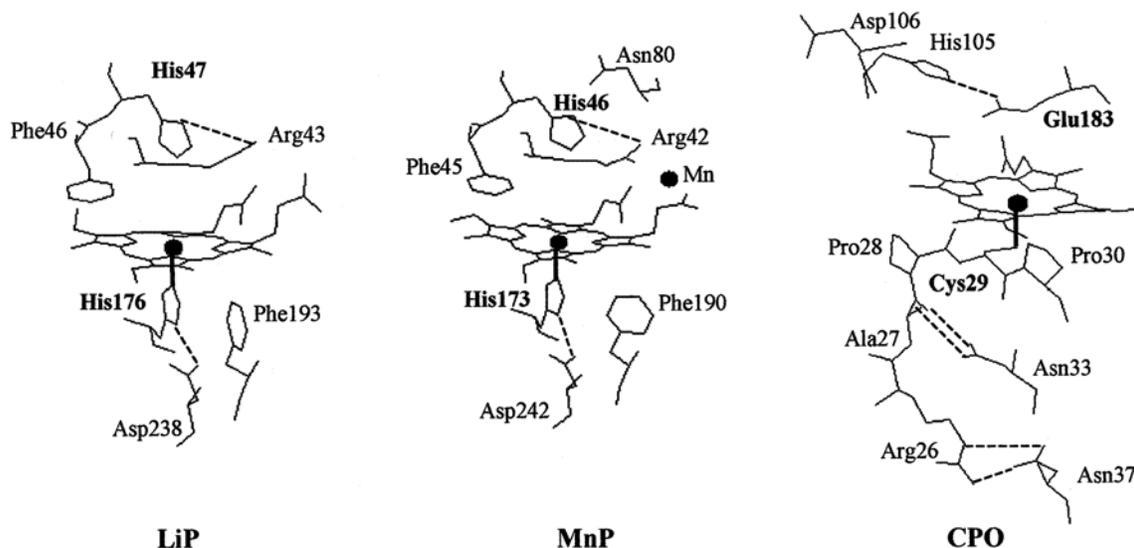


Figura 3. El sitio catalítico de la LiP, MnP y CPO. Los residuos distal y proximal se indican en negritas. La coordinación del grupo hemo al ligando proximal se indica con una línea sólida. Los puentes de hidrógeno se representan con líneas punteadas (Conesa *et al.* 2002).

La interacción de aminoácidos más allá de la primera esfera de coordinación es crítica en la modulación de las propiedades del hemo. En el sitio proximal de las peroxidasas de la clase I se encuentra conservado un triptófano, mientras que en las peroxidasas de las clases II y III este sitio lo ocupa una fenilalanina (con excepción de la CIP, que presenta una leucina). El triptófano es el sitio del radical catiónico del compuesto I en la CIP (Sivaraja *et al.* 1989). Por su parte, la fenilalanina tiene un potencial de reducción demasiado alto para ser oxidado por el peróxido y por lo tanto no está involucrado en la formación del compuesto I. En las demás peroxidasas, el radical catiónico puede localizarse en la molécula del hemo o en un residuo peptídico (Banci *et al.* 1997).

La histidina y la arginina distales están completamente conservadas en las peroxidasas de la superfamilia de plantas. Estos residuos son los principales responsables de la actividad peroxidasa y desempeñan un papel concertado en el ciclo catalítico. Se han propuesto dos funciones para la arginina distal (Poulos y Kraut, 1980). Primero, ayuda a estabilizar la carga negativa del grupo OH⁻ saliente del peróxido de hidrógeno. Segundo, una vez que el enlace O-O se rompe, el grupo guanidino se mueve dentro de la cavidad del hemo y forma un puente de hidrógeno con el oxo-Fe^{IV}=O del compuesto I y el compuesto II, estabilizando la carga. En la CCP, La histidina distal actúa como un catalizador ácido-base para traslocar el protón de uno

de los oxígenos del peróxido de hidrógeno al otro. La reacción inicia cuando el peróxido de hidrógeno entra en la cavidad distal del hemo y le transfiere un protón al átomo N^ε de la histidina distal. La estabilización de la forma desprotonada (disponible para aceptar el protón del peróxido de hidrógeno) está determinada por el puente de hidrógeno entre el N^ε de la histidina y el oxígeno de la cadena lateral de la D84 que a su vez, está unida por medio de un puente de hidrógeno al residuo E78 (ambos altamente conservadas en las peroxidasas). En el siguiente paso, la histidina distal regresa el protón al otro oxígeno del peróxido y se produce el rompimiento simultáneo del enlace O-O. En la CPO, el responsable del rompimiento del enlace O-O y la formación del compuesto I es la E183 (Sundaramoorthy *et al.* 1995).

En las hemoproteínas, el borde hidrofóbico del grupo hemo está escondido dentro de la proteína, mientras que los ácidos propiónicos hidrofílicos están cerca del exterior de la molécula. Entre las interacciones específicas y no covalentes que existen entre la ferriprotoporfirina IX y la matriz proteínica se encuentran las fuerzas de van der Waals que establece la porfirina con los aminoácidos hidrofóbicos que forman la cavidad del hemo y los puentes de hidrógeno que forman los propionatos de las cadenas laterales con los aminoácidos vecinos, algunos de los cuales están mediados por una molécula de agua (Dunford, 1999).

1.4.3 El Potencial de reducción de las peroxidasas

La facilidad de un compuesto de perder electrones o ser oxidado puede definirse por medio de un parámetro cuantitativo que se denomina potencial de reducción, de oxidación-reducción o potencial redox. Dicho de otra manera, el potencial de reducción es la tendencia de un donador de electrones en reducir su respectivo aceptor. El potencial se denomina potencial reductor estándar (E'_{\circ}) cuando se mide (en Volts) a 25°C y 1 M de donador y aceptor de electrones. Mientras más alto es el valor de E'_{\circ} para un par redox, el aceptor de electrones del par es más fuerte como oxidante (Vazquez-Duhalt, 2002). El ión férrico del par Fe^{3+}/Fe^{2+} es un oxidante fuerte, pues su valor de E'_{\circ} es de +770 mV. La adecuación única del hierro proviene de la gran variabilidad del potencial de reducción del Fe^{3+}/Fe^{2+} , regulado tan finamente por ligandos específicos, que los sitios activos de las hemoproteínas abarcan una gran parte del rango de potenciales redox de importancia biológica (Frausto da Silva y Williams, 1991).

El poder oxidante de los intermediarios de mayor estado de oxidación de las peroxidasas fúngicas puede explicarse mediante la medición de sus potenciales redox. Los potenciales de reducción medios a pH 7 (E_m) para el par Fe^{3+}/Fe^{2+} de varias isoenzimas de la LiP y MnP están alrededor de -130 y -90 mV, respectivamente (Millis *et al.* 1989). Estos valores son más positivos que los de otras peroxidasas como la HRP y la CCP, -278 y -194 mV, respectivamente (Yamada *et al.* 1975; Conroy *et al.* 1978). Es decir, el sitio activo de las peroxidasas fúngicas es más deficiente en electrones y concuerda con su capacidad para oxidar un rango más diverso de sustratos que las peroxidasas de otras clases (Kernsten *et al.* 1990).

Los valores de E'_o del compuesto I y II sólo han sido reportados para unas pocas peroxidasas. Sin embargo, a partir del potencial de reducción de los sustratos aromáticos que la LiP puede oxidar, se ha inferido que su E'_o excede los +1400 mV (Hammel *et al.* 1986; Kersten *et al.* 1990). En contexto, los valores de E'_o de los compuestos I y II de la HRP son cercanos a +950 mV, a un pH de 6.3 (Hayashi y Yamazaki, 1979). El potencial redox del alcohol veratrílico (AV^{++}/AV), sustrato de la LiP, medido en solución acuosa es de +1360 mV (Bietti *et al.* 1998). El potencial de reducción de los compuestos I y II de la MnP también deben ser altos, ya que el valor de E'_o del Mn^{3+} es de +1500 mV (Lide, 2000).

Uno de los factores que modulan el potencial de reducción de las peroxidasas es la fuerza de la red de puentes de hidrógeno entre el anillo imidazol y los aminoácidos vecinos en el sitio proximal. El átomo N^{δ} de la histidina proximal forma un puente de hidrógeno fuerte con el ácido carboxílico de un aspártico completamente conservado en las peroxidasas. La interacción le imparte un carácter imidazolato (basicidad) al N^{ϵ} de la histidina proximal e incrementa la densidad electrónica del hemo (Smulevich, 1998). El incremento en la basicidad estabiliza el estado férrico de la enzima en estado basal y los estados $Fe^{(IV)}$ de los compuestos I y II y por lo tanto, disminuye los potenciales redox del hierro (Banci *et al.* 1991).

Las resonancias de 1H -NMR de la histidina proximal de la LiP mostraron que la fuerza del puente de hidrógeno del imidazol de la LiP es menor que en la de la HRP (deRopp *et al.* 1991). Por su parte, Andrawis *et al.* (1988) sugirieron que un puente de hidrógeno más débil entre el enlace $Fe-N^{\epsilon}$ reduce la densidad electrónica del anillo de imidazol y resulta en un

enlace Fe-N^ε más largo. Las estimaciones de H-NMR de Banci *et al.* (1993) revelaron enlaces Fe-N^ε progresivamente más largos en la HRP, la CCP, la MnP y la LiP. Aunque no se encontraron diferencias significativas en la longitud de los enlaces de la CCP y la LiP. En las peroxidasas fúngicas, la histidina proximal se aleja 1 Å del plano del hemo con respecto a su posición en la CCP. Este movimiento se debe a la formación de un puente de hidrógeno fuerte entre la cadena lateral de la serina (contigua a la histidina proximal ubicada en la hélice F) y la cadena lateral de un aspártico contiguo a la hélice G, que jala a la hélice F lejos del hemo (ausente en la CCP). El desplazamiento de la hélice F incrementa la longitud del enlace Fe-N^ε y la deficiencia electrónica del hemo y por lo tanto, contribuye a la desestabilización de los estados oxidados del hierro (Piontek *et al.* 1993).

El potencial de reducción de las peroxidasas también depende del pH. La dependencia se debe a un incremento en los potenciales redox de los compuestos I y II a medida que el pH decrece, y no a una característica relacionada a residuos específicos de la cavidad del hemo (Poulos *et al.* 1993). El pH óptimo de la LiP, MnP y VP es de 3 (Tien y Kirk, 1988), 4.7 (Glenn *et al.* 1983) y 3/4.5 (Heinfling *et al.* 1998a; Mester y Field, 1998), respectivamente. Considerando sus pH óptimos, la LiP y la MnP tienen potenciales redox más altos que otras peroxidasas (Hammel *et al.* 1986; Millis *et al.* 1989; Kersten *et al.* 1990). En ambos casos, la velocidad de formación del compuesto I es relativamente insensible al pH en un rango amplio, pero la reducción del compuesto I si depende del pH, con un incremento en el potencial a medida que el pH decrece (Wariishi *et al.* 1991).

El potencial de reducción de las hemoproteínas está relacionado directamente con la densidad electrónica del hemo, que a su vez, está modulada por la unión de ligandos endógenos al hierro y la naturaleza donante u aceptora de electrones de los grupos periféricos del hemo y sus interacciones con los alrededores (Singh *et al.* 1998). Generalmente, a mayor poder de atracción de electrones de los grupos laterales, menor es la densidad electrónica del hemo y el potencial de reducción del par Fe³⁺/Fe²⁺ en la peroxidasa se desplaza en una dirección positiva (Torres *et al.* 2002). Estos principios proporcionan la oportunidad de modular la actividad catalítica de las peroxidasas a través de la modificación de las cadenas laterales de su grupo prostético.

1.5 El sistema ligninolítico de los hongos de la “podredumbre blanca”

La lignina es un polímero de la madera que provee a las plantas de rigidez e impermeabilidad al agua, además de proteger a la celulosa y a la hemicelulosa del ataque microbiano. Los precursores de la lignina son los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico, su condensación produce un polímero fenólico, heterogéneo, ramificado, de alto peso molecular y recalcitrante al ataque bacteriano (Shoemaker y Leisola, 1990).

Los hongos de la “podredumbre blanca” comprenden los hongos capaces de mineralizar la lignina, la mayoría perteneciente a la clase Basidiomycetes. El nombre de podredumbre blanca se debe al aspecto blanquecino que adquiere la madera después de que los hongos han degradado la lignina. Muchas cepas de los géneros *Pleurotus*, *Bjerkandera*, *Phanerochaete* y *Trametes* producen enzimas extracelulares con actividad ligninolítica. Estas enzimas incluyen a la lignino peroxidasa (LiP), la manganeso peroxidasa (MnP) y la lacasa (Pointing, 2001). Los hongos ligninolíticos producen diferentes combinaciones de estas enzimas, sin embargo, no todas son necesarias para degradar la lignina. Cada una de ellas puede actuar por separado o en conjunto con otras enzimas, mediadores y radicales.

La naturaleza de la estructura de la lignina requiere que la degradación funcione inespecíficamente. Las enzimas ligninolíticas extraen un electrón del componente no fenólico de la lignina, produciendo un radical catiónico altamente inestable que inicia una reacción oxidativa que produce el rompimiento de los enlaces C-C y C-O-C de las cadenas laterales o los anillos aromáticos de las subunidades fenilpropano (Shoemaker y Leisola, 1990). La oxidación de la lignina también implica la participación de mediadores redox que después de ser activados por el sistema enzimático, difunden hacia dentro del microambiente de la madera para oxidar el polímero. El papel de la MnP en la despolimerización de la lignina es oxidar estructuras aromáticas a través de complejos de Mn^{3+} (Glenn *et al.* 1987). La LiP oxida directamente moléculas aromáticas (Kersten *et al.* 1985). La lacasa ataca estructuras fenólicas preferentemente, pero también puede oxidar porciones no fenólicas de la lignina en presencia de mediadores redox apropiados (Bourbonnais y Paice, 1990).

1.5.1 La lignino peroxidasa y la manganeso peroxidasa

La ligninasa o LiP y la MnP se identificaron por primera vez en *Phanerochaete chrysosporium* (Gold *et al.*, 1983; Kuwahara *et al.* 1984). Ambas peroxidases se encuentran como una serie de isoenzimas en la mayoría de los hongos ligninolíticos. Se han purificado diez peroxidases de cultivos de *P. chrysosporium* (ATCC 24725), designadas de H1 hasta H10 según el orden de elusión de una columna de intercambio iónico. Seis de estas isoenzimas (H1, H2, H6, H7, H8 y H10) exhiben una gran habilidad para oxidar alcohol veratrílico (Farrel *et al.* 1989) y se clasificaron como LiP. Las cuatro restantes (H3, H4, H5 y H9) se catalogaron como MnP debido a que su actividad depende de iones Mn^{+2} (Pease y Tien, 1992). Ambas son monoméricas, están glicosiladas, tienen puntos isoeléctricos ácidos y un hemo *b* como grupo prostético. El peso molecular de estas enzimas oscila entre 40 y 45 kDa (Kuwahara *et al.* 1984; Pease y Tien, 1992).

La LiP se caracteriza por su poca especificidad hacia los sustratos, la habilidad para oxidar sustratos de alto potencial de reducción y presentar un pH óptimo de actividad bajo (Hammel *et al.* 1986). La LiP puede degradar una amplia variedad de compuestos fenólicos, aunque sus sustratos preferidos son compuestos aromáticos no fenólicos que al ser oxidados forman radicales π -catiónicos. El sustrato modelo para la LiP es el alcohol veratrílico (AV), que también es secretado por el hongo. El papel principal del AV en el mecanismo catalítico de la LiP es el de actuar como mediador en las reacciones de transferencia de electrones. El AV es esencial para completar el ciclo catalítico de la LiP, debido a que es un excelente sustrato para el compuesto II. Además, el AV previene la desactivación por peróxido de hidrógeno, reduciendo el compuesto II de vuelta al estado basal (ten Have y Teunissen, 2001).

A diferencia de la LiP, la MnP es muy específica y sólo el ión Mn^{2+} puede completar efectivamente su ciclo catalítico. En el ciclo de la MnP, dos iones Mn^{2+} son oxidados en un electrón por los compuestos I y II, generando dos iones Mn^{3+} . Estudios cinéticos han demostrado que el compuesto I puede ser reducido por la lignina y fenoles, además del Mn^{2+} , pero el compuesto II solamente puede ser reducido por Mn^{2+} (Wariishi *et al.* 1988). A pesar de ser altamente reactivo, el ión Mn^{3+} generado por la MnP es poco estable en medio acuoso. Sin embargo, el ión puede formar un complejo con algunos ácidos orgánicos producidos por el

hongo, como el oxalato y el malonato. Los complejos estabilizan el producto y promueven su liberación de la enzima. Los iones Mn^{3+} pueden oxidar sustratos fenólicos con la ayuda de estos agentes (Glenn *et al.* 1987).

Las peroxidasas fúngicas presentan dos dominios estructurales que delimitan la cavidad central que alberga a la ferriprotoporfirina IX (Conesa *et al.* 2002). La estructura está constituida de 11 a 12 α -hélices que ocupan posiciones topológicamente similares en casi todos los miembros de las peroxidasas de la superfamilia de plantas. Las estructuras tipo β están ausentes o son un componente minoritario. Estas enzimas están glicosiladas, aunque el grado de glicosilación varía para cada peroxidasa. Los glicanos aparentemente no tienen un papel esencial en la actividad, sin embargo, mejoran la estabilidad y la solubilidad. También, presentan cuatro puentes disulfuro (con excepción de la MnP que tiene un quinto puente disulfuro en el carboxilo terminal) y un sitio de unión a calcio altamente conservado en cada dominio. El Ca^{2+} desempeña un papel relevante en el mantenimiento de la estructura y función del sitio activo. Ambos sitios de unión están formados por átomos de oxígeno de varios aminoácidos y moléculas de agua. Uno de los ligandos en cada sitio de unión a Ca^{2+} , es un residuo adyacente a las histidinas proximal y distal (Banci, 1997).

1.5.2 La peroxidasa versátil

Recientemente, se describió una nueva familia de peroxidasas ligninolíticas, designada como peroxidasa versátil (VP). La VP es producida por hongos del género *Pleurotus* (Martínez *et al.* 1996; Ruiz-Dueñas *et al.* 1999; Giardina *et al.* 2000), *Bjerkandera* (Heinfling *et al.* 1998a; Mester y Field, 1998; Palma *et al.* 2000; Wang *et al.* 2002; Moreira *et al.* 2005), entre otros.

El aspecto más relevante de la VP es que combina las características de especificidad de sustrato de las peroxidasas de la clase II. Esta enzima es capaz de oxidar una variedad de sustratos (de alto potencial redox) incluyendo Mn^{2+} , dímeros de lignina fenólicos y no fenólicos, KBTA, AV, dimetoxibencenos, diferentes tipos de colorantes, fenoles sustituidos e hidroquinonas (Caramelo *et al.* 1999; Heinfling *et al.* 1998b). Las propiedades catalíticas de la VP se deben a una arquitectura molecular híbrida que combina diferentes sitios de unión y oxidación del sustrato (Figura 4). Las diferencias en los parámetros catalíticos y en las características estructurales, justifican la descripción de la VP como una nueva familia de peroxidasas fúngicas, junto con las familias de la LiP, MnP y CIP.

