

**SEMI-PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA PEROXIDASA  
DE PASTO GUINEA (*Panicum maximum*)**

**DIANA ALEJANDRA CENTENO GARCÍA**

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

**2017**

**SEMI-PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA PEROXIDASA  
DE PASTO GUINEA (*Panicum maximum*)**

**DIANA ALEJANDRA CENTENO GARCÍA**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de  
Químico**

**Director**

**JOHN JAIRO CASTILLO LEÓN**

**Doctor en Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2017**

*A mis padres y hermanos,  
lo mejor que hay en mi vida*

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por apoyarme todo el tiempo en este largo proceso, agradezco inmensamente su paciencia y todos los grandes esfuerzos realizados. Esto es para ustedes, que son mi mayor inspiración.

A mis hermanos: Angie y Gerson, por llenar mi vida de tantos momentos inolvidables, de las risas y peleas, de todo se aprende. Gracias por estar siempre para mí.

A mi nona Rosa, mi segunda madre por ser un gran ejemplo de que el trabajo duro y la dedicación traen grandes recompensas.

Al profesor John Castillo, gracias por su paciencia, orientación y participación en este proyecto, por ser un gran maestro.

A la Vicerrectoría de investigación y Extensión por su apoyo económico a través del proyecto de convocatoria interna INMOVILIZACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL (*Roystonea regia*) MEDIANTE LA PREPARACIÓN DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS ENTRECruzADOS (CLEAs) y fondo de capital semilla 2014 número 726.

A mis grandes amigas Andrea, Paola, Delia, Katherin y Mary, por hacer de estos años en la universidad más llevaderos en los momentos difíciles, por su apoyo incondicional, tantas aventuras y alegrías.

A mis compañeros del GIBIM: Bryan, Zayda, Chucho, Erika, Jorge, Marlón, Jennifer Ruíz, Orlando, Mauricio, Nathaly, Nicolás, Xuxan, Carolina, César,

Jennifer Cruz y demás, que hicieron de los momentos en el laboratorio más alegres, agradezco sus asesorías y aportes al proyecto.

A esas personas que de una u otra forma participaron en alguna etapa este proceso de formación profesional y personal, gracias :)

## CONTENIDO

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   | 22          |
| <b>1. MARCO DE REFERENCIA</b> .....   | 25          |
| <b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....   | 28          |
| 2.1 ENZIMAS .....   | 28          |
| 2.1.1 Clasificación de las enzimas .....                                    | 29          |
| 2.2 ÓXIDO REDUCTASAS .....  | 29          |
| 2.3 PEROXIDASAS .....   | 30          |
| 2.3.1 Fuentes de peroxidasa .....   | 31          |
| 2.3.2 Clasificación de las peroxidasas .....                                | 31          |
| 2.3.3 Determinación de la actividad enzimática de la peroxidasa .....       | 32          |
| 2.3.4 Propiedades catalíticas .....   | 33          |
| 2.3.5 Propiedades moleculares.....  | 35          |
| 2.3.5.1 Efecto del pH sobre la actividad de las peroxidasas .....           | 35          |
| 2.3.5.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la peroxidasas ..... | 35          |
| 2.3.5.3 Estabilidad de las peroxidasas frente a la temperatura y pH .....   | 35          |
| 2.3.6 Purificación de peroxidasas .....                                     | 36          |
| 2.3.6.1 Extracción y eliminación de pigmentos .....                         | 37          |
| 2.3.6.2 Cromatografía por exclusión de tamaño .....                         | 38          |
| 2.3.6.3 Ultrafiltración .....   | 39          |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.3.7 Determinación del peso molecular por electroforesis .....                      | 39        |
| 2.3.7.1 Electroforésis en geles de agarosa .....                                     | 40        |
| 2.4 GENERALIDADES DEL PASTO GUINEA ( <i>Panicum maximum</i> ) .....                  | 41        |
| <b>3. METODOLOGÍA</b> .....  | <b>43</b> |
| 3.1 REACTIVOS .....  | 43        |
| 3.2 METODOLOGÍA .....  | 43        |
| 3.2.1 Extracción y semipurificación de la peroxidasa de pasto guinea .....           | 43        |
| 3.2.1.1 Recolección de las hojas de pasto guinea y extracción de la peroxidasa..     | 43        |
| 3.2.1.2 Eliminación de pigmentos por reparto bifásico.....                           | 44        |
| 3.2.1.3 Cromatografía por exclusión de tamaño .....                                  | 44        |
| 3.2.1.4 Ultrafiltración .....  | 45        |
| 3.2.1.5 Determinación de la actividad enzimática .....                               | 46        |
| 3.2.1.6 Determinación de proteínas por el método Bradford .....                      | 46        |
| 3.2.2 Caracterización bioquímica parcial .....                                       | 46        |
| 3.2.2.1 Estudio de la estabilidad de la POD a diferentes pH .....                    | 46        |
| 3.2.2.2 Estudio de la termoestabilidad .....   | 47        |
| 3.2.2.3 Estudio de la especificidad sustrática .....                                 | 47        |
| 3.2.2.4 Determinación del peso molecular por electroforesis .....                    | 48        |
| <b>4. RESULTADOS Y ANÁLISIS</b> .....  | <b>49</b> |
| 4.1 ESTUDIOS PRELIMINARES .....  | 49        |
| 4.2 EXTRACCIÓN Y SEMIPURIFICACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PASTO<br>GUINEA .....          | 51        |
| 4.3 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PPG A DIFERENTES<br>VALORES DE pH ..... | 55        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.4 ESTUDIO DE LA TERMOESTABILIDAD DE LA PPG.....   | 56        |
| 4.5 ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD SUSTRÁTICA.....   | 59        |
| 4.5.1 Especificidad sustrática de la PPG frente al guayacol .....                           | 59        |
| 4.5.2 Especificidad sustrática de la PPG frente a la o-dianisidina .....                    | 63        |
| 4.5.3 Especificidad sustrática de la PPG frente al ABTS .....                               | 67        |
| 4.5.4 Estudio de parámetros cinéticos de la PPG.....  | 71        |
| 4.6 DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR POR ELECTROFORÉISIS<br>EN GEL DE POLIACRILAMIDA..... | 77        |
| <b>5. CONCLUSIONES .....</b>  | <b>78</b> |
| <b>6. RECOMENDACIONES.....</b>  | <b>80</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>81</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>89</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>  | <b>97</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| Figura 1. Pasto guinea ( <i>Panicum maximum</i> ) (CONABIO.COM.MX, n.d.).   | 42          |
| Figura 2. Purificador de proteínas Bio-Rad Biologic y sus partes (Vargas, 2016).  | 45          |
| Figura 3. A) Proceso de molienda de pasto guinea. B) Extracción por 6 horas. C) Extracto centrifugado. D) Reparto bifásico.               | 53          |
| Figura 4. Cromatografía de exclusión por tamaño molecular de la peroxidasa de pasto guinea ( <i>Panicum maximum</i> ) sobre Sephadex G50. | 54          |
| Figura 5. Efecto del pH sobre la actividad catalítica de la peroxidasa de pasto guinea ( <i>Panicum maximum</i> ).                        | 56          |
| Figura 6. Efecto de la termoestabilidad de la peroxidasa de pasto guinea ( <i>Panicum maximum</i> ).                                      | 57          |
| Figura 7. Estabilidad de la peroxidasa de pasto guinea ( <i>Panicum maximum</i> ) en función de la temperatura a 66 °C.                   | 58          |
| Figura 8. Determinación de la constante de inactivación de la peroxidasa de pasto guinea ( <i>Panicum maximum</i> ) a 66°C.               | 58          |
| Figura 9. Estudio de la velocidad catalítica de la PPG en función de la concentración de guayacol.  | 72          |
| Figura 10. Estudio de la velocidad catalítica de la PPG en función de la concentración de <i>o</i> -dianisidina.                          | 73          |
| Figura 11. Estudio de la velocidad catalítica de la PPG en función de la concentración de ABTS.   | 73          |
| Figura 12. Estudio de la velocidad catalítica de la PPG en función de la concentración de guayacol.                                       | 74          |
| Figura 13. Estudio de la velocidad catalítica de la PPG en función de la concentración de <i>o</i> -dianisidina.                          | 75          |

Figura 14. Estudio de la velocidad catalítica de la PPG en función de la concentración de ABTS. 75

Figura 15. SDS-PAGE al 8%. Carril 1: bandas de las proteínas del marcador de masas moleculares de Thermo scientific (26614), carril 2: peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*). 77

## LISTA DE GRÁFICAS

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| Gráfica 1. Gráfico de Pareto estandarizado para la actividad volumétrica de la PPG frente al guayacol.               | 60          |
| Gráfica 2. Gráfica de efectos principales para la actividad volumétrica de la PPG frente al guayacol.                | 61          |
| Gráfica 3. Gráfica de superficie de respuesta estimada de la PPG frente al guayacol.                                 | 62          |
| Gráfica 4. Gráfico de Pareto estandarizado para la actividad volumétrica de la PPG frente al <i>o</i> -dianisidina.  | 65          |
| Gráfica 5. Gráfica de efectos principales para la actividad volumétrica de la PPG frente a la <i>o</i> -dianisidina. | 66          |
| Gráfica 6.. Gráfica de superficie de respuesta estimada de la PPG frente a l a <i>o</i> -dianisidina.                | 66          |
| Gráfica 7. Gráfico de Pareto estandarizado para la actividad volumétrica de la PPG frente al ABTS.                   | 69          |
| Gráfica 8. Gráfica de efectos principales para la actividad volumétrica de la PPG frente al ABTS.                    | 70          |
| Gráfica 9. Gráfica de superficie de respuesta estimada de la PPG frente al ABTS.                                     | 70          |

## LISTA DE ESQUEMAS

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| Esquema 1. Oxidación de guayacol en tetraguayacol en presencia de peroxidasa.  | 32          |
| Esquema 2. Mecanismo general de catálisis de las peroxidasas (Castillo, 2001). | 34          |

## LISTA DE ECUACIONES

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| Ecuación 1. Ecuación modelo obtenida por medio de STATGRAPHICS plus para el análisis de la especificidad de la PPG frente al guayacol.        | 62          |
| Ecuación 2. Ecuación modelo obtenida por medio de STATGRAPHICS plus para el análisis de la especificidad de la PPG frente a la o-dianisidina. | 67          |
| Ecuación 3. Ecuación modelo obtenida por medio de STATGRAPHICS plus para el análisis de la especificidad de la PPG frente al ABTS.            | 71          |

## LISTA DE TABLAS

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| Tabla 1. Peroxidasas vegetales aisladas en la actualidad.  | 27          |
| Tabla 2. Clasificación de las enzimas (Barbosa, 2006).   | 29          |
| Tabla 3. Clasificación de las peroxidasas.   | 32          |
| Tabla 4. pH y temperatura óptima para diferentes peroxidasas vegetales.  | 36          |
| Tabla 5. Condiciones del diseño experimental para estudiar la especificidad sustrática de la enzima peroxidasa de pasto guinea ( <i>Panicum maximum</i> ).                               | 48          |
| Tabla 6. Estudio del estado del pasto guinea ( <i>Panicum maximum</i> ).   | 50          |
| Tabla 7. Estudio del tiempo de extracción de la peroxidasa de pasto guinea ( <i>Panicum maximum</i> ).   | 50          |
| Tabla 8. Estudio del efecto de la concentración de la solución buffer de fosfatos con la peroxidasa de pasto guinea ( <i>Panicum maximum</i> ).  | 51          |
| Tabla 9. Tabla de rendimientos del proceso de purificación de la peroxidasa de pasto guinea ( <i>Panicum maximum</i> ).  | 55          |
| Tabla 10. Matriz de resultados para el estudio de la especificidad sustrática de la PPG frente al guayacol generada por el software STATGRAPHICS plus.                                   | 59          |
| Tabla 11. Valores óptimos del estudio de la especificidad sustrática de la PPG frente al guayacol determinados por medio del DCC empleando el software STATGRAPHICS plus.                | 62          |
| Tabla 12.. Matriz de resultados para el estudio de la especificidad sustrática de la PPG frente a la <i>o</i> -dianisidina generada por el software STATGRAPHICS plus.                   | 64          |
| Tabla 13. Valores óptimos del estudio de la especificidad sustrática de la PPG frente a la <i>o</i> -dianisidina determinados por medio del DCC empleando el software STATGRAPHICS plus. | 67          |
| Tabla 14. Matriz de resultados para el estudio de la especificidad sustrática de la PPG frente al ABTS generada por el software STATGRAPHICS plus.                                       | 68          |

|   |    |
|---|----|
| Tabla 15. Valores óptimos del estudio de la especificidad sustrática de la PPG frente al ABTS determinados por medio del DCC empleando el software STATGRAPHICS plus.                 | 71 |
| Tabla 16. Comparación de los valores óptimos obtenidos para los diferentes sustratos a partir del diseño de composición central (DCC) $2^4$ por medio del software STATGRAPHICS plus. | 71 |
| Tabla 17. Constantes cinéticas de la PPG frente a todos los sustratos.  | 76 |

## LISTA DE ANEXOS

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| ANEXO A. CURVA DE CALIBRACIÓN DE BRADFORD.....                      | 97          |
| ANEXO B. CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA PPG SOLUBLE ..... | 98          |

## ABREVIATURAS

|              |  |
|--------------|--|
| <b>°C</b>    | grados Celsius                                       |
| <b>μl</b>    | microlitros  |
| <b>ABTS</b>  | Ac. 2-2´azino-bis-(3-etilbenzotiosolina-6-sulfónico) |
| <b>BSA</b>   | Albumina de suero bovino                             |
| <b>DCC</b>   | Diseño de composición central                        |
| <b>HRP</b>   | Peroxidasa de rábano picante                         |
| <b>IUPAC</b> | Unión Internacional de Química pura y aplicada       |
| <b>KDa</b>   | Kilodalton   |
| <b>mL</b>    | mililitros   |
| <b>PEG</b>   | polietilengligol                                     |
| <b>POD</b>   | Peroxidasa   |
| <b>pm</b>    | peso molecular                                       |
| <b>PPG</b>   | Peroxidasa de pasto guinea                           |
| <b>p/v</b>   | peso/volumen   |
| <b>UIS</b>   | Universidad Industrial de Santander                  |

## RESUMEN

**TITULO:** SEMI-PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA PEROXIDASA DE PASTO GUINEA (*Panicum maximum*)<sup>\*</sup>

**AUTORA:** Centeno García Diana Alejandra<sup>\*\*</sup>

**PALABRAS CLAVES:** Peroxidasa de pasto guinea, extracción de enzimas, *Panicum maximum*, purificación de enzimas, caracterización parcial.

En este trabajo la enzima peroxidasa fue extraída de las hojas de pasto guinea (*Panicum maximum*) y parcialmente purificada mediante reparto bifásico con PEG 14% y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%, luego se empleó cromatografía de exclusión por tamaño sobre una columna Sephadex G50 y finalmente se concentró el extracto con amicones de 10000 Da. Después de este proceso se consiguió aumentar el valor de la actividad específica y el grado de pureza hasta 408,9 U/mg y 3,16, respectivamente. La peroxidasa de pasto guinea (PPG) fue caracterizada parcialmente para determinar la estabilidad frente al pH donde se determinó que un intervalo de pH entre 4 y 12 la actividad enzimática se conserva hasta en un 75%, además se hizo un análisis de termoestabilidad donde se determinó que a una temperatura de 66°C la actividad enzimática se mantiene en un 73,7%.

Para el estudio de la especificidad sustrática se empleó un diseño experimental de superficie de respuesta de composición central (DCC) 2<sup>4</sup> y el software STATGRAPHICS plus, con ello se encontraron las condiciones óptimas de pH, concentración de buffer, concentración de peróxido de hidrógeno y concentración de sustrato para el ABTS, guayacol y *o*-dianisidina. Se estableció que las mejores condiciones fueron sustrato (guayacol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (9,99 y 8,0 mM, respectivamente), tipo de buffer (tampón de 10 mM fosfato), pH (5,0) y tiempo (1,5 min).

Con estos resultados prometedores, en cuanto a sus propiedades bioquímicas (alta actividad específica, estabilidad frente al pH y temperatura) la peroxidasa de pasto guinea demuestra ser una alternativa ideal para aplicaciones industriales como biosensores, bioquímica clínica o biorremediación de aguas residuales de refinerías de petróleo, industrias textiles, de polímeros, resinas y papel, entre otras.

---

<sup>\*</sup> Trabajo de grado

<sup>\*\*</sup> Facultad de Ciencia, Escuela de Química, Director: John Jairo Castillo León Doctor en Química

## ABSTRACT

**TITLE:** SEMI-PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE OF GUINEA GRASS (*Panicum Maximum*)<sup>\*</sup>

**AUTHOR:** Centeno García Diana Alejandra<sup>\*\*</sup>

**KEY WORDS:** guinea grass peroxidase, enzyme extraction, *Panicum maximum*, enzyme purification, partial characterization.

In this work the peroxidase enzyme was extracted from guinea grass leaves (*Panicum maximum*) and partially purified by biphasic partition with PEG 14% and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10%, followed by size exclusion chromatography on a Sephadex column G50 and finally the extract was concentrated with amikons 10000 Da. After this process it was possible to increase the value of the specific activity and the degree of purity up to 408,9 U/mg and 3,16, respectively. The guinea grass peroxidase (GGP) was partially characterized to determine the stability to pH where it was determined that a pH range between 4 and 12 the enzymatic activity is conserved up to 75%, besides a thermostability analysis was performed where determined that at a temperature of 66 °C the enzymatic activity is maintained at 73,7%.

A central composite response surface (DCC)  $2^4$  design and the STATGRAPHICS plus software were used for the study of the specificity of the samples, the optimum conditions of pH, buffer concentration, hydrogen peroxide concentration and concentration of substrate for ABTS, guaiacol and *o*-dianisidine were found. It was established that the best conditions were substrate (guaiacol and  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (9,99 and 8,0 mM, respectively), buffer type (10 mM phosphate buffer), pH (5,0) and time (1,5 min ).

With these promising results, as regards its biochemical properties (high specific activity, stability to pH and temperature), guinea grass peroxidase proves to be an ideal alternative for industrial applications such as biosensors, clinical biochemistry or bioremediation of wastewater from oil refineries , Textiles, polymers, resins and paper industries, among others.

---

<sup>\*</sup> Degree of Project

<sup>\*\*</sup> Faculty of Science, School of Chemistry, Director: John Jairo Castillo León. Doctor on Chemistry

## INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos que poseen grandes ventajas sobre los catalizadores químicos convencionales, algunas de ellas son: altas velocidades de reacción, especificidad hacia los sustratos, mejora en la actividad catalítica bajo condiciones de pH y temperatura óptimas (Voet, D., 2006). Las enzimas se clasifican de acuerdo a las reacciones que catalizan (IUPAC Comisión de enzimas), entre estas se destacan las oxidorreductasas que se encargan de procesos de óxido-reducción, transfiriendo electrones para oxidar o reducir grupos funcionales.

Las peroxidasas forman parte del grupo de oxidorreductasas, estas utilizan el peróxido de hidrógeno, algunos peróxidos orgánicos, o peroxiácidos como aceptores de hidrógeno para catalizar la oxidación de una variedad de donantes de hidrógeno orgánico e inorgánico, tales como fenoles, aminas aromáticas, y otros, como lo reportan Jiang y col. 2003, estas características hacen a las peroxidasas deseables a nivel industrial y actualmente se usan en diferentes campos, algunos de ellos son:

- En biorremediación se usan las peroxidasas de rábano picante (HRP) y peroxidasa de lignina (LIP) para el tratamiento de contaminantes aromáticos acuosos y decoloración de tintes, según el estudio de Kauffmann y col. 1999.
- Wright y Nicell. en 1999 emplearon peroxidasa de soja para el tratamiento de residuos líquidos y suelos contaminados de fenoles, aminas aromáticas, compuestos colorados y metales.
- En el año 2009 Hamid y Rehman realizaron ensayos ligados a enzimas (ELISA), también conocidas como EIA, son pruebas diseñadas para detectar antígenos o anticuerpos, mediante la producción de una enzima activada por el cambio de color.

- Alpeeva y col. en el 2005, publicaron la construcción de un biosensor, al inmovilizar la peroxidasa sobre la superficie de un electrodo permitiendo determinar la concentración de peróxido de hidrógeno, otros hidroperóxidos o un amplio rango de compuesto fenólicos.

La peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana*) ha sido la fuente vegetal más estudiada y empleada para procesos industriales debido a su alta actividad enzimática, pero tiene limitaciones con respecto a su estabilidad a temperaturas superiores a 60°C y pH inferior a 3, informaron Pina y col. 2001. Por ello es conveniente encontrar otras fuentes vegetales de peroxidasa que puedan reemplazar la HRP y potencialmente puedan superar las limitaciones con las que esta cuenta.

