

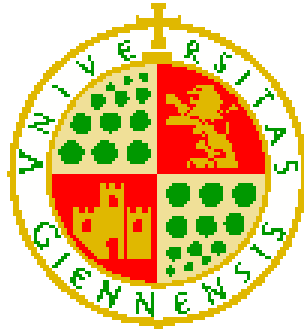


UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Purificación y caracterización de una peroxidasa de zanahoria

Alumno: Ángel Cobo Peinado

Septiembre, 2016.



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

Purificación y caracterización de una peroxidasa de zanahoria

ÁNGEL COBO PEINADO

SEPTIEMBRE, 2016.

ÍNDICE:

• 1. RESUMEN	1
○ 1.1 ABSTRACT	1
• 2. INTRODUCCIÓN	2
○ 2.1 CLASIFICACIÓN	2
○ 2.2. MECANISMO CATALÍTICO	6
○ 2.2 APLICACIONES	8
○ 2.3 JUSTIFICACIÓN	10
• 3. MATERIAL Y METODOS	13
○ 3.1. MATERIAL	13
○ 3.2. FABRICACION DE EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS DE RAÍCES DE ZANAHORIA	13
○ 3.3. PRECIPITACIÓN PROTEICA CON SULFATO AMONICO	14
○ 3.4. DIALISIS, CONCENTRACION Y DESALACIÓN DE MUESTRAS	14
○ 3.5. CROMATOGRAFÍAS	15
○ 3.5.1 CROMATOGRAFÍA HIDROFÓBICA	15
○ 3.5.2 CROMATOGRAFIA IÓNICA	16
○ 3.5.3 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	16
○ 3.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEINA	16
○ 3.7. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA (POD)	16
○ 3.8. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLICRILAMIDA (SDS-PAGE)	18
• 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
• 5. CONCLUSIÓN	31
• 5. BIBLIOGRAFÍA	32

1. RESUMEN

El uso extendido de las enzimas peroxidadas (POD) está siendo una revolución biotecnológica en nuestro siglo. La infinidad de aplicaciones que se pueden atribuir a estas enzimas hace que sean una importante fuente de ingresos.

El uso extendido de la peroxidasa de rábano picante, *horsderadish peroxidase* o también conocida como HRP, se debe generalmente a su potencial de conjugación con inmunoglobulinas y su facilidad para ser observada en pruebas colorimétricas. Aunque, tanto la purificación de HRP como su exportación son procesos caros en definitiva.

El uso de enzimas peroxidadas secretadas por plantas (Clase III) como la procedente de zanahoria, *Daucus carota*, puede suponer no solo un ahorro en los métodos de purificación sino salvar los problemas que presenta la HRP para reaccionar con nuevos sustratos.

En general el uso alternativo de una POD de la Clase III secretada por plantas puede suponer un avance significativo en la utilización del enzima así como la obtención de un producto más barato y eficiente.

Palabras clave: Peroxidasa (POD), *A Armoracia rusticana*, *horsderadish peroxidase* (HRP), *Daucus carota*.

1.1. ABSTRACT

The widespread use of enzymes peroxidases (POD) being a biotechnology revolution in our century. The many applications that can be attributed to these enzymes makes them an important source of income.

The widespread use of horseradish peroxidase, peroxidase or horsderadish also known as HRP, is generally due to their potential for conjugation with immunoglobulins and ease to be seen in colorimetric tests, though, all is not glory in this way. Purification of HRP as export processes are expensive ultimately.

The use of peroxidases enzymes secreted by plants (Class III) as from carrot, *Daucus carota*, may involve not only a saving in purification methods but to save the problems with the HRP to react with new substrates.

In general, the alternative use of a POD Class III secreted by plants can be a significant advance in the use of the enzyme and obtaining a cheaper and more efficient product.

Key words: Peroxidase (POD), *Armoracia rusticana*, *horsderadish peroxidase* (HRP), *Daucus carota*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. CLASIFICACIÓN

La conocida como peroxidasa de rábano (*horsderadish peroxidase*, HRP, POD) es una enzima (EC 1.11.1.7.) que contiene un grupo hemo y un peso molecular de 40-45 kDa. Cataliza la oxidación de una amplia gama de sustratos en presencia de un agente oxidante como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Su grupo hemo es de tipo b (protoporfirina IX), con un ión de hierro en el centro del anillo porfirínico cuyo estado de reducción oscila entre valencia III y IV. El grupo hemo forma parte del centro activo de la enzima. La reacción catalizada por la enzima tiene la capacidad de oxidar una amplia gama de productos orgánicos e inorgánicos, tales como fenoles (pirogalol, guayacol) o aminas aromáticas (O-fenilendiamina, O-dianisidina), y los electrones son transmitidos al peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que se reduce a H₂O (Veitch N C, 2004).

La actividad catalítica depende principalmente de la estructura molecular del enzima, la estructura de HRP puede observarse en la **figura 1**. La proteína presenta una estructura globular compuesta por 308 aminoácidos formando una cadena sencilla (Fujiyama K et al., 1988), con 12 regiones en estructura secundaria hélice α separadas por giros y bucles, además, presenta una escasa proporción de estructura en lámina β .

Como ya se ha dicho, contiene un grupo hemo situado en el centro de la estructura fijado a la proteína mediante un enlace coordinado entre el hierro y

un residuo de histidina (Veitch N C, 2004), cuatro puentes disulfuro estabilizan la estructura.

La presencia de dos iones calcio (Ca^{2+}), junto al grupo hemo, son esenciales para la actividad catalítica (Labergue M et al., 2003). La ausencia del calcio en la estructura genera una desestabilización de la estructura del enzima con la consiguiente disminución de la actividad específica. Esta disminución puede ser parcial o completa dependiendo de la peroxidasa (Shiro et al., 1986).

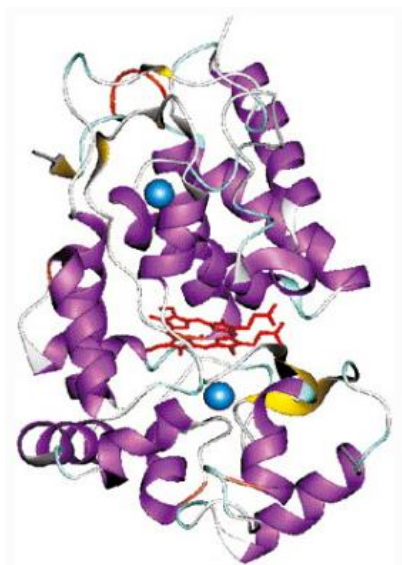


Figura 1. Estructura de HRP, determinada mediante cristalografía de rayos X. En color rojo el grupo hemo, en azul dos átomos de calcio, en violeta las hélices α y en amarillo las láminas β .

La evidencia de estas enzimas comienza en el siglo XIX con estudios destinados a la determinación de su actividad en los sistemas biológicos. Se puede decir que su aparición en la ciencia moderna no llegó hasta 1903 en un estudio sobre el papel de los peróxidos en la célula viva (Bach A N & Chodat R, 1903). En 1920 un famoso debate entre los investigadores Richard Willstätter y James Summer sobre la naturaleza de las enzimas y entre ellas la HRP, despertó gran interés en su investigación. Sin duda este debate ha favorecido al conocimiento que se tiene hoy en día del enzima.

Existe una gran variedad de enzimas con actividad peroxidasa. Las PODs se dividen en dos superfamilias; Una identificada en algunas bacterias,

hongos y animales o de animales (Passardi F et al., 2007) y otra superfamilia encontrada esencialmente en bacterias, hongos y plantas también denominada de plantas (Furtmuller P G et al., 2006).

Se han identificado tres subclases dentro de esta segunda superfamilia o superfamilia de plantas. La diferencia entre estas tres clases depende de su estructura primaria, algunos ejemplos pueden observarse en la **tabla 1** (Wlinder K G, 1992).

Las superfamilias de peroxidases se distinguen mediante la presencia en su estructura de residuos concretos. La superfamilia de bacterias, hongos y plantas (clase III o C) se caracteriza por la conservación evolutiva las hélices A hasta la hélice J. A pesar de ello, los bucles parecen no ser idénticos. No se presenta una homología superior al 55% de la estructura (Welinder K G, 1992).

Todas las peroxidases conocidas presentan tres aminoácidos caracterizados por formar parte del centro activo del enzima. Se sugiere que estos residuos están involucrados en la estabilización de las cargas entre His⁴² y Arg³⁸ y como ligando del grupo hemo (Mittler R & Zilinskas B A, 1991).

Clase I	Clase II	Clase III
Peroxidasas intracelulares	Peroxidasas extracelulares de hongos	Clasicas o secretadas por la planta
Ejemplos	Ejemplos	Ejemplos
Citocromo c Peroxidasa (CcP)	Lignina Peroxidasa (Lip)	Peroxidasa de rábano
Ascorbato Peroxidasa (Apx)	Magenesio Peroxidasa (MnP)	Peroxidasa de cacahuete
Catalasa Peroxidasa (CP)	Peroxidasa versátil (VP)	Peroxidasa Soya

Tabla 1. Clasificación de la superfamilia de POD de plantas (Welinder K G, 1992).