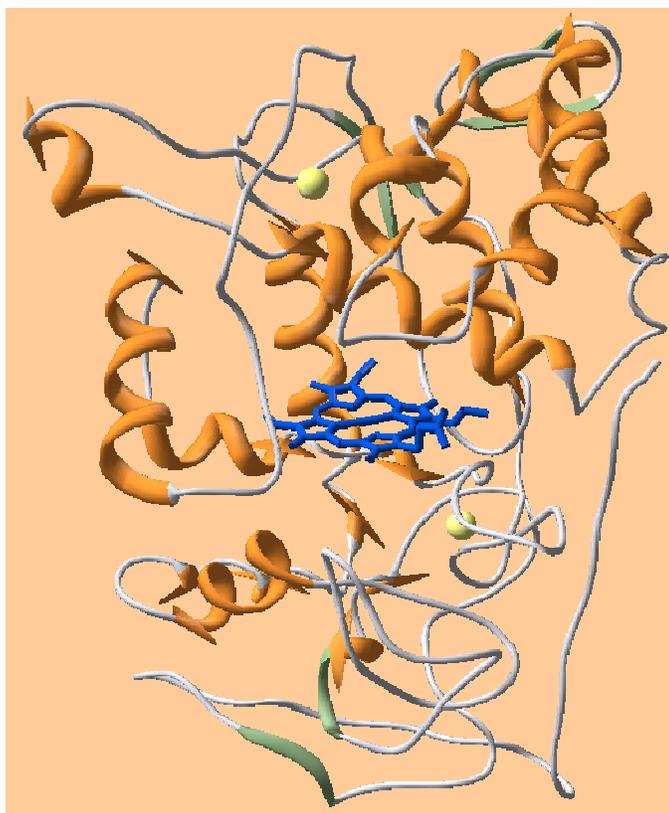


Figura 4. Representación molecular de la VP de *Bjerkandera adusta*. Se muestra el grupo hemo en azul y los calcio estructurales en amarillo.

1.5.3 Ciclo catalítico de la peroxidasa versátil

El ciclo catalítico de la VP combina los ciclos de la LiP y la MnP (Figura 5). Sus características básicas son comunes a la mayoría de la peroxidasas. Sin embargo, la VP es única ya que es capaz de oxidar sustratos aromáticos como el AV a su correspondiente radical AV^{\bullet} , el Mn^{2+} a Mn^{3+} y sustratos que la LiP sólo oxida en presencia de AV. El ciclo de la VP incluye la sustracción de dos electrones de la enzima en estado basal por el peróxido de hidrógeno para producir el compuesto I_A (C- I_A), que contiene un oxo- $Fe^{IV}=O$ y un radical catiónico en la porfirina. La reducción en dos reacciones de un electrón produce el compuesto II_A (C- II_A), que contiene un oxo- $Fe^{IV}=O$. Y después, la forma basal de la enzima (Pérez-Boada *et al.* 2005). El ciclo también incluye el compuesto I_B (C- I_B), que contiene un oxo- $Fe^{IV}=O$ y un radical triptófano (Trp^{\bullet}) y el II_B (C- II_B), que contiene un Fe^{III} y un Trp^{\bullet} involucrado en la oxidación de AV y otros compuestos aromáticos de alto potencial redox (C- I_B y C- II_B están en equilibrio con C- I_A y C- II_A , respectivamente). El porcentaje de las formas A y B en las dos reacciones puede ser variable y su participación en la catálisis dependerá de los sustratos disponibles. En otras palabras, los compuestos I_A y II_A predominarán durante la oxidación de Mn^{2+} , mientras que un porcentaje del Trp^{\bullet} será necesario durante la oxidación de AV. El triptófano activo en C- I_B y C- II_B es el W164 en la VPL de *P. eryngii* (Pérez-Boada *et al.* 2005).

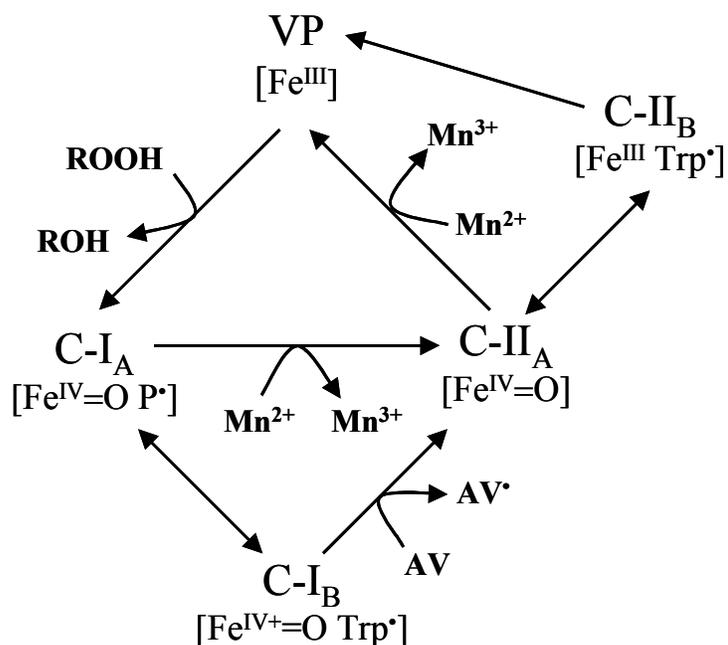


Figura 5. Esquema del mecanismo catalítico de la peroxidasa versátil.

1.6 Sitios de unión al sustrato en las peroxidasas fúngicas

La identidad del sustrato que reduce el compuesto I en las peroxidasas varía enormemente. Por ejemplo, el sustrato puede ser un ión metálico (Mn^{+2} en la MnP), un haluro (Cl⁻ en la cloroperoxidasa), un sustrato orgánico (L-ascorbato en la ascorbato peroxidasa), fenólico (ácido ferrúlico en la peroxidasa de rábano blanco) o una proteína (el citocromo *c* en la citocromo *c* peroxidasa). En las peroxidasas fúngicas, la cavidad interna del hemo está conectada a la superficie de la enzima por dos pequeños canales de acceso (Banci, 1997). El peróxido de hidrógeno alcanza el sitio distal del hemo a través de uno de los canales. El otro canal se extiende directamente a los propionatos del hemo, que están expuestos a la superficie de la enzima (Smith y Veitch, 1998).

1.6.1 Sitio de oxidación del manganeso

En la MnP, el sitio donde se oxida el Mn^{2+} a Mn^{3+} se ubicó cerca del borde γ -meso del hemo (Sundaramoorthy *et al.* 1994). El papel funcional de los residuos involucrados en la unión de Mn^{2+} (E35, E39 y D179) ha sido confirmado por medio de mutagénesis sitio-dirigida (Kuster-van Someren *et al.* 1995; Whitwam *et al.* 1997). La habilidad de la peroxidasa versátil de *P. eryngii* para oxidar Mn^{2+} se ha explicado mediante la postulación de un sitio de unión a Mn^{2+} en sus modelos moleculares (Camarero *et al.* 1999; Ruiz-Dueñas *et al.* 1999). Recientemente, se secuenció el gen de la VP de *Bjerkandera sp.* B33/3 y se construyó un modelo molecular que exhibe un sitio putativo de interacción a Mn^{2+} (Moreira *et al.* 2005). La secuencia de la VP de *B. adusta* UAMH 8258 (GenBank DQ060037) sólo difiere en cuatro residuos de la de *Bjerkandera sp.* B33/3 (I57, S93, T167 y T323) y todos se encuentran alejados del sitio activo de la enzima.

La función de los tres residuos ácidos que forman el sitio de unión a Mn^{2+} es delimitar un pequeño canal de acceso enfrente de los propionatos del hemo, en donde los ácidos glutámicos actúan como una puerta. El Mn^{2+} entra a través de este canal, siendo coordinado por el grupo carboxilo del propionato de la cadena 6 del hemo. El poliedro de hexacoordinación del Mn^{2+} lo completan tres oxígenos de los grupos carboxilo de las cadenas laterales de los residuos ácidos y dos moléculas de agua estructurales. La ubicación del sitio de

unión a Mn^{2+} sugiere que la transferencia de electrones del Mn^{2+} al hemo pasa a través de los enlaces σ del propionato (Poulos *et al.* 1995).

1.6.2 Sitios de oxidación de sustratos aromáticos

En la primera isoenzima de la LiP cristalizada, la molécula de alcohol veratrílico (AV) se modeló en el canal de acceso al hemo, unida a los residuos H82 y Q222 (Poulos *et al.* 1993) debido a que era generalmente aceptado que el sitio de oxidación de los sustratos en las peroxidasas ocurría en las inmediaciones del hemo. Sin embargo, el alto peso molecular de algunos sustratos, así como el reducido tamaño de los canales de acceso al hemo impiden el contacto directo entre los sustratos y el hemo en la LiP. Aún compuestos como el AV parecen demasiado grandes para acercarse al hemo a través de los canales de acceso. Recientemente, la construcción de varias mutantes de la LiP (H82A y Q222A), ha demostrado que estos residuos no participan en la oxidación del AV y que el canal de acceso al hemo no es un sitio probable para su oxidación (Gelpke *et al.* 2002).

Una alternativa razonable que explica la oxidación de los sustratos en la LiP es que la transferencia de electrones se produce desde las inmediaciones de la superficie de la enzima hasta el hemo, pasando a través de varios residuos, esto se conoce como ruta de transferencia de electrones a larga distancia (RTEL). Blodig *et al.* (1998) propusieron que la aparición de la forma hidroxilada del carbono β (C_β) del W171 de la LiP en presencia de tres equivalentes de H_2O_2 , estaba originada por una oxidación autocatalítica. Además, la modificación de este residuo con N-bromosuccinimida redujo drásticamente la oxidación de AV. Con base en esto, los autores propusieron que el W171 forma parte de una RTEL. Este residuo se encuentra en la superficie de la proteína, a ~ 11 Å del hemo, alrededor de 6 Å por arriba del plano del hemo y opuesto al canal que da acceso al carbono δ -meso del hemo (Piontek *et al.* 1993; Poulos *et al.* 1993). En la LiPH2, el C_β del residuo L172 está en contacto con el metilo tres del hemo a través de fuerzas de van der Waals y completa la vía. Se ha propuesto que el residuo W171 funciona como un donador de electrones endógeno de la LiP, lo que implica la formación del radical triptófano catiónico y su participación como mediador en la oxidación de otros compuestos (Doyle *et al.* 1998). La VP tiene una ruta de transferencia electrónica similar a la LiP (Figura 6) (Pérez-Boada *et al.* 2005).

El papel del W171 en la oxidación del AV ha sido confirmado mediante mutagénesis sitio-dirigida. Doyle *et al.* (1998) construyeron dos mutantes de la LiP, W171S y W171F, sin actividad contra AV. Sin embargo, las mutantes mantuvieron intacta su actividad contra el 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico y la sal de sodio del 4-[(3,5-difluoro-4-hidroxifenil)azo] ácido bencenosulfónico (ABTS y DFAD, respectivamente). Además de remarcar la importancia del residuo W171 en el mecanismo catalítico, estos resultados también demostraron que hay más de un sitio de interacción con el sustrato en la LiP.

Recientemente, Pérez-Boada *et al.* (2005) demostraron el papel del radical del residuo W164 d en el decaimiento espontáneo de la VP oxidada a su estado basal y en la oxidación del AV y un colorante. En su ambiente local, el triptófano se encuentra rodeado por varios residuos ácidos que estabilizan el radical catiónico del AV que se forma después de la transferencia de un electrón. Aparentemente, la estabilización del radical favorece su función como mediador de la enzima en la oxidación de los sustratos.

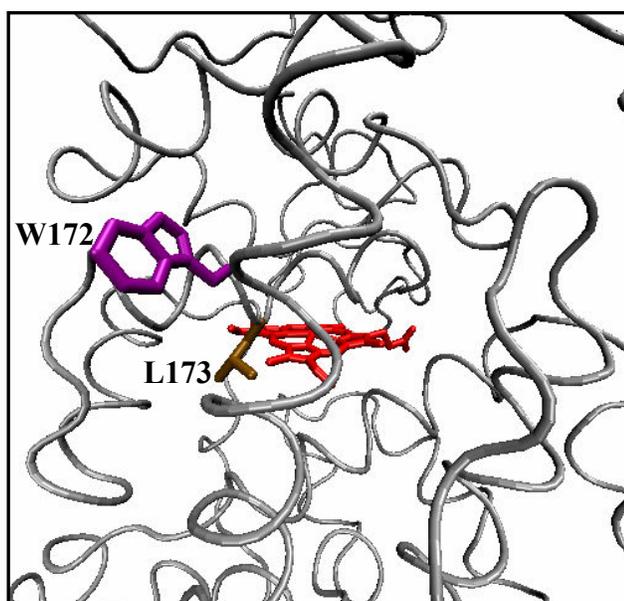


Figura 6. Aminoácidos que conforman la RTEL de la VP de *Bjerkandera adusta*.

1.7 Aplicaciones ambientales de las peroxidasas

La utilización de enzimas en procesos industriales para la obtención de una amplia variedad de productos se ha incrementado en los últimos años. Esto obedece a un intento de crear tecnologías más limpias y redituables por medio de la disminución del uso y generación de sustancias que no sean compatibles con el ambiente y el reemplazo de procesos que utilicen condiciones extremas. En este sentido, la reducción de peróxidos a expensas de un sustrato donador de electrones, hace a las peroxidasas potencialmente útiles en varias aplicaciones biotecnológicas (Regalado *et al.* 2004). Debido a la naturaleza oxidativa de las peroxidasas, hay varias áreas en donde podrían reemplazar rápidamente las técnicas oxidativas químicas actuales. Varias clases de peroxidasas están siendo extensivamente estudiadas por su potencial aplicación en procesos industriales como el blanqueo del papel en el proceso de Kraft, en donde estas enzimas podrían sustituir las grandes cantidades de cloro que se usan actualmente y prevenir la formación de compuestos tóxicos halogenados durante el proceso (Ferrer *et al.* 1991).

Por otra parte, la implementación de regulaciones ambientales cada vez más estrictas para el desecho de residuos peligrosos, ha creado la necesidad de buscar nuevas tecnologías de tratamiento, compatibles con el ambiente, para complementar o sustituir a las convencionales. En las dos últimas décadas, la biorremediación ha explorado el uso de la batería catalítica de los hongos de la podredumbre blanca en la remoción de contaminantes tóxicos (García-Arellano *et al.* 2004). Se ha demostrado la participación directa de las peroxidasas ligninolíticas en la oxidación de un amplio rango de contaminantes ambientales como los hidrocarburos policíclicos aromáticos, dioxinas, así como de otros compuestos xenobióticos que incluyen colorantes azo, pesticidas, fenoles y bifenilos policlorados (Field *et al.* 1993). Las peroxidasas podrían ser usadas para la remoción de estos compuestos del ambiente debido a su amplio rango de sustratos y sus bajos requerimientos energéticos (Vazquez-Duhalt, 1998; Torres *et al.* 2003).

1.7.1 Oxidación biocatalítica de hidrocarburos poliaromáticos

Los hidrocarburos poliaromáticos (HPAs) son componentes del petróleo crudo, la creosota y el carbón. Este tipo de compuestos está ampliamente distribuido en el ambiente. La

mayoría de la contaminación por HPAs está originada por el uso extensivo de combustibles fósiles como fuente de energía. Su alta persistencia en el ambiente se debe a su alta hidrofobicidad y baja solubilidad acuosa, lo que hace muy lenta su biodegradación microbiana. Su remoción del ambiente es prioritaria debido a que muchos de los HPAs tienen propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas (Mastrangelo *et al.* 1996).

Compuestos como el pireno, benzo(a)pireno, acenafteno, fenantreno, antraceno y fluorantreno pueden ser oxidados en presencia de solventes orgánico por enzimas como la LiP (Hammel *et al.* 1986), la lacasa (Majcherczyk *et al.* 1998) y algunas hemoproteínas como la hemoglobina (Torres y Vázquez-Duhalt, 2000). La habilidad de estas enzimas para oxidar los HPAs depende del potencial de ionización (IP) de cada compuesto.

El PI es una medida (electrón-Volts) de la energía requerida para sustraer un electrón del orbital molecular más alto de un compuesto. La extracción de un electrón del sistema π de los compuestos aromáticos genera un radical catiónico. La capacidad de los HPAs para formar radicales catiónicos se relaciona con su PI, que a su vez, depende de la distribución de carga de los electrones π del compuesto. Las posiciones con la densidad de carga más alta, son las más susceptibles de sustitución nucleofílica. Se ha reportado una correlación entre el IP de los HPAs y la actividad específica de hemoproteínas como la LiP (Vazquez-Duhalt *et al.* 1994), la MnP (Bogan *et al.* 1996), la Hb y la VP (Wang *et al.* 2003). En esos trabajos se ha reportado un valor de IP umbral (en electrón-Volts) para cada proteína: LiP ≤ 7.55 , MnP ≤ 8.2 , Hb ≤ 8.0 y VP (VP) ≤ 7.42 .

Los productos de reacción de la oxidación de HPAs con peroxidasas son esencialmente quinonas (Figura 7). El hecho de que se obtengan los mismos productos de oxidación sugiere que las enzimas tienen el mismo mecanismo de oxidación (Vazquez-Duhalt, 1998). La oxidación enzimática, seguida de la adición de microorganismos endógenos puede ser una estrategia de remediación efectiva debido a que la biodegradación de los HPAs y sus metabolitos incrementa con su estado de oxidación. Adicionalmente, las quinonas son significativamente menos mutagénicas que sus correspondientes HPAs (Durant *et al.* 1996).