Este trabajo de grado se enfocó en la semi-purificación y caracterización parcial de una nueva fuente vegetal de peroxidasa: la de pasto guinea (*Panicum maximum*), ya que en un estudio previo realizado por Sakharov y col. 1999, mostró tener una alta actividad catalítica respecto a las demás plantas estudiadas. En la primera etapa se ejecutaron ensayos preliminares del estado del pasto, tiempo de extracción y concentración de la solución buffer de fosfatos para determinar las mejores condiciones de extracción. En la segunda parte se estableció el protocolo de extracción de la PPG empleando una metodología similar y con algunas modificaciones a la descrita por Sakharov y col. en 2001.

En la última fase, para la caracterización bioquímica parcial se estudiaron algunas propiedades de la PPG como pH, temperatura y la especificidad sustrática (empleando un diseño experimental de composición central  $2^4$  con el software STATGRAPHICS plus) frente al ABTS, *o*-dianisidina y guayacol. Luego con las condiciones óptimas para cada sustrato, se determinaron las constantes cinéticas como la afinidad de la enzima por el sustrato ( $K_m$ ), velocidad máxima de reacción cuando todos los centros activos están ocupados por el sustrato ( $V_{max}$ ) y el

número de recambio ( $K_{cat}$ ), que es el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por molécula de enzima y unidad de tiempo, en condiciones saturantes del sustrato. Finalmente mediante la técnica de electroforésis se determinó el peso molecular de la PPG semi-purificada.

## 1. MARCO DE REFERENCIA

Gracias a la información estructural detallada de técnicas como la difracción de rayos x y RMN, se han podido recolectar abundantes datos sobre la estructura de las peroxidasas. Sin embargo, el análisis y el alineamiento de múltiples secuencias de peroxidasas, combinada con la estructura cristalina de la citocromo c peroxidasa de la levadura, ha suministrado la predicción de modelos útiles para las peroxidasas de bacterias, hongos y plantas, Welinder y Gajhede. 1993. Se comprobó que todas las peroxidasas contienen ocho cisteínas, las cuales están localizadas en posiciones muy similares en la estructura primaria. De igual forma, dos histidinas invariables (His42 e His170) han sido inferidas en la estructura del sitio activo, así His42 está involucrada en la catálisis ácido/base e His170 está unida al quinto ligando del grupo hemo, como lo reporta Esnault y col. 2015.

Las peroxidasas han sido identificadas sobre la superficie de muchas especies de plantas, Mueller y Beckman. 1994. Por ejemplo, a partir de las hojas de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) Castillo y Ariza en el año 2000 aislaron y purificaron una peroxidasa aniónica con una alta termoestabilidad y un peso molecular de 57 KDa. Existen peroxidasas termoestables que han sido reveladas y purificadas de plantas, como la de hojas de *Jatropha curcas* por Cai y col. 2012 y hojas de *citrus medica* (Mall y col. 2013).

Otro tipo de peroxidasa vegetal se encuentra en las raíces de repollo morado (*Brassica oleracea*) la cual fue purificada por cromatografía de afinidad y se determinó un peso molecular de 63,9 kDa (Somtürk y col. 2014).

También fue reportada la peroxidasa proveniente de la cáscara de naranja (*Citrus sinenses*), que ha sido purificada a través de una nueva técnica de partición de

tres fases, esta utiliza una bioseparación para la extracción, concentración y purificación de enzimas. El peso molecular después de la purificación parcial fue de 26 kDa según el reporte de Vetal y Rathod, en el año 2015.

Algunas peroxidasas han sido extraídas y purificadas de los frutos de las plantas, este es el caso de la peroxidasa del agua dulce de *Cocos nucifera*, de cuyo estudio se determinó que tenía el potencial de biotransformar un compuesto genotóxico en un compuesto no genotóxico (Balasubramanian y Boopathy, 2013).

Para las aplicaciones industriales de biorremediación de aguas contaminadas, se registró que al purificar la peroxidasa proveniente de hojas de caucho (*Hevea brasiliensis*) esta podía decolorar diversas clases de colorantes como azul de anilina, púrpura de bromocresol, verde brillante, violeta de cristal, fucsia, verde de malaquita, verde de metilo, violeta de metilo y azul de agua (Chanwun y col. 2013).

Diferentes técnicas espectroscópicas se han utilizado para el estudio de la estabilidad conformacional y estructural de la peroxidasa de rábano picante, entre las descritas por Chattopadhyaya y Mazundar. 2000. se tienen principalmente: dicroísmo circular, estudios de fluorescencia y calorimetría de barrido diferencial.

Debido a su estabilidad y disponibilidad, la HRP purificada se utiliza a menudo como una enzima modelo dentro de la familia de las peroxidasas. El pH óptimo es 7,0 para las preparaciones comerciales y la temperatura óptima es 30°C, dependiendo del tipo de isoenzima y los sustratos, según el estudio hecho por Lavery y col. 2010. Otras peroxidasas provenientes de fuentes vegetales han sido reveladas y aisladas recientemente se muestran en la tabla 2.

**Tabla 1. Peroxidasas vegetales aisladas en la actualidad.**

| <b>Fuente vegetal de POD</b>                     | <b>Referencia</b>           |
|--|-----------------------------|
| Lakoocha ( <i>Artocarpus lakoocha</i> )          | (Sonkar y col. 2015)        |
| Escoba española ( <i>Cytisus multiflorus</i> )   | (Perez y col. 2015)         |
| Lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> )                | (Hu y col. 2012)            |
| Palma datilera ( <i>Phoenix dactylifera L.</i> ) | (Al-senaidy e Ismael, 2011) |
| Papaya ( <i>Carica papaya</i> )                  | (Pandey y col. 2012)        |
| Rábano silvestre ( <i>Raphanus sativus L</i> )   | (Woitovich y Picó, 2013)    |

En cuanto a peroxidasas animales, fueron identificadas las hemo peroxidasas VPO1 en ratones y VPO2 en humanos (Cheng y col. 2008), ambas exhiben su expresión más alta en el tejido del corazón y la pared vascular.

Sakharov y col. 1999 en su trabajo Peroxidasa de plantas tropicales, determinó la actividad enzimática a diferentes frutos, raíces y hojas de plantas tropicales. En el caso de la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*) el valor en la actividad enzimática fue de 980 U/g hoja, siendo esta peroxidasa una de las más promisorias para posteriores estudios de actividad catalítica bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y especificidad sustrática, debido a su alta actividad respecto a las demás examinadas. Por esta razón fue elegida en principio para este proyecto de investigación sobre las otras plantas posibles, asimismo posterior al proceso de purificación parcial y caracterización de la peroxidasa los resultados serán comparados con los de la HRP para considerar si es una opción adecuada respecto a aplicaciones industriales.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 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. 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 (Voet, 2006):

- 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.
- Exhiben 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.
- Muestran gran capacidad de regulación. Las actividades catalíticas de muchas enzimas varían en respuesta a las concentraciones de sustancias distintas de sus sustratos y productos.

Por ser proteínas las enzimas están conformadas por una o varias cadenas polipeptídicas (estructuras en 3d), aunque también contienen constituyentes no péptidicos, como los carbohidratos. Para realizar su actividad catalítica pueden requerir un constituyente no-péptidico llamado cofactor, que puede ser un ión o

una molécula orgánica. Si el cofactor está directamente enlazado a la enzima se denomina grupo prostético y si está añadido al sistema se denomina NADH.

La actividad enzimática se ve afectada por los siguientes factores: concentración del sustrato, concentración de la enzima, temperatura, pH y presencia de cofactores.

**2.1.1 Clasificación de las enzimas** Las enzimas se clasifican de acuerdo a la reacción química que catalizan (IUPAC Comisión de enzimas) en seis clases:

**Tabla 2. Clasificación de las enzimas (Barbosa, 2006).**

| CLASE                   | TIPO DE REACCIÓN          | EJEMPLO   |
|-------------------------|---------------------------|---|
| <b>Óxido-reductasas</b> | Oxidación/ reducción      | Deshidrogenasas, oxidasas, peroxidasas, oxigenasas. |
| <b>Transferasas</b>     | Transferencia de grupo    | Transaldolasas, transcetolasas, etc.                |
| <b>Hidrolasas</b>       | Reacciones de hidrólisis  | Esterasas, proteasas, carbohidrasas, etc.           |
| <b>Liasas</b>           | Reacciones de eliminación | Substrato grupo Liasa                               |
| <b>Isomerasas</b>       | Isomerización             | Epimerasas, racemasas, etc.                         |
| <b>Ligasas</b>          | Síntesis                  | Ligasa X-Y  |

## 2.2 ÓXIDO REDUCTASAS

La mayoría de óxido-reductasas son hemoproteínas, un diverso grupo de enzimas que desarrollan una amplia variedad de funciones en los organismos vivos, entre ellas están el transporte y el almacenamiento de oxígeno (hemoglobina y

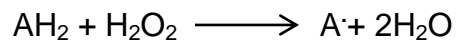
mioglobina), el transporte de electrones y la producción de energía (citocromo), la transferencia de oxígeno (monoxigenasas), la oxidación de sustratos (peroxidasas), la dismutación del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y las transformaciones sintéticas (varias sintetásas), según estudios de Hiner y col. 1996.

Las oxidoreductasas como su nombre lo indica son enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción; ellas transfieren electrones para oxidar o reducir grupos tales como: alcoholes, alquenos, aldehídos o cetonas, aminas y cofactores, entre otros. Las oxidorreductasas se dividen en: deshidrogenasas, oxidasas y peroxidasas (Barbosa, 2006).

### **2.3 PEROXIDASAS**

Las peroxidasas son glicoproteínas globulares con un peso molecular aproximado de 42000 Da, en las cuáles la porción proteica corresponde a 34000 Da, el resto del peso molecular del grupo está constituido por el grupo prostético (grupo hemo), dos iones de calcio y algunos glicanos superficiales enlazados. Por lo general son moléculas más pequeñas que las oxidasas (Barbosa, 2006).

La peroxidasa cataliza la siguiente reacción:



La enzima utiliza peróxido de hidrógeno, algunos peróxidos orgánicos, o peroxiácidos de la fórmula general ROOH como aceptores de hidrógeno para catalizar la oxidación de una variedad de donantes de hidrógeno orgánico e inorgánico, tales como fenoles, aminas aromáticas, y otros (Jiang y Yuan. 2003).

Las peroxidasas vegetales desempeñan importantes funciones fisiológicas:

1. La degradación y la síntesis de lignina en el daño y la reparación de la pared celular. También es importante en el alargamiento de las plantas (Fry, 1979).
2. Proporcionar defensa contra los patógenos y el estrés (Vance y col. 1980).
3. Catalizan el catabolismo de las fito-hormonas de crecimiento, por ejemplo, ácido indol acético (IAA) y de auxinas para regular el crecimiento de la planta (Ricard y Job, 1974).
4. Control de la respiración en plantas, en la producción y eliminación de las especies reactivas de oxígeno (Paul y Mukherji, 1972).
5. Promueven la formación de especies altamente reactivas, es decir, los radicales libres y los estados electrónicamente excitados. Estas especies pueden participar en el daño celular o ser de beneficio frente a patógenos (Frylink y col. 1987).
6. Catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos, usando  $H_2O_2$  u otros peróxidos (Regalado y col. 2004).

**2.3.1 Fuentes de peroxidasa** Las peroxidasas se encuentran en los reinos vegetal y animal. Debido a la presencia del grupo hemo las peroxidasas se pueden clasificar en dos grupos: las peroxidasas presentes en bacterias, hongos y plantas, y las que están presentes en los tejidos animales (Barbosa, 2006).

Sobre la superficie de muchas especies de plantas han sido identificadas peroxidasas. Por ejemplo, a partir de las hojas de la palma datilera (*Phoenix dactylifera L*) fue purificada por Al-senaidy e Ismael en 2011 una peroxidasa con peso molecular de 55 KDa.

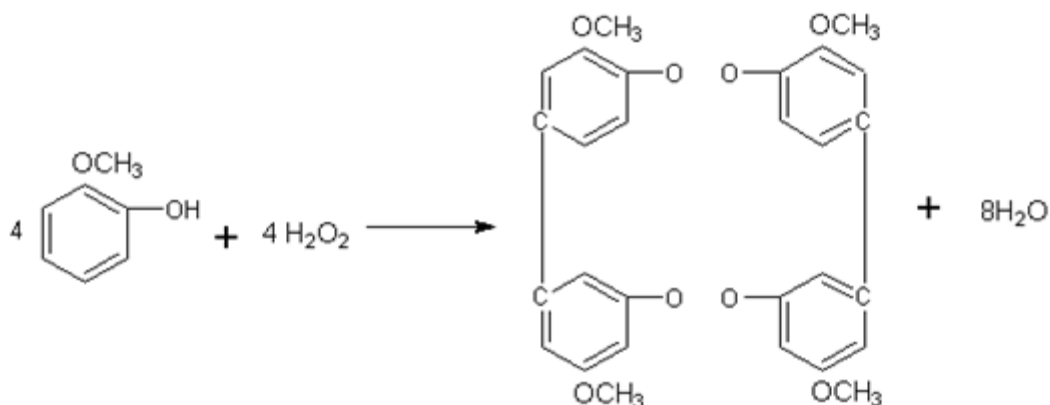
**2.3.2 Clasificación de las peroxidasas** Las peroxidasas se clasifican según de acuerdo a sus propiedades estructurales, y se dividen en dos grandes superfamilias (Welinder, 1992).

**Tabla 3. Clasificación de las peroxidasas.**

| FAMILIA                      | CLASE | ORIGEN             | EJEMPLO                 |
|------------------------------|-------|--------------------|-------------------------|
| Peroxidasas de las plantas   | I     | Procariótico       | Citocromo c peroxidasa  |
|                              | II    | Fúngico            | Lignina peroxidasa      |
|                              | III   | Plantas            | HRP, maní, pasto guinea |
| Peroxidasas de origen animal | I     | Haluro peroxidasas | Mieloperóxidadas        |
|                              | II    | Prostaglandinas    | Prostaglandina sintasa  |

**2.3.3 Determinación de la actividad enzimática de la peroxidasa** La peroxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de ciertos compuestos dadores de hidrógeno, como fenoles (guayacol, pirogalol) y aminas aromáticas (*o*-fenilendiamina) por medio de peróxidos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El sustrato oxidable más usado es el guayacol, que es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol en presencia de peroxidasa, tal y como es mostrado en el siguiente esquema:

**Esquema 1. Oxidación de guayacol en tetraguayacol en presencia de peroxidasa.**

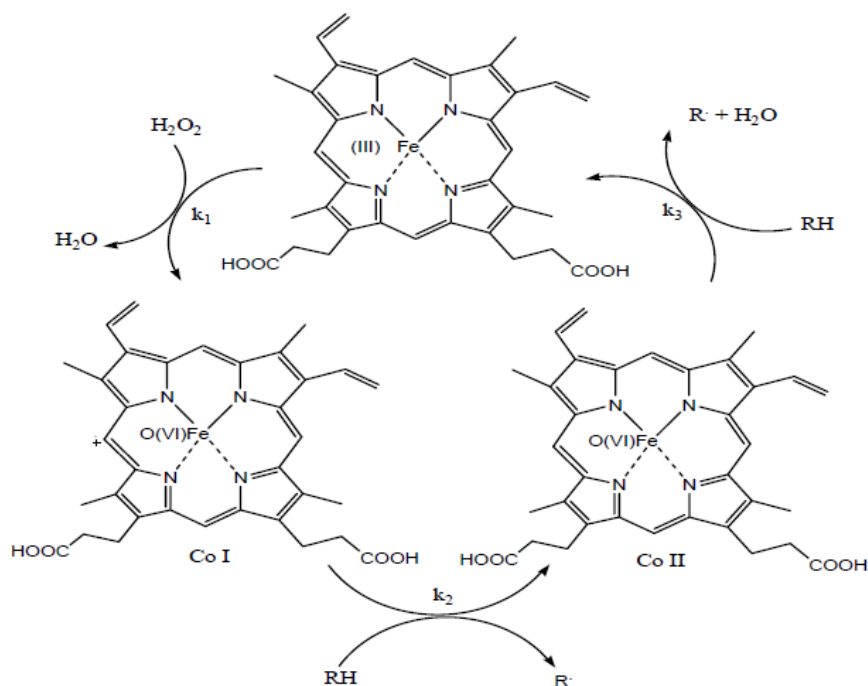


La velocidad de formación del color rojo ladrillo puede ser utilizada como medida de la actividad enzimática por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias (470 nm UV) en relación con el tiempo. La peroxidasa presenta como grupo prostético un grupo hemo, cuyo átomo central de hierro forma complejos con diferentes compuestos, como los cianuros y la hidroxilamina, inhibiéndose su actividad enzimática. La actividad enzimática depende del vegetal, el sustrato oxidable que se emplea como reactivo, pH y temperatura a que se trabaja.

Como la mayoría de las enzimas, la peroxidasa puede ser inactivada por el calor, siendo una de las que precisan mayor temperatura y más tiempo para su inactivación. Posee, además, la propiedad peculiar de la regeneración enzimática. Este fenómeno consiste en que al inactivarla por medio del calor recupera parcialmente su actividad después de un cierto tiempo. Esto ha sido explicado, aduciendo que la fracción proteica de la enzima sufre una desnaturalización sólo parcial, con pérdida de su estructura terciaria, si el calor se aplica por un tiempo muy corto, produciéndose luego una reversión de la proteína a su estado normal por recombinación de sus grupos hidrógenos o sulfhidrúlicos. Este efecto del calor sobre la actividad peroxidásica es muy importante en la industria de alimentos y la regeneración enzimática de la peroxidasa puede causar serios problemas en los caracteres organolépticos. Se ha demostrado que esta actividad enzimática puede detenerse totalmente, si el calentamiento es suficientemente largo, de manera que sobre 30 segundos la regeneración es muy débil generalmente (Universidad de Manizales).

**2.3.4 Propiedades catalíticas** En general, el ciclo catalítico de las peroxidasas se asemeja al descrito para la peroxidasa de rábano picante (HRP). La gran mayoría de las peroxidasas catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno a agua y la oxidación a un amplio rango de sustratos.

**Esquema 2. Mecanismo general de catálisis de las peroxidasas (Castillo, 2001).**



El primer paso es el rompimiento del peróxido de hidrógeno catalizado por la peroxidasa. Uno de los oxígenos del peróxido sale como agua, mientras que el otro es retenido por el grupo ferrilo. El compuesto I es conocido como cation porfirínico  $\pi$ . El compuesto I acepta luego un electrón de la molécula del sustrato  $RH$ , produciendo el compuesto II, que contiene el grupo ferrilo, pero ya no como cation porfirínico. El compuesto II acepta un electrón de una segunda molécula de sustrato, regresando a la enzima nuevamente a su estado nativo. La pérdida de un electrón del sustrato, acompañado de la pérdida de un protón, genera la formación de un radical. La alta reactividad y baja selectividad asociada con los radicales orgánicos hacen que la química de los radicales sea realmente complicada.

Los sustratos que reducen los compuestos I y II, reciben el nombre de “sustratos reductores”, y su interacción con el sitio activo de la peroxidasa tiene lugar en la posición delta del borde del grupo Hemo (Barbosa, 2006).

### **2.3.5 Propiedades moleculares**

**2.3.5.1 Efecto del pH sobre la actividad de las peroxidasas** Por ser proteínas las peroxidasas se ven afectadas también por los cambios en el pH. Un cambio en el pH afecta la estabilidad, la conformación de la peroxidasa y la forma del sitio activo destruyendo las interacciones no covalentes (rompiendo los enlaces iónicos y los enlaces de hidrógeno). Un cambio en el pH produce una adición o una eliminación de hidrógeno de los aminoácidos de la peroxidasa. En el pH óptimo, la peroxidasa tiene una actividad catalítica máxima. Si el pH disminuye o aumenta respecto a este valor óptimo, la actividad enzimática disminuye. El pH óptimo para cualquier peroxidasa depende del substrato donador de hidrógeno y el buffer utilizado (Halpin y col. 1989).

**2.3.5.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la peroxidasas** Las reacciones enzimáticas aumentan su velocidad con la temperatura, dentro de una gama limitada de valores. La temperatura a la cual las peroxidasas presentan su máxima actividad depende de una serie de factores tales como la pureza de la enzima y del substrato, la presencia de activadores o inhibidores. Varía fundamentalmente con el método para seguir el curso de la reacción, ya que la llamada temperatura óptima es función del período de tiempo que se emplee en la medida de la actividad (Barbosa, 2006).

**2.3.5.3 Estabilidad de las peroxidasas frente a la temperatura y pH** La forma como el pH y la temperatura afectan la estabilidad de las peroxidasas específicamente a sus estructuras secundaria y terciaria, está determinada principalmente por tres factores: Iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), puentes disulfuro y la red de enlaces de hidrógeno (Chattopadhyya y Mazundar, 2000; Pina y col. 2001).