HRP se clasifica en la clase III o C de la superfamilia de hemoperoxidasas de plantas, hongos y bacterias. Esta clase engloba a peroxidases de plantas que son N-glucosiladas y secretadas de las células (Campa A, 1991).

Cumplen varias funciones fisiológicas en la planta a lo largo de todo su ciclo vital; participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno, oxidación de compuestos tóxicos, lignificación, elongación y parada del crecimiento de la pared celular, el catabolismo de auxinas, la defensa frente al estrés oxidativo y en la defensa frente a patógenos, simbiosis y germinación (Almagro L *et al.*, 2009). Algunas funciones pueden parecer paradójicas como el caso de la elongación y la ausencia del crecimiento de la pared celular, esta se sintoniza con las necesidades de la planta (Passardi F *et al.*, 2004). La principal función de las PODs en la planta parece ser la lignificación de la pared celular, esta puede presentar una rigidez modificable por la enzima. La aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS) hace que la pared celular sea más flexible, además, ROS actúa eliminando ciertos agentes patógenos para la planta. La ausencia de ROS en la pared aumenta su rigidez.

La participación de la POD en gran parte de los procesos fisiológicos dentro de la planta puede deberse al elevado número de isoformas y su versatilidad para realizar su función catalítica (Passardi F *et al.*, 2005).

La funcionalidad del enzima en los procesos fisiológicos de la planta abre el camino para la determinación no solo de enzimas de distinta clase en relación con su origen evolutivo y su estructura, sino a la existencia de diferentes isoenzimas.

Se han descrito isoenzimas de HRP con capacidad de soportar diferentes ambientes de pH (Horie T *et al.*, 1985).

Se diferencian 3 grupos:

- **Isoenzimas aniónicas o ácidas:** Soportan un pH menor que 7, se caracterizan por la presencia de un alto contenido en carbohidratos.
- **Isoenzimas neutras:** Comprenden un pH entre 7 y 9. También se conocen con el nombre de isoenzimas ligeramente básicas.
- **Isoenzimas catiónicas o básicas:** Soportan un pH mayor a 11, se caracterizan por un bajo contenido en carbohidratos.

La planta presenta una compartimentación enzimática en la cual las diferentes isoenzimas van a cubrir un papel crucial para la realización de la

función catalítica de la POD en diferentes órganos de la planta y estructuras celulares. La razón por la que existen isoformas de una enzima dentro de una misma planta se debe a la necesidad de conservar la actividad catalítica. Las propiedades cinéticas, catalítica, secuencia de aminoácidos y la carga pueden ser diferentes entre isoenzimas (Theorell H, 1942).

Por otro lado dentro de la planta no existe una distribución homogénea de la enzima, por ejemplo; La actividad de la enzima es baja en frutos y jugos de la misma, sobre todo cuando el pH de los líquidos de los tejidos es bajo. Por otro lado la raíz es donde se encuentra la mayor actividad de la misma.

No obstante la enzima presenta una gran estabilidad frente al pH y temperatura. La estabilidad de la enzima favorece su capacidad para realizar su función catalítica lo que la dota como un enzima muy útil en cuanto a su aplicación en diferentes condiciones.

2.2. MECANISMO CATALÍTICO

La estructura tridimensional de la proteína junto con la estructura del metal ayuda a la función catalítica establecida por el grupo hemo, proporcionando un ambiente catalítico idóneo para reacciones de transferencia de electrones (Vallee B L & Williams J P, 1967).

Los residuos del dominio distal junto a los residuos del dominio proximal participan en la estabilización del grupo hemo. El lado distal no solo interviene en la estabilización del del grupo hemo sino que se mantiene en contacto con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La POD puede ejercer dos posibles ciclos catalíticos, peroxidativo e hidrolítico, siendo esta una enzima multifuncional. La regulación de su actividad y expresión se debe a la aparición de estímulos tanto internos como externos (aún no dilucidados con precisión).

La reacción cataítica consiste en el uso del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como aceptor electrones para realizar la oxidación de numerosos compuestos, dando la capacidad a la POD de ser uno de los oxidantes por excelencia. La reacción POD se realiza en dos pasos, la **figura 2** muestra la reacción.

Las PODs presentan un ligando de imidazol axial, un grupo hemo cargado y un ambiente polar que facilita la ruptura del enlace O-O del peróxido de hidrógeno.

Un grupo hemo casi inaccesible permite evitar la transferencia de O-O mientras que el borde hemo expuesto promueve las reacciones de transferencia de electrones (Dawson J H, 1988). El peróxido de hidrógeno mantiene contacto con el átomo de hierro del grupo hemo al que se une.

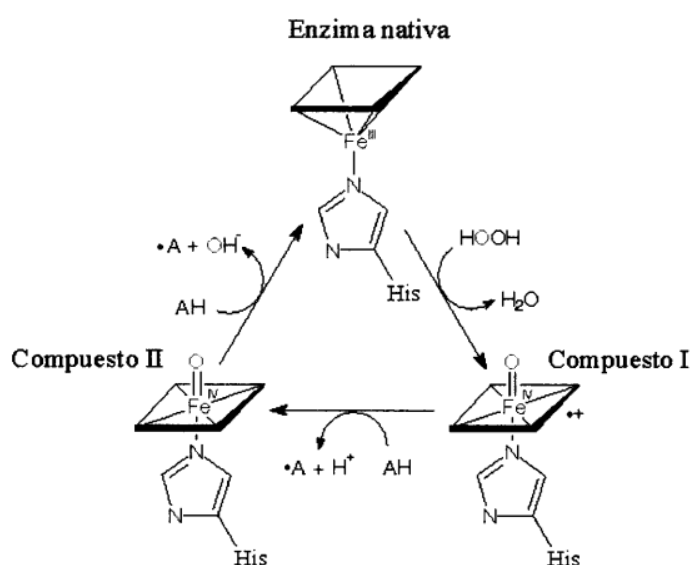


Figura 2. En esta imagen se representa de forma sencilla la reacción de oxidación-reducción catalizada por la POD (Dawson JH, 1988).

El primer paso de la reacción requiere que la enzima reaccione con el peróxido de hidrógeno para dar lugar a un compuesto I. Este compuesto adquiere la capacidad de oxidar a un sustrato mediante una reacción de transferencia electrónica. En este primer paso la enzima es oxidada y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se reduce a agua (H₂O) (Dawson J H, 1988).

El compuesto I tiene capacidad para oxidar mediante una reacción de transferencia de electrones, en esta reacción la enzima se presenta como

compuesto II con un centro de $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ en la cual el grupo hemo recupera un electrón procedente del sustrato, dejando un radical libre en el mismo.

El compuesto I pasa a denominarse ahora compuesto II. El $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ del compuesto II recupera su electrón y pasa a estado férrico Fe^{3+} , de esta forma la enzima recupera su estado nativo.

Puede darse el caso en el que no existan sustratos reductores en el medio, la presencia de un exceso de H_2O_2 puede hacer que el compuesto II no pase a su forma nativa sino que experimente un estado de oxidación diferente formando un compuesto III, $\text{Fe}^{3+} \text{O}_2^-$, produciendo la inactivación de la enzima y la posterior pérdida del grupo hemo (Wariishi H & Gold M H, 1990; Soysal Ç, 2005).

2.3. APLICACIONES

La infinidad de posibilidades de oxidación que proporciona la POD pueden ser trasladadas de la planta a otros sistemas o reacciones con el fin de aprovechar la actividad catalítica del enzima.

En términos generales las aplicaciones de las PODs no solo están destinadas a su uso comercial como oxidantes, sino que ,debido a su plasticidad para oxidar y reducir compuestos, puede servir como; marcador de reacciones inmunohistoquímicas, tratamientos para enfermedades, bioreactor, descontaminante de aguas entre otras aplicaciones.

En este apartado se pretende exponer las diferentes aplicaciones del enzima y resaltar su importancia así como la necesidad de obtener un producto con un uso más extendido.

Aplicaciones:

- **Terapia contra el cáncer.** Una combinación de HRP y el indol-3-acético o sus derivados están siendo evaluados como un agentes para su uso en terapias contra el cáncer (Veitch N C, 2004). El estudio del fármaco está relacionado con la inducción de ciertas células a apoptosis.

- **Empleo industrial.** Elaboración de productos de panadería, blanqueo de papel, detergentes, decoloración de ropa.

- Aplicación **bioanalíticas**:
 - **Inmunoensayos** y ensayos ligados a enzimas. Reacciones colorimétricas para la determinación de compuestos mediante técnicas **espectrofotométricas**, esta aplicación consiste en acoplar una reacción catalizada por una POD para determinar la cantidad de un compuestos de forma proporcional a la coloración de la solución.
Se usa generalmente para pruebas diagnósticas, kits comerciales para uso clínico (determinación de glucosa, ácido úrico, colesterol, triacilglicéridos).
 - **Determinación de reactivos químicos utilizados en industria farmacológica** tales como anilinas y fenoles.

