



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**PURIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE UNA
PEROXIDASA DE ZANAHORIA**

Alumna: Carmen María Solís Molero

Julio, 2019.



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
GRADO EN QUÍMICA
TRABAJO DE FIN DE GRADO

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PEROXIDASA DE RÁBANO

Carmen María Solís Molero

Julio, 2019.

ÍNDICE

• 1. RESUMEN.....	4
1.1 ABSTRACT.....	4
• 2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1 CLASIFICACIÓN.....	5
2.2 PEROXIDASA DE RÁBANO (HORSERADISH PEROXIDASE)	7
2.3 APLICACIONES.....	9
2.4 MECANISMO CATALÍTICO.....	12
2.5 JUSTIFICACIÓN.....	13
• 3. OBJETIVOS.....	15
• 4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1 MATERIALES.....	16
4.2 HOMOGENIZACIÓN DE RAÍCES DE ZANAHORIA PARA FABRICAR EL EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS (ELC)	16
4.3 PRECIPITACIÓN PROTÉICA CON SULFATO AMÓNICO...	17
4.4 CROMATOGRAFÍA HIDROFÓBICA.....	17
4.5 DESALACIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS MUESTRAS.....	18
4.6 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS.....	18
4.7 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	18
4.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA (POD)	19
• 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
• 6. CONCLUSIÓN.....	31
• 7. BIBLIOGRAFÍA.....	32

1. RESUMEN

Las enzimas peroxidadas (POD) son una gran importante fuente de ingresos, debido a la cantidad de diferentes aplicaciones que se puede atribuir a esta.

Está siendo una gran revolución biotecnológica para nuestro país.

Se podría decir que este tipo de purificación de la POD a través de Zanahoria fuese necesaria, porque se necesita utilizar métodos menos costosos y menos laboriosos, para sacar características similares a la peroxidasa de rabano picante, *Horseradish Peroxidase* (HRP), como por ejemplo la actividad. Aunque la actividad de la zanahoria común, *Daucus Carota*, es más baja que la de HRP, pero podrían ser similares.

Este uso alternativo de una enzima peroxidasa de la clase III, de plantas vegetales, puede suponer un gran avance significativo con el fin de obtener un producto más barato y eficiente.

Palabras Clave: Horseradish Peroxidase (HRP), *Daucus Carota*, Peroxidasa (POD).

1.1. Abstract

Peroxidase enzymes (POD) are a great source of income, due to the amount of different applications that can be attributed to it.

It is being a great biotechnological revolution for our country.

It could be said that this type of purification of carrot POD was necessary, because you need to use less expensive methods and less laborious to get similar characteristics to *horseradish peroxidase* (HRP), as for example the activity. Although the activity of the common carrot, *Daucus Carota*, is lower than HRP, but they could be similar.

This alternative use of a peroxidase enzyme of class III, of plant plants, can be a significant breakthrough in order to obtain a cheaper and more efficient product.

Keywords: *Horseradish Peroxidase (HRP)*, *Daucus Carota*, Peroxidase (POD).

2. INTRODUCCIÓN

Las peroxidasas (EC.1.11.1.X) forman parte del grupo principal de enzimas denominadas oxidoreductasas y eliminan peróxidos utilizando una variedad de sustratos reductores (Zakharova et al, 2011).



Las peroxidasas han sido ampliamente utilizadas como componentes de reactivos utilizados en los diagnósticos clínicos y otros usos de interés industrial. A las peroxidasas se le atribuyen además de la destoxificación de especies reactivas de oxígeno otros papeles fisiológicos como el metabolismo del ácido indol-3-acético, la lignificación, la reticulación de polímeros de la pared celular, resistencia a las infecciones, entre otros (Lavery et al,2010).

2.1. Clasificación

Según la NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) se distinguen los siguientes tipos de peroxidasas que se recogen en la **tabla 1**. Por otro lado, otro criterio de clasificación distingue dos superfamilias de peroxidasas: las peroxidasas animales y las peroxidasas vegetales (Welinder K G, 1992). Centrándonos en la superfamilia de las Peroxidasas vegetales se distinguen tres clases dependiendo de su estructura primaria (Welinder K G, 1992), que son:

- **Clase I:** constituyen un grupo de peroxidasas intracelulares, tales como la citocromo c peroxidasa (CCP), la catalasa peroxidasa y la ascorbato peroxidasa, entre otras.

- **Clase II:** peroxidasas fúngicas como la lignina peroxidasa (PCL), la magnesio peroxidasa (PCM) y la peroxidasa coprinus cinereus (CIP).
- **Clase III:** son las peroxidasas de plantas extracelulares, tales como la peroxidasa de cebada (BP 1) y la peroxidasa de trigo (WP 1) y la peroxidasa de rábano (HRP), cuya purificación y caracterización de su homóloga en zanahoria es el objeto de este estudio.

Tabla 1: Tipos de peroxidasas según (NC-IUBMB)

EC 1.11.1.1	NADH peroxidasa
EC 1.11.1.2	NADPH peroxidasa
EC 1.11.1.3	Ácido graso peroxidasa
EC 1.11.1.5	Citocromo C peroxidasa
EC 1.11.1.6	Catalasa
EC 1.11.1.7	Peroxidasa
EC 1.11.1.8	Yoduro peroxidasa
EC 1.11.1.9	Glutación peroxidasa
EC 1.11.1.10	Cloruro peroxidasa
EC 1.11.1.11	L-ascorbatoperoxidasa
EC 1.11.1.12	Fosfolípidos hidroperóxidos glutación peroxidasa
EC 1.11.1.13	Magnesio peroxidasa
EC 1.11.1.14	Lignina peroxidasa
EC 1.11.1.15	Peroxirredoxina
EC 1.11.1.16	Peroxidasas versátiles
EC 1.11.1.17	Glutación dependiente de amida peroxidasa
EC 1.11.1.18	Bromuro peroxidasa
EC 1.11.1.19	Colorante decolorante peroxidasa
EC 1.11.1.21	Catalasa peroxidasa

2.2. Peroxidasa de rábano (*HorseradishPeroxidase*, HRP)

La peroxidasa de rábano (*HorsereadishPeroxidase*, HRP) (EC 1.11.1.7) se clasifica en la clase III de la superfamilia de peroxidases vegetales. Son glicoproteínas monoméricas que contienen un grupo hemo y un peso molecular de 40-45 KDa. Su secuencia de residuos de aminoácidos se muestra en la **Figura 1**. El residuo N-terminal está bloqueado por piroglutamato y el C-terminal es heterogéneo, por tanto, algunas moléculas carecen de residuo terminal Ser308. Existen cuatro puentes disulfuro entre los residuos de cisteína 11-91, 44-49, 97-301 y 177-209, y un puente salino entre Asp99 y Arg123 (Veitch N C, 2004).

```
MQLTPTFYDNSCPNVSNIIVRDTIVNELRSDPRIAASILRLHFHDCFVNGCDASILLDNTTSFRTEKDAFG  
NANSARGFFVIDRMKAAVESACPRTVSCADLLTIAAQQSVTLAGGPSWRVPLGRRDSLQAFDLANANLP  
APFFTLPLQKDSFRNVGLNRSDDLVALSGGHTFGKNQCRFIMDRLYNFSNTGLPDPTLNTTYLQTLRGLC  
PLNGNLSALVDFDLRTPTI FDNKYVNL EEQKGLIQSDQELFSSPNATDTI PLVRSFANSTQTFNAFVE  
AMDRMGNITPLTGTQGQIRLNCRVVNSNS
```

Figura 1. Secuencia de residuos de aminoácidos, tomada de la base de datos NCBI (GeneBank N° XXX)

La estructura molecular de HRP se muestra en la **Figura 2**. HPR contiene dos tipos de centros metálicos diferentes: el hierro (III) de la Protoporfirina IX o grupo hemo, y dos átomos de calcio.