**Tabla 4. pH y temperatura óptima para diferentes peroxidadas vegetales.**

| <b>Fuente de peroxidasa</b>   | <b>pH óptimo</b> | <b>Temperatura óptima (°C)</b> | <b>Referencia</b>            |
|---|------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Rábano picante<br>( <i>Armoracia rusticana</i> )                                    | 7,0              | 30                             | (Lavery y col. 2010)         |
| Palma real<br>( <i>Roystonea regia</i> )  | 7,0 - 8,0        | 30 - 50                        | (Castillo, 2001)             |
| Hojas de palmera datilera<br>( <i>Phoenix dactylifera</i> L.)                       | 5,0 - 6,0        | 55                             | (Al-senaidy, e Ismael, 2011) |
| Repollo morado<br>( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i> ) | 7,0              | 30 - 70                        | (Somtürk y col. 2014)        |
| Rábano negro turco<br>( <i>Raphanus sativus</i> L.)                                 | 6,5              | 30                             | (Kalin y col. 2014)          |
| Piñón<br>( <i>Jatropha curcas</i> )   | 5,0              | 60                             | (Cai y col. 2012)            |
| Nabo<br>( <i>Brassica napus</i> )   | 6,0              | 45                             | (Rodríguez, 2011)            |

**2.3.6 Purificación de peroxidadas** El estudio completo de muchos sistemas biológicos está relacionado con la purificación de uno o más componentes del sistema. Desafortunadamente, hay un gran número de contradicciones sobre la táctica de desarrollar un esquema de purificación que de buenos resultados. Las cinco etapas básicas de la purificación son las siguientes (Cooper, 1984):

1. Desarrollo de los métodos de análisis adecuados.
2. Selección de la mejor fuente a partir de la cual se puede aislar la enzima.
3. Solubilización de la molécula deseada.
4. Estabilización de la molécula repetidamente en cada etapa de su purificación.
5. Desarrollo de una serie de procesos y concentración.

Para la purificación de proteínas específicamente de la peroxidasa se deben tener cuatro criterios: especificidad absoluta, sensibilidad alta, elevada precisión y utilidad.

Habitualmente el proceso de purificación de la peroxidasa está compuesto por las siguientes etapas: extracción y separación de pigmentos, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de permeación en gel y cromatografía de intercambio iónico (Castillo, 2001). En este caso adicionalmente se va a realizar una ultrafiltración.

**2.3.6.1 Extracción y eliminación de pigmentos** En esta etapa las hojas son trituradas y generalmente se utilizan soluciones buffer PBS con baja concentración de sales, de tal modo que el pH escogido resulte en la máxima actividad de la peroxidasa.

El proceso de eliminación de pigmentos se lleva a cabo en un medio acuoso con la formación de dos fases insolubles. Los sistemas acuosos son formados cuando dos polímeros, tales como el polietilenglicol (PEG) y el dextrano, o un polímero y una sal, son mezclados por encima de sus concentraciones críticas en un medio acuoso (Albertsson, 1986). Cuando biomateriales, tales como las proteínas, son adicionadas a estas mezclas, ellas se distribuyen desigualmente entre las dos fases formadas (Kenkare, 1996).

En la eliminación de pigmentos específicamente en las peroxidasas se utiliza un sistema bifásico de polietilenglicol y sulfato de amonio (Sakharov y Castillo, 2000). Durante esta etapa hay una separación de capas en el extracto; la capa superior o capa oscura donde están presentes toda clase de pigmentos es separada de la capa clara o capa inferior en donde está presente la peroxidasa con la sal libre de pigmentos.

**2.3.6.2 Cromatografía por exclusión de tamaño** La cromatografía de exclusión es un tipo de cromatografía líquida en la cual la fase estacionaria es sólida y la fase móvil es líquida. Su principal aplicación es la separación de las moléculas en función de su tamaño con la finalidad de estudiar el peso molecular y distribución de los polímeros (Seymour y Carraher, 1995).

Las principales características de esta técnica cromatográfica son:

- La fase estacionaria es inerte, por lo que la columna no se desactiva.
- La muestra no interacciona químicamente con la fase estacionaria, ni con la fase móvil.
- Los solutos son generalmente sustancias de peso molecular elevado (mayores de 2000). Dependiendo de su medida y estructura, éstos se retienen o se eluyen a través de la columna. No se pueden emplear gradientes de elución en la fase móvil.

El relleno de columna se comporta como un tamiz o filtro dónde se distinguen tres tipos de moléculas: moléculas permeables (moléculas pequeñas que entran el interior del relleno poroso y quedan detenidas), moléculas fraccionables (moléculas intermedias que entran de manera parcial en el poro) y moléculas excluidas (moléculas grandes que no entran en los poros).

En lo que respecta a la fase estacionaria, se utiliza un material poroso con las siguientes características: uniformidad en la granulometría de las esferas y en la medida de los poros; estabilidad química (sobre todo al pH y a la temperatura); máxima inercia frente a los compuestos a separar; preparación rápida y sencilla; y resistencia mecánica a las alta presiones. La característica principal del eluyente empleado como fase móvil es que debe arrastrar los diferentes componentes, sin interaccionar ni con la muestra ni con la fase estacionaria. Por tanto, la muestra debe ser soluble en la fase móvil para evitar interferencias en los resultados (Gutiérrez y Bouzán, 2009).

**2.3.6.3 Ultrafiltración** La ultrafiltración es el tipo de Filtración que utiliza membranas para separar diferentes tipos de sólidos y líquidos. El tamaño de poro no es tan fino como en la nanofiltración y tampoco requiere tanta energía para efectuar la separación, y es más pequeño que el de las membranas de microfiltración. La membranas de Ultrafiltración están dispuestas en forma de capilares y están construidas con materiales plásticos que son porosos semipermeables.

La Ultrafiltración es capaz de concentrar sólidos suspendidos, bacterias, algunas proteínas, algunos colorantes y compuestos con un peso molecular mayor a 150,000 Dalton (C.V, 2013).

**2.3.7 Determinación del peso molecular por electroforesis** La electroforésis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo). El movimiento de las moléculas está gobernado también por dos fuerzas adicionales; inicialmente la fricción con el solvente dificultará este movimiento originando una fuerza que se opone, por otro lado las moléculas tienen que moverse en forma aleatoria o movimiento browniano debido a que poseen energía cinética propia denominado difusión. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión.

La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas son colocadas en un cierto lugar de solución, los iones comenzaran a moverse formando un frente cuya anchura aumentara con el tiempo. Para reducir la anchura de este frente podemos reducir el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga más resistencia a dicho movimiento. Una forma común de hacer esto es formar un gel. El gel consiste de un polímero soluble de muy alto peso molecular que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz que dificulta el movimiento de los solutos, consecuentemente, la migración electroforética de las moléculas será más lenta, pero el ensanchamiento del frente se verá reducido también.

Los métodos electroforéticos zonales son útiles para lograr la separación de mezclas complejas. Se aplican pequeñas cantidades de la disolución de proteínas a un soporte sólido, que se impregna con una solución tampón. Los soportes son en general polímeros y forman un gel poroso que restringe el movimiento de las moléculas a través del medio durante la electroforésis y disminuyen los flujos de convección del solvente.

**2.3.7.1 Electroforésis en geles de agarosa** La agarosa es un polisacárido (originalmente obtenido de algas, como el agar-agar, pero de composición homogénea), cuyas disoluciones (típicamente de 0.5 a 2 %) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50 grados C y formar un gel, semisólido al enfriarse. Este gel está constituido por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas embebida en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas, se usa usualmente para separar moléculas grandes de alrededor 20.000 nucleótidos (Javeriana, 2003).

## **2.4 GENERALIDADES DEL PASTO GUINEA (*Panicum maximum*)**

Son plantas de la familia gramínea que forman macollas, pueden alcanzar hasta 3 m de altura y de 1 a 1.5 m de diámetro de la macolla. Los tallos son erectos y ascendentes con una vena central pronunciada. La inflorescencia se presenta en forma de panoja abierta de 12 a 40 cm de longitud. Las raíces son fibrosas, largas y nudosas y ocasionalmente tienen rizomas, esto confiere cierta tolerancia a la sequía. Requiere alta fertilidad de suelo, competencia menor con malezas y alta digestibilidad. Son usadas para pastoreo, corte y acarreo, barreras vivas (Tesfay y col. 2014).

Figura 1. Pasto guinea (*Panicum maximum*) (CONABIO.COM.MX, n.d.).



### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 REACTIVOS

Los reactivos y materiales utilizados en este estudio fueron adquiridos de la siguiente manera: Merck: peróxido de hidrógeno (30 % p/v), sulfato de amonio y polietilenglicol (peso molecular 15000); J.T. Baker: guayacol. Sigma-Aldich: ABTS ( $\geq 98\%$ ), *o*-dianisidina. Los reactivos utilizados para las soluciones tampón fueron todas de grado analítico y proporcionados por J.T Baker.

La peroxidasa de pasto guinea (PPG) fue extraída y parcialmente purificada en el laboratorio perteneciente al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología de la Universidad Industrial de Santander (UIS).

#### 3.2 METODOLOGÍA

**3.2.1 Extracción y semipurificación de la peroxidasa de pasto guinea** Para purificar la peroxidasa extraída de las hojas de pasto guinea (*Panicum maximum*) que se encuentra en pastizales dentro de la ciudad de Bucaramanga, se empleó una metodología similar a la descrita por Sakharov y col. 2001 con algunas modificaciones como el tiempo de extracción, pH de la solución buffer de fosfatos, tiempo y frecuencia de centrifugado.

**3.2.1.1 Recolección de las hojas de pasto guinea y extracción de la peroxidasa** Las hojas recolectadas fueron lavadas con agua destilada, luego se les retiró el nervio central y se cortaron en pequeños trozos que fueron molidos con un molino de granos. Para homogenizar el material vegetal se pesaron 50 g

de hojas que se separaron en 2 partes iguales, a la primera parte se le agregó 100 mL de buffer de fosfatos 30 mM a pH 8 y se agitó por 6 horas a 200 rpm. Para estudiar el mejor tiempo de extracción, se varió el tiempo de agitación en 3 experimentos de 6 h, 12 h y 24 h; a partir del cual se eligió 6 horas, como el mejor tiempo de extracción con el que se presentó una mayor actividad enzimática. Posteriormente se filtró el extracto con un filtro de tela de algodón y al sobrenadante se le añadió la segunda parte de 25 g con el objetivo de tener un extracto con mayor concentración de la POD. Luego el extracto concentrado se dejó agitar nuevamente por 6 horas y se filtró usando las condiciones descritas para la primera extracción. El extracto fue centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos y 4° C, para eliminar sólidos.

Al concluir la extracción, se midieron tanto la concentración de proteínas por el método de Bradford como la actividad enzimática de la POD (ver sección 3.2.1.5).

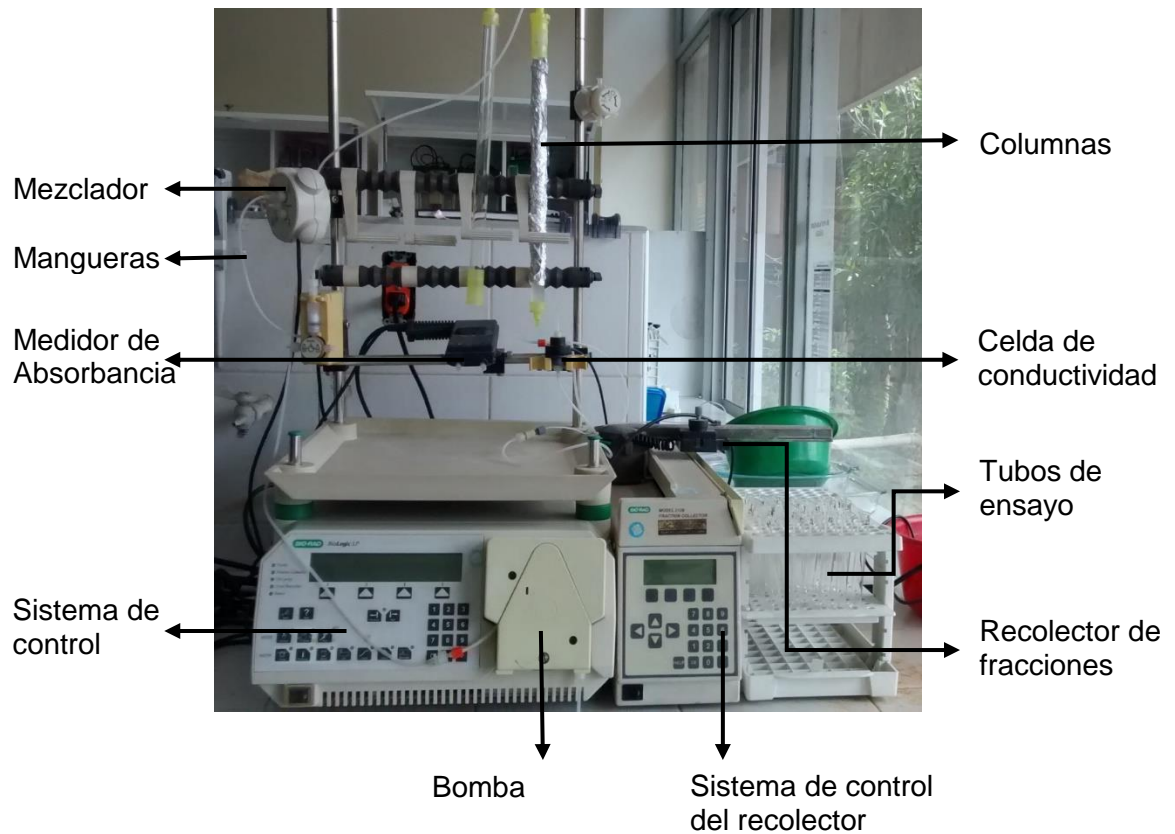
**3.2.1.2 Eliminación de pigmentos por reparto bifásico** Para eliminar los fenoles, polifenoles y sus productos de oxidación, se adicionó sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 10% p/v y polietilenglicol (PEG, peso molecular: 15.000-20.000 Da) 14% p/v en el extracto y se agitó a temperatura ambiente hasta su completa disolución con la ayuda de un agitador magnético. Fue dejado en reposo en un embudo de decantación por una hora, hasta que se formaron 2 fases insolubles. La fase inferior de color claro fue recolectada ya que contenía la PPG.

Terminada la etapa de eliminación de pigmentos, se determinará la concentración de proteínas y actividad enzimática del extracto.

**3.2.1.3 Cromatografía por exclusión de tamaño** Esta cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente. Como fase estacionaria se utilizó una columna de 25 cm<sup>3</sup> Sephadex G-50. La columna se equilibró con buffer Tris-básica 3 mM pH 8.3 utilizando un flujo de 1 mL/min, esta misma solución se empleó como fase

móvil para la elución de la PPG. Luego el extracto y la fase móvil fueron eluidos recolectando las fracciones cada 8 min, finalmente seleccionando las fracciones que poseían una mayor actividad enzimática y posteriormente determinando la concentración de proteínas.

**Figura 2. Purificador de proteínas Bio-Rad Biologic y sus partes (Vargas, 2016).**



**3.2.1.4 Ultrafiltración** Para concentrar el extracto obtenido en el paso anterior, se utilizaron amicones de 10000 Da que fueron puestos en la centrífuga junto con el extracto a 5000 rpm y 4°C por 30 minutos. Luego se tomó la actividad enzimática tanto al filtrado como al concentrado, para garantizar que sólo en el concentrado estuviera presente la POD y se determinó la concentración de proteínas para concluir el proceso de purificación parcial.

**3.2.1.5 Determinación de la actividad enzimática** El medio de reacción empleado para la determinación de la actividad enzimática de la PPG se preparó adicionando a 50 mL de solución tampón de fosfatos 30 mM a pH 8, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % (p/v). La actividad catalítica de la PPG se cuantificó de forma continua a través de la determinación de las velocidades iniciales de reacción. Usando guayacol como sustrato, se observó la aparición del producto de reacción tetraguayacol, a 470 nm, con un coeficiente de extinción molar del producto de 5200  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Para el ensayo se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de PPG a 2.5 mL de medio de reacción y 5  $\mu\text{L}$  de guayacol, luego se siguió la formación del producto mediante el aumento de absorbancia en un espectrofotómetro UV/visible de doble haz UV-1800 SHIMADZU.

**3.2.1.6 Determinación de proteínas por el método Bradford** Para calcular la concentración de proteínas en la solución resultante se hizo una curva de calibración utilizando albumina de suero bovino (BSA) como patrón en un rango entre 0,1-1 ppm. La concentración de proteínas se halló por interpolación con la curva de calibración que relaciona la concentración de proteínas con la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV/visible de doble haz UV-1800 SHIMADZU.

### **3.2.2 Caracterización bioquímica parcial**

**3.2.2.1 Estudio de la estabilidad de la POD a diferentes pH** Para el estudio del pH sobre la actividad de la PPG se incubaron 10  $\mu\text{L}$  del extracto semi-purificado en un volumen de 990  $\mu\text{L}$  de un buffer universal compuesto por ácido bórico, ácido acético, ácido fosfórico e hidróxido de sodio 10 mM, durante 2 horas, en un rango de pH entre 2-12. Después, se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de la enzima y se determinó la actividad utilizando 5  $\mu\text{L}$  de guayacol como sustrato.

**3.2.2.2 Estudio de la termoestabilidad** Se calentó una solución buffer de fosfatos 30 mM de pH óptimo a 66°C durante 15 minutos. Luego se adicionaron 10  $\mu$ L de la PPG por cada 2,5 mL de buffer fosfatos con  $H_2O_2$  0,9 mM y se incubaron a la misma temperatura. Posteriormente, cada 10 minutos se tomaron alícuotas de 2,510 mL de la mezcla (solución buffer de fosfatos 30 mM con  $H_2O_2$  9 mM y PPG), incubando por 30 minutos a 25°C, para restaurar la actividad perdida debido a la inactivación reversible. Finalmente se determinó la actividad enzimática empleando 5  $\mu$ L de guayacol como sustrato y se graficó la actividad relativa en el tiempo para hallar la constante de inactivación de la PPG.

**3.2.2.3 Estudio de la especificidad sustrática** Para el estudio de la especificidad sustrática se realizó un tipo de diseño experimental de superficie de respuesta denominado: diseño de composición central (DCC), con un diseño factorial  $2^4$  (concentración de buffer, concentración de peróxido de hidrógeno, concentración de sustrato y pH) usando el software STATGRAPHICS plus en los intervalos dados en la tabla 5. Con ello se logró determinar que variables dependientes (concentración de buffer, concentración de peróxido de hidrógeno, concentración de sustrato y pH) afectan significativamente la variable independiente de respuesta, que es la actividad enzimática de la peroxidasa del pasto guinea (*Panicum maximum*). Además el diseño de composición central (DCC) permitió encontrar los valores óptimos de las variables dependientes y los respectivos modelos polinómicos para cada sustrato.

La constante de velocidad límite de la reacción se determinó variando la concentración de sustrato y luego la del peróxido de hidrógeno. En la celda se adicionó la solución buffer, sustrato y peróxido de hidrógeno (la mezcla será tomada como blanco para ajustar el cero en el espectrofotómetro a la longitud de onda correspondiente). Luego se adicionó la enzima registrando el cambio de absorbancia durante 5 minutos. Una vez se obtuvo la concentración óptima del sustrato se varió de la concentración de peróxido de hidrógeno.

**Tabla 5. Condiciones del diseño experimental para estudiar la especificidad sustrática de la enzima peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*).**

| Sustrato      | Concentración de sustrato [mM] | Concentración de buffer [mM] | Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM] | pH      |
|---------------|--------------------------------|------------------------------|---|---------|
| ABTS          | 0,016-0,15                     | 0,01-0,1                     | 0,2-6,0   | 4,0-8,0 |
| Guayacol      | 0,1-10,0                       | 0,01-0,1                     | 0,7-8,0   | 4,0-8,0 |
| o-dianisidina | 0,08-0,5                       | 0,01-0,1                     | 1,0-9,0   | 4,0-8,0 |

**3.2.2.4 Determinación del peso molecular por electroforesis** La pureza y valor del peso molecular de la PPG fue determinado por electroforesis SDS-PAGE (8%) en presencia de 1% de 2-mercaptoetanol y EDTA 5 mM (Laemmli, 1970).

La electroforesis con dodecil sulfato de sodio en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de la enzima nativa en un gel al 8,0% se efectuó a temperatura ambiente de acuerdo con el procedimiento publicado (Davis, 1964). La tinción del gel se llevó a cabo de acuerdo con el método de tinción de plata de Chevallet y col. 2006. El peso molecular aproximado de enzima purificada se determinó mediante el corrimiento de alícuotas de 20 µL de la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*) aislada en tándem con HRP y marcadores de peso molecular (estándares de mayor precisión de proteínas de Bio-Rad).

