

Comparación de patrones electroforéticos de Peroxidasas de raíz de *Brassica napus*, *Raphanus sativus* y frutos de *Sechium edule* y *Cucumis sativus*

Comparison of electrophoretic patterns of peroxidases from roots of *Brassica napus*, *Raphanus sativus*, and fruits of *Sechin edule* and *Cucumis sativus*

Walter Santiago Moya-Fernández¹

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se estudió, los extractos pre-purificados de peroxidasa (POD) de: *Brassica napus*, "nabo", *Raphanus sativus* "rabanito", *Sechium edule* "caigua china" y *Cucumis sativus* "pepinillo". Se encontró que la actividad de POD 128 U/g; 272 U/g; 27.20 U/g; y 12.40 U/g respectivamente. Se realizó la extracción de la Peroxidasas, las raíces de nabo y rabanito y frutos de caigua china y pepinillo, previamente seleccionados y analizados el mismo día de su recolección. El extracto crudo se obtuvo por extracción directa de 250 g de cada uno de los vegetales en mención en un licuestrator (Oster), se filtró 2 ó 3 veces al vacío con papel whatman de poro decreciente y finalmente se centrifugó por 10 minutos a 3500 rpm. Luego, el sobrenadante obtenido fue diluido con igual volumen de buffer fosfato 20 mM pH 6.0 y se conservó en congelación. La medición de la actividad de peroxidasa se llevó a cabo en espectrofotómetro a temperatura ambiente (25°C) utilizando 50 uL de la solución de enzima en 4 mL de buffer fosfato 10 mM de pH 6,0 conteniendo guayacol en (2mM) y H₂O₂ (4,4 mM) como sustratos. Se midió los cambios de absorbancia debidos a la oxidación de guayacol por la POD por 2 minutos. En el enzimograma se corrió el extracto crudo de POD + SDS, se observa en nabo 4 bandas, en pepinillo 3 bandas, en rabanito 7 bandas y en caigua 1 banda; en el enzimograma cuando se corrió solamente el extracto crudo de POD, se observa también 4 bandas para nabo, 4 para pepinillo y 6 bandas para rabanito y 5 bandas para caigua. Se observa también la presencia bandas claras y bandas intensas, todas ellas en el rango de peso molecular bajo entre 80,660 y mayor igual a 103,035 Daltons y otras entre 28,829 y 36,545 Daltons (Prestained SDS-PAGE standards, BIO_RAD).

Palabras claves: extracto de peroxidasa, nabo, rabanito, caigua y pepinillo

¹ Biólogo- Microbiólogo- Universidad Privada Antenor Orrego

ABSTRACT

The pre-purified peroxidase (POD) extracts of: *Brassica napus*, "turnip", *Raphanus sativus* "rabanito", *Sechium edule* "caigua china" and *Cucumis sativus* "gherkin" were studied. It was found that POD activity 128 U / g; 272 U / g; 27.20 U / g; and 12.40 U / g respectively. The extraction of peroxidases, roots of turnip and radish and fruits of Chinese cañon and gherkin, previously selected and analyzed on the same day of collection, was carried out. The crude extract was obtained by direct extraction of 250 g of each of the aforementioned vegetables in a liquefier (Oster), filtered 2 or 3 times under vacuum with decreasing pore whatman paper and finally centrifuged for 10 minutes at 3500 rpm. Then, the obtained supernatant was diluted with an equal volume of 20 mM phosphate buffer pH 6.0 and kept in freezing. The measurement of peroxidase activity was carried out in a spectrophotometer at room temperature (25°C) using 50 μ L of the enzyme solution in 4 mL of 10 mM phosphate buffer pH 6.0 containing guaiacol in (2mM) and H₂O₂ (4,4 mM) as substrates. The absorbance changes due to the oxidation of guaiacol by the POD for 2 minutes were measured. In the enzymogram, the crude POD + SDS extract was run, 4 bands are observed in turnip, 3 bands in gherkin, 7 bands in radish and 1 band in caigua; In the enzyme diagram when only the raw POD extract was run, 4 bands are also observed for turnip, 4 for pickle and 6 bands for radish and 5 bands for caigua. The presence of clear bands and intense bands is also observed, all of them in the low molecular weight range between 80,660 and greater equal to 103,035 Daltons and others between 28,829 and 36,545 Daltons (Prestained SDS-PAGE standards, BIO_RAD).