El grupo hemo está unido a la enzima por un enlace coordinado entre el ión férrico y la histidina 170 (histidina proximal). El segundo sitio de coordinación axial está desocupado en el estado de reposo de la enzima pero disponible para el peróxido de hidrógeno durante el proceso enzimático. Los dos sitios de unión del calcio se localizan en posiciones distales y proximales al plano hemo y están unidos mediante enlaces de hidrógeno a la región de unión del grupo hemo (Veitch N C, 2004).

Los dos iones de Ca^{2+} junto al grupo hemo son esenciales para la catálisis y el mantenimiento de las características estructurales de la enzima necesaria para su actividad catalítica. En presencia de Ca^{2+} , la energía libre es mayor que en ausencia del ion Ca^{2+} (Laberge et al, 2003).

La pérdida del calcio resulta en una disminución tanto en la actividad enzimática como en la estabilidad térmica (Haschke et al, 1978), así como cambios en el entorno del grupo hemodetectables por espectroscopía (Howes et al, 2001).

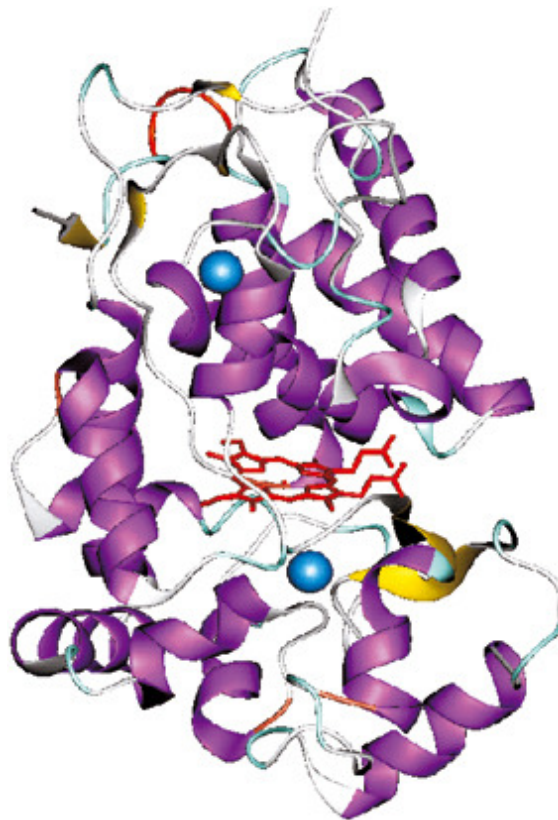


Figura 2. Estructura HRP (*Horseradish Peroxidase*), determinada mediante cristalografía de Rayos-X. El grupo hemo (en color rojo) está situado en los dominios distal y proximal que contiene cada uno un átomo de calcio (representado en color rojo). En violeta está representadas las α -hélices y en amarillo las láminas β .

2.3. Aplicaciones.

Las peroxidasas son importantes desde el punto de vista de sus aplicaciones industriales en virtud de su capacidad para catalizar la reacción de oxidación-reducción de una amplia cantidad de sustratos fenólicos y no fenólicos en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se han reportado varias aplicaciones de Peroxidasas industriales en sectores agrícolas, analíticos, ambiental, médicos (Pandey et al, 2017).

Se van a describir algunas de las diferentes aplicaciones que existen de estas generalmente:

- **Aplicaciones como Biosensor:** tienen una gran importancia en la medicina, control de calidad, alimentación, monitoreo ambiental e investigación. La peroxidasa de rábano (HRP) se ha usado ampliamente en el desarrollo de estos. Además de esta, otras peroxidasas también han sido exploradas para estas aplicaciones como la de batata, el tabaco, la soja (Pandey et al, 2017).
- **Aplicaciones en kits analíticos y de diagnóstico:** entre peroxidasas, HRP son más comúnmente para propósitos analíticos. Otras plantas peroxidasas tienen una amplia estabilidad del pH y temperatura, son emergidas como opción para HRP. Se han detectado kits de detección de ácido úrico utilizando peroxidasas de raíz en rotación. También se han utilizado en el desarrollo de kits para el diagnóstico de cánceres de vejiga y próstatas mediante la detección de 8-hidroxidooxiguanosina y sus análogos en la orina (Pandey et al, 2017).
- **Aplicación en decoloración de tintes industriales:** se utilizan ampliamente para la impresión en papel, fotografía en color y como aditivo en productos petrolíferos. Compuestos aromáticos sintéticos tienen estructuras complejas, biológicamente no degradable y causando problemas medioambientales. Para la degradación de estos tintes

sintéticos industriales, la oxidación química, la osmosis inversa y la adsorción son altamente eficientes (Pandey et al, 2017).

- **Aplicaciones analíticas:** inmunoensayos basados en HRP para la detección de proteínas lácteas no decloradas en alimentos (Pandey et al, 2017).
- **Aplicación en síntesis de polímeros orgánicos e injertos:** las peroxidasas han sido usadas en el desarrollo de resinas híbridas de fuentes renovables para remplazar al fenol formaldehído basado en resinas que son extensamente usadas en fuentes de revestimiento, adhesivas, laminadas, moldura, materiales de fricción (Pandey et al, 2017).

Se van a desarrollar específicamente las aplicaciones más importantes que puede tener esta enzima (HRP):

- **Aplicaciones en análisis colorimétricos de materiales biológicos:** consiste en isoenzimas que son localizadas en varios compartimentos celulares (Uozumi N et al, 1992).
- **Aplicación como Biosensor:** se fabrican aplicando varios métodos de detección que incluyen un inmunosensor amperométrico, balance de masas, métodos potenciométricos, espectroscopia fotovoltáica o métodos quimiluminiscencia (Pandey et al, 2017).

Los biosensores de base potenciométrica se desarrollan mediante la combinación de una enzima (peroxidasa) y un transductor que puede detectar la variación de protones.

Biosensores en HRP para el control de antioxidantes se han aplicado en la detección del radical superóxido, óxido nítrico, glutatión, ácido úrico y compuestos fenólicos (Pandey et al, 2017).

- **Tratamiento contra el cáncer:** están siendo evaluados como agentes, la combinación de HRP con indol-3-acético o derivados en terapias contra el cáncer. (Veitch N C, 2004).

- **Aplicaciones de reactores enzimáticas para la degradación de vertidos:**
 - Eliminación peróxido de compuestos orgánicos (Hamid M & Rehman K U, 2009).
 - Tratamiento de aguas residuales contaminadas con compuestos fenólicos (Dalal S & Gupta M N, 2007).

- **Aplicaciones industriales:** en detergentes, tintes para el cabello o tintes sintéticos, decoloración de la ropa.

Las HRP tienen un gran interés biotecnológico en el S.XXI, ya que es un buen sustituto de catalizadores químicos tóxicos de uso industrial y tiene una infinidad de aplicaciones en diferentes sectores.