## 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 4.1 ESTUDIOS PRELIMINARES

Para determinar las mejores condiciones de extracción se realizaron estudios previos que se mencionan a continuación:

➤ Estado del pasto

Se recogió pasto guinea de hojas cortas (no más de 20 cm de altura), largas (40 cm de altura en adelante) y con señales de estrés oxidativo (mordidas de insectos, manchas y telarañas, entre otros), posteriormente se extrajo la POD como indica el protocolo de Sakharov y col. 2001 hasta la primera etapa, antes del reparto bifásico. En la tabla 6 de resumen, se puede observar que la clase de pasto empleada para la extracción tiene un efecto significativo en la actividad enzimática. En el caso del largo de la hoja, es mejor elegir pasto con hojas largas (mayor a 40 cm de altura) debido a que contiene un 50% más de peroxidasa, esto puede deberse a que está implicada en los procesos fisiológicos de las plantas, como el crecimiento, desarrollo y endurecimiento de la pared celular. Es de esperarse que el estrés oxidativo incremente la cantidad de POD presente en el pasto guinea, ya que lo emplea como mecanismo de defensa frente a agentes externos y patógenos. Por tanto fue ideal elegir pasto de hojas largas (con altura superior a 40 cm) y con señales de exposición al estrés oxidativo.

**Tabla 6. Estudio del estado del pasto guinea (*Panicum maximum*).**

| <b>Estado del pasto guinea</b>       | <b>Actividad enzimática relativa (%)</b> |
|--------------------------------------|--|
| Hojas cortas (<20 cm)                | 31,9                                     |
| Hojas largas (>40 cm)                | 63,1                                     |
| Bajo condiciones de estrés oxidativo | 100,0                                    |

➤ **Tiempo de extracción**

Para lograr los resultados deseados en el menor tiempo posible fue necesario comparar los períodos de extracción de la POD, eligiendo 3 intervalos de: 6 horas, 12 horas y 24 horas. Según la tabla 7 la variación de la actividad enzimática no fue muy variable (inferior al 20%) respecto al tiempo de extracción, por ello se eligió 6 horas como tiempo de extracción ideal.

**Tabla 7. Estudio del tiempo de extracción de la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*).**

| <b>Tiempo de extracción</b> | <b>Actividad enzimática relativa (%)</b> |
|-----------------------------|--|
| 6 horas                     | 82,1                                     |
| 12 horas                    | 100,0                                    |
| 24 horas                    | 76,8                                     |

➤ **Concentración de la solución buffer de fosfatos**

Para analizar el efecto de la concentración de la solución buffer se realizó una prueba a diferentes concentraciones de la solución buffer de fosfatos que se muestra a continuación en la tabla 8. A partir de los resultados obtenidos se determinó a 30 mM como la mejor concentración buffer de fosfatos, al incrementar la concentración hasta 90 mM disminuye la actividad enzimática de la PPG. Este efecto puede deberse a que las propiedades de las proteínas también están influenciadas por la fuerza iónica, que se encuentra en función de la concentración

de sales en la solución buffer. En la tabla 8 se observa que la actividad enzimática relativa aumenta hasta una concentración 30 mM del buffer de extracción, esto puede atribuirse a que la PPG es una enzima que es afectada por la concentración de iones fosfato, por ello la fuerza iónica del medio puede alterar su actividad, lo que sucede a concentraciones superiores a 30 mM donde disminuye la actividad enzimática relativa; mientras que a una concentración baja del buffer (10 mM) puede no ejercer la capacidad amortiguadora requerida (Bravo y col. 2011).

**Tabla 8. Estudio del efecto de la concentración de la solución buffer de fosfatos con la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*).**

| <b>Concentración buffer de fosfatos (mM)</b> | <b>Actividad enzimática relativa (%)</b> |
|--|--|
| 10   | 82,1                                     |
| 30   | 100,0                                    |
| 50   | 98,5                                     |
| 70   | 63,5                                     |
| 80   | 57,0                                     |
| 90   | 50,6                                     |
| 100  | 57,7                                     |

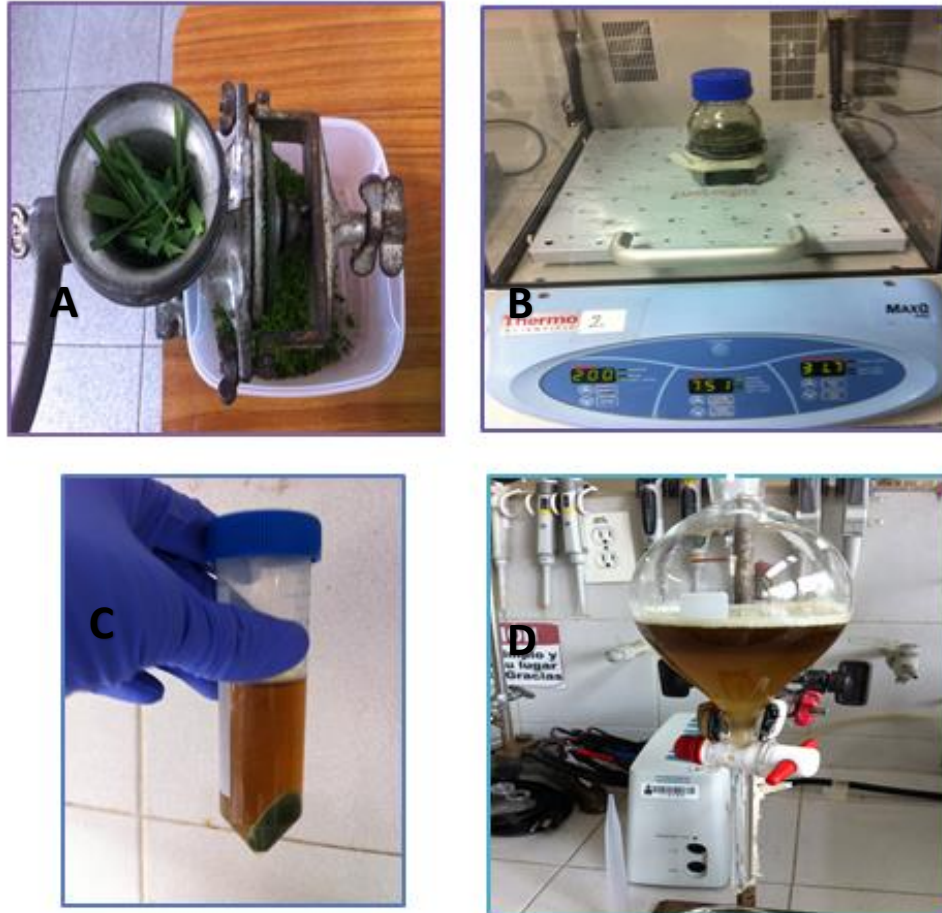
#### **4.2 EXTRACCIÓN Y SEMIPURIFICACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PASTO GUINEA**

En estudios previos según Sakharov y col. 1999. la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*) presenta una alta actividad enzimática respecto a las demás hojas de plantas analizadas, además se encuentra comúnmente en el territorio colombiano y se le quiere dar un valor agregado ya que sólo se emplea como pasto de forraje para el ganado. Estas características hacen a la PPG una alternativa llamativa con posibles características deseables para aplicaciones

como biosensores, biorremediación y bioquímica clínica. Por ello este proyecto de investigación se centró en la purificación parcial y estudio bioquímico evaluando la estabilidad en función del pH, la temperatura y la especificidad frente a algunos sustratos de esta novedosa fuente de peroxidasa. Para cumplir el objetivo, se homogenizaron 50 g de hojas de pasto guinea, previamente cortadas y molidas obtenidas en pastizales dentro de la ciudad de Bucaramanga. Para la extracción de la enzima se utilizó una solución buffer fosfato pH 8, 30 mM en una relación 1 g hoja/4 mL de buffer, condiciones previamente establecidas en el ítem anterior. Para la concentración de la PPG, los 50 g de hojas se dividieron en dos porciones iguales y el volumen inicial de solución buffer (100 mL) se usó como solución extractora para las dos porciones. El extracto obtenido presentó un color verde oscuro. Para eliminar parte del material sólido, se filtró el extracto con un filtro de tela de algodón y el extracto resultante presentaba un color verde oscuro. La actividad enzimática total del extracto crudo fue de 16174 U. La coloración del extracto se debe a la presencia de pigmentos y polifenoles, por tanto es de vital importancia eliminar estos compuestos, para ello se centrifugó el extracto crudo precipitando así los sedimentos y después de este procedimiento el color del extracto cambió a café claro.

Continuando con el proceso de eliminación de fenoles, polifenoles y productos de oxidación de estos compuestos, se hizo un reparto bifásico adicionando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y polietilenglicol en concentraciones de 10% p/v y 14% p/v respectivamente. En esta etapa se formaron dos fases: una de color marrón oscuro, donde quedaron suspendidos por la acción del PEG los pigmentos, polifenoles, productos de oxidación y proteínas de naturaleza hidrofóbica, mientras en la otra fase de color amarillo claro se encontraron las proteínas hidrosolubles. Luego de este procedimiento hubo un incremento de la actividad específica en 79 U/mg y una reducción del volumen en un 58% como es de esperarse al purificar las proteínas.

**Figura 3. A) Proceso de molienda de pasto guinea. B) Extracción por 6 horas. C) Extracto centrifugado. D) Reparto bifásico.**



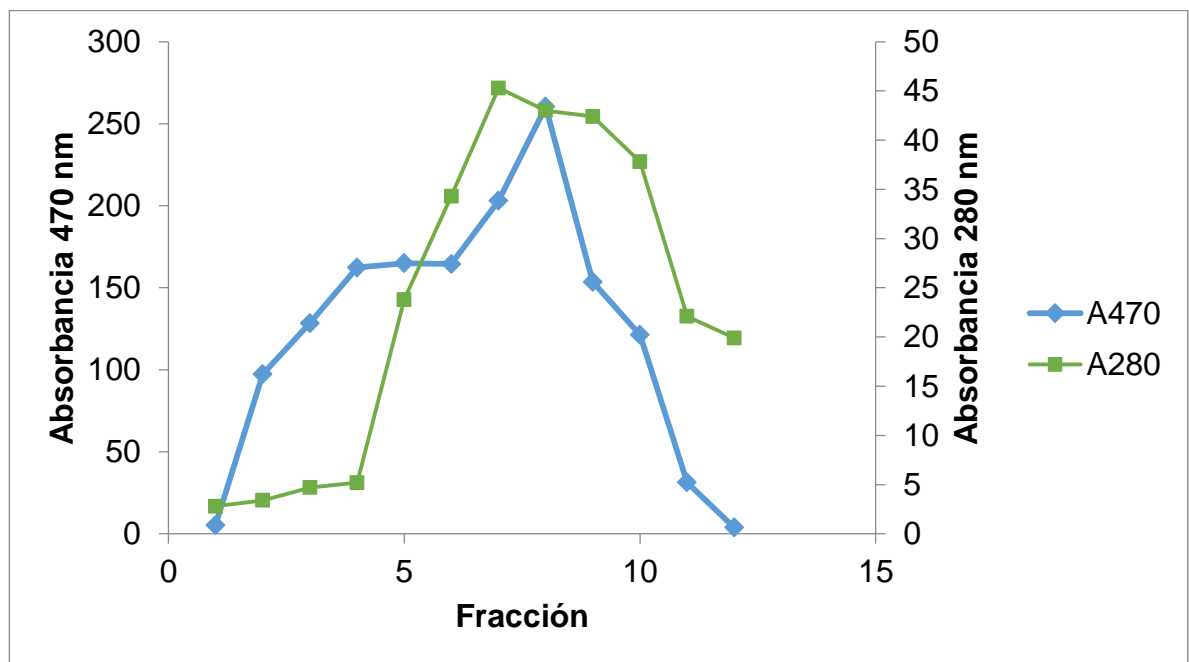
Después de la separación de las dos fases en un embudo de separación, la fase color amarillo claro, que contiene la actividad peroxidasa pasa al fraccionamiento cromatográfico.

➤ Cromatografía de exclusión por tamaño molecular

La parte clara del reparto bifásico se pasó a través de una columna con fase estacionaria Sephadex G50, en donde se usó como fase móvil TRIS-básica 3 mM pH 8,3. Se trabajó a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min y se recogieron

fracciones cada 8 minutos. El objetivo de éste paso es eliminar proteínas de bajo peso molecular y las sales en exceso, como el sulfato de amonio. Una evidencia de la eliminación de las sales es la disminución de la conductividad de 177 mS a 0,36 mS. Posteriormente se colectaron las fracciones 5-10 que contenían simultáneamente una mayor actividad volumétrica y alta absorbancia a 280 nm (longitud de onda que indica la presencia de grupos aromáticos de las proteínas).

**Figura 4. Cromatografía de exclusión por tamaño molecular de la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*) sobre Sephadex G50.**



Para finalizar la purificación parcial se realizó la concentración de la PPG obtenida en la etapa anterior pasando el extracto por amicones de 10000 Da a 5000 rpm en la centrífuga y 4°C durante 30 minutos. La parte superior denominada concentrado corresponde al extracto final semi-purificado de PPG.

Para resumir el procedimiento de purificación parcial se da la tabla 9, por medio de ella se puede saber el rendimiento y eficiencia en cada etapa de la purificación de la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*). Como en todo proceso de

purificación el rendimiento disminuye a medida de que el extracto se enriquece de enzima, pero un rendimiento casi del 40% en el extracto final es bastante bueno para provenir de material vivo, ya que normalmente en el caso de purificaciones vegetales suele encontrarse alrededor del 25-35%.

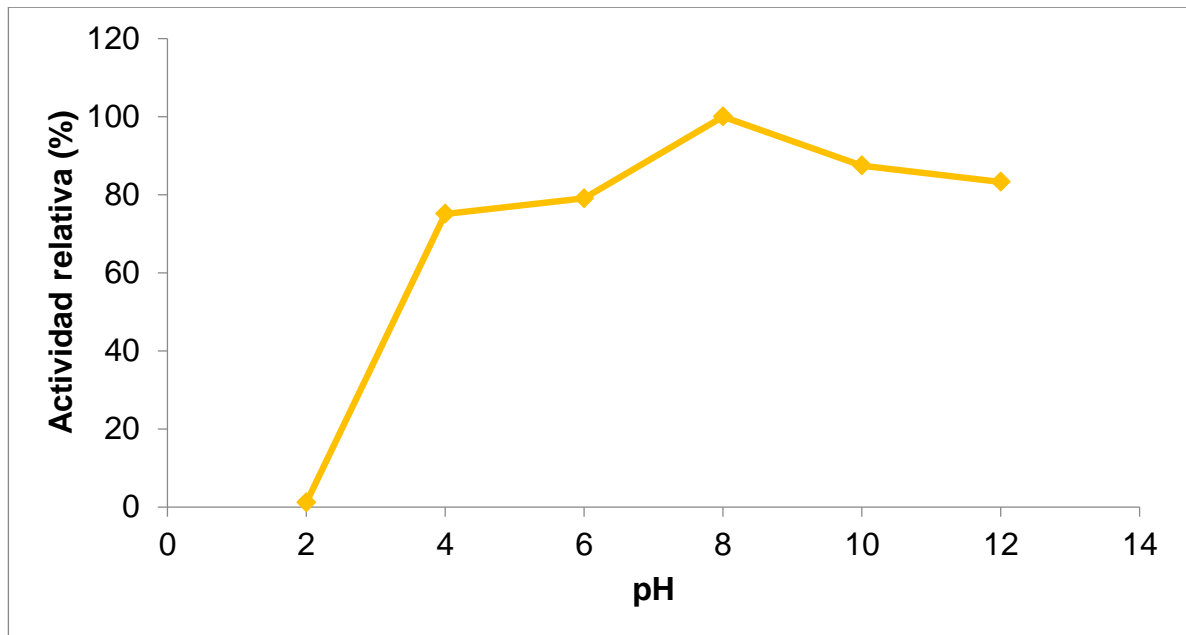
**Tabla 9. Tabla de rendimientos del proceso de purificación de la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*).**

| Etapa de purificación                 | Volumen (mL) | Proteína total (mg) | Actividad total | Actividad específica (U/mg) | Factor de purificación | Rendimiento (%) |
|---------------------------------------|--------------|---------------------|-----------------|-----------------------------|------------------------|-----------------|
| Extracción                            | 90           | 124,98              | 16173,90        | 129,41                      | 1                      | 100             |
| Eliminación de sólidos                | 85           | 74,21               | 15475,95        | 208,53                      | 1,61                   | 95,68           |
| Reparto bifásico                      | 49           | 47,79               | 12553,80        | 262,69                      | 2,03                   | 77,62           |
| Cromatografía de exclusión por tamaño | 31           | 30,57               | 10229,07        | 334,65                      | 2,58                   | 63,24           |
| Ultrafiltración                       | 11           | 15,26               | 6238,76         | 408,88                      | 3,16                   | 38,57           |

#### 4.3 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PPG A DIFERENTES VALORES DE pH

La PPG tiene una actividad enzimática bastante estable en un intervalo de 4 a 12 frente al guayacol como lo muestra la figura 5, ya que esta se mantiene superior al 70% siendo 8 el mejor pH de trabajo para la enzima. Las peroxidases de hojas de *Jatropha curcas*, lechuga (*Lactuca sativa L*) y cidro (*Citrus medica*) presentaron 4, 5 y 6 como los mejores pH respectivamente, empleando guayacol como sustrato (Cai y col. 2012; Hu y col. 2012; Mall y col. 2013). Por tanto es ideal usar la PPG a pH básico (superior a 7) debido a que en el caso de las peroxidases de hojas de lechuga o cidro la actividad enzimática disminuye por debajo del 50% a este mismo pH.

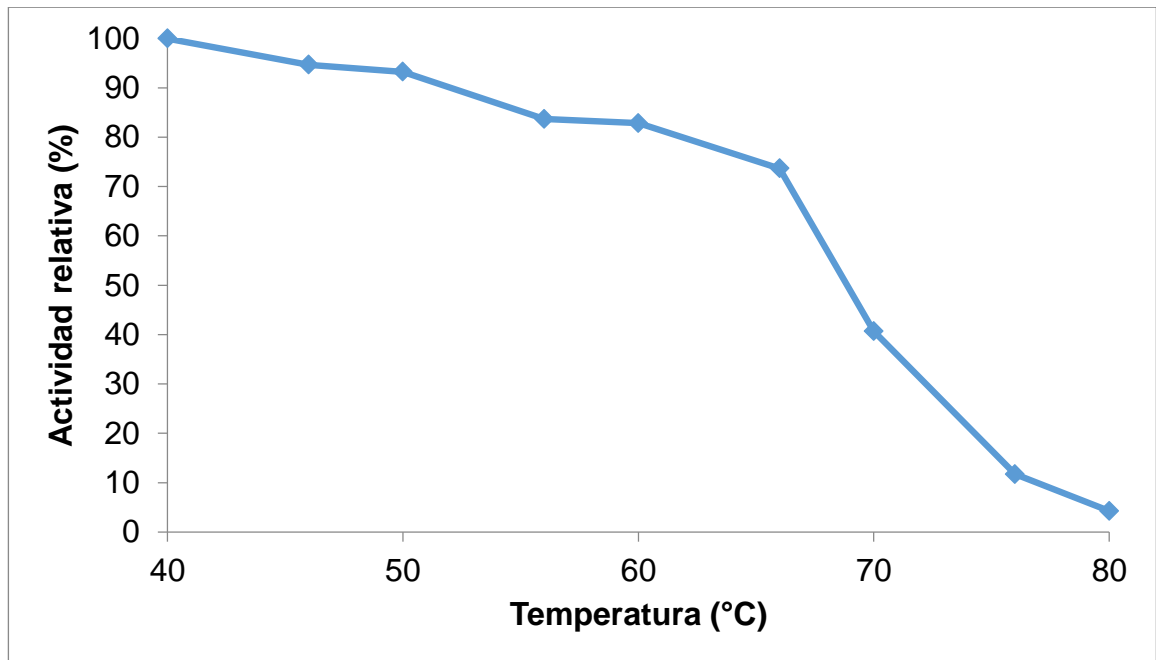
**Figura 5. Efecto del pH sobre la actividad catalítica de la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*).**



#### **4.4 ESTUDIO DE LA TERMOESTABILIDAD DE LA PPG**

Para analizar la estabilidad térmica de la PPG se realizó un ensayo incrementando la temperatura a partir de 40°C hasta 80°C, para posteriormente incubar a 25°C en solución buffer fosfatos 30 mM pH 8 y así restaurar la actividad perdida debido a la inactivación reversible. De la figura 6 se puede visualizar que la PPG conserva más del 70% de su actividad enzimática hasta los 66°C, después de esta temperatura la enzima se inactiva de forma irreversible debido a desnaturalización de la misma.

