

**CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS DE
AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA DE PALMA REAL
(*Roystonea regia*)**

ALBA ROCIO MORALES ARMESTO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2014**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS DE
AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA DE PALMA REAL
(*Roystonea regia*)**

ALBA ROCIO MORALES ARMESTO

Trabajo de grado para optar al título de Químico

Director:

RODRIGO GONZALO TORRES SAEZ, Ph.D

Codirectores:

LUIS OVEIMAR BARBOSA JAIME, MSc.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a mis padres Fabio Morales y Rocio Armesto por su apoyo incondicional, por su voz de aliento durante toda esta importante etapa de mi vida, por su amor y sus consejos que me ayudaron a culminar mi carrera profesional.

A mis hermanos Leonardo, Gerardo, Daniel quienes me enseñaron que las oportunidades hay que aprovecharlas y luchar por lograr nuestros sueños.

Al Dr Rodrigo Torres Sáez y la Dr. Claudia Ortiz por su paciencia, orientación y aportes en el desarrollo de este trabajo de grado.

Al MSc. Luis Oveimar Barbosa por su gran colaboración, sus enseñanzas y amistad.

A mis grandes amigas Mariel Bacca, Mónica Diaz porque nunca me dejaron desfallecer y siempre me brindaron su más sincera amistad.

A todos los integrantes del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, porque encontré nuevos amigos, grandes colegas, y de cada uno de ellos aprendí que para esta profesión hay que ser pacientes y perseverantes.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. HIPÓTESIS	18
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GENERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MARCO DE REFERENCIA	20
3.1 ESTUDIOS SOBRE PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS DE PEROXIDASA	20
3.2 ESTUDIOS SOBRE EL DESARROLLO DE AGREGADOS ENTRECRUZADOS ENZIMÁTICOS (CLEA)	22
4. MARCO TEÓRICO	25
4.1 GENERALIDADES DE LAS ENZIMAS	25
4.2 CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS	27
4.2.1 Óxido-reductasas	28
4.3 PEROXIDASAS	28
4.3.1 Familia de peroxidasas	29
4.3.2 Funcionalidad de las peroxidasas	31
4.4 FUENTES DE PEROXIDASAS	31
4.5 LA PALMA REAL (<i>Roystonea regia</i>)	32
4.6 PEROXIDASA DE PALMA REAL	33
4.6.1 Mecanismo de reacción de peroxidasa de palma real	33
4.6.2 Propiedades estructurales de peroxidasa de palma real	34
4.6.3 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la peroxidasas	37
4.7 APLICACIONES DE LAS PEROXIDASAS	39

4.7.1	Biorremediación	39
4.7.2	Biomedicina.....	43
4.7.3	Biosensores	43
4.8	Inmovilización de enzimas	45
4.9	CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN(GUISAN, 2006)	45
4.9.1	Métodos con soportes(Arroyo, 1999)	46
4.9.2	Métodos libre de soporte.....	46
4.10	ENTRECRUZAMIENTO DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS (CLEAs)	47
4.10.1	Rasgos característicos de los CLEAs	49
4.11	EL GLUTARALDEHÍDO	50
4.11.1	Aspectos generales(Guisan, 2006)	50
4.11.2	Comportamiento químico en soluciones acuosas	50
4.11.3	Reacción con proteínas.....	51
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
5.1	MATERIALES	56
5.2	MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	56
5.2.1	Extracción de la peroxidasa de palma real.....	57
5.2.2	Efecto del pH sobre la actividad catalítica de la peroxidasa de palma real soluble	58
5.2.3	Evaluación de la estabilidad de la peroxidasa de la palma real soluble	58
5.2.4	Elaboración de los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real	59
5.2.5	Evaluación de la estabilidad de los agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real(CLEA-PPR)en diferentes condiciones experimentales	62
5.2.6	Evaluación de la reacción de los CLEA-PPR en la decoloración del naranja de metilo.	62
5.3	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	63
5.3.1	Determinación de la actividad enzimática.	63
5.3.2	Electroforesis SDS-PAGE(Laemmli, 1970)	64
5.3.3	Determinación de proteínas	65

5.3.4	Determinación de la remoción del naranja de metilo catalizada por los CLEAs de PPR	65
6.	RESULTADOS y DISCUSIÓN	66
6.1	EXTRACCIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL.....	66
6.2	ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA PEROXIDASA SOLUBLE	68
6.3	PERFIL DE ACTIVIDAD/PH DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL.....	69
6.4	EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA PEROXIDASA DE LA PALMA REAL SOLUBLE	70
6.4.1	Estabilidad térmica de la peroxidasa soluble	70
6.4.2	Efecto de la dilución proteica sobre la estabilidad de la PPR frente al peróxido de hidrógeno	74
6.5	AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA DE PALMA REAL	80
6.6	EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD EN PH, TEMPERATURA Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PERÓXIDO, DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS OBTENIDOS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS.....	83
6.6.1	Efecto del pH sobre la actividad enzimática de los CLEAs de PPR.....	83
6.6.2	Estabilidad térmica de los CLEAs	85
6.6.3	Estabilidad en presencia de peróxido de hidrógeno de los CLEAs	88
6.7	EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN DE LOS CLEA-PPR EN LA DECOLORACIÓN DEL NARANJA DE METILO.....	93
6.7.1	Cinética de remoción del colorante con los CLEA-PPR.....	94
6.7.2	Evaluación de los CLEAs de PPR en diferentes ciclos de reacción con naranja de metilo	95
7.	CONCLUSIONES.....	98
	BILBIOGRAFÍA.....	100
	ANEXOS.....	111

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Palma real (<i>Roystonea regia</i>)	32
Figura 2. Mecanismo general de catálisis de las peroxidases(Banci,1997).....	34
Figura 3. Estructura tridimensional de la PPR. Representación de la proteína PPR determinada por rayos- X, se muestran las 13 α -hélices, el grupo hemo(verde) , dos iones calcio(morado), cuatro puentes disulfuros (cisteínas aguamarina) y los 9 sitios de N-glicosilación. La estructura 3D de PPR fue obtenida de Protein Data Bank (código PDB: 3HDL) y visualizada usando Pymol 0.99	35
Figura 4. Modelo de estructura de superficie 3D de PPR indicando los residuos de asparginas (en color aguamarina), sitios de glicosilación y los nueve glicanos encontrados en la estructura nativa de la PPR. La estructura de superficie 3D de PPR fue obtenida de Protein Data Bank (código PDB: 3HDL) y visualizada usando Pymol 0.99.....	36
Figura 5. Elaboración de agregados entrecruzados de enzimas (CLEAs).....	48
Figura 6. Posibles formas del glutaraldehído en soluciones acuosas(Migneault y Dartiguenave, 2004).	51
Figura 7. Reacciones del glutaraldehído con proteínas (Migneault y Dartiguenave, 2004).....	52
Figura 8. Reacciones del glutaraldehído con proteínas en condiciones ácidas y neutras(Migneault y Dartiguenave, 2004)	53
Figura 9. Modelo de estructura de superficie 3D de PPR indicando los grupos amino (color amarillo). A) Cara frontal. B) Cara posterior. Representación obtenida de Protein Data Bank (código PDB: 3HDL) y visualizada usando Pymol 0.99.....	54
Figura 10. Entrecruzamiento de enzimas con glutaraldehído. Los residuos de lisinas (azules) expuestos para entrecruzamientos. A) entrecruzamiento intermolecular. B) entrecruzamiento intramolecular.....	55

Figura 11. Elaboración de agregados entrecruzados. (Schoevaart y col. 2004)....	60
Figura 12. Oxidación de guayacol catalizada por la PPR	64
Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE del extracto de peroxidasa de palma real (PPR) purificado. Carril B: marcadores de peso molecular; Carril A: extracto purificado de PPR.....	68

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de las enzimas.	27
Tabla 2. Clasificación de peroxidasa según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular.	29
Tabla 3. Factores constantes en la elaboración de agregados entrecruzados.	59
Tabla 4. Actividad catalítica de la peroxidasa soluble de la palma real.	69
Tabla 5. . Tiempos de vida media (minutos) de la PPR soluble bajo diferentes condiciones de inactivación térmica.	70
Tabla 6. Tiempos de vida media (minutos) de la PPR soluble bajo diferentes condiciones de inactivación térmica.	70
Tabla 7. Tiempos de vida media (minutos) de loa PPR soluble en presencia de peróxido de hidrogeno a pH 6. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral Xg	75
Tabla 8. Monitoreo de la actividad catalítica durante la síntesis de CLEAs.	81
Tabla 9. Tiempos de vida media (minutos) de los CLEAs de PPR bajo diferentes condiciones de inactivación térmica.	87
Tabla 10. Tiempos de vida media (minutos) de CLEAs y PPR soluble en presencia de peróxido de hidrogeno a pH 6.	90

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Rango de linealidad durante la medición de la aparición del producto de reacción tetraguayacol.	111
Anexo B. Curva calibración para la determinación de proteína mediante el método del BRADFORD	111
Anexo C. Calculo de la actividad volumétrica de la peroxidasa soluble de la palma real (<i>Roystonea regia</i>).	113
Anexo D. Calculo de tiempos de vida media.	114
Anexo E. Estabilidad térmica de la PPR soluble. La inactivación térmica se realizó para dos diluciones a a pH 5 a 10mM A) 70°C-75°C ; B)80°C ; C)90°C.	114
Anexo F. Estabilidad térmica de la PPR soluble. La inactivación térmica se realizó para dos diluciones a a pH 7 con buffer 10mM a A) 70°C-75°C ; B)80°C.	114
Anexo G. Estabilidad térmica de la PPR soluble. La inactivación térmica se realizó para dos diluciones a a pH 9 con buffer 10mM a A) 70°C-75°C ; B)80°C.	114
Anexo H. Estabilidad en peróxido de hidrógeno de CLEAs y PPR soluble. La inactivación con H ₂ O ₂ se realizó a pH 7, 25°C y concentración de H ₂ O ₂ [1mM] para las soluciones de CLEAs y PPR soluble con igual unidades de actividad catalítica (9U).	114
Anexo I. Espectro de la cinética de remoción del colorante naranja de metilo con CLEAs de PPR.	114
Anexo J. Espectro de reutilización de los CLEAs de PPR en ciclos de remoción del colorante naranja de metilo.	114

RESUMEN

TITULO: CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS DE AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA DE PALMA REAL (*Roystonea regia*)*

AUTOR: ALBA ROCIO MORALES ARMESTO**

PALABRAS CLAVES: ENZIMA, PEROXIDASA, INSOLUBILIZACIÓN.

DESCRIPCION

Las enzimas son catalizadores biológicos que presentan propiedades de alta eficiencia catalítica, selectividad frente al sustrato y especificidad frente al producto, en condiciones suaves de pH, temperatura y presión. Sin embargo, a pesar de las claras ventajas que estas presentan frente a catalizadores químicos convencionales, tienen desventajas asociadas principalmente a su origen biológico, como que son catalizadores solubles, generalmente inestables a pH y temperaturas extremas, a menudo inhibidas por altas concentraciones de sustratos y productos de reacción. Entre las enzimas con mayor potencial de uso en el área ambiental, especialmente en biorremediación se encuentra la peroxidasa de palma real (*Roystonea Regia*)(PPR), ya que posee alta estabilidad térmica y en condiciones drásticas de pH. Esta enzima es una oxido-reductasa que ha sido utilizada en varios estudios de remoción de compuestos orgánicos, como fenol en aguas contaminadas.

Con el fin de buscar solución a las desventajas que presentan la PPR, este trabajo tiene como objetivo mostrar las mejoras en estabilidad y actividad de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) a partir de extracto de peroxidasa de palma real (PPR) en condiciones extrema de pH y temperatura y el efecto de los CLEA-PPR en la decoloración del naranja de metilo, para determinar la capacidad de remoción de los CLEAs y su uso como biocatalizador reutilizable. El entrecruzamiento de agregados enzimáticos se realizó por medio de reactivos bifuncionales como el glutaraldehído.

Se obtuvieron CLEAs con alta estabilidad a 65°C y pH 3, esto demostró que el entrecruzamiento confiere mayor estabilidad a la enzima. Por otro lado se logró la remoción de más del 50% del colorante a pH 3 lo cual lo hace un potencial biocatalizador en procesos de biorremediación. Además se logró separar por métodos físicos el biocatalizador del medio de reacción, siendo esta una gran ventaja frente a otros catalizadores.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Química. Director: Rodrigo Gonzalo Torres Saez, Ph.D

ABSTRACT

TITLE: DESCRIPTION OF BIOCATALYTIC PROPERTIES OF ROYAL PALM PEROXIDASE CROSSLINKED AGGREGATES (*Roystonea regia*)*.

AUTHOR: ALBA ROCIO MORALES ARMESTO**

KEYWORDS: ENZYME, PEROXIDASE, INSOLUBILIZATION

DESCRIPTION

Enzymes are biological catalysts that have properties of high catalytic efficiency, selectivity towards the substrate and specificity to the product under mild conditions of pH, temperature and pressure. However, despite the clear advantages they present over conventional chemical catalysts, they have disadvantages mainly associated with their biological origin; like they are soluble catalysts, generally unstable at extreme pH and temperatures, and often inhibited by high concentrations of substrates and reaction products. Among the enzymes with a greater potential for use in the environmental area, especially in bioremediation, is the royal palm (*Roystonea Regia*) peroxidase (PPR), since it has high thermal stability and in drastic pH conditions. This enzyme is an oxidoreductase which has been used in several studies of removal of organic compounds such as phenol in contaminated water.

In order to find a solution to the disadvantages of the PPR, this work aims to show the improvements in stability and activity of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) from the peroxidase extract of royal palm tree (PPR) in extreme pH and temperature conditions and the effect of CLEA-PPR in methyl orange discoloration to determine the removal capacity of CLEAs and their use as a reusable biocatalyst. The crosslinking of enzyme aggregates was performed using bifunctional reagents such as glutaraldehyde.

High stability CLEAs were obtained at 65°C and pH 3, this showed that the crosslinking confers greater stability to the enzyme. On the other hand the removal of more than 50% of the dye at pH 3 was achieved, which makes it a potential biocatalyst in bioremediation processes. In addition it was possible to separate by physical methods the biocatalyst from the reaction medium, being this a great advantage over other catalysts.

* Work Degree

** Faculty of Basic Sciences. School of Chemistry. Directed by Rodrigo Gonzalo Torres Saez, Ph.D

INTRODUCCIÓN

Desde una perspectiva ambiental las enzimas presentan muchas ventajas frente a los catalizadores químicos convencionales no biológicos. Estas poseen gran actividad catalítica, especificidad y selectividad frente al sustrato, bajo condiciones óptimas de temperatura, pH, concentración enzima-sustrato y presión atmosférica, lo cual las convierte en excelentes catalizadores para procesos de transformación.

Por otro lado, las enzimas se han ido optimizando, a través de la evolución biológica, para trabajar dentro de complejos ciclos metabólicos sometidos a múltiples niveles de regulación biológica. Por esta razón, la mayoría de las veces las enzimas no poseen todas las propiedades necesarias para su implementación como catalizadores en reactores industriales, aspecto que se convierte en una desventaja a la hora de ser aplicadas en procesos químicos convencionales.

En general, las enzimas son catalizadores solubles, comúnmente inestables y a menudo inhibidos por altas concentraciones de sustratos y productos de reacción. En muchas ocasiones las enzimas no presentan las propiedades de actividad y selectividad óptimas, cuando se requiere que catalicen procesos diferentes de los naturales sobre sustratos sintéticos y en condiciones de reacción no-convencionales. Sin embargo, las propiedades de las enzimas se pueden mejorar mediante su insolubilización y, de esta manera, ser utilizadas de forma masiva como catalizadores industriales en procesos de química sostenible: química fina y farmacéutica, biocombustibles, química de alimentos, química analítica, entre otros.(Teijón y Teijón, 2001)

Entre las enzimas que tienen potencial para ser usados en procesos químicos a nivel industrial se encuentran las oxidoreductasas, que catalizan reacciones de oxidación de compuestos orgánicos por medio del uso diferentes tipos de aceptores

electrónicos. De éstas se destacan las peroxidasas, las cuales tienen la capacidad de catalizar reacciones de oxidación de moléculas orgánicas utilizando peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones. Las peroxidasas son enzimas que podrían favorecer la eliminación parcial de compuestos fenólicos presentes en aguas residuales industriales y acelerar los procesos de biorremediación. Para el caso particular de la peroxidasa de palma real (PPR), una enzima que según indican varios estudios posee una buena estabilidad, se ha determinado recientemente que su forma monomérica es menos estable que el dímero a altas temperaturas, por lo cual se ha llegado a la conclusión que la estabilidad térmica realmente es conferida por una conformación dimérica que presenta la enzima a determinados valores de pH y concentración proteica. Además, se ha sugerido el uso de esta enzima como un biocatalizador en procesos industriales relacionados con síntesis orgánica y de polímeros, remoción de compuestos fenólicos en agua industriales, decoloración de tintes en aguas residuales, entre otros (Zamorano y col., 2008).

Como consecuencia de esto, se han buscado alternativas de insolubilización enzimática que permitan la estabilización de las enzimas en procesos catalíticos industriales, su separación del medio de reacción, y su reutilización, con la correspondiente reducción de costos de proceso y disminución de residuos (Cao y col., 2003). En los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas de inmovilización que permiten insolubilizar las enzimas conservando y mejorando sus propiedades catalíticas. Una de las más recientes es el entrecruzamiento de agregados enzimáticos por medio de reactivos bifuncionales como el glutaraldehído. Esta técnica presenta grandes ventajas en cuanto a simplicidad en el proceso, mejoras en la estabilidad de proteínas y aumento en el rendimiento de la actividad catalítica.

Teniendo en cuenta lo descrito previamente, se llevó a cabo la caracterización de las propiedades biocatalíticas de la peroxidasa de palma real (PPR) soluble e insolubilizada. Para la insolubilización, se utilizó la técnica de entrecruzamiento de

agregados enzimáticos, lo cual se hizo para conservar la conformación dimérica de la PPR con el objetivo de mejorar la estabilidad de la enzima y potencializarla como biocatalizador en aplicaciones industriales.

En este trabajo, se presentan los resultados de la elaboración de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs), utilizando un extracto purificado de peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*). Asimismo, se exponen los resultados de la caracterización de estos CLEAs en condiciones extremas de pH, temperatura y concentración de peróxido de hidrógeno; y de la evaluación de la reacción de los CLEA-PPR en la decoloración del colorante naranja de metilo por los CLEAs, para determinar la capacidad de decolorización en la remoción de colorantes de estos agregados y su potencial uso como biocatalizador reutilizable.

1. HIPÓTESIS

¿Es posible estabilizar la estructura de la PPR a través de estrategias de ingeniería de proteínas como la insolubilización de las enzimas mediante la técnica de entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEAs)?

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar agregados entrecruzados (CLEAs) de peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) con propiedades biocatalíticas mejoradas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer y purificar la peroxidasa de hojas de palma real (*Roystonea regia*).
- Evaluar el efecto del pH sobre la actividad catalítica del extracto soluble purificado de peroxidasa de palma real.
- Determinar la estabilidad térmica de la peroxidasa de palma real.
- Evaluar el efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno en la inactivación de la peroxidasa de palma real.
- Analizar el efecto del glutaraldehído como agente entrecruzante para la formación de CLEAs.
- Caracterizar las propiedades biocatalíticas de actividad y estabilidad térmica de los CLEAs de peroxidasa de palma real.

3. MARCO DE REFERENCIA

3.1 ESTUDIOS SOBRE PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS DE PEROXIDASA.

En el año 2005, Baquero y col., determinaron la actividad de la peroxidasa de pitaya amarilla, evidenciando el funcionamiento complementario que presentó esta enzima en el sistema antioxidante del fruto (Baquero y col., 2005).

En el año 2009, Caicedo y col., evaluaron el comportamiento de la peroxidasa en frutos de lulo con el fin de determinar su participación en las respuestas bioquímicas hacia el patógeno *Colletotrichum acutatum*, causante de la antracnosis (Caicedo y col., 2009).

Otros estudios realizados en los últimos años se han dirigido a la viabilidad del uso de enzimas para mejorar la calidad de muchos procesos. Con esto se evidencian que dichas macromoléculas biológicas pueden ser una gran herramienta en biotecnología. Por ejemplo, en el año 2005, Ikehata y col., evaluaron las propiedades catalíticas de peroxidasa extracelular proveniente de dos especies de hongos *Coprinus sp.* para el tratamiento de aguas residuales fenólicas. Estos investigadores determinaron que la peroxidasa de *Coprinus sp* UAMH 10067, fue más estable a 50°C y en condiciones básicas en comparación con la peroxidasa extraída de *Coprinus cinereus* UAMH 4103. Ambas enzimas evidenciaron que la eficiencia de eliminación de fenol era comparable con otras peroxidosas vegetales previamente estudiadas (Ikehata y col., 2005).

En el 2008, Zamorano y col., publicaron el estudio termodinámico de la peroxidasa de la palma real *Roystena regia* (PPR) y, con los resultados obtenidos, determinaron que la enzima forma dímeros, característica que la diferencia de otras peroxidosas vegetales, por lo que probablemente sea más estable. Además, los

autores observaron que la estabilidad estructural de la PPR era dependiente del pH. Por otro lado, realizaron un análisis térmico que indicó su alta estabilidad a temperaturas mayores de 70°C y, finalmente, concluyeron que la desnaturalización estaba acoplada a la disociación del dímero, el cual se forma en solución, y dependiendo del pH y de la concentración en la que se realizó el ensayo. De acuerdo con lo mencionado anteriormente, propusieron que esta enzima podría ser utilizada con fines biotecnológicos(Zamorano y col., 2008).

Al año siguiente, Zamorano y col., estudiaron la estabilidad estructural de una peroxidasa, proteína dimérica extraída de hojas de palma de *Chamaerops excelsa* (CEP). La caracterización fue realizada por calorimetría diferencial de alta sensibilidad, dicroísmo circular y fluorescencia de triptófano en estado estable a un pH de 3. Como resultado, encontraron que la CEP a pH 3, comparada con otras peroxidasas, es sustancialmente más estable que la peroxidasa de rábano picante isoenzima C (CPRH) y la peroxidasa aniónica de maní (*Arachis hypogaea*L.) (aprx). Asimismo, observaron que presentaba prácticamente la misma estabilidad que la peroxidasa de la palma de aceite africana *Elaeis guineensis* (AOPTP) y la de peroxidasa de palma real *Roystonea regia* (RPTP)(Zamorano y col., 2009).

Abdurrahman y col., en el 2011, caracterizaron bioquímicamente la peroxidasa proveniente de la palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.), de la cual obtuvieron como resultado, una elevada actividad catalítica, buena estabilidad en un amplio rango de pH, excelente termoestabilidad, especificidad en un amplio rango de sustratos y estabilidad en la presencia de una alta concentración de metales. Con estos resultados, los investigadores demostraron que esta peroxidasa tiene buen potencial para aplicaciones industriales y biomédicas(AI-Senaidy y Ismael, 2011).

En el 2012, Cai y col., purificaron una nueva hemoperoxidasa de hojas de *Jatropha curcas*, una importante fuente de bio-diesel. La caracterización de esta peroxidasa permitió conocer que la masa molecular de esta enzima purificada fue de alrededor

de 48 kDa. El análisis de filtración en gel reveló que la enzima era un monómero bajo condiciones nativas. La peroxidasa purificada tenía amplia especificidad de sustrato, gran estabilidad frente a la alta temperatura, pH extremo, disolvente orgánico y peróxido de hidrógeno, lo que sugirió que la enzima podría ser una candidata potencial para aplicaciones industriales y biomédicas(Cai y col., 2012).

3.2 ESTUDIOS SOBRE EL DESARROLLO DE AGREGADOS ENTRECruzADOS ENZIMÁTICOS (CLEA)

Durante los últimos años se ha venido estudiando el desarrollo de diferentes estrategias y protocolos de inmovilización de enzimas que permitan la mejora de sus propiedades biocatalíticas para su aplicación a nivel industrial. Por ejemplo:

En el año 2000, Linqiu Cao y colaboradores, desarrollaron una técnica efectiva de insolubilización, que permitió incrementar la estabilidad operacional de las enzimas facilitando su recuperación y re-uso. Cao y col. insolubilizaron la enzima penicilina acilasa a través del entrecruzamiento con glutaraldehído de agregados físicos de la enzima formados por la adición de un agente precipitante, en este caso etanol, generando agregados entrecruzados de la enzima (CLEA). Estos agregados de la penicilina acilasa, catalizaron la síntesis de ampicilina en un amplio rango de solventes orgánicos, manteniendo su actividad catalítica intacta.

En el 2004, Schoevaart, Sheldon y col, demostraron la gran aplicabilidad del entrecruzamiento de agregados enzimáticos para la efectiva insolubilización de enzimas. Elaboraron agregados entrecruzados de 12 enzimas diferentes, entre las que se encontraban la galactosa oxidasa, glucosa oxidasa, lacasa, lipasa, entre otras. Estimaron el efecto de 14 agentes precipitantes (metanol, etanol, acetona, PEG, entre otros) y de la concentración del glutaraldehído como agente entrecruzante en la formación de los agregados físicos entrecruzados de estas enzimas. Determinaron las estructuras físicas de los CLEAs a través de un

microscopio de barrido electrónico, estableciendo que la forma de agregación de las enzimas depende del grado de glicosilación de éstas. Los resultados demostraron que todos estos parámetros evaluados inciden de manera directa sobre las propiedades de los agregados obtenidos.

En este mismo año, Wilson, Betancor y otros, publicaron los resultados de la elaboración de agregados entrecruzados de enzimas multiméricas como las catalasas de hígado de bovino (BLC) y *Micrococcus lysodikticus* (MLE). Los agregados entrecruzados fueron sintetizados adicionando dietilenglicol dimetil éter como agente precipitante y glutaraldehído al 5% (v/v). Determinaron que los CLEAs elaborados presentaban una alta estabilidad bajo condiciones de dilución y que estabilizaban la estructura multimérica de estas enzimas tetraméricas. Por último, establecieron que los CLEAs presentaban una gran estabilidad bajo condiciones de dilución y probablemente estabilizaban la estructura multimérica de estas enzimas tetraméricas.

En el año 2007, Cabana y col, insolubilizaron por primera vez lacasa aislada del hongo *Corioloropsis polizona*, a través de la formación de CLEAs. Estos CLEAs se elaboraron usando polietilenglicol como agente precipitante, glutaraldehído como agente entrecruzante y albúmina de suero bovino (BSA) como agente estabilizante. Los CLEAs formados en presencia de BSA mostraron una menor actividad y afinidad por el sustrato ABTS que aquellos sin BSA. Por otra parte, los CLEAs de lacasa presentaron mayor actividad en comparación con la enzima libre. En general, los resultados mostraron que la insolubilización de lacasa a través de la formación de CLEAs es una herramienta prometedora para aumentar la aplicabilidad y reutilización de esta enzima en biotecnología, como en la eliminación exitosa de perturbadores químicos endocrinos (EDCs).

Para el año 2008, Sangeetha y col., obtuvieron agregados enzimáticos entrecruzados de subtilisina (CLEA-Subtilisina), con retención de actividad

catalítica. Evaluaron el efecto del pH, la temperatura, la estabilidad térmica y los disolventes orgánicos sobre los CLEAs. Obtuvieron agregados enzimáticos entrecruzados (CLEA) que presentaron estabilidad en disolventes orgánicos no polares, tales como hexano y ciclohexano, alcanzando una alta estabilidad térmica hasta 60 °C y, por lo tanto, puede ser utilizado como un catalizador para la biotransformación de compuestos que no son solubles en medio acuoso. Los CLEAs fueron atrapados en perlas de hidrogel compuestas de alginato: goma guar (3:1), resistentes a condiciones de bajo pH en el estómago, encontrando que estos agregados encapsulados son útiles para el suministro de fármacos orales de proteínas y péptidos bioactivos.