Es una enzima versátil aplicada en la industrias químicas, ambiental, farmacéutica y biotecnológica. Se sabe que es eficaz en la eliminación de un amplio espectro de compuestos aromáticos (fenoles, biofenoles, anilinas) in presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y en la degradación y precipitación de importantes industrias de tintes (Ulson de Souza S.M.A.G. & Ulson de Souza E.F.A.A, 2007).

2.4. Mecanismo Catalítico.

La Peroxidasa de Rábano (POD) puede ejercer dos posibles ciclos catalíticos, peroxidativo e hidrolítico, siendo una enzima multifuncional. La regularización de su activación y expresión se debe a los estímulos internos y externos.

Para esta reacción catalítica hay que usar peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones para realizar la oxidación de compuestos. La reacción de la POD se realiza en dos pasos viéndose en la **Figura 3**. Los PODs presentan un ligando de imidazol axial, un grupo hemo cargado en ambiente polar que facilita la ruptura del enlace de oxígeno del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este mantiene un contacto con el grupo hemo al que se une (Dawson JH, 1988).

La estructura que tiene del metal junto con la estructura tridimensional de la proteína descrita anteriormente ayuda a la función catalítica formalizada por el grupo hemo, proporcionando un ambiente catalítico idóneo para reacciones de transferencia de electrones (Valle B L & William J P, 1967).

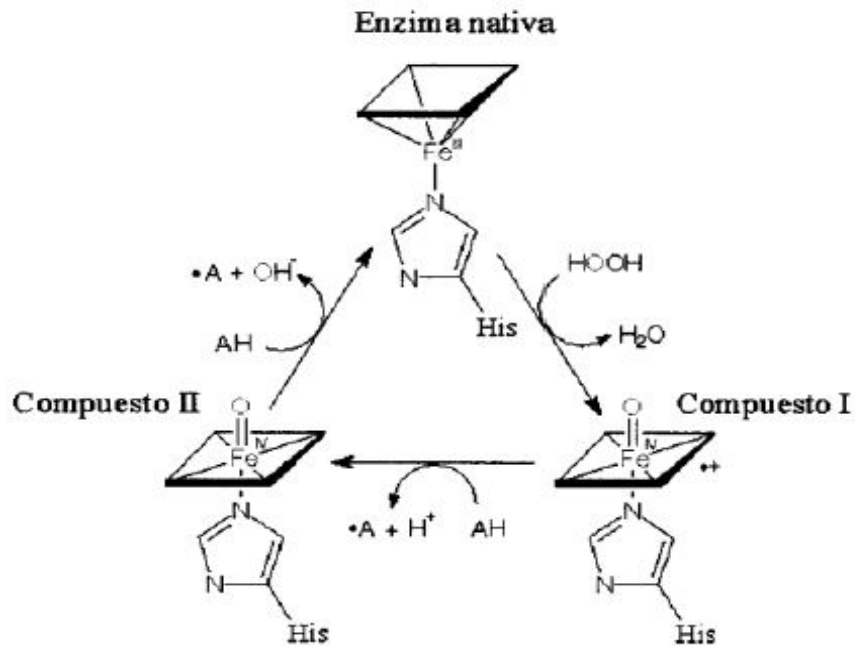


Figura 3. Reacción de oxidación-reducción catalizada por la POD (Dawson JH, 1988).

Primero la enzima reacciona con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para dar el compuesto I, el cual es capaz de oxidar a un sustrato mediante transferencia electrónica. Aquí el peróxido de hidrógeno se reduce a agua (H_2O) y la enzima se oxida. Este compuesto I tiene una gran capacidad para oxidar mediante reacciones de transferencia electrónica y se tiene que la enzima se presenta como compuesto II con el centro de $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ y el grupo hemo recupera un electrón del sustrato, y deja un radical libre en él (Dawson JH, 1988).

El compuesto I, se llama ahora compuesto II, la enzima recuperará su estado principal cuando el $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ del compuesto II recupere su electrón y pase a Fe^{3+} (estado férrico).

El peróxido de hidrógeno puede hacer que el compuesto II no pase a su estado inicial si no que experimente un estado de oxidación distinto y forme otro compuesto diferente, el cual podemos llamar compuesto III $\text{Fe}^{3+}\text{O}^{2-}$, produciendo así la inactivación de la enzima y pérdida del grupo hemo de esta (Wariishi H & Gold MH, 1990).

2.5. Justificación.

Existen diferentes empresas en todo el mundo que se encargan de fabricar enzimas peroxidasa (POD). Tiene un gran uso comercial en todo el mundo y venden millones de unidades de esta al año.

Esta enzima y los métodos de extracción necesarios son muy costosos y tienen muy bajo rendimiento. Esta peroxidasa (POD) tiene un gran problema ya que solventa el alto coste la purificación de HRP.

Se está investigando la determinación de otro método eficiente de purificación que utilice otros tipos de PODs que sean de bajo coste, y que su purificación no tenga un coste tan elevado como las HRP. Esto supone que estén disponibles mejores técnicas, para que se pueda producir un producto más barato y tenga mejor rendimiento.

Aquí se ha estudiado una enzima POD con características parecidas a HRP, pero con diferentes características de purificación. Se ha propuesto el estudio a través de una planta comestible, con bajo coste, que se puede obtener de cualquier supermercado, ya que esta existe en plantaciones de todo el planeta.

Estas enzimas PODs comestibles se encuentran en la Clase III de las Peroxidasas (Welinder, K.G., 1992).

Aquí se propuso la Zanahoria Común, *Daucus Carota*, con características semejantes a las HRP (Horseradish Peroxidase). Utilizando esta materia prima se ahorrará en el coste del estudio.

Este estudio se ha basado en un artículo descrito anteriormente de la purificación de la peroxidasa de rábano descrito por *Lavery et al, 2010*. La parte experimental es muy semejante al artículo ya que se han ido siguiendo los diferentes experimentos que se describen en este. La única diferencia que existe es que se uso zanahoria común, cuando en el artículo se utiliza la auténtica enzima HRP. Y esta tiene una actividad superior a la de la zanahoria común.

Esta POD puede soportar grandes cambios de temperatura, incluido la resistencia a la congelación, no cambia sus características cinéticas. Es decir, está en altas concentraciones en las plantas vegetales y tiene alta resistencia a la temperatura (Gonçalves E.M., et al, 2010).

En general, esta purificación de la Zanahoria Común, *Daucus Carota*, podría permitir el uso de técnicas menos complicadas, que sean más rápidas, y que se pueda obtener un producto de mayor calidad.

3. OBEJTIVOS

El objetivo de este estudio es obtener un método de purificación eficiente para poder producir una POD de mayor o igual concentración como la que podemos encontrar en la HRP picante (Horseradish Peroxidase), intentando que tenga características de uso experimental similar pero con un bajo coste de ellas para su futura comercialización.

En general, esta purificación de la POD a partir de zanahoria común, *Daucus Carota*, podría permitir el uso de técnicas menos complicadas, que sean más rápidas, y que se pueda obtener un producto de mayor calidad.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

La fuente de la enzima fueron raíces de zanahoria, adquiridas en establecimientos comerciales de alimentación.