**Figura 6. Efecto de la termoestabilidad de la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*).**



Luego se seleccionó la temperatura de 66°C para observar el efecto de la temperatura en el tiempo, ya que la PPG conservaba más del 70% de actividad catalítica. En la figura 7 se muestra que la PPG hasta los 70 minutos mantiene más del 55% de la actividad original a 66°C, comparada con la peroxidasa de hojas de cidro que después de 70 minutos a 65°C su actividad disminuye a 45% (Mall y col. 2013). Para determinar la constante de inactivación de la enzima ( $K_{inac}$ ) a 66°C se graficó el  $\ln(A/A_0)$  en función del tiempo, donde  $A_0$  es la actividad enzimática inicial y  $A$  la actividad enzimática residual, como muestra la figura 8. Luego se realizó una regresión lineal (ya que la peroxidasa de pasto guinea sigue una cinética de primer orden), donde se obtuvo la ecuación  $y = -0,0081x - 0,0319$ , cuya pendiente corresponde al valor de la constante de inactivación de la enzima, esto indica que pierde 0,0081 unidades por minuto a 66°C. La  $K_{inac}$  de la peroxidasa de palma real es de  $0,408 \text{ min}^{-1}$  a 80°C (Barbosa, 2006), lo que probablemente indica una mayor termoestabilidad de la PPG.

Figura 7. Estabilidad de la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*) en función de la temperatura a 66 °C.

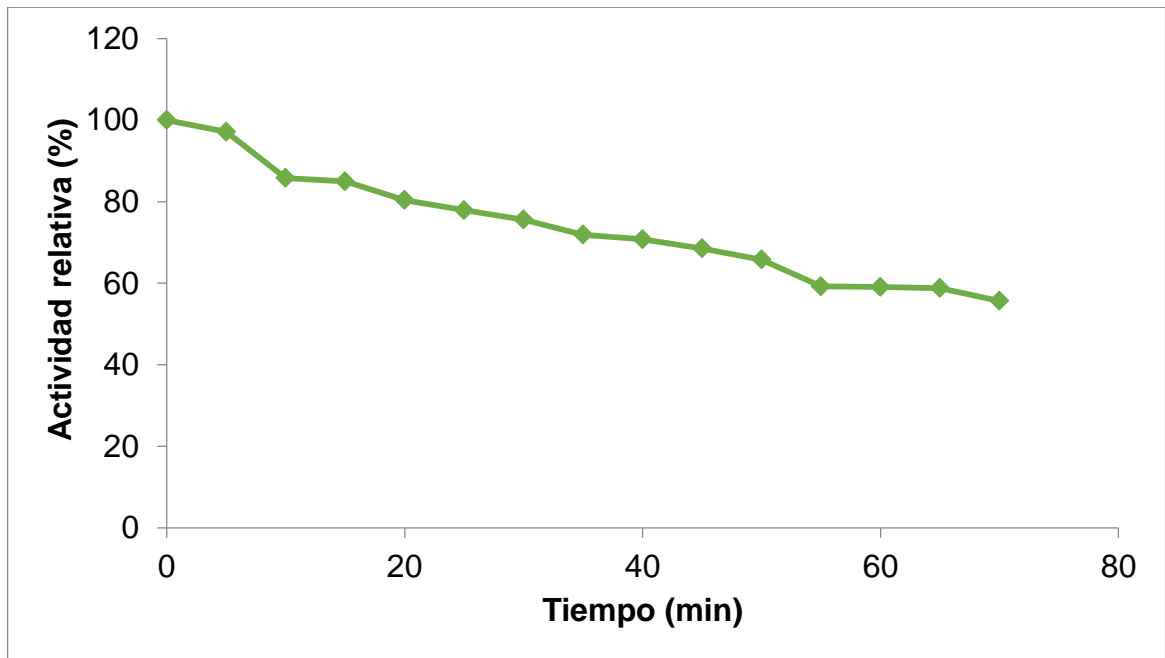
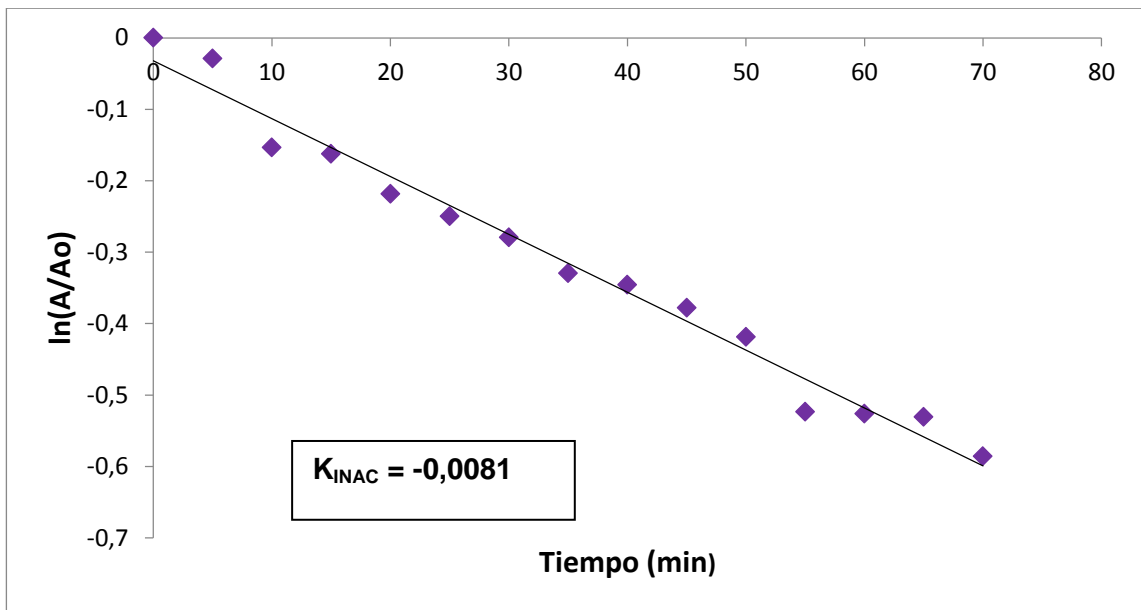


Figura 8. Determinación de la constante de inactivación de la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*) a 66°C.



## 4.5 ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD SUSTRÁTICA

Para determinar las mejores condiciones de la actividad catalítica de la PPG frente a los diferentes sustratos se analizó qué parámetros (concentración de buffer, concentración de peróxido de hidrógeno, concentración de sustrato y pH) pueden afectar la actividad catalítica de la PPG con cada uno de los sustratos analizados (guayacol, *o*-dianisidina y ABTS) se realizó en cada caso un diseño experimental de superficie de respuesta denominado diseño de composición central (DCC), con un diseño factorial  $2^4$  usando el software STATGRAPHICS plus en los intervalos dados en la tabla 5.

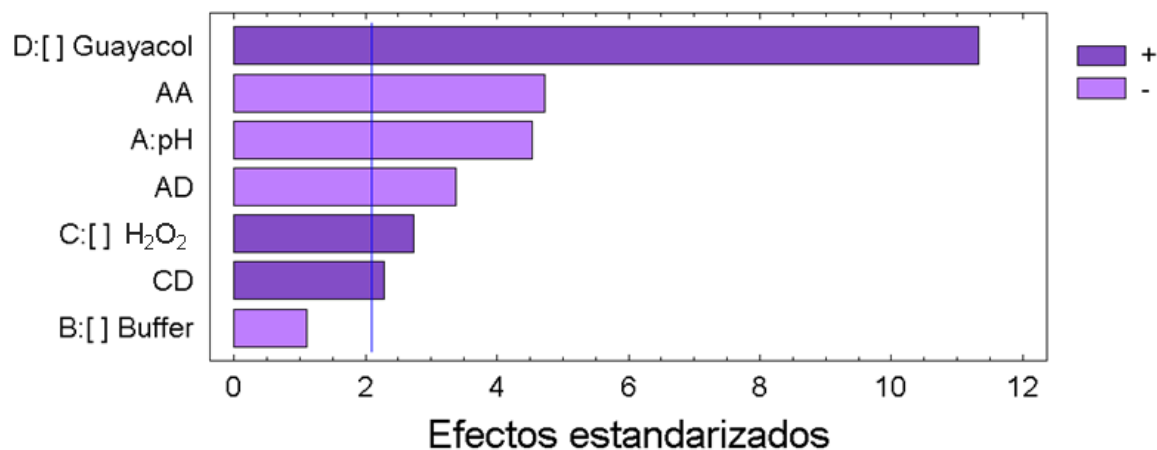
### 4.5.1 Especificidad sustrática de la PPG frente al guayacol

**Tabla 10. Matriz de resultados para el estudio de la especificidad sustrática de la PPG frente al guayacol generada por el software STATGRAPHICS plus.**

| pH | [mM] Buffer | [mM] H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | [mM] Guayacol | Actividad volumétrica (U/mL) |
|----|-------------|------------------------------------|---------------|------------------------------|
| 4  | 10          | 0,7                                | 0,1           | 12,50                        |
| 8  | 10          | 0,7                                | 0,1           | 3,62                         |
| 4  | 100         | 0,7                                | 0,1           | 10,71                        |
| 8  | 100         | 0,7                                | 0,1           | 5,21                         |
| 4  | 10          | 8                                  | 0,1           | 76,02                        |
| 8  | 10          | 8                                  | 0,1           | 2,03                         |
| 4  | 100         | 8                                  | 0,1           | 6,13                         |
| 8  | 100         | 8                                  | 0,1           | 3,52                         |
| 4  | 10          | 0,7                                | 10            | 310,23                       |
| 8  | 10          | 0,7                                | 10            | 159,29                       |
| 4  | 100         | 0,7                                | 10            | 339,96                       |
| 8  | 100         | 0,7                                | 10            | 204,95                       |
| 4  | 10          | 8                                  | 10            | 633,00                       |
| 8  | 10          | 8                                  | 10            | 232,99                       |
| 4  | 100         | 8                                  | 10            | 501,71                       |
| 8  | 100         | 8                                  | 10            | 265,34                       |
| 4  | 55          | 4,35                               | 5,05          | 294,88                       |
| 8  | 55          | 4,35                               | 5,05          | 119,13                       |
| 6  | 10          | 4,35                               | 5,05          | 459,23                       |
| 6  | 100         | 4,35                               | 5,05          | 262,34                       |
| 6  | 55          | 0,7                                | 5,05          | 252,35                       |
| 6  | 55          | 8                                  | 5,05          | 292,46                       |
| 6  | 55          | 4,35                               | 0,1           | 33,35                        |
| 6  | 55          | 4,35                               | 10            | 472,07                       |
| 6  | 55          | 4,35                               | 5,05          | 303,27                       |
| 6  | 55          | 4,35                               | 5,05          | 328,66                       |

En la tabla 10 se resumen los resultados obtenidos después de realizar los experimentos planteados por el diseño de composición central, donde a través de los factores analizados (pH, concentración de buffer, concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y concentración de guayacol) se determinó como afectan estos la variable de respuesta (actividad volumétrica). La gráfica 1 exhibe a la derecha de la línea azul las variables que más afectan la actividad catalítica de la PPG (concentración de guayacol, pH y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), mientras la concentración de buffer no afecta en gran manera la variable de respuesta. Los signos + y – representan cuando las variables tienen un efecto directa o inversamente proporcional, respectivamente. El R<sup>2</sup> obtenido con este modelo corresponde a 91,6%, lo que indica que existe una alta correlación de los datos experimentales obtenidos respecto a la ecuación modelo que generó el software.

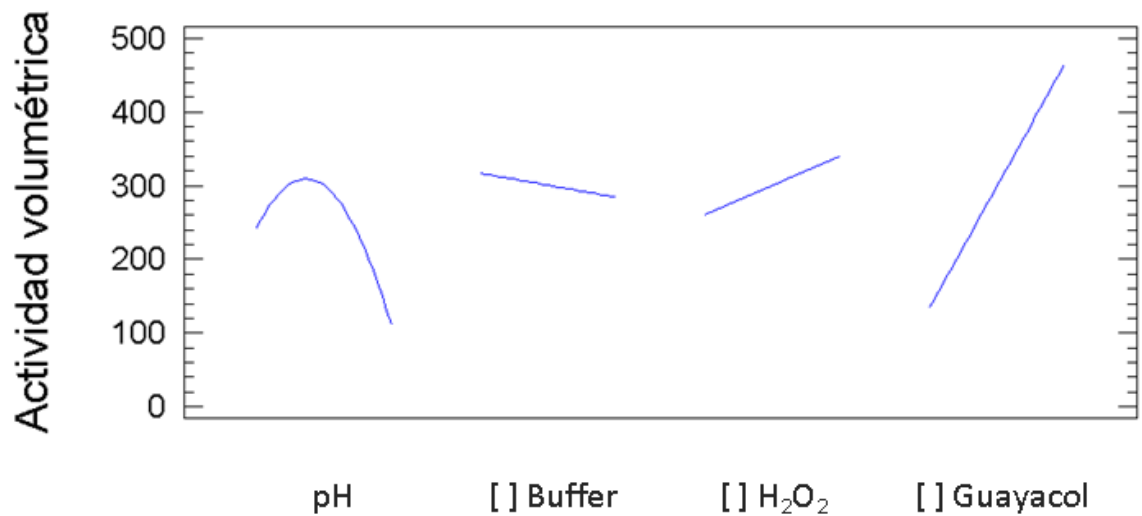
**Gráfica 1. Gráfico de Pareto estandarizado para la actividad volumétrica de la PPG frente al guayacol.**



En la gráfica 2 se aprecia como las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y guayacol afectan la actividad volumétrica de la PPG de forma lineal y proporcional, mientras que la concentración de la solución buffer y el pH ejercen un efecto inversamente proporcional de forma lineal y parabólica, respectivamente en la actividad

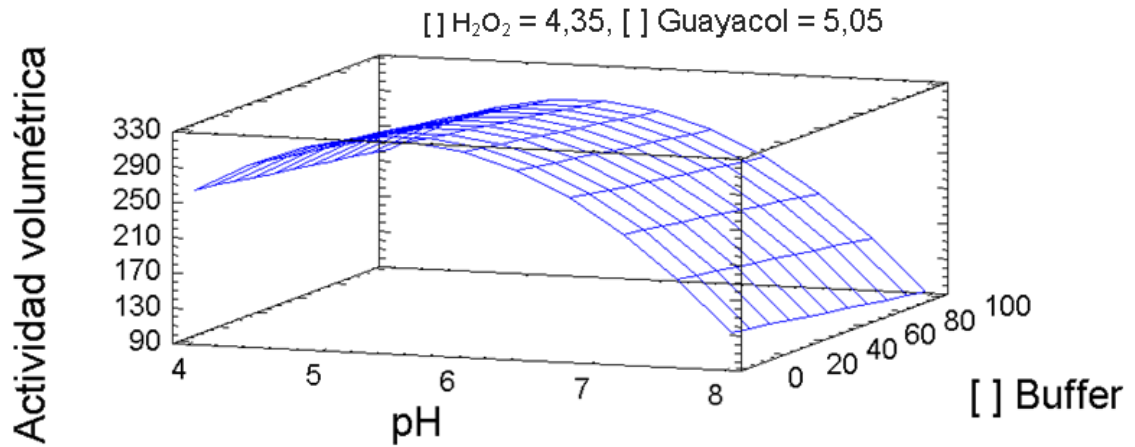
volumétrica. La alta inclinación de la pendiente de la concentración de guayacol indica que es la variable que más influye en la actividad catalítica de la enzima.

**Gráfica 2. Gráfica de efectos principales para la actividad volumétrica de la PPG frente al guayacol.**



La superficie de respuesta obtenida sumando los efectos de todas las variables se puede visualizar en la gráfica 3 donde se mantuvieron constantes las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 4,35 mM y guayacol 5,05 mM.

**Gráfica 3. Gráfica de superficie de respuesta estimada de la PPG frente al guayacol.**



**Ecuación 1. Ecuación modelo obtenida por medio de STATGRAPHICS plus para el análisis de la especificidad de la PPG frente al guayacol.**

$$\text{Actividad volumétrica} = -927,016 + 364,679 \cdot \text{pH} - 0,356835 \cdot [\ ] \text{ Buffer} + 1,03889 \cdot [\ ] \text{ H}_2\text{O}_2 + 56,3122 \cdot [\ ] \text{ Guayacol} - 30,9337 \cdot \text{pH}^2 - 5,24836 \cdot \text{pH} \cdot [\ ] \text{ Guayacol} + 1,94743 \cdot 10^6 \cdot [\ ] \text{ H}_2\text{O}_2 \cdot [\ ] \text{ Guayacol}$$

Los valores óptimos obtenidos de cada una de las variables estudiadas para la especificidad sustrática de la PPG frente al guayacol se presentan en la tabla 11.

**Tabla 11. Valores óptimos del estudio de la especificidad sustrática de la PPG frente al guayacol determinados por medio del DCC empleando el software STATGRAPHICS plus.**

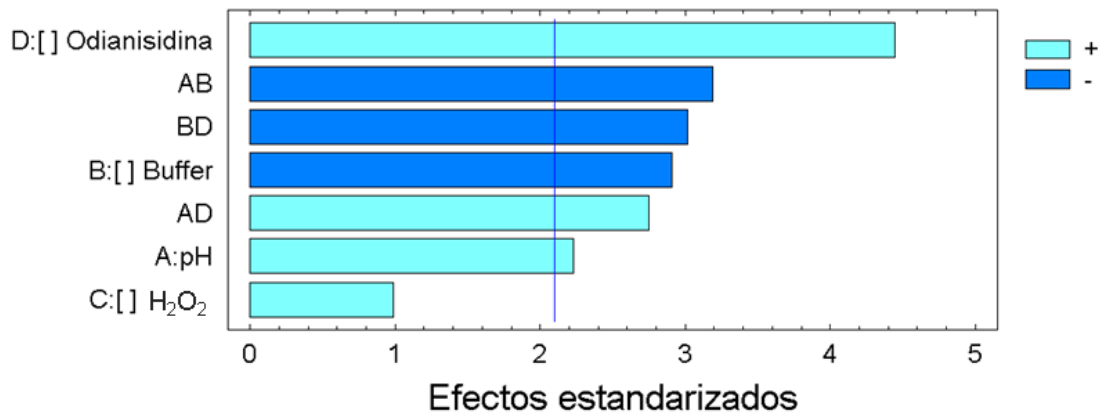
| Factor  | Inferior | Superior | Óptimo |
|---|----------|----------|--------|
| pH  | 4,0      | 8,0      | 5,05   |
| Concentración de buffer (mM)                        | 10,0     | 100,0    | 10,02  |
| Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM) | 0,7      | 8,0      | 8,00   |
| Concentración de guayacol (mM)                      | 0,1      | 10,0     | 9,99   |

**4.5.2 Especificidad sustrática de la PPG frente a la o-dianisidina** El resumen de resultados obtenidos luego de realizar los experimentos planteados por el DCC se muestran en la tabla 12, donde se aprecia como la actividad volumétrica es afectada por las variables analizadas: pH, concentración de buffer, concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y concentración de o-dianisidina. A la derecha de la línea azul de la gráfica 4 se presentan las variables que más afectan la actividad catalítica de la PPG, las cuales son concentración de o-dianisidina, pH y concentración de la solución buffer, como la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está a la izquierda de la línea esto indica que no afecta en significativamente la variable de respuesta. Los signos + y – representan cuando las variables tienen un efecto directa o inversamente proporcional, respectivamente. El R<sup>2</sup> obtenido con este modelo corresponde a 77,2%, lo que revela que existe buena correlación de los datos experimentales obtenidos respecto a la ecuación modelo que generó el software.