Más recientemente, en el año 2012, Cruz y col., optimizaron la elaboración de agregados entrecruzados de lipasa de *Candida antarctica* B (CLEAs de CAL-B) en presencia y ausencia de “albúmina de suero bovino”, utilizando un diseño experimental factorial multinivel para evaluar los efectos de la concentración de proteína, de diferentes agentes precipitantes (t-butanol, sulfato de amonio y dimetiléter), y de glutaraldehído (agente entrecruzante), sobre la actividad enzimática de CAL-B. La mayoría de los agregados entrecruzados mostraron un incremento significativo de la actividad específica de la CAL-B; el CLEA óptimo obtenido de CAL-B con albúmina de suero bovino, es mucho más estable que la enzima CALB a 70 ° C, de hecho después de 1 h, el CLEA permaneció completamente activo, mientras que el tiempo de vida media de la CALB sin entrecruzar está por debajo de 10.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 GENERALIDADES DE LAS ENZIMAS

La gran variedad de reacciones bioquímicas que comprende la vida está mediada, casi en su totalidad, por un conjunto de catalizadores biológicos notables denominados enzimas (Voet y Voet, 2006). Si bien éstas se encuentran sometidas a las mismas leyes de la naturaleza que gobiernan las demás sustancias, difieren de los catalizadores químicos habituales en varios aspectos importantes:

- Presentan mayores velocidades de reacción, en general, las velocidades de reacciones catalizadas por enzimas se multiplican de 10^6 a 10^{12} veces con respecto a las mismas reacciones no catalizadas por ellas.
- Actúan bajo condiciones moderadas de reacción. Las reacciones catalizadas por enzimas tienen lugar bajo condiciones relativamente suaves: temperaturas inferiores a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, presión atmosférica y pH neutro.
- Presentan mayor especificidad de reacción. Las enzimas tienen un alto grado de especificidad hacia los sustratos sobre los cuales actúan, en comparación con los catalizadores químicos rara vez en las reacciones enzimáticas se obtienen productos secundarios.
- Presentan gran capacidad de regulación. Las actividades catalíticas de muchas enzimas varían en respuesta a las concentraciones de sustancias distintas de sus sustratos y productos. (Voet y Voet, 2006)

La función catalítica de las enzimas depende de la integridad de su conformación terciaria (3D) nativa. En consecuencia, la desnaturalización o disociación de dicha estructura ocasiona la pérdida de actividad. Si se descompone la enzima en sus aminoácidos constituyentes, se destruye su actividad catalítica. Así, las estructuras primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias de las proteínas enzimáticas son

esenciales para su actividad catalítica. A continuación se describirán cada una de las estructuras que posee una enzima:

- La estructura primaria es una descripción de todos los enlaces covalentes (principalmente enlaces peptídicos y puentes disulfuros) que unen los residuos aminoácidos de una cadena polipeptídica. (Lehninger y col., 2005) .
- La estructura secundaria se refiere a disposiciones particularmente estables de los aminoácidos que dan lugar a patrones estructuralmente repetitivos. Para proteínas globulares, como las enzimas, el modelo de la hélice α es razonablemente aceptable.
- La estructura terciaria describe todos los aspectos del plegamiento tridimensional de un polipéptido (Lehninger y col., 2005). Dado que esta estructura se encuentra más expuesta a factores externos que pueden desestabilizar la enzima hasta el punto de desnaturalizarla, es importante conocer en detalle los principales tipos de interacciones responsables de la estructura tridimensional de una proteína. Estos son:

Los puentes de hidrógeno, resultantes de la interacción de un átomo electronegativo con un protón unido a otro átomo electronegativo.

Las interacciones apolares resultantes de la repulsión por un solvente polar hacia los residuos aminoácidos apolares, que los hace ubicarse en el interior de la molécula.

Los puentes disulfuro producidos por oxidación de residuos de cisteína, que son altamente estabilizantes de la estructura tridimensional, adquieren un gran significado para el caso de proteínas de bajo peso molecular.

Los enlaces iónicos entre residuos aminoacídicos cargados contribuyen, aunque de manera poco significativa, a la estabilización de la estructura tridimensional de la proteína. Esto es debido a la elevada fuerza iónica del medio que rodea a la molécula proteica, lo que hace que los residuos aminoacídicos cargados reaccionen preferentemente con otros iones y no entre sí. (Teijón y Teijón, 2001)

- La estructura cuaternaria se define como la disposición en el espacio de dos o más subunidades polipeptídicas que posea una proteína.

4.2 CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS

Las enzimas se clasifican de acuerdo con la reacción química que catalizan (IUPAC, Comisión de enzimas) en seis clases:

Tabla 1. Clasificación de las enzimas.

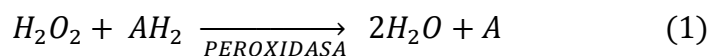
Clase	Tipo de reacción	Ejemplo
I. Óxido-reductasas	Oxidación/reducción	Dehidrogenasas, oxidasas, peroxidasas, oxigenasas.
II. Transferasas	Transferencia de grupo	Transaldolasas, transcetolasas, etc.
III. Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis	Esterasas, proteasas, carbohidrasas, etc.
IV. Liasas	Reacciones de Eliminación	Substrato grupo liasa
V. Isomerasas	Isomerización	Epimerasas, racemasas, etc.
VI. Ligasas	Síntesis	Ligasa X-Y

4.2.1 Óxido-reductasas

La mayoría de las óxido-reductasas son hemoproteínas, un grupo diverso de enzimas que desarrolla una amplia variedad de funciones en los organismos vivos. Entre las funciones se encuentran el transporte y almacenamiento de oxígeno (hemoglobina y mioglobina), el transporte de electrones y la producción de energía (citocromo), la transferencia de oxígeno (monooxigenasas), la oxidación de sustratos (peroxidasas), la dismutación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y las transformaciones sintéticas (Hiner y col., 1996). Algunos grupos que pueden reaccionar con este tipo de enzimas son: alcoholes (R-OH), alquenos, aminas primarias (R-NH₂), cofactores (NADH, NADPH).

4.3 PEROXIDASAS

Las peroxidasas contienen como grupo prostético hierro (III) protoporfirina IX (ferriprotoporfirina IX). Tienen un peso molecular que varía entre los 30 a 150 kDa. Éstas catalizan la reducción de peróxidos, tales como peróxido de hidrógeno y la oxidación de una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos (Hamid, 2009). La reacción catalizada por la peroxidasa es compleja, con el siguiente balance global (Ec. 1):



Actualmente, 15 diferentes clasificaciones del código enzimático (EC), catalogado por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, se han incorporado a las reacciones catalizadas por peroxidasas: de EC 1.11.1.1 a 1.11.1.16 (la clasificación EC 1.11.1.4 se ha removido). (Passardi et al., 2007) Las peroxidasas se pueden encontrar bajo la clasificación E.C.1.11.1.7.

Tabla 2. Clasificación de peroxidasa según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (Passardi et al., 2007)

Numero EC	Nombre recomendado	Abreviación
EC 1.11.1.1	Peroxidasa NADH	NadPrx
EC 1.11.1.2	Peroxidasa NADPH	Secuencia no disponible
EC 1.11.1.3	Peroxidasa de acidos grasos	Secuencia no disponible
EC 1.11.1.11 (antes EC 1.11.1.4)	Triptófano 2,3-dioxigenasa	Ya no se considera como peroxidasa
EC 1.11.1.5	Citocromo-c Peroxidasa	CcP, DHCcP
EC 1.11.1.6	Catalasa	CAT
EC 1.11.1.7	Peroxidasa	Hemo peroxidases
EC 1.11.1.8	Yoduro Peroxidasa	TPO
EC 1.11.1.9	Glutación Peroxidasa	GPx
EC 1.11.1.10	Cloruro Peroxidasa	HalPrx, HalNPrx, HalVPrx
EC 1.11.1.11	L-Ascorbato Peroxidasa	APx
EC 1.11.1.12	Glutación hidroperóxido fosfolipídico Peroxidasa	GPx
EC 1.11.1.13	Manganeso Peroxidasa	MnP
EC 1.11.1.14	Lignina Peroxidasa	LiP
EC 1.11.1.15	Peroxideroxina	1CysPrx,2 CysPrx,PrxII/V/PrxGrx,Prx Q/BCP
EC 1.11.1.16	Peroxidasa versátil	VP

4.3.1 Familia de peroxidases

Estas enzimas se clasifican según su estructura en tres superfamilias: peroxidases de mamíferos, peroxidases catalasas y peroxidases de plantas.

- Superfamilia de peroxidases animales: Han sido caracterizadas estructuralmente la mieloperoxidasa, la eosinófilo peroxidasa y la prostaglandina sintetasa H2, entre otras. Todas ellas son enzimas formadas por varias subunidades, iguales o no.
- Superfamilia de catalasas: Se engloban dentro de las peroxidases, ya que poseen un grupo hemo e intervienen en la misma reacción catalítica. Todas ellas son enzimas tetraméricas, condición necesaria para que sean funcionales. Se ha caracterizado estructuralmente la catalasa de hígado de buey, entre otras. (Murthy y col., 1981)

- Para la superfamilia de peroxidasa de plantas se hizo una subclasificación, en función de sus elementos estructurales, y se diferenció esta superfamilia en tres clases:

Clase I: incluye enzimas intracelulares procarióticas, en mitocondrias y cloroplastos de plantas, tales como ascorbato peroxidasa (APX) y peroxidasa citocromo C (CcP)(Al-Senaidy y Ismael, 2011). Estas se encuentran implicadas en los procesos de detoxificación de la planta (eliminación de peróxido de hidrógeno).

Clase II: comprende peroxidasas extracelulares fúngicas, tales como manganeso peroxidasa (MnP) y lignina peroxidasa-degradante (LiP). Dichas enzimas participan en procesos de degradación de la lignina.

Clase III: consiste en peroxidasas vegetales secretadas. Estructuralmente estas enzimas (EC 1.11.1.7) poseen dos iones Ca^{2+} , una señal peptídica en el extremo N-terminal para la secreción, cuatro puentes disulfuro conservados, en sitios distintos a los que aparecen en las peroxidasas de clase II, un conjunto de hélices extra que juegan un papel muy importante en el acceso al centro activo y un grado de glicosilación comprendido entre el 0 y el 25%.

Las enzimas clase III existen en múltiples formas de isoenzimas, con diferencias en la función, la masa molecular, estabilidad al calor, pH óptimo, y especificidad de sustrato(Al-Senaidy y Ismael, 2011). Para la mayoría de las peroxidasas, los sustratos típicos son moléculas aromáticas pequeñas tales como fenoles y aminas aromáticas. Sin embargo, es muy difícil determinar qué sustratos son fisiológicamente relevantes para peroxidasas vegetales debido a la capacidad de éstas para oxidar una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos(Watanabe y col., 2010).

4.3.2 Funcionalidad de las peroxidasas

Las peroxidasas de plantas superiores (clase III) están implicadas en una gran variedad de procesos fisiológicos a lo largo de todo el ciclo vital de la planta, es decir, desde la germinación hasta la senescencia. Esto es debido a la variedad de isoformas, así como a la alta y heterogénea regulación de su expresión (Passardi y col., 2005).

También se cree que están implicadas en la expulsión de H_2O_2 , la oxidación de agentes reductores tóxicos, la defensa contra patógenos o ataques de insectos, así como también en el crecimiento celular normal. Además, las peroxidasas clase III se pueden generar, de una manera controlada, actuando como parte de las vías de transducción de señales durante diversos procesos fisiológicos. (Mathé y col., 2010)

4.4 FUENTES DE PEROXIDASAS

Las peroxidasas han sido identificadas sobre la superficie de muchas especies de plantas. Por ejemplo, a partir de las hojas de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) fue aislada y purificada una peroxidasa aniónica con una alta termoestabilidad. De igual forma, en la palma real (*Roystonea regia*) fue encontrada una peroxidasa (PPR); el estudio de esta enzima demostró que es constitutiva, es decir, no está vinculada a la pared celular, sino que se encuentra en una forma soluble en las hojas de la palma; Se han identificado dentro de las peroxidasas clase III las siguientes : la isoenzima c peroxidasa de rábano picante (HRP-C), una de las más estudiadas; la peroxidasa catiónica de cacahuete (PNP); la peroxidasa de capa de semilla de soja (PAS) y la peroxidasa del grano de cebada (BP1), entre otras (Watanabe y col., 2010).

4.5 LA PALMA REAL (*Roystonea regia*)

La palma real es un árbol de tronco cilíndrico que alcanza alturas de 10 a 24 m. Sus hojas son plumosas, entre 2.40 y 3 m de longitud, conformada por segmentos de 75 cm de largo. Crece relativamente rápido alcanzando su máximo desarrollo en unos 10 años. Se cultiva sobre altitudes de 900 m – 1000 m sobre el nivel del mar, propagándose por semillas. Pertenece a la familia de las palmáceas, (*Palmae*). Su nombre científico es (*Roystonea regia*), en honor a un científico norteamericano que trabajó en Puerto Rico. (Luther, Howard, & Marrero, 2001)

Las hojas de *Roystonea regia* presentan altos contenidos de enzimas peroxidasas, unos 700 (U/gramo de hoja), las cuales se mantienen constantes durante todo el año y en varias etapas del desarrollo. La actividad de las peroxidasas ha sido medida en diferentes épocas del año, encontrándose que la concentración de las enzimas es independiente de factores como la edad de la planta, condiciones climatológicas, altura de la palma, entre otras (I Yu Sakharov, Vesga, Galaev, & Sakharova, 2001). La **figura 1** ilustra la palma real.



Figura 1. Palma real (*Roystonea regia*)
(<http://www.arbolesornamentales.es/Roystonearegia.htm>)

4.6 PEROXIDASA DE PALMA REAL

La peroxidasa de palma real es una glicoproteína de peso molecular 51 kDa, que se encuentra con una mayor concentración en las hojas verdes de dicha planta. Su peso molecular es relativamente alto en comparación con las otras peroxidases, debido a su alto grado de glicosilación. Posee un punto isoeléctrico $pI=3.5$. Su espectro de absorción tiene un máximo en 403 nm, conocido con el nombre de banda Soret, la cual es característica de las peroxidases vegetales (Sakharov y col., 2001).

4.6.1 Mecanismo de reacción de peroxidasa de palma real

La peroxidasa de palma real cataliza la oxidación de un amplio rango de sustratos orgánicos en presencia de peróxido de hidrógeno. En la reacción catalizada por la enzima están implicados dos sustratos y la caracterización de este comportamiento cinético bi-sustrato fue explicada por Robert Alberty (Alberty, 1953). Este mecanismo recibe el nombre de mecanismo *ping-pong* (Cleland, 1990).

En la **figura 2** se describe el ciclo catalítico donde el peróxido de hidrógeno oxida la forma enzimática nativa [Fe (III)], mediante un paso monoelectrónico, para generar el compuesto I (Co-I), radical π catiónico (oxiferrilo porfirina). Este Co-I acepta un electrón y un protón de un sustrato reductor (RH) para generar su correspondiente radical libre ($R\bullet$) y el intermedio hémico oxiferrilo denominado compuesto II (Co-II). En el siguiente paso de reducción monoelectrónica del Co-II, una segunda molécula de RH regenera la enzima en su forma férrica nativa. Las constantes de velocidad k_1 , k_2 y k_3 corresponden a la formación y reducción del Co-I y a la reducción del Co-II, respectivamente (Banci, 1997).

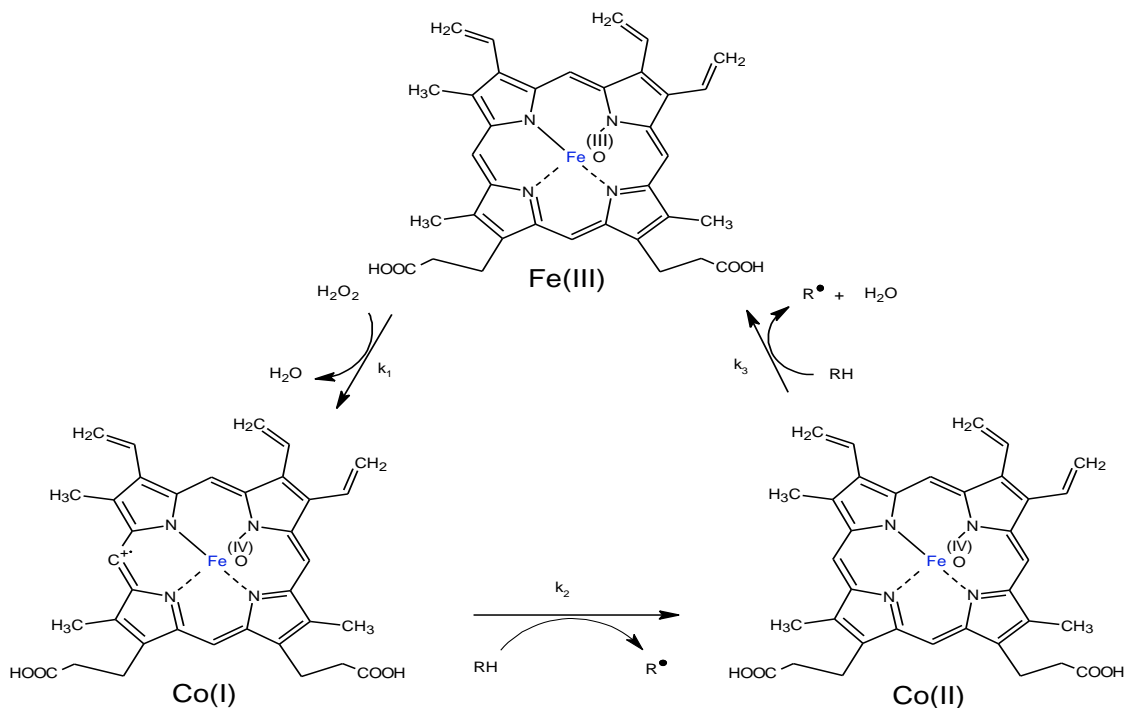


Figura 2. Mecanismo general de catálisis de las peroxidasa(Banci,1997).

4.6.2 Propiedades estructurales de peroxidasa de palma real

Se han podido recolectar abundantes datos sobre la estructura de las peroxidasa gracias a la información estructural aportadas por técnicas como la difracción de rayos X y la espectrometría de masas.

El modelo final obtenido del estudio de la estructura de la peroxidasa de palma real (PPR) realizado por Watanabe y col., en el 2010, concluye que es una glicoproteína monomérica compuesta por una cadena polipeptídica. Posee una masa molecular de 44.6 kDa y tiene 304 residuos. Además, presenta un grupo hemo, dos iones calcio (Ca²⁺), ocho iones sulfato (SO₄²⁻), una molécula de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y una molécula de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES); también contiene nueve N-glicanos que están formados por 15 moléculas de N-acetil-D-glucosamina (GlcNac), 5 de α-L-fucosas (Fuc), ocho moléculas de manosa (Man) y una xilosa (Xyl)(Watanabe y col., 2010).

La estructura tridimensional de la PPR (**figura 3**) es muy similar a la de otras peroxidasas de clase III: PNP, cHRP y SBP (peroxidasa de grano de soya). Todas

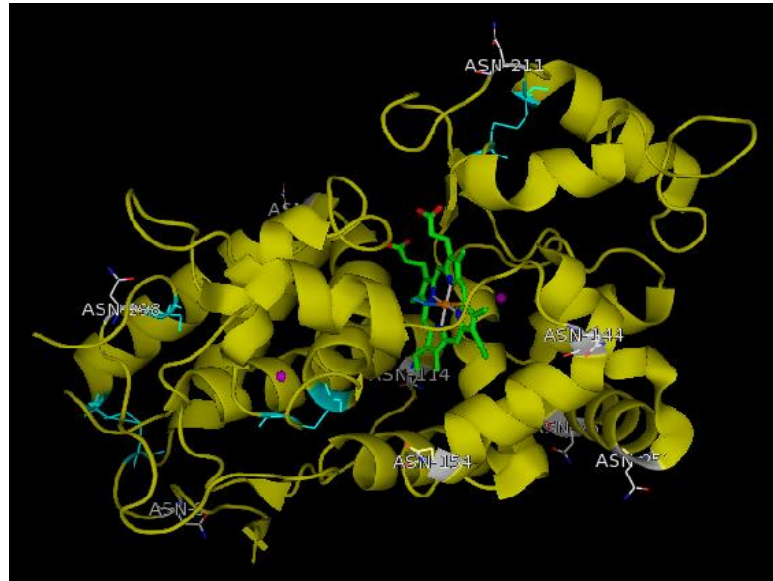


Figura 3. Estructura tridimensional de la PPR. Representación de la proteína PPR determinada por rayos- X, se muestran las 13 α -hélices, el grupo hemo(verde) , dos iones calcio(morado), cuatro puentes disulfuros (cisteínas aguamarina) y los 9 sitios de N-glicosilación. La estructura 3D de PPR fue obtenida de Protein Data Bank (código PDB: 3HDL) y visualizada usando Pymol 0.99

ellas son proteínas con un alto contenido de hélices α , con un grupo hemo que se encuentra entre los dominios distal (superior) y proximal (inferior), y dos iones calcio, cada uno de ellos localizado en un dominio. La RPTP tiene 13 α -hélices: 17-28 (A), 30-45 (B), 77-90 (C), 102-112 (D), 131-137 (D'), 145-155 (E), 159-170 (F), 176-183 (F'), 198-204 (F''), 237-240 (G), 246-252 (H), 259-266 (I) y 268-284 (J). Además, posee dos hélices adicionales muy cortas entre las hélices B y C: 52-54 (B') y 64-66 (B'').

En la estructura de la PPR, como en otras peroxidasas de clase III, aparecen cuatro puentes disulfuro entre parejas de cisteínas altamente conservadas (11-91, 44-49, 97-299 y 176-208) que mantienen la rigidez estructural. El extremo N- terminal se

encuentra unido a la parte posterior de la hélice A por el puente disulfuro 11-91. El extremo C-terminal está unido al inicio de la hélice D por el puente disulfuro 97-299.

Los análisis MALDI-TOF-MS, realizado por Watanabe y col., en el año 2010, revelan que la RPTP tiene un contenido de carbohidratos en su estructura nativa del 24.3%. La **figura 4** muestra claramente nueve sitios de unión a glicanos, que se encuentran en los residuos Asn8, Asn28, Asn114, Asn144, Asn154, Asn211, Asn256, Asn267 y Asn298(Watanabe y col., 2010).

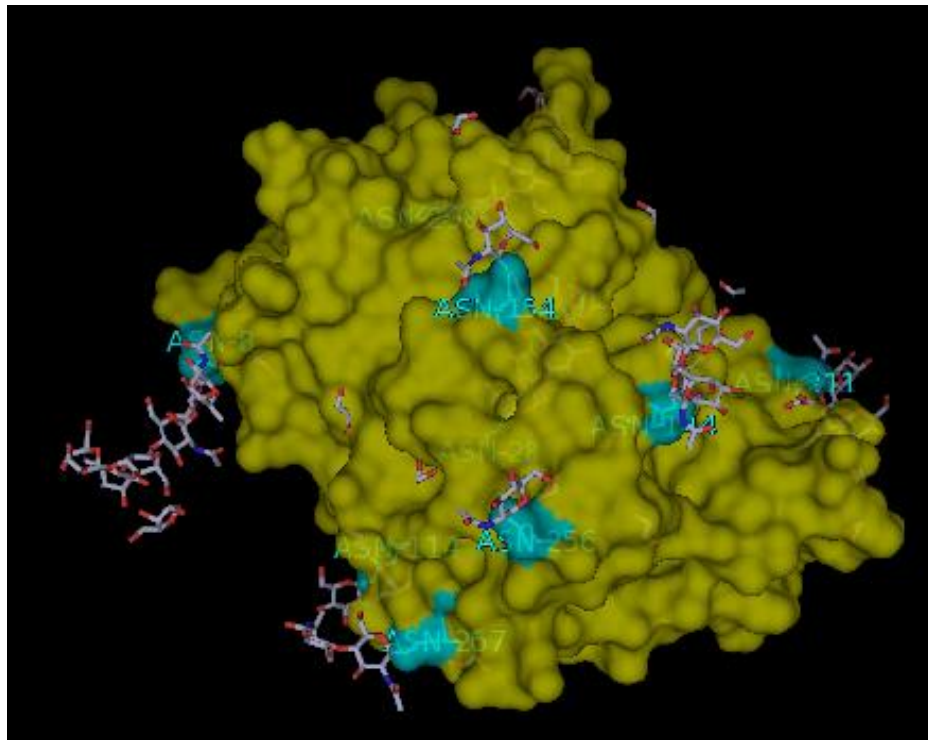


Figura 4. Modelo de estructura de superficie 3D de PPR indicando los residuos de asparinas (en color aguamarina), sitios de glicosilación y los nueve glicanos encontrados en la estructura nativa de la PPR. La estructura de superficie 3D de PPR fue obtenida de Protein Data Bank (código PDB: 3HDL) y visualizada usando Pymol 0.99

Por otra parte, según el estudio realizado por Zamorano y col. en el 2008, se encontró que la peroxidasa de palma real presentaba una estructura cuaternaria dimérica. Dicha estructura se daba en condiciones de alta concentración de la enzima, lo cual genera la gran estabilidad térmica que presenta la peroxidasa.(Zamorano y col., 2008)

4.6.3 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la peroxidasa

Las peroxidasa, al igual que otras proteínas, se ven afectada por variaciones de temperatura y pH. La mayoría de proteínas se pueden desnaturizar mediante el calor, que afecta de una manera compleja las interacciones débiles de una proteína. Sin embargo, la peroxidasa de palma real (PPR) es una enzima que presenta alta estabilidad y resistencia a temperaturas poco inusuales para este tipo de macromoléculas. El rango de temperatura reportado por otros estudios es de 70-90°C, dentro del cual se evidencia actividad catalítica. Además, recientemente se reveló que esta enzima sufre desnaturización irreversible a pH 3, mientras que a pH 7 la desnaturización es un proceso reversible con una transición entre la forma dimérica y monomérica de la enzima. En este estudio también se encontró que la estabilidad que presenta la peroxidasa se asocia a la conformación dimérica(Zamorano y col., 2008).

En cuanto al pH, las enzimas poseen un valor o intervalo óptimo en el que su actividad es máxima; a valores superiores o inferiores de pH la actividad disminuye. Los cambios extremos de pH afectan la estabilidad de la peroxidasa, ya que pueden producir alteraciones en la carga neta de la enzima, cambios en su conformación los que a su vez distorsionan la forma del sitio activo, y que en consecuencia dificultaría o impediría en su totalidad el acople del sustrato.

Diferentes investigaciones relacionadas con peroxidasa de especies de palmas tropicales, como lo es la peroxidasa de palma real, comprueban la influencia del pH

y la temperatura en la estabilidad enzimática. Algunos ejemplos son: la caracterización de la peroxidasa de palma africana (*Elaeis guineensis*) (AOPTP), estudio con el que se dio a conocer que esta enzima presenta desnaturalización térmica irreversible a pH 3.0; es estable en el rango de pH 2.2-12.0, por ello, es la peroxidasa más estable caracterizada hasta el momento. Además, la AOPTP mantiene el 100% de su actividad con GuHCl 4M, un poderoso agente caotrópico (Sakharov y Sakharova, 2002).