Productos químicos: Fosfato potásico, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30%, O-dianisidina, dimetilsulfóxido (DMSO), fosfato sódico, persulfato amónico, ácido acético, glicina, metanol, albúmina de suero bovino (BSA), dodecil sulfato sódico (SDS), Trizma, hidróxido potásico, cloruro de sodio, ácido clorhídrico, y el cocktail de inhibidor de proteasa (Ref. P9699) han sido adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich. El sulfato amónico ha sido adquirido de Panreac. La disolución de acrilamida (40%, 19:1) y el tetrametiletilendiamida (TEMED) son de Bio-Rad, y el Commasie Blue R-250 de Amresco. Las resinas cromatográficas Phenyl Sepharose es de GE Healthcare.

4.2. Homogenización y obtención del extracto libre de células (ELC) de raíces de zanahoria.

25,5 gramos de raíces de zanahoria, cortadas en rodajas de 2-3 mm, se congelaron con nitrógeno líquido y se pulverizaron en un mortero. A continuación, se añadieron 100 mL de fosfato potásico 50 mM, pH=7,8, y se trituró con un dispersor Heydolph TYP 10G durante 15 minutos en un baño de agua-hielo para mantener la disolución en frío. Durante la trituración se añadieron 50 µL de un cocktail de inhibidores de proteasas y PSMF a concentración 1mM. El homogenado se filtró por un colador de cocina y se centrifugó a 10.000xg durante 30 minutos. El sobrenadante constituye el extracto libre de células (ELC).

4.3. Precipitación proteica con sulfato amónico

Se añadió sulfato amónico al extracto libre de células hasta un grado de saturación del 40%, según el cálculo proporcionado por un programa bioinformático (<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>) (EncorBiotechnology Inc., Florida). La disolución se mantuvo a 0°C en un baño de agua-hielo y el sulfato amónico fue añadido gradualmente durante unos 20 minutos, aproximadamente.

Posteriormente se centrifugó a 10.0000xg durante 10 minutos y se separaron sobrenadante y precipitado. Para comprobar la distribución de la enzima en el fraccionamiento se midió la actividad peroxidasa del sobrenadante.

Seguidamente, se añadió sulfato amónico al sobrenadante hasta una saturación del 100%, en las mismas condiciones que en el proceso anterior. Se separaron sobrenadante y precipitado por centrifugación y se comprobó la cantidad de enzima presente en el sobrenadante mediante ensayos de actividad peroxidasa.

Al precipitado obtenido del fraccionamiento entre 40-100 % de saturación se le añadieron 10 mL de tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7,5, conteniendo 1,5 M de sulfato amónico. A esta muestra se le denominó FSA (fraccionamiento con sulfato amónico).

4.4. Cromatografía hidrofóbica

La muestra FSA se sometió a cromatografía en fenil-sefarosa, que separa a las proteínas en función de su carácter hidrofóbico. Se fabricó una columna cromatográfica de fenil-sefarosa (20 x 1 cm).equilibrada con tampón fosfato 20 mM, pH 7,5, y 1,5 M de sulfato amónico.

El flujo de la cromatografía se hizo a 1 mL/min, controlado por una bomba peristáltica Gilson. Tras aplicar la muestra se lavó la columna con tampón de equilibrio. A continuación, se hizo pasar por la columna cromatográfica el tampón sin sulfato amónico para eluir las proteínas retenidas en la columna. Durante el proceso

se recolectaron fracciones cada 5 minutos mediante un colector automático (Pharmacia). Las fracciones fueron evaluadas en contenido general de proteína en función de la absorbancia a 280nm y en contenido de enzima peroxidasa en función de su actividad.

4.5. Desalación de proteínas de las muestras

El sulfato amónico a alta concentración en las muestras interfiere en los procesos analíticos de determinación de proteínas y electroforesis. Por eso, para eliminar el sulfato amónico de las muestras se utilizaron columnas de desalación (ProteinDesalting Spin Columns, ThermoScientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.6. Determinación de la concentración de proteína

La cantidad de proteína de las muestras implicadas en la purificación, se determinó mediante el método Bradford, utilizando el reactivo ProteinAssay de Bio-Rad diluido 5 veces, y proteína BSA (albúmina de suero bovino) como patrón de concentración.

4.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para la electroforesis de proteínas se fabricaron geles laminares de poliacrilamida constituidos por una parte inferior (gel separador) formado por 12% de acrilamida, 4,62% p/v de Trizma y 0,1% p/v de SDS (dodecil sulfato sódico) a pH 8,8, y otra parte (gel concentrador) conteniendo 5% de acrilamida, 1,55% p/v de Trizma y 0,1% p/v de SDS a pH 6,8. La reacción de polimerización fue iniciada añadiendo a las disoluciones constituyentes de cada gel 10 μ L de persulfato amónico (PSAM) al 10% p/v y 1 μ L de TEMED por mL de disolución. Los geles se fabricaron en un compartimento laminar estanco formado por dos cristales. Primero se vierte la disolución de gel separador y, tras su polimerización, se añade la

disolución del gel separador hasta rellenar todo el espacio, colocando seguidamente un molde dentado para que se formen los pocillos en los que se alojan las muestras.

La electroforesis se realizó en un equipo Mini-Protean (BioRad) relleno con tampón de electroforesis consistente en 0,69% p/v Trizma, 2,88% p/v glicina y 0,1% p/v SDS. Las muestras se mezclaron con tampón de carga en proporción 3:1 y se incubaron a 100°C durante 5 minutos. El tampón de carga contiene 0,8% p/v de SDS, un determinante aniónico que se adhiere uniformemente a las cadenas peptídicas dotándolas de carga negativa, 400mM de ditioneitol (DTT), un reductor de enlaces disulfuro, glicerol (40% v/v) y azul de bromofenol (0,4% p/v), como colorante que indica la parte más avanzada de la muestra a través del gel.

Se cargaron 10µL de cada muestra en los pocillos y también se aplicó una disolución de proteínas indicadoras de peso molecular (LMW calibration Kit forelectroforesis, GE Healthcare). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 200V durante 45 minutos.

Tras la electroforesis, se tiñeron los geles con una disolución colorante de azul CoomassieR-250 (0,1% p/v) con 10% v/v ácido acético y 40% v/v metanol.

4.8. Determinación de la actividad peroxidasa (POD)

La actividad peroxidasa se determinó mediante espectrofotometría, utilizando un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Spectrophotomer 50 Bio (Varian). Se analizó el producto obtenido de la reacción de oxidación-reducción entre la O-dianisidina y el peróxido de hidrógeno, que absorbe luz a una longitud de onda de 460nm. La reacción es la siguiente:



La disolución de reacción se preparó mezclando en 100 mL de tampón fosfato 50 mM, pH 7,2, una disolución de 0,12g de O-dianisidina en 1 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) en un agitador magnético durante 30 minutos a temperatura

ambiente. Seguidamente se filtra la mezcla con papel de filtro para descartar restos insolubles. Finalmente, se añadió peróxido de hidrógeno a una concentración 0,02 M.

El ensayo de la peroxidasa consistió en añadir una alícuota de 50 μL de muestra a 950 μL de disolución de reacción e inmediatamente analizar el incremento de absorbancia a 460nm durante al menos un minuto. La actividad enzimática (U/mL) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{U/mL} = \mu\text{mol/min} \times \text{mL} = [(\Delta\text{Abs/min}) \times V_1 \times 10^6] / \epsilon \times d \times V_2$$

V_1 : volumen de ensayo (L); V_2 : volumen de muestra (mL); ϵ =coeficiente de extinción molar del producto ($11300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); d: paso de luz (1 cm).