- **Biorreactor enzimático** para la degradación de vertidos:
 - **Eliminación** de peróxido de **compuestos orgánicos** y de los **efluentes industriales** (Hamid M & Rehman K U, 2009).
 - **Tratamiento de aguas residuales** contaminadas con compuestos fenólicos (Dalal S & Gupta M N, 2007). Agente depurador de aguas subterráneas, lagos, suelos y lodos industriales que contienen compuestos fenólicos y aromáticos que no son biodegradables (Kim E et al., 2006) Los cuales presentan problemas en la depuración de aguas, los métodos enzimáticos se consideran buenas opciones para la eliminación de elementos aromáticos tóxicos, después de ver que los métodos microbiológicos de aguas residuales no son seguros ni se consideran una práctica común (Lavery C B et al., 2010).

El uso en general de enzimas peroxidasa vegetales para la eliminación de compuestos del agua requiere un menor coste que su producción a partir de microorganismos (Kim E et al., 2006).

Estas son las aplicaciones más importantes dentro de los posibles usos que se pueden dar al enzima. Se evidencia que la importancia del enzima está destinado a su aplicación.

La Comisión Científica de la Unión Europea considera a las POD como las enzimas con mayor interés biotecnológico del siglo XXI, esto se debe no solo a las aplicaciones que presenta sino también porque es un sustituto perfecto de algunos catalizadores químicos tóxicos y agresivos de uso industrial.

2.4. JUSTIFICACIÓN

La empresa BBI enzimas es uno de los mayores fabricantes de enzimas POD para uso comercial en todo el mundo, concretamente es uno de los mayores fabricantes de HRP. BBI vende más de 10 millones de unidades por año.

Los métodos de extracción son muy costosos y presentan un bajo rendimiento. El problema al que se enfrenta este trabajo es la purificación de la enzima peroxidasa (POD) que solvente el alto coste de la purificación HRP. Es una realidad que existe la demanda de nuevas PODs más estables y con mejores propiedades catalíticas que la HRP.

La determinación de un método eficiente de purificación no solo supone la disponibilidad de mejores técnicas, sino que dichos avances suponen un punto de inflexión en la determinación comercial de este producto. Produciendo un producto más barato, con mejor reconocimiento de sustratos y mayor versatilidad en cuanto a sus aplicaciones.

En términos generales sería una revolución de las técnicas comerciales usadas hoy en día y un avance dentro del campo de la biotecnología. Lo que

suponde que la repercusión en los medios de comunicación sea algo más que evidente.

Las PODs extraídas provienen de plantas comestibles (Clase III). El uso más extendido de HRP se debe a; Su gran estabilidad enzimática, potencial de conjugación con inmunoglobulinas y su facilidad para ser observada en pruebas colorimétricas.

Pero no todo son ventajas en el uso de la HRP, su extracción y purificación son procesos delicados y costosos. Estos presentan baja rentabilidad de pureza y baja concentración de enzima. Además a estos hechos hay que sumarle un factor determinante en el costo del producto, la importación del rábano picante.

Además, los análisis del proceso cuantitativo de la enzima presentan algunas desventajas. Estos procesos son muy lentos y la enzima se somete a determinados factores que pueden influir en la exactitud de los métodos de purificación. Los métodos de análisis suponen retrasos en la purificación y producción de enzima HRP.

Es necesario la búsqueda no solo de técnicas de extracción o de purificación más eficientes sino la búsqueda de enzimas peroxidasas o isoformas de otras plantas de la clase III.

En este estudio se pretende la búsqueda de una POD con características catalíticas similares a HRP, aunque con diferentes características de purificación. El uso de una POD procedente de otra planta podría suponer un coste más bajo del enzima. A esto hay que sumarle la posibilidad de una mejor purificación, lo que nos daría una mayor concentración de enzima por proceso.

En este caso, la planta propuesta para la purificación de POD es la zanahoria común, *Daucus carota* sb. *Sativus*. La versatilidad culinaria que presenta la zanahoria y la adaptabilidad de la planta le permite estar presente en plantaciones por todo el planeta. Se produce un ahorro significativo en la importación de la materia prima.

La zanahoria presenta una alta concentración de enzima POD esencial para el mantenimiento de la planta. Pruebas de Alder determinan la presencia de altas concentraciones de la enzima en la hortaliza. Se puede decir que la presencia de una POD de la clase III es más que evidente en *Daucus carota*.

Un ejemplo de la presencia de POD en zanahoria serían los procesos de congelado de zanahorias comercial. En estos se usan métodos de inactivación de la POD para evitar el deterioro del color, de la textura y composición de la hortaliza congelada.

La capacidad de la POD para soportar los cambios de temperatura no presenta ninguna alteración de las características cinéticas, ni siquiera bajo la congelación. Es decir, presenta alta resistencia a la temperatura y se encuentra en altas concentraciones en los vegetales (Gonçalves E M et al., 2010). Pese a someterse temperaturas desnaturalizantes la actividad catalítica presenta gran estabilidad frente a la temperatura (Soysal Ç & Söylemez Z, 2005).

La caracterización de la POD purificada de *Daucus carota* se realizará mediante pruebas de actividad a diferentes temperaturas, pH y con diferentes concentraciones de sustrato. Destinados a determinar la estabilidad de la enzima en diferentes ambientes desfavorables.

El objetivo de este estudio es la obtención de un método de purificación óptimo que salve los problemas de calidad de la purificación de la HRP en rábano picante. Produciendo una POD con mayor concentración, características de empleo idénticas y un coste más reducido para su comercialización.

La purificación de POD a partir de zanahoria, *Daucus carota* sb. *Sativus*, podría permitir el empleo no solo de técnicas menos laboriosas y más rápidas sino también la obtención de un producto de mayor calidad y eficiencia.

La pérdida de la riqueza y los bajos datos de optimización de los métodos de purificación, así como, el problema para reconocer nuevos sustratos (Wellinger N C, 1992) son un problema real al que se enfrenta HRP.

Salvar dichos problemas supondría la obtención de un producto más barato, con una mejor riqueza y un mayor número de aplicaciones.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

La fuente del enzima POD fueron raíces de zanahoria (*Daucus carota*), adquiridas en comercios locales de la ciudad de Jaén.

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂), O-dianisidina, dimetilsulfóxido (DMSO), fosfato potásico, persulfato amónico, albúmina de suero bovino (BSA), ácido acético, glicina, cloruro sódico, cocktail de inhibidores de proteasas (Ref. P 9699) y etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) y Trizma base fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El sulfato amónico y la lana de vidrio son de Panreac. La disolución de acrilamida-bisacrilamida (19:1) y tetrametiletilendiamida (TEMED) proceden de Bio-Rad. Fenil y DEAE sefarosas (FastFlow), y Sefadex G-100 son de la marca GE Healthcare.

3.2. FABRICACIÓN DE EXTRACTOS LIBRES DE CÉLULAS DE RAÍCES DE ZANAHORIA.

50 gramos de raíces de zanahoria cortada en rodajas de 3 mm de grosor, aproximadamente, se congelaron con nitrógeno líquido y se pulverizaron en un mortero. Al pulverizado se añadieron 100 mL de tampón fosfato potásico 50mM, pH 7.5, 0.2 mM EDTA más 25 µL de cocktail inhibidor de proteasas y se trituró con un dispersor Heidolph TYP 10 G, durante 10 minutos y manteniendo el frío con un baño de agua-hielo. Posteriormente, el homogenado se sometió a cavitación con un sonicador Bandelin Sonoplus HD 2070 MS 72 Titaniummicrotrip, durante 30 minutos a la máxima potencia permitida en pulsos de 1 segundo, manteniendo la temperatura en frío con un baño de agua-hielo. Seguidamente, el homogenado se filtró a través de un lecho compacto de lana de vidrio y se centrifugó a 8.000xg durante 30 minutos a 4^o C. El sobrenadante constituyó el extracto libre de células (ELC).

3.3. PRECIPITACIÓN PROTÉICA CON SULFATO AMÓNICO

La precipitación proteica por insolubilización salina con sulfato amónico se realizó atendiendo a los parámetros requeridos por un programa bioinformático libre de EnCorBiotechnology Inc., Florida (<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>). La adición de sulfato amónico a la disolución se realizó a 25° C de manera progresiva durante 20 minutos, mezclando continuamente con un agitador magnético. Tras la adición, se continuó agitando durante 10 minutos más. Finalmente, se centrifuga la mezcla a 10000xg durante 15 minutos a 4° C, y se separan el sobrenadante del precipitado.