Por otra parte, Zamorano y col. en el 2009, estudiaron la peroxidasa de palma de la especie *Chamaerops excelsa* (CEP). Sus resultados mostraron que la CEP es una peroxidasa aniónica con una masa molecular de 50 kDa, presentando un estado dimérico en solución y siendo estable en un margen de pH comprendido entre 2.0 y 12.0. La enzima fue térmicamente desnaturalizada a pH 3,0, siendo su estabilidad térmica muy próxima a la de la AOPTP(Zamorano y col., 2009).

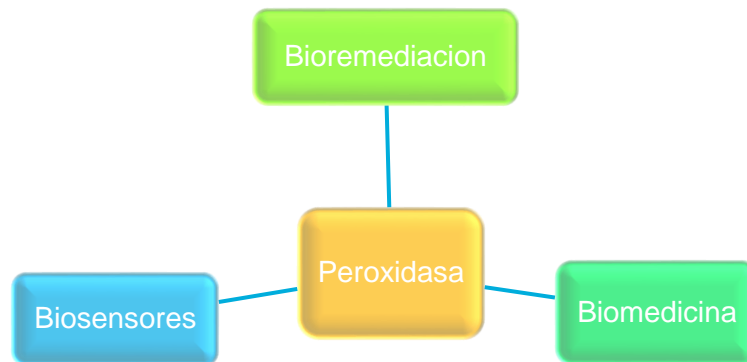
Otro ejemplo es el estudio llevado a cabo por Caramyshev y col. en el 2006, de la peroxidasa de palma *Trachycarpus fortunei* (WPTP), con el que determinaron que esta peroxidasa mantiene la actividad enzimática a pH 7.5 después de 1 h de incubación a 80 °C, siendo menos estable a pH's ácidos. El estudio cinético a pH 3.0 indicó que se inactiva entre 61 y 67 °C (Caramyshev y col., 2006).

Debido a la elevada estabilidad que presenta este tipo de peroxidasas de plantas, es posible decir que son un grupo enzimático con un futuro biotecnológico muy prometedor.

4.7 APLICACIONES DE LAS PEROXIDASAS

Las peroxidasas se utilizan ampliamente en bioquímica clínica e inmunoensayos enzimáticos. Algunas aplicaciones novedosas de peroxidasas incluyen el tratamiento de aguas residuales que contienen compuestos fenólicos, síntesis de diversos productos químicos aromáticos y la eliminación de peróxido de materiales tales como productos alimenticios y residuos industriales.

Dentro de las aplicaciones más destacadas se encuentran:



Esquema 1. Aplicaciones biotecnológicas de las peroxidasas

4.7.1 Biorremediación

Compuestos aromáticos, incluyendo fenoles y aminas aromáticas, constituyen una de las clases principales de contaminantes orgánicos. Se encuentran en las aguas residuales de una amplia variedad de industrias, tales como la conversión del carbón, refinación de petróleo, resinas y plásticos, conservación de la madera, revestimiento metálico, tintes y otros productos químicos, textiles, minería, etc.

Los compuestos más aromáticos son tóxicos y deben ser retirados de las aguas residuales antes de su descarga al medio ambiente. El tratamiento enzimático ha sido propuesto por muchos investigadores como posible alternativa a los métodos convencionales. Las peroxidasas que se han utilizado para el tratamiento de

contaminantes aromáticos acuosos y decoloración de tintes son la peroxidasa de rábano picante (HRP), peroxidasa de lignina (LIP) y otras peroxidases de diferentes fuentes (Hamid, 2009; Kauffmann y col., 1999; Cheriyan y Abraham, 2010; Alonso-Calderón, 2008).

Dentro de los procesos en los que se utiliza las peroxidases como método de biorremediación están:

- Decoloración de los tintes sintéticos

Los tintes utilizados para la impresión en papel, fotografía en color, teñido de textiles; y a su vez, usados como aditivo en productos derivados del petróleo tienen un origen sintético y estructura molecular aromática compleja. Cerca del 10-15% de los tintes sintéticos producidos son descargados en los efluentes industriales, causando graves problemas de contaminación ambiental.

Algunos colorantes son sustancias recalcitrantes, tóxicas, resistentes a la degradación biológica y no se degradan fácilmente en plantas de tratamiento de aguas residuales.

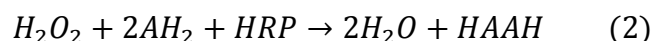
Varios autores han mostrado que la destrucción oxidativa de compuestos coloreados es estimulada significativamente por las enzimas oxidativas y pueden ser de interés práctico para la decoloración de tintes sintéticos. Enzimas tales como la lignina-peroxidasa (LIP) y manganeso peroxidasa (MnP), ambas asociadas con la degradación de la lignina, están involucradas en la decoloración de tintes azo sintéticos, como el naranja ácido II, y otros. Bhunia y col. en el 2002 mostraron que la HRP fue eficaz en la degradación y precipitación de colorantes azoicos industrialmente importantes, tales como el azul Ramazol. Este colorante es utilizado industrialmente y contiene al menos un grupo aromático en su estructura, por lo que es un posible sustrato de HRP (Hamid, 2009). Asimismo, se ha reportado que la HRP en su forma libre es eficaz para la decoloración de tintes textiles y efluentes,

como también para lograr una reducción en la toxicidad del efluente después del tratamiento enzimático.

- Procesos de detoxificación de suelos y aguas

Las industrias químicas y alimentarias generan entre sus residuos una gran cantidad de compuestos fenólicos, los cuales son altamente tóxicos y carcinogénicos; por esta razón, son controlados en un gran número de países, y deben ser eliminados antes de que se viertan los efluentes industriales al medio ambiente. Así pues, las peroxidasas se utilizan para el tratamiento de residuos líquidos y suelos contaminados de fenoles, aminas aromáticas, compuestos clorados y metales pesados (Wright y Nicell, 1999).

Uno de los métodos usados para la eliminación de tales contaminantes consiste en un proceso de polimerización usando enzimas redox. Se usa peróxido de hidrógeno como molécula aceptora de electrones y la peroxidasa puede catalizar la polimerización oxidativa de fenoles, anilinas y otros compuestos aromáticos generando oligómeros insolubles que son fácilmente eliminados por filtración o sedimentación (Ec. 2).



Siendo HAAH el producto de polimerización. El tratamiento enzimático ofrece una gran especificidad y elevada velocidad de reacción en condiciones suaves (Dordick y col., 1987) .

Inicialmente, se utilizó HRP para llevar a cabo los procesos de detoxificación de agua. Si bien en la actualidad se usan peroxidasas de otras especies como soja (Caza y col., 1999) y nabo (Duarte-Vázquez y col., 2003), el pH óptimo de trabajo depende del tipo de peroxidasa que se utilice y del sustrato (fenol) a eliminar. El

rango de pH oscila entre 3 y 10, aunque con peroxidasa de soja se puede eliminar el 90% de un compuesto fenólico trabajando a un pH 2.5. La eficacia del proceso de detoxificación no depende sólo del pH, sino también de la concentración de peróxido de hidrógeno, de modo que concentraciones superiores a 1.2 mM inhiben la enzima (Duarte-Vázquez y col., 2001).

- Degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son contaminantes orgánicos altamente tóxicos ampliamente distribuidos en los ecosistemas terrestres y acuáticos, como productos de la combustión incompleta de combustibles fósiles. Muchos HAP son mutagénicos y algunos de ellos son cancerígenos, lo que representa un peligro considerable para la salud pública.

Los HAP se componen de anillos aromáticos condensados con alta persistencia bioquímica y, por tanto, resistente al ataque nucleófilo. Su biodisponibilidad limitada también es un posible factor restrictivo para el ataque microbiano. Para degradar HAPs se han realizado muchos estudios que utilizan los hongos de pudrición blanca.

Entre las enzimas secretadas por los hongos de pudrición blanca, lignina peroxidasa (LIP), lacasa (Lac) y manganeso peroxidasa (MnP), se encontró que éstas tienen un papel fundamental en la degradación de los HAP. En los últimos años, MnP ha recibido considerable atención por su uso potencial en la degradación de contaminantes orgánicos, en particular la degradación de los HAPs. La peroxidasa producida por *Anthracophyllum discolor* fue inmovilizada en nanoarcillas obtenidas a partir de suelo volcánico y se evaluó su capacidad de degradar los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). La enzima inmovilizada fue capaz de degradar pireno (> 86%), antraceno (> 65%), solo o en mezcla, y en menor medida fluoranteno (<15,2%) y fenantreno (<8,6%) (Acevedo y col., 2010).

4.7.2 Biomedicina

- Inmunoensayos

Ensayos ligados a enzimas (ELISA), también conocido como EIA, son pruebas diseñadas para detectar antígenos o anticuerpos, mediante la producción de una enzima activada por el cambio de color. Con este fin, se requiere de un anticuerpo marcado con una enzima, específica para el antígeno, así como de un sustrato cromogénico, que en presencia de la enzima da cambios de color. La cantidad de color desarrollado es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra de ensayo. HRP (peroxidasa de rábano picante) es la enzima más usada como reportero (anticuerpo marcado con enzima) en inmunoensayos enzimáticos. Se han desarrollado pruebas de ELISA para el cribado de anticuerpos monoclonales contra las micotoxinas en el que la peroxidasa se utiliza para el etiquetado de un anticuerpo(Hamid, 2009).

4.7.3 Biosensores

Un biosensor se define como un instrumento analítico que consiste en un componente biológico en contacto íntimo con un transductor de señal seguro, el cual convierte una señal bioquímica en una señal cuantificable. Las peroxidases son ampliamente utilizadas para la construcción de biosensores(Migneault y Dartiguenave, 2004).

La inmovilización de la peroxidasa sobre la superficie de electrodos permite la construcción de biosensores para determinar la concentración de peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos, como también de biosensores que dan respuesta a un amplio rango de compuesto fenólicos.

La isoenzima C catiónica de peroxidasa de rábano picante (EC 1.1.11.7, HRP-C) es la enzima más ampliamente utilizada para la construcción de biosensores. Se han hecho electrodos con otras peroxidasas de plantas como la peroxidasa de tabaco, cacahuete, batata, y hojas de plantas como la peroxidasa de palma real. Las propiedades moleculares y catalíticas de peroxidasas aisladas de diferentes fuentes son distintas, y por lo tanto, los biosensores construidos con diferentes peroxidasas tienen características diferentes. Por ejemplo, el electrodo con RPTP inmovilizada mostró una mayor estabilidad operacional y de almacenamiento en combinación con una mayor sensibilidad y rango lineal más amplio. Además, debido a la alta estabilidad de la RPTP en el pH, este biosensor puede ser utilizado para la determinación de peróxido en condiciones ácidas (Alpeeva y col., 2005).

Otro ejemplo es el de biosensores enzimáticos amperométricos; la tirosinasa ha sido la enzima más utilizada actualmente para la detección de compuestos fenólicos. Sin embargo, los biosensores de tirosinasa se limitan a la vigilancia de los compuestos fenólicos que tienen al menos una posición *orto*- libre. Por otro lado, los biosensores de lacasa dan respuesta a los compuestos fenólicos con posición libre *para*- y *meta*- (Alpeeva y col., 2005).

Si bien las enzimas han sido implementadas en diferentes procesos biotecnológicos, se debe en gran medida a la aplicación de diferentes técnicas de ingeniería de proteínas. La inmovilización es una estrategia muy conocida de la ingeniería de proteínas y utilizada para mejorar propiedades biocatalíticas de las enzimas. En el caso de la peroxidasa de palma real, es importante mejorar su estabilidad para poder implementar mejor su uso como biocatalizador. Aunque esta enzima presenta estabilidad superior a muchas otras, también tiene dificultades para conservarla en condiciones drásticas de pH, temperatura y concentración de peróxido de hidrogeno. Por lo tanto, se sugiere mantener la conformación dimérica de la peroxidasa, ya que es un factor que en gran parte le confiere estabilidad a la

enzima. Con el fin de lograr este objetivo se hace necesario utilizar algunas de las diferentes estrategias de inmovilización definidas en la siguiente sección.

4.8 Inmovilización de enzimas

- **Aspectos generales**

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que, a su vez, pueden ser reutilizadas repetidas veces. Posteriormente, se ha ampliado esta definición a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por medio de su unión a un soporte (Galvis, 2012). Como ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas podemos destacar:

- El aumento de la estabilidad de la enzima;
- La posible reutilización del derivado, por lo que se disminuyen los costos del proceso.
- La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Estos reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, así, esta última mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza.

4.9 CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN (GUISAN, 2006)

Existen dos grandes categorías con las que se pueden clasificar los diversos enfoques a la hora de inmovilizar enzimas. Estas son: métodos con soporte y métodos libre de soportes.

4.9.1 Métodos con soportes(Arroyo, 1999)

Son los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además, el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado. Se ha utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente se encuentran en forma de cilindros, hojas, fibras y más corrientemente en forma de esferas. Los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos:

1. Soportes inorgánicos. Dentro de este grupo tenemos una gran variedad de soportes, que pueden ser naturales (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc.) o materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.)

2. Soportes orgánicos. Se pueden clasificar en:

Polímeros naturales: divididos en polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, quitosano, etc);proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc).

Polímeros sintéticos: divididos en poliolefinas (como el poliestireno); polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.); otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc).

4.9.2 Métodos libre de soporte

Recientemente, se han desarrollado nuevas técnicas de insolubilización que conllevan el entrecruzamiento de moléculas de enzimas con agentes bifuncionales. Con este método se soluciona una gran desventaja que presenta la inmovilización

por unión a un soporte: la disminución de actividad catalítica, la cual es el resultado de haber introducido una porción grande de masa no catalítica. Con la técnica de entrecruzamiento, el peso del agente entrecruzante es insignificante en comparación al de la enzima, resultando un biocatalizador que contiene el 100% del peso en proteína(Guisan, 2006).

La técnica de entrecruzamiento de proteína inició su desarrollo en la década de 1960, y consistía en una reacción de glutaraldehído, como agente entrecruzante, con residuos de amino reactivos en la superficie de la proteína en forma soluble, obteniendo de esta manera enzimas entrecruzadas (CLEs). Sin embargo, este método tenía varios inconvenientes, tales como baja retención de la actividad, mala reproducibilidad, baja estabilidad mecánica, y dificultades en el manejo de los CLEs, puesto que la masa resultante del entrecruzamiento tenía un aspecto gelatinoso(Cao y col., 2003).

4.10 ENTRECruzAMIENTO DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS (CLEAs)

En busca de superar estas dificultades, surgió el entrecruzamiento de cristales de enzima (CLECs); estos fueron comercializados con éxito como biocatalizadores industriales. No obstante, presentaban una desventaja inherente, la necesidad de cristalizar la enzima, que a menudo es un procedimiento laborioso que requiere la enzima con alta pureza.

A mediados del año 2001, se encontró un solución para la desventaja presentada por los CLEC, la cual fue precipitar la enzima y luego entrecruzar los agregados físicos producidos por la precipitación. Esto condujo al desarrollo de una nueva forma de insolubilizar enzimas a través del entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEAs) (**figura 5**)(Schoevaart y col., 2004; Cao y col., 2003; Cao y col., 2000; Sheldon, 2011).

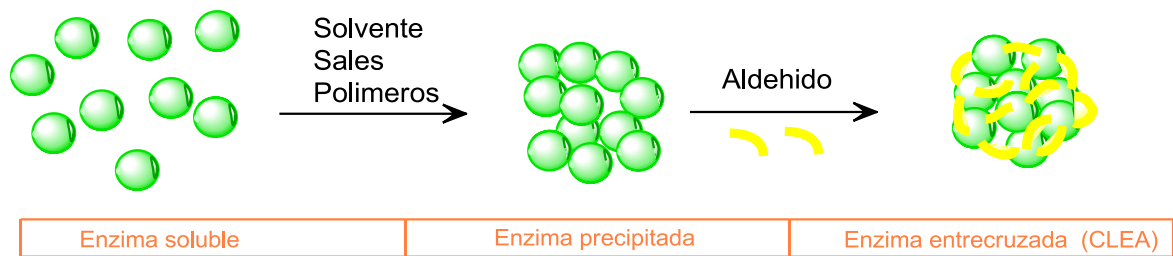


Figura 5. Elaboración de agregados entrecruzados de enzimas (CLEAs)

El entrecruzamiento de agregados enzimáticos consta inicialmente de una etapa de precipitación, que es inducida por la adición de sales, solventes orgánicos, polímeros no iónicos y ácidos. Esta primera etapa puede ser considerada una etapa de pre-purificación en la que se obtienen agregados físicos, que son estructuras supramoleculares unidas por enlaces no covalentes, lo cual provoca que los agregados se redisuelvan cuando son dispersados en agua. La formación de estos agregados físicos es posible debido a un cambio en el estado de hidratación de las moléculas de la enzima, o por la alteración de la constante electrostática de la solución por la adición de un agente de agregación o precipitación apropiado (Cao y col., 2003).

La naturaleza del agente precipitante tiene previsiblemente un efecto importante en la recuperación de la actividad del CLEA, y por lo tanto, es necesario realizar una selección inicial de precipitantes. En diferentes estudios, la observación de una alta actividad en la redisolución del precipitado en tampón no significa automáticamente que los agregados mantendrán esta alta actividad después del entrecruzamiento. Es decir, el precipitante óptimo no garantiza un CLEA con actividad óptima. También, se conoce que el comportamiento catalítico de los diferentes agregados físicos depende de las propiedades de los agentes precipitantes utilizados, esto parece ser posible debido a que cada agente precipitante induce a una conformación diferente de la enzima (Migneault y Dartiguenave, 2004). Por consiguiente, es aconsejable elegir un precipitante que de buenos rendimientos de agregados para el posterior entrecruzamiento.

La etapa de entrecruzamiento consiste básicamente en la formación de enlaces covalentes entre los grupos reactivos del agente bifuncional y los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina superficiales de la enzima. En esta etapa, se mantienen la estructura del agregado y la actividad catalítica de la proteína individual.

4.10.1 Rasgos característicos de los CLEAs

- **Propiedades físicas**

El tamaño de partícula es una propiedad importante de cualquier catalizador heterogéneo en el contexto de aplicaciones industriales, ya que afecta directamente la transferencia de masa y la facilidad de filtrarlos en condiciones operacionales. Un tamaño de partícula típico de CLEAs es de 5-50 μm . Al igual que con todos los catalizadores sólidos, se podría esperar una pérdida de actividad debido a las limitaciones de difusión en una enzima inmovilizada. Sin embargo, los CLEAs son materiales muy porosos, y por lo general no han observado ningún tipo de limitaciones de difusión al usarlos en las transformaciones biocatalíticas comúnmente utilizadas en la síntesis orgánica(Sheldon, 2011).

- **Estabilidad**

La razón principal para la inmovilización de una enzima es probablemente la mejora significativa de la estabilidad hacia temperatura y disolventes orgánicos. Generalmente, la inmovilización es un resultado directo de la disminución en la flexibilidad de las enzimas hacia cambios conformacionales que acompaña a la pérdida de estructura terciaria necesaria para la actividad. De hecho, se ha encontrado que la insolubilización de enzimas como agregados enzimáticos entrecruzados puede conducir a aumentos espectaculares en la estabilidad a temperaturas elevadas(Sheldon, 2011).

- Reciclado

Otra ventaja de los agregados entrecruzados es su fácil separación de soluciones acuosas. En contraste con la enzima libre, los CLEAs pueden ser fácilmente separados del medio de reacción a través de una breve centrifugación o filtración, recuperando así completamente su actividad catalítica y facilitando su reutilización.

4.11 EL GLUTARALDEHÍDO

El glutaraldehído es generalmente el agente entrecruzante de elección, ya que es barato y fácilmente disponible en cantidades comerciales. Se ha utilizado durante décadas para entrecruzar proteínas.

4.11.1 Aspectos generales(Guisan, 2006)

Es un dialdehído lineal de 5 carbonos. Líquido aceitoso, claro e incoloro, el cual es altamente soluble en agua, alcohol y solventes orgánicos. Se encuentra principalmente disponible como una solución acuosa ácida (pH 3.0-4.0), variando en concentración desde el 2% hasta el 70% (p/v).

Se ha demostrado que en las reacciones de entrecruzamiento con monoaldehídos (formaldehído) y dialdehídos que tienen una cadena larga de 2 a 6 átomos de carbono (glioxal, malonaldehído, succinaldehído, glutaraldehído y adipaldehído), son más reactivos los aldehídos de 5 carbonos, sobresaliendo entre ellos el glutaraldehído.

4.11.2 Comportamiento químico en soluciones acuosas

En soluciones acuosas el glutaraldehído puede existir en su forma más simple como un dialdehído monomérico, pero también como un dímero, trímero y polímero como se puede observar en la **figura 6**.

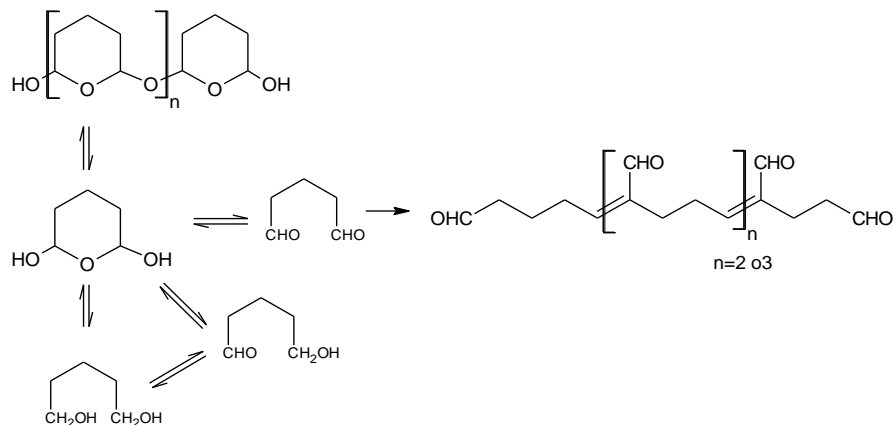


Figura 6. Posibles formas del glutaraldehído en soluciones acuosas(Migneault y Dartiguenave, 2004).

4.11.3 Reacción con proteínas

El glutaraldehído es el agente entrecruzante más efectivo de proteínas, debido en gran medida a las variadas estructuras que puede tomar en solución acuosa, lo que le permite bajo determinadas condiciones de pH, temperatura y concentración reaccionar con ciertos grupos funcionales de residuos aminoácidos de las proteínas tales como amino, tiol, fenol e imidazol porque la cadena lateral de estos aminoácidos son nucleófilos más reactivos (Barbosa, 2006).

La reactividad mostrada de los aminoácidos en orden decreciente frente a los aldehídos es: ϵ -amino, α -amino, guanidilo, amina secundaria y grupos hidroxilos.

El grupo ϵ -amino de los residuos de lisina de las proteínas reaccionan con los aldehídos formando bases de Schiff a través de un ataque nucleofílico del grupo amino al carbono carbonilo del aldehído. Sin embargo, las bases de Schiff no son estables bajo condiciones ácidas y tienden a regenerar el aldehído y la amina. En contraste, el enlace formado por la reacción del glutaraldehído con un grupo amino, mostró estabilidad excepcional a pHs y temperaturas extremas (Migneault y Dartiguenave, 2004). Se han propuesto diversas alternativas de mecanismos de reacción de formación de estas bases de Schiff, entre ellos el de Richards y

Knowles, en el cual el glutaraldehído y el grupo ϵ -amino del residuo de lisina interactúan a través de una reacción de tipo Michael como se puede observar en la reacción 2 de la **figura 7**.

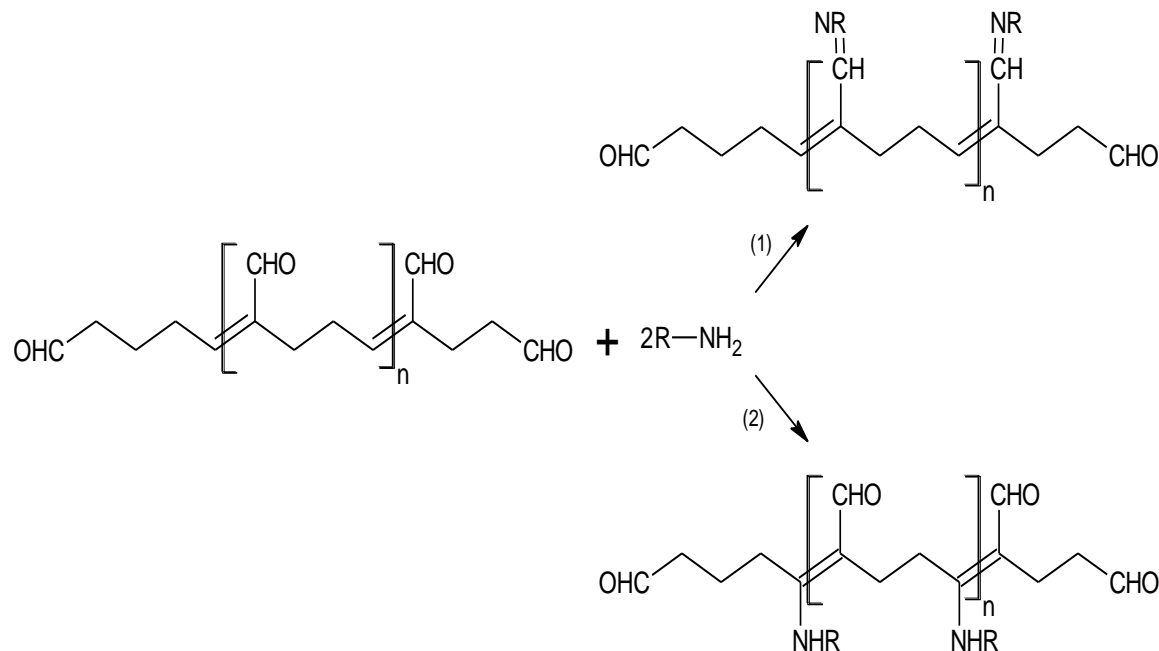


Figura 7. Reacciones del glutaraldehído con proteínas (Migneault y Dartiguenave, 2004).

Posteriormente, surgió un mecanismo ligeramente diferente en el cual una reacción de adición ocurría sobre la parte aldéhica del polímero α - β -insaturado (poli-glutaraldehído) para originar una base de Schiff (imina) estabilizada por conjugación, la cual se presenta en la figura a anterior (reacción 1).

Cada una de las estructuras de la **figura 6** puede formar bases de Schiff a través de un ataque nucleofílico por los residuos de lisina en la proteína como se muestra en la **figura 8**.