**Tabla 12.. Matriz de resultados para el estudio de la especificidad sustrática de la PPG frente a la o-dianisidina generada por el software STATGRAPHICS plus.**

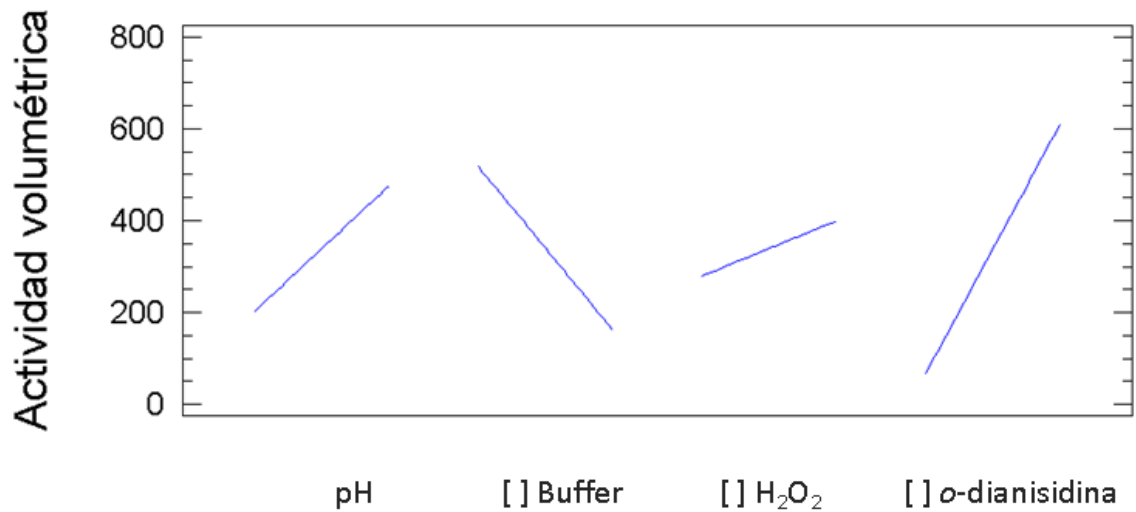
| pH | [mM] Buffer | [mM] H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | [mM] o-dianisidina | Actividad (U/mL) |
|----|-------------|------------------------------------|--------------------|------------------|
| 4  | 10          | 1                                  | 0,08               | 61,00            |
| 8  | 10          | 1                                  | 0,08               | 47,62            |
| 4  | 100         | 1                                  | 0,08               | 65,24            |
| 8  | 100         | 1                                  | 0,08               | 36,04            |
| 4  | 10          | 9                                  | 0,08               | 60,01            |
| 8  | 10          | 9                                  | 0,08               | 34,62            |
| 4  | 100         | 9                                  | 0,08               | 63,32            |
| 8  | 100         | 9                                  | 0,08               | 28,19            |
| 4  | 10          | 1                                  | 0,5                | 196,87           |
| 8  | 10          | 1                                  | 0,5                | 1346,87          |
| 4  | 100         | 1                                  | 0,5                | 242,47           |
| 8  | 100         | 1                                  | 0,5                | 132,19           |
| 4  | 10          | 9                                  | 0,5                | 295,93           |
| 8  | 10          | 9                                  | 0,5                | 2153,08          |
| 4  | 100         | 9                                  | 0,5                | 321,78           |
| 8  | 100         | 9                                  | 0,5                | 164,40           |
| 4  | 55          | 5                                  | 0,29               | 274,68           |
| 8  | 55          | 5                                  | 0,29               | 88,69            |
| 6  | 10          | 5                                  | 0,29               | 466,52           |
| 6  | 100         | 5                                  | 0,29               | 418,08           |
| 6  | 55          | 1                                  | 0,29               | 326,72           |
| 6  | 55          | 9                                  | 0,29               | 415,91           |
| 6  | 55          | 5                                  | 0,08               | 149,93           |
| 6  | 55          | 5                                  | 0,5                | 572,95           |
| 6  | 55          | 5                                  | 0,29               | 439,25           |
| 6  | 55          | 5                                  | 0,29               | 425,53           |

**Gráfica 4. Gráfico de Pareto estandarizado para la actividad volumétrica de la PPG frente al o-dianisidina.**



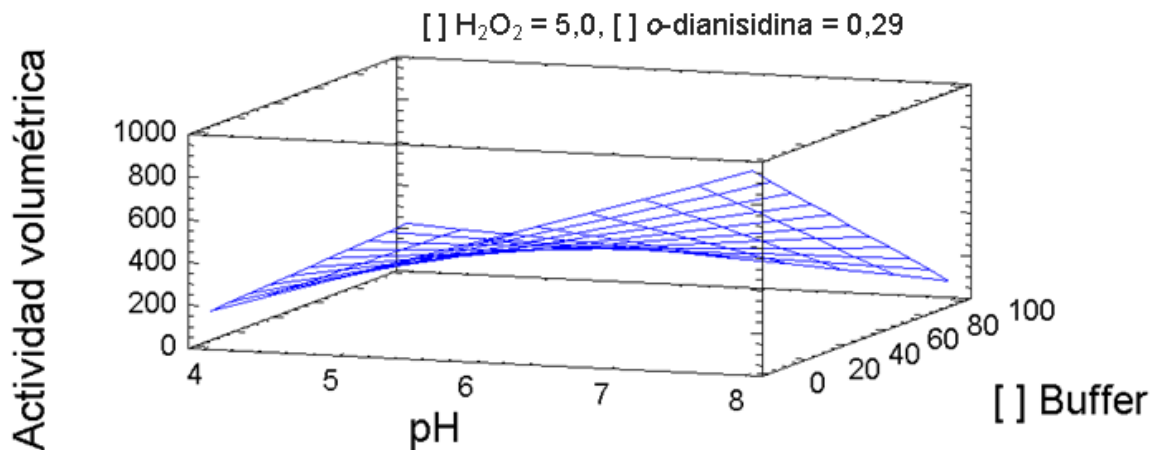
Para observar los efectos de cada variable respecto a la actividad catalítica de la PPG se presenta la gráfica 4, donde se exhibe que las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o-dianisidina y pH influyen la actividad volumétrica de la PPG de forma lineal y proporcional, mientras que la concentración de la solución buffer afecta lineal e inversamente proporcional la actividad volumétrica. La alta pendiente que representa la concentración de o-dianisidina en la gráfica 5, denota que esta variable tiene un mayor efecto en la actividad catalítica de la PPG.

**Gráfica 5. Gráfica de efectos principales para la actividad volumétrica de la PPG frente a la *o*-dianisidina.**



La superficie de respuesta obtenida sumando los efectos de todas las variables de puede visualizar en la gráfica 6 donde se mantuvieron constantes las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5,0 mM y *o*-dianisidina 0,29 mM.

**Gráfica 6.. Gráfica de superficie de respuesta estimada de la PPG frente a la *o*-dianisidina.**



**Ecuación 2. Ecuación modelo obtenida por medio de STATGRAPHICS plus para el análisis de la especificidad de la PPG frente a la o-dianisidina.**

$$\text{Actividad volumétrica} = -650,891 + 71,3983 \cdot \text{pH} + 15,7956 \cdot [\text{ Buffer}] + 15,0242 \cdot [\text{ H}_2\text{O}_2] - 112,17 \cdot [\text{ o-dianisidina}] - 2,29158 \cdot \text{pH} \cdot [\text{ Buffer}] + 423,077 \cdot \text{pH} \cdot [\text{ o-dianisidina}] - 20,6412 \cdot [\text{ Buffer}] \cdot [\text{ o-dianisidina}]$$

Los valores óptimos obtenidos de cada una de las variables estudiadas para la especificidad sustrática de la PPG frente a la o-dianisidina son dados en la tabla 13.

**Tabla 13. Valores óptimos del estudio de la especificidad sustrática de la PPG frente a la o-dianisidina determinados por medio del DCC empleando el software STATGRAPHICS plus.**

| Factor  | Inferior | Superior | Óptimo |
|---|----------|----------|--------|
| pH  | 4,0      | 8,0      | 8,0    |
| Concentración de buffer (mM)                        | 10,0     | 100,0    | 10,0   |
| Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM) | 1,0      | 9,0      | 9,0    |
| Concentración de o-dianisidina (mM)                 | 0,08     | 0,5      | 0,5    |

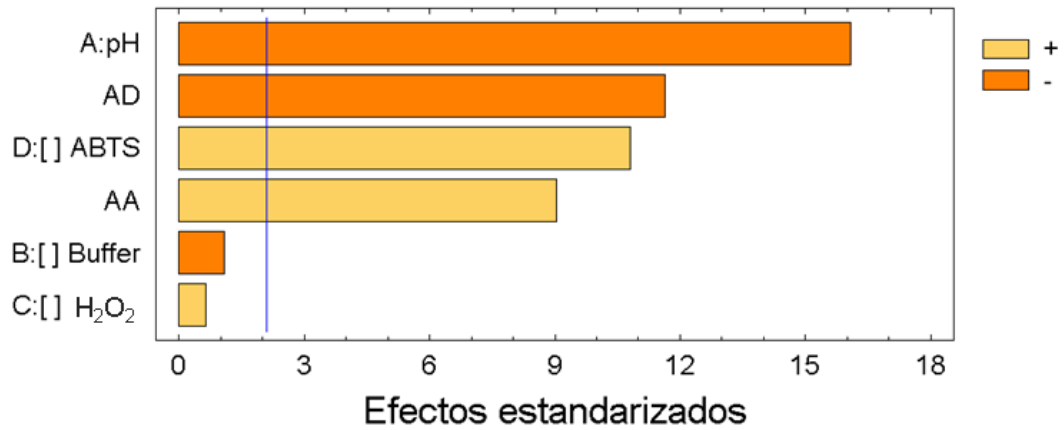
**4.5.3 Especificidad sustrática de la PPG frente al ABTS** La tabla 14 enseña los resultados obtenidos al ejecutar los experimentos propuestos por el DCC, allí se muestra como las variables analizadas: pH, concentración de buffer, concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y concentración de ABTS influyen sobre la actividad volumétrica. En la gráfica 7 se presentan a la derecha de la línea azul las variables que tienen mayor efecto sobre la actividad catalítica de la PPG, estas son la concentración de ABTS y pH, mientras a la izquierda de la línea se muestra que la concentración de la solución buffer y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no ejerce un impacto significativo respecto a la actividad volumétrica. Los signos + y –

representan cuando las variables tienen un efecto directa o inversamente proporcional, respectivamente. El  $R^2$  obtenido con este modelo corresponde a 96,9%, el más alto obtenido entre los tres sustratos analizados, esto señala que los datos experimentales obtenidos se ajustan de forma precisa a la ecuación modelo que generó el software.

**Tabla 14. Matriz de resultados para el estudio de la especificidad sustrática de la PPG frente al ABTS generada por el software STATGRAPHICS plus.**

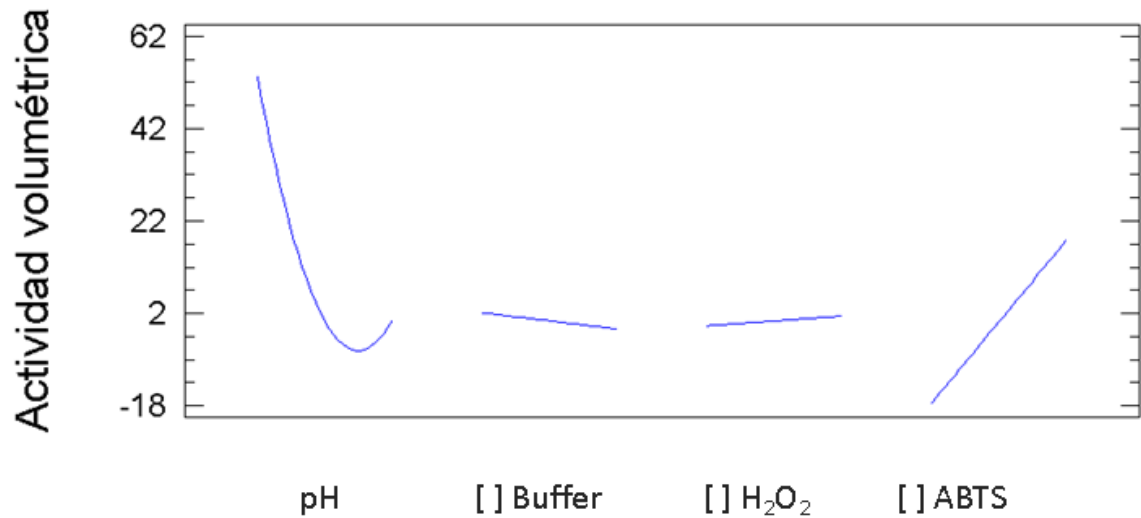
| pH | [mM] Buffer | [mM] H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | [mM] ABTS | Actividad (U/mL) |
|----|-------------|------------------------------------|-----------|------------------|
| 4  | 10          | 0,2                                | 0,016     | 15,45            |
| 8  | 10          | 0,2                                | 0,016     | 3,74             |
| 4  | 100         | 0,2                                | 0,016     | 12,60            |
| 8  | 100         | 0,2                                | 0,016     | 0,18             |
| 4  | 10          | 0,6                                | 0,016     | 15,61            |
| 8  | 10          | 0,6                                | 0,016     | 0,58             |
| 4  | 100         | 0,6                                | 0,016     | 11,57            |
| 8  | 100         | 0,6                                | 0,016     | 0,13             |
| 4  | 10          | 0,2                                | 0,15      | 91,10            |
| 8  | 10          | 0,2                                | 0,15      | 0,84             |
| 4  | 100         | 0,2                                | 0,15      | 85,06            |
| 8  | 100         | 0,2                                | 0,15      | 0,09             |
| 4  | 10          | 0,6                                | 0,15      | 106,91           |
| 8  | 10          | 0,6                                | 0,15      | 0,45             |
| 4  | 100         | 0,6                                | 0,15      | 91,96            |
| 8  | 100         | 0,6                                | 0,15      | 0,62             |
| 4  | 55          | 0,4                                | 0,083     | 49,31            |
| 8  | 55          | 0,4                                | 0,083     | 0,14             |
| 6  | 10          | 0,4                                | 0,083     | 0,19             |
| 6  | 100         | 0,4                                | 0,083     | 0,85             |
| 6  | 55          | 0,2                                | 0,083     | 0,19             |
| 6  | 55          | 0,6                                | 0,083     | 0,16             |
| 6  | 55          | 0,4                                | 0,016     | 0,39             |
| 6  | 55          | 0,4                                | 0,15      | 0,69             |
| 6  | 55          | 0,4                                | 0,083     | 0,31             |
| 6  | 55          | 0,4                                | 0,083     | 0,25             |

**Gráfica 7. Gráfico de Pareto estandarizado para la actividad volumétrica de la PPG frente al ABTS.**



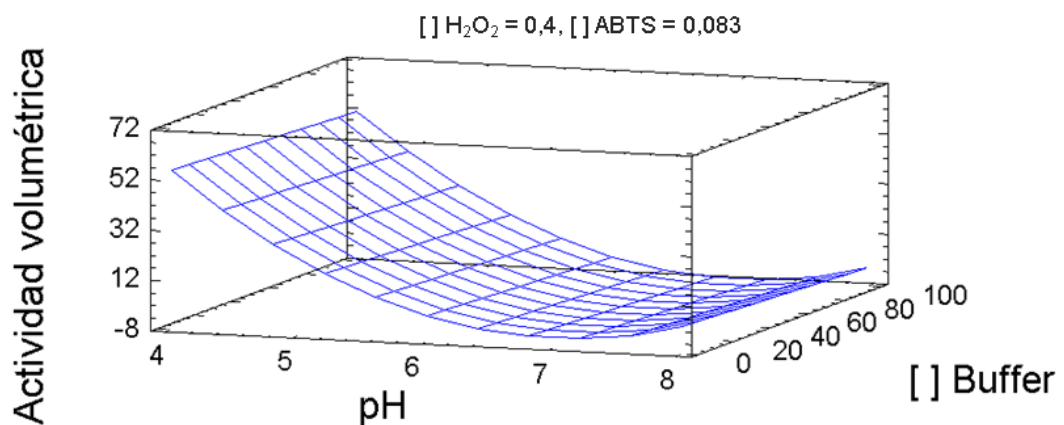
En la gráfica 8 se presenta que tanto las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ABTS intervienen en la actividad volumétrica de la PPG de forma lineal y proporcional. Por otro lado la concentración de la solución buffer y el pH afectan inversamente proporcional en forma lineal y parabólica, respectivamente la actividad volumétrica. La prominente pendiente de la concentración de ABTS indica que es la variable con mayor contribución a la actividad catalítica de la PPG.

**Gráfica 8. Gráfica de efectos principales para la actividad volumétrica de la PPG frente al ABTS.**



La superficie de respuesta obtenida sumando los efectos de todas las variables de puede visualizar en la gráfica 9 donde se mantuvieron constantes las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,4 mM y ABTS 0,083 mM.

**Gráfica 9. Gráfica de superficie de respuesta estimada de la PPG frente al ABTS.**



**Ecuación 3. Ecuación modelo obtenida por medio de STATGRAPHICS plus para el análisis de la especificidad de la PPG frente al ABTS.**

$$\text{Actividad volumétrica} = 222,285 - 80,5736 \cdot \text{pH} - 0,0392878 \cdot [\text{Buffer}] + 5,20564 \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] + 1165,55 \cdot [\text{ABTS}] + 6,66015 \cdot \text{pH}^2 - 150,385 \cdot \text{pH} \cdot [\text{ABTS}]$$

Los valores óptimos obtenidos de cada una de las variables estudiadas para la especificidad sustrática de la PPG frente al ABTS son dados en la tabla 15.

**Tabla 15. Valores óptimos del estudio de la especificidad sustrática de la PPG frente al ABTS determinados por medio del DCC empleando el software STATGRAPHICS plus.**

| Factor  | Inferior | Superior | Óptimo |
|---|----------|----------|--------|
| pH  | 4,0      | 8,0      | 4,0    |
| Concentración de buffer (mM)                        | 10,0     | 100,0    | 10,0   |
| Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM) | 0,2      | 0,6      | 0,6    |
| Concentración de ABTS (mM)                          | 0,016    | 0,15     | 0,15   |

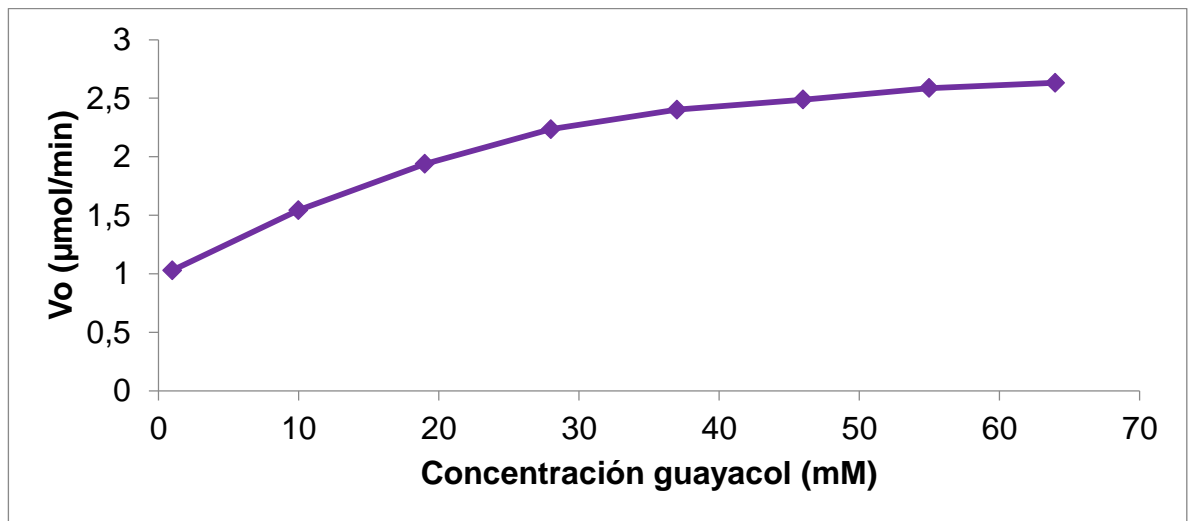
**Tabla 16. Comparación de los valores óptimos obtenidos para los diferentes sustratos a partir del diseño de composición central (DCC) 2<sup>4</sup> por medio del software STATGRAPHICS plus.**

| Sustrato      | Concentración de sustrato (mM) | Concentración de buffer (mM) | Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM) | pH   |
|---------------|--------------------------------|------------------------------|---|------|
| Guayacol      | 9,99                           | 10,02                        | 8,0   | 5,05 |
| o-dianisidina | 0,5                            | 10,0                         | 9,0   | 8,0  |
| ABTS          | 0,15                           | 10,0                         | 0,6   | 4,0  |

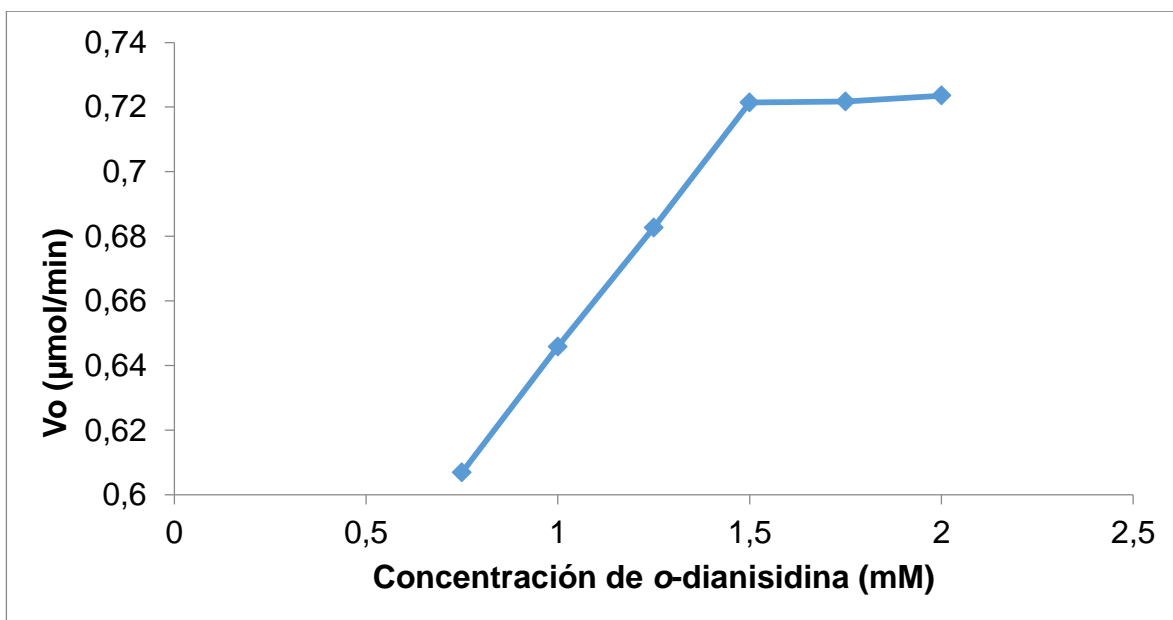
**4.5.4 Estudio de parámetros cinéticos de la PPG** Empleando los valores óptimos correspondientes a las variables analizadas para cada sustrato

(concentración de  $H_2O_2$ , pH y concentración de la solución buffer) obtenidos en la tabla 16, se realizaron ensayos para obtener los parámetros cinéticos característicos de la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*) frente a cada sustrato. Para determinar estos parámetros ( $K_m$ ,  $V_{max}$  y  $K_{cat}$ ) fue necesario variar las concentraciones de sustrato hasta la saturación en las condiciones óptimas de cada sustrato, esto se visualiza en las figuras 9, 10 y 11.