3.4. DIÁLISIS, CONCENTRACIÓN Y DESALACIÓN DE MUESTRAS

La diálisis de laboratorio se emplea para modificar las características de pH y salinidad de una disolución. Típicamente, una disolución con proteínas es encerrada en una bolsa de un material poroso que permite el paso de agua, iones salinos y pequeñas moléculas, pero no de moléculas grandes como proteínas. La bolsa que contiene la disolución proteica es introducida en un recipiente con una disolución tampón de volumen mucho mayor (al menos 100 veces mayor) que el de la muestra encerrada en la bolsa. Transcurrido un tiempo se va establecer un equilibrio osmótico entre la disolución interna y externa a la bolsa, por lo que la disolución proteica va a adquirir las propiedades de pH y salinidad que existían en la disolución externa. Para la realización de diálisis se utilizaron bolsas de membrana Spectra/Por 1 (Spectrum Labs.Com) y el proceso se realizó a 4° C durante al menos seis horas.

Para reducir el volumen de las muestras, concentrando su contenido en proteínas, se utilizó el proceso de ultrafiltración. Las muestras se introdujeron en cápsulas Centricon YM-10 (Millipore) y se sometieron a centrifugación (5000xg, 4° C) hasta conseguir la reducción de volumen deseada.

Para eliminar el alto contenido en sulfato amónico que tuviera una muestra, que pudiera interferir en procesos analíticos tales como la

determinación de la concentración de proteínas o la SDS-PAGE, se utilizaron columnas de desalación (Protein Desalting Spin Column, ThermoScientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5. CROMATOGRAFIAS

Se llevaron a cabo tres cromatografías con el fin de obtener un producto final con mayor pureza en la enzima deseada. Las cromatografías usadas fueron:

3.5.1 Cromatografía Hidrofóbica

La cromatografía se realizó mediante una matriz de fenilsefarosa en una columna cromatográfica de (15 x 1 cm de diámetro), equilibrada con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, 1,5 M de sulfato amónico. Tras aplicar la muestra y lavar la columna con el tampón de equilibrio, se aplicó un gradiente decreciente de concentración de sulfato amónico hasta 0 M. El flujo de la cromatografía fue de 1 mL/min, ejercido por una bomba GilsonMinipuls 3.

Para aplicar el gradiente en la columna se utilizó un formador de gradiente, consistente en un sistema de vasos comunicantes de dos compartimentos. El primer compartimento contiene una solución de 50 mL de tampón fosfato potásico 50 mM a pH 7,5 y con 1,5 M de sulfato amónico en agitación mediante un agitador magnético. El segundo compartimento contiene 50 mL de tampón fosfato potásico 50 mM a pH 7,5 y 0,5 M de sulfato amónico. La unión entre ambos compartimentos establece que se produzca una mezcla gradual y continua de ambas soluciones permitiendo que a la columna entre un gradiente que oscila entre 1,5 M de sulfato amónico y 0,5 M. En un posterior gradiente se hace pasar de una solución de fosfato potásico 50 mM a pH 7,5 y 0,5 M de sulfato amónico a 0 M de igual forma.

3.5.2 Cromatografía iónica

La cromatografía iónica se realizó con una matriz de DEAE sefarosa con una columna de (10 x 1 cm de diámetro), una bomba GilsonMinipuls 3 ejercía un flujo continuo de 1 mL/min. Se utilizó un gradiente con diferentes

concentraciones de NaCl para en primer lugar favorecer que la enzima se una a la matriz y por último que se desprenda.

El gradiente se introdujo mediante un formador de gradiente que oscilaba entre una solución de tampón Tris 20 mM, pH 8, 0,1 M EDTA y 0,5 M de NaCl (50 mL) y Tris 20 mM, pH 8, 0,1 M EDTA y 2 M de NaCl (50 mL). El mecanismo del formador de gradiente es el mismo que el descrito en el apartado anterior, se introdujo en la columna cromatográfica un flujo continuo y con una mezcla gradual de ambas soluciones permitiendo la separación final de cierta cantidad de enzima.

3.5.3 Cromatografía de exclusión molecular

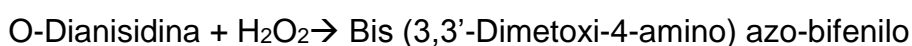
La cromatografía de exclusión molecular se llevó a cabo con una matriz Sefadex G-100 mediante una cromatografía con BioLogicDuoFlow (Bio-Rad) a un flujo continuo de 0,25 ml/ min. El tampón utilizado fue un tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, 0,2 mM EDTA.

3.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La determinación de la cantidad de proteína de las muestras se realizó por el método de Bradford, utilizando el producto Bio Rad ProteinAssay (Bio-Rad) y BSA como patrón de la concentración de proteína.

3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA (POD)

La actividad POD se determinó por espectrofotometría, utilizando un espectrofotómetro UV-Visible Spectrophotometer 50 Bio (Varian). Se analizó la generación del producto de la reacción entre la O-dianisidina y el peróxido de hidrógeno, que absorbe luz a una longitud de onda de 460 nm:



El medio de reacción consistió en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.2, con 20 mM de peróxido de hidrógeno y dianisidina a saturación. Para conseguir una disolución saturada de dianisidina se disolvió 50 mg de O-dianisidina en

0.5 mL de DMSO y se añadió a 100 ml de tampón en agitación con agitador magnético. Se mantuvo la disolución en agitación durante 30 min temperatura ambiente y se filtró con papel de filtro Wathman 1. Finalmente, se añadía el peróxido de hidrógeno.

El ensayo POD consistió en añadir una alícuota de la muestra a analizar a 1 mL de medio de reacción y analizar el incremento de absorbancia a 460 nm (A460) durante un periodo de tiempo. La actividad enzimática (U/mL) se determinó en función de la siguiente ecuación:

$$U/ml = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1} = (\Delta A_{460}/\text{min}) \times V \times \epsilon^{-1} \times d^{-1} \times v^{-1} \times 10^6$$

V: Volumen de reacción (L)

ϵ : coeficiente de extinción molar del producto = 11.300 M⁻¹ cm⁻¹

d: paso de luz de la cubeta de espectrofotómetro (1 cm)

v: Volumen de la muestra (mL)

Para determinar la sensibilidad de la enzima a la temperatura, se incubó la muestra de enzima) a diferentes temperaturas durante 5 min en un termobloque (Labolan). Seguidamente, se determinó la actividad en el medio de reacción descrito anteriormente.

Para la determinación de la actividad enzimática con respecto al pH, se fabricaron medios de reacción compuestos por fosfato potásico 50 mM, dianisidina a saturación y 20 mM H₂O₂, ajustados a diferentes pH con HCl o NaOH.

La determinación de la actividad enzimática a diferentes concentraciones del sustrato O dianisidina, se prepararon medios de reacción consistentes en 850 μ L de fosfato potásico 50 mM, pH 7.2, más 50 μ L de 400 mM de peróxido de hidrógeno, más 2,5 μ L de disolución de dianisidina en DMSO a diferentes concentraciones. Entonces se agitó vigorosamente la mezcla con vortex y se añadieron 100 mL de la muestra enzimática.

La determinación de la actividad enzimática a diferentes concentraciones del sustrato H₂O₂, se prepararon medios de reacción consistentes en 850 μ L

de fosfato potásico 50 mM, pH 7.2, más 2,5 μ L de 200 mM de dianisidina en DMSO, más 50 μ L de disolución de H₂O₂ a diferentes concentraciones. Entonces se agitó vigorosamente la mezcla con vortex y se añadieron 100 mL de la muestra enzimática.

3.8. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Para la electroforesis de proteínas se fabricaron geles de poliacrilamida de la siguiente manera. Se preparan dos disoluciones de acrilamida. Una disolución formará el gel separador y contiene un 12 % de acrilamida, 4,6 % p/v de Trizma y 0,1 % p/v de dodecil-sulfato sódico (SDS), a pH 8.8. La otra disolución formará el gel concentrador y contiene un 5% de acrilamida, 1,25 % p/v de Trizma y 0,1 % p/v de SDS, pH 6.8. Justo antes de verter la correspondientes disoluciones en un molde formado por dos láminas de cristal separadas 1 mm, se añaden 10 μ L de PSAM y 1 μ L de TEMED por ml de disolución preparada. Primero, se vierte la disolución del gel separador al molde hasta una altura óptima, se cubre su superficie con isopropanol y se espera a que polimerice. Una vez polimerizado, se retira el isopropanol y se añade la disolución del gel concentrador. Inmediatamente, se coloca un molde dentado.

Las muestras sometidas a electroforesis se mezclan con la correspondiente proporción de tampón de carga 4X (200mM Tris-HCl, pH 6,8; 6% p/v SDS; 4% v/v mercaptoetanol; 60% v/v glicerol; 0,3% p/v azul de bromofenol) y se calientan a 100° C durante 5 minutos. Alícuotas de cada muestra se introducen en los pocillos formados en el gel y todo ello se instala en un equipo de electroforesis (Mini Polyacrilamide Gel System, Bio-Rad), con tampón de electroforesis (0,69 % p/v Tris, 2,88 % p/v glicina, 0,1 % p/v SDS). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 200 V durante 45 min. En cada electroforesis se incluyó una muestra de proteínas marcadoras de peso molecular (LMW Calibration Kit for Electrophoresis, GE Healthcare).