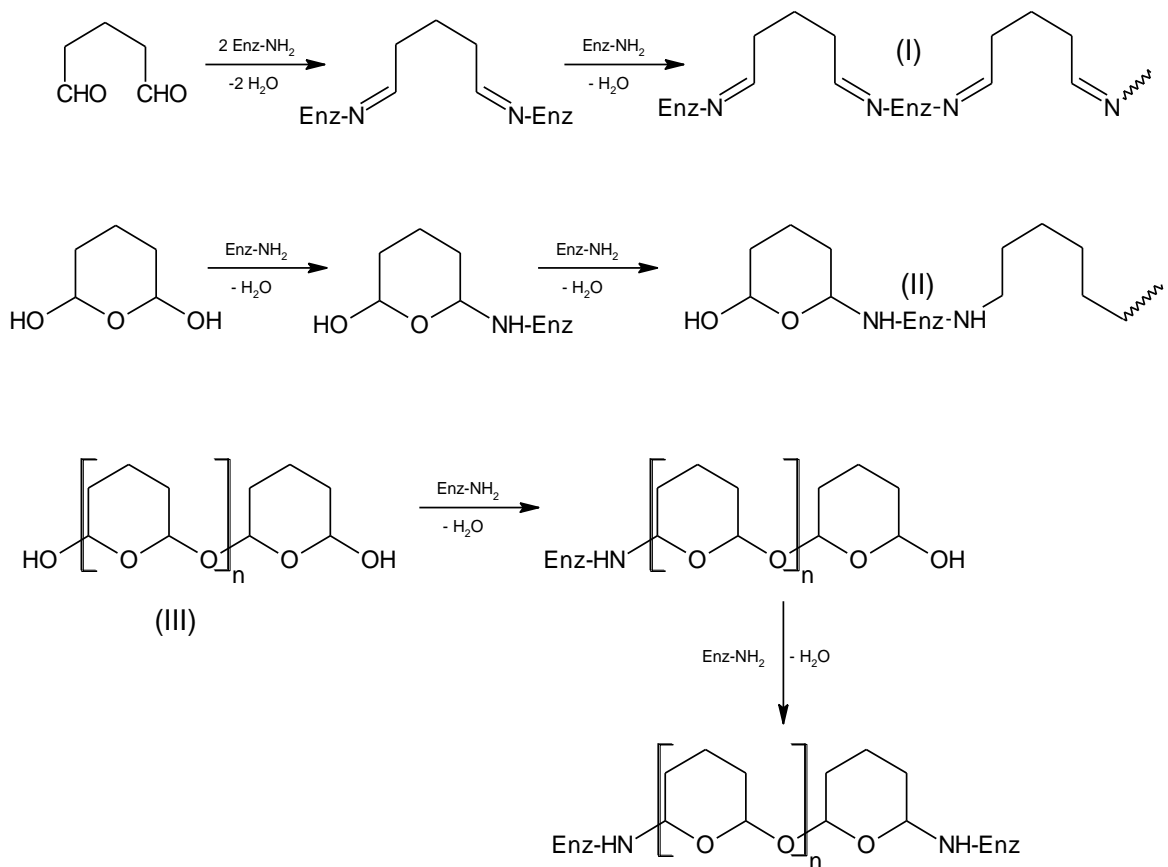


Figura 8. Reacciones del glutaraldehído con proteínas en condiciones ácidas y neutras (Migneault y Dartiguenave, 2004)

Como se ha mencionado anteriormente, las bases de Schiff bajo condiciones ácidas son inestables, por lo que la formación de estas bases entre el grupo amino de la lisina y el aldehído libre (estructural) no es favorecida (estructura I). Esta es más favorable para la estructura del hemiacetal cíclico monomérica (II) y para las formas multiméricas (III).

En general, el tratamiento de proteínas con glutaraldehído puede generar entrecruzamientos intermoleculares e intramoleculares. El tipo de entrecruzamiento generado depende de la posición espacial de los residuos de lisina en la estructura 3D de la proteína y la proximidad entre las moléculas proteicas. Por ejemplo, el entrecruzamiento intramolecular se da solo cuando las posiciones espaciales y los

radios de van der Waals de los grupos involucrados localizados sobre la superficie proteica de la enzima coinciden con los del agente entrecruzante. Mientras el entrecruzamiento intermolecular se da a través de la modificación completa de los grupos ϵ -amino de la proteína facilitando la reacción entre moléculas de proteína próximas entre sí (Torchilin y col., 1979; Rodrigues y col., 2013).

En el caso de la PPR, ésta tiene en su estructura un número de lisinas reducido, sin embargo, éstas se encuentran accesibles en su gran mayoría para reaccionar con el glutaraldehído.

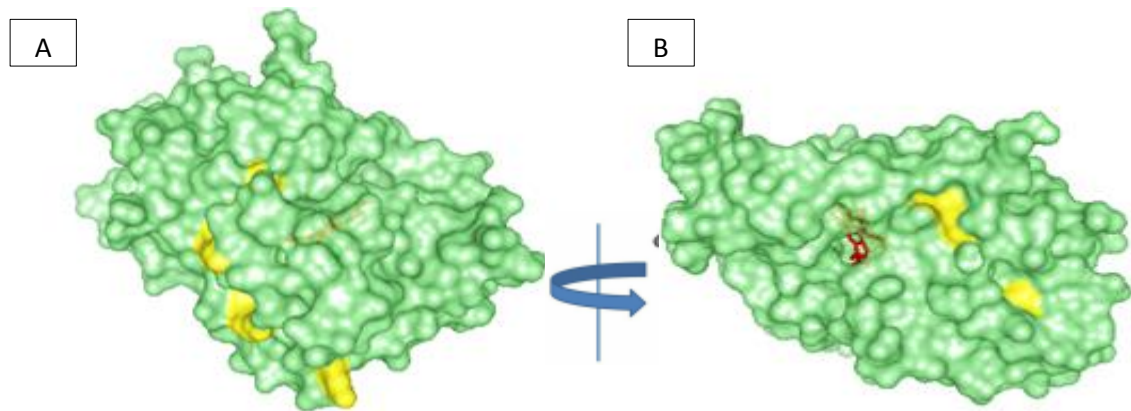


Figura 9. Modelo de estructura de superficie 3D de PPR indicando los grupos amino (color amarillo). A) Cara frontal. B) Cara posterior. Representación obtenida de Protein Data Bank (código PDB: 3HDL) y visualizada usando Pymol 0.99.

En la **figura 9** se pueden apreciar las 6 lisinas (en color amarillo) presentes en la peroxidasa RPTP; se observa también el grupo Hemo (en color rojo) alejado de los residuos aminoacídicos de lisina, lo que evitaría la inactivación de la enzima durante el entrecruzamiento de estas enzimas con el reactivo bifuncional. En la **figura 10** se pueden observar los tipos de entrecruzamiento mencionados anteriormente.

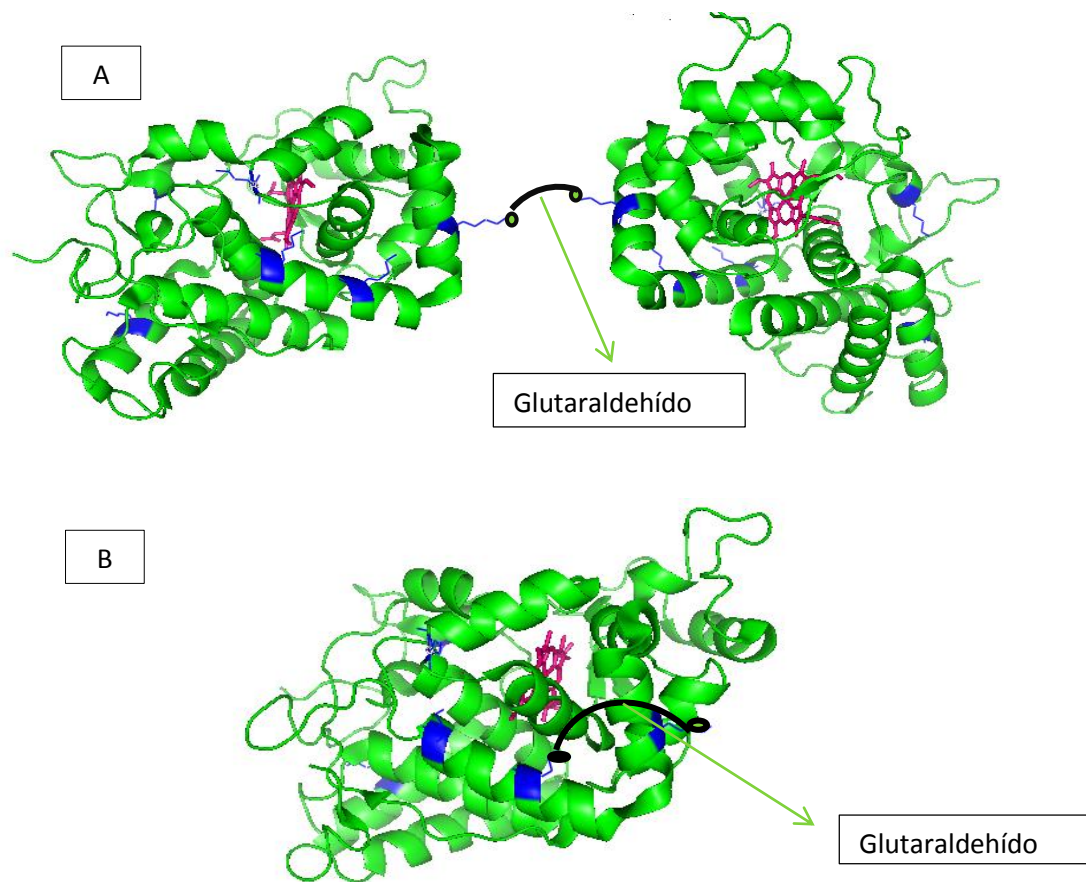


Figura 10. Entrecruzamiento de enzimas con glutaraldehído. Los residuos de lisinas (azules) expuestos para entrecruzamientos. A) entrecruzamiento intermolecular. B) entrecruzamiento intramolecular.

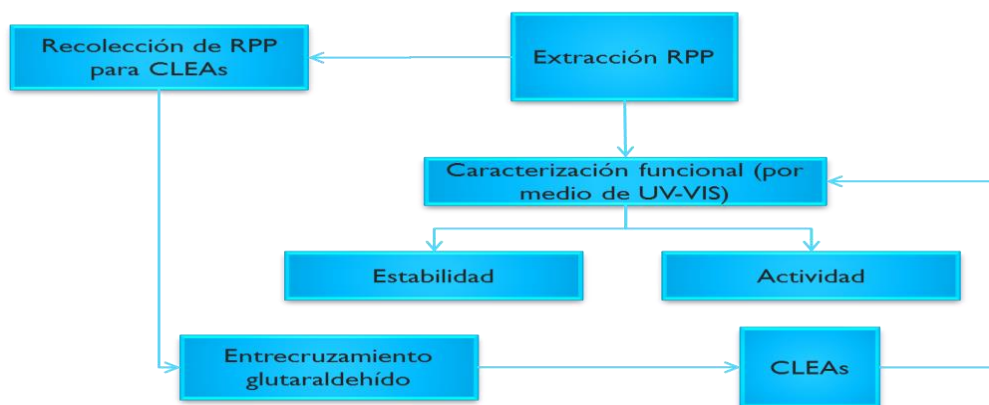
5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 MATERIALES

Peróxido de hidrógeno (30% p/v), etanol (98% v/v) fueron obtenidos de Merck. Guayacol (J. T Baker), glutaraldehído (Sigma-Aldich). Los reactivos utilizados para buffers y otras soluciones fueron todos de grado analítico y proporcionado por JT Baker. La enzima peroxidasa fue extraída de las hojas de palma real como describe en la sección 6.2.1. de métodos experimentales.

5.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES

La peroxidasa de palma real (PPR) se extrajo y purificó de acuerdo con(Sakharov y col., 2001) . Una vez purificada, se estudiaron sus propiedades biocatalíticas a través la evaluación de los siguientes parámetros: 1) a diferentes pHs; 2) a diferentes temperaturas entre un rango 60°C-90°C a pHs entre 3-9; 3) a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Por otro lado, se sintetizaron los agregados entrecruzados enzimáticos utilizando glutaraldehído como entrecruzante. Una vez obtenido los CLEAs de PPR, se evaluó sus propiedades



Esquema 2. . Metodología generalizada del estudio de peroxidasa de palma real

biocatalíticas (actividad y estabilidad). En el **Esquema 2** se presenta la metodología general usada para la tesis.

5.2.1 Extracción de la peroxidasa de palma real

5.2.1.1 Extracción

La peroxidasa de palma real (RPP) fue extraída y parcialmente purificada de las hojas de palma recolectadas en el estadio Alfonso López, ubicado dentro del área metropolitana de Bucaramanga, en el laboratorio del grupo de investigación de bioquímica y microbiología de la Universidad Industrial de Santander, empleando el método desarrollado por Sakharov y col. en el 2001.

Las hojas fueron lavadas con agua destilada, se les retiró su nervadura central, cortaron y trituraron en molinos de granos el mismo día de su recolección. Se pesó 500 g de triturado y dividió en dos porciones de igual masa; a una de éstas se le adicionó un buffer de fosfato 10mM (pH 6) en una relación 1g:4ml, agitando mecánicamente durante 4 h. Posteriormente, se filtró y el sobrenadante obtenido se utilizó como solución extractora para la porción restante de triturado, repitiendo el procedimiento descrito anteriormente(Sakharov y col., 2001).

5.2.1.2 Eliminación de pigmentos

La eliminación de los pigmentos del extracto crudo de peroxidasa se realizó a través del método de partición en dos fases. Para ello, a los 673.6ml de extracto crudo obtenido, se le adicionó polietilenglicol (PEG) hasta obtener una concentración final 14 % (p/v). Posteriormente, se adicionó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido hasta 10% (p/v) y se agitó hasta homogenizar la mezcla por completo. Esta solución se dejó en reposo a temperatura ambiente hasta la formación de dos capas (aproximadamente 12 horas). Luego, se procedió a separar la capa oscura superficial de la capa clara que contiene la peroxidasa. Finalmente, se determinó la concentración proteica de peroxidasa de acuerdo con el método de Bradford(Bradford, 1976). Para concentrar la enzima se usó la técnica de ultrafiltración, utilizando para ello ultrafiltros amicones

PLTK de PM 30kDa(Amicon® Ultra Centrifugal Filters). En cada amición se adicionó 10ml del extracto PPR y se realizó 3 ciclos de centrifugación, sin cambiar el volumen inicial del extracto. Cada ciclo fue de 15 min a 5000g y a una temperatura de 4°C. Por último, se almacenó la enzima a 4°C. Dicha solución enzimática es la que se utilizó para el desarrollo de los CLEAs.

5.2.2 Efecto del pH sobre la actividad catalítica de la peroxidasa de palma real soluble

Se evaluó el efecto del pH sobre la actividad enzimática del extracto soluble de PPR a una temperatura de 25°C, siguiendo el procedimiento descrito en la sección de métodos analíticos, numeral 6.3.1. Para la determinación de actividad se usó como sustrato guayacol y como solución buffer citrato de sodio 10 mM a pH 3, pH 4 y pH 5; fosfato de potasio 10 mM a pH 6, pH 7 y pH 8; bicarbonato de sodio 10 mM a pH 9 y pH 10.

5.2.3 Evaluación de la estabilidad de la peroxidasa de la palma real soluble

5.2.3.1 Estabilidad térmica

La estabilidad térmica de la PPR fue evaluada en un rango de temperatura entre 60-90°C. Para esto, se prepararon 5ml de las diluciones 1/5 y 1/50 con buffer fosfato pH 6 y se incubaron a las diferentes temperaturas. Periódicamente, se extrajeron 50 µL de las diluciones y se determinó la actividad catalítica usando como sustrato guayacol de acuerdo con lo descrito en la sección de métodos analíticos, numeral 6.3.1. El procedimiento fue realizado utilizando como medio de reacción buffer citrato de sodio 10 mM a pH 3 y pH 5, buffer fosfato de potasio 10 mM a pH 7 y buffer bicarbonato de sodio 10mM a pH 9.

5.2.3.2 Efecto de la dilución proteica sobre la estabilidad de la RPP frente al peróxido de hidrógeno

La estabilidad en presencia de H₂O₂ fue evaluada para las diluciones 1/5 y 1/50 del extracto de peroxidasa. Estas soluciones se prepararon con buffer fosfato 10mM a pH 6, e incubaron a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (30mM-297mM) a 25 °C. Periódicamente, se extrajeron 50 µL de la solución para evaluar la actividad enzimática residual frente al sustrato guayacol tal como se describe en el punto 6.3.1 de métodos analíticos.

5.2.4 Elaboración de los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real

Los agregados entrecruzados fueron obtenidos de acuerdo con la metodología propuesta por Schoevaart y col. en el 2004. Para ello, se utilizaron como agente precipitante etanol, y como agente entrecruzante glutaraldehído. La optimización del proceso de elaboración se realizó de acuerdo con lo propuesto por Barbosa y col.,(2006).

Tabla 3. Factores constantes en la elaboración de agregados entrecruzados.

Factor valor constante	valor constante
pH	6.0
Temperatura de reacción	4°C

El proceso de obtención de los agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real se llevó a cabo tal como se describe en la **figura 5** (Schoevaart y col. 2004)

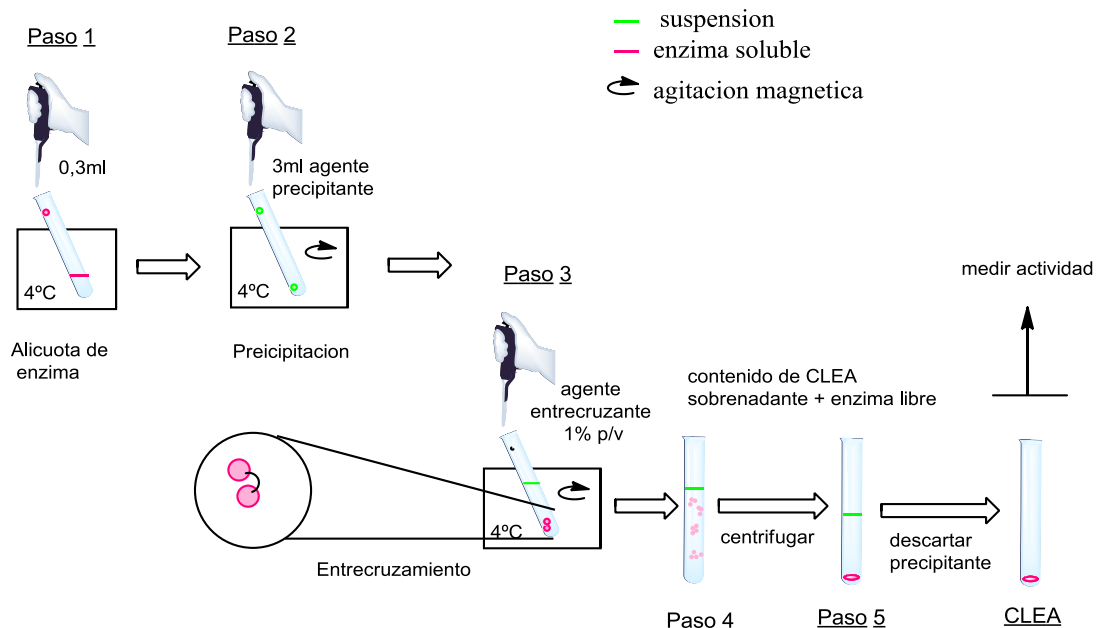


Figura 11. Elaboración de agregados entrecruzados. (Schoevaart y col. 2004)

5.2.4.1 Procedimiento para la elaboración de los agregados entrecruzados

Paso 1: Se transfirió un volumen de 0.3 ml de enzima en un tubo de ensayo.

Paso 2. Etapa de precipitación

Al tubo de ensayo que contiene peroxidasa de palma real fueron adicionados 3.0 ml de etanol al 78 % (v/v), con agitación magnética constante por una hora.

Paso 3A. Actividad del agregado

La actividad catalítica se determinó tal como se describe en la sección 1.3.1 utilizando como blanco etanol al 78%(v/v). Se midió la actividad catalítica de la suspensión generada al agregar el agente precipitante, de acuerdo con lo descrito en la sección de métodos analíticos, numeral 6.3.1..

Paso 3B. Entrecruzamiento del agregado formado

Al agregado de peroxidasa formado se le adicionó glutaraldehído al 1%(v/v) como agente entrecruzante. Este tratamiento permitió la reacción de los grupos amino presentes en la superficie de la enzima con los grupos carboxílicos del dialdehído.

Paso 4. Medición de la actividad catalítica de la suspensión (agregado entrecruzado y enzima soluble no entrecruzada libre).

De la mezcla acuosa conteniendo agregados entrecruzados de peroxidasa y enzima libre que no reaccionó con el glutaraldehído, se extrajo un volumen de 20 μ L para determinar su actividad catalítica tal como se describe en la sección de métodos analíticos, numeral 6.3.1..

Paso 5. Medición de la actividad catalítica del sobrenadante

Se centrifugó a 8000 rpm por 5min la mezcla acuosa que contenían los agregados entrecruzados insolubles y la enzima libre. Se determinó la actividad enzimática del sobrenadante como se describe en la sección de métodos analíticos, numeral 6.3.1.

Las actividades catalíticas del paso 4 y 5 se midieron con el fin de monitorear la enzima durante el proceso de entrecruzamiento.

Paso 5A. Medición de la actividad de los agregados entrecruzados

Los CLEAs obtenidos se centrifugaron para separarlos del medio de reacción, luego se realizó un lavado con buffer fosfato pH 7 con el fin de retirar el exceso de glutaraldehído. Posteriormente 20 mg de CLEAs se resuspendieron en 2ml de buffer fosfato pH 7 y su actividad enzimática determinada de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos analíticos, numeral 6.3.1.

5.2.5 Evaluación de la estabilidad de los agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real(CLEA-PPR)en diferentes condiciones experimentales

Los agregados entrecruzados de peroxidasa obtenidos a través de las condiciones óptimas, se les evaluó su estabilidad en los diferentes parámetros (pH, temperatura y [H₂O₂]) en los que la enzima soluble presentó baja estabilidad.

5.2.5.1 Estabilidad térmica

Para este ensayo se pesó aproximadamente 16.5 mg de CLEAs y se re-suspendieron en 1ml de buffer fosfato de potasio 10mM a pH 6. Los CLEAs fueron incubados a 65°C y 90°C, utilizando buffer citrato de sodio pH 3 y buffer fosfato de potasio pH 7, respectivamente, como medio de reacción. Periódicamente, se extrajeron 50µL de la suspensión para evaluar la actividad enzimática residual frente al sustrato guayacol tal como se describe en el punto 6.3.1 de métodos analíticos.

5.2.5.2 Estabilidad en peróxido de hidrógeno

Para este ensayo se pesó aproximadamente 18.2 mg de CLEAs y se re-suspendieron en 1ml de buffer fosfato de potasio 10mM a pH 6. Los CLEAS fueron incubados a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (30mM-1188mM) a 25 °C. Periódicamente, se extrajeron 50µL de la suspensión para evaluar la actividad enzimática residual frente al sustrato guayacol tal como se describe en el punto 6.3.1 de métodos analíticos.

5.2.6 Evaluación de la reacción de los CLEA-PPR en la decoloración del naranja de metilo.

La actividad de los CLEAs fue evaluada en la degradación de colorantes del tipo Azo para ello, como sustrato modelo se utilizó anaranjado de metilo. Las condiciones de reacción utilizadas fueron las descritas por Graterón y col (Grateron y col., 2007).

5.2.6.1 Cinética de remoción del colorante con los CLEA-PPR

Inicialmente, se preparó la solución de colorante naranja de metilo con una concentración [0.045mM] utilizando buffer citrato pH 3 [50mM] y se adicionó peróxido de hidrogeno quedando a una concentración de 0.5mM en el volumen final de reacción. Para el ensayo, se tomaron 3ml del colorante y se le adicionaron 27mg de CLEAs (equivalentes a 4.6U). Transcurrida una hora, se midió la absorbancia del colorante tal como se describe en la sección de métodos analíticos, numeral 6.3.1.

5.2.6.2 Evaluación de la estabilidad de los CLEAs de PPR en diferentes ciclos de reacción.

Se evaluó la estabilidad de los agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real frente al uso en diferentes ciclos de reacción. Para ello, en un ciclo de reacción, 3 ml de anaranjado de metilo eran contactados con 27mg de CLEAs y se les adicionó peróxido de hidrógeno a una concentración final de 0.5mM en el volumen de reacción, por un tiempo de 3 h. Transcurrido el tiempo de reacción se determinó el porcentaje de degradación del colorante, como se describe en la sección de métodos analíticos, numeral 6.3.1. Finalizado un ciclo de reacción los CLEAs eran lavados y reutilizados en un nuevo ciclo de reacción.

5.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.

5.3.1 Determinación de la actividad enzimática.

5.3.1.1 Preparación del medio de reacción.

El sustrato utilizado para la determinación de la actividad catalítica de la peroxidasa se preparó adicionando a 50 ml de buffer fosfato 10 mM (pH 6.0), 10.6 µL de H₂O₂ al 30% (v/v) (Sakharov y col., 2001).

5.3.1.2 Actividad enzimática

La actividad catalítica de la peroxidasa se cuantificó de forma continua a través de la determinación de las velocidades iniciales de reacción; se utilizó como sustrato guayacol y se determinó la reacción de aparición del producto, el tetraguayacol, a 470 nm, con un coeficiente de extinción molar del producto $5200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (ver **figura 12**). Para el ensayo se adicionó 50 μL de peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) a 2.5 ml de medio de reacción y 5 μL de guayacol. Posteriormente, se siguió la formación del producto de reacción midiendo el aumento la absorbancia en un espectrofotómetro UV/visible de doble haz UV-1800 SHIMADZU(Sakharov y col., 2001). La actividad catalítica se expresó como unidades de actividad de peroxidasa por mililitro de solución de proteína.

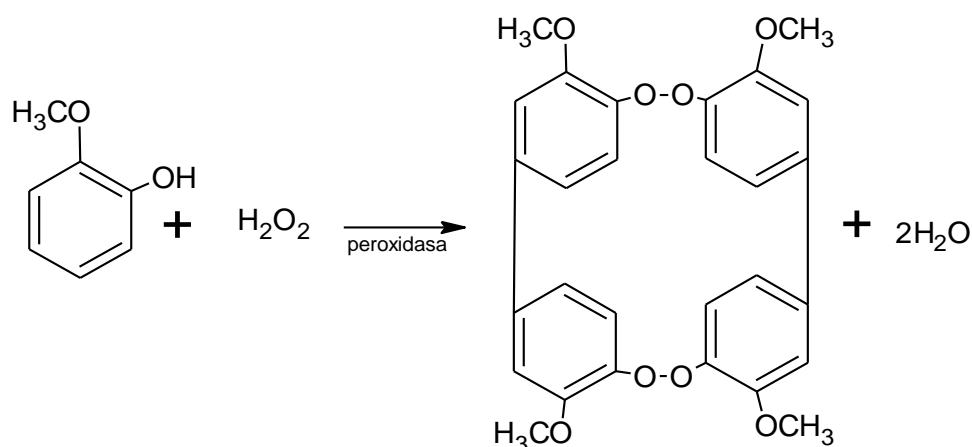


Figura 12. Oxidación de guayacol catalizada por la PPR

5.3.2 Electroforesis SDS-PAGE(Laemmli, 1970)

La electroforesis de proteínas se realizó de acuerdo con lo descrito por Laemmli y col. en 1970, a temperatura ambiente y 150 mV de voltaje constante utilizando como electrolito Tris-HCl, 25 mM-glicina 192 mM y SDS 1% (p/v). Las muestras fueron tratadas durante 5-10 minutos a 100 °C en presencia de tampón de ruptura (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8 – SDS 2%(v/v) - β -mercaptoetanol 5%(v/v) - glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0.005%(p/v)). El revelado de las proteínas se realizó mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-250

(0.25% p/v) disuelto en metanol 50%(v/v) y ácido acético 10%(v/v). Para la determinación de las masas moleculares de las proteínas se utilizaron marcadores de bajo peso molecular: fosforilasa b (94 KD), BSA (66.2 KD), ovoalbúmina (45 KD), anhidrasa carbónica (30 KD) e inhibidor de tripsina (20.1 KD). El gel obtenido fue posteriormente escaneado en un scanner con un densitómetro UMAX PowerLook 2100XL y visualizados a través del software PDQuest (Biorad).

5.3.3 Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). Este método se utilizó para determinar la concentración de proteínas del extracto enzimático purificado de peroxidasa de palma real.