Key words: tres (03) o cuatro (04) palabras

INTRODUCCIÓN

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son un grupo de enzimas, ampliamente distribuidas en los organismos animales y vegetales, que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el peróxido de hidrógeno o un hidroperóxido orgánico como molécula aceptora de electrones. Las reacciones en las que están implicadas las peroxidasas son bisustrato y siguen un mecanismo ping-pong. Todas ellas se caracterizan por tener como grupo prostético un grupo hemo tipo b (*protoporfirina IX*), con Fe(III) pentacoordinado, que constituye el centro activo de la enzima. Estas enzimas se clasifican en peroxidasas de mamíferos, peroxidasas catalasas y superfamilia de peroxidasas de plantas. Se ha hecho una clasificación interna diferenciando en la superfamilia de peroxidasas de plantas tres clases, en función de sus diferentes elementos estructurales. La clase I, compuesta por peroxidasas intracelulares de origen procariótico

como la ascorbato peroxidasa (APX) y la citocromo c peroxidasa (CcP); la clase II, compuesta por peroxidasas intracelulares de origen fúngico como la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (MnP) y la clase III, compuesta por peroxidasas secretadas por plantas superiores como la peroxidasas de rábano picante (HRP), de cebada (BP), de cacahuete (PNP), de hojas de palma africana (AOPTP), de hojas de palma real (RPTP) y de semillas de soja (SBP), entre otras¹.

Las peroxidasas se dividen en tres grandes superfamilias:

- **Superfamilia de peroxidasas animales:** Han sido caracterizadas estructuralmente la mieloperoxidasa², la eosinófilo peroxidasa³ y la prostaglandina sintetasa H₂^{4,5}, entre otras. Todas ellas son enzimas formadas por varias subunidades, iguales o no.

- **Superfamilia de catalasas:** Se engloban dentro de las peroxididasas ya que poseen un grupo hemo e intervienen en la misma reacción catalítica. Todas ellas son enzimas tetraméricas, condición necesaria para que sean funcionales. Se ha caracterizado estructuralmente la catalasa de hígado de buey6, entre otras.
- **Superfamilia de peroxididasas de plantas:** Se divide en tres grandes grupos¹. Esta clasificación, divide las peroxididasas en función de diferentes características estructurales (Tabla I). Normalmente las peroxididasas presentan una estructura secundaria mayoritaria de α -hélices, separadas por fragmentos de longitud variable. Dentro de esta estructura se ha observado que en todas las peroxididasas de plantas conocidas hasta el momento hay 9 residuos invariables y 22 casi invariables. Si usamos la numeración del citocromo c peroxidasa de levadura (CcP), estos residuos son los siguientes: Arg48 e His52 en la hélice B, y Asn82, los tres están en la cavidad distal del grupo hemo. Val169 e His175 en la hélice F, y Asp235, están en la cavidad proximal. Asp106 de la hélice D. Gly129 y Arg130 forman un puente salino. His175 es el quinto ligando del hierro hémico y está unido mediante un enlace de hidrógeno al Asp235.

Peroxidasas secretadas por plantas. Dentro de este grupo, la enzima más ampliamente estudiada es la isoenzima c de la peroxidasa de rábano (cHRP), pero también se han estudiado enzimas de otras especies vegetales tales como tomate, cebada, trigo, tabaco, nabo, cacahuete, y diferentes especies de palmeras. Estructuralmente estas enzimas poseen dos iones Ca^{2+} , una señal peptídica en el extremo N-terminal para la secreción, cuatro puentes disulfuro conservados, en sitios distintos a los que aparecen en las peroxididasas de clase II, un conjunto de hélices extra que juegan un papel muy importante en el acceso al centro activo y un grado de glicosilación comprendido entre el 0 y el 25%. Algunas de ellas tienen un propéptido en el extremo C-terminal que las dirige hacia las vacuolas.

La peroxidasa de cacahuete (PNP) presenta dos isoenzimas, una aniónica (aPrx) y otra catiónica (cPrx). Ésta presenta un 15% de glicosilación, un grupo hemo por molécula de enzima y dos iones Ca^{2+} . Presenta un máximo en el espectro UV-Visible a 405 nm (banda Soret) con un ϵ_{405} de 112 mM⁻¹ cm⁻¹. La aPrx posee dos cadenas de glicanos de longitud variable, en cambio la cPrx tiene cuatro cadenas. Estructuralmente estas peroxididasas de clase III tienen una serie de hélices extra que no aparecen en las peroxididasas de otras clases. En el

caso concreto de la cPrx, la hélice B' desaparece, en cambio, aparecen tres nuevas hélices de pequeño tamaño adicionales, D', situada entre D y E, además de F' y F'', situadas entre F y G. Los sitios de unión de los átomos metálicos varían de unas peroxididasas a otras. Los residuos del sitio distal están bastante conservados y son His42, Arg38, Phe41 y Asn70. La His169 es el ligando proximal en la cPrx.