Tras la electroforesis se tiñeron los geles con una disolución colorante de azul de Coomasie (0,1 % p/v Coomassie Blue R-250 en ácido acético y metanol al 10 y 40 % v/v, respectivamente).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La literatura científica muestra diferentes procesos de extracción de POD, estos van destinados a buscar la mejor extracción POD dependiendo de la composición de la planta.

En este estudio se concreta la extracción a partir de raíces de zanahoria común, *Daucus carota*, procedente de los comercios locales de la ciudad de Jaén. Las soluciones de ensayo y técnicas empleadas han sido siempre enfocadas a la obtención de un producto final eficiente y de calidad.

Se llevaron a cabo 3 métodos de extracción diferentes, pudiendo diferenciar entre ellos el uso de cromatografías con distintas características. Este hecho se realizó para determinar cuál de las cromatografías obtiene un producto más puro. La metodología e instrumental utilizado para la homogenización de la materia prima es la misma para los 3 métodos.

El proceso de homogenado se realizó a partir de 50 gramos de raíz de zanahoria, la cual se cortó en finas láminas transversales. Estas se llevaron a homogenizar en tampón fosfato potásico 50 mM 0,1 mM EDTA a pH 7,5. Posteriormente, se realiza una segunda homogenización en la cual se añade cocktail inhibitor de proteasas, con el fin de obtener una muestra más homogénea. El último paso del homogenado es el tratamiento con ultrasonidos, destinado a romper los orgánulos que forman parte de la muestra, esta muestra se ha denominado extracto libre de células (ELC). La presencia de la muestra en este apartado es de un tono anaranjado, esto se debe a la presencia de carotenos. Los carotenos deben de eliminarse antes de llevar a la matriz cromatográfica.

Los carotenos interfieren en la cromatografía adhiriéndose a la matriz donde son difíciles o imposibles de eliminar. La eliminación de los carotenos junto con la separación de la POD se lleva a cabo a partir de la precipitación mediante sulfato amónico, los mejores resultados de actividad POD se han obtenido a partir de una saturación de 0% a 40% y posteriormente de 40% a 90% de sulfato amónico.

En la saturación con sulfato amónico desde 0% a 40% se produce la precipitación de los carotenos, evitando que estos contaminen la matriz cromatográfica. Por otra parte, la actividad POD se mantiene en su mayoría en la solución.

La posterior saturación desde 40% a 90% retiene la actividad POD en el precipitado, concentrando la enzima de la muestra. A esta muestra se ha denominado como fracción de sulfato amónico (FSA).

Antes de introducir la muestra concentrada en la columna cromatográfica se debe de eliminar el exceso de sulfato amónico ya que este también interfiere en la matriz, la interferencia en la columna cromatográfica es especialmente delicada en la cromatografía de interacción iónica ya que se altera la capacidad de retención de la matriz cromatográfica. La eliminación de sulfato amónico se puede llevar a cabo a partir de altos procesos de diálisis de la muestra FSA. El siguiente paso es la eliminación del resto de moléculas de la muestra y la concentración de la enzima mediante cromatografía. Además la eliminación del exceso de sulfato amónico también debe de hacerse para realización de la electroforesis y determinación de proteína. En estos casos la eliminación del mismo se realiza mediante el uso de concentradores, los cuales mediante centrifugación separan la muestra del sulfato amónico.

En este paso se han realizado 3 cromatografías con el fin de aprovechar las características del enzima para obtener un producto final lo más puro posible. Las cromatografías se diferencian en las características de retención de moléculas.

La resistencia ejercida por la matriz absorbente permite separar moléculas en función de sus características moleculares. En este caso

hidrofóbicas (CH), iónicas (CII) y tamaño mediante la cromatografía de exclusión molecular (CEM).

La aplicación de la cromatografía hidrofóbica se ha realizado adoptando el método propuesto en Lavery, C. B. et al., 2010. Los demás métodos de purificación no han sido basados en otros estudios sino en nuestro propio intento de explorar otras vías de purificación.

CROMATOGRAFÍA HIDROFÓBICA (CH): La retención ejercida por la matriz obedece a las características de hidrofobicidad superficial del enzima, permitiendo que se separen fracciones de la muestra en función de su hidrofobicidad.

Los resultados obtenidos mediante este método han sido los mejores en cuanto al rendimiento de purificación, **Tabla 2**. La cromatografía hidrofóbica (**Figura 3**) muestra una capacidad de purificación superior a los métodos en los que se ha usado cromatografía de exclusión molecular (CEM) y de interacción iónica (CII).

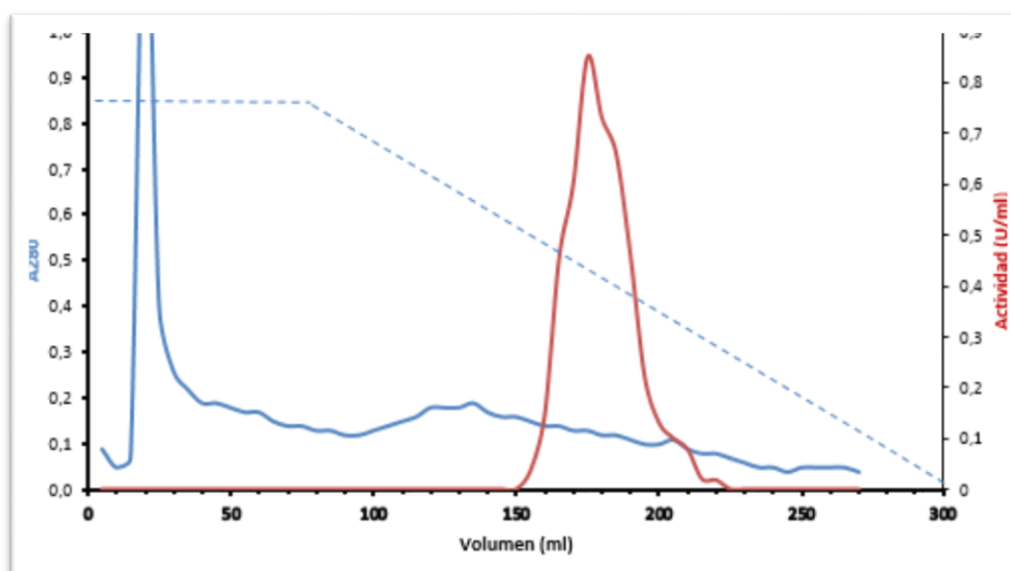


Figura 3. La cromatografía hidrofóbica muestra la siguiente gráfica de purificación. Línea azul corresponde con Absorbancia a 280 nm, línea roja corresponde con actividad POD (U/ml) y línea discontinua representa el gradiente introducido en la columna.

Se puede observar como la mayoría de la actividad POD radica entre los volúmenes 150 y 225, siendo estas las obtenidas como muestra final. La mayor parte de proteínas de la muestra se pierden en los primeros volúmenes de la cromatografía. Se obtiene una muestra final pura y concentrada de POD, ver **Figura 4**.

	Volumen	[Prot.]	Actividad Enzimática	Actividad Total	Actividad Específica	Rendimiento %	E
ELC	97 ml	1,101 mg/ml	0,294 U/ml	28,518 U	0,267 U/mg	100	1
FSA	5,5 ml	1,195 mg/ml	3,8 U/ml	20,9 U	3,179 U/mg	73	12
CH	0,9 ml	0,201 mg/ml	4,36 U/ml	3,924 U	21,691 U/mg	14	81

Tabla 2. Pueden observarse los datos obtenidos en los procesos de purificación, el análisis de los datos muestra que se ha obtenido un rendimiento del 14% tras la cromatografía.

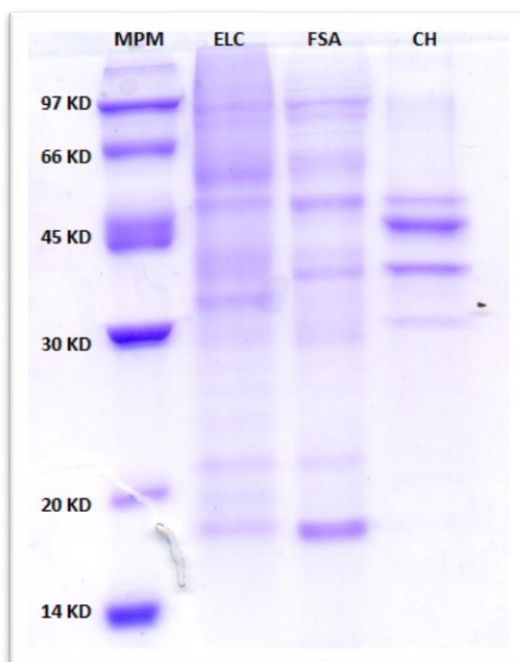


Figura 4. Los distintos procesos de purificación POD pueden observarse en los diferentes pasos tomados en el estudio a partir de la SDS-Page. Marcador de peso molecular (MPM), extracto libre de células (ELC), fracción sulfato amónico (FSA) y cromatografía (CH).