La concentración de proteínas se obtuvo por interpolación con una curva de calibrado (anexo 1) que correlacionó la concentración de proteína con la absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro UV/visible de doble haz UV-1800 SHIMADZU, utilizando como patrón la albúmina de suero de bovino (BSA). La concentración de proteínas se expresó en mg de proteína por ml de solución. Todos los análisis se desarrollaron por triplicado.

5.3.4 Determinación de la remoción del naranja de metilo catalizada por los CLEAs de PPR

Los agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real incubados durante 3 h se les midió la absorbancia para determinar el porcentaje de remoción del colorante. Antes de realizar cada medición, se centrifugó la muestra a 8000 rpm para separar los CLEAs del medio de reacción; luego se retiró un volumen considerable de la solución colorante para medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV/visible de doble haz UV-1800 SHIMADZU a 504nm.

6. RESULTADOS y DISCUSIÓN

6.1 EXTRACCIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL

La extracción de la peroxidasa de palma real se realizó de acuerdo con lo descrito por Sakharov y col. en el 2001. Para ello se usó una relación de 1g de hojas por 4 ml de buffer fosfato pH 7, con el fin de obtener un extracto crudo con una mayor concentración de proteína.

La etapa siguiente a la extracción de la peroxidasa fue la eliminación de una alta concentración de pigmentos. Es conocido que para separar y purificar proteínas se usa el método de partición bifásica utilizando polímeros sintéticos, por ejemplo el polietilenglicol (PEG) soluble, en presencia de una sal, la cual para nuestro caso fue el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Con este método se logró una disminución del volumen del extracto, que permitió, aumentar la concentración de peroxidasa.

Luego de purificar parcialmente la peroxidasa en la etapa anterior, se realizó una filtración al vacío con un papel de tamaño de poro de 0.2 μm . De esta forma, se retuvieron los posibles microorganismos presentes al realizar la extracción de las hojas, evitándose un foco de contaminación en la muestra de interés. Este procedimiento normalmente se utiliza para esterilizar materiales termosensibles como algunos medios de cultivos, enzimas, vacunas y soluciones de antibióticos (Tortora y col., 2007).

Posteriormente, se llevó a cabo la concentración de la enzima por ultrafiltración utilizando un sistema de ultrafiltros (Amicon), Esta técnica es una separación por peso molecular en la que se utiliza un filtro equipado en los ultrafiltros que permitió separar proteínas con peso molecular mayor de 30 kDa. De esta forma, se logró concentrar mucho más el extracto, ya que también se elimina la mayor cantidad de

agua presente en la muestra. La aplicación de esta técnica fue posible debido a que el peso molecular de la peroxidasa reportado en la literatura es de aproximadamente 51kDa(Sakharov y col., 2001).

Finalmente, se realizó una electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%(p/v). La pureza de muestras biológicas y sus posibles contaminaciones se pueden determinar por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). En general, como las peroxidasas monómericas tienen una masa molecular que oscila entre 30 y 50 kDa, se trabaja con geles de poro intermedio (10-12%(p/v)) que son útiles para separar proteínas de entre 10 y 90kDa. Al trabajar en condiciones desnaturizantes, debido al uso del SDS, las proteínas se encuentran cargadas negativamente. La cantidad de SDS unido a la proteína es directamente proporcional a su tamaño, por ello, en el gel poroso las proteínas se van a separar en función de su masa molecular. Con esta técnica, se puede estimar la masa molecular (M) de la proteína en forma monomérica con un margen de error ~ 10%(Zamorano, 2009a).

En la **figura 13** se observa la electroforesis realizada al extracto de PPR, en la cual se aprecia una banda tenue de aproximadamente 51 kDa, a la que se señaló como la peroxidasa de palma real (PPR,). La presencia de otras proteínas es evidente, pues se observaron bandas un poco menos marcadas cerca de 35kDa y 72.2kDa, sin embargo, la intensidad de la banda correspondiente a la PPR es mayor.

En cuanto a la corrida electroforética hay que resaltar que el extracto de PPR presentó dificultad para migrar a través del gel de poliacrilamida. Se sabe que algunos tipos de proteínas pueden mostrar migración atípica en esta técnica, ya sea por poseer puntos isoeléctricos muy extremos (donde la carga intrínseca puede ser lo suficientemente fuerte para influir en la movilidad), o por ser proteínas altamente glicosiladas como es el caso de la PPR, que pertenece a la familia de peroxidasa de plantas clase III (plantas secretoras de enzimas), las cuales presentan un alto

grado de glicosilación característico de este tipo de peroxidasa(Watanabe y col., 2010).

Debido a que el extracto de PPR se utilizó para una técnica de insolubilización que no requiere una alta pureza de la enzima, no se realizó otra etapa de purificación.

6.2 ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA PEROXIDASA SOLUBLE

Inicialmente, la actividad catalítica de la peroxidasa se determinó para dos diluciones (1/25 y 1/50) del extracto enzimático con el propósito de determinar el rango de linealidad para la medición de la actividad catalítica a través del método de velocidades iniciales. En la tabla 4 se muestran los resultados de actividad enzimática para las diferentes diluciones del extracto enzimático. La actividad se determinó midiendo la aparición del producto de reacción (tetraguayacol) utilizando como sustrato guayacol como se describe en la sección de métodos analíticos, numeral 6.3.1.

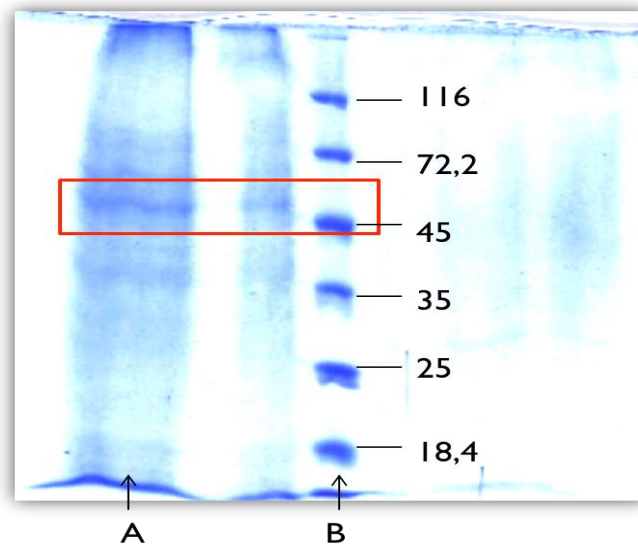


Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE del extracto de peroxidasa de palma real (PPR) purificado. Carril B: marcadores de peso molecular; Carril A: extracto

Tabla 4. Actividad catalítica de la peroxidasa soluble de la palma real.

Dilución	Actividad volumétrica(U/ml)
1/50	56.81
1/25	22.85

De acuerdo con la tabla 4, la dilución 1/50 presentó buenos valores de actividad volumétrica y se observó un amplio rango de linealidad durante la medición de la aparición del producto de reacción (anexo A). Esta dilución se escogió para realizar el perfil de actividad Vs pH que se muestra a continuación.

6.3 PERFIL DE ACTIVIDAD/PH DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL.

Con el fin de determinar el pH óptimo en el cual la peroxidasa expresa la máxima actividad enzimática, se realizó el perfil de actividad enzimática frente al pH. Este ensayo se llevó a cabo con la dilución 1/50, variando el pH del medio de reacción en el rango 3-10 a 25°C y de concentración 10mM, luego se midió su actividad de acuerdo al numeral 6.2.2 de métodos experimentales.

En la **figura 14** se observó que la PPR soluble en el rango de pH (5-8) presenta una buena actividad. Además, con base al perfil determinado se obtuvo un pH

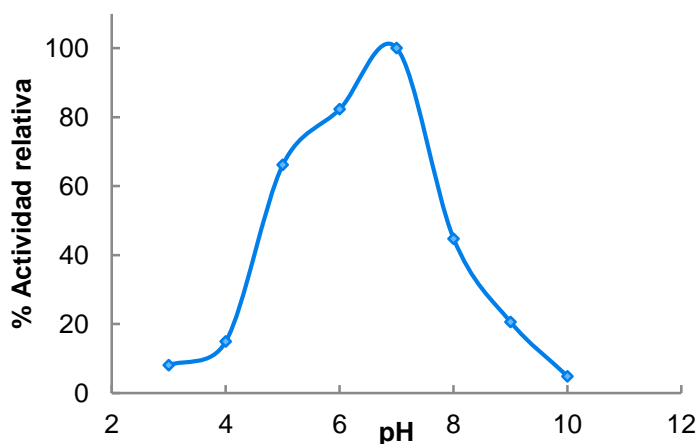


Figura 14. Influencia del valor del pH sobre la actividad de la PPR soluble. El ensayo se realizó a 25 °C, usando guayacol como sustrato, de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales 6.2.2.

óptimo (pH=7) para esta enzima con una actividad catalítica máxima de 30.11U/mL. De acuerdo con el estudio realizado por Sakharov y col.(2001) sobre purificación y caracterización de la peroxidasa de palma real, esta enzima presenta buena actividad en el rango de pH 5-7 cuando el sustrato utilizado es guayacol. Esto que concuerda con el resultado obtenido para esta etapa de investigación sobre la PPR.

6.4 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA PEROXIDASA DE LA PALMA REAL SOLUBLE

6.4.1 Estabilidad térmica de la peroxidasa soluble

La estabilidad de la PPR soluble fue evaluada a diferentes temperaturas (60-90°C) y en el rango de pH 3- 9, de acuerdo con lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.3.1. Con el fin de observar el efecto de la dilución en la estabilidad de la enzima soluble, estas pruebas se trabajaron con dos diluciones: 1/5 y 1/50. Con los resultados obtenidos, se determinaron los tiempos de vida media siguiendo el procedimiento matemático descrito en el anexo 4. Las tablas 5 y 6 muestran los tiempos de vida media de la PPR soluble a los pH y temperaturas que se trabajó. Se observó que a valores de pH 5, 7 y 9, los tiempos de vida media disminuyen, presentando un perfil de estabilidad semejante en todas las temperaturas evaluadas (anexo E, F,G).

Tabla 5. Tiempos de vida media (minutos) de la PPR soluble bajo diferentes condiciones de inactivación térmica. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.3.1.

pH	Diluciones	Temperaturas[°C]	
		60	65
		Tiempo de vida media[min]	
3	1/5	6931	6931
	1/50	315	20

Tabla 6. Tiempos de vida media (minutos) de la PPR soluble bajo diferentes condiciones de inactivación térmica. Los experimentos se realizaron de acuerdo

a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.3.1. Dilución 1/5 [15.4 µg/ml]; Dilución 1/50 [1.54 µg/ml]

pH	Diluciones	Temperaturas[°C]			
		70	75	80	90
Tiempo de vida media[min]					
5	1/5	ND	408	187	12
	1/50	ND	347	120	6
7	1/5	248	ND	122	23
	1/50	ND	151	85	10
9	1/5	248	ND	133	22
	1/50	ND	141	72	18

De acuerdo con las tablas 5 y 6, se observó que los tiempos de vida media en el rango de pH 3-9 para la PPR soluble son mayores en la dilución 1/5 para todos los casos evaluados. Los resultados obtenidos a pH 3 muestran una clara diferencia entre las diluciones; en la **figura 15A y 15B** se observan los perfiles de inactivación térmica evidenciando que la enzima diluida 1/5 es 22 veces más estable a 60°C en comparación con la dilución 1/50 y 346 veces más estable a 65°C. Lo que indica que la estabilidad se ve influenciada por la concentración de la enzima.

Esta pérdida de estabilidad fue observada también en la caracterización termodinámica de la PPR realizada por Zamorano y col. (2008), ellos encontraron que a pH 3 los pares de iones han desaparecido debido a la protonación y la desnaturalización térmica de PPR era irreversible; por otro lado, encontraron que las transiciones térmicamente inducidas en este valor del pH dependen de la concentración de proteínas, lo que les permitió llegar a la conclusión de que en solución la PPR se encuentra como dímero el cual, cuando se somete a la desnaturalización térmica es más estable que el monómero pero sufre la disociación de los dos monómeros durante el proceso de inactivación térmica (Zamorano y col., 2008); este efecto también fue observado en la peroxidasa de palma *Chamaerops excelsa*(CEP)(Zamorano y col., 2009).

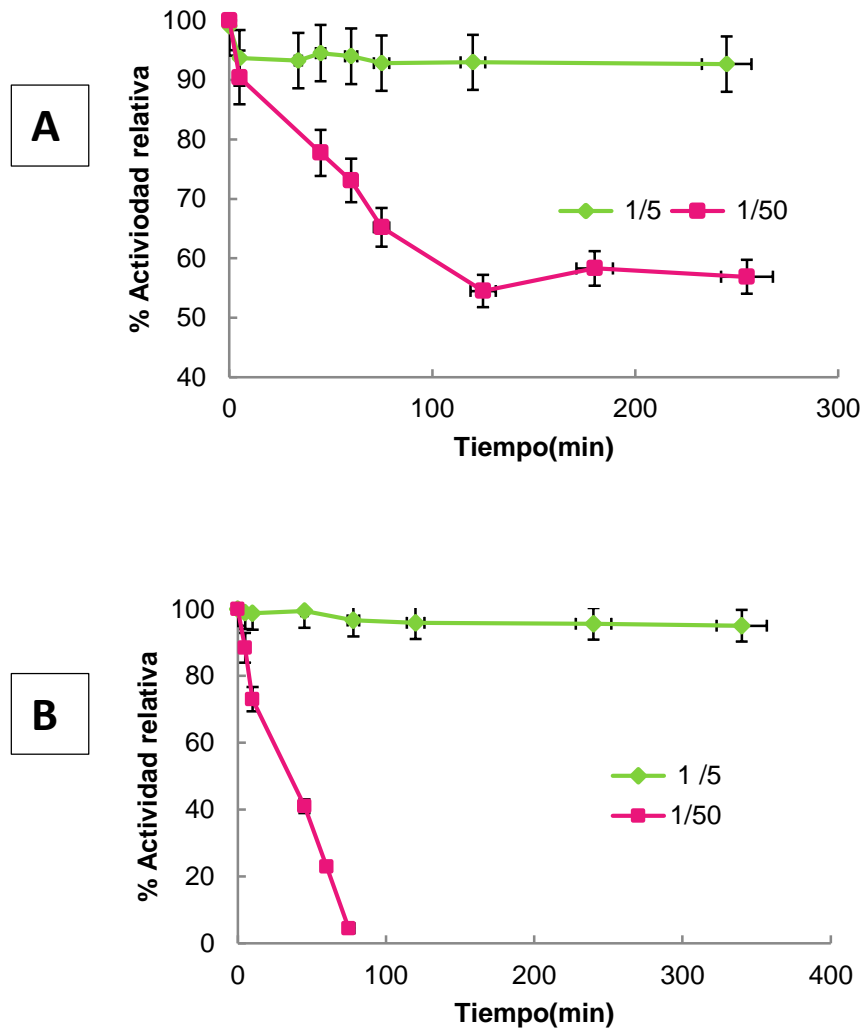


Figura 15. Estabilidad térmica de la PPR soluble. La inactivación térmica se realizó para dos diluciones a pH 3, 10mM y A) 60°C, B)65°C, usando como sustrato guayacol para determinar la actividad residual, como se indica en el numeral 6.2.3.1 de métodos experimentales.

Si bien Zamorano y col. proponen que la enzima en solución se encuentra en un equilibrio entre dos formas, una plegada (dímero) y una desplegada (monómero), dicho equilibrio está desplazado hacia alguna de las conformaciones mencionadas dependiendo de la concentración de la enzima (Zamorano y col., 2008). En el caso de la dilución 1/50 [1.54 µg/ml] el equilibrio estaría desplazado hacia la conformación

monomérica, por tanto, la evaluación de estabilidad térmica realizada a esta dilución confirma que la desnaturalización se lleva más rápidamente cuando la población mayoritaria en la solución enzimática son monómeros. Contrario a la dilución 1/5[15.4 µg/ml], en la dilución 1/50 el daño en la estructura terciaria y secundaria es más rápido, ya que la enzima no pasa por la etapa de disociación del dímero. En este sentido, es evidente que uno de los factores a los que más se les atribuye la estabilidad de la PPR es a la conformación dimérica que se presenta cuando se tiene la enzima concentrada(Zamorano y col., 2008).

En la tabla 6, se evidencia que la estabilidad disminuye con el aumento de temperatura, reflejándose en la disminución de tiempo de vida media de la enzima. Cabe resaltar que para pH 7 se tiene un tiempo de vida media de aproximadamente 23 min a una temperatura de 90°C (**figura 16A**). Igualmente, a pH 9, la PPR logró un tiempo de vida media de 21 min en la misma temperatura (**figura 16B**); lo que confirma que la PPR es una enzima que posee una alta estabilidad térmica a diferencia de otras enzimas extraídas de plantas. Muchas peroxidasa reflejan una alta estabilidad en temperaturas superiores a 60°C(Al-Senaidy & Ismael, 2011; Ikehata et al., 2005; Mdluli, 2005), sin embargo, hasta el momento, solo se había conocido alta estabilidad térmica (temperaturas aprox- 70°C) en la peroxidasa de palma de aceite africana (AOPTP), palma *Chamaerops excelsa* (CEP) y *Jatropha curcas* (JcGP)(Sakharov y Sakharova, 2002; Zamorano y col., 2009; Cai y col., 2012). En el caso de la AOPTP, no presentan efecto nocivo en la estabilidad térmica cuando está a 70°C en condiciones neutras, mientras que al combinar alta temperatura con condiciones ácidas o alcalinas decrece drásticamente su estabilidad tal como ocurre con la peroxidasa de palma real (Sakharov y Sakharova, 2002).

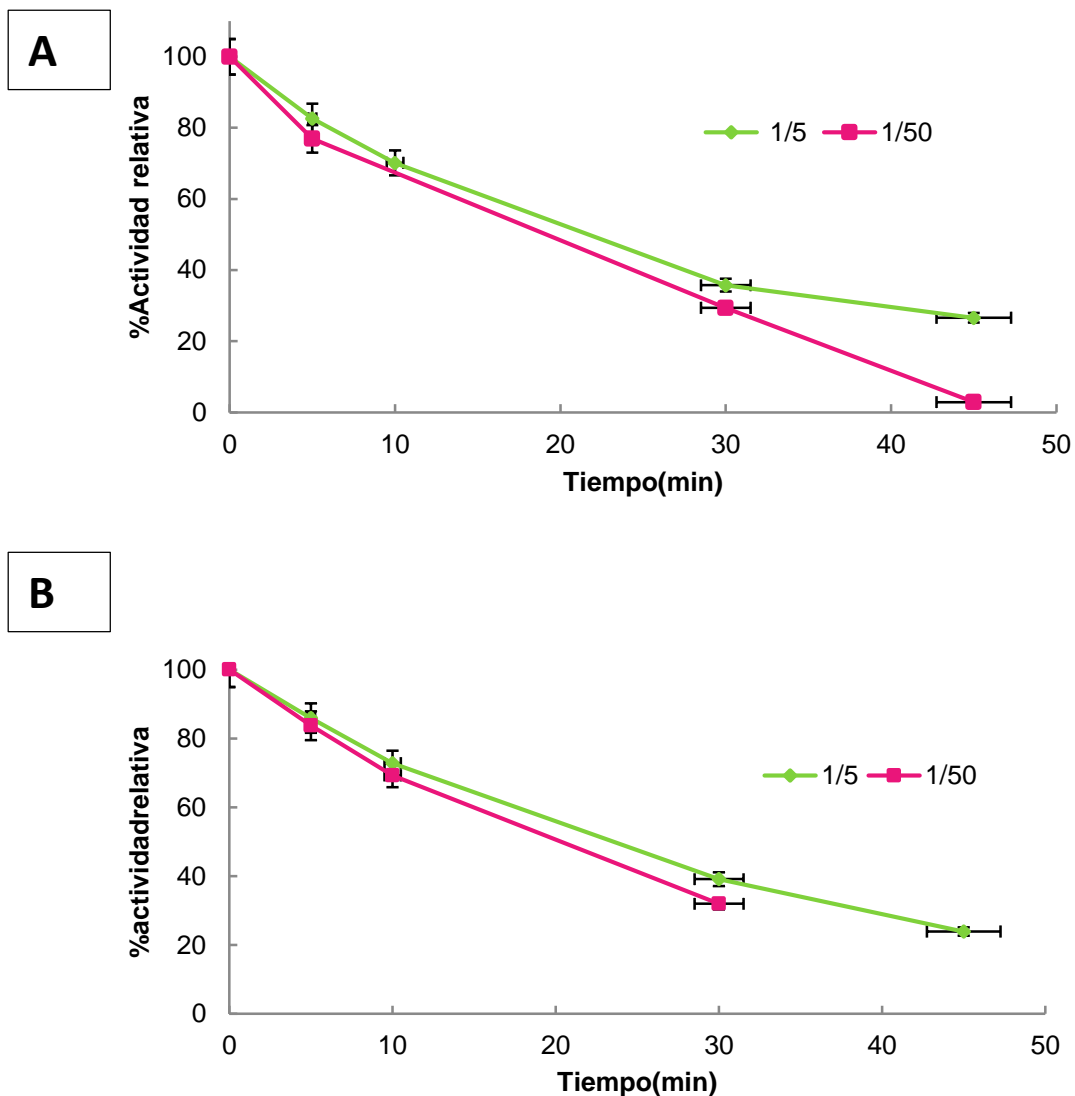


Figura 16. Estabilidad térmica de la PPR soluble. La inactivación térmica se realizó para dos diluciones a 90°C con buffer 10mM a A) pH 7 y B) pH 9, usando como sustrato guayacol para determinar la actividad residual, como se indica en

6.4.2 Efecto de la dilución proteica sobre la estabilidad de la PPR frente al peróxido de hidrógeno

Se evaluó la estabilidad de la PPR soluble variando la concentración de H₂O₂ en un rango de 30-297mM. Para ello se realizó una cinética de inactivación para cada concentración de peróxido de hidrógeno utilizando buffer fosfato 10mM a pH 6 y

temperatura de 25°C, de acuerdo con lo descrito en métodos experimentales, numeral 6.2.3.2. Este experimento fue llevado a cabo con el fin de conocer el perfil de inactivación de la PPR frente al peróxido de hidrógeno, ya que se ha reportado que las peroxidasas de palma se inactivan en ausencia de sustratos reductores o expuestos a altas concentraciones de H₂O₂ (Cuadrado y col., 2011).

Tabla 7. Tiempos de vida media (minutos) de loa PPR soluble en presencia de peróxido de hidrogeno a pH 6. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.3.2

Concentración de H ₂ O ₂ [mM]	Dilución 1/5	Dilución 1/50
	Tiempo de vida media[min]	
30	990	330
89	347	224
148	248	173
207	204	151
297	169	112

La **figura 17** muestra que la estabilidad de la PPR decrece a medida que aumenta a concentración de peróxido de hidrógeno. En los tiempos de vida media determinados para esta etapa (tabla 7), se observó que para la dilución 1/5 la estabilidad disminuye 5.85 veces y para la dilución 1/50 disminuye 2.94 veces, ambos con respecto al valor inicial de concentración de H₂O₂. Además, se evidenció que la estabilidad es 3 veces mayor para la dilución más concentrada, lo que puede relacionarse con la naturaleza dimérica que expresa la PPR.

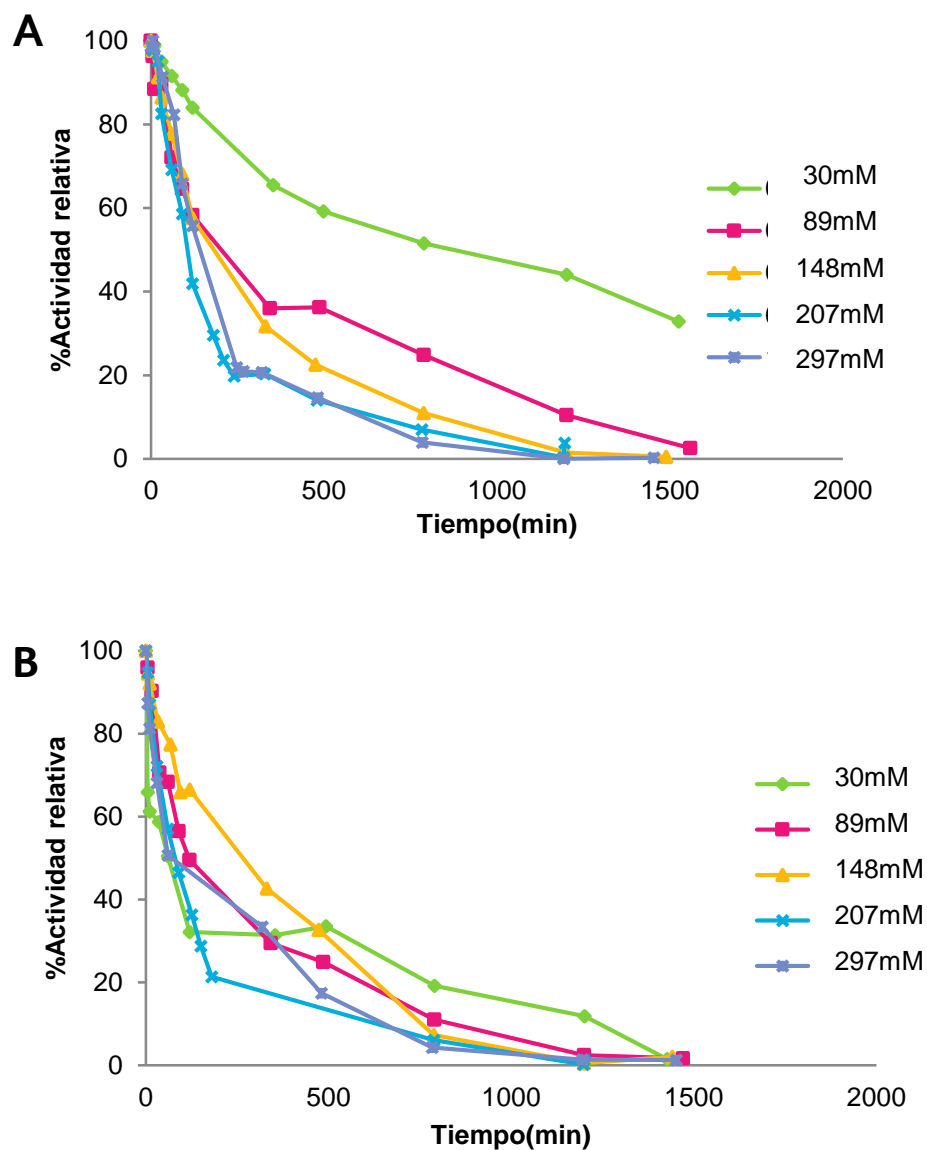


Figura 17. Estabilidad en peróxido de hidrogeno para la PPR soluble. La inactivación con H_2O_2 se realizó a pH 6 y $25^\circ C$ para dos diluciones A) 1/5 y B) 1/50, usando como sustrato guayacol para determinar la actividad residual como se describe en el numeral 6.2.3.2 de métodos experimentales.

Las peroxidasas de clase I, II y III, estudiadas hasta el momento, sufren inactivación suicida por H_2O_2 en ausencia de sustratos reductores (Valderrama y col., 2002). Las cinéticas de inactivación tienen perfiles característicos para cada una de las diluciones de las enzimas. Dentro de las peroxidasas de clase III estudiadas se

conocen varias con alta estabilidad frente al peróxido de hidrógeno. Por ejemplo la CEP, la AOPTP, la peroxidasa de palma dactilera (*Phoenix dactylifera L.*), entre otras. (Cuadrado y col., 2011; Sakharov y Sakharova, 2002; Al-Senaidy y Ismael, 2011) Todas las enzimas mencionadas anteriormente tienen un rasgo en común que es considerado un factor contribuyente a la estabilidad tanto térmica como en presencia de sustrato suicida, son los sitios de N-glicosilación presente en sus estructuras, los cuales son 9 en la PPR (Hiner y col., 1995; Zamorano y col., 2012).