Las peroxididasas de clase II y III son glicoproteínas que poseen un porcentaje de glicosilación que oscila entre el 0-5 y 0-25%, respectivamente. Los glicanos son importantes para el mantenimiento de la actividad y estabilidad proteica. Los glicanos aumentan la hidrofobicidad, la cual influye directamente sobre la actividad proteica, protegiendo, también, a la proteína de la proteólisis con tripsina.

Los glicanos están formados por 5 azúcares distintos, N-acetilglucosamina (GlcNAc), xilosa (Xyl), manosa (Man), fucosa (Fuc) y galactosa (Gal), teniendo una longitud de entre 7 y 14 azúcares, con una masa media de 176 Da por azúcar. Las cadenas glucídicas se unen a residuos de Asn. Cada peroxidasa tiene un porcentaje de glicosilación diferente, la HRP tiene 7 glicanos, la SBP, 5, y las isoenzimas cPrx y aPrx, 3 (N-60, N-144 y N-185) y 1, respectivamente⁷.

Los glicanos están situados en giros α de la proteína. El glicano más abundante y típico en glicoproteínas de plantas es Man α 3 (Man α 6) (Xyl β 2)Man β 4GlcNAc β 4(Fuc α 3)GlcNAc-. Las glicoproteínas se sintetizan en el retículo endoplasmático, se procesan en el aparato de Golgi y son secretadas por el mismo camino que otras glicoproteínas, normalmente son proteínas de membrana, o van a parar a la pared celular o el espacio extracelular.

Debido a que en el Perú, se cuenta con una rica variedad en vegetación, esto nos permite tener una amplia fuente de productos naturales de los cuales se pueden aislar, purificar y caracterizar, mediante distintas técnicas, a las POD obtenidas de fuentes naturales peruanas poco explotadas industrialmente como el nabo, rabanito, caygua, pepinillo, etc., y probar su posible utilidad en los distintos procesos donde la POD de *Horseradish* es utilizada, para tratar de sustituirla, ya que esta POD es una enzima con alto costo comercial debido a su importación.

El contenido de POD en las diferentes partes de una planta varía de acuerdo a su localización, frecuentemente son mayores en las raíces. Hay

también variación dependiendo de la estación del año y crecimiento de planta. A menudo, la actividad de POD es relativamente baja en frutos y jugos de frutos, particularmente cuando el pH de los líquidos de los tejidos es bajo⁸.

Brassica napus L. es una hortaliza muy común en nuestro medio y según referencia de otros países⁹ contiene una apreciable concentración de POD, lo que nos permitirá considerar la posibilidad de usarla como una fuente potencial de esta enzima. Así, se ha encontrado que el extracto crudo de nabo presenta una elevada actividad de POD (9,60 U/mg) comparativamente con otras fuentes vegetales, por lo cual parece ser una fuente alternativa para la obtención de esta enzima^{10,11}.

Raphanus sativus (rabanito o rábano común) es una hortaliza, cuya raíz es carnosa, jugosa y de sabor picante que se consume cruda o cocida⁹; presenta 4 fracciones activas de POD (por cromatografía de exclusión molecular), siendo la cuarta la más importante ya que presenta una actividad total de 22 316,43 U con una actividad específica de 8 389,64 U/mg¹².

Sechium edule (caygua chilena, compacta) es una enredadera se cultiva con fines de consumo como hortaliza (fruto) y es un apoyo económico para las familias al comercializarlo en los mercados regionales⁹. Se ha extraído de este fruto 5 fracciones de POD (cromatografía de intercambio catiónico con régimen de elución de gradiente lineal de concentración a pH 4.5), siendo la fracción 4 (F2P) la más importante ya que presenta una actividad total de 7225,02 U/L y una actividad específica de 5.90 U/mg¹³.

Respecto a *Cucumis sativus* (pepinillo, pepino de castilla) una especie que tiene frutos comestibles en ensaladas o en encurtidos, es de suma importancia en la alimentación por su riqueza en vitaminas A, B1, B2, B5, C y sales minerales como potasio, fósforo, calcio, sodio, cloro, hierro y magnesio⁹. No se encontró información sobre el potencial de POD, por lo que su estudio en este trabajo es de mucha importancia.

Al conocer la versatilidad de las POD y su elevada estabilidad térmica, química, y frente a los cambios de pH, se empezaron a estudiar otras POD procedentes de distintas fuentes vegetales, y al día de hoy el espectro de