Se puede observar en la **Figura 4** como se ha purificado la fracción procedente al tamaño de la POD, siendo esta obtenida en la muestra final en una concentración superior a las demás proteínas de la electroforesis.

CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN IÓNICA (CII): La retención ejercida por la matriz cromatográfica obedece a las características iónicas del enzima, es decir, la unión del enzima a la matriz se debe a uniones iónicas ejercidas por la misma y por el ambiente. De esta forma se produce la separación de fracciones en función de las características iónicas del enzima.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación, **Tabla 3**. La cromatografía de interacción iónica (**Figura 5**) muestra un perfil de purificación poco eficiente en cuanto a pureza de la muestra POD final, la cromatografía de interacción iónica no ha mostrado buen índice de purificación, de hecho se podría decir que se ha perdido parte de la POD en el proceso, ver **Figura 6**.

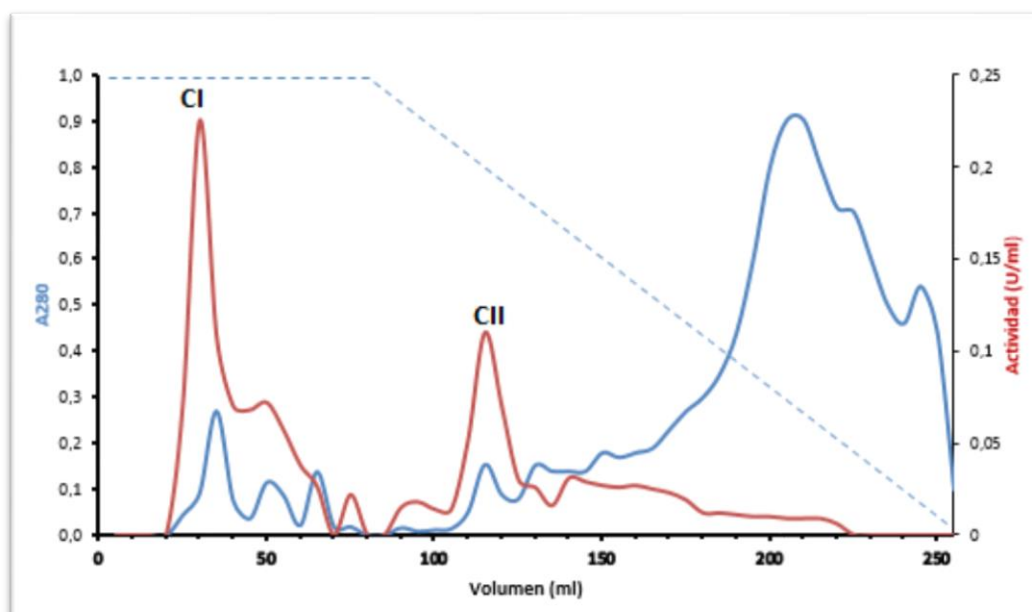


Figura 5. La cromatografía de interacción iónica muestra la siguiente gráfica de purificación, se puede observar como la mayoría de la actividad POD radica entre los volúmenes 20 y 70 (CI) además del segundo pico comprendido

dente los volúmenes 100 y 130 (CII) siendo estos las obtenidas como muestra final. Línea azul corresponde con Absorbancia a 280 nm, línea roja con actividad POD (U/ml) y la línea discontinua representa el gradiente introducido en la columna.

	Volumen	[Prot.]	Actividad Enzimática	Actividad Total	Actividad Específica	Rendimiento %	E
ELC	105 ml	0,755 mg/ml	0,315 U/ml	33,075 U	0,417 U/mg	100	1
FSA	10,6 ml	1,24 mg/ml	1,685 U/ml	17,861 U	1,358 U/mg	54	3
CI	0,5 ml	0,018 mg/ml	0,182 U/ml	0,091 U	10,11 U/mg	0,27	24
CII	0,5 ml	0,08 mg/ml	0,08 U/ml	0,04 U	1 U/ml	0,12	2

Tabla 3. La tabla de purificación muestra muy bajo rendimiento tras la cromatografía de interacción iónica, en este caso no solo se ha perdido un poco de enzima sino que también se ha diluido. CI y CII corresponden con los dos picos de actividad POD obtenidos en la cromatografía.

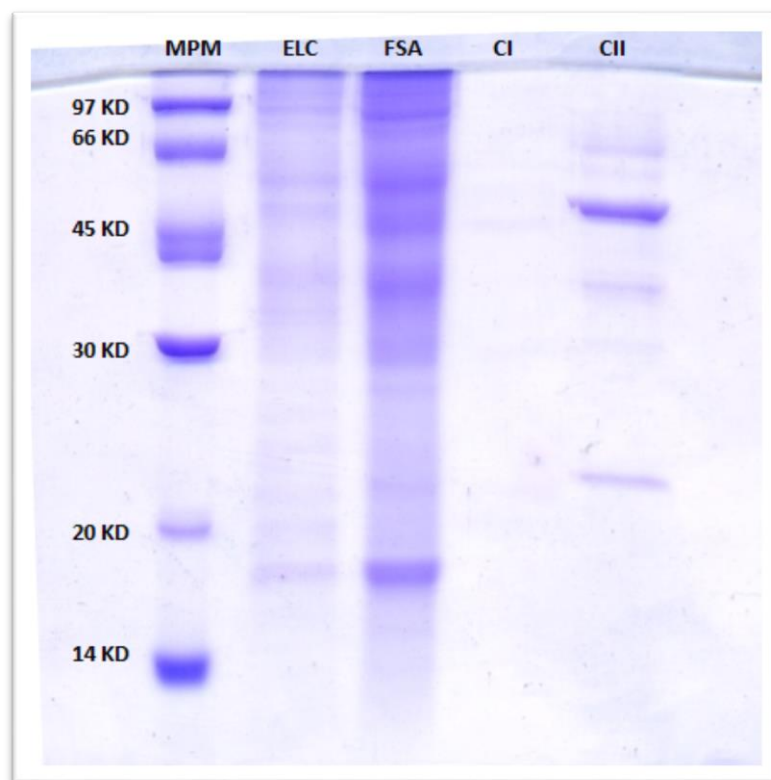


Figura 6. Se pueden observar la presencia de un pico de la cromatografía (CI), el segundo pico (CII) al presentar baja concentración de enzima y no se puede apreciar en la SDS-Page. Marcador de peso molecular (MPM), extracto libre de células (ELC), fracción sulfato amónico (FSA) y cromatografía (C).

Los picos de la cromatografía no parecen dar datos relevantes en cuanto a purificación se refiere. El pico CI no es resolutivo, la concentración de POD y enzimas no se pueden observar. El pico CII muestra una ligera franja a la altura de 45 KD, demostrando que una pequeña cantidad de enzima POD hay sido purificada, aunque no presenta una purificación significativa.

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (CEM): La retención ejercida por la columna se debe al tamaño de los poros de la matriz. Las moléculas más grandes no entran en los poros y se ven expulsadas antes de la matriz, por otro lado las moléculas más pequeñas se verán retenidas saliendo después.

Los resultados obtenidos no son muy útiles en esta técnica, **Tabla 4**. La cromatografía de exclusión molecular (**Figura 7**) muestra un perfil de purificación poco resolutivo. La purificación establecida no ha eliminado la mayoría de las proteínas de la muestra introducida FSA. Esta técnica puede no ser útil en la purificación de POD ya que no se ha obtenido un extracto final ni puro ni concentrado, ver **Figura 8**.

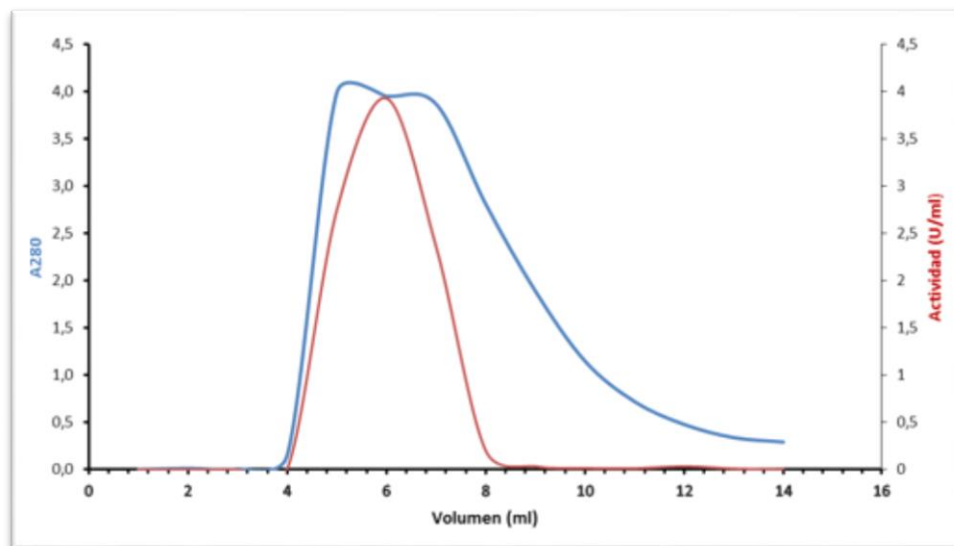


Figura 7. La cromatografía de interacción iónica muestra la siguiente gráfica de purificación. Línea roja con actividad POD (U/ml) y la línea discontinua representa el gradiente introducido en la columna.