Se han reportado diferentes causas para explicar la inactivación ocasionada por el H_2O_2 . Se ha encontrado que hay ciertas enzimas que son inactivadas específicamente por la oxidación irreversible de residuos catalíticamente importantes. Por ejemplo, los residuos de cisteína, una vez oxidados, alteran la estructura proteica. Se ha observado también en las proteínas, que aminoácidos como metionina, cisteína, triptófano, tirosina, e histidina tienen más susceptibilidad al estar en exceso de peróxido de hidrógeno, aunque también se han reportado daños en otros residuos (Valderrama y col., 2002).

Otra forma de inactivarse la enzima en exceso de H_2O_2 es actuando como sustrato de la peroxidasa y uniéndose irreversiblemente a su sitio activo. A este efecto, producido por el peróxido de hidrógeno, se le denomina inactivación suicida (Cuadrado y col., 2011). Sin embargo, varios autores sugieren (Puiu y col., 2008; Aitken y col., 2003) que la inactivación de peroxidasas como la HRP por el peróxido de hidrógeno, se debe a la formación de uno o varios productos enzimáticos no activos probablemente a través de la formación del compuesto III (peroxilo - FeIII porfirina).

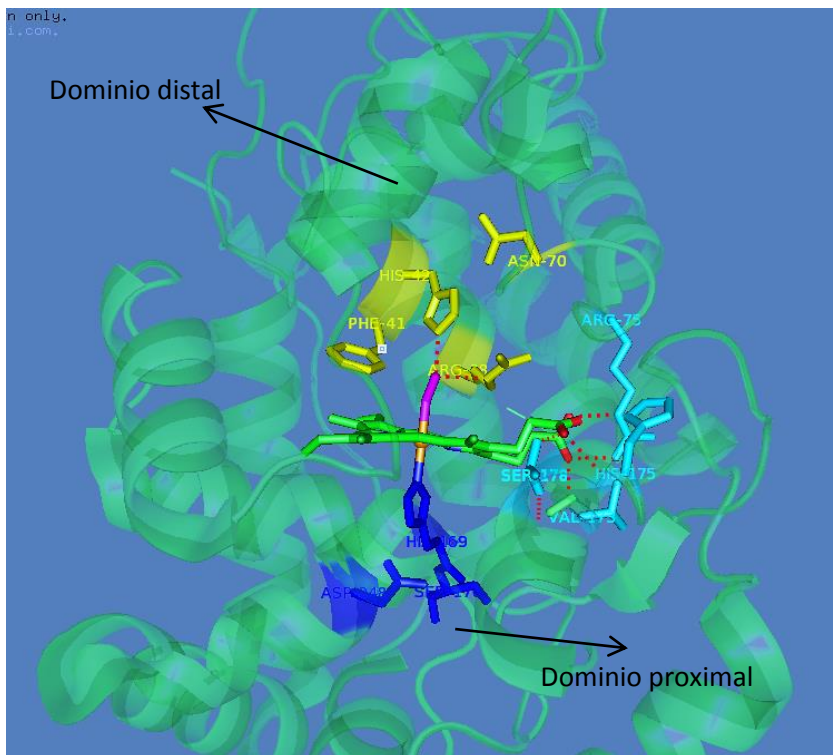


Figura 18. Modelo de estructura 3D de la PPR indicando los residuos del entorno del sitio activo. Residuos en dominio distal: Arg38, Phe41, His42 y Asn70 en color amarillo; residuos en dominio proximal: His169, Asp248 y Ser170 en color azul; residuos que interaccionan con propionatos hemo: Arg75, Val173, His175, Ser178; grupo hemo en color verde y su átomo de Fe en naranja. La estructura 3D fue modelada usando el visualizador Pymol 0.99. La estructura 3D de PPR fue obtenida de Protein Data bank (PDB), código 3HDL.

La **figura 18** muestra la estructura 3D de la PPR con el centro activo constituido por un grupo hemo (color verde) que posee un átomo de hierro (color naranja) centrado en el plano hémico, entre los dominios distal y proximal. En el primero, los residuos altamente conservados e implicados en los procesos de catálisis ácido-base son Arg38, Phe41, His42 y Asn70 (color amarillo); en el segundo los residuos más conservados en las peroxidasas de clase III son His169 y Asp248 (color azul), estando implicados en la estabilización de los distintos estados de oxidación del

hierro hémico. Otro residuo de este último dominio altamente conservado es la Ser170(color azul), ligando del átomo de calcio proximal(Watanabe y col., 2010).

El grupo hemo juega un papel crucial en la catálisis de la peroxidasa, y la orientación correcta con respecto a los residuos catalíticos que rodean influye en la reactividad de H_2O_2 y la formación del compuesto I (Nagano y col., 1996). La orientación correcta del grupo hemo se mantiene por las interacciones entre los propionatos hemo y residuos vecinos, y por la unión coordinada entre el átomo de hierro y la His169 proximal (Watanabe y col., 2010). En la estructura de PPR, en el dominio distal, los residuos Arg75, Val173, His175, Ser178 (color aguamarina) forman enlaces de hidrógeno directos con las cadenas laterales de los propionatos hemo.

De acuerdo con la descripción del entorno del sitio activo, al exponer la PPR en exceso de peróxido de hidrógeno, residuos como His42, His169 e His175 pueden ser oxidados causando daño en el sitio activo, y en consecuencia, la pérdida de estabilidad o inactivación de la enzima. El daño causado puede ser como se mencionó al principio, una unión irreversible del H_2O_2 al centro activo, que estaría actuando como sustrato,; o la formación de productos enzimáticos no activos, probablemente a través de la formación del compuesto III (peroxilo - FeIII porfirina); también cabe la posibilidad que los residuos de cisteína sean oxidados rompiéndose los puentes disulfuro, deformando la estructura terciaria y por consiguiente el centro activo quede más expuesto al peróxido de hidrógeno, propiciando que se rompan los enlaces que mantienen el centro activo dentro de la enzima, liberándose el grupo hemo y ocasionando así su desnaturalización(Valderrama y col., 2002).

Sin embargo, la estabilidad reflejada por la PPR indica que tanto la naturaleza dimérica como el alto grado de glicosilación que posee la enzima, son factores que aportan en gran medida a la estabilidad de esta enzima (Watanabe y col., 2010). En otro estudio, se demostró que la desglicosilación de cinco glicoproteínas diferentes disminuye la estabilidad térmica de éstas (Wang y col., 1996). Por otra parte, los

glicanos hidrofílicos alteran las propiedades estructurales de las proteínas, mejorando con frecuencia su solubilidad y protegiéndolos de la proteólisis (Watanabe y col., 2010).

En el caso de la PPR, se puede decir que los N-glicanos en su estructura estarían protegiéndola por un tiempo de las posibles oxidaciones en presencia de un exceso de H₂O₂. El mismo efecto es observado en la peroxidasa de *Chamaerops excelsa* (CEP). Los investigadores de este estudio exponen que la glicosilación de CEP parece ser importante en la protección de la enzima en la inactivación con diferentes sustratos. Al igual que la PPR, la CEP es una de las peroxidases más activas conocidas en la actualidad, lo que sugiere que el sitio activo de la enzima se ha desarrollado no sólo para mejorar la eficiencia catalítica, sino también para la prevención de la inactivación por el sustrato de H₂O₂ altamente reactivo (Cuadrado y col., 2011).

6.5 AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA DE PALMA REAL

La elaboración de agregados entrecruzados de palma real (CLEA-PPR) se llevó a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Schoevaart y col. (2004), como se describe en el numeral 6.2.4.1 de métodos experimentales. Además, se tuvo en cuenta la optimización de este proceso realizado por Barbosa (2006) en el cual se encontró que las concentraciones óptimas de entrecruzante y agente precipitante eran glutaraldehído al 1%(p/v) y etanol al 78%(v/v), respectivamente, y bajo condiciones de temperatura de reacción de 4°C y pH 6 (Barbosa, 2006).

Durante la síntesis de los CLEA-PPR se controló el tiempo de reacción para el agente entrecruzante y el tiempo de precipitación de la enzima, aun cuando en el estudio realizado por Barbosa (2006) no se contempló esta variable como esencial durante el proceso. En el proceso de elaboración de CLEA-PPR se realizaron medidas de la actividad catalítica entre las etapas de precipitación y

entrecruzamiento, con el fin de observar si había desnaturalización de la enzima. La variación observada en la actividad de PPR se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Monitoreo de la actividad catalítica durante la síntesis de CLEAs. Se utilizaron como agente precipitante y entrecruzante, etanol al 78%(v/v) y glutaraldehído al 1%(p/v), respectivamente. Las dos etapas se realizaron a 4°C y pH 6. La determinación de la actividad se realizó a de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.4.1.

Antes de precipitar		Después de precipitar		Después de entrecruzar		Después de lavar	
t[h]	A _i [U _l]	t[h]	A _s [U _l]	t[h]	A _s [U _l]	t[h]	A _s [U _l]
t=0	0.268	t=3	0.354	t=8	0.104	Rsu	0,109
			A _{so} [U _t] 0.601 x10 ⁻³		A _{so} [U _t] 1.91 x10 ⁻³		

Abreviaturas: A_i: actividad inicial; A_s: actividad de la suspensión; A_{so}: actividad sobrenadante; R_{su}: re-suspensión.

En la tabla 8 se observa que después de precipitar la enzima aumentó un 32% de la actividad inicial. Este aumento de actividad durante el proceso de síntesis de CLEAs se puede atribuir por un lado, a que la peroxidasa de palma, real al cambiar su estado de agregación, se hiperactivó parcialmente debido a variaciones en su estructura terciaria, quedando en una conformación más activa frente al sustrato guayacol. Por otro lado, después de entrecruzarse disminuyó 29,37% con respecto a la actividad de la PPR precipitada. Esto pudo ser ocasionado por restricciones de difusión del sustrato hacia el centro activo de la enzima o del producto hacia el medio de reacción, como consecuencia de un alto entrecruzamiento de la peroxidasa (Migneault y Dartiguenave, 2004).

En varios estudios sobre agregados entrecruzados se observa este efecto durante las etapas de elaboración. Por ejemplo, Sulek y col. (2011) elaboraron CLEAs de

peroxidasa de rábano picante y observaron que en los agregados entrecruzados, las enzimas están estrechamente conectados entre sí por enlaces inter e intramoleculares, que pueden conducir a limitaciones difusionales internas. Al igual que en este estudio, monitorearon la síntesis de CLEAs, determinando la actividad de HRP al final de cada etapa del proceso de elaboración. Ellos antes de realizar mediciones de actividad, reducían por agitación magnética los tamaños de partícula de los agregados formados durante el entrecruzamiento. Con estos datos, hicieron una curva de la formación de CLEAs vs el tiempo, que les indicó una pérdida progresiva de la actividad de la enzima a través del tiempo. En conclusión, una disminución sustancial en la actividad de las partículas de CLEAs se produjo después de finalizar el entrecruzamiento(Šulek y col. 2011).

Asimismo, en la tabla 8 se observa que después de lavar, centrifugar y re-suspender los CLEAs, su actividad vuelve a disminuir. Posiblemente en esta etapa del proceso, los CLEAs se hayan aglomerado formando “clusters”, los cuales sino se re-suspenden bien en el medio de reacción, causan problemas para que el sustrato pueda llegar al centro activo. Este efecto también se evidenció en el estudio realizado por Cao y col. (2001), quienes trabajaron con CLEAs de penicilina acilasa, y determinaron que en comparación con la enzima libre, más o menos 40% de la actividad de los CLEAs se perdió después de la filtración y re dispersión en tampón. Esta pérdida de la actividad en la filtración se la atribuyeron a la fusión de algunos CLEAs, dando lugar a efectos de restricciones difusionales. En este caso, se tuvo trabajó con agitación magnética continua con los CLEAs PPR, manteniendo una suspensión lo más homogénea posible y tomando la medida por duplicado; sin embargo, es un factor difícil de controlar y que se refleja en los valores de actividad obtenidos(Cao y col., 2001).

6.6 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD EN PH, TEMPERATURA Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PERÓXIDO, DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS OBTENIDOS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS

6.6.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de los CLEAs de PPR.

Se evaluó la influencia del pH en la actividad de los CLEAs, utilizando como sustrato guayacol, con el fin de conocer el valor máximo de actividad y realizar una comparación con la PPR soluble. Este ensayo se llevó a cabo con una solución de CLEAs de aproximadamente las mismas unidades de actividad utilizadas para el perfil de actividad de la PPR soluble. Para este experimento, se varió el pH del medio de reacción en el rango 3-10, luego se midió a 25°C su actividad de acuerdo al paso 5A del numeral 6.2.4.1 de métodos experimentales.

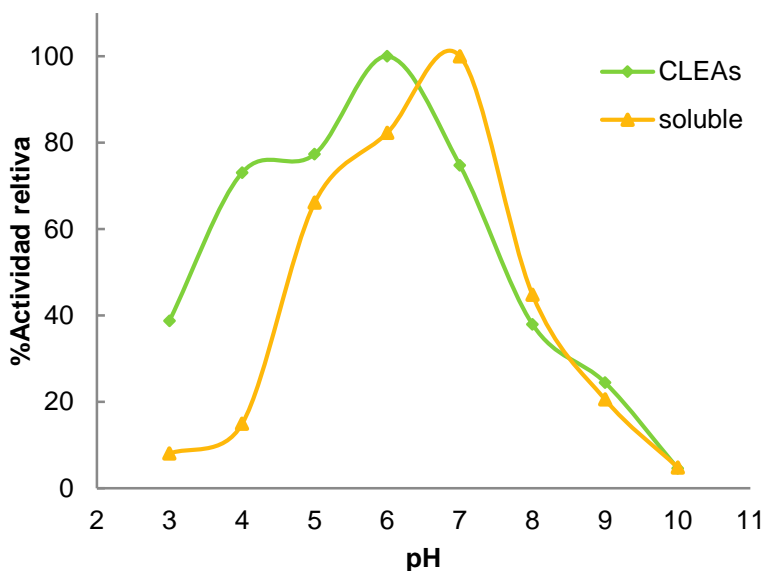


Figura 19. Influencia del valor del pH sobre la actividad de los CLEAs de PPR y perfil de actividad de PPR soluble. El ensayo para los CLEAs se realizó a 25 °C, usando guayacol como sustrato de acuerdo con lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.4.1.

La **figura 19** muestra que la modificación de las moléculas de PPR con glutaraldehído produjo un cambio significativo en el perfil pH/actividad de la enzima. Por ejemplo, para los pH 3, 4, 5 y 6, la estabilidad de los CLEAs aumentó un 30.66%, 58.16%, 11.26% y 17.7%, respectivamente. Además, se puede observar que el pH óptimo de los CLEAs de PPR fue pH 6, alcanzando un valor máximo de actividad de 12.61[U/ml].

Estas diferencias encontradas en el perfil de actividad de los CLEAs en comparación con la PPR soluble frente al guayacol se deben posiblemente a que la modificación de los residuos de lisina con el agente entrecruzante produzca cambios conformacionales en la estructura 3D de la PPR por cuenta de los entrecruzamientos inter- e intra-moleculares.

Algunos estudios como el realizado por Sangeethay col. (2008) han reportado cambios en el perfil de actividad catalítica luego de realizar el entrecruzamiento. Estos investigadores al caracterizar los CLEAs encontraron que el efecto del pH sobre la actividad de la enzima subtilisina libre e inmovilizada era diferente, ya que el pH óptimo de la enzima nativa estaba en 7.0 y se desplazó a un pH de 9.0 después del entrecruzamiento. Ellos afirman que este cambio de pH hacia el lado alcalino es debido a las interacciones secundarias entre el agente entrecruzante y la enzima. Sangeetha y col (2008) plantean que el acoplamiento de glutaraldehído con la enzima habría ligado todos los grupos aminos disponibles en la superficie de la subtilisina, y por lo tanto los grupos ácidos sobre la superficie de la enzima dan una carga negativa a la proteína que en última instancia desplazó el pH óptimo hacia valores mayores de pH(Sangeetha y Abraham, 2008).

Para el caso de los CLEAs de PPR, se observó que igualmente hubo un corrimiento del pH óptimo, pero hacia valores menores de pH. Esto es probablemente debido a que al entrecruzar la enzima por medio de los ϵ -amino de los residuos de lisina, se están eliminando cargas positivas y la carga neta de la PPR se ve alterada,

induciendo a una “nueva” conformación de la proteína, la cual hace que el pH óptimo se desplace hacia pHs ácidos para equilibrar las cargas positivas que aportaban las lisinas(aminoácidos catiónicos). El mismo efecto se evidenció en el estudio realizado por Aytar y col. (2008), quienes también sugieren que este cambio podría ser el resultado de la variación en las cadenas laterales ionizables de aminoácidos ácidos y básicos en el microambiente alrededor del sitio activo, que fue causada por las interacciones recién formadas entre los residuos básicos de la enzima y el glutaraldehído durante el entrecruzamiento(Aytar y Bakir, 2008).

En cuanto a la actividad obtenida para los CLEAs de PPR (12.61U/ml), éstos alcanzaron un 41,9% de la actividad con respecto a la PPR soluble (30.11U/ml). Como anteriormente se mencionó, esta disminución de actividad puede estar relacionada con restricciones difusionales provocadas por el entrecruzamiento de la enzima o al tratamiento dado para resuspender los CLEAs a la hora de realizar la medida de actividad(Šulek y col., 2011).

6.6.2 Estabilidad térmica de los CLEAs

La finalidad de los ensayos de estabilidad térmica fue confirmar la hipótesis planteada para este proyecto: saber si es posible mejorar las propiedades biocatalíticas de la PPR por medio de la técnica de insolubilización de CLEAs. Además, se evidenció el planteamiento realizado por Zamorano y col. (2008), sobre la naturaleza dimérica de la PPR. Al principio de este trabajo, se describió que uno de los factores a los que se le atribuye la alta estabilidad de esta enzima era la conformación dimérica que presentaba la enzima en solución a altas concentraciones de proteína (Zamorano y col., 2008). Por esta razón, la elaboración de los agregados entrecruzados de PPR permitió mantener la conformación dimérica por medio de los enlaces covalentes formados entre el glutaraldehído y los residuos lisínicos de la enzima.

La estabilidad de estos CLEAs de PPR fue evaluada a pH 3 y pH 7, y a 65°C y 90°C, respectivamente, de acuerdo con lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.5.1; teniendo en cuenta que las unidades de actividad fueron las mismas en las muestras evaluadas. Las condiciones de evaluación se escogieron de acuerdo con los resultados obtenidos en la caracterización realizada inicialmente a la PPR soluble, de los cuales se observó que la enzima presentaba baja estabilidad para la dilución 1/50, la cual que representa a la PPR soluble en su forma mayoritariamente monomérica.

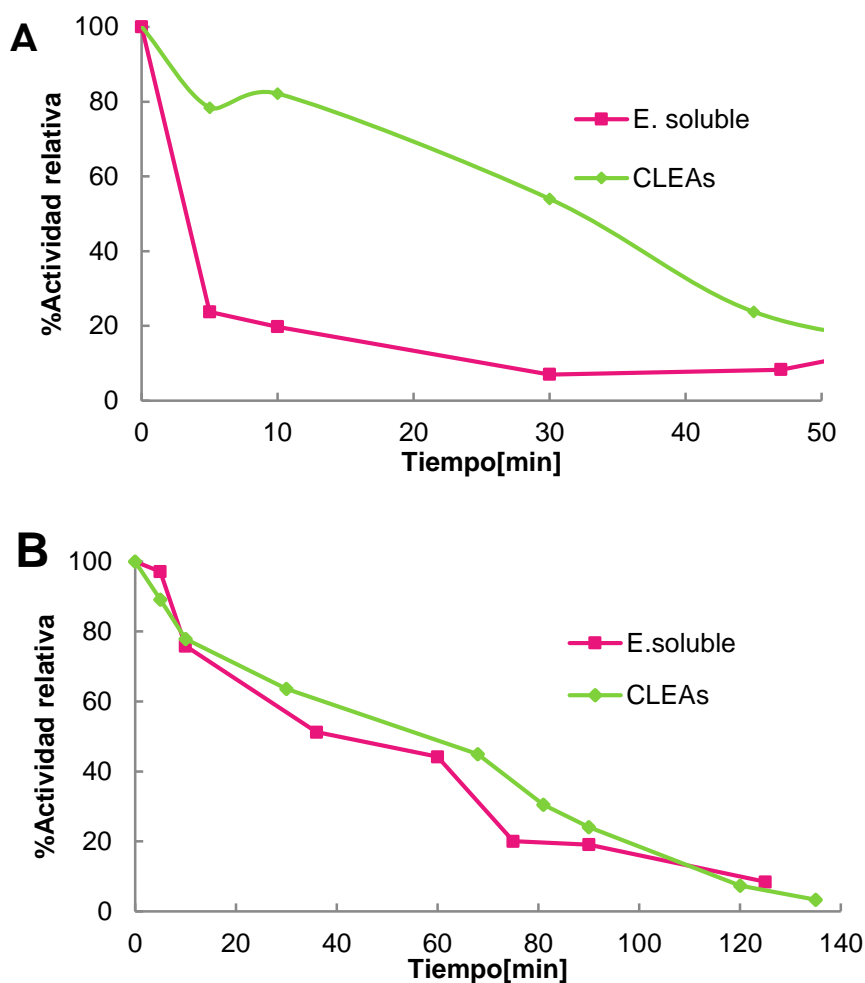


Figura 20. Estabilidad térmica CLEAs y soluble. La inactivación térmica se realizó para una solución de la enzima soluble y CLEAs con las mismas unidades de actividad (1,18U) en las siguientes condiciones: A) buffer citrato [10mM] a pH

La **figura 20A** muestra que la insolubilización de la PPR en forma de CLEAs aumentó significativamente la estabilidad de la enzima. Es evidente que en comparación con la PPR soluble, los CLEAs aumentaron su estabilidad, ya que conservan el 54% de la actividad después de media hora de incubar las muestras, a diferencia de la PPR soluble que en el mismo tiempo solo retuvo el 7% de actividad en las condiciones de ensayo. Por otro lado, en la **figura 20B** muestra que la PPR al estar en su pH óptimo (pH 7) posee más estabilidad que cuando se encuentra en pH 3, y su estabilidad es similar a la de los CLEAs. Sin embargo, estos últimos conservan 10% más de actividad al transcurrir más de 70 minutos de inactivación térmica.

La tabla 9 resume los tiempos de vida media para los CLEAs y la PPR soluble en las condiciones de inactivación mencionadas anteriormente. De estos resultados, se determinó que los CLEAs aumentaron la estabilidad de la enzima en 1.16 y 1.08 veces a pH 3/65°C y a pH 7/90°C, respectivamente. La estabilidad exhibida por los CLEAs sugiere que la insolubilización de la enzima generó la formación de agregados diméricos o multiméricos a través de entrecruzamientos intermoleculares que rigidificaron la estructura 3D de las moléculas de PPR, evitando cambios conformacionales desfavorables, como por ejemplo, la disociación del dímero por efecto de la temperatura (Sangeetha y Abraham, 2008; Sheldon, 2011).

Tabla 9. Tiempos de vida media (minutos) de los CLEAs de PPR bajo diferentes condiciones de inactivación térmica. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.5.1.

pH	Diluciones	Temperaturas[°C]	
		65	90
		Tiempo de vida media[min]	
3	PPR soluble(1/50)	18	
	CLEAs	21	ND
7	PPR soluble(1/50)		35
	CLEAs	ND	38

Diferentes estudios relacionados con CLEAs evidencian este tipo de comportamiento con respecto a la estabilidad (Cruz y col. 2012; Hassani y col. 2013; Cabana y col. 2007), por ejemplo, Sangeetha y col. (2008) obtuvieron CLEAs de subtilisina que eran termoestables hasta 60°C, y por encima de esta temperatura, observaron que la actividad de la enzima comenzó a disminuir a medida que se incrementó el tiempo de incubación. Asimismo, al comparar la enzima nativa con los CLEAs, los resultados mostraron que la estabilidad térmica de los CLEAs de subtilisina era superior a la enzima nativa(Sangeetha y Abraham, 2008).

Otros ejemplos del efecto de formación de CLEAs sobre el aumento en la estabilidad operativa a temperaturas elevadas son: el estudio de la estabilidad térmica limitada de la papaína por medio de entrecruzamiento, donde mejoró la estabilidad del CLEA de papaína a pH 7 y 50 ° C de forma espectacular en comparación con la papaína libre(Sheldon, 2011). Igualmente, en el estudio realizado por van Pelt y col. (2008) lograron insolubilizar la enzima nitrilo hidratasa extraída de una bacteria alcalofílica, *Nitriiruptor alkaliphilus*, mediante la formación de CLEAs, lo que condujo a un aumento dramático en la estabilidad en comparación con la enzima libre (van Pelt y col., 2008).

6.6.3 Estabilidad en presencia de peróxido de hidrógeno de los CLEAs

La estabilidad de los CLEAs fue evaluada en peróxido de hidrogeno (H₂O₂) al 30%(v/v) en un rango de concentración de 297mM-1188mM, a pH 7 y 25°C frente al guayacol, de acuerdo con lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.5.2. En este ensayo también, se trabajó con las mismas unidades para las muestras de CLEAs y la PPR soluble (9U). La selección de H₂O₂ se realizó debido a que inactiva la PPR soluble, y a que se ha reportado en la literatura que este compuesto actúa como un sustrato suicida en el mecanismo catalítico de la PPR(Valderrama y col., 2002; Cuadrado y col. 2011).

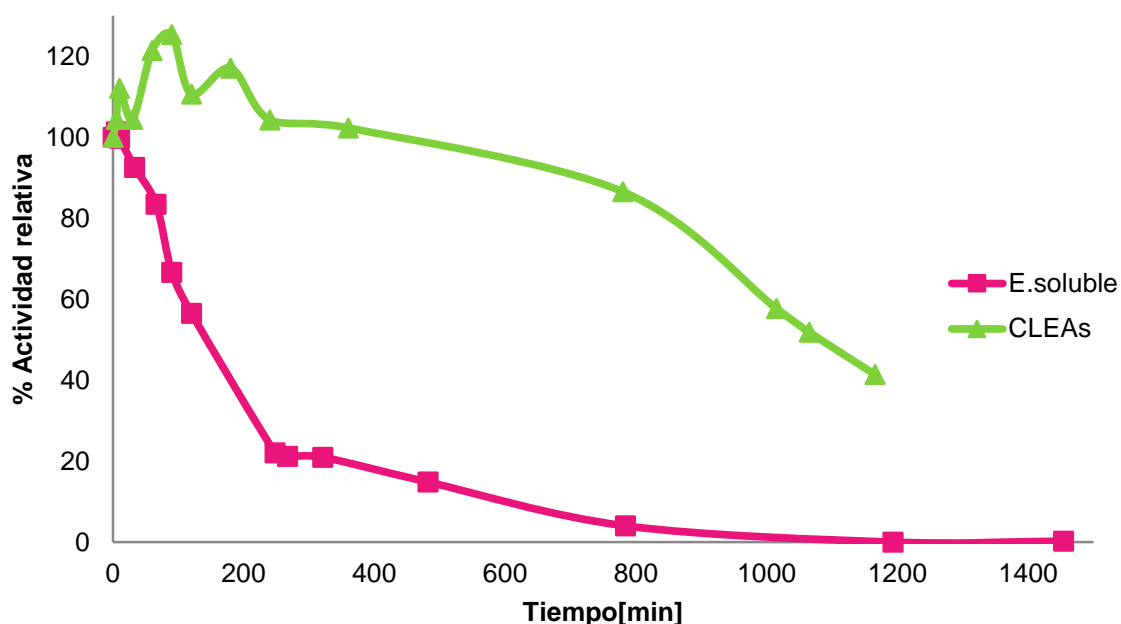


Figura 21. Estabilidad en peróxido de hidrógeno de CLEAs y PPR soluble. La inactivación con H₂O₂ se realizó a pH 7, 25°C y concentración de H₂O₂ [297mM] para las soluciones de CLEAs y PPR soluble con igual unidades de actividad catalítica (9U), se determinó la actividad residual usando como sustrato guayacol de acuerdo al numeral 6.2.5.2 de métodos experimentales.