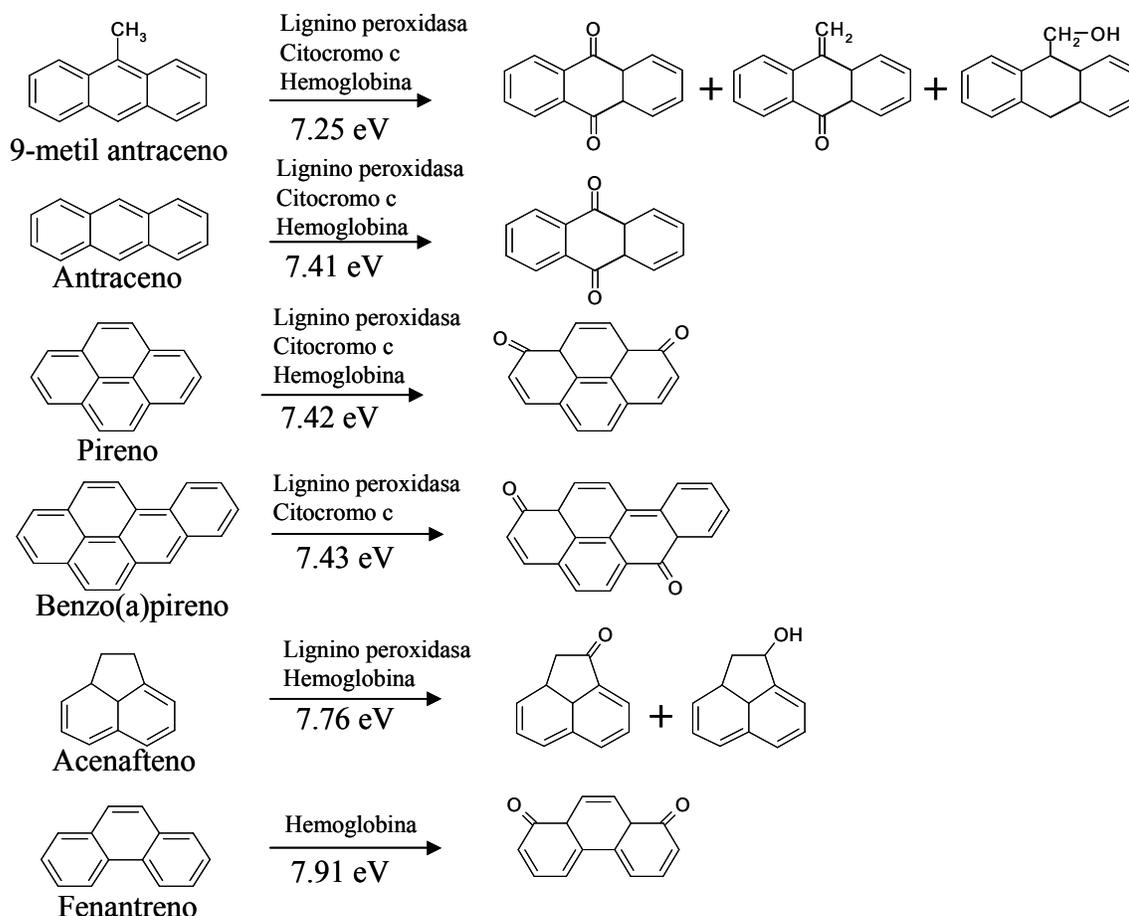


Figura 7. Oxidación de hidrocarburos poliaromáticos con diferentes hemoproteínas. Se indica el potencial de ionización (eV) de cada compuesto.

1.8 Modificación de proteínas

A pesar de su potencial aplicación en la bioremediación y en el desarrollo de procesos limpios, la actividad de las enzimas oxidativas está limitada por la baja biodisponibilidad de los contaminantes y por otro lado, por la baja estabilidad operacional de las enzimas. Lo anterior ha impulsado la búsqueda de métodos que mejoren el desempeño catalítico de las peroxidasa. Se han probado varias herramientas para mejorar el desempeño de las enzimas por medio de la introducción de nuevas características, a través de la manipulación de su estructura enzimática. Entre las principales estrategias se encuentran la modificación química de la enzima y la ingeniería de proteínas. Sin embargo, conseguir la alteración de una sola de las múltiples variables que afectan la catálisis de las peroxidasa, mientras las otras se mantienen constantes, no ha sido un ejercicio trivial.

1.8.1 Ingeniería de proteínas

La ingeniería de proteínas implica el uso de mutagénesis sitio-dirigida o mutagénesis al azar para introducir alteraciones en una proteína. La elección racional del residuo que se altera en la mutación sitio-dirigida se basa en el conocimiento detallado que se deriva de una estructura cristalográfica, la similitud de secuencias o el diseño de la proteína en cuestión. En la evolución dirigida, la selección del residuo se determina a través de monitoreo, un enfoque basado en evolución forzada (al azar) o una combinación de ambas técnicas. El diseño racional de hemoproteínas se ha enfocado en la exploración de la relación estructura-función (Smith y Veitch, 1998), aunque también ha servido para diseñar enzimas con mejores propiedades catalíticas. Por otra parte, los estudios de evolución dirigida se han usado para producir sistemas enzimáticos redox con mejores actividades y sobre todo, mayores estabilidades contra temperatura y solventes orgánicos.

Por ejemplo, Cherry *et al* (1999) reportaron una combinación de mutagénesis sitio-dirigida y al azar en la peroxidasa de *Coprinus cinereus* (CIP). La enzima debe ser estable a pH alcalino, 50°C y 10 mM de peróxido con el fin de usarla como inhibidor de la pérdida de color ocasionada por el detergente de lavandería. Los autores identificaron tres aminoácidos oxidables alrededor del sitio activo de la enzima (M166F, M242I y Y272F) que fueron removidos a través de mutagénesis sitio-dirigida. Las mutantes mostraron una mayor estabilidad al peróxido con relación a la enzima nativa, sin que se viera afectada su estabilidad térmica o su actividad a pH 7. La construcción de la mutante E239K removió la interacción desestabilizante entre las cadenas laterales de los residuos E239 y E214 y mejoró la estabilidad térmica y oxidativa de la CIP 134 y 1.2 veces, respectivamente. Dos rondas de mutagénesis al azar y el barajeo *in vivo* de estas clonas produjo una mutante con una mejora en la estabilidad térmica y oxidativa con respecto a la enzima nativa, de 174 y 100 veces, respectivamente.

Un requisito previo para la aplicación de estas metodologías es la disponibilidad de un sistema de expresión heterólogo eficiente para producir la proteína de interés. Pocas peroxidases han podido expresarse eficientemente debido a que sufren de múltiples modificaciones post-traduccionales. Las modificaciones son huésped-específicas y pueden estar relacionadas a la condición metabólica del organismo productor. La serie de enzimas que

participan en las modificaciones post-traduccionales puede ser muy diferente de un sistema de expresión homólogo a un sistema heterólogo. Además de las modificaciones post-traduccionales, el plegamiento de una enzima no solo depende de su estructura primaria. La presencia de chaperonas y foldasas también son críticas para el correcto plegamiento y maduración de los péptidos a proteínas funcionales (Conesa *et al.* 2002). Es razonable que la dificultad para expresar las peroxidasas en un sistema heterólogo se deba a sus complejos requerimientos post-traduccionales. En los casos en donde no se puede hacer uso de estas herramientas, la enzima aún puede ser modificada por técnicas químicas.

1.8.2 Modificación química de proteínas

A medida que la aplicación potencial de biocatalizadores se ha incrementado, también lo ha hecho la búsqueda de técnicas que mejoren su especificidad y actividad naturales. Antes del descubrimiento de la mutagénesis sitio-dirigida, los primeros métodos disponibles para alterar las propiedades de una enzima fueron de hecho, químicos (DeSantis y Jones, 1999). Los métodos químicos se utilizaron inicialmente para estudiar los complejos mecanismos de las reacciones enzimáticas y han tenido un resurgimiento como un enfoque complementario y poderoso a la mutagénesis sitio-dirigida y la evolución dirigida. La modificación química covalente es una herramienta valiosa para alterar las propiedades catalíticas de las enzimas o proporcionar nuevas actividades catalíticas a proteínas que naturalmente no desarrollan una función enzimática (Hamachi y Shinkai, 1999; Watanabe, 2002).

Sin embargo, la modificación química de enzimas puede complicarse debido a la naturaleza polifuncional de las proteínas. La modificación de las cadenas laterales de los aminoácidos permite que una gran variedad de grupos pueda acoplarse a los residuos, sin embargo, las reacciones que se utilizan típicamente no son específicas. Por lo que la principal desventaja de los métodos clásicos utilizados para la modificación química de proteínas es la falta de control con respecto al grado y regioespecificidad de la reacción, lo que crea una mezcla de proteínas modificadas al azar. La limitada variedad y numerosa repetición de los grupos funcionales químicos en las proteínas complica este problema (Davis, 2003). En general, la funcionalización selectiva de un solo tipo de residuo en una proteína no es una tarea trivial (DeSantis y Jones, 1999).

1.8.3 Modificación química *ex-situ* del grupo hemo

Las propiedades catalíticas de las hemoproteínas pueden ser controladas por medio de cambios asociados a su grupo prostético. La modificación química *ex-situ* del grupo hemo implica que el grupo prostético sea reemplazado con un derivado de la hemina. El primer paso consiste en la extracción del grupo hemo de la proteína. En ciertas condiciones, los cofactores de un gran número de hemoproteínas pueden ser extraídos de su sitio activo (Ascoli *et al.* 1981). La apoproteína resultante puede combinarse con un hemo modificado (Figura 8). El proceso de reconstitución permite la incorporación de grupos específicos con diferentes características químicas, electroquímicas o estéricas en la proximidad del sitio activo de las enzimas. Una variación de esta metodología implica la expresión heteróloga de la apoproteína en un organismo recombinante, su purificación y la reconstitución de la apoproteína con la metaloporfirina (Reading y Aust, 1998).

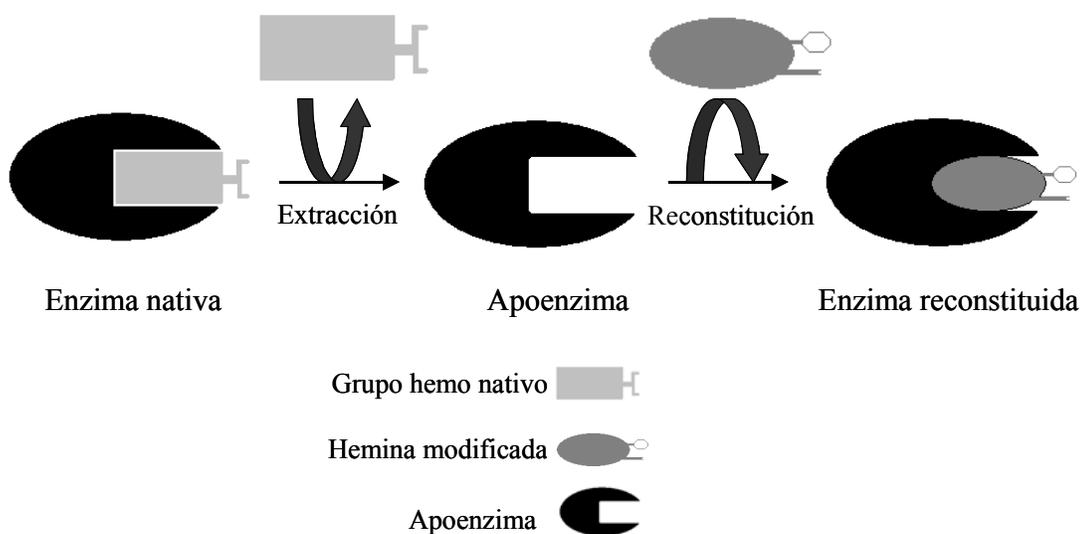


Figura 8. Modificación química *ex-situ* del grupo hemo y reconstitución de la apoenzima.

El grupo hemo del citocromo P450 de *Bacillus megaterium* fue modificado mediante la estrategia *ex-situ* (Modi *et al.* 1995). El reemplazo del grupo hemo de la enzima con la ferriprotoporfirina IX dimetiléster incrementó la afinidad de la enzima por el ácido dodecanoico y triplicó la eficiencia catalítica de la enzima. La remoción de las cargas negativas de los propionatos tuvo un efecto concomitante en el incremento de la naturaleza no polar del sitio de interacción al sustrato y en el aumento en la afinidad por el mismo.

La derivatización de los propionatos del grupo hemo de las peroxidasas puede modificar sensiblemente su actividad catalítica (Yonetani y Asakura, 1969; Adak, y Banerjee, 1998), mientras que los grupos vinilo y metilo desempeñan un papel secundario en la actividad (Yonetani y Asakura, 1968; Dinello y Dolphin, 1981).

La reacción de esterificación es un procedimiento utilizado para derivatizar grupos carboxilo. La esterificación involucra la condensación del grupo carboxilo de un ácido y el grupo hidroxilo de un alcohol, además de la eliminación de agua. Un catalizador comúnmente usado para producir metil ésteres es el trifluoruro de boro (BF₃). Buldain *et al.* (1986), reportaron la producción de dimetil ésteres de la hematoxilina, un producto de la degradación de la hemina, con BF₃/metanol.

Los grupos carboxilo también pueden ser esterificados con carbodiimida (Mathews y Brittain, 1986). En presencia del nucleófilo adecuado, la carbodiimida promueve la formación del enlace en dos pasos. Inicialmente, la carbodiimida es protonada, y el catión es atacado por el ácido carboxílico para formar un intermediario inestable *O*-acil-urea. Posteriormente, el ataque intramolecular del nucleófilo da lugar a un entrecruzamiento interno y al desplazamiento de la urea inerte (Figura 9). Por ejemplo, los grupos carboxilos de la LiP de *P. chrysosporium* fueron derivatización con 1-etil-3-[3-(dimetilaminopropil)] carbodiimida, en presencia y ausencia de ácido 2-aminoetanosulfónico (Johjima *et al.* 2002).

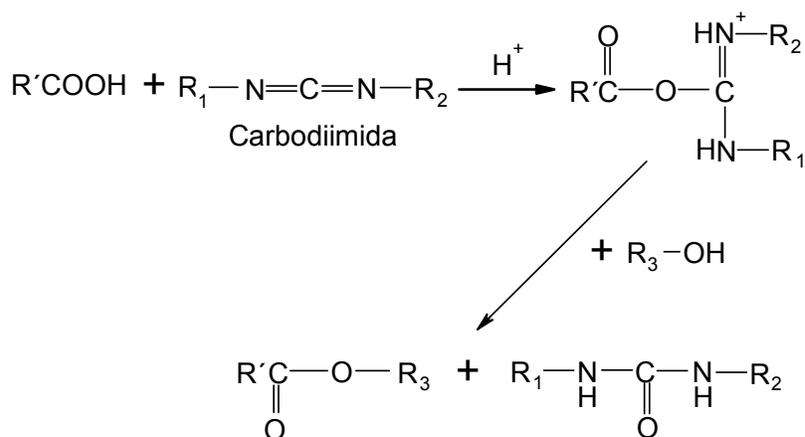


Figura 9. Mecanismo de la esterificación del grupo carboxilo con carbodiimida.

Debido a la gran hidrofobicidad de algunos sustratos, es necesaria la presencia de solventes orgánicos en el medio de reacción con el fin de incrementar su solubilidad. Sin embargo, la partición del sustrato entre el sitio activo de la enzima y el solvente reduce la actividad catalítica de la enzima. La modificación con polietilenglicol ha sido empleada para solubilizar proteínas en solventes orgánicos. Por ejemplo, la pegilación de los aminos libres y la subsecuente esterificación de los propionatos del grupo hemo del citocromo *c* y de la hemoglobina mejoraron sus propiedades como biocatalizadores (Tinoco y Vázquez-Duhalt, 1998; Torres y Vázquez-Duhalt, 2000). Aunque las proteínas nativas oxidaron algunos HPAs en presencia de peróxido de hidrógeno, bajo las mismas condiciones, las modificaciones incrementaron el rango de oxidación de los HPAs por las proteínas.

Torres *et al.* (2002) observaron un cambio en la actividad específica contra triantreno después de modificar los propionatos del hemo de la hemoglobina con grupos con diferentes propiedades en su carácter electrón atrayente. Los autores concluyeron que la densidad electrónica del grupo hemo de la hemoglobina fue modulada a través de la modificación de los grupos laterales del hemo con alcohol *p*-nitrofenol y alcohol *p*-aminofenol.

Con base en estos antecedentes y debido al interés de desarrollar un catalizador con fines ambientales, se planteó la posibilidad de incrementar las propiedades catalíticas de la peroxidasa versátil a través de la sustitución de su grupo hemo con una hemina modificada. La incorporación de un grupo donador o atractor de electrones en los propionatos de la hemina tuvo la intención de alterar el potencial redox de la enzima. Por otra parte, la esterificación de la hemina con grupos metilo o polietilenglicol fue para incrementar la hidrofobicidad del sitio activo y facilitar la oxidación de sustratos hidrofóbicos, en presencia de solventes orgánicos.

2. HIPÓTESIS

La sustitución del grupo hemo del sitio activo de la peroxidasa versátil con una hemina modificada covalentemente en sus propionatos puede incrementar la actividad catalítica de la enzima contra sustratos hidrofóbicos y de alto potencial de reducción.

3. OBJETIVOS

GENERAL

- Estudiar el efecto de la modificación química *ex-situ* del grupo hemo de la peroxidasa versátil sobre su actividad enzimática.

ESPECÍFICOS

- Optimizar el protocolo de extracción del grupo hemo de la peroxidasa versátil.
- Modificar químicamente la hemina en los grupos carboxilos de sus propionatos con grupos metilo, polietilenglicol, alcohol *p*-nitro-bencílico y alcohol *p*-amino-bencílico.
- Reconstituir la peroxidasa versátil con cada una de las heminas modificadas.
- Caracterizar cinéticamente la enzima reconstituida con la hemina modificada.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Enzima

La peroxidasa versátil de *Bjerkandera adusta* UAMH8258, fue donada por el Dr. Michael A. Pickard de la Universidad de Alberta, Canadá. La enzima se purificó hasta un valor de coeficiente Reinheitszahl (Rz) de 2.7. El Rz se usa como un criterio de pureza en las hemoproteínas y es la relación entre la absorbancia debida al grupo hemo entre la absorbancia debida a los residuos aromáticos de la proteína ($A_{407\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$). El valor teórico para la peroxidasa versátil pura es 4.2 (Wang *et al.* 2002). La solución enzimática presentó una actividad específica de 120 U/mg proteína. La enzima se almacenó en amortiguador de fosfatos 60 mM pH 6.0, a 4°C.

4.2 Reactivos

El 9-metil antraceno, antraceno, fenantreno, pireno, peróxido de hidrógeno, guayacol, cloruro de pinacianol y alcohol veratrílico se adquirieron de Aldrich Chemical Co. El alcohol *p*-nitro-bencílico, alcohol *p*-amino-bencílico y tetracloruro de carbono se compraron a Fluka. La peroxidasa de rábano blanco, hemoglobina, ácido malónico, cloruro de hemina, Tween 80, 1-etil-3-[3-(dimetilaminopropil)] carbodiimida hidrocloreto, metoxipoli(etilenglicol) de 350 Da, trifluoruro de boro en metanol al 14% fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. Las sales para amortiguadores, bromuro de potasio, sulfato de manganeso (II), sulfato de sodio anhidro, óxido de aluminio, urea y otros compuestos grado reactivo se compraron a J.T. Baker. Los solventes orgánicos grado HPLC, metanol, 2-butanona, acetona, acetonitrilo, cloroformo, diclorometano y *N,N*-dimetilformamida se adquirieron de Fischer Scientific. El reactivo de Bradford, las resinas de intercambio iónico y permeación en gel se adquirieron de BioRad.

4.3 Equipo

Las mediciones cinéticas y los espectros de absorción electrónica en la región ultravioleta y visible (UV-vis) se realizaron en un espectrofotómetro Beckman, modelo DU-650. Los espectros de infrarrojo se registraron en dos espectrofotómetros de transformada de Fourier, uno marca Bruker y otro Perkin Elmer, modelo Spectrum 6X. El sistema de cromatografía líquida de alta presión de Perkin Elmer empleó dos columnas en fase reversa,

una columna analítica (100 x 2.1 mm) ODS Hypersil (Agilent) y una preparativa (300 x 47 mm) RP-C₁₈ (Vydac). Ambas columnas se montaron al sistema equipado con una bomba Serie 200 y un detector de UV con arreglo de diodos, modelo 235C.

4.4 Métodos

4.4.1 Caracterización enzimática

La estimación de la actividad específica de la peroxidasa de rábano blanco y de la peroxidasa versátil se realizó por espectrofotometría. Las actividades enzimáticas fueron medidas como velocidades iniciales, a diferentes concentraciones de sustrato, a temperatura ambiente y en presencia de 1 mM de H₂O₂. La actividad específica se define como la cantidad de sustrato transformado por mol de proteína por unidad de tiempo.