Para la determinación de la sensibilidad a la temperatura de la enzima se incubó la muestra a diferentes temperaturas durante 5 minutos en un termobloque y, seguidamente, se enfrió la muestra en un baño de hielo antes de medir la actividad enzimática.

Para determinar la actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato peróxido de hidrógeno, se preparó una nueva disolución de tampón fosfato 50 mM, pH 7,2, con O-dianisidina pero sin peróxido de hidrógeno. Se prepararon diferentes disoluciones con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno en tampón fosfato. El ensayo enzimático consistió en 900 μL de tampón con dianisidina, 50 μL de muestra y 50 μL de la correspondiente disolución de peróxido de hidrógeno.

Para la determinación de actividad enzimática en función del pH, se prepararon varias disoluciones compuestas de fosfato potásico 50 mM, O-dianisidina saturación y peróxido de hidrógeno 20 mM, ajustadas a diferentes pHs con HCl o NaOH.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen diferentes métodos de extracción de POD, dependiendo de la planta, se tendrá una mejor extracción dependiendo de un método u otro.

Este estudio se hizo a partir de raíces de zanahoria común, *Daucus Carota*. Los ensayos y las técnicas han sido enfocados para la obtención de un producto final eficiente y de calidad.

El proceso de homogenado se llevó a cabo a partir de 25 gramos de raíz de zanahoria fresca en cuatro volúmenes de tampón fosfato 50 mM a pH 7,8.

Se propuso añadir 2mM CaCl₂ al tampón puesto que la enzima peroxidasa de rábano contiene iones Ca²⁺ en su estructura, pero se comprobó que el calcio hace precipitar al fosfato, por lo que se descartó.

Se tuvo en cuenta no incluir compuestos quelantes al tampón, como EDTA, para evitar la pérdida de los iones metálicos necesarios para la actividad de la enzima. Para evitar la degradación proteica debida a la liberación de proteasas de los lisosomas durante la homogenización se añadió una disolución con una mezcla de inhibidores de proteasas así como fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF).

Tras la homogenización y posterior aclarado por centrifugación se obtuvo el denominado extracto libre de células (ELC), que tiene un color anaranjado debido a la presencia de carotenos. ELC es considerada la muestra de partida del proceso de purificación.

Como primer paso de purificación se realizó un fraccionamiento proteico por solubilidad en sulfato amónico.

Al añadir sulfato amónico a una disolución de proteínas, los iones salinos secuestran moléculas de agua de la capa de solvatación que mantienen solubles a las proteínas, ejerciendo que las proteínas se agreguen y se insolubilicen. En una

primera fase, se añadió sulfato amónico al ELC hasta un grado de saturación del 40%.

Tras forzar la precipitación proteica por centrifugación, se comprobó la actividad peroxidasa del sobrenadante remanente. Curiosamente, el sobrenadante al 40% de saturación de sulfato amónico presentaba prácticamente el doble de actividad peroxidasa que el ELC original (**Figura 4**).

No podemos explicar con seguridad a qué puede ser debido este incremento en actividad pero posiblemente hubiera algún componente en el ELC que contrarrestara la actividad de la enzima y fuera excluido con la precipitación. También es posible que la fuerza iónica de la disolución al 40% de sulfato amónico afecte a la estructura de la HRP optimizando su actividad.

Otro efecto que se puso de manifiesto en la primera fase del fraccionamiento es que los pigmentos anaranjados del ELC precipitaron al 40% de saturación. Estos pigmentos suponen un inconveniente para los siguientes procesos de purificación pues quedan adsorbidos a las resinas cromatográficas de manera prácticamente irreversible, deteriorando su efectividad.

Seguidamente, en una segunda fase de fraccionamiento se añadió sulfato amónico al sobrenadante de la primera fase hasta un grado de saturación del 100%. Tras centrifugación, el sobrenadante resultante apenas contenía actividad peroxidasa (**Figura 4**).

El precipitado resultante fue disuelto en tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7,5, conteniendo 1,5 M de sulfato amónico.

La muestra resultante, denominada FSA, contenía prácticamente tanta actividad enzimática como la muestra original (ELC) (**Figura 4**).

La muestra FSA fue sometida a otro paso de purificación mediante cromatografía hidrofóbica.

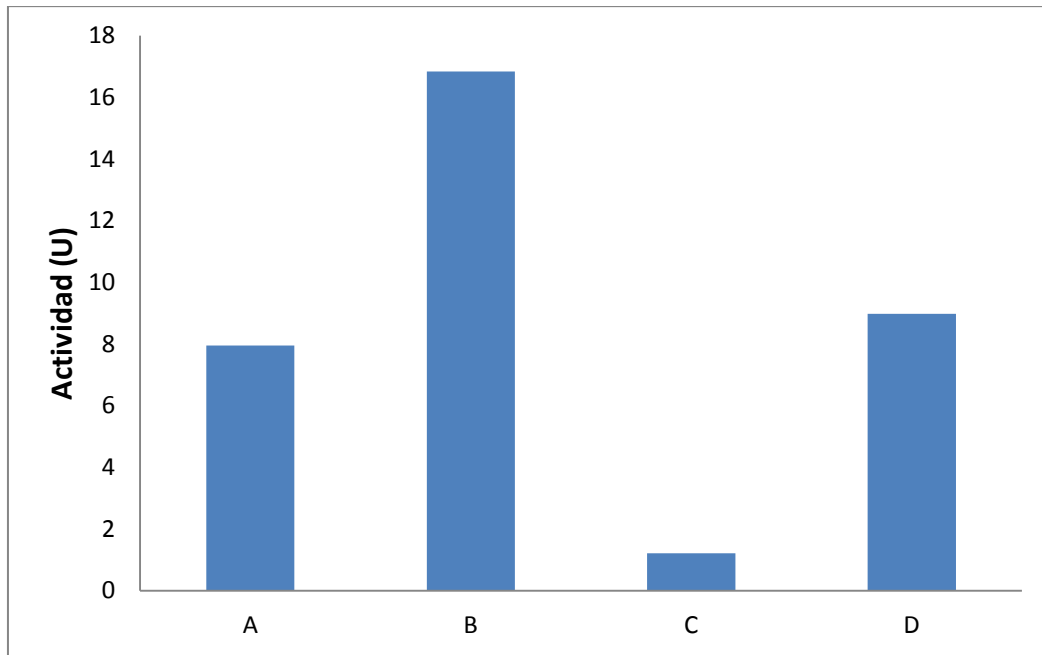


Figura 4. A: Actividad total del ELC; B: Actividad total del sobrenadante tras saturación al 40% de sulfato amónico; C: Actividad total del sobrenadante tras saturación al 100% de sulfato amónico; D: Actividad total de precipitado del fraccionamiento 40-100% de sulfato amónico.

La cromatografía hidrofóbica (CH) separa a las proteínas de una muestra en función de su carácter hidrofóbico superficial. La matriz cromatográfica contiene grupos químicos hidrofóbicos.

Por otra parte, las proteínas incrementan su carácter hidrofóbico al estar disueltas en un medio con alta concentración de sulfato amónico. Por tanto, ciertas proteínas pueden interaccionar y quedar adsorbidas por efecto hidrofóbico a los grupos químicos de la resina en tanto la fase móvil de la cromatografía sea altamente salina.