Como se pudo observar en la caracterización de la enzima soluble, la estabilidad disminuyó drásticamente a una concentración de peróxido de hidrógeno de 297mM; por esta razón, se realizó una comparación entre los CLEAs y la enzima soluble bajo las mismas condiciones en las que se caracterizó la PPR soluble. Los resultados obtenidos (**figura 21**) muestran que los CLEAs fueron notablemente más estables. Los agregados entrecruzados conservan más de la mitad de su actividad después de 13 horas de incubación con el peróxido de hidrógeno, mientras que la enzima soluble después de 8 h perdió más del 80% de su actividad, es decir, prácticamente se inactivó bajo estas condiciones. Este aumento en la estabilidad al insolubilizar la enzima con esta técnica de entrecruzamiento se ha visto en otros estudios, por ejemplo, Roberge y col. (2009) obtuvieron CLEAs de cloroperoxidasa (CLEA-CPO) con alta tolerancia al peróxido de hidrógeno. Estos CLEA-CPO lograron mejoras 5

veces su estabilidad con respecto a la concentración máxima soportada por la cloroperoxidasa soluble (Roberge y col., 2009).

Debido a la alta estabilidad que se observó en los CLEAs de PPR, se realizó un ensayo a concentraciones de H₂O₂ entre 297mM-1188mM (anexo H), con el fin de conocer la concentración máxima antes de generarse la inactivación suicida de estos agregados entrecruzados. De los resultados obtenidos, se determinaron los tiempos de vida media (tabla 10) y se compararon con la enzima soluble, encontrándose que los CLEAs conservaron la mitad de su actividad hasta 59 min después de incubarse con peróxido de hidrogeno 1188mM. Además, el tiempo de vida media hallado para la enzima soluble, el cual fue de 112 minutos, permitió confirmar el perfil de inactivación que presentó la enzima y el aumento de estabilidad con los CLEAs, ya que éstos fueron 1.89 veces más estables que la enzima soluble cuando fueron incubados a una concentración de H₂O₂ de 1188mM.

Tabla 10. Tiempos de vida media (minutos) de CLEAs y PPR soluble en presencia de peróxido de hidrogeno a pH 6. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.5.2.

Concentración de H ₂ O ₂ [mM]	CLEAs	PPR soluble Dilución 1/50
	Tiempo de vida media[min]	Tiempo de vida media[min]
297	990	112
594	315	ND
910	198	ND
1188	59	ND

Abreviaturas. ND: no se determinó la actividad debido a que la enzima se desnaturalizaba rápidamente.

Las diferencias entre la enzima soluble y la alta estabilidad de los CLEAs frente H₂O₂, podría atribuirse a la modificación con glutaraldehído de la estructura 3D de PPR, en la que se forman entrecruzamientos intermoleculares irreversibles. Éstos se forman entre dos o más moléculas de enzima, las cuales pueden generar agregados multiméricos que, junto al alto grado de glicosilación de la PPR, protegen

el centro activo de altas concentraciones de peróxido de hidrogeno, y retardan el efecto de inactivación suicida que se da comúnmente en las peroxidases. Por otro lado, como se mencionó en la evaluación de estabilidad en H₂O₂ de la PPR soluble, el peróxido de hidrógeno puede oxidar los residuos de cisteínas(Valderrama y col., 2002) que ayudan a conservar la estructura terciaria de la enzima.

De acuerdo con lo anterior, es probable que la formación de dímeros o tetrámeros producidos por el entrecruzamiento, puedan también proteger la PPR puesto que los residuos de cisteína serían menos accesibles al entorno saturado con H₂O₂. Para ilustrar lo descrito anteriormente, se puede observar en la **figura 22** que los residuos de cisteína (azules), que conforman los cuatro puentes disulfuros de la PPR, se encuentran cercanos a las lisinas utilizadas en el entrecruzamiento. Igualmente, en la **figura 23** se observan tres residuos de cisteína que claramente

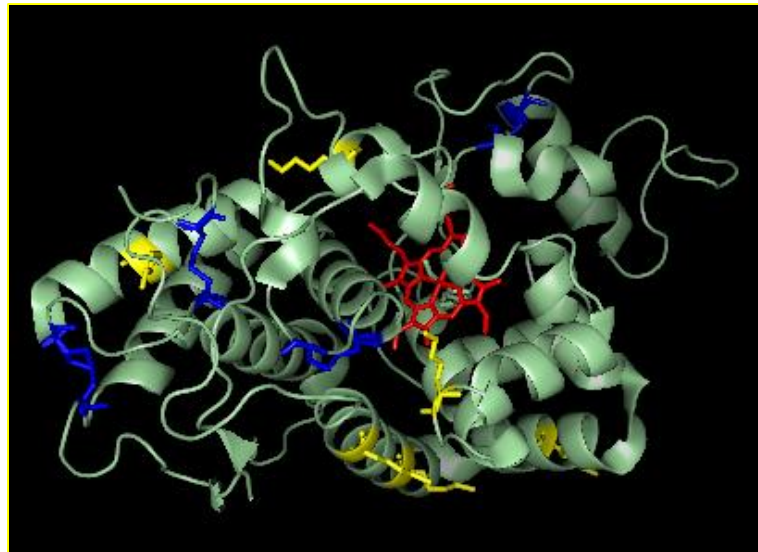


Figura 22. Modelo de estructura de 3D de PPR. Se indican los residuos de lisinas (color amarillo), los residuos de cisteína (color azul) y el grupo hemo(color rojo). La estructura 3D de PPR fue obtenida de Protein Data Bank (código PDB: 3HDL) y visualizada usando Pymol 0.99. estarían expuestos a la oxidación en exceso de peróxido de hidrógeno, sin embargo,

al entrecruzar la enzima utilizando las lisinas 65 y 84, estos residuos se verán protegidos por otras moléculas de PPR.

Para concluir, según el artículo de revisión “Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment” de Iyer y col. (2008) en el que se describe la desnaturalización como el despliegue de la estructura terciaria de la enzima a un polipéptido desordenado en el que los principales residuos ya no están alineados de cerca, lo suficiente para seguir participando en las interacciones funcionales o

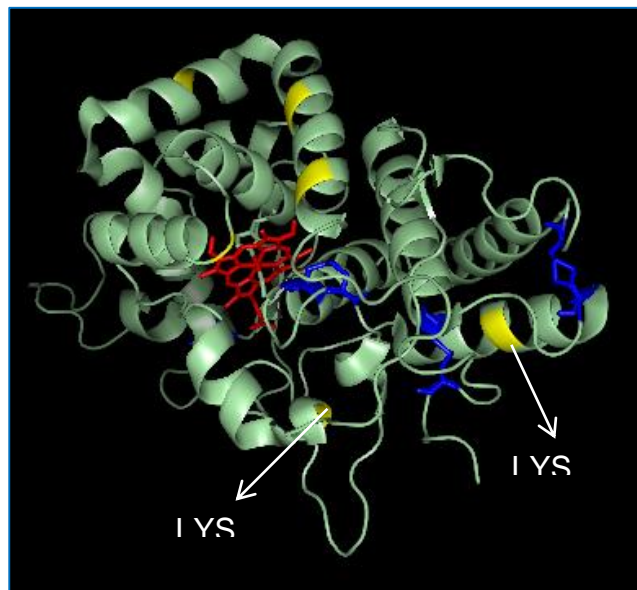


Figura 23. Modelo de estructura de 3D de PPR. Se indican los residuos de lisinas (color amarillo), los residuos de cisteína (color azul) y el grupo hemo (color rojo). La estructura 3D de PPR fue obtenida de Protein Data Bank (código PDB: 3HDL) y visualizada usando Pymol 0.99.

estructuras de estabilización. Además, la desnaturalización se da cuando una proteína está expuesta a cambios químicos que conducen a una pérdida irreversible de la actividad o inactivación particular.

De acuerdo a esto, los autores indican que estos fenómenos dan lugar a dos definiciones, estabilidad termodinámica (o conformacional) y estabilidad cinética (o

de largo plazo). La primera se refiere a la resistencia de la conformación de la proteína plegada para desnaturalizarse, mientras que la segunda mide la resistencia a la inactivación irreversible, es decir, la persistencia de la actividad biológica (Iyer y Ananthanarayan, 2008).

Por lo tanto, en base a lo anterior, se puede afirmar que los agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real aumentaron significativamente la estabilidad termodinámica y cinética de la enzima soluble, es decir, las propiedades biocatalíticas de la PPR fueron mejoradas a través de la técnica de ingeniería de proteínas CLEAs. Una vez logrado este objetivo del proyecto, se realizó posteriormente una evaluación de los CLEAs de PPR, utilizándolos como biocatalizadores en la remoción del colorante naranja de metilo.

6.7 EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN DE LOS CLEA-PPR EN LA DECOLORACIÓN DEL NARANJA DE METILO.

Con el objetivo de evaluar la aplicabilidad de estos CLEAs como un biocatalizador con propiedades catalíticas mejoradas, se llevaron a cabo dos pruebas, inicialmente, se realizó un cinética de remoción de un colorante en condiciones ácidas y luego un ensayo de reutilización del biocatalizador en la remoción de un colorante. Diferentes estudios (Jamal et al., 2013; Mohan, Prasad, Rao, & Sarma, 2005; Vinoth Kumar et al., 2012; Wright & Nicell, 1999) han usado enzimas libres e inmovilizadas para el tratamiento de agua contaminadas con colorantes. Un ejemplo es la investigación llevada a cabo por Akhtar y col. (2005), en el que encontraron que la peroxidasa extraída de la planta del melón amargo (*Momordica charantia*) es un decolorante altamente eficaz en un amplio espectro de colorantes industrialmente importantes (Akhtar y col., 2005). Asimismo, Boucherit y col. (2013) estudiaron la degradación de un colorante utilizando la peroxidasa extraída de la planta de calabaza amarilla (*Curcubita pepo*) inmovilizada, obteniendo como

resultados la remoción de más del 80% del colorante en los primeros cinco minutos de una concentración de 25mg/L(Boucherit y col., 2013).

6.7.1 Cinética de remoción del colorante con los CLEA-PPR

La cinética de remoción del colorante con CLEAs de PPR se realizó con 3ml de una solución de naranja de metilo 0,045mM a pH 3, 25°C y una concentración de H₂O₂ de 224mM, de acuerdo con lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.6.1(anexo I). Las condiciones para evaluar los CLEAs se escogieron en base al estudio realizado por Grateron (2006), quien evaluó la biotransformación del naranja de metilo con PPR soluble. Sus resultados(Grateron, 2006) indicaron que la reacción de decoloración es significativa hasta 140 minutos, alcanzando un porcentaje de remoción de color del 52%. Además, determinó que la reacción se puede realizar con 4.5U de enzima alcanzando el 49% de remoción del colorante y que la concentración de H₂O₂ óptima para la reacción es de 0.5mM.

La **figura 24** muestra que en este caso los CLEAs de PPR decoloraron el 62.03% de la muestra de tinte, lo que indicó que aumento en un 10% la remoción después de 3 horas de reacción con el naranja de metilo con respecto a los resultados encontrados por Graterón. Igualmente, hay estudios que reportan el uso de la técnica de entrecruzamiento de enzimas para aumentar la estabilidad y actividad de la enzima libre en aplicaciones industriales de este tipo(Šulek y col., 2011; Majourhat y col., 2002).

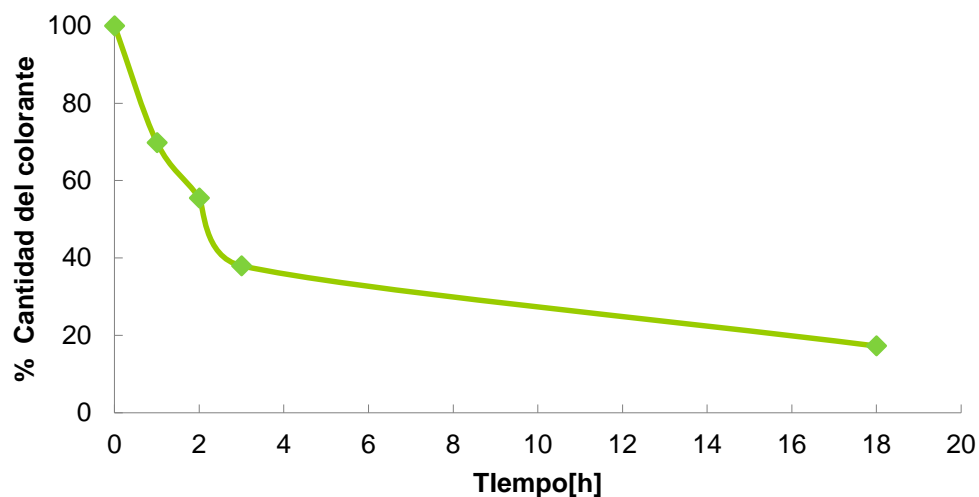


Figura 24. Cinética de remoción del colorante naranja de metilo con CLEAs de PPR. Se realizó con 3ml de una solución de naranja de metilo 0,045mM a pH 3, 25°C y una concentración de H₂O₂ de 224mM, de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.6.1.

6.7.2 Evaluación de los CLEAs de PPR en diferentes ciclos de reacción con naranja de metilo

En este ensayo cada ciclo de reacción se llevó a cabo con las mismas condiciones utilizadas usadas en la cinética de remoción del naranja de metilo, y se determinó el porcentaje de remoción para cada ciclo de acuerdo con la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.6.2(anexo J).

Los resultados de reutilización de los CLEAs de PPR (**figura 25**) mostraron remoción de colorante durante 5 ciclos, para los ciclos 1, 2 y 3 se obtuvieron porcentajes de remoción del 54.93%, 35.11% y 22.17%, respectivamente. Sin embargo, en los últimos dos ciclos, el porcentaje de remoción no fue muy significativo. Esto pudo deberse a que el lavado no fue adecuado, provocando pérdida de una pequeña porción de CLEAs, también puede atribuirse a que los lavados no lograron retirar el peróxido hidrogeno residual en la superficie de los

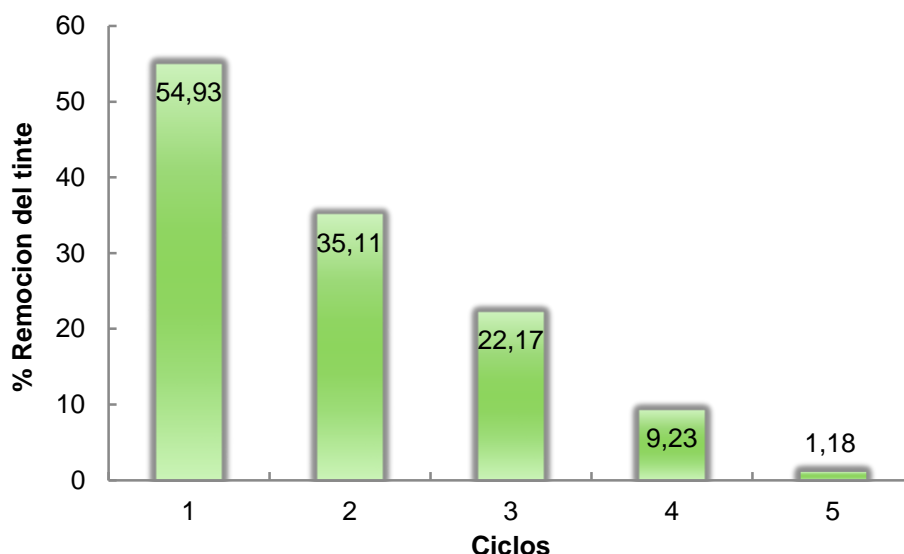


Figura 25. Reutilización de los CLEAs de PPR en ciclos de remoción del colorante naranja de metilo. Se realizó con 3ml de una solución de naranja de metilo 0,045mM a pH 3, 25°C y una concentración de H₂O₂ de 224mM, de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.6.2.

CLEAs ocasionando daños en su estructura que se ve reflejado en la disminución drástica de la actividad catalítica frente al colorante(Vinoth Kumar y col., 2012; Matijošytė y col., 2010). Otro factor que afecta el desempeño de los CLEAs en cada ciclo es la re-dispersión después de centrifugar para separarlos del medio de reacción, ya que la aglomeración de los CLEAs puede causar restricciones en la transferencia del sustrato al centro activo(Cao y col., 2001)

7. CONCLUSIONES

Se obtuvieron agregados entrecruzados de PPR (CLEAs-PPR) a través de la metodología propuesta por Schoevaart y col. (2004), en la que se utilizó como agente precipitante etanol al 78%(v/v) y agente entrecruzante, glutaraldehído al 1%(p/v), determinándose que el tiempo que generaba mayor cantidad de CLEAs con retención de actividad eran 3 horas para etapa de precipitación y 8 horas para la etapa de entrecruzamiento.

Los CLEAs de PPR obtenidos evidenciaron un aumento en estabilidad de la enzima, alcanzando temperaturas de 90°C a pH 7, y 65°C a pH 3, con un tiempo de vida media 1,08 y 1,16 veces mayor al de la enzima soluble, respectivamente. Cabe resaltar que de acuerdo al perfil de inactivación térmica a pH 3 que presentaron los CLEAs, se sugiere que posiblemente estos agregados sigan siendo estables a valores mayores de temperatura.

La modificación de la PPR con glutaraldehído alteró el pH óptimo de funcionamiento de la enzima. Los CLEAs exhibieron la máxima actividad enzimática en la reacción frente al guayacol a pH 6, mientras que la PPR no modificada fue más activa a pH 7.

Los CLEAs fueron notablemente más estables en las condiciones de inactivación con peróxido de hidrógeno evaluadas, mostrando actividad catalítica hasta una concentración 1188mM de H₂O₂, mientras que la enzima soluble solo presentó actividad hasta 297mM.

Se aumentaron los tiempos de vida media de la PPR por medio de la formación de los CLEAS de PPR, ya que a una concentración de peróxido de hidrógeno de 297mM los CLEAs alcanzaron tiempos de vida media de 990 minutos en

comparación con la enzima soluble obtuvo un tiempo de vida media de sólo 112 minutos, siendo entonces los CLEAs 9 veces más estables que la PPR soluble.

La evaluación de los CLEAs en la remoción del naranja de metilo, mostró una degradación superior al 50% de la concentración inicial del colorante. Además, se reutilizó el biocatalizador para 5 ciclos de reacción con el colorante azo(naranja de metilo)

En base a lo anterior, se concluye que la peroxidasa de palma real es una enzima con alta estabilidad a partir de la cual se desarrollaron agregados entrecruzados (CLEAs) que mejoraron las propiedades biocatalíticas de esta enzima, por lo que se recomienda su posible uso como biocatalizador reutilizable en aplicaciones industriales.

BILBIOGRAFÍA

Acevedo, F., Pizzul, L., Castillo, M. D., González, M. E., Cea, M., Gianfreda, L., & Diez, M. C. (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by free and nanoclay-immobilized manganese peroxidase from *Anthracoxyllum discolor*. *Chemosphere*, *80*(3), 271–8. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.04.022

Aitken, S. M., Ouellet, M., Percival, M. D., & English, A. M. (2003). Mechanism of horseradish peroxidase inactivation by benzhydrazide: a critical evaluation of arylhydrazides as peroxidase inhibitors. *The Biochemical Journal*, *375*(Pt 3), 613–21. doi:10.1042/BJ20021936

Akhtar, S., Ali Khan, A., & Husain, Q. (2005). Partially purified bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase catalyzed decolorization of textile and other industrially important dyes. *Bioresource Technology*, *96*(16), 1804–11. doi:10.1016/j.biortech.2005.01.004

Alberty, R. (1953). A short history of the thermodynamics of enzyme-catalyzed reactions. *Journal of the American Chemical Society*, *75*(8), 1921–1925.

Alonso-Calderón, A. (2008). Eliminación de fenol, 2-clorofenol y colorantes en aguas artificialmente contaminadas y aguas residuales textiles utilizando a la peroxidasa de chayote. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, *4*(2), 278–284.

Alpeeva, I. S., Niculescu-Nistor, M., Leon, J. C., Csöregi, E., & Sakharov, I. Y. (2005). Palm tree peroxidase-based biosensor with unique characteristics for hydrogen peroxide monitoring. *Biosensors & Bioelectronics*, *21*(5), 742–8. doi:10.1016/j.bios.2005.01.008

Al-Senaïdy, A. M., & Ismael, M. a. (2011). Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(3), 293–298. doi:10.1016/j.sjbs.2011.04.005

Arroyo, M. (1999). Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica.*, 39(2), 23–39.

Aytar, B. S., & Bakir, U. (2008). Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates, 43, 125–131. doi:10.1016/j.procbio.2007.11.001

Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *Journal of Biotechnology*, 53(2-3), 253–63.

Baquero, L., Castro, J., & Narv ez, C. (2005). Catalasa , Peroxidasa Y Polifenoloxidasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*): maduraci n y senescencia. *Acta Biologica Colombiana*, 10(2), 49–59.

Barbosa, O. (2006). *Elaboraci n de agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real (Roystonea regia)*. Universidad Industrial de Santander.

Boucherit, N., Abouseoud, M., & Adour, L. (2013). Degradation of direct azo dye by Cucurbita pepo free and immobilized peroxidase. *Journal of Environmental Sciences*, 25(6), 1235–1244. doi:10.1016/S1001-0742(12)60102-8

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

Cabana, H., Jones, J. P., & Agathos, S. N. (2007). Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Biotechnology*, 132(1), 23–31. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.07.948

Cai, F., OuYang, C., Duan, P., Gao, S., Xu, Y., & Chen, F. (2012). Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 77, 59–66. doi:10.1016/j.molcatb.2011.12.002

Caicedo, O., Higuera, B., & Martinez, S. (2009). Induccion de actividad peroxidasa y de fenoles totales como respuesta del fruto de lulo (*Solanum quitoense* L.) al patogeno causal de la antracnosis. *Revista Colombiana de Quimica*, 1, 25–42.

Cao, L., Langen, L., & Sheldon, R. (2003). Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), 387–394.

Cao, L., Langen, L. M. Van, Rantwijk, F. Van, & Sheldon, R. A. (2001). Cross-linked aggregates of penicillin acylase : robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics, 0–5.

Cao, L., Van Rantwijk, F., & Sheldon, R. (2000). Cross-linked Enzyme Aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Organic Letters*, 2(10), 1361–1364.

Caramyshev, A., Firsova, Y., Slastya, E., Tagaev, A., Potapenko, N., Lobakova, E., ... Sakharov, I. (2006). Purification and characterization of windmill palm tree (*Trachycarpus fortunei*) peroxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9888–9894.

Caza, N., Bewtra, J. K., Biswas, N., & Taylor, K. E. (1999). Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. *Water Research*, 33(13), 3012–3018.

Cheriyān, S., & Abraham, E. T. (2010). Enzymatic bioremediation of cashew nut shell liquid contamination. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3), 1097–1100. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.11.091

Cruz, J., Barbosa, O., Rodrigues, R. C., Fernandez-Lafuente, R., Torres, R., & Ortiz, C. (2012). Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 80, 7–14. doi:10.1016/j.molcatb.2012.04.013

Cuadrado, N. H., Zhadan, G. G., Roig, M. G., & Shnyrov, V. L. (2011). Suicide inactivation of peroxidase from *Chamaerops excelsa* palm tree leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(5), 1078–1082. doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.09.001

Dordick, J., Marletta, M., & Klivanov, A. (1987). Polymerization of phenols catalized by peroxidase in non-aqueous media. *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 31–36.

Duarte-Vázquez, M., García-Almendárez, B., Regalado, C., & Whitaker, J. (2001). Purification and properties of a neutral peroxidase isoenzyme from turnip (*Brassica napus* L. var purple top white globe) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4450–4456.

Duarte-Vázquez, M., Ortega-Tovar, M., García-Almendárez, B., & Regalado, C. (2003). Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L. var purple top white globe) peroxidase. *Chemical Technology and Biotechnology*, 78, 42–47.

Galvis, M. (2012). *Modulación de las propiedades biocatalíticas de lipases microbianas mediante la síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEA)*. Universidad Industrial de Santander.

Grateron, C. (2006). *Biotransformación de colorantes orgánicos en procesos catalizados con peroxidasa de palma real (Roystonea Regia)*. Universidad Industrial de Santander.

Grateron, C., Barbosa, O., Rueda, N., Ortiz-López, C., & Torres, R. (2007). Azo dye decolorization by optimized cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of a royal palm (*Roystonea regia*) peroxidase. *Journal of Biotechnology*, 131(2), S87. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.07.150

Guisan, J. (2006). Immobilization of Enzymes and Cells. In *Immobilization of Enzymes and Cells* (pp. 19–23). Humana Press.

Hamid, M. (2009). Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, 115(4), 1177–1186. doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.035

Hassani, T., Ba, S., & Cabana, H. (2013). Formation of enzyme polymer engineered structure for laccase and cross-linked laccase aggregates stabilization. *Bioresource Technology*, 128, 640–645. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.058

Hiner, a N., Hernández-Ruíz, J., García-Cánovas, F., Smith, a T., Arnao, M. B., & Acosta, M. (1995). A comparative study of the inactivation of wild-type, recombinant and two mutant horseradish peroxidase isoenzymes C by hydrogen peroxide and m-chloroperoxybenzoic acid. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 234(2), 506–12.

Hiner, N., Hernandez, J., Arnao, B., Garcia, F., & Acosta, M. (1996). Comparative study of the purity, enzyme activity, and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available Horseradish peroxidase isoenzymes A and C. *Biotechnology and Bioengineering*, *50*, 655–662.

Ikehata, K., Buchanan, I. D., Pickard, M. a, & Smith, D. W. (2005). Purification, characterization and evaluation of extracellular peroxidase from two *Coprinus* species for aqueous phenol treatment. *Bioresource Technology*, *96*(16), 1758–1770. doi:10.1016/j.biortech.2005.01.019

Iyer, P. V., & Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, *43*(10), 1019–1032. doi:10.1016/j.procbio.2008.06.004

Jamal, F., Singh, S., Qidwai, T., Singh, D., Pandey, P. K., Pandey, G. C., & Khan, M. Y. (2013). Catalytic activity of soluble versus immobilized cauliflower (*Brassica oleracea*) bud peroxidase-concanavalin A complex and its application in dye color removal. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *2*(4), 311–321. doi:10.1016/j.bcab.2013.05.005

Kauffmann, C., Petersen, B. R., & Bjerrum, M. J. (1999). Enzymatic removal of phenols from aqueous solutions by *Coprinus cinereus* peroxidase and hydrogen peroxide. *Journal of Biotechnology*, *73*(1), 71–74.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680–685.

Lehninger, A., Nelson, D., & Cox, M. (2005). Principios de Bioquímica. In *Principios de Bioquímica* (Omega., pp. 88–90;191–194).

Luther, E., Howard, F., & Marrero, J. (2001). Árboles comunes de Puerto Rico y las Islas Vírgenes. In U. de P. Rico (Ed.), (2001st ed., pp. 27–29).