La actividad enzimática de la peroxidasa de rábano blanco se midió en 1 mL de solución de guayacol 16 mM en amortiguador de fosfatos 60 mM, pH 6.0. La reacción fue monitoreada siguiendo el cambio de absorbancia a 470 nm durante 1 minuto. El coeficiente de extinción molar (ϵ) del guayacol que se usó fue de 26,600 M⁻¹cm⁻¹ (Chance y Maehly, 1995).

La actividad de tipo manganeso peroxidasa se midió como la formación del complejo malonato-Mn (III) a 270 nm ($\epsilon=11,570$ M⁻¹cm⁻¹). La mezcla de reacción contenía 1 mM de MnSO₄ (II) en solución amortiguadora de malonatos 50 mM, pH 4.5 (Wariishi *et al*, 1992).

La actividad de tipo ligninasa se determinó por el método de Tien y Kirk (1988). En el ensayo se siguió la oxidación del alcohol veratrílico hasta veratril aldehído a 310 nm ($\epsilon=9,300$ M⁻¹cm⁻¹). El medio de reacción consistió de una solución de amortiguador de succinatos 40 mM, pH 3.0 y con 4 mM de alcohol veratrílico.

4.4.2 Determinación de proteína

La concentración de proteína se cuantificó con el reactivo de BioRad y con base en el método de Bradford (1976). Para este ensayo, se adicionaron 200 μ L del reactivo de BioRad a 800 μ L de una solución de proteína en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 6.0. Se agitó y

después de cinco minutos se leyó su absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro UV/vis. La comparación de la absorbancia con una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) proporcionó una medida de la concentración de proteína en la muestra.

La concentración de proteína también se estimó de la absorción a 407 nm del espectro de la VP en estado basal. Se utilizó un coeficiente de extinción molar (ϵ_{407}) de $77000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, determinado con la ley de Beer-Lambert.

$$A = \epsilon l C$$

Donde, A es el valor de la absorbancia a 407 nm de una alícuota de VP con un valor de Rz de 3.1, l es la longitud de la celda y C es la concentración de proteína de la alícuota. La concentración de proteína se calculó a partir de una curva estándar de peroxidasa de rábano blanco, con un Rz de 3.3. La concentración de la VP nativa obtenida con estos dos métodos dio aproximadamente el mismo resultado.

4.4.3 Métodos para la extracción del grupo hemo de la enzima

Método de la metil etil cetona. La solución de enzima se diluyó a una concentración de 1 mM en amortiguador de acetatos 60 mM, a 4°C. Inmediatamente después, se adicionó 2-butanona fría, en una relación 2:3 (amortiguador/butanona). La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 segundos y se dejó en reposo por unos minutos a 4°C, para permitir la separación de las fases. La fase superior (butanona) se removió y se desechó. La fase acuosa con la apoenzima, se dializó exhaustivamente contra tres cambios de amortiguador Tris-HCl 20 mM con CaCl_2 5mM, a diferentes valores de pH. La solución dializada se centrifugó para remover el material insoluble (Ascoli, *et al.* 1981). La cantidad de grupo hemo en la apoenzima se determinó por medio de su espectro de absorción electrónica y de su actividad específica.

Método de la acetona ácida. La enzima disuelta en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 6.0, se añadió gota a gota y en agitación constante a una solución de acetona ácida (2.5 mL de HCl 2M en un litro de acetona), previamente enfriada a -20°C en un baño de hielo seco y acetona. Dos minutos después de haber adicionado la gota final, la mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 10,000 g y a -10°C. El sobrenadante con el hemo disuelto se removió y

se desechó. La apoenzima formó un precipitado incoloro que se disolvió en un volumen mínimo de NaOH 0.1 M y se diluyó en agua destilada. Para remover la acetona disuelta, se dializó la solución de apoenzima contra NaHCO₃ 10 mM y después, contra tres cambios de amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.0, con CaCl₂ 5mM (Ascoli, *et al.* 1981).

4.4.4 Modificación química de la ferritoporfirina IX

Modificación con alcohol *p*-nitro-bencílico (Hemo-PAB) y alcohol *p*-amino-bencílico (Hemo-PNB). Los grupos carboxilos de los propionatos del cloruro de hemina se modificaron con la química de la carbodiimida (Ryabov *et al.* 1999). Se mezclaron 10 mg de cloruro de hemina, disuelta en dimetilformamida (DMF), con un exceso de diez veces en base molar de alcohol *p*-nitro-bencílico o alcohol *p*-amino-bencílico. En ambos casos se añadió 1-etil-3-[3-(dimetilaminopropil)] carbodiimida (exceso de diez en base molar). La mezcla se incubó a temperatura ambiente y en agitación constante. Después de 24 horas, se adicionó HCl diluido a la mezcla de reacción hasta que se formó un precipitado de color café. El precipitado se lavó varias veces con agua para neutralizar su pH, se secó y se disolvió en un volumen mínimo de diclorometano/metanol (10:1). El producto se pasó a través de una columna de óxido de aluminio (alúmina), la hemina modificada se separó de la no modificada usando una fase de diclorometano/metanol (5:1) como eluyente.

Modificación con polietilenglicol (Hemo-PEG). Se disolvieron 10 mg de cloruro de hemina en una solución acuosa a pH 9. A esta solución se le adicionó 1-etil-3-[3-(dimetilaminopropil)] carbodiimida y metoxipolietilenglicol de 350 Da; ambos a una concentración de 10 veces en exceso molar. La reacción se mantuvo durante 3 horas a temperatura ambiente y en agitación constante. La solución se lavó con 10 volúmenes de cloroformo y se filtró con Na₂SO₄ anhidro para eliminar el exceso de agua y materiales insolubles (Takahashi *et al.* 1986). Posteriormente, se evaporó el cloroformo y el material seco se disolvió en un volumen mínimo de diclorometano/metanol (10:1). Los productos obtenidos se purificaron a través de una columna con alúmina, la hemina modificada eluyó con una mezcla de diclorometano/metanol (5:1).

Esterificación de los carboxilos de la hemina (Hemo-MET). Se disolvieron 10 mg de cloruro de hemina en 3 mL de metanol/KOH 150 mM y 3 mL de BF₃/metanol al 14% durante 15 minutos a 60°C. Posteriormente, se incubó toda la noche a temperatura ambiente, en la oscuridad (Buldain *et al.* 1986). Después, se extrajo la hemina con tres lavados con cloroformo. El extracto se deshidrató con Na₂SO₄ anhidro, se evaporó el solvente y el material seco se disolvió en diclorometano. Este producto se aplicó en una columna de alúmina y la hemina esterificada se separó de la no modificada usando una fase de diclorometano/metanol (10:1) como eluyente.

4.4.5 Espectro de infrarrojo de la hemina nativa y modificada

Los espectros de infrarrojo del cloruro de hemina, el hemo-MET y el hemo-PEG se obtuvieron en la región de 4000 a 500 cm⁻¹, con los materiales dispersos en discos de bromuro de potasio. Mientras que los espectros de infrarrojo en solución del cloruro de hemina, Hemo-PAB y Hemo-PNB se realizaron en tetracloruro de carbono, en la región de 4000 a 650 cm⁻¹.

4.4.6 Reconstitución de la enzima

La reconstitución de la enzima se realizó con hemina no modificada y modificada y de acuerdo al procedimiento descrito por Torres (2000). La hemina se adicionó gota a gota y en un exceso de cinco veces en base molar a la apoenzima, disuelta en amortiguador de fosfatos 10 mM y 5% (v/v) de DMF. La mezcla se incubó por 12 horas a 4°C y en agitación constante. Después, se dializó contra amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 6.0 para eliminar la DMF. La hemina libre se separó de la enzima reconstituida por cromatografía. La mezcla se pasó a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada con una solución de amortiguador fosfatos 10 mM con NaCl 150 mM y a través de una columna de DEAE-Sepharosa, eluída con un gradiente de 100 a 300 mM de NaCl. La proteína eluída se concentró en una celda de ultracentrifugación con una membrana de 10,000 Da. Posteriormente, se dializó contra amortiguador de fosfatos 60 mM pH 6.1 a 4°C. Los ensayos de reconstitución incluyeron la incubación de la enzima en presencia de hemina a diferentes temperaturas (20-50°C), valores de pH (4-9), concentraciones de urea (1-4 M) y con 0.01% de Tween 80.

4.4.7 Determinación de los parámetros cinéticos

Las constantes cinéticas de cada una de las preparaciones enzimáticas fueron calculadas a partir de las velocidades de reacción estimadas bajo condiciones de saturación de uno de los sustratos (peróxido de hidrógeno y sustrato orgánico). Se realizó un barrido inicial con alcohol veratrílico o manganeso y se mantuvo fija la concentración de peróxido de hidrógeno. Una vez que se encontró una concentración de saturación para el sustrato, se siguió con un barrido de peróxido de hidrógeno y se mantuvo fija la concentración de sustrato (bajo la condición de saturación correspondiente a cada preparación). Las mediciones cinéticas se realizaron con una concentración constante de enzima. Los valores para la constante de afinidad aparente (K_M) y máximo recambio de la enzima (k_{cat}) se calcularon a través del ajuste de los datos experimentales al modelo no lineal de Michaelis-Menten por medio del método de Lineweaver-Burk, con el software EnzFitter de Biosoft. Por medio de una gráfica del inverso de la velocidad contra el inverso de la concentración del sustrato ($1/[v_0]$ frente a $1/[S]$) se obtiene una línea recta en donde la k_{cat} es el inverso de la ordenada al origen y K_M/k_{cat} es la pendiente de la recta.

4.4.8 Actividad específica contra hidrocarburos poliaromáticos

La oxidación enzimática del 9-metil antraceno, antraceno, pireno y fenantreno se llevó a cabo a temperatura ambiente y se cuantificó por HPLC. Las condiciones de reacción utilizadas fueron las reportadas por Wang *et al.* (2003). Se preparó un mL de mezcla de reacción con una concentración final de 20 μ M de hidrocarburo poliaromático en 20% de acetonitrilo, 50 mM de amortiguador de malonatos pH 4.0° y en ausencia de $MnSO_4$. Se inyectaron 50 μ L de la mezcla de reacción en el HPLC y se cuantificó el área del pico del sustrato a la máxima longitud de onda a la que absorbe el compuesto. El 9-metil antraceno absorbe a 255 nm, antraceno y fenantreno a 250 nm, y pireno a 235 nm. La reacción se inició por medio de la adición de 1 mM de H_2O_2 a la mezcla. Después de 10 minutos, se inyectaron 50 μ L de la mezcla y se cuantificó la disminución del área del pico del sustrato. La integración del área de los picos se realizó con el software del equipo (Turbochrom). Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado. La elusión se realizó isocráticamente con una mezcla de acetonitrilo/agua (60:40) y a un flujo de 0.5 mL/min.

4.4.9 Construcción del modelo de la peroxidasa versátil con las heminas modificadas

Se construyó un modelo por homología con la secuencia de la peroxidasa versátil de *Bjerkandera adusta* utilizando el servidor Swiss-Model (swissmodel.expasy.org). Para el modelo se seleccionaron como plantillas a los archivos 1QPA, 1B82, 1B85 y 1LGA del PDB (Protein Data Bank). Las heminas modificadas con los grupos metilo, polietilenglicol, alcohol *p*-nitro-bencílico y alcohol *p*-amino-bencílico se modelaron con el módulo Builder del programa Insight II (Accelrys). La posición de cada una de las heminas modificadas en el modelo de la enzima se ajustó con el programa O (Jones *et al.* 1991). Los archivos de la enzima y de la hemina modificada se integraron con el programa CNS, con la subrutina GENERATE, mientras que la posición y los alrededores del grupo hemo se minimizaron energéticamente con la subrutina model-minimize (Brünger *et al.* 1998). Finalmente, las figuras de la peroxidasa versátil con las heminas modificadas se generaron con el programa Visual Molecular Dynamics (VMD).

4.4.10 Análisis estadístico

Se realizó la prueba *F* para la comparación de desviaciones estándar a las constantes cinéticas y a las actividades específicas contra hidrocarburos poliaromáticos de la VP nativa y las preparaciones de VP modificada. El valor de *F* se obtuvo del cociente de la variación entre muestras y la variación dentro de la muestra. Después de haber determinado que si existían diferencias entre las varianzas de cada grupo de datos (*F* calculada > valor crítico de *F* a $\alpha=0.05$), a cada uno de los grupos de datos se les realizó la prueba de la menor diferencia significativa (MDS) de Fisher, con una $\alpha=0.002$, corregida con el método de Bonferroni (Townend, 2002) para comparaciones múltiples.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Preparación de la apoenzima

El enlace no covalente entre la quinta posición de coordinación del grupo hemo y la histidina proximal de las peroxidasa puede romperse bajo condiciones ácidas. Se exploraron dos métodos para extraer el grupo hemo de la peroxidasa versátil (VP), el método de la butanona ácida y el de la acetona ácida. Ambos se basan en el decremento de la afinidad del hemo por la matriz proteínica en condiciones ácidas (Ascoli *et al.* 1981).

5.1.1 Extracción del grupo hemo de la peroxidasa de rábano blanco

Con el fin de optimizar el uso de la VP se realizó la puesta a punto del protocolo para extraer el grupo hemo de la enzima con la peroxidasa de rábano blanco (HRP). A diferencia de la VP, la HRP se encuentra disponible comercialmente. La actividad enzimática de la HRP se midió usando guayacol como sustrato. La actividad específica de la HRP nativa relativa con base en el número de mol de hemo fue de $34,100 \pm 3,100 \text{ min}^{-1}$.

El primer método que se exploró fue el de la butanona ácida. Para determinar la acidez mínima necesaria para inducir la partición completa del grupo hemo de la HRP en la butanona se siguió el procedimiento descrito por Yonetani (1967). Se prepararon cuatro alícuotas de la HRP en amortiguador de acetatos a cuatro valores de pH (1-4) y a cada una se le adicionó butanona fría en una relación 2:3 (amortiguador/butanona). Las mezclas se agitaron por 30 segundos y se dejaron en reposo hasta que la fase de butanona se separó de la fase acuosa. Al disociarse el enlace entre la matriz peptídica y el grupo hemo, la apoenzima se decoloró y el hemo liberado se transfirió a la fase de butanona. La cantidad de grupo hemo en la apoenzima de la HRP se determinó por medio del espectro de su banda Soret a 403 nm (Dunford, 1999).

Con el método de la butanona ácida se removió casi completamente el hemo de la HRP y sin insolubilizar la apoenzima. La eficiencia en la remoción del hemo fue cercana al 100% en las cuatro condiciones de pH ensayadas (Tabla I) por lo que en los siguientes experimentos el grupo hemo se extrajo a pH 4.

Tabla I. Actividad específica de la apoHRP preprada con butanona ácida y a diferentes pH de extracción.

pH de extracción	Actividad específica (min ⁻¹)
1	0.5 ± 0.2
2	2.3 ± 1
3	60.2 ± 8.1
4	642.3 ± 38

Actividad específica por mol de grupo hemo (banda Soret a 403 nm). Los resultados presentados son las medias, ± es la desviación estándar de tres réplicas.

La apoHRP preparada con butanona ácida se reconstituyó con hemina a 4°C y a pH 7. La enzima reconstituida presentó una actividad del 16% con respecto a la enzima nativa. Después, se reconstituyó la apoHRP con hemina variando el pH del medio de reconstitución (4-9). En la tabla II se observa que el pH de la solución de reconstitución aparentemente tiene un efecto en el grado de actividad recuperada, siendo a pH 7 donde se recuperó una mayor actividad. La dependencia al pH observada puede ser interpretada como un indicio de que la variación en el pH de la solución produce cambios susceptibles en la conformación de la apoproteína y que la conformación que existe a pH 7 se parece a la de la enzima nativa y favorece la unión con la hemina.

La razón por la que no se restauró completamente la actividad enzimática contra guayacol en la HRP reconstituida con hemina pudo ser que las condiciones de extracción del grupo hemo fueron extremas para la HRP y que un porcentaje de la enzima se haya inactivado, o que la hemina se haya incorporado en una forma desordenada en el sitio activo de la apoenzima durante la reconstitución e incluso, que el factor limitante haya sido una pobre reincorporación de la hemina dentro del sitio activo debido a una transferencia limitada de la hemina hacia el sitio activo de la apoenzima. Lo anterior pudo deberse a la hidrofobicidad de la hemina o a su tamaño. Los siguientes experimentos estuvieron dirigidos a resolver el aparente acceso limitado de la hemina al sitio activo de la enzima.

Lo primero que se realizó fue aumentar la temperatura de la reconstitución para favorecer el replegamiento de la apoHRP. Sin embargo, a medida que se aumentó la temperatura de la reconstitución se redujo la actividad de la enzima reconstituida. A

continuación, se adicionó urea al medio de reconstitución en diferentes concentraciones para relajar la estructura de la apoenzima y favorecer la transferencia del hemo en la proteína. Conforme aumentó la concentración de urea, la actividad de la enzima reconstituida disminuyó, esto se debió a que el ambiente alrededor del grupo prostético fue desestructurado por la presencia de urea. Finalmente, se adicionó Tween 80 al medio de reconstitución para disminuir la limitación en la transferencia del hemo dentro de la cavidad de la enzima, aunque no tuvo un efecto positivo en la actividad recuperada (Tabla II). Los resultados anteriores sugieren que la causa principal por la que no se reconstituye completamente la apoHRP preparada con butanona no se debe a la dificultad de la hemina para acceder a la cavidad del grupo hemo de la HRP, sino más bien a que las condiciones de extracción del grupo hemo (pH ácido y butanona) afectan la viabilidad para reconstituir la apoenzima.

Tabla II. Variables y condiciones de reconstitución ensayadas con la apoHRP preparada con butanona ácida.

Variable	Condición de reconstitución	Actividad (%) ^a
pH ^b	4	2.5 ± 0.1
	5	4.0 ± 0.04
	6	13.6 ± 0.9
	7	16.4 ± 1
	8	8.1 ± 0.1
	9	5.7 ± 0.3
Temperatura ^c (°C)	20	6.9 ± 0.04
	30	3.4 ± 0.1
	40	5.2 ± 0.1
	50	2.6 ± 0.1
Urea ^d (M)	1	5.0 ± 0.2
	2	4.0 ± 0.2
	3	3.1 ± 0.1
	4	0.5 ± 0.02
Tween 80 ^d (%)	0.01	6.8 ± 0.1

^a(Actividad específica de la HRP reconstituida/Actividad específica de la HRP nativa) x 100. Los resultados presentados son las medias, ± es la desviación estándar de tres réplicas. ^b, ^c y

^dReconstituciones a 4°C, pH 7. y 4°C /pH 7, respectivamente.

Ninguna de las condiciones ensayadas incrementó la actividad enzimática. Las condiciones donde se recuperó la mayor actividad fueron las iniciales (a pH 7 y 4°C). Por lo tanto, estas condiciones se mantuvieron constantes en los siguientes experimentos de

reconstitución. Por otra parte, a pesar de que sólo se recuperó parcialmente la actividad de la HRP reconstituida con hemina, el porcentaje de reconstitución alcanzado (16%) se consideró suficiente para proceder a la extracción del grupo hemo de la VP con butanona ácida.