Si disminuye la concentración de sulfato amónico, las proteínas pierden carácter hidrofóbico superficial y, por tanto, se separan de la matriz cromatográfica y son eluidas con la fase móvil.

La aplicación de la cromatografía hidrofóbica para purificar la peroxidasa de zanahoria ha sido inspirado en un método descrito para la purificación de la peroxidasa de rábano picante (Lavery et al, 2010).

La aplicación de la muestra a una matriz cromatográfica de fenil-sefarosa, equilibrada con una disolución tampón con una concentración de sulfato amónico 1.5 M, y el posterior lavado de la matriz con dicha disolución tampón demostró que la actividad peroxidasa quedó retenida en la columna, pues no se detectó actividad en el *flow-through* (**Figura 5**).

No obstante, al aplicar una fase móvil de tampón sin sulfato amónico, la actividad peroxidasa eluyó en dos picos muy solapados, lo que puede sugerir la existencia de dos isoformas de peroxidasa en la zanahoria (**Figura 5**).

Se recolectaron aquellas fracciones con una actividad significativa de actividad POD, conformando la muestra final de la purificación (CH).

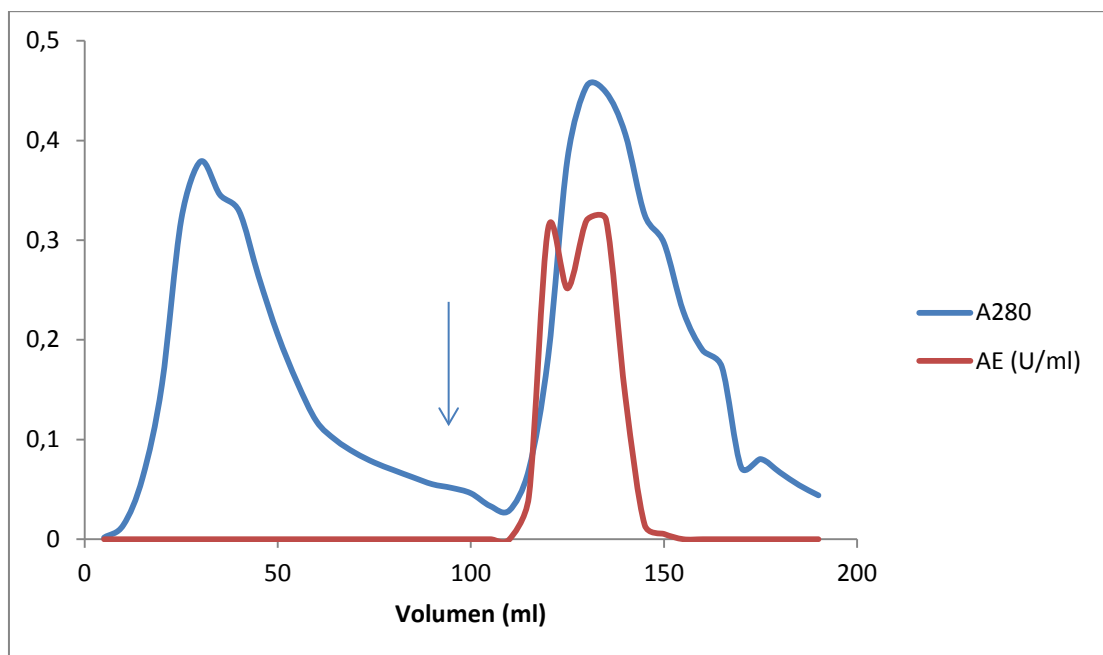


Figura 5. El cromatograma de la cromatografía de hidrofobicidad realizada para la purificación de la peroxidasa de zanahoria. La curva roja corresponde con la actividad POD, la curva azul corresponde a la absorbancia a 280 nm y la flecha indica el cambio de fase móvil.

Las muestras implicadas en el proceso de purificación: ELC, FSA y CH, fueron evaluadas por su contenido global en proteína, mediante el método Bradford, y por su actividad enzimática POD.

Las muestras con un alto contenido en sulfato amónico (FSA y CH) tuvieron que ser desaladas en columnas específicamente diseñadas para este fin, puesto que la alta concentración de sulfato amónico interfiere con el método Bradford así como con el proceso de electroforesis que se detalla a continuación. El balance del proceso de purificación se expone en la **Tabla 2**.

El primer paso de purificación, el fraccionamiento con sulfato amónico, resultó un proceso bastante efectivo en tanto no se apreció una pérdida aparente de actividad con respecto a la muestra inicial a la vez que se consiguió enriquecer en enzima la muestra algo más de tres veces.

Con respecto al segundo paso de purificación, la cromatografía hidrofóbica supuso una pérdida de prácticamente la mitad del contenido de enzima de la muestra precedente, si bien se enriqueció la muestra en enzima casi 2,5 veces. En todo caso, el balance total de la purificación ha supuesto un enriquecimiento de la muestra en enzima POD de casi ocho veces, con un rendimiento superior al 50%.

Tabla 2. Balance de la purificación de la enzima POD de zanahoria. Rendimiento (R): implica el porcentaje de actividad POD total de la muestra con respecto a la muestra inicial (ELC). E: enriquecimiento, número de veces mayor en actividad específica de la muestra con respecto a la muestra inicial.

	Volumen	[Proteína]	Actividad enzimática	Actividad total	Actividad específica	Rendimiento (%)	E
ELC	100 ml	0,41 mg/ml	0,080 U/ml	8,00 U	0,19 U/mg	100	1
FSA	11 ml	1,29 mg/ml	0,817 U/ml	8,98 U	0,63 U/mg	112	3,3
CH	20 ml	0,156 mg/ml	0,231 U/ml	4,63 U	1,48 U/mg	58	7,8

Se analizó el proceso de purificación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), donde los polipéptidos son separados en función de su tamaño.

Se tomaron alícuotas de las muestras representativas del proceso de purificación, que se desnaturizaron a 100° C en presencia de SDS y DTT, y se

sometieron a SDS-PAGE.

Tras la electroforesis el gel de poliacrilamida se tiñó con azul de Coomasie para revelar la variedad de proteínas que compone cada muestra (**Figura 6**).

Las muestras ECL y FSA son similares en la variedad de proteínas que contienen, por lo que el fraccionamiento por sulfato amónico ha sido un paso de purificación poco selectivo.

La muestra resultante de la cromatografía hidrofóbica presenta menos bandas proteicas que la muestra precedente, por lo que este proceso de purificación ha sido más selectivo.

En la electroforesis se pueden observar dos destacadas bandas (indicado en la **figura 6** con flechas), correspondientes a proteínas de peso molecular 40 y 45 aproximadamente, que según su tamaño podrían corresponder a la peroxidasa homóloga a HPR. No obstante, se observa en la muestra final una amplia variedad de bandas de proteínas, por lo que el proceso de purificación no ha sido totalmente eficaz, no lográndose la purificación de la POD de zanahoria a homogeneidad.

Serían necesarios sucesivos procesos de purificación, como la cromatografía de exclusión molecular o la cromatografía de intercambio iónico, así como un perfeccionamiento de la cromatografía hidrofóbica aplicando un gradiente de elución adecuado.