Majourhat, K., Bendiab, K., Medraoui, L., & Baaziz, M. (2002). Diversity of leaf peroxidases in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) as revealed in an example of marginal (seedling derived) palm groves. *Scientia Horticulturae*, 95(1-2), 31–38. doi:10.1016/S0304-4238(02)00032-8

Mathé, C., Barre, A., Jourda, C., & Dunand, C. (2010). Evolution and expression of class III peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500, 58–65. doi:10.1016/j.abb.2010.04.007

Matijošytė, I., Arends, I. W. C. E., de Vries, S., & Sheldon, R. a. (2010). Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(2), 142–148. doi:10.1016/j.molcatb.2009.09.019

Mdluli, K. (2005). Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (subsp. Caffra). *Food Chemistry*, 92(2), 311–323. doi:10.1016/j.foodchem.2004.07.026

Migneault, I., & Dartiguenave, C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, 37, 790–802.

Mohan, S. V., Prasad, K. K., Rao, N. C., & Sarma, P. N. (2005). Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. *Chemosphere*, 58(8), 1097–105. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.09.070

Murthy, M., Reid, T., Sicignano, A., Tanaka, N., & Rossmann, M. (1981). Structure of beef liver catalase. *Journal of Molecular Biology*, 152(2), 465–499.

Nagano, S., Tanaka, M., Ishimori, K., Watanabe, Y., & Morishima, I. (1996). Catalytic roles of the distal site asparagine–histidine couple in peroxidases. *Biochemistry*, *35*, 14251–14258. doi:10.1007/978-4-431-68476-3_44

Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, *24*(5), 255–265.

Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., ... Dunand, C. (2007). PeroxiBase: The peroxidase database. *Phytochemistry*, *68*(12), 1605–1611.

Puiu, M., Răducan, A., Babaligea, I., & Oancea, D. (2008). Oxidase-peroxidase reaction: kinetics of peroxidase-catalysed oxidation of 2-aminophenol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *31*(6), 579–86. doi:10.1007/s00449-008-0206-8

Roberge, C., Amos, D., Pollard, D., & Devine, P. (2009). Preparation and application of cross-linked aggregates of chloroperoxidase with enhanced hydrogen peroxide tolerance. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *56*(1), 41–45. doi:10.1016/j.molcatb.2008.04.002

Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., & Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, *42*(15), 6290–307. doi:10.1039/c2cs35231a

Sakharov, I. Y., & Sakharova, I. V. (2002). Extremely high stability of African oil palm tree peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1598*(1-2), 108–14.

Sakharov, I. Y., Vesga, M. K. B., Galaev, I. Y., & Sakharova, I. V. (2001). Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties, *161*, 853–860.

Sangeetha, K., & Abraham, T. E. (2008). Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of subtilisin for controlled release applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(3), 314–319. doi:10.1016/j.ijbiomac.2008.07.001

Schoevaart, R., Wolbers, M. W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, a P. G., van Rantwijk, F., ... Sheldon, R. a. (2004). Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering*, 87(6), 754–762. doi:10.1002/bit.20184

Sheldon, R. a. (2011). Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(3), 467–77. doi:10.1007/s00253-011-3554-2

Šulek, F., Fernández, D. P., Knez, Ž., Habulin, M., & Sheldon, R. a. (2011). Immobilization of horseradish peroxidase as crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). *Process Biochemistry*, 46(3), 765–769. doi:10.1016/j.procbio.2010.12.001

Teijòn, J. M., & Teijòn, C. (2001). Bioquímica Estructural. In Editorial Tebar. (Ed.), (pp. 267–280).

Torchilin, V., Maksimenko, A., Smirnov, V., Berezin, I., & Martinek, K. (1979). Principles of enzyme stabilization V. The possibility of enzyme self stabilization under the action of potentially reversible intramolecular crosslinkages of different length. *Biochimica et Biophysica Acta*, 568, 1–10. doi:10.1016/0005-2744(79)90267-5

Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (novena., p. 194). Buenos aires: Editorila Mèdica Panamericana.

Valderrama, B., Ayala, M., & Vazquez-Duhalt, R. (2002). Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry & Biology*, 9(5), 555–65.

Van Pelt, S., Quignard, S., Kubáč, D., Sorokin, D. Y., van Rantwijk, F., & Sheldon, R. A. (2008). Nitrile hydratase CLEAs: The immobilization and stabilization of an industrially important enzyme. *Green Chemistry*, 10(4), 395. doi:10.1039/b714258g

Vinoth Kumar, V., Prem Kumar, M. P., Thiruvankadaravi, K. V, Baskaralingam, P., Senthil Kumar, P., & Sivanesan, S. (2012). Preparation and characterization of porous cross linked laccase aggregates for the decolorization of triphenyl methane and reactive dyes. *Bioresource Technology*, 119, 28–34. doi:10.1016/j.biortech.2012.05.078

Voet, D., & Voet, J. (2006). Bioquímica. In *Bioquímica* (Mèdica Pan., pp. 473–475).

Wang, C., Eufemi, M., Turano, C., & Giartosio, A. (1996). Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry*, 35, 7299–7307.

Watanabe, L., de Moura, P. R., Bleicher, L., Nascimento, A. S., Zamorano, L. S., Calvete, J. J., ... Polikarpov, I. (2010). Crystal structure and statistical coupling analysis of highly glycosylated peroxidase from royal palm tree (*Roystonea regia*). *Journal of Structural Biology*, 169(2), 226–342. doi:10.1016/j.jsb.2009.10.009

Wright, H., & Nicell, J. a. (1999). Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technology*, 70(1), 69–79. doi:10.1016/S0960-8524(99)00007-3

Zamorano, L. S. (2009). *Caracterización quimico-física de la peroxidasa de palma real (Roystonea regia), una enzima con elevada estabilidad*. Universidad de Salamanca.

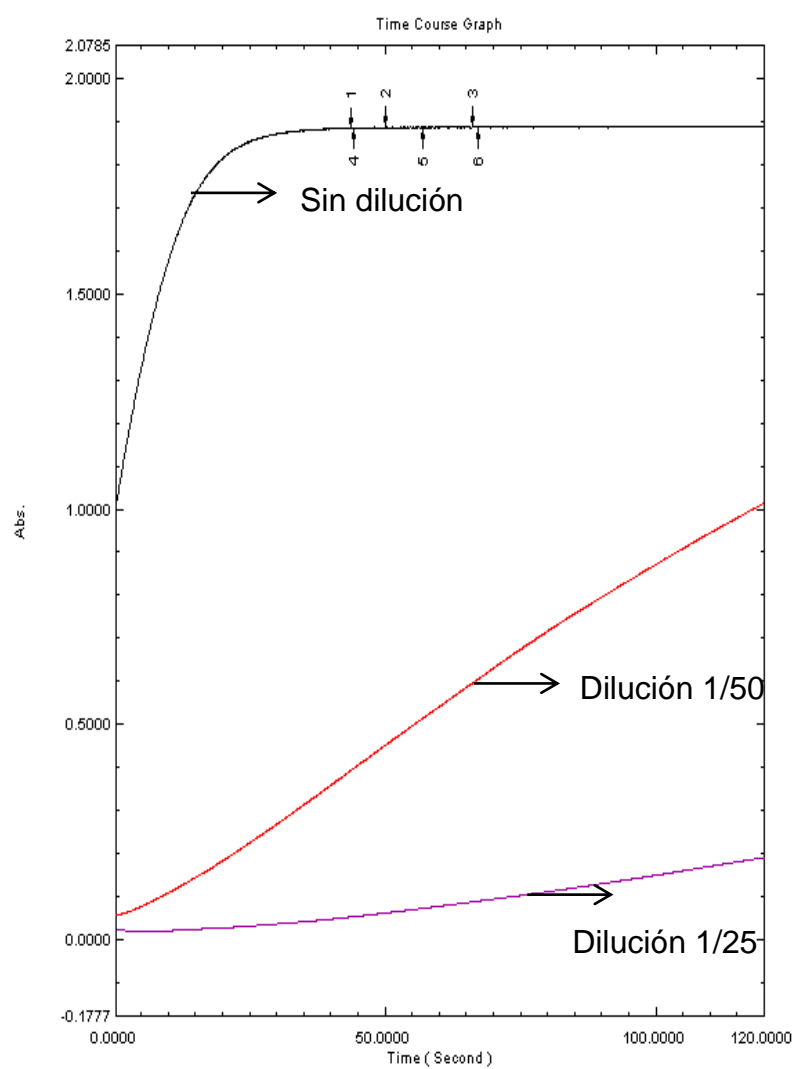
Zamorano, L. S., Cuadrado, N. H., Galende, P. P., Roig, M. G., & Shnyrov, V. L. (2012). Steady-state kinetics of *Roystonea regia* palm tree peroxidase, 3(1), 16–28.

Zamorano, L. S., Pina, D. G., Arellano, J. B., Bursakov, S. a, Zhadan, A. P., Calvete, J. J., ... Shnyrov, V. L. (2008). Thermodynamic characterization of the palm tree *Roystonea regia* peroxidase stability. *Biochimie*, 90(11-12), 1737–49. doi:10.1016/j.biochi.2008.07.010

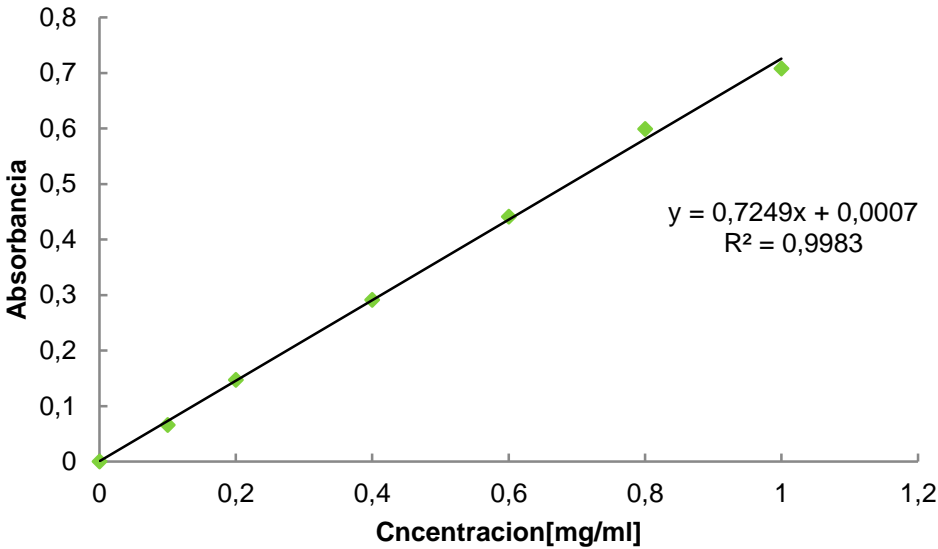
Zamorano, L. S., Vilarmau, S. B., Arellano, J. B., Zhadan, G. G., Cuadrado, N. H., Bursakov, S. a, ... Shnyrov, V. L. (2009). Thermal stability of peroxidase from *Chamaerops excelsa* palm tree at pH 3. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44(4), 326–332. doi:10.1016/j.ijbiomac.2009.01.004

ANEXOS

Anexo A. Rango de linealidad durante la medición de la aparición del producto de reacción tetraguayacol.



Anexo B. Curva calibración para la determinación de proteína mediante el método del BRADFORD



Anexo C. Calculo de la actividad volumétrica de la peroxidasa soluble de la palma real (*Roystonea regia*).

La actividad volumétrica de la peroxidasa soluble se determinó así:

$$\text{actividad volumétrica} \left(\frac{U}{ml} \right) = m * \frac{10^6 * V_t}{\epsilon_{\text{producto}} * V_m} * d$$

Donde:

m: Pendiente (mol/L.min)

ϵ : Coeficiente de extinción molar del guayacol, 5200 M⁻¹·cm⁻¹.

V_t : volumen total de reacción (ml).

V_m : Volumen de solución enzimática (ml).

d : factor de dilución de la solución enzimática.

U : se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol guayacol por minuto bajo condiciones de pH 6.0 y temperatura de 25°C.

La actividad volumétrica de los agregados entrecruzados se determinó de igual forma que la enzima soluble.

Anexo D. Calculo de tiempos de vida media.

Los tiempos de vida media se determinaron así:

Teniendo en cuenta una cinética de primer orden:

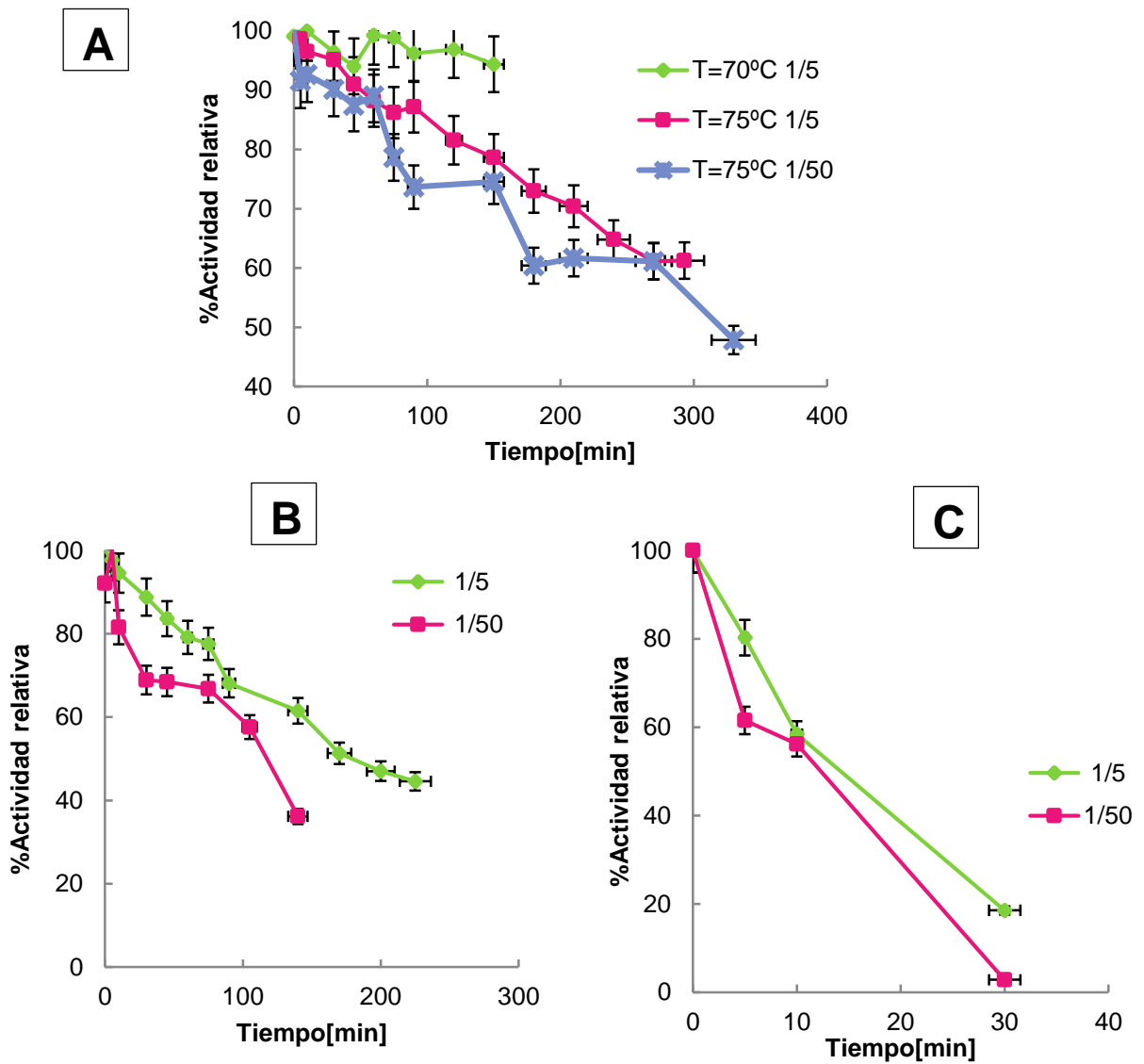
$$v(t) = -\frac{d[A]}{dt} = k * [A] \quad (1)$$

$$\ln \frac{[A]}{[A]_0} = -k * t \quad (2)$$

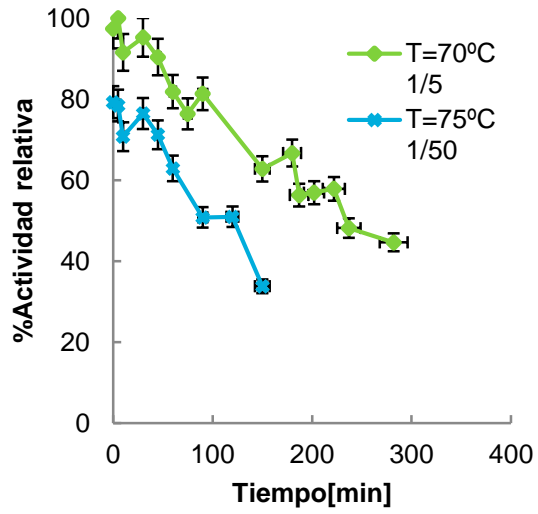
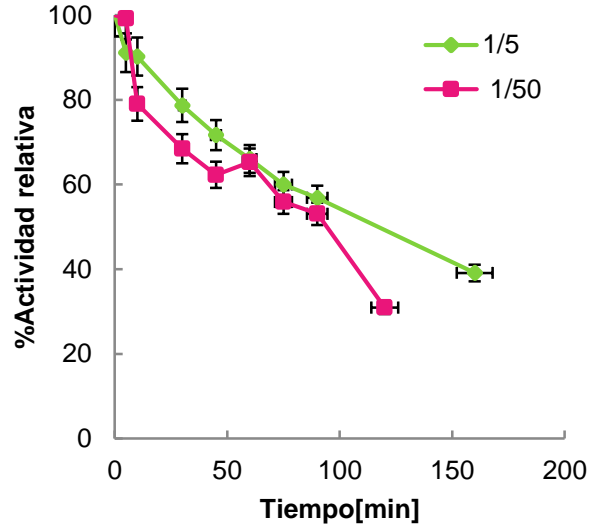
Y sabiendo que el tiempo de vida media es el tiempo necesario para consumir la mitad de un reactivo:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (3)$$

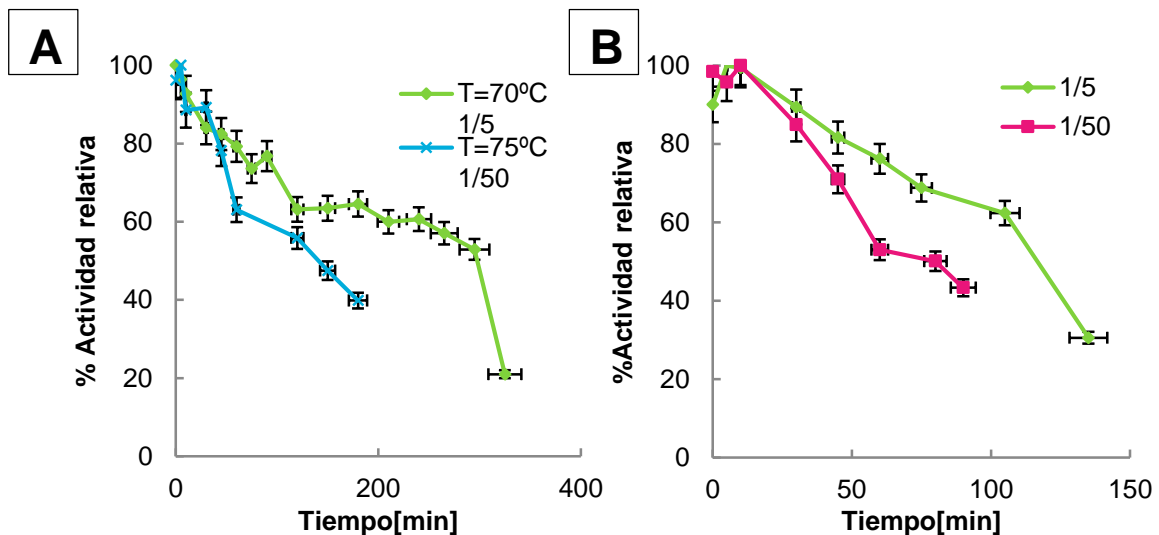
Para hacer posible el cálculo se realizó la linealización de las curvas de inactivación, de esta forma se consiguieron rectas con la forma de la ecuación (2), en la que k es la constantes de inactivación en ese instante y la pendiente de la recta. De esta forma se aplicó la ecuación (3) y se obtuvieron los tiempos de vida media.



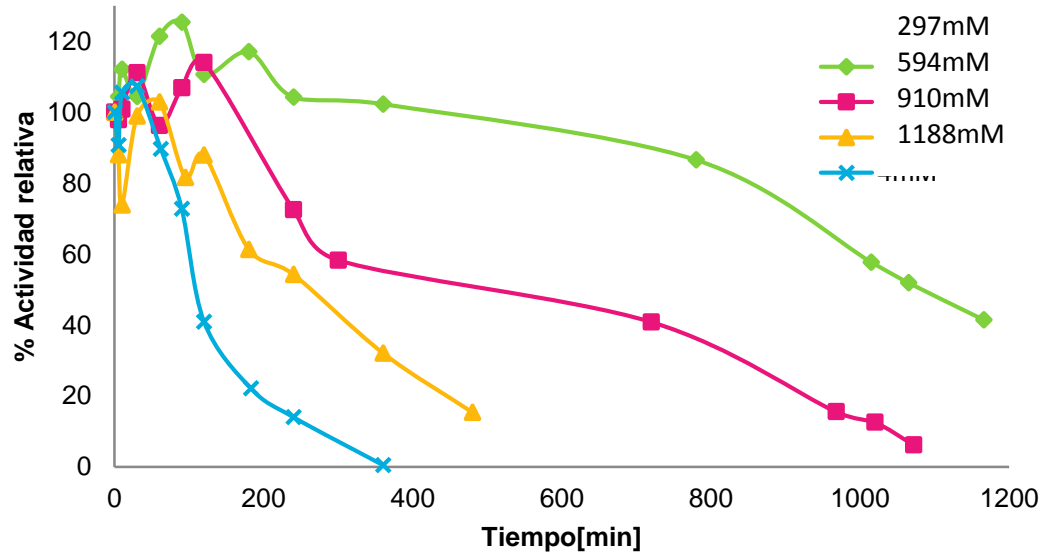
Anexo E. Estabilidad térmica de la PPR soluble. La inactivación térmica se realizó para dos diluciones a a pH 5 con buffer 10mM a A) 70°C-75°C ; B)80°C ; C)90°C, usando como sustrato guayaol para determinar la actividad residual, como se indica en el numeral 6.2.3.1 de métodos experimentales

A**B**

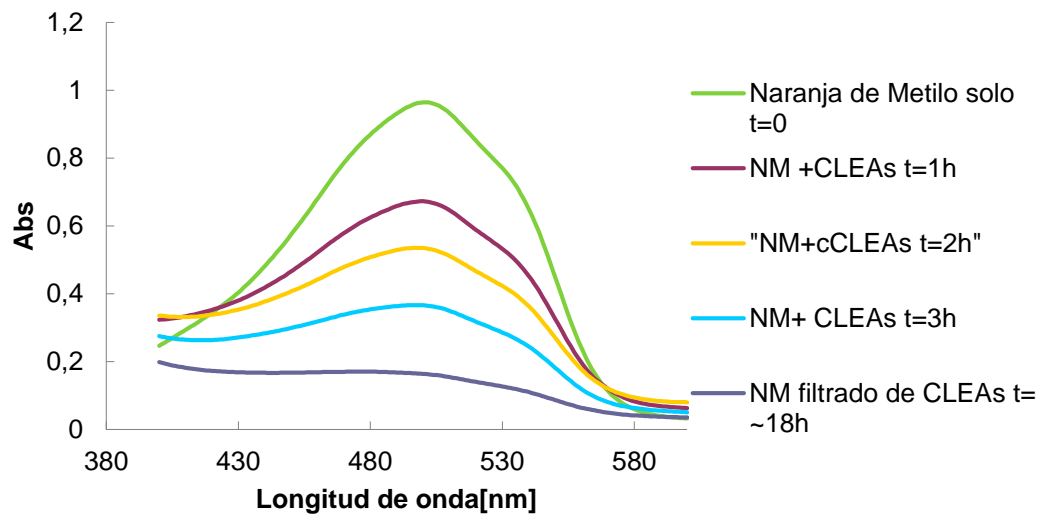
Anexo F. Estabilidad térmica de la PPR soluble. La inactivación térmica se realizó para dos diluciones a a pH 7 con buffer 10mM a A) 70°C-75°C ; B)80°C, usando como sustrato guayacol para determinar la actividad residual, como se indica en el numeral 6.3.2.1 de métodos experimentales



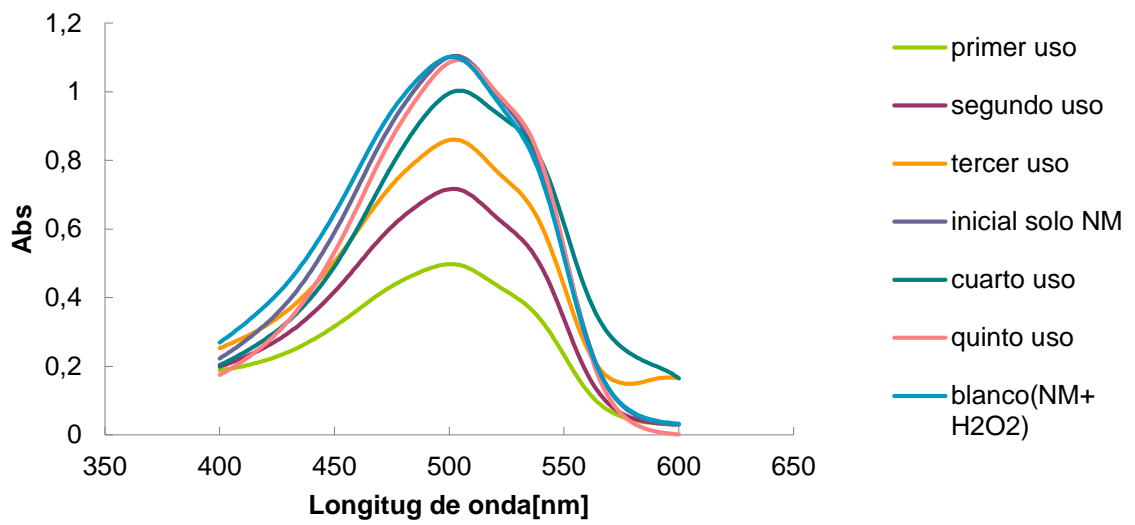
Anexo G. Estabilidad térmica de la PPR soluble. La inactivación térmica se realizó para dos diluciones a a pH 9 con buffer 10mM a A) 70°C-75°C ; B)80°C, usando como sustrato guayacol para determinar la actividad residual, como se indica en el numeral 6.2.3.1 de métodos experimentales



H₂O₂ se realizó a pH 7, 25°C para las soluciones de CLEAs con igual unidades de actividad catalítica (9U), se determinó la actividad residual usando como sustrato guayacol de acuerdo al numeral 6.2.5.2 de métodos experimentales.



Anexo I. Espectro de la cinética de remoción del colorante naranja de metilo con CLEAs de PPR. Se realizó con 3ml de una solución de naranja de metilo 0,045mM a pH 3, 25°C y una concentración de H₂O₂ de 224mM, de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.1.



Anexo J. Espectro de Reutilización de los CLEAs de PPR en ciclos de remoción del colorante naranja de metilo. Se realizó con 3ml de una solución de naranja de metilo 0,045mM a pH 3, 25°C y una concentración de H₂O₂ de 224mM, de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 6.2.6.2.