5.1.2 Extracción del grupo hemo de la peroxidasa versátil

Las actividades enzimáticas de la VP se midieron usando Mn^{2+} para la actividad de tipo manganeso peroxidasa (MnP) y alcohol veratrílico para la actividad tipo ligninasa (LiP).

Una alícuota de la VP fue tratada con butanona a pH 4.0 para extraerle su grupo hemo. La extracción fue incompleta, ya que la apoenzima conservó 21% de la actividad nativa (Tabla III). Esto significa que en la solución de apoenzima había una fracción de la enzima nativa. No es posible separar esta fracción de la apoenzima y su presencia dificultaría la interpretación del efecto de la hemina modificada en la enzima reconstituida. Por lo tanto, se probó la extracción del grupo hemo a pH 3.0. Bajo esta condición, la reducción en la actividad de la apoenzima fue casi del 99% (Tabla III). Después de la reconstitución con hemina, no se observó un aumento en la actividad de la enzima, aunque la relación molar entre hemo y proteína fue de uno.

Tabla III. Actividad tipo MnP de la apoVP preparada con butanona ácida y de la VP reconstituida con hemina.

Preparación	Relación molar Hemo/Proteína	Actividad ^a (%)
VP nativa	1.0	100
ApoVP4 (preparada a pH 4)	-	21.2 ± 0.9
ApoVP3 (preparada a pH 3)	-	1.2 ± 0.4
VP reconstituida (ApoVP3 + hemina)	1.0	1.5 ± 0.4

^a(Actividad de la VP reconstituida/Actividad de la VP nativa) x 100. Los resultados presentados son las medias, ± es la desviación estándar de tres réplicas.

Se sabe que pequeños cambios en la arquitectura de las peroxidasas pueden conducir a la desactivación irreversible de la enzima y que a un pH ácido, la estructura de la apoenzima es más inestable (Shiro *et al.* 1986). Los resultados anteriores nos indican que la VP es más sensible que la HRP a las condiciones del tratamiento con butanona ácida. El principal criterio

para escoger el procedimiento para preparar la apoenzima es que puedan reconstituirse las propiedades de la enzima nativa, por eso se descartó la butanona ácida y se ensayó la extracción del grupo hemo de la VP en presencia de acetona ácida.

El tratamiento con acetona ácida para extraer el grupo prostético de la VP disminuye la banda Soret de la enzima (Figura 10). La apoenzima preparada con acetona ácida presentó 1% de sus actividades específicas de tipo MnP y LiP con respecto a la VP nativa. La reconstitución de la apoVP con hemina (a 4°C y pH 7) restauró sus dos actividades en un 70% (Tabla IV). El gran parecido entre los espectros de la VP nativa y la VP reconstituida con hemina permite sugerir que la cavidad del hemo se conservó después de extraer el grupo prostético con acetona ácida y que la hemina se insertó correctamente dentro de la apoenzima.

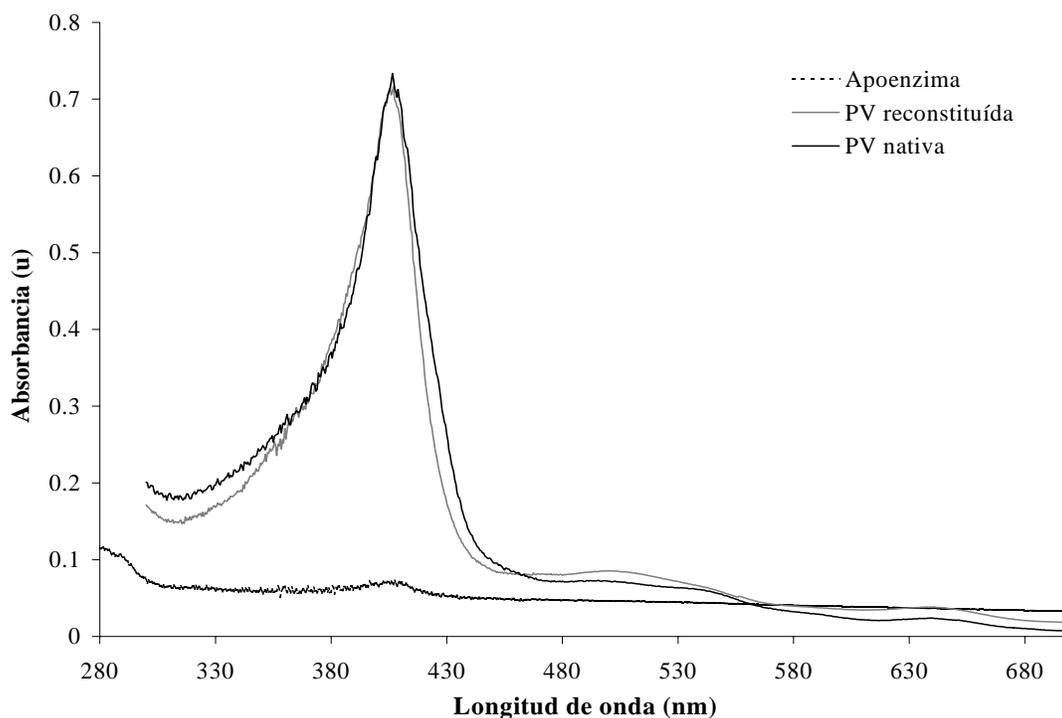


Figura 10. Espectro UV/vis de la VP, su apoenzima y de la VP reconstituida con hemina.

Las variables y condiciones de reincorporación ensayadas con la HRP también se ensayaron en la VP. Nuevamente, en ninguno de estos experimentos se observó una mayor recuperación de la actividad enzimática de la VP (Tabla IV). Adicionalmente, se probaron concentraciones más altas de DMF en el medio de reconstitución, sin observarse un efecto

claro en la recuperación de la actividad. El tratamiento con acetona ácida (pH < 2), al igual que el de la butanona ácida, además de destruir las interacciones entre el hemo y la apoenzima, también puede modificar (irreversiblemente) otro tipo de interacciones en la enzima.

Desde esta perspectiva, sería difícil alcanzar la reconstitución completa de la apoenzima preparada con acetona o butanona ácida, ya que las condiciones de extracción parecen afectar sensiblemente las interacciones hemo/proteína. Sin embargo, la reconstitución de más del 70% de las propiedades catalíticas de la VP reconstituida con hemina, permitió el reemplazo del grupo hemo de la VP con heminas modificadas y estudiar el efecto de las modificaciones en las propiedades catalíticas de la enzima modificada.

Tabla IV. Variables y condiciones de reconstitución ensayadas con la apoVP preparada con acetona ácida.

Variable	Condición de reconstitución	Actividad (%) ^a	
		Actividad tipo MnP	Actividad tipo LiP
pH ^b	5	10 ± 0.4	9 ± 0.2
	6	58 ± 3	54 ± 0.4
	7	73 ± 8	70 ± 11
	8	55 ± 1	44 ± 0.3
Temperatura ^c (°C)	20	50 ± 2	54 ± 2
	30	45 ± 0.3	43 ± 1
	40	23 ± 0.2	26 ± 2
	50	19 ± 1	18 ± 0.1
Urea ^d (M)	1	60 ± 3	64 ± 2
	2	60 ± 7	59 ± 3
	3	44 ± 0.4	37 ± 1
Tween 80 ^d (%)	0.01	39 ± 3	49 ± 1

^aActividad específica de la VP reconstituida/Actividad específica de la VP nativa x 100. Los resultados presentados son las medias, ± es la desviación estándar de tres réplicas. ^{b, c y d}Reconstituciones a 4°C, pH 7, y 4°C /pH 7, respectivamente.

5.2 Modificación química de la ferriprotoporfirina IX

Las propiedades de fluorescencia, ionización, solubilidad y ópticas de las metaloporfirinas están determinadas por la hidrofiliidad y electronegatividad de sus cadenas laterales. La hemina es prácticamente insoluble en agua y en solventes orgánicos polares (Dawson, *et al.* 1969). La reacción de ligandos con los grupos carboxilos periféricos del anillo de porfirina tiene gran importancia en las propiedades de la hemina. Después de esterificar la hemina con polietilenglicol, grupos metilo, alcohol *p*-amino-bencílico y alcohol *p*-nitro-bencílico, las heminas modificadas fueron solubles en cloroformo, benceno, metanol o diclorometano.

La presencia de impurezas en la hemina modificada haría difícil la interpretación de los resultados de reconstitución. El producto de cada reacción de modificación se separó de la hemina no modificada a través de una columna cromatográfica de alumina para obtener un producto homogéneo. Las estructuras propuestas para cada una de las heminas modificadas se muestran en sus espectros de infrarrojo (Figuras 11-14).

5.2.1 Espectros de infrarrojo de la hemina sin modificar y las heminas modificadas

La interpretación de los espectros de infrarrojo de la hemina no modificada y las heminas modificadas se realizó con la ayuda de tablas de correlación que proporcionan los rangos dentro de los cuales absorbe un tipo de enlace particular (Furniss *et al.* 1989).

IR de la hemina. En la figura 11 se muestra el espectro de IR de la hemina registrado en un disco de KBr. La región del espectro de 4000 a 1600 cm^{-1} se llama “la región del grupo funcional”, debido a que los tipos de vibración de la mayoría de los grupos funcionales absorbe en esta región. Se observan varias bandas traslapadas que son de intensidad mediana a débil en la región de 3100 a 2800 cm^{-1} y que pueden ser asignadas a las vibraciones de estiramiento del enlace C-H. Estas bandas ofrecen información cualitativa relacionada con el número de grupos CH_3 ó CH_2 en una cadena alifática pues que su intensidad relativa depende del número de cada grupo presente en un compuesto. Los picos a 2960, 2920 y 2875 cm^{-1} se asocian con vibraciones de estiramiento de tipo simétrico y asimétrico de los grupos alquilo de las cadenas laterales. También se observa una absorción de estiramiento débil a 3090 cm^{-1} .

asignada al enlace C-H del grupo vinilo. El pico más fuerte y prominente en la región del grupo funcional (1700 cm^{-1}) está originado por la vibración de estiramiento del enlace carbonilo (C=O) de los grupos carboxilos de los propionatos (Reguera *et al.* 2004).

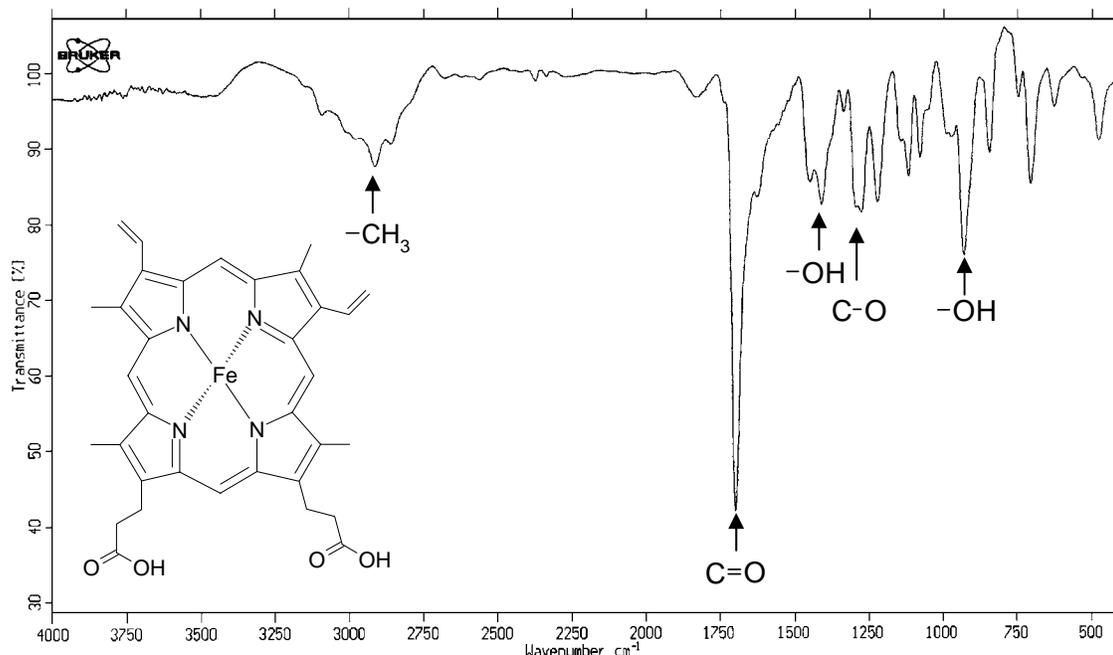


Figura 11. Espectro de infrarrojo de la hemina no modificada.

El espectro de la hemina presenta un gran número de bandas de absorción en la región de la huella digital ($1600\text{ a }600\text{ cm}^{-1}$), llamada así porque es única para cada compuesto. Algunas de las bandas se atribuyen a la presencia de los grupos carboxilos. La intensa absorción a 1410 cm^{-1} se debe a la energía de estiramiento del enlace C-O. Las absorciones a 1280 , 1220 y 930 cm^{-1} son originadas por la energía de flexión (fuera del plano) del enlace O-H. El pico a 850 cm^{-1} corresponde al enlace C-H del α -meteno. El espectro de la hemina en CCl_4 fue marcadamente similar al obtenido en KBr, aunque existieron diferencias cuantitativas en las intensidades de la banda de estiramiento del enlace carbonilo y en las bandas de la región de la huella digital. Como era de esperarse, la absorción debida al estiramiento del enlace N-H a 3320 cm^{-1} (Boucher y Katz, 1966) está ausente en los espectros de la hemina.

IR de la hemina modificada con BF₃/metanol. En el espectro de la hemina esterificada (Hemo-MET) la banda de estiramiento del carbonilo de la hemina (1700 cm⁻¹) se desplazó hacia 1735 cm⁻¹, debido a la formación del éster metil propionato (Figura 12). Las bandas originadas por los grupos alifáticos de las cadenas laterales de la hemina, entre 3100 y 2860 cm⁻¹, están mejor resueltas. A 3444 cm⁻¹ se observa un pico asignado a la vibración de estiramiento del enlace C-O de alcohol disociado, lo que indica la presencia de residuos de metanol. Por otra parte, el grupo CH₃ presenta dos tipos de vibración de flexión en el enlace C-H. La vibración asimétrica se observa alrededor de 1440 cm⁻¹ y la simétrica a 1360 cm⁻¹. La energía de estiramiento del enlace C-O del éster carboxílico se observa a 1160 cm⁻¹.

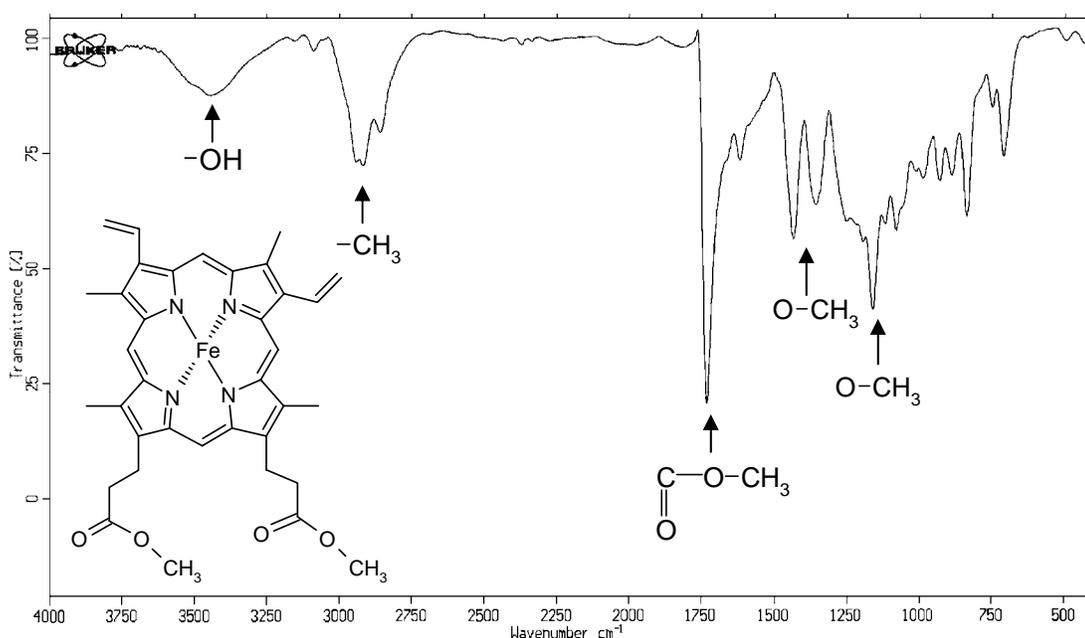


Figura 12. Espectro de infrarrojo de la hemina esterificada con BF₃/metanol.

IR de la hemina modificada con polietilenglicol. En la figura 13 se presenta el espectro de la hemina modificada en sus carboxilos con polietilenglicol (Hemo-PEG). La vibración de estiramiento del grupo hidroxilo terminal es claramente visible alrededor de 3480 cm⁻¹. Se observa una banda muy intensa cerca de 2870 cm⁻¹, región donde se produce la vibración de estiramiento del enlace -CH₂- del poliéter. Mientras que en la región de la huella digital, a 1455 cm⁻¹, se tiene la banda producida por la vibración del modo de flexión del poliéter. En esta misma región, se encuentra la vibración de estiramiento del enlace C-O, alrededor de 1110 cm⁻¹, característica de un alcohol primario. A 1350 cm⁻¹ se observa la banda

propia de la vibración de flexión del OH. Se observa que la vibración de estiramiento del carbonilo ($\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) disminuye sensiblemente, aunque no desaparece completamente.

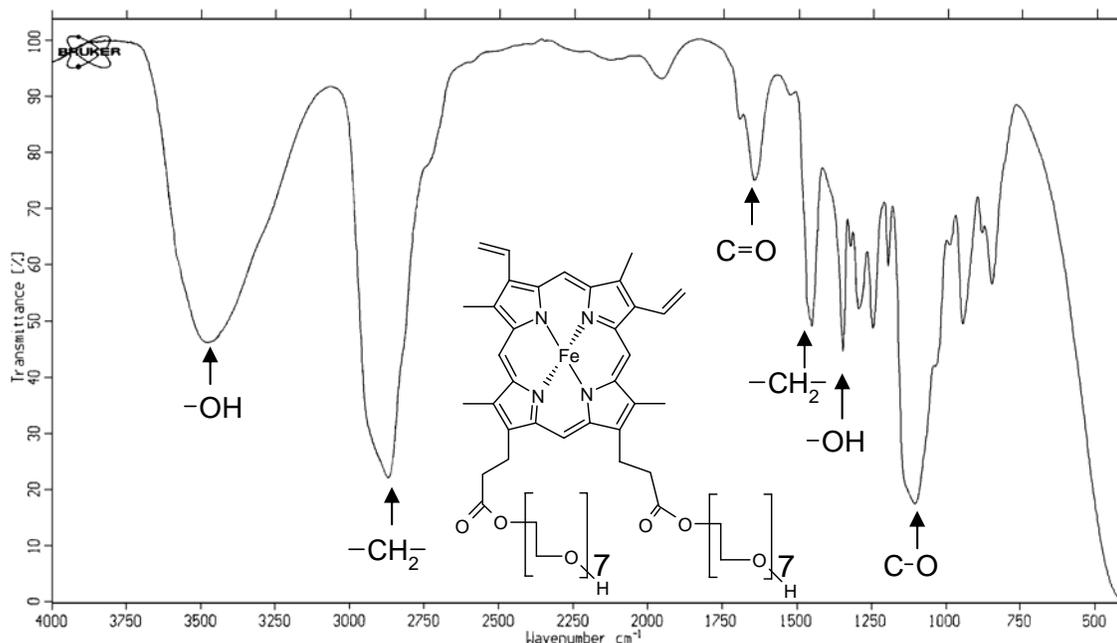


Figura 13. Espectro de infrarrojo de la hemina modificada con PEG de 350 Da.