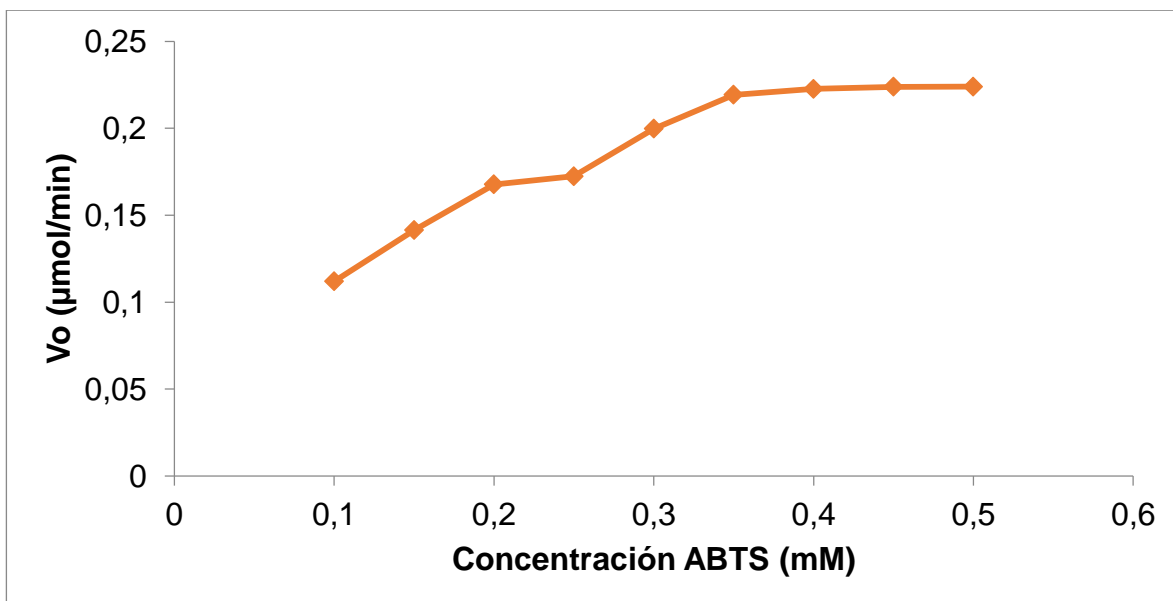
**Figura 9. Estudio de la velocidad catalítica de la PPG en función de la concentración de guayacol.**



**Figura 10. Estudio de la velocidad catalítica de la PPG en función de la concentración de o-dianisidina.**



**Figura 11. Estudio de la velocidad catalítica de la PPG en función de la concentración de ABTS.**



En las figuras 12, 13 y 14 se graficó el valor inverso de la velocidad catalítica de la PPG contra el valor inverso de la concentración de sustrato para obtener las ecuaciones lineales correspondientes. Los  $R^2$  obtenidos en cada caso son bastante cercanos a 1, lo que verifica la correlación entre los datos experimentales graficados.

De las ecuaciones lineales correspondientes a cada gráfica se determinaron los parámetros cinéticos de los sustratos. Despejando la pendiente se obtuvo la relación  $K_m/V_{max}$ , el término independiente es igual  $1/V_{max}$  y el  $K_{cat}$  es equivalente a  $V_{max}/K_m$ . Donde  $K_m$  es la afinidad de la enzima por el sustrato,  $V_{max}$  velocidad máxima de reacción cuando todos los centros activos están ocupados por el sustrato y  $K_{cat}$  o el número de recambio es el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por molécula de enzima y unidad de tiempo, en condiciones saturantes del sustrato.

**Figura 12. Estudio de la velocidad catalítica de la PPG en función de la concentración de guayacol.**

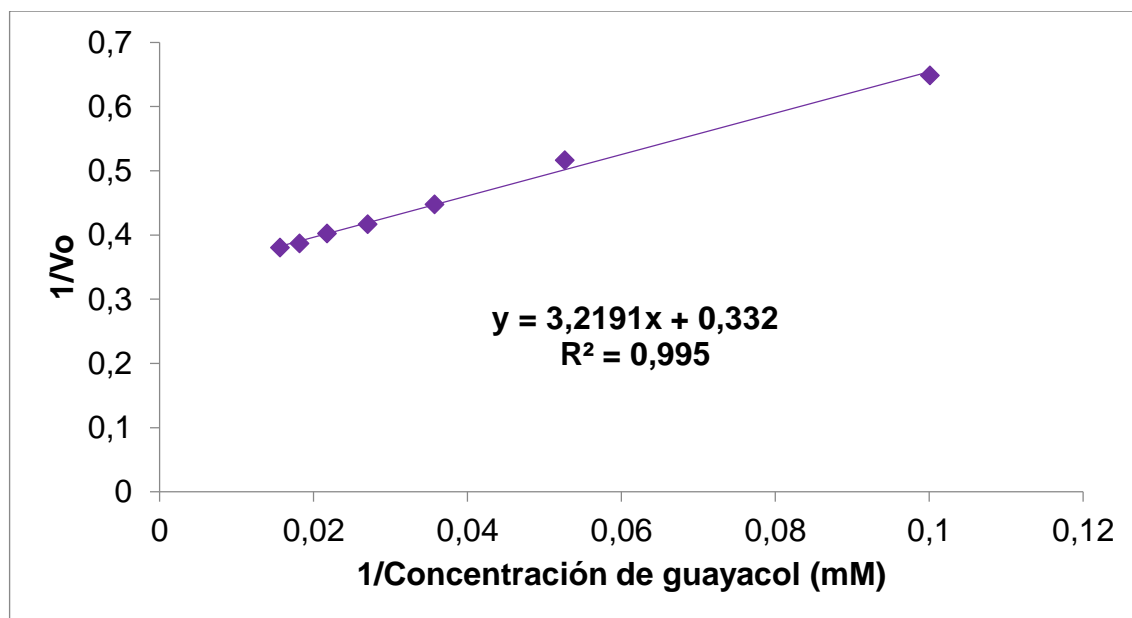


Figura 13. Estudio de la velocidad catalítica de la PPG en función de la concentración de o-dianisidina.

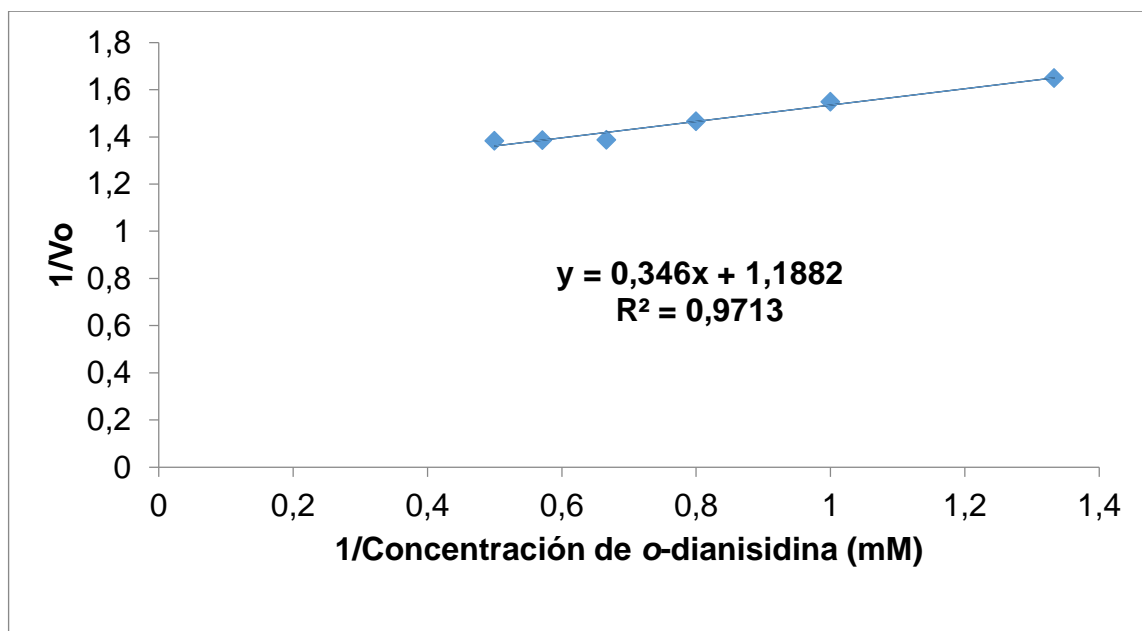
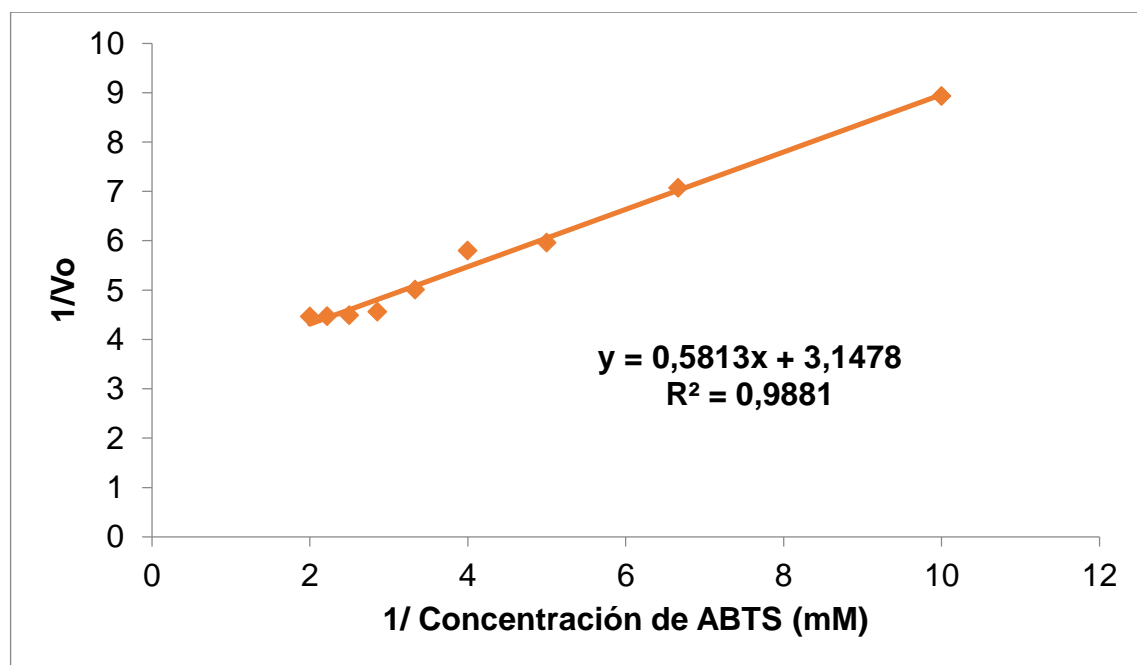


Figura 14. Estudio de la velocidad catalítica de la PPG en función de la concentración de ABTS.



La tabla 17 contiene los resultados de todas las constantes para cada sustrato, a partir de ellas se puede determinar que los sustratos más afines según su  $K_m$  a la PPG con valores de 0,29 mM y 0,18 mM son la *o*-dianisidina y el ABTS. En otros estudios se determinó que los valores de  $K_m$  usando *o*-dianisidina como sustrato fueron 0,56 mM y 0,40 mM para las peroxidasas de *Brassica oleracea* y callos de arroz, respectivamente (Mall y col. 2013), mientras el  $K_m$  empleando ABTS para la peroxidasa de tallos de lechuga fue de 3,75 mM (Hu y col. 2012).

El valor más alto de  $V_{max}$  fue 1800,03 U/mL.min usando guayacol como sustrato, entonces la PPG alcanza una mayor velocidad al tener todos sus sitios activos ocupados con guayacol, respecto a los demás sustratos. Esto lo hace el sustrato más adecuado para esta enzima. En otros estudios se determinó que las  $V_{max}$  de las peroxidasas de tallos de lechuga y hojas de *Citrus medica* usando guayacol como sustrato fue 10585 U/mL.min y 37000 U/mL.min (Hu y col. 2012; Mall y col. 2013). En este caso el valor de  $K_{cat}$  empleando *o*-dianisidina mostró una mayor conversión de producto por molécula de enzima en el tiempo. Entonces según el valor de  $V_{max}$  obtenido para el guayacol, se puede esperar que la PPG sea probablemente más activa frente a los fenoles que frente a las aminas.

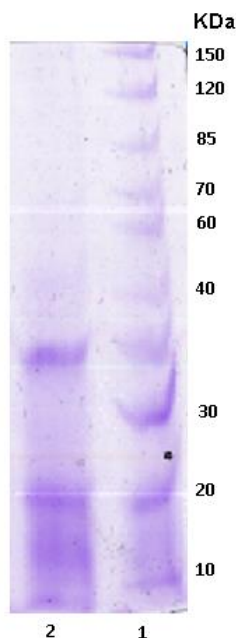
**Tabla 17. Constantes cinéticas de la PPG frente a todos los sustratos.**

| <b>Sustrato</b>             | <b><math>K_m</math> (mM)</b> | <b><math>V_{max}</math> (U/mL.min)</b> | <b><math>K_{cat}</math> (<math>min^{-1}</math>)</b> |
|-----------------------------|------------------------------|--|---|
| <b>Guayacol</b>             | 9,70                         | 1800,03                                | 185,57  |
| <b><i>o</i>-dianisidina</b> | 0,29                         | 502,95                                 | 1734,31   |
| <b>ABTS</b>                 | 0,18                         | 189,85                                 | 1054,72   |

#### 4.6 DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR POR ELECTROFORÉSIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Para realizar el procedimiento se usó una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) con la que se logró tener una idea del grado de pureza de la enzima y además establecer la masa molecular de la misma que en este caso fue de 35 KDa (figura 15), que se encuentra en el intervalo de masas moleculares típicas en peroxidases de plantas.

**Figura 15. SDS-PAGE al 8%. Carril 1: bandas de las proteínas del marcador de masas moleculares de Thermo scientific (26614), carril 2: peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*).**



Luego de semipurificar la enzima se halló el índice RZ (Reinheitszahl) para la PPG, este es una relación entre la banda de Soret (403 nm, banda de absorción de las hemoperoxidasas) y una banda de absorción de proteínas (280 nm), en el caso de la PPG se obtuvo un RZ de 1,08. Es ideal tener valores de RZ cercanos a 3, lo que indica un alto grado de pureza.

## 5. CONCLUSIONES

- ✓ Se logró extraer y purificar de manera parcial para la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*), este método constó de las etapas de: homogenización, extracción, centrifugación, eliminación de pigmentos, cromatografía de exclusión por tamaño sobre Sephadex G50 y ultrafiltración.
- ✓ El objetivo de semipurificar la peroxidasa de pasto guinea se cumplió ya que en cada fase del proceso se evidenció un aumento del factor de purificación y de la actividad específica. Finalmente se consiguió purificar 3,2 veces la PPG, con un rendimiento del 38,6% y una actividad específica de 408,9 U/mL.
- ✓ Se demostró que el pasto de hojas largas (>40 cm) y bajo condiciones de estrés oxidativo es el ideal para obtener una alta actividad enzimática durante la extracción de la enzima.
- ✓ El tiempo de extracción de 6 horas y la concentración de la solución buffer de fosfatos 30 mM fueron elegidas como las mejores condiciones para la extracción de la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*).
- ✓ Al estudiar la estabilidad de la PPG frente al pH se determinó que en un intervalo comprendido entre 7-12 esta conserva más del 80% de la actividad catalítica, siendo 8 el mejor pH.
- ✓ La peroxidasa de pasto guinea presentó una buena termoestabilidad de 40°C-66°C manteniendo más del 70% de actividad catalítica, luego se determinó que la constante de inactivación de la enzima a 66°C fue de 0,0081 min<sup>-1</sup>.

- ✓ En el estudio de la especificidad sustrática se hallaron las condiciones óptimas de concentración de buffer, concentración de  $H_2O_2$ , pH y concentración de sustrato para el guayacol, o-dianisidina y ABTS.
  
- ✓ Según las constantes cinéticas se determinó que el mejor sustrato para la PPG fue el guayacol con un  $V_{max}$  de 1800,03 U/mL.min, además la enzima mostró ser más afín a la o-dianisidina y ABTS con valores de  $K_m$  de 0,29 mM y 0,18 mM respectivamente.
  
- ✓ El peso molecular de la peroxidasa de pasto guinea fue de 35 KDa.

## 6. RECOMENDACIONES

- ✓ Es importante tener en cuenta la época del año para recoger el pasto para la extracción ya que la actividad peroxidasa se ve afectada por el clima, siendo los meses de invierno con los que se obtiene una mayor actividad catalítica.
- ✓ En el estudio de la especificidad sustrática es importante revisar la solubilidad de los sustratos en agua ya que cuando son poco solubles es necesario añadir pequeñas gotas de solventes orgánicos junto con agitación para su total disolución.
- ✓ El proceso de semipurificación de la PPG se puede complementar para generar protocolo de purificación total de la enzima.
- ✓ Para verificar el peso molecular de la PPG se sugiere realizar un estudio del peso molecular por MALDI.
- ✓ Hacer un estudio de los costos de extracción y semipurificación a nivel industrial sería útil para conocer la rentabilidad del proceso si se empleará para las diversas aplicaciones biotecnológicas de las peroxidases.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-senaïdy, M., & Ismael, M. (2011). Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera L.*). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 293–298.

Albertsson, P. A. (1986). *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. (Wiley, Ed.) (3rd ed.). New York.

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 and Bioelectronics*, 21(5), 742–748.

Balasubramanian, M., & Boopathy, R. (2013). Purification and characterization of peroxidases from liquid endosperm of *Cocos nucifera* (L.): Biotransformation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 33–42.

Barbosa, L. (2006). *Elaboración de agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real (Roystonea regia)*. Universidad Industrial de Santander.

Bravo, K ., Muñoz, K., Calderón, J., & Osorio, E. (2011). Desarrollo de un método para la extracción de polifenol oxidasa de uchuva (*physalis peruviana l.*) y aislamiento por sistemas bifásicos acuosos. *vitae, revista de la facultad de química farmacéutica*, 18, 124–132.

C.V., A. y aire S. A. de. (2013). Tecnología de filtración de membranas. Obtenido de <http://www.ultrafiltracion.com.mx/>

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.

Castillo, J., & Ariza, J. (2000). *Extracción y purificación de las peroxidasas de las hojas de palma de aceite (Elais guineensis) y palma real (Roystonea regia)*. Universidad Industrial de Santander.

Castillo, J. (2001). *Separación y caracterización de isoenzimas de la peroxidasa de palma real (Roystonea regia)*. Universidad Industrial de Santander.

Chanwun, T., Muhamad, N., Chirapongsatunkul, N., & Churngchow, N. (2013). *Hevea brasiliensis* cell suspension peroxidase: purification, characterization and application for dye decolorization. *AMB Express*, 3.

Chattopadhyaya, K., & Mazundar, S. (2000). Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH. *Biochemistry*, 39, 263–270.

Cheng G., Salerno, J., Cao, Z., Pagano, P., & Lambeth, J. (2008). Identification and characterization of VPO1, a new animal heme-containing peroxidase. *Free Radical Biology & Medicine*, 45, 1682–1694.

Chevallet, M., Luche, S., & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 1, 1852–1858.

CONABIO.COM.MX. (20 de diciembre de 2016.). *Panicum maximum*. Obtenido de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/poaceae/panicum-maximum/fichas/pagina1.htm>

Cooper, F. (1984). *Instrumentos y Técnicas de Bioquímica* (Editorial). Barcelona.

Davis, B. J. (1964). Disc electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121, 404–427.

Esnault, R., Buffard, D., Breda, C., & Van Huystee, L. B. (2015). Molecular cloning of complementary DNAs encoding two cationic peroxidases from cultivated peanut cells Molecular cloning of complementary DNAs encoding two cationic peroxidases from cultivated peanut cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 8874–8878.