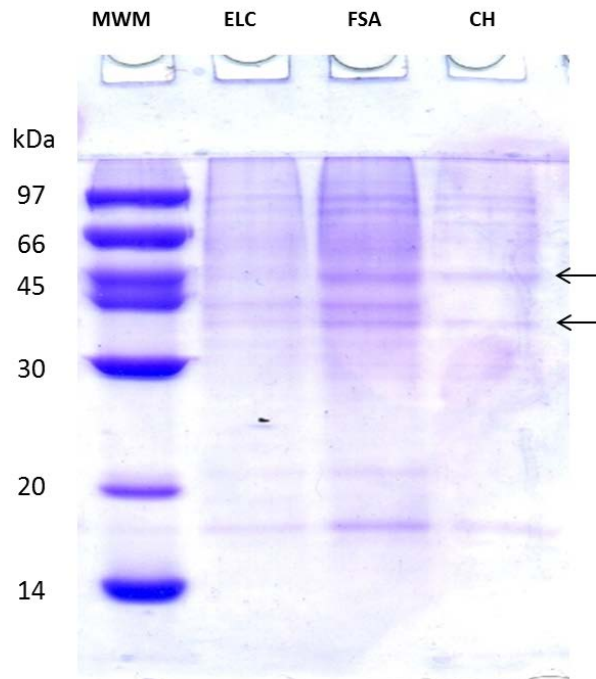


Figura 6. Electroforesis (SDS-PAGE) de las muestras implicadas en el proceso de purificación. Marcadores de peso molecular (MWM), Extracto libre de célula (ELC), fraccionamiento con sulfato amónico (FSA) y Cromatografía Hidrofóbica (PS).

La caracterización de la enzima POD se realizó mediante una serie de ensayos, donde se determinó la actividad enzimática de la peroxidasa en diferentes condiciones de temperatura (**Figura 7**), de concentración del sustrato peróxido de hidrógeno (**Figura 8**) y de pH (**Figura 9**).

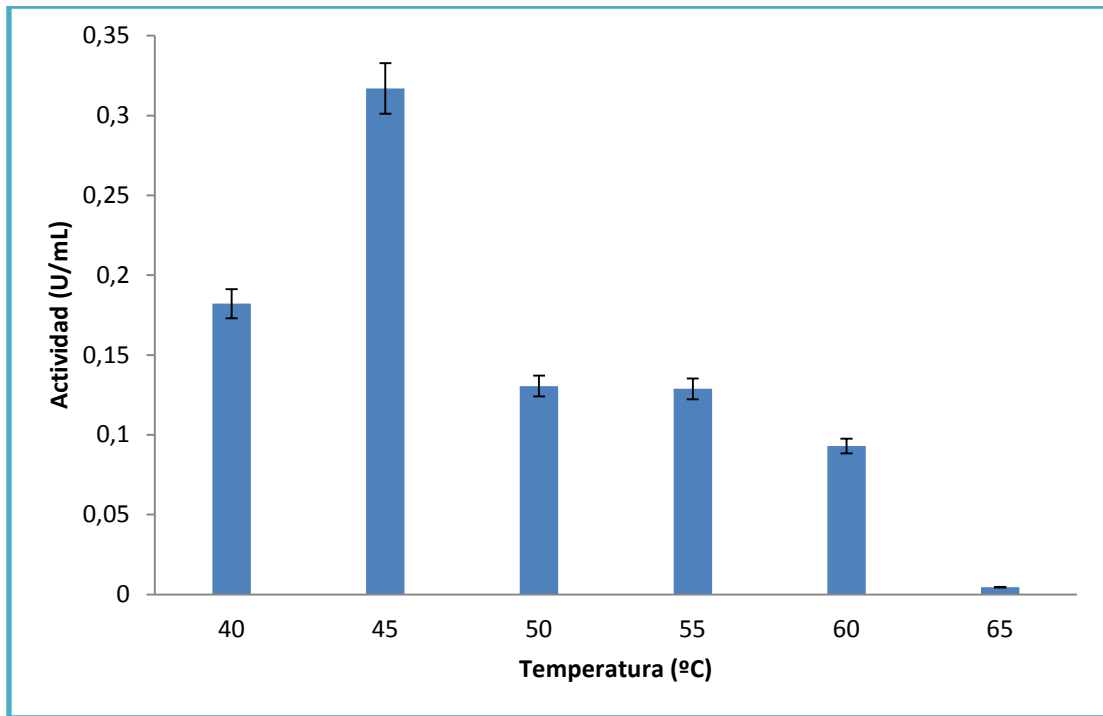


Figura 7. Actividad enzimática de POD en función de la temperatura.

La actividad enzimática de POD se somete a varias temperaturas, viéndose en la gráfica como de 40°C a 45°C existe un gran aumento, y a partir de 50°C disminuye esta actividad enzimática hasta quedarse nula.

A 40 °C se puede ver que la actividad es 0,182 U/ml, a 45°C 0,317 U/ml y ya disminuye hasta que a 65°C es prácticamente nula.

A partir de 60 °C se produce una pérdida muy alta de actividad, por tanto, se puede decir que este es el punto crítico termoestable de la enzima, a partir de la cual cae considerablemente la actividad enzimática.

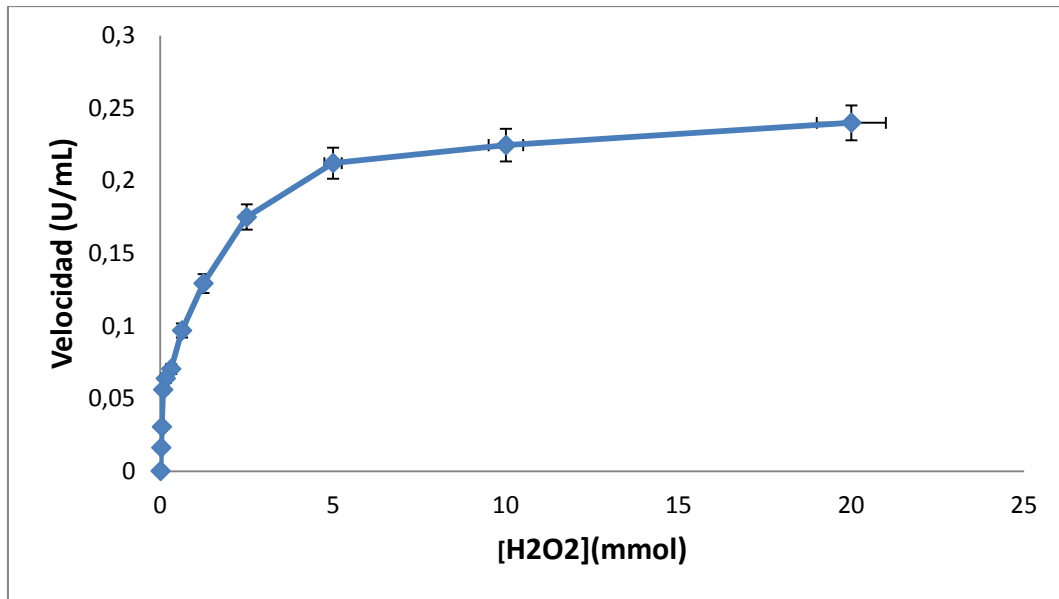


Figura 8. Actividad de POD con respecto a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno como sustrato.

En esta gráfica se puede ver que la actividad enzimática aumenta al aumentar la concentración del sustrato, que en este caso es el peróxido de hidrógeno.

También pudiéndose observar que a concentraciones muy pequeñas de peróxido de hidrógeno, la actividad enzimática es prácticamente nula.