IR de la hemina modificada con alcohol *p*-amino-bencílico y alcohol *p*-nitro-bencílico. Los espectros de la hemina modificada con PAB y PNB (Hemo-PAB y Hemo-PNB) se registraron en una solución de CCl_4 . Estos espectros estuvieron menos resueltos que los registrados en KBr. El rasgo característico de los IR de compuestos aromáticos es la presencia de varias bandas originadas por la vibración del anillo aromático. La banda cercana a 3000 cm^{-1} se debe a las vibraciones de estiramiento del enlace $=\text{C}-\text{H}$. Mientras que las bandas entre $1600\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ se originan por la vibración de flexión en el plano del $\text{C}=\text{C}$ del esqueleto del anillo aromático (Figura 14).

Las amidas producen dos bandas alrededor de $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$. Mientras que las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas de los enlaces del grupo nitro produce dos bandas de absorción muy intensas en la región de $1550\text{-}1490\text{ cm}^{-1}$ y $1350\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$. En los espectros de la figura 14 no se observa ningún pico de absorción prominente que pueda ser asignado concretamente a las vibraciones de los grupos amino o nitro. La incapacidad para observar estas bandas en el IR mediano puede deberse a que la concentración de las heminas

en la solución de CCl_4 no haya sido la adecuada y se hayan producido picos débiles y pobremente resueltos. De hecho, estos espectros están menos resueltos que los espectros realizados en KBr. Otra causa podría ser que las múltiples absorciones de la hemina hayan enmascarado las absorciones producidas por los grupos acoplados. Por otra parte, la ausencia de bandas por arriba de los 3000 cm^{-1} , indica la ausencia del grupo OH de los compuestos acoplados. Además, se observa que la banda representativa del enlace carbonilo se desplaza a 1735 cm^{-1} y que disminuye sensiblemente en ambos espectros. Estas observaciones permiten suponer que los grupos PAB y PNB se acoplaron a los grupos carboxilos de la hemina.

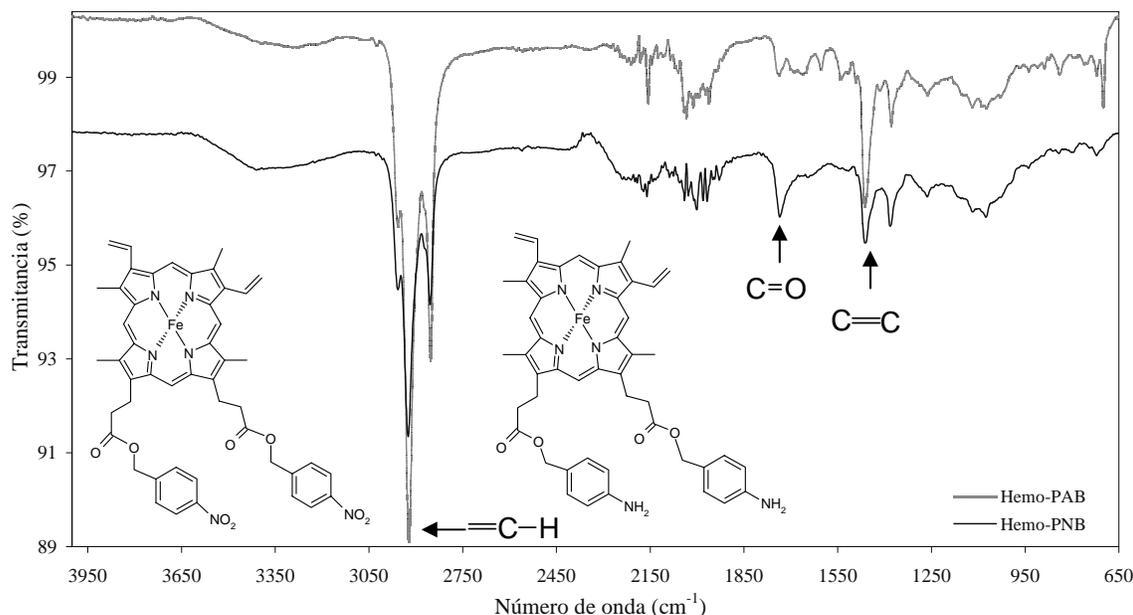


Figura 14. Espectro de infrarrojo de la hemina modificada con PAB y PNB.

La espectroscopia de infrarrojo fue útil para analizar la modificación de los grupos carboxilos de la hemina. Muchos grupos funcionales reprodujeron notablemente bandas de absorción en las mismas regiones del espectro, independientemente del resto de la estructura molecular. Además, las absorciones más prominentes en el espectro de las porfirinas estuvieron asociadas con las vibraciones de las cadenas laterales. En general, las absorciones que se originan por las vibraciones del esqueleto tetrapirrólico son débiles y difíciles de observar (Boucher y Katz, 1966). Los espectros de infrarrojo indican claramente que las reacciones con carbodiimida y con BF_3 modificaron los grupos carboxilo de los propionatos de la hemina. En la tabla V se encuentran enlistados los números de onda de las principales bandas observadas en los espectros de la hemina y sus análogos modificados.

Tabla V. Absorción en el infrarrojo de los principales grupos funcionales de la hemina modificada y no modificada.

Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)				
	Hemina	Hemo-MET	Hemo-PEG	Hemo-PAB	Hemo-PNB
Acido carboxílico	C=O	1700	-	-	-
	C-O	1410	-	-	-
	O-H	1280 1220 930	-	-	-
Alquilo	-CH ₃	2910	2920	2870	-
	-CH ₂ -		2860		
			1440 1360		
Ester	C=O	-	1735	-	-
	C-O	-	1160	-	-
Alcohol	O-H	-	-	3480 1350	-
	C-O	-	-	1110	-
Bencilo	=C-H	-	-	-	2920 2925
	C-C	-	-	-	1465 1380

5.2.2 Espectros UV/vis de la hemina sin modificar y de las heminas modificadas

El espectro UV/vis de la hemina en diclorometano tiene el máximo de la banda Soret a 390 nm y las bandas α y β tienen su máximo alrededor de 597 y 550 nm (Figura 15). En el espectro se observan dos bandas asignadas a la transferencia de carga (CT) entre el Fe³⁺ y la porfirina, éstas bandas no están presentes en los espectros de las heminas modificadas. La banda Soret de éstas últimas está desplazada hacia el rojo, entre 395 y 400 nm y presentan un pequeño hombro alrededor de los 350 nm que está ausente en la hemina no modificada.

La región visible de los espectros de Hemo-MET, Hemo-PAB y Hemo-PNB son muy similares y las bandas α y β están sobrepuestas, entre 570 nm y 600 nm, de tal forma que no se distinguen las bandas CT. La región visible del espectro de Hemo-PEG es diferente de los demás espectros. En éste, la banda β se encuentra a 575 nm y la banda α se encuentra desplazada hacia el rojo (630 nm). Los cambios observados en el Soret y en la región visible de los espectros de las heminas, indican un cambio en el ambiente electrónico de la hemina después de haber sido modificada.

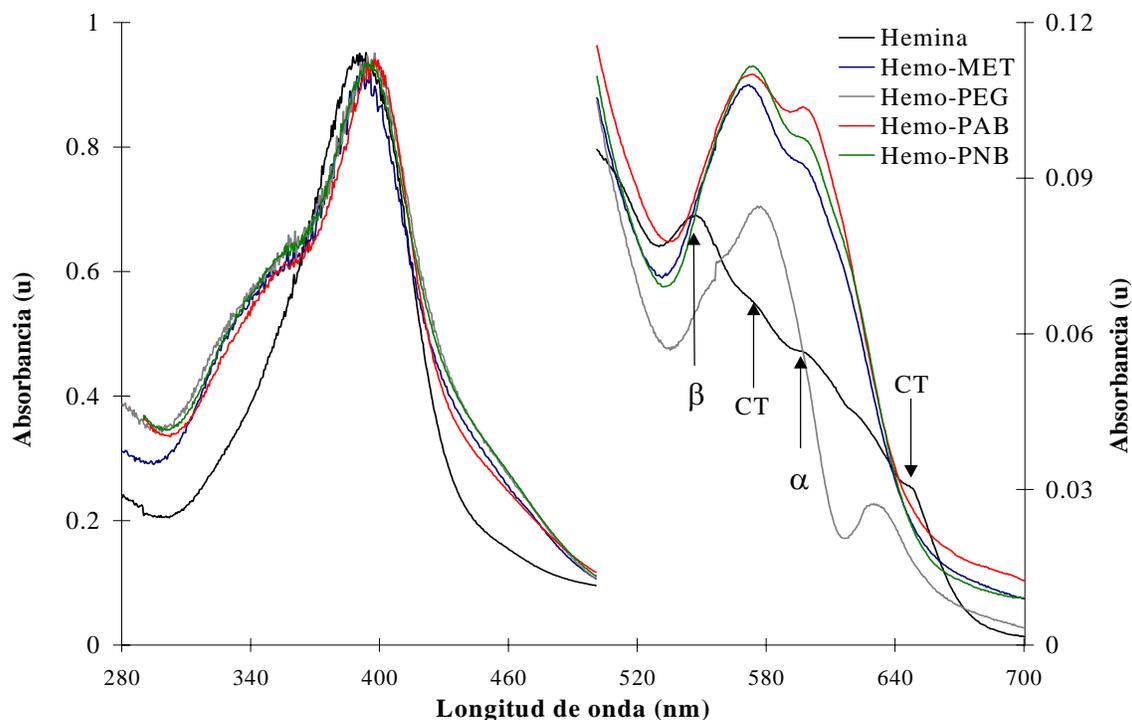


Figura 15. Espectro UV/vis de la hemina nativa y modificada con CH₃, PEG, PAB y PNB. La región entre 500 y 700 nm se presenta expandida.

5.3 Reconstitución de la peroxidasa versátil

La VP se reconstituyó con la hemina sin modificar y modificada. En cada una de las preparaciones de VP modificada se determinó el número de moles de hemo (banda Soret) espectrofotométricamente y la cantidad de proteína por medio del reactivo de BioRad. A diferencia del exceso de hemina, no es posible separar la apoenzima (que no se reconstituyó) de la VP reconstituida. Para discriminar la apoenzima que acompaña a la enzima modificada, las actividades específicas y las constantes catalíticas de las preparaciones modificadas se reportan con base en el número de hemos en las enzimas reconstituidas.

Como se muestra en la tabla VI, la relación molar Hemo/Proteína varió en función de la naturaleza de la hemina empleada en la reconstitución de la VP. Por otra parte, la actividad específica de las actividades tipo MnP y LiP de la VP reconstituida con hemina modificada y no modificada fueron menores a las actividades de la VP nativa en todos los casos (Tabla VI).

Tabla VI. Actividades específicas de la VP nativa y VP reconstituida con hemina modificada y no modificada.

Enzima	Relación molar Hemo/Proteína	Actividad específica (min ⁻¹) ^a	
		Actividad tipo MnP	Actividad tipo LiP
VP nativa	1	4,200±140	500±15
VP-HEM	0.9	3,400±170	380±13
VP-MET	0.45	3,470±40	410±30
VP-PEG	0.9	1,510±90	100±8
VP-PAB	0.7	730±30	95±3
VP-PNB	0.9	442±7	40±1

^aActividad específica por mol de hemo en la preparación enzimática. Los resultados presentados son las medias, ± es la desviación estándar de tres réplicas.

5.3.1 Espectros UV/vis de la peroxidasa versátil nativa y modificada.

El grupo hemo de la VP nativa es una mezcla de poblaciones pentacoordinadas y hexacoordinadas de alto y bajo espín (Ayala *et al.* 2001). El espectro óptico de la VP nativa en estado basal muestra la banda Soret a 407 nm y las bandas de transferencia de carga CT1 y CT2 a 637 y 505 nm, respectivamente (Figura 16). La CT1 sólo se observa en hemoproteínas de alto espín (Smulevich, 1998). Las bandas β y α de la VP están menos pronunciadas que las de transferencia de carga y se encuentran a 540 y 580 nm, respectivamente. El máximo de las posiciones de las bandas de transferencia de carga y Soret de la VP reconstituida con hemina (VP-HEM) se encuentra en posiciones similares a las de la VP nativa (640, 500 y 407 nm), aunque las bandas CT son más anchas. Las bandas β y α no se aprecian posiblemente porque están traslapadas con las bandas de transferencia de carga. Sin embargo, parece que el proceso de extracción del grupo prostético de la enzima no afectó sensiblemente la cavidad del hemo y que la hemina se reconstituyó correctamente en la cavidad del hemo de la apoenzima.

El máximo de la banda Soret de la VP reconstituida con Hemo-PAB (VP-PAB) y Hemo-PEG (VP-PEG) se encuentra en la misma posición que en la enzima nativa. En la VP reconstituida con Hemo-MET (VP-MET) el máximo del Soret está ligeramente desplazado hacia el azul (403 nm) y en la VP reconstituida con Hemo-PNB (VP-PNB) se encuentra a 410 nm. Se ha reportado que en general, la modificación de los propionatos del hemo no afecta sensiblemente la posición del máximo del Soret (Reading y Aust, 1998).

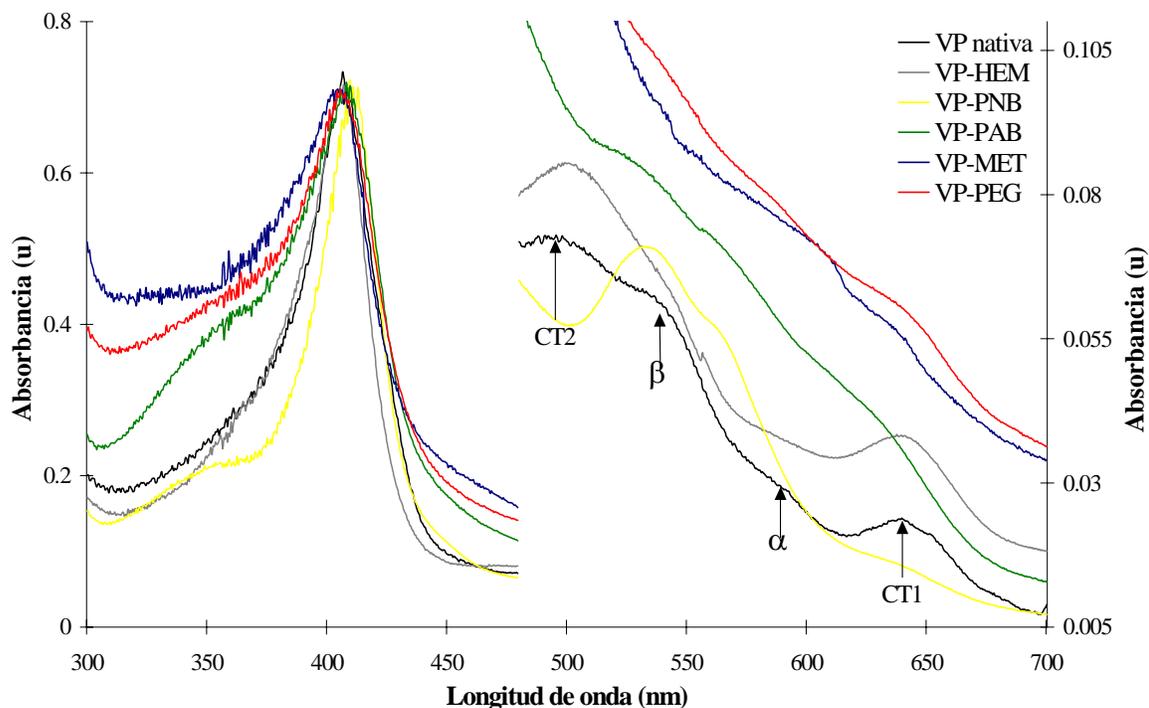


Figura 16. Espectro UV/vis de la VP nativa y modificada. La región entre 475 y 700 nm está expandida.

Las bandas CT1 y CT2 de la VP-PNB están desplazadas a 640 y 533 nm. Estas bandas están menos acentuadas (o ausentes) en los espectros del resto de las heminas modificadas (Figura 16). En particular, la ausencia de la banda CT1 es indicativo de un estado de bajo espín para el Fe^{3+} del grupo hemo (Smulevich, 1998). En general, los cambios observados en los espectros de las enzimas modificadas indican una modificación electrónica del grupo prostético de la peroxidasa versátil.

En la misma figura, se observa un hombro pronunciado alrededor de los 360 nm en la VP-PAB, VP-PEG y VP-MET. Este hombro no está presente en la VP nativa ni en la VP-HEM. Lo anterior, junto con el sensible decremento en la intensidad de las bandas de transferencia de carga son características de un hemo pentacoordinado (Smulevich, 1996). Las diferencias observadas en los espectros ópticos indican que el ambiente en el sitio activo del hemo de la enzima reconstituida con los hemos modificados es diferente al ambiente de la VP sin modificar.

5.3.2 Constantes cinéticas de la peroxidasa versátil nativa y modificada

La caracterización cinética de las enzimas modificadas se realizó mediante la medición de las velocidades iniciales de oxidación de sustratos representativos de las actividades tipo MnP (Mn^{2+} y H_2O_2) y tipo LiP (AV) y su comparación con la VP nativa. El AV es un compuesto aromático no fenólico de alto potencial redox que puede ser oxidado por la VP a su radical catiónico en ausencia de Mn^{2+} (Pérez-Boada *et al.* 2005). La VP tiene una gran afinidad por el ion Mn^{2+} y lo puede oxidar con gran eficiencia (Heinfling *et al.* 1998b). La elevada K_M del AV en la VP indica un sitio de unión con menor afinidad que el sitio de unión del Mn^{2+} .

Las constantes cinéticas de la VP de *B. adusta* UAMH 8258 fueron similares a las reportadas para la VP de *P. eryngii* y *Bjerkandera sp.* BOS55 (Martínez *et al.* 1996; Mester y Field, 1998). En la tabla VII se muestra la comparación de las constantes cinéticas de las actividades de tipo MnP y LiP para la VP nativa, la VP reconstituida con hemina y las preparaciones de VP reconstituidas con las heminas modificadas. La menor diferencia significativa (MDS) para cada constante se presenta en la última fila de la tabla. Cuando la diferencia entre dos medias fue mayor a la MDS se tuvieron preparaciones significativamente diferentes. En general, dentro de un grupo de constantes determinado, la mayoría de las medias fueron significativamente diferentes del resto de las demás.

Las eficiencias catalíticas para el H_2O_2 y el AV de la VP reconstituida con hemina (VP-HEM) fueron menores que las de la VP nativa. Para el Mn^{2+} , la eficiencia fue ligeramente mayor para la VP-HEM. A pesar de este último resultado, la comparación de las constantes cinéticas de las dos preparaciones (Tabla VII) indica claramente que la preparación de la enzima modificada (extracción del grupo hemo y reincorporación de la hemina) *per se* reduce las propiedades catalíticas de la enzima. Por lo tanto, el efecto real de la modificación del grupo hemo de la VP en sus constantes catalíticas resulta de comparar las constantes de las VP modificadas contra las de la VP-HEM.

