

Peroxidasa de Nabo un Modelo de Estudio de las Enzimas de Plantas

El estudio de las enzimas es una tarea muy amplia, que requiere las contribuciones de un grupo multidisciplinario, con el fin de estudiar mecanismos de catálisis, biofísica de macromoléculas, ingeniería de proteínas, bioinformática, simulación *in silico*, biología molecular y actualmente nanotecnología. Esta forma de abordar el estudio de las enzimas nos fue inculcado por el recientemente fallecido (en el mes de septiembre de este año) Dr. John R. Whitaker quien fue miembro correspondiente de la Academia Mexicana de Ciencias, debido a su trayectoria de calidad mundial en el estudio de las enzimas en alimentos. El Dr. Whitaker recibió dos cátedras patrimoniales para estancias en el Grupo de Biotecnología, del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Facultad de Química de la UAQ, además de impartir por 14 años el curso de Proteínas y Enzimas en el DIPA. Su conducta profesional fue una inspiración para sus estudiantes, y colegas entre los cuales fuimos distinguidos con sus enseñanzas y su experiencia, siendo su filosofía "Trabaja lo mejor que puedas y marca la diferencia; sirve a tu prójimo, sé humilde dando crédito cuando sea necesario". Su capacidad de innovación, generosidad y su gran sentido de amistad con todos sus colegas y colaboradores, entre los cuales nos encontramos, fueron siempre su sello distintivo.

Las peroxidasas (E.C. 1.11.1.7) son oxidoreductasas que catalizan la reacción entre peróxido de hidrógeno y varios compuestos reductores y la mayoría contienen Fe(III) protoporfirina IX como grupo prostético. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y se han identificado en plantas microorganismos y animales. En plantas participan en procesos de lignificación y el mecanismo de defensa en tejidos dañados físicamente o infectados. En la industria de alimentos constituye un indicador de escaldado de vegetales debido a su relativamente alta estabilidad térmica. La peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana*) es la más abundante comercialmente y se ha utilizado para síntesis orgánica, análisis enzimáticos acoplados, ensayos de quimioluminiscencia y terapia de cáncer. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que las peroxidasas de nabo (*Brassica napus*) pueden tener propiedades similares o mejoradas, ya que hemos aislado peroxidasas neutras, ácidas y básicas de esta fuente que es abundante en México. Por otro lado, hemos caracterizado las propiedades cinéticas, térmicas, termodinámicas y estructurales de dichas isoenzimas

La descontaminación de aguas residuales conteniendo compuestos fenólicos se ha realizado usando una isoforma ácida para la descontaminación de compuestos fenólicos presentes en aguas residuales de la industria petrolera y de pinturas, tales como fenol, 2-clorofenol, 3-clorofenol y 2,4-diclorofenol. Para mejorar la eficiencia de esta enzima se decidió modificarla químicamente utilizando metoxi-polietilén glicol que proporcionó una mayor estabilidad enzimática y una actividad que fue 2.5 veces mayor que su contraparte

nativa, probablemente debido a una mejor accesibilidad del sustrato cerca del sitio activo, que involucra al grupo hemo; además presentó una disminución en la carga neta positiva de la proteína que condujo a una menor repulsión electrostática y por tanto un efecto de estabilización. La peroxidasa modificada también presentó una mejor estabilidad térmica y una buena tolerancia a compuestos orgánicos como dimetilformamida (25%), metanol (40%), y dioxano (20%).

Se decidió utilizar la peroxidasa nativa inmovilizada en esferas de alginato, poniendo en contacto las esferas en un reactor con compuestos fenólicos. Se obtuvo una eficiencia de remoción $\geq 65\%$ durante 15 ciclos. Posteriormente, se decidió inmovilizar en las esferas de alginato la peroxidasa modificada químicamente, en donde se repitieron ciclos de contacto con compuestos fenólicos, siendo capaz la enzima de remover $>90\%$ de los fenoles después de 11 ciclos de reacción, mientras que una eficiencia $\geq 65\%$ se obtuvo luego de 17 ciclos de remoción. La modificación de la enzima permitió un reuso extendido para la transformación de una solución de fenoles de elevada concentración. La reducción eficiente de contaminantes industriales tales como los compuestos fenólicos puede ayudar a evitar una posible acumulación en la cadena alimenticia. Resultados de pruebas toxicológicas indicaron una significativa pérdida de toxicidad después de la polimerización de los compuestos fenólicos de las mezclas sintéticas empleadas en estos estudios.

Los métodos de purificación clásicos de proteínas involucran procesos tediosos y lentos, con bajos rendimientos, además de la difícil tarea de separar las isoenzimas. Métodos moleculares como la clonación pueden ayudar a la búsqueda de peroxidases que muestren buenas propiedades catalíticas, como la isoenzima ácida de la peroxidasa del nabo. La capacidad de esta enzima para remover concentraciones relativamente altas de compuestos fenólicos tanto en agua sintética como residuos industriales, la hace una buena candidata. Existen pocos estudios sobre la expresión de peroxidasa de nabo recombinante, mientras que cantidades significativas de esta enzima pudieran ser prometedoras en la búsqueda de peroxidases novedosas y más económicas. La expresión de proteínas eucarióticas en *E. coli* no siempre es sencilla debido a que los codones eucariotes ocurren de manera poco frecuente en *E. coli*. Otro detalle relevante consiste en que la peroxidasa de nabo tiene alrededor de 9% de glucosilación y se sabe que la expresión bacteriana no es capaz de glucosilar proteínas recombinantes. No obstante, en un trabajo previo nuestro grupo publicó que aún estando parcialmente desglucosilada (88%) se retuvo 40% de la actividad, sin tenerse efectos en la conformación estructural. Por otro lado, hemos previamente aislado, secuenciado y clonado un cDNA de peroxidasa ácida del nabo. Por tanto, nos propusimos lograr una expresión heteróloga de esta peroxidasa, ligando el gen en el vector pET 28(+) el cual se usó para transformar *E. coli* Rosetta 2. La peroxidasa recombinante se sobre-expresó exitosamente siendo el primer estudio reportado en nuestro país y uno de los poco a nivel internacional, utilizando tanto el análogo de lactosa isopropilo- β -D-tiogalactopiranosido, así como la propia lactosa con el fin de disminuir los costos de la sobre-expresión. La enzima recombinante se purificó en una sola etapa a 98% de pureza con un rendimiento de 36 mg/L

EDITORIAL

de cultivo. Esto es solo el principio para las posibles aplicaciones biotecnológicas de la enzima recombinante, que pueden desarrollarse en el área de inmunodetección, inmunohistoquímica, bio- y nano sensores.

Dr. Carlos Regalado González

DIPA, PROPAC, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, C.U., Cerro de las Campanas s/n Querétaro, 76010, Qro. Email: regcarlos@gmail.com