Por tanto se puede observar que la actividad enzimática de POD depende de una manera u otra del sustrato peróxido de hidrógeno.

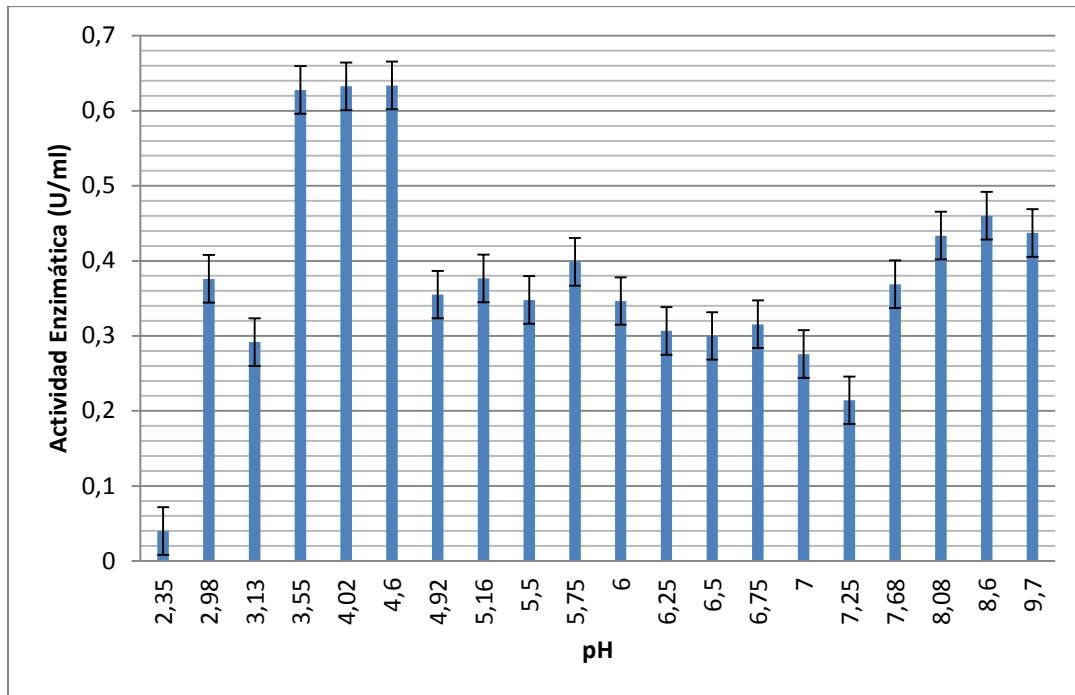


Figura 9. Actividad enzimática de POD con respecto al pH.

Se puede observar que a pH 4,6 la actividad es óptima. Por tanto, la enzima de la peroxidasa de zanahoria tiene una mayor actividad en el pH ácido entre un pH de 3-6.

Por otra parte, también se sometió a pH básicos y se pudo ver que también tiene una actividad medianamente alta.

Además, la actividad catalítica nunca desaparece, siendo el valor más pequeño de actividad a un pH 7,25.

6. CONCLUSIÓN

Se llegó a la conclusión de que la cromatografía hidrofóbica es el mejor método para la purificación de la enzima de peroxidasa de rábano (POD), aprovecha muy bien las características de esta enzima y da unos resultados muy concluyentes.

Se puede destacar la eficacia de esta cromatografía hidrofóbica con respecto a otros métodos también posibles de purificación como pueden ser otros tipos de cromatografía, como la de exclusión molecular.

En la caracterización de esta enzima con respecto a la temperatura se observó que la actividad catalítica disminuye mientras aumenta la temperatura. A partir de 60 °C se ve una notable disminución de la actividad catalítica, siendo posiblemente el punto crítico de termoestabilidad de esta enzima. Al llegar a los 65°C esta actividad es nula.

En la caracterización de esta enzima frente al pH se puede observar que el pH óptimo de esta enzima es 4,6. Por tanto, la POD purificada de zanahoria (*Daucus Carota*), se encuentra dentro del grupo de las peroxidases ácidas o aniónicas.

En los resultados obtenidos en este ensayo se puede ver actividades bajas con pH entre 6 y 7,5. Seguramente, en la muestra final, se encontrarán diferentes tipos de isoenzimas neutras (tienen la misma actividad pero diferente composición) o también podría encontrarse pequeñas fracciones de POD sin desnaturalizar.

Por último, en la caracterización de la enzima con respecto a la concentración del sustrato peróxido de hidrógeno, se puede deducir que a medida que disminuye la concentración del sustrato también disminuye la actividad catalítica de esta enzima.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Dalal, S; Gupta M.N. (2007). Treatment of phenolic wastewater by horseradish peroxidase immobilized. *Chemosphere* 67:741-747.
2. Dawson J.H. (1988). Probing structure-function relations iii heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science* 240:433-439.
3. Gonçalves, E.M.; Pinheiro, J.; Abreu, M.; Brandao, T.R.S.; Silva, C.L.M. (2010). Carrot (*Daucus Carota* L.) peroxidase inactivation, phenolic content and physical changes kinetics due to blanching. *Journal of Food Engineering*. 97:574-581.
4. Hamid, M; Rehman, K.U. (2009). Potencial applications of peroxidases. *Food Chem.* 15:1177-1186.
5. Haschke, R.H.; Friedhoff, J.M. (1978). Calcium-related properties of Horseradish peroxidase. *Biochemical and biophysical research communications*. 80:1039-1042.
6. Howes, B. D.; Feis, A.; Raimondi, L.; Indiani, C.; Smulevich, G. (2001). The critical role of the proximal calcium ion in the structural properties of Horseradish Peroxidase. *The journal of biological chemistry*. 276:40704-40711.
7. Laberge, M.; Huang, Q.; Schweitzer-Stenner, R.; Fidy, J. (2003). The endogenous calcium ions of Horseradish Peroxidase C are required to maintain the functional nonplanarity of the heme. *Biophysical Journal*. 84:2542-2552
8. Lavery, C.B.; Macinnis, M. C.; MacDonald, M.J.; Williams, J.B.; Spencer, C.A.; Burke, A.A.; Irwin, D.J.G.; Godwin, B.D. (2010). Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *J. Agric. Food. Chem.* 58:8471-8476.
9. Pandey, V.P.; Awasthi, M.; Singh, S.; Tiwari, S.; Dwivedi, U.N. (2017). A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochem Anal Biochem*. 10:4176/1009.1000308.

10. Ulson de Souza, S.M.A.G.; Forgiarini, E; Ulson de Souza, A.A. (2007). Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*. 147:1073-1078.
11. Uozumi, N.; Kato, Y.; Nakashimada, Y.; Kobayashi, T. (1992). Excretion of peroxidase from horseradish hairy root in combination with ion supplementation. *Appl Microbiolol Biotechnol*. 37: 560-565.
12. Vallee, B.L.; Williams R.J.P. (1968). Metalloenzymes: The entatic nature of their active sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59:498-505.
13. Veitch, N.C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. 65:249-259.
14. Wariishi, H; Gold M.H. (1990). Lignin Peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.* 265:2070-2077.
15. Welinder, K.G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current opinión in structural biology*. 2:388-393.
16. Zakharova, G.S; Uporov, I.V.; Tishkov, V.I. (2011). Horseradish peroxidase: modulation of properties by chemical modification of protein and heme. *Biochemistry (Moscow)*. 76:1391-1401.