Tabla VII. Constantes cinéticas de las actividades tipo MnP y LiP de la VP nativa y modificada* .

Enzima	Actividad tipo MnP					Actividad tipo LiP		
	Mn ²⁺			H ₂ O ₂		AV		
	<i>k_{cat}</i> (min ⁻¹)	<i>K_M</i> (μM)	<i>k_{cat}/K_M</i> (μM ⁻¹ min ⁻¹)	<i>K_M</i> (μM)	<i>k_{cat}/K_M</i> (μM ⁻¹ min ⁻¹)	<i>k_{cat}</i> (min ⁻¹)	<i>K_M</i> (μM)	<i>k_{cat}/K_M</i> (μM ⁻¹ min ⁻¹)
VP nativa	4000 ± 130	77 ± 2	50 ± 2	13 ± 0.4	310 ± 2	620 ± 20	4300 ± 50	0.14 ± 0.004
VP-HEM	3100 ± 190	52 ± 1	60 ± 4	14 ± 1.6	220 ± 30	460 ± 25	4600 ± 150	0.10 ± 0.002
VP-MET	2950 ± 100	92 ± 3	30 ± 1	17 ± 0.8	180 ± 14	320 ± 20	2900 ± 70	0.11 ± 0.004
VP-PEG	1400 ± 40	300 ± 9	5 ± 0.3	19 ± 0.6	74 ± 3	130 ± 10	2100 ± 220	0.06 ± 0.003
VP-PAB	760 ± 20	160 ± 7	5 ± 0.3	12 ± 0.3	65 ± 1	140 ± 2	5100 ± 110	0.03 ± 0.001
VP-PNB	520 ± 6	190 ± 13	3 ± 0.2	20 ± 0.4	26 ± 1	60 ± 1	3000 ± 45	0.02 ± 0.001
MDS ^(α=0.002)	330	23	5.4	3	41	49	400	0.009

* Con base en el número de mol de hemo en la preparación enzimática. Nota: MDS es la menor diferencia significativa. Los resultados son las medias, ± es la desviación estándar de tres réplicas.

En la VP con la hemina metilada (VP-MET) se observan diferencias significativas entre la *K_M* del Mn²⁺ y del AV comparadas con las *K_M* de VP-HEM, aunque no existe una diferencia significativa entre la *K_M* del Mn²⁺ de la VP-MET y la de la VP nativa. Con relación a la eficiencia catalítica (*k_{cat}/K_M*), la única diferencia significativa es en la eficiencia de oxidación del Mn²⁺. En la figura 17 se muestran los modelos moleculares del sitio de unión a Mn²⁺ (E37, E41 y D183) de cada una de las VP modificadas. Debido a su tamaño, los grupos metilo aparentemente no alteraron sensiblemente el sitio y la ruta de transferencia electrónica entre el Mn²⁺ y el hemo (Figura 17a).

Las *k_{cat}* de las actividades de la VP con la hemina pegilada (VP-PEG) fueron significativamente menores a las de la VP-HEM. Mientras que la afinidad por el Mn²⁺ fue considerablemente menor, la afinidad por el AV fue casi del doble y la del H₂O₂ permaneció sin cambio. La eficiencia catalítica del Mn²⁺ fue la que más disminuyó, posiblemente porque el acceso al sitio de unión del ligante metálico se dificultó. Lo anterior es comprensible si se toma en cuenta el gran tamaño de las cadenas de polietilenglicol acopladas a los propionatos de la hemina, que pasan a través del canal de acceso de la peroxidasa versátil hacia el solvente (Figura 17b).

Las k_{cat} y las eficiencias catalíticas de las preparaciones enzimáticas VP-PAB y VP-PNB (modificadas con Hemo-PAB y Hemo-PNB, respectivamente) fueron las más inferiores con relación a la VP-HEM y VP nativa. Sin embargo, las constantes cinéticas de las preparaciones son muy similares entre sí. Debido al gran parecido estructural de las dos modificaciones, su efecto en la enzima debe tener un componente estérico. En los modelos de la VP con esas modificaciones se observa que el anillo bencénico del PAB y del PNB se encuentra próximo al ión Mn^{2+} y está situado entre el residuo D175 y el ligante metálico (Figura 17c y d).

El efecto más claro de la reconstitución de la VP con las enzimas modificadas fue la reducción de la k_{cat} de las dos actividades de la enzima. En general, los valores de K_M de las enzimas modificadas permiten sugerir que la interacción del Mn^{2+} con la enzima no fue afectada sensiblemente por las sustituciones en los propionatos del hemo. La reducción en la k_{cat} de las enzimas modificadas puede deberse a un decremento de la velocidad de transferencia de los electrones entre el sustrato y el hemo. Reading y Aust (1998) reportaron que después de expresar la MnP en *E. coli* y reconstituirla con varios hemos modificados en los propionatos, la enzima presentó valores de k_{cat} para el Mn^{2+} y el H_2O_2 significativamente menores a los de la MnP nativa. Los autores sugirieron que las sustituciones en el borde γ -meso del hemo dificultaron la coordinación del Mn^{2+} y que la pérdida de la interacción electrostática entre el propionato y el ión metálico interrumpió la ruta de transferencia primaria de electrones del Mn^{2+} al hemo.

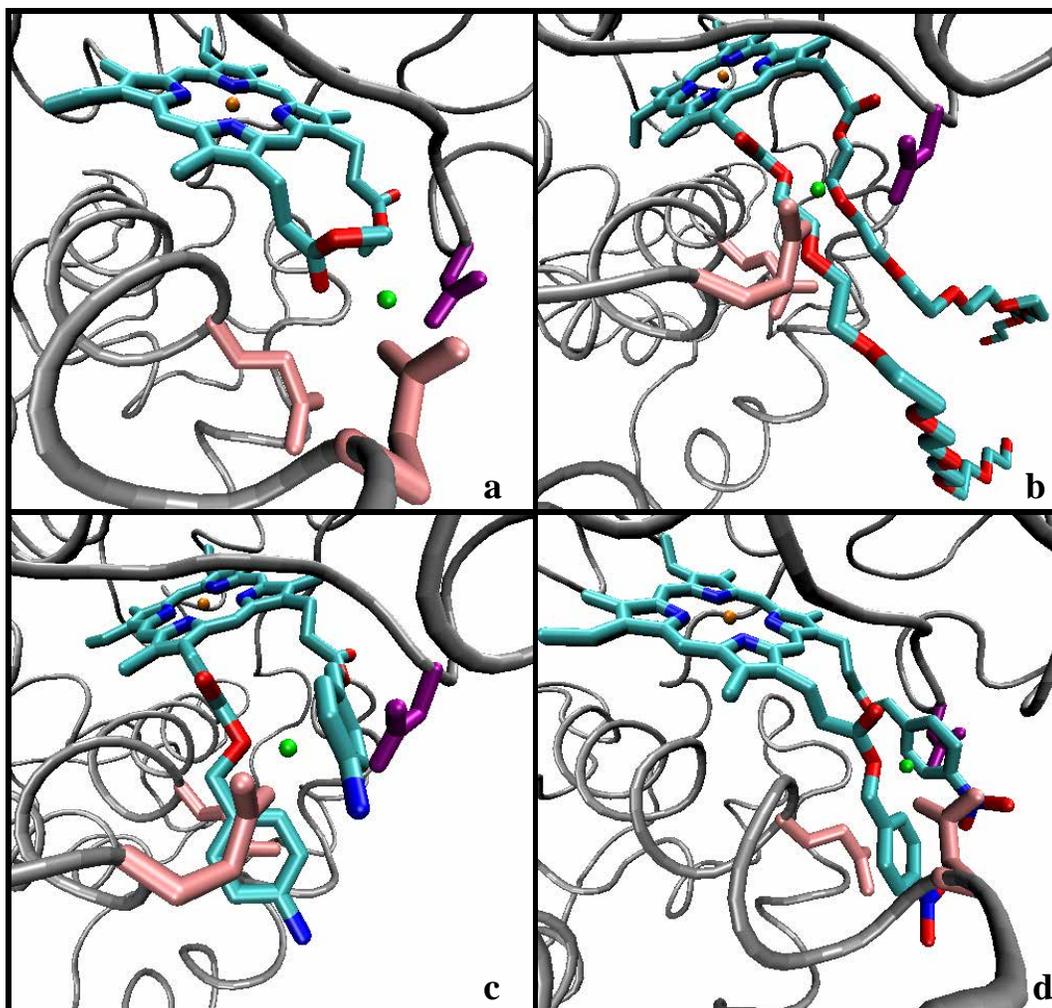


Figura 17. Representación del sitio de unión a Mn^{2+} de la VP con a) Hemo-MET, b) Hemo-PEG, c) Hemo-PAB y d) Hemo-PNB. Los residuos E37 y E41 se muestran en rosa, el residuo D183 se muestra en púrpura y el ión Mn^{2+} se presenta en verde.

La disminución de la eficiencia de oxidación del AV en las enzimas modificadas debe ser producto de una inhibición en la transferencia de electrones y no de una disminución en la formación del complejo entre el AV y el intermediario oxidado de la enzima puesto que el residuo que interacciona con el AV (W172) se encuentra en la superficie (Figura 6). En todos los casos, la enzima reconstituida con los hemos modificados presentó una menor actividad que la VP nativa. Por lo tanto, las modificaciones tuvieron un efecto negativo en la actividad catalítica tipo MnP y LiP, independientemente de la naturaleza de la molécula acoplada a la hemina.

5.3.3 Oxidación de hidrocarburos poliaromáticos por la peroxidasa versátil

El trabajo pionero de Hammel *et al.* (1986) demostró la habilidad de la LiP de *P. chrysosporium* para oxidar HPAs con potenciales de ionización (PI) ≤ 7.55 eV. La correlación entre el PI de los HPAs y la actividad específica de la LiP fue confirmado por Vazquez-Duhalt *et al.* (1994). Recientemente, Wang *et al.* (2003) encontraron que la actividad específica de la VP contra HPAs es mayor en ausencia de Mn^{+2} y a pH 4.0.

Se estudió la actividad de las diferentes preparaciones de la VP modificada contra cuatro HPAs. El diseño del experimento incluyó la selección de HPAs con diferentes PI. El sistema de reacción se basó en las condiciones reportadas por Wang *et al.* (2003). Las actividades de las preparaciones de VP modificadas fueron menores que las de la VP nativa, sin embargo, fueron similares a las actividades de la PV-HEM. La actividad específica con los sustratos antraceno y 9-metil antraceno disminuyó casi en la misma proporción para todas las VP modificadas, excepto para la VP-PNB, que presentó una actividad considerablemente inferior al resto de las preparaciones. La actividad específica contra pireno fue prácticamente igual en todas las modificaciones, con excepción de la VP-PNB que presentó menos del 10% de la actividad de la VP nativa (Tabla VIII).

Tabla VIII. Actividad específica en ausencia de Mn^{2+} de la VP nativa y VP modificada contra hidrocarburos poliaromáticos*.

Enzima	Actividad específica (min^{-1})			
	9-metil antraceno (7.25) ^a	Antraceno (7.41)	Pireno (7.42)	Fenantreno (7.91)
VP nativa	59 ± 6	27 ± 3	0.78 ± 0.09	NR
VP-HEM	38 ± 3	16 ± 1	0.58 ± 0.04	NR
VP-PEG	38 ± 3	9 ± 1	0.54 ± 0.04	NR
VP-PAB	33 ± 4	14 ± 1	0.51 ± 0.04	NR
VP-MET	22 ± 1	9 ± 1	0.47 ± 0.02	NR
VP-PNB	6 ± 0.8	2 ± 0.1	0.09 ± 0.01	NR
MDS ^($\alpha=0.002$)	11	5	0.15	-

* Con base en el número de mol de hemo en la preparación enzimática.^a Potencial de ionización (eV) obtenido de <http://webbook.nist.gov>. NR, Reacción no detectada.

Nota: MDS es la menor diferencia significativa. Los resultados presentados son las medias, ± es la desviación estándar de tres réplicas.

Los resultados obtenidos con las diferentes preparaciones de VP modificada confirman que a menor PI del HPA, más alta es la actividad específica de la preparación enzimática. Es decir, la energía necesaria para remover un electrón del sustrato aromático correlaciona con la velocidad de oxidación de la enzima (Wang *et al.* 2003). Las enzimas modificadas sólo oxidaron los compuestos aromáticos con $PI \leq 7.42$ eV. Por otra parte, las diferentes susceptibilidades a la oxidación que tienen el antraceno y el 9-metil antraceno ilustran las propiedades electrón-donadoras de los grupos metilos. El aumento de la densidad electrónica de los carbonos adyacentes en el 9-metil antraceno lo hace más susceptible a la oxidación.

Ninguna de las preparaciones modificadas pudo oxidar el fenantreno, por lo que no se pudo confirmar un aumento en el potencial redox de la enzima. El fenantreno no puede ser oxidado por la VP debido a que el PI de este compuesto es superior a 7.42 y sólo puede ser metabolizado en cultivos de *P. chysosporium* y *P. ostreatus* (Bezalel *et al.* 1996).

Las preparaciones VP-PNB y VP-PAB fueron reconstituidas con heminas modificadas con compuestos opuestos en su carácter electrón atrayente. El alcohol *p*-aminobencílico (PAB) se comporta como donador de electrones y el alcohol *p*-nitrobencílico (PNB) como un atractor de electrones. La actividad específica de la VP-PAB fue de cinco a siete veces mayor que la actividad de la VP-PNB contra los compuestos poliaromáticos (Tabla VIII). Se esperaba que la enzima modificada con HEM-PNB presentara una mayor actividad específica en contra de los compuestos aromáticos debido a que la menor densidad electrónica del hemo en esa modificación debería ocasionar que el potencial de reducción del par Fe^{3+}/Fe^{2+} en la peroxidasa se desplazara en una dirección positiva y se aumentara la actividad catalítica de la enzima. No es fácil dar una explicación concreta a estos resultados debido a la multiplicidad de factores que pudieran haberse alterado por la modificación del grupo prostético de la enzima, impedimentos estéricos, velocidad de formación de los intermediarios de reacción, hidrofobicidad del sitio activo, potencial de reducción, integridad de la enzima después de la sustitución del grupo prostético, etc. Sin embargo, una explicación a estos resultados sería que el efecto de las modificaciones se estuviera dando en la formación del compuesto I, donde la modificación con el atractor de electrones dificultaría la formación del intermediario altamente oxidado y reduciría la velocidad de oxidación del sustrato. Esta hipótesis se contrapone al

punto de vista actual que sitúa la reducción del compuesto II como el paso limitante en la oxidación de los sustratos por las peroxidasas (Shiro *et al.* 1986).

Finalmente, no se realizó ningún intento por identificar los productos de oxidación de los HPAs. Sin embargo, está bien documentado que los productos principales de la oxidación del antraceno, 9-metil antraceno y pireno con peroxidasas o hemoproteínas con actividad de tipo peroxidasa son sus quinonas correspondientes (Vazquez-Duhalt *et al.* 1994; Wang *et al.* 2003).

6. CONCLUSIONES

I. El grupo hemo de la peroxidasa versátil se removió eficientemente con los métodos de la acetona ácida y butanona ácida. Sin embargo, la enzima fue más sensible al tratamiento con la butanona ácida y la apoenzima obtenida con este método no recuperó su actividad catalítica. Por el contrario, el método de la butanona ácida fue el más adecuado para extraer el grupo prostético de la peroxidasa de rábano blanco.

II. Después de reincorporar el hemo a la apoenzima de la peroxidasa versátil, se obtuvo una enzima reconstituida completamente, con propiedades espectroscópicas y catalíticas muy semejantes a las de la enzima nativa.

III. Los propionatos de la hemina se esterificaron con metanol, polietilenglicol, alcohol *p*-nitro-bencílico y alcohol *p*-amino-bencílico, usando trifluoruro de boro para acoplar los grupos metilo y la química de la carbodiimida para las demás modificaciones. La presencia de estos grupos en la hemina se corroboró por medio de espectroscopia de infrarrojo y de absorción electrónica.

IV. Las heminas modificadas Hemo-MET, Hemo-PEG, Hemo-PAB y Hemo-PNB, fueron introducidas exitosamente en el sitio activo de la peroxidasa versátil. El reemplazo del grupo hemo nativo de la VP con las heminas modificadas produjo enzimas con diferente afinidad por los sustratos y con menores actividades catalíticas contra el alcohol veratrílico y el Mn^{2+} . Lo anterior posiblemente se debió a que la modificación de los propionatos dificultó la transferencia de electrones entre los sustratos y el grupo hemo.

V. La modificación química *ex-situ* de la peroxidasa versátil no incrementó su capacidad oxidativa contra hidrocarburos poliaromáticos. Es probable que tampoco se haya incrementado el potencial redox de la enzima porque ninguna de las preparaciones fue capaz de oxidar el fenantreno.

7. PERSPECTIVAS

Uno de los aspectos positivos de este trabajo fue la obtención de varias preparaciones de peroxidasa versátil modificada, esto, a pesar de que las modificaciones no introdujeron cambios espectaculares en el comportamiento catalítico de la enzima nativa. La peroxidasa versátil es un modelo único por su arquitectura molecular híbrida que combina diferentes sitios de unión y oxidación de sustratos de alto potencial de reducción. Sería interesante probar la oxidación de otros sustratos con las preparaciones modificadas con el fin de obtener información adicional sobre el efecto de las modificaciones en la actividad de la enzima. Podrían usarse colorantes con diferente potencial redox, que se sabe interactúan en un sitio diferente al triptófano catalítico en la peroxidasa versátil (Doyle *et al.* 1998; Pérez-Boada *et al.* 2005) y no necesitan de solventes orgánicos para disolverse, esto último para evitar el efecto de la partición del sustrato sobre la actividad de la enzima.

Es importante determinar el potencial de reducción del compuesto II y del par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ de la peroxidasa versátil nativa y modificada. Su comparación permitiría evaluar el efecto de la modificación de los propionatos en el ambiente electrónico del hemo.

Una de las vertientes más importantes por estudiar es la modificación del resto de las posiciones del grupo hemo. Los grupos vinilo son buenos candidatos para modular la densidad electrónica del hemo mediante su reemplazo con grupos diferentes en su capacidad atrayente de electrones. Las modificaciones químicas que se utilizaron en este trabajo comprenden sólo una pequeña muestra de las modificaciones posibles. Actualmente, existen numerosos métodos para modificar las cadenas laterales del grupo hemo o de la superficie de la peroxidasa versátil.

Es muy importante realizar estudios que sirvan para desarrollar las herramientas de la ingeniería de proteínas en las peroxidases fúngicas y permitan su aplicación en el diseño de la estructura molecular de las hemoenzimas, para producir biocatalizadores con un mejor desempeño operacional.