Se puede observar como la mayoría de la actividad POD radica entre los volúmenes 4 y 8 siendo estas las obtenidas como muestra final (CEM). Línea azul corresponde con Absorbancia a 280 nm.

	Volumen	[Prot.]	Actividad Enzimática	Actividad Total	Actividad Específica	Rendimiento %	E
ELC	100 ml	1,256 mg/ml	0,616 U/ml	61,6 U	0,49 U/mg	100	1
FSA	3,8 ml	1,42 mg/ml	11,02 U/ml	41,87 U	7,76 U/mg	68	16
CEM	7,3 ml	2,23 mg/ml	3,7 U/ml	27,01 U	1,65 U/mg	43	3,4

Tabla 4. Se puede observar un rendimiento en la cromatografía de exclusión molecular del 43%, aunque la muestra presenta una pureza muy baja esto se debe a que la muestra final presenta baja concentración de enzima. Se puede decir que la POD se ha diluido con respecto a la FSA.

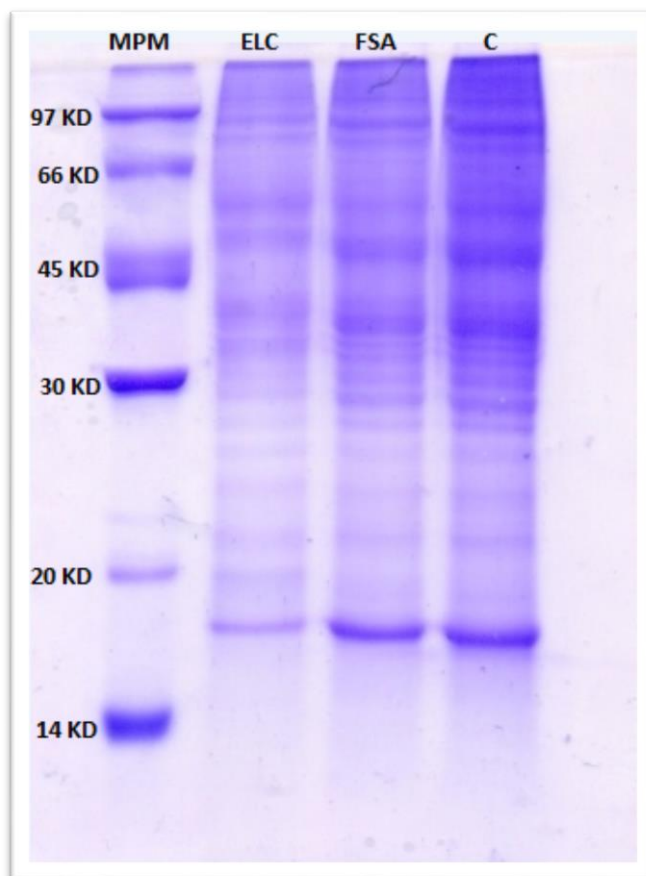


Figura 8. Muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida con las fracciones tomadas del método de cromatografía de exclusión molecular. Marcador de peso molecular (MPM), extracto libre de células (ELC), fracción sulfato amónico (FSA) y cromatografía (C).

Se puede observar la presencia de proteínas en la muestra C o procedente de la cromatografía, en esta se evidencia que la cromatografía no ha sido capaz de purificar la enzima POD ya que en la muestra aparecen bandas de proteínas además de la POD.

La caracterización del enzima POD consiste en una serie de pruebas en las cuales se determinó la actividad del enzima en diferentes condiciones de pH (**Figura 12**), temperatura (**Figura 13**) y de concentración de sustratos siendo estos O-dianisidina (**Figura 10**) y peróxido de hidrógeno (**Figura 11**).

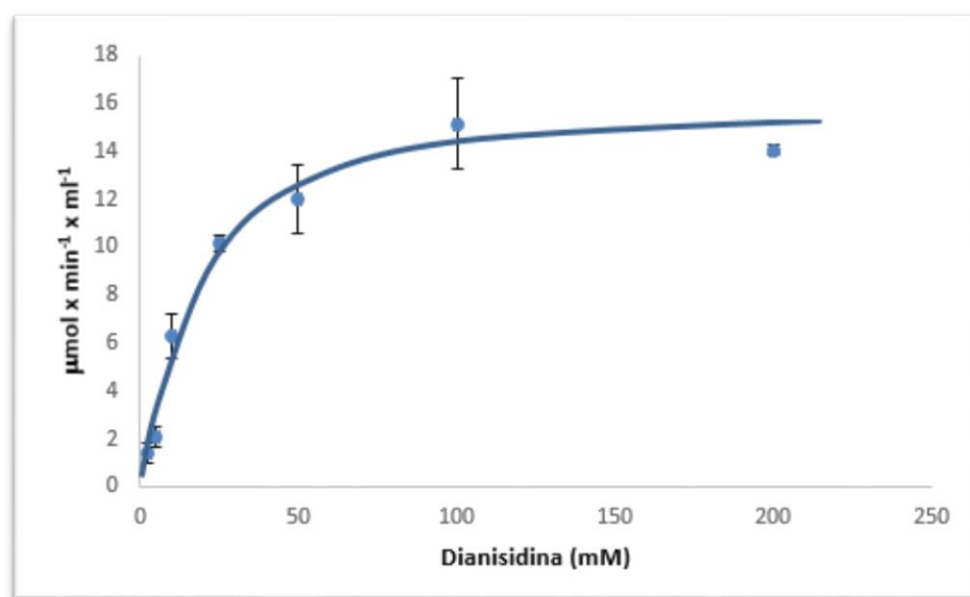


Figura 10. La gráfica muestra la actividad POD en respuesta con la concentración de O-dianisidina como sustrato. A partir de los cálculos de la cinética enzimática extrapolados con la ecuación de lineweaver-burk se ha calculado que la Km es de 24,4 mM.

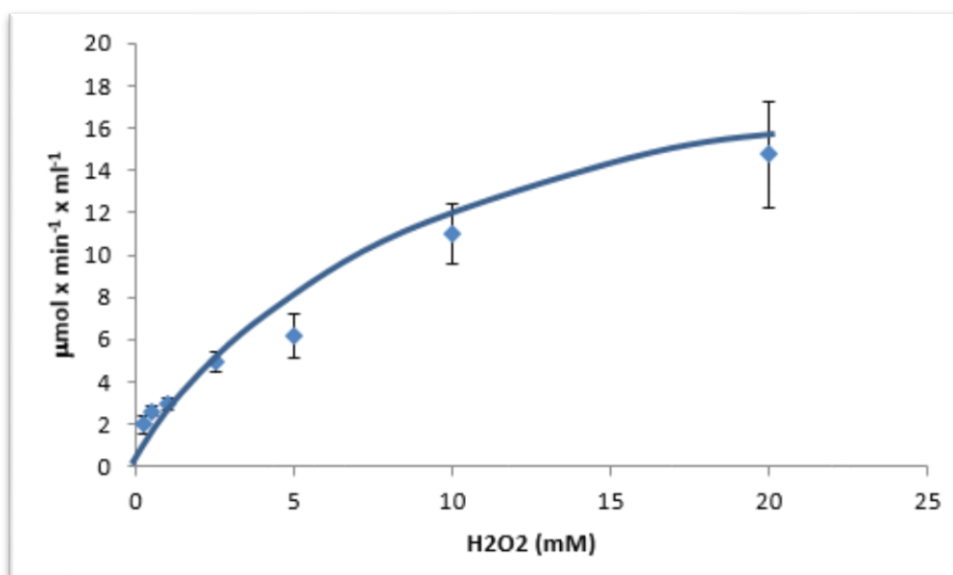


Figura 11. La gráfica muestra la actividad POD en respuesta con la concentración de peróxido de hidrógeno como sustrato. A partir de los cálculos de la cinética enzimática extrapolados con la ecuación de lineweaver-burk se ha calculado que la Km es de 0,45 mM.