Fry, S. C. (1979). Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth. *Planta*, 146, 343–351.

Frylink, L., Durbery, I., & Schabort, J. (1987). Biochemical changes involved in stress response and ripening behaviors of -irradiated mango fruit. *Phytochemistry*, 26, 681–686.

Gutiérrez-Bouzán, M. C. A. B. (2009). La cromatografía de exclusión: análisis de la distribución de pesos moleculares en siliconas por gpc. *Boletín iNTEXTER (U.P.C.)*, 33–40.

Halpin, B., Pressey, R., Jen, J., & Mondy, N. (1989). Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *Journal of Food Science*, 54, 644–649.

Hamid, M., & Rehman, K. (2009). Potential Applications of. *Food Chemistry*, 115(1), 1177–1186.

Hiner, N. P., Hernandez-Ruiz, J., Arnao, B. M., García-Cánovas, F., & Acosta, M. (1996). A 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.

Hu, Y., Wu, J., Luo, P., & Mo, Y. (2012). Purification and Partial characterization of peroxidase from lettuce stems. *African Journal of Biotechnology*, 11(11), 2752–2756.

Javeriana, U. (2003). Electroforésis. Obtenido de <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/electroforesis.html>

Jiang, T., & Y. Z. (2003). Horseadish peroxidase. In D. Whitaker, John. Voragen, Alphons y Wong (Ed.), *HANDBOOK OF FOOD ENZYMOLOGY* (pp. 404–412). New York: Marcel Dekker, Inc.

Kalin, R., Atasever, A., & Özdemir, H. (2014). The single-step purification of peroxidase by 4- aminobenzohydrazide from Turkish blackradish (*Raphanus sativus L.*) roots. *Food Chemistry*, 150, 335–340.

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, 71–74.

Kenkare, U., & H. C. (1996). Modeling of phase separation in PEG-Salt aqueous two phase systems. *Materials, Interfaces and Electrochemical Phenomena*, 42, 3508–3522.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

Lavery, C., MacInnis, M., MacDonald, M; Williams, J., Spencer, C., Burke, A., Irwin, D., & D'cunha, G. (2010). Purification of Peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) Roots. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 8471–8476.

Mall, R., Naik, G., Mina, U., & Mishra, S. (2013). Purification and characterization of a thermostable soluble peroxidase from *Citrus medica* leaf. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43, 137–151.

Manizales, U. de. (19 de diciembre de 2016). Determinación de actividad de peroxidasa y su regeneración. Obtenido de [http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmaceuticas/sc\\_hmidth02/parte08/02.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/sc_hmidth02/parte08/02.html)

Mueller, W. C., Beckman, & C. H. (1994). Ultrastructural localization of polyphenol oxidase and peroxidase in roots and hypocotyls of cotton seedlings. *Journal of Botany*, 56, 1579–1587.

Pandey, V., Singh, S., Singh, R., & Dwivedi, U. (2012). Purification and Characterization of Peroxidase from Papaya (*Carica papaya*) Fruit. *Applied Biochemistry and Biotechnology Biochem Biotechnol*, 167, 367–376.

Paul, AK., & Mukherji, S. (1972). Change in respiration rate of rice seedlings as affected by storage and viability and its possible relation with catalase and peroxidase activities during germination. *Biologia Plantarum*, 14, 414–419.

Perez, P., Hidalgo, N., Arellano, J., Gavilanes, F., Kostetskye, E., Zhadan, G., Villar, E., Roiga, M., Kennedy, J., Shnyrov, V. (2015). Purification and structural stability of white Spanish broom (*Cytisus multiflorus*) peroxidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 718–723.

Pina, G., Shnyrova, A., Gavilanes, F., Rodriguez, A., Lea, F., Roig, M., Sakharov, I., Zhadan, G; Villar, E., & Shnyrov, V. (2001). Thermally induced conformational changes in horseradish peroxidase. *European Journal of Biochemistry*, 268, 120–126.

Regalado, C., García, B., & Duarte, M. (2004). Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Reviews*, 3, 243–256.

Ricard, J., & Job, D. (1974). Reaction mechanism of indole-3- acetate degradation by peroxidase. A stopped flow and low-temperature spectroscopic study. *European Journal of Biochemistry*, 44, 359–374.

Rodríguez, N. (2011). Expresión y caracterización de una peroxidasa recombinante de nabo (*Brassica napus*) en un sistema bacteriano. Universidad autónoma de Querétaro.

Sakharov, I., Vesga, M. K., Galaev, I., Sakharova, I. y, & Pletjushina, O. (2001). Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: Purification and some properties. *Plant Science*, 161(5), 853–860.

Sakharov I., Castillo J., & A. J. (2000). Purification and stability of peroxidase of African oil palm *Elaies guineensis*. *Bioseparation*, 3, 125–132.

Sakharov, I; Bautista, G; Sakharova, I; Roja, A; & Yu, O. (1999). Peroxidasa de plantas tropicales. *Revista Colombiana de Química*, 28, 45–60. Obtenido de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/download/17382/18258::pdf>

Seymour, R., & Carraher, C. (1995). *Introducción a la química de los polímeros*. España: Reverté.

Somtürk, B., Kalin, R., & Özdemir, N. (2014). Purification of Peroxidase from Red Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by Affinity Chromatography. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173, 1815–1828.

Sonkar, S., Pachauri, M., Kumar, A., Shukla, A., Patel, M., & Jagannadham, M. (2015). Heme-peroxidase from medicinal plant *Artocarpus lakoocha*: Purification, characterization and wound healing studies. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 180–190.

Tesfay, E; Cook, B & Parker, M. (2014). A case study of evaluation, demonstration and adoption of improved forages for a cut-and-carry system in Eritrea. *Tropical Grasslands – Forrajes Tropicales*, 2, 145–146.

Vance, C. P., Kirk, T. K., & Sherwood, R. T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 18, 259–288.

Vargas, J. (2016). *Desarrollo de un biosensor amperométrico para la detección de peróxido de hidrógeno utilizando electrodos serigrafados de oro modificados con peroxidasa de palma real (Roystonea regia) y nanotubos de péptidos*. Universidad Industrial de Santander.

Vetal, M., & Rathod, V. (2015). Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (*Citrus sinenses*). *Food and Bioproducts Processing*, 94, 284–289.

Voet, D., & V. J. G. (2006). *Bioquímica - Donald Voet, Judith G. Voet*. (D. K. y M. V. P. Traducido por: Silvia Rondinone, Ed.) (3 ed). Buenos Aires: Médica Panamericana. Obtenido de [https://books.google.com.co/books?id=r5bedH\\_aST0C&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.co/books?id=r5bedH_aST0C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

Welinder, K. G., & Gajhede, M. (1993). Structure and evolution of peroxidase. In H. Welinder, KG; Rasmussen, SK; Penel, C y Greppin (Ed.), *Plant Peroxidase: Biochemistry and Physiology* (University, pp. 35–42). Geneva.

Welinder K, G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2, 388–393.

Woitovich, N., & Picó, P. (2013). A friendly method for *Raphanus sativus L* (wild radish) peroxidase purification by polyelectrolyte precipitation. *Separation and Purification Technology*, 119, 1–6.

Wright, H., & Nicell, J. (1999). Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technology*, 70, 69–79.

## BIBLIOGRAFÍA

AL-SENAIDY, M., & ISMAEL, M. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 293–298. 2011

ALBERTSSON, P. A. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. (Wiley, Ed.) (3rd ed.). New York. 1986

ALPEEVA, I.S., NICULESCU-NISTOR, M; LEON, J. C; CSÖREGI, E; & SAKHAROV, I. Y. Palm tree peroxidase-based biosensor with unique characteristics for hydrogen peroxide monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(5), 742–748. 2005

BALASUBRAMANIAN, M., & BOOPATHY, R. Purification and characterization of peroxidases from liquid endosperm of *Cocos nucifera* (L.): Biotransformation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 33–42. 2013

BARBOSA, L. *Elaboración de agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*)*. Universidad Industrial de Santander. 2006

BRAVO, K ., MUÑOZ, K., CALDERÓN, J., & OSORIO, E. Desarrollo de un método para la extracción de polifenol oxidasa de uchuva (*physalis peruviana* l.) y aislamiento por sistemas bifásicos acuosos. *vitae, revista de la facultad de química farmacéutica*, 18, 124–132. 2011

C.V., A. Y AIRE S. A. DE. *Tecnología de filtración de membranas*. [en línea] disponible en: <http://www.ultrafiltracion.com.mx/> 2013

CAI, F; OUYANG, C; DUAN, P; GAO, S; XU, Y; & CHEN, F. Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 77, 59– 66. 2012

CASTILLO, J., & ARIZA, J. Extracción y purificación de las peroxidasas de las hojas de palma de aceite (*Elais guineensis*) y palma real (*Roystonea regia*). Universidad Industrial de Santander. 2000

CASTILLO, J. Separación y caracterización de isoenzimas de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*). Universidad Industrial de Santander. 2001

CHANWUN, T., MUHAMAD, N., CHIRAPONGSATONKUL, N., & CHURNGCHOW, N. Hevea brasiliensis cell suspension peroxidase: purification, characterization and application for dye decolorization. *AMB Express*, 3. 2013

CHATTOPADHYA, K., & MAZUNDAR, S. Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH. *Biochemistry*, 39, 263–270. 2000

CHENG G., SALERNO, J., CAO, Z., PAGANO, P., & LAMBETH, J. Identification and characterization of VPO1, a new animal heme-containing peroxidase. *Free Radical Biology & Medicine*, 45, 1682–1694. 2008

CHEVALLET, M., LUCHE, S., & RABILLOUD, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 1, 1852–1858. 2006

CONABIO. *Panicum maximum*. 20 de diciembre de 2016 [en línea] disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/poaceae/panicum-maximum/fichas/pagina1.htm>

- COOPER, F. Instrumentos y Técnicas de Bioquímica (Editorial). Barcelona. 1984
- DAVIS, B. J. Disc electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121, 404–427. 1964
- ESNAULT, R., BUFFARD, D., BRENDA, C., & VAN HUYSTEE, L. B. Molecular cloning of complementary DNAs encoding two cationic peroxidases from cultivated peanut cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 8874–8878. 2015
- FRY, S. C. Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth. *Planta*, 146, 343–351. 1979
- FRYLINK, L., DURBERY, I., & SCHABORT, J. Biochemical changes involved in stress response and ripening behaviors of -irradiated mango fruit. *Phytochemistry*, 26, 681–686. 1987
- GUTIÉRREZ-BOUZÁN, M. C. A. B. La cromatografía de exclusión: análisis de la distribución de pesos moleculares en siliconas por gpc. *Boletín iNTEXTER (U.P.C.)*, 33–40. 2009
- HALPIN, B., PRESSEY, R., JEN, J., & MONDY, N. Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *Journal of Food Science*, 54, 644–649. 1989
- HAMID, M., & REHMAN, K. Potential Applications of. *Food Chemistry*, 115(1), 1177–1186. 2009

HINER, N. P., HERNANDEZ-RUIZ, J., ARNAO, B. M., GARCÍA-CÁNOVAS, F., & ACOSTA, M. A 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. 1996

HU, Y., WU, J., LUO, P., & MO, Y. Purification and Partial characterization of peroxidase from lettuce stems. *African Journal of Biotechnology*, 11(11), 2752–2756. 2012

JAVERIANA, U. Electroforésis. [en línea] disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/electroforesis.html>

JIANG, T., & Y. Z. Horseadish peroxidase. In D. Whitaker, John. Voragen, Alphons y Wong (Ed.), *HANDBOOK OF FOOD ENZYMOLOGY* (pp. 404–412). New York: Marcel Dekker, Inc. 2003

KALIN, R., ATASEVER, A., & ÖZDEMİR, H. The single-step purification of peroxidase by 4- aminobenzohydrazide from Turkish blackradish (*Raphanus sativus* L.) roots. *Food Chemistry*, 150, 335–340. 2014

KAUFFMANN, C., PETERSEN, B.R., & BJERRUM, M. J. Enzymatic removal of phenols from aqueous solutions by *Coprinus cinereus* peroxidase and hydrogen peroxide. *Journal of Biotechnology*, 73, 71–74. 1999

KENKARE, U., & H. C. Modeling of phase separation in PEG-Salt aqueous two phase systems. *Materials, Interfaces and Electrochemical Phenomena*, 42, 3508–3522. 1996

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685. 1970

LIVERY, C., MACINNIS, M., MACDONALD, M; WILLIAMS, J., SPENCER, C., BURKE, A., IRWIN, D., & D’CUNHA, G. Purification of Peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) Roots. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 8471–8476. 2010

MALL, R., NAIK, G., MINA, U., & MISHRA, S. Purification and characterization of a thermostable soluble peroxidase from *Citrus medica* leaf. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43, 137–151. 2013

MANIZALES, U. DE. Determinación de actividad de peroxidasa y su regeneración. 19 de diciembre de 2016 [en línea] disponible en: [http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmaceuticas/sc\\_hmidth02/parte08/02.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/sc_hmidth02/parte08/02.html)

MUELLER, W. C., BECKMAN, & C. H. Ultrastructural localization of polyphenol oxidase and peroxidase in roots and hypocotyls of cotton seedlings. *Journal of Botany*, 56, 1579–1587. 1994

PANDEY, V., SINGH, S., SINGH, R., & DWIVEDI, U. Purification and Characterization of Peroxidase from Papaya (*Carica papaya*) Fruit. *Applied Biochemistry and Biotechnology Biochem Biotechnol*, 167, 367–376. 2012

PAUL, AK., & MUKHERJI, S. Change in respiration rate of rice seedlings as affected by storage and viability and its possible relation with catalase and peroxidase activities during germination. *Biologia Plantarum*, 14, 414–419. 1972

PEREZ, P., HIDALGO, N., ARELLANO, J., GAVILANES, F., KOSTETSKYE, E., ZHADAN, G., VILLAR, E., ROIGA, M., KENNEDY, J., SHNYROV, V. Purification and structural stability of white Spanish broom (*Cytisus multiflorus*) peroxidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 718–723. 2015

PINA, G., SHNYROVA, A., GAVILANES, F., RODRIGUEZ, A., LEA, F., ROIG, M., SAKHAROV, I., ZHADAN, G; VILLAR, E., & SHNYROV, V. Thermally induced conformational changes in horseradish peroxidase. *European Journal of Biochemistry*, 268, 120–126. 2001

REGALADO, C., GARCÍA, B., & DUARTE, M. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Reviews*, 3, 243–256. 2004

RICARD, J., & JOB, D. Reaction mechanism of indole-3- acetate degradation by peroxidase. A stopped flow and low-temperature spectroscopic study. *European Journal of Biochemistry*, 44, 359–374. 1974

RODRÍGUEZ, N. Expresión y caracterización de una peroxidasa recombinante de nabo (*Brassica napus*) en un sistema bacteriano. Universidad autónoma de Querétaro. 2011

SAKHAROV, I., VESGA, M. K., GALAEV, I., SAKHAROVA, I. Y, & PLETJUSHINA, O. Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: Purification and some properties. *Plant Science*, 161(5), 853–860. 2001

SAKHAROV I., CASTILLO J., & A. J. Purification and stability of peroxidase of African oil palm *Elaies guineensis*. *Bioseparation*, 3, 125–132. 2000

SAKHAROV, I; BAUTISTA, G; SAKHAROVA, I; ROJA, A; & YU, O. (). Peroxidasa de plantas tropicales. *Revista Colombiana de Química*, 28, 45–60. 1999 [en línea]

disponible en:  
<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/download/17382/18258>::  
pdf

SEYMOUR, R., & CARRAHER, C. Introducción a la química de los polímeros. España: Reverté. 1995

SOMTÜRK, B., KALIN, R., & ÖZDEMİR, N. Purification of Peroxidase from Red Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by Affinity Chromatography. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173, 1815–1828. 2014

SONKAR, S., PACHAURI, M., KUMAR, A., SHUKLA, A., PATEL, M., & JAGANNADHAM, M. Heme-peroxidase from medicina lplant *Artocarpus lakoocha*: Purification, characterization and wound healing studies. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 180–190. 2015

TESFAY, E; COOK, B & PARKER, M. A case study of evaluation, demonstration and adoption of improved forages for a cut-and-carry system in Eritrea. *Tropical Grasslands – Forrajes Tropicales*, 2, 145–146. 2014

VANCE, C. P., KIRK, T. K., & SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 18, 259–288. 1980

VARGAS, J. Desarrollo de un biosensor amperométrico para la detección de peróxido de hidrógeno utilizando electrodos serigrafiados de oro modificados con peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) y nanotubos de péptidos. Universidad Industrial de Santander. 2016

VETAL, M., & RATHOD, V. Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (*Citrus sinenses*). *Food and Bioproducts Processing*, 94, 284–289. 2015

VOET, D., & V. J. G. *Bioquímica* - Donald Voet, Judith G. Voet. (D. K. y M. V. P. Traducido por: Silvia Rondinone, Ed.) (3 ed). Buenos Aires: Médica Panamericana. 2006 [en línea] disponible en: [https://books.google.com.co/books?id=r5bedH\\_aST0C&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.co/books?id=r5bedH_aST0C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

WELINDER, K. G., & GAJHEDE, M. Structure and evolution of peroxidase. In H. Welinder, KG; Rasmussen, SK; Penel, C y Greppin (Ed.), *Plant Peroxidase: Biochemistry and Physiology* (University, pp. 35–42). Geneva. 1993

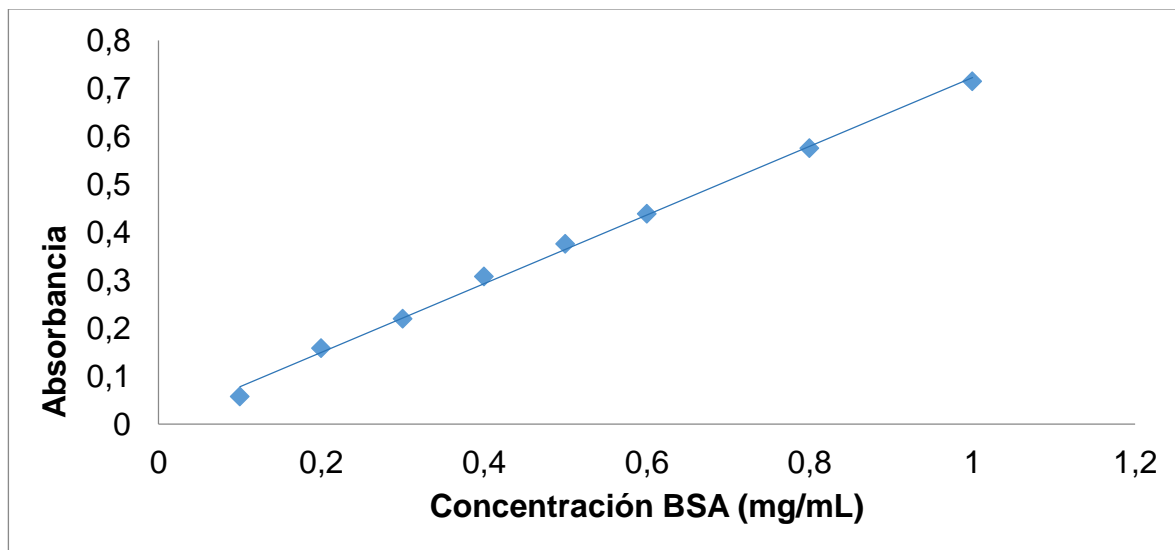
WELINDER K, G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2, 388–393. 1992

WOITOVICH, N., & PICÓ, P. A friendly method for *Raphanus sativus* L (wild radish) peroxidase purification by polyelectrolyte precipitation. *Separation and Purification Technology*, 119, 1–6. 2013

WRIGHT, H., & NICELL, J. Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technology*, 70, 69–79. 1999

## ANEXOS

### ANEXO A. CURVA DE CALIBRACIÓN DE BRADFORD



$$Absorbancia = 0.7154 \left( Concentración \frac{mg}{mL} \right) + 0.0066$$

$$R^2 = 0.9972$$

## ANEXO B. CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA PPG SOLUBLE

La actividad específica de la peroxidasa soluble se determinó de la siguiente manera

$$\text{actividad específica} \left( \frac{U}{mg} \right) = m * \frac{10^6}{\epsilon_{\text{producto}}} * \frac{V_t}{V_m} * \frac{d}{C_{\text{proteína}}}$$

Donde:

|                       |  |
|-----------------------|--|
| m                     | Pendiente (mol/L*min)  |
| $\epsilon$            | Coeficiente de extinción molar de guayacol, 5200 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>  |
| $V_t$                 | Volumen total de reacción (mL)   |
| $V_m$                 | Volumen de extracto enzimático (mL)  |
| d                     | factor de dilución de la solución enzimática   |
| $C_{\text{proteína}}$ | Concentración de proteína en la solución enzimática  |
| U                     | Se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 $\mu$ mol de guayacol por minuto bajo condiciones de pH 8 y temperatura de 25 °C |