8. REFERENCIAS

- **Adak, S. and Banerjee, R.** (1998). Haem propionates control oxidative and reductive activities of horseradish peroxidase by maintaining the correct orientation of the haem. *Biochem. J.* 334: 51-56.
- **Andrawis, A., Johnson, K. A. and Tien, M.** (1988) Studies on compound I formation of the lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 263: 1195-1198.
- **Ascoli, F., Fanelli, M. R. R. and Antonini, E.** (1981). Preparation and properties of apohemoglobin and reconstituted hemoglobins. *Methods Enzymol.* 76: 72-87.
- **Ayala-Aceves, M., Baratto, M. C., Basosi, R., Vazquez-Duhalt, R. and Pogni, R.** (2001). Spectroscopic characterization of a manganese-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera adusta* in the absence of manganese: evidence of a protein centered radical by hydrogen peroxide. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 16: 159-167.
- **Banci, L.** (1997). Structural properties of peroxidases. *J. Biotechnol.* 53: 253-263.
- **Banci, L., Bertini, I., Kuan, I. C., Turano, P., Tien, M. and Kirk, T. K.** (1991). Proton NMR investigation into the basis for the relatively high redox potential of lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 6956-6960.
- **Banci, L., Bertini, I., Kuan, I. C., Tien, M., Turano, P. and Vila, A. J.** (1993). NMR investigation of isotopically labeled cyanide derivatives of lignin peroxidase and manganese peroxidase. *Biochemistry.* 32: 13483-13489.
- **Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P. P., Freeman, J. P. and Cerniglia, C. E.** (1996). Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microb.* 62: 2547-2553.
- **Bietti, M., Baciocchi, E. and Steenken, S.** (1998). Lifetime, reduction potential and base-induced fragmentation of the veratryl alcohol radical cation in aqueous solution. Pulse radiolysis studies on a ligninase “mediator”. *J. Phys. Chem. A.* 102: 7337-7342.
- **Blodig, W., Doyle, W. A., Smith, A. T., Winterhalter, K., Choinowski, T. H. and Piontek, K.** (1998). Autocatalytic formation of a hydroxy group at C β of Trp171 in lignin peroxidase. *Biochemistry.* 37: 8832-8838.
- **Bogan, B.W., Lamar, R.T. and Hammel, K. E.** (1996). Fluorene oxidation *in vivo* by *Phanerochaete chrysosporium* and *in vitro* during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1788-1792.
- **Boucher, L. J. and Katz, J. J.** (1966). The infrared spectra of metalloporphyrins (4000-160 cm⁻¹). *J. Am. Chem. Soc.* 89: 1340-1345.
- **Bourbonnais, R. and Paice, M. G.** (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267: 99-102.
- **Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- **Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W. et al.** (1998). Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallog. sect. D.* 54: 905-921.
- **Buldain, G., Frydman R. B., Tomaro, M. L. and Frydman B.** (1986). The chemical and enzymatic oxidation of hemothemin IX. Identification of hematoobiliverdin IX α as the sole product of the enzymatic oxidation. *Eur. J. Biochem.* 156: 179-184.
- **Butler, A.** (1998). Vanadium haloperoxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 279-285.
- **Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J. and Martínez, A. T.** (1999). Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J. Biol. Chem.* 274: 10324-10330.
- **Caramelo, L., Martínez, M. J. and Martínez, A. T.** (1999). A search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving α -keto- γ -thiomethylbutyric acid and lignin model dimers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 916-922.
- **Chance, B. and Maehly, A. C.** (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2: 764-775.
- **Cherry, J. R., Lamsa, M. H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones A. and Pedersen, A. H.** (1999). Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nat. Biotechnol.* 17: 379-384.
- **Conesa, A., Punt, P. J. and van den Hondel C. A. M. J. J.** (2002). Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J. Biotechnol.* 93: 143-158.
- **Conroy, C. W., Tyma, P., Daum, P. H. and Erman, J. E.** (1978). Oxidation-reduction potential measurements of cytochrome c peroxidase and pH dependent spectral transitions in the ferrous enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 537: 62-69.
- **Davis, B. G.** (2003). Chemical modification of biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 379-386.
- **Dawson, R. M. C., Elliot, D. C., Elliot, W. H. and Jones, K. M.** (1969). Data for biochemical research. Oxford University Press.
- **deRopp, J. S., LaMar, G. N., Wariishi, H. and Gold, M. H.** (1991). NMR study of the active site of resting state and cyanide-inhibited lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Comparison with horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* 266: 15001-15008.
- **DeSantis G. and Jones, J. B.** (1999). Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 324-330.
- **Dinello, R. K. and Dolphin, D. H.** (1981). Substituted hemins as probes for structure-function relationships in horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* 256: 6903-6912.
- **Doyle, W. A., Blodig, W., Veich, N. C., Piontek, K. and Smith, A. T.** (1998). Two substrate interaction sites in lignin peroxidase revealed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry.* 37: 15097-15105.

- **Dunford, H. B.** (1999). Heme Peroxidases. John Wiley and Sons, England.
- **Durant, J. L., Busby, W. F. Jr., Lafleur, A. L., Penman, B. W. and Crespi, C.L.** (1996). Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. *Mutat Res.* 371: 123-157.
- **Farrel, R. L., Murtagh, K. E., Tien, M., Mozuch, M. D. and Kirk, T. K.** (1989). Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isozymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* 11: 322-328.
- **Ferrer, I., Dezotti, M. and Duran, N.** (1991). Decolorization of Kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidases and horseradish peroxidase. *Biotechnol. Lett.* 13: 577-582.
- **Field, J. A., de Jong, E., Feijoo-Costa, G. and de Bont, J. A. M.** (1993). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 11: 42-49.
- **Frausto da Silva J. J. R. and Williams R. J. P.** (1991). The Biological Chemistry of the Elements. Clarendon-Press, Oxford.
- **Furniss, B. S., Hannaford, A. J., Smith, P. W. G. and Tatchell, A. R.** (1989). Vogels Textbook of Practical Organic Chemistry. Quinta edición. Longman Scientific and Technical. Essex, England.
- **Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith A. T. and Poulos T. L.** (1997). Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 4: 1032-1038.
- **García-Arellano, H., Alcalde, M. and Ballesteros, A.** (2004). Use and improvement of microbial redox enzymes for environmental purposes. *Microbial Cell Factories.* 3: 10-12.
- **Gelpke, S. M. D., Lee, J. and Gold, M. H.** (2002). Lignin peroxidase oxidation of veratril alcohol: effects of the mutants H82A, Q222A, W171A, and F267L. *Biochemistry.* 41: 3498-3506.
- **Giardina, P., Palmieri, G., Fontanella, B., Riviaccio, V. and Sannia, G.** (2000). Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Arch. Biochem. Biophys.* 376: 171-179.
- **Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M. and Gold, M. H.** (1983). An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 114: 1077-1083.
- **Glenn, J. K., Akileswaran, L. and Gold, M. H.** (1987). Mn (II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 251: 688-696.
- **Gold, M. H., Kuwahara, M., Chiu, A. A. and Glenn, J. K.** (1983). Biochemical and genetic studies on lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. En: *Recent advances in lignin biodegradation research.* Higuchi, T., Chang, H. M. y Kirk, T. K. (Eds.). Tokio. Uni Publishers. pp 219-232.

- **Gouterman, M.** (1959). Study of the effects of substitution on the absorption spectra of porphyrin. *J. Chem. Phys.* 30: 1139-1161.
- **Hamachi, I. and Shinkai, S.** (1999). Chemical modification of the structures and functions of proteins by the cofactor reconstitution method. *Eur. J. Org. Chem.* 3: 539-549.
- **Hammel, K. E., Kalyaranaman, B. and Kirk, T. K.** (1986). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[*p*]-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* 261: 16948-16952.
- **Hayashi, Y. and Yamazaki, I.** (1979). The oxidation-reduction potentials of compound I/compound II and compound II/ferric couples of horseradish peroxidases A2 and C. *J. Biol. Chem.* 254: 9101-9106.
- **Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M. and Szewzyk, U.** (1998a). Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiol. Lett.* 165: 43-50.
- **Heinfling, A., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., Bergbauer, M., Szewzyk, U. and Martínez, A. T.** (1998b). A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Lett.* 428: 141-146.
- **Johjima, T., Wariishi, H. and Tanaka, H.** (2002). Veratril alcohol binding sites of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 17: 49-57.
- **Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. and Kjeldgaard, M.** (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in those models. *Acta Crystallog. sect. A.* 47:110-119.
- **Kernsten, P. J., Tien, M., Kalyanaraman, B. and Kirk., T. K.** (1985). The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. *J. Biol. Chem.* 260: 2609-2612.
- **Kernsten, P. J., Kalyanaraman, B., Hammel, K. E. and Reinhammar, B.** (1990). Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochem. J.* 268: 475-480.
- **Kuster-van Someren, M., Kishi, K., Lundell, T. and Gold, M. H.** (1995). The manganese binding site of manganese peroxidase: characterization of a Asp179Asn site-directed mutant protein. *Biochemistry.* 34: 10620-10627.
- **Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A. and Gold, M. H.** (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169: 247-250.
- **Lide, D. R.** (2000). Handbook of Chemistry and Physics. CRC Press. LLC. Boca Ratón, Florida.
- **Lippard, S. J. and Berg, J. M.** (1994). Principles of Bioinorganic Chemistry. Mill Valley: University Science Books.
- **Lombardi, A., Nastri, F. and Pavone, V.** (2001). Peptide-based heme-protein models. *Chem. Rev.* 101: 3165-3189.

- **Majcherczyk, A., Johannes, C. and Hüttermann, A.** (1998). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 22: 335-341.
- **Martínez, M. J., Ruiz-Dueñas, F. J., Guillén, F. and Martínez, A. T.** (1996). Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 237: 424-432.
- **Mastrangelo, G., Fadda, E. and Marzia, V.** (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ. Health Perspect.* 104: 1166-1170.
- **Mathews, J. and Brittain, T.** (1986). Chemical modification of the haem propionate of cytochrome *c*. A reevaluation of the reaction of cytochrome *c* with water-soluble carbodi-imide. *Biochem. J.* 240: 181-187.
- **Mester, T. and Field, J. A.** (1998). Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *J. Biol. Chem.* 273: 15412-15417.
- **Millis, C. D., Cai, D., Stankovich, M. T. and Tien, M.** (1989). Oxidation-reduction potentials and ionization states of extracellular peroxidases from the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry.* 28: 8484-8489.
- **Modi, S., Primrose, W. U., Lian, L. Y. and Roberts, G. C. K.** (1995). Effect of replacement of ferriprotoporphyrin IX in the haem domain of cytochrome *P-450* BM-3 on the substrate binding and catalytic activity. *Biochem. J.* 310: 939-943.
- **Moreira, P., Duez, C., Dehareng, D., Antunes, A., Almeida-Vara, E., Frère, J. M., Malcata, F. X. and Duarte, J. C.** (2005). Molecular characterization of a versatile peroxidase from a *Bjerkandera* strain. *J. Biotechnol.* 118: 339-352.
- **Palma C., Martínez, A. T., Lema, J. M. and Martínez, M. J.** (2000). Different fungal manganese-oxidizing peroxidases: a comparison between *Bjerkandera sp.* and *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* 77: 235-245.
- **Pease, E. and Tien, M.** (1992). Heterogeneity and regulation of manganese peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 174: 3532-3540.
- **Pérez-Boada, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martínez, M. J., Piontek, K. and Martínez, A. T.** (2005). Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *J. Mol. Biol.* 354: 385-402.
- **Piontek, K., Glumoff, T. and Winterhalter, K.** (1993). Low pH crystal structure of glycosylated lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å resolution. *FEBS Lett.* 315: 119-124.
- **Pointing, S. B.** (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 20-33.
- **Poulos, T. L. and Kraut, J.** (1980). The stereochemistry of peroxidase catalysis. *J. Biol. Chem.* 255: 8199-8205.

- **Poulos, T. L., Edwards, S. L., Wariishi, H. and Gold, M. H.** (1993). Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *J. Biol. Chem.* 268: 4429-4440.
- **Poulos, T. L., Freer, S. T., Alden, R. A., Edwards, S. L., Skogland, U., Takio, K., Eriksson, B., Xuong, N., Yonetani, T. and Kraut, J.** (1980). The crystal structure of cytochrome *c* peroxidase. *J. Biol. Chem.* 255: 575-580.
- **Poulos, T. L., Patterson, W. R. and Sundaramoorthy, M.** (1995). The crystal structure of ascorbate and manganese peroxidases: the role of non-haem metal in the catalytic mechanism. *Biochem. Soc. Trans.* 23: 228-232.
- **Reading, N. S. and Aust S. D.** (1998). Effect of modified hemes on the spectral properties and activity of manganese peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* 359: 291-296.
- **Regalado, C., García-Almendárez, B. E. and Duarte-Vázquez, M. A.** (2004). Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem. Rev.* 3: 243-256.
- **Reguera, E., Blamaseda, J., Fernández-Beltrán, J., Paneque, A. and Madeira, H. Y.** (2004). Complex formation of ferric protoporphyrin IX from the reaction of hemin with ammonia and small aliphatic amines. *Transition. Met. Chem.* 29: 451-456.
- **Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J. and Martínez, A. T.** (1999). Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol. Microbiol.* 31: 223-235.
- **Ryabov, A., Goral, V., Gorton, L. and Csöregi E.** (1999). Electrochemically and catalytically active reconstituted horseradish peroxidase with ferrocene-modified hemin and an artificial binding site. *Chem. Eur. J.* 5: 961-967.
- **Shiro, Y., Kurono, M. and Morishima, I.** (1986). Presence of endogenous calcium ion and its functional and structural regulation in horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* 261: 9382-9390.
- **Shoemaker, H. E. and Leisola, M. S. A.** (1990). Degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* 13: 101-109.
- **Singh, U. P., Obayashi, E., Takahashi, S., Iizuka, T., Shoun, H. and Shiro, Y.** (1998). The effects of heme modification on reactivity, ligand binding properties and iron-coordination structures of cytochrome *P450nor*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1384: 103-111.
- **Sivaraja, M., Goodin, D. B., Smith, M. and Hoffman, B. M.** (1989). Identification by ENDOR of Trp191 as the free-radical site in cytochrome *c* peroxidase compound ES. *Science.* 245: 738-740.
- **Smith, A. T. and Veitch, N. C.** (1998). Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Curr. Opin. Biol. Chem.* 2: 269-278.
- **Smulevich, G.** (1998). Understanding the heme cavity structure of peroxidases: comparison of electronic absorption of electronic absorption and resonance Raman spectra with crystallographic results. *Biospectroscopy.* 4:S3.
- **Smulevich, G., Neri, F., Marzocchi, M. P. and Welinder, K. G.** (1996). Versatility of heme coordination demonstrated in a fungal peroxidase. Absorption and resonance Raman

- studies of *Coprinus cinereus* peroxidase and the Asp245→Asn mutant at various pH values. *Biochemistry*. 35: 10576-10585.
- **Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M. H., and Poulos, T. L.** (1994). The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 269: 32759-32767.
 - **Sundaramoorthy, M., Turner, J. and Poulos, T. L.** (1995). The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Structure*. 3: 1367-1377.
 - **Takahashi, K., Matsushima A., Saito, Y. and Inada, Y.** (1986). Polyethylene glycol-modified hemin having peroxidase activity in organic solvents. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 138: 283-288.
 - **ten Have R. and Teunissen, P. J. M.** (2001). Oxidative mechanism involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chem. Rev.* 101: 3397-3413.
 - **Tien, M. and Kirk, T. K.** (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* 161: 238-248.
 - **Tinoco, R. and Vazquez-Duhalt, R.** (1998). Chemical modification of cytochrome c improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Enzyme Microb. Technol.* 22: 8-12.
 - **Townend, J.** (2002). Practical Statistics for Environmental and Biological Scientists. John Wiley and Sons, West Sussex, England.
 - **Torres, E.** (2000). Modificación química *ex-situ* e *in-situ* del grupo hemo de la cloroperoxidasa del hongo *Caldaromyces fumago* y de la hemoglobina humana. *Tesis Doctoral*. Universidad Nacional Autónoma de México.
 - **Torres, E. and Vazquez-Duhalt, R.** (2000). Chemical modification of hemoglobin improves biocatalytic oxidation of PAHs. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 273: 820-823.
 - **Torres, E., Baeza, A. and Vazquez-Duhalt, R.** (2002). Chemical modification of heme group improves hemoglobin affinity for hydrophobic substrates in organic media. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 19-20: 437-441.
 - **Torres, E., Bustos-Jaimes, I. and Le Borgne, S.** (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Catal. B: Environ.* 46: 1-15.
 - **Valderrama, B., Ayala, M. and Vazquez-Duhalt, R.** (2002). Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chem. Biol.* 9: 555-565.
 - **Vazquez-Duhalt, R.** (1998). Hemoproteins as biocatalyst for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. En *Advances in Bioprocess Engineering II*. Galindo, E. y Ramírez, O. T. (Eds.) Kluwer Academic Publishers. pp. 183-207.
 - **Vazquez-Duhalt, R.** (2002). Termodinámica biológica. AGT editor, S. A. México.

- **Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D. W. S. and Fedorak, P. M.** (1994). Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 459-466.
- **Wang, Y., Vazquez-Duhalt, R. and Pickard, M. A.** (2002). Purification, characterization and chemical modification of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258. *Curr. Microbiol.* 45: 77-87.
- **Wang, Y., Vazquez-Duhalt, R. and Pickard, M. A.** (2003). Manganese-lignin peroxidase hybrid from *Bjerkandera adusta* oxidizes polycyclic aromatic hydrocarbons more actively in the absence of manganese. *Can. J. Microbiol.* 49: 675-682.
- **Wariishi, H., Akileswaran, L. and Gold, M. H.** (1988). Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry.* 27: 5365-5370.
- **Wariishi, H., Huang, J., Dunford, H. B. and Gold, M. H.** (1991). Reactions of lignin peroxidase compounds I and II with veratryl alcohol. Transient-state kinetic characterization. *J. Biol. Chem.* 266: 20694-20699.
- **Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H.** (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 267: 23688-23695.
- **Watanabe, Y.** (2002). Construction of heme enzymes: four approaches. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 208-216.
- **Welinder, K. G.** (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Biol.* 2: 388-393.
- **Whitwam, R. E., Brown, K. R., Musick, M., Natan, M. J. and Tien, M.** (1997). Mutagenesis of the Mn²⁺ binding site of manganese peroxidase affects oxidation of Mn²⁺ by both compound I and compound II. *Biochemistry.* 36: 9766-9773.
- **Wijsekera T. P. and Dolphin D.** (1994). Synthetic aspects of porphyrin and metaloporphyrin chemistry. En *Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations*. Sheldon, R. A. (Ed.). Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 193-231.
- **Yamada, H., Makino, R. and Yamazaki, I.** (1975). Effects of 2,4-substituents of deuteroheme upon redox potentials of horseradish peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* 169: 344-353.
- **Yonetani, T.** (1967). Studies on cytochrome *c* peroxidase: X. Crystalline apo- and reconstituted holoenzymes. *J. Biol. Chem.* 242: 5008-5013.
- **Yonetani, T. and Asakura, T.** (1968). Studies on cytochrome *c* peroxidase: XII. Crystalline synthetic enzymes containing unnatural heme prosthetic groups. *J. Biol. Chem.* 243: 4715-4721.
- **Yonetani, T. and Asakura, T.** (1969). Studies on cytochrome *c* peroxidase: XIV. Recombination of apoenzyme with protoheme dialkyl esters and etioheme. *J. Biol. Chem.* 244: 4573-4579.