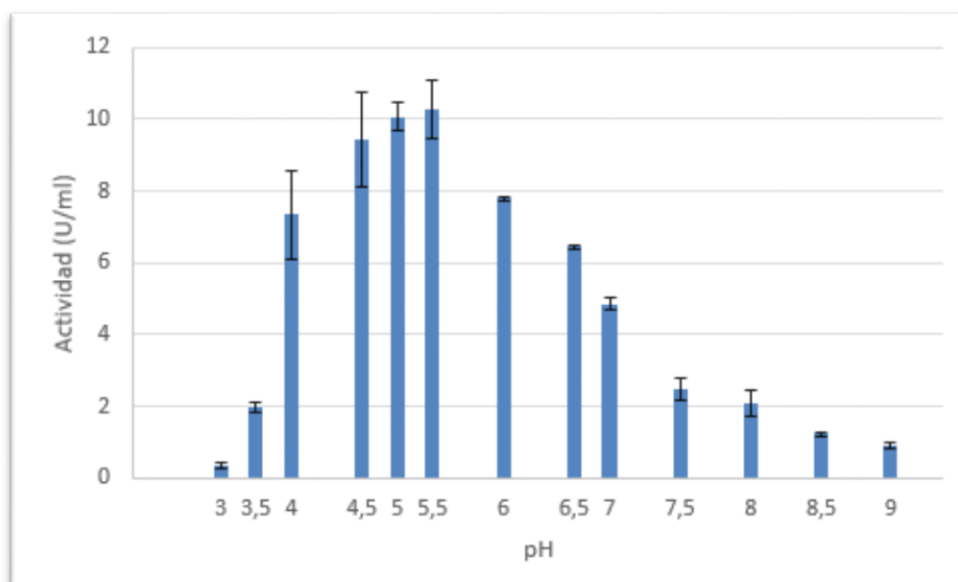


Figura 12. La gráfica muestra la relación que existe entre el pH al que se ha sometido el enzima POD y la actividad de la misma.

La actividad ha sido óptima a un pH de 5,5. Esto sugiere que la POD purificada mediante este método es esencialmente ácida o aniónica, las suales

soportan y presentan una actividad óptima con pH menor a 7. Se puede decir que la actividad POD encontrada en *Daucus carota* se encuentra entre pH 4 y pH 7, siendo 5,5 el pH óptimo.

Además la actividad catalítica del enzima no desaparece y se mantiene hasta un pH 9 con actividad muy reducida pero no inexistente.

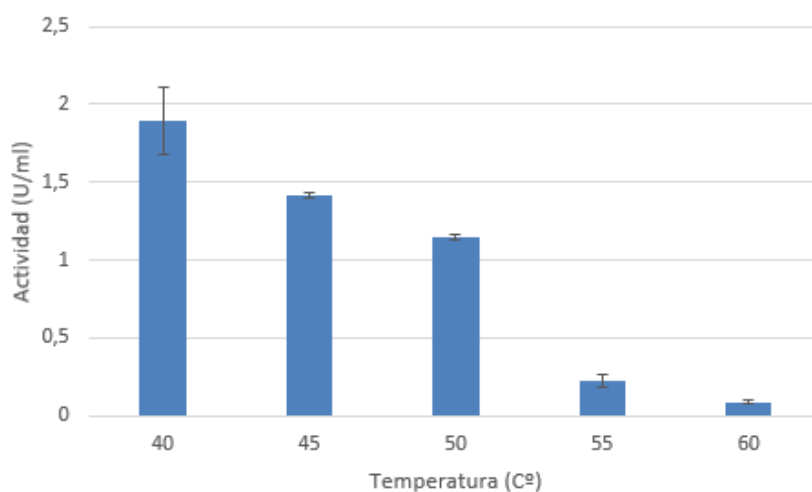


Figura 13. Se muestra la actividad POD frente a la temperatura.

La actividad catalítica POD se somete a diferentes ambientes térmicos, viéndose en esta gráfica la pérdida de actividad a partir de 40 C°.

La actividad POD desciende progresivamente a partir de 40 C° con una actividad de 1,9 U/ml hasta 60 C° donde la actividad es casi nula.

Se produce una pérdida de actividad sugerente a partir de 50 C°, este punto puede ser el punto crítico de termoestabilidad del enzima, a partir del cual se produce la caída significativa de la actividad enzimática.

5. CONCLUSIÓN

Es posible que sea la cromatografía sea la que dicte la eficiencia del proceso total de purificación, en este caso la cromatografía de interacción hidrofóbica es la que mejor aprovecha las características del enzima POD para su purificación.

En los demás métodos parecen obtenerse datos no solo más bajos en cuanto a concentraciones POD sino diluidas con respecto a la introducida en la cromatografía. Podemos destacar la eficacia de la cromatografía de interacción hidrofóbica sobre las demás en el proceso de purificación.

La caracterización del enzima muestra que la actividad enzimática baja progresivamente a partir de 40 C°, siendo posiblemente 50 C° el punto crítico de termoestabilidad del enzima.

Por otro lado la actividad frente al pH sugiere que el pH óptimo del enzima es 5,5. Se evidencia que la POD purificada de *Daucus carotra* se encuentra dentro del grupo de las PODs ácidas o aniónicas, presentando un ph menor a 7.

En los datos obtenidos se encuentran actividades bajas con pH comprendido entre 7 y 9. Posiblemente en nuestra muestra final exista la presencia de pequeñas cantidades de isoenzimas neutras. Estas isoenzimas pueden comprender la actividad que se realiza entre pH 7 y pH 9. Esta actividad también puede ser debida a pequeñas fracciones de POD ácida sin desnaturalizar.

El estudio de la cinética enzimática con respecto a la concentración de sustrato presenta un valor de Km frente a la O-dianisidina de 24,4 mM, en cuanto a la cinética enzimática frente a la concentración de peróxido de hidrógeno se presenta una Km de 0,45 mM, similar a la descrita por Lavery et al., 2010.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Almagro, L.; Gómez, L.V.; Belchi-Navarro, S.; Bru, R.; Barceló, A.R.; Pedreño, M.A. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*. 60:377–390.
2. Bach, A.N.; Chodat, R. (1902). Ber. Untersuchungen über die rolle der peroxide in der chemie der lebendenzelle. *Deutsch. Chem. Gesell.* 35:2466-2470.
3. Campa, A. (1991). Biological role of plant peroxidases: Known and potential function. *Peroxidases in Chemistry and Biology*. Everse, J.; Everse, K. E.; Grisham, M. B. (Eds). CRC.Press, Boca Raton.
4. Dalal, S.; Gupta, M.N. (2007). Treatment of phenolic wastewater by horseradish peroxidase immobilized. *Chemosphere*. 67:741–747.
5. Dawson, J.H. (1988). Probing structure-function relations iii heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science*. 240:433-439.
6. Fujiyama, K.; Takemura, H.; Shibayama, S.; Kobayashi, K.; Takano, M.; Yamada, Y.; Okada, H. (1988). Structure of the horseradish peroxidase isozyme C genes. *Eur. J. Biochem*. 173:681 -687.
7. Furtmuller, P.G.; Zederbauer, M.; Jantschko, W.; Helm, J.; Bogner, M.; Jakopitsch, C.; Obinger, C. (2006). Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Arch Biochem Biophys*. 445:199-213.

8. Gonçalves, E.M.; Pinheiro, J.; Abreu, M.; Brandão, 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.
9. Hamid, M.; Rehman, K.U. (2009). Potential applications of peroxidases. *Food Chem*. 15:1177–1186.
10. Horie, T.; Vanderkooi, J.M.; Paul, K.G. (1985). Study of the active site of horseradish peroxidase isoenzymes A and C by luminescence. *Biochemistry*. 24:7935–7941.
11. Kim, E.; Choi, Y.J.; Chae, H.J.; Chu, K.H. (2006). Removal of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase in the presence of surfactants. *Biotechnol. Bioprocess Eng*. 11:462–465.
12. 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.
13. Lavery, C.B.; Morgan, C.; MacInnis, M.; MacDonald, J.; Williams, J.B.; Spencer, C.A.; Burke, A.; Irwin, D.J.; Godwin, B.D. (2010). *J. Agric. Food Chem*. 58: 8471–8476.
14. Mittler, R.; Zilinskas, B.A. (1991). Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Federation of European Biochemical Societies*. 289:257-259.

15. Passardi, F.; Cosio, C.; Penel, C.; Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*. 24:255–265.
16. Passardi, F.; Penel, C.; Dunand, C. (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Science*. 9:534-540.
17. Passardi, F.; Zamocky, M.; Favet, J.; Jakopitsch, C.; Penel, C.; Obinger, C.; Dunand, C. (2007). Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: are there patches of order in chaos? *Gene*. 397:101-113.
18. Shannon, L.M.; Kay, E.; Lew, J.Y. (1966). Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots I. isolation and physical properties. *The Journal of Biological Chemistry*. 241:2166-2172.
19. Shiro, Y.; Kurono, M.; Morishima, I. (1986). Presence of endogenous calcium ion and its functional and structural regulation in horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem*. 261:9382–9390.
20. Soysal, Ç.; Söylemez, Z. (2005). Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. *Journal of Food Engineering*. 68:349–356.
21. Theorell, H. (1942). Crystalline peroxidase. *Enzymologia*. 10:250-252.
22. 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.
23. Veitch, N.C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. 65:249–259.

24. Wariishi, H.; Gold, M.H. (1990). Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.* 265:2070-2077.
25. Welinder, K.G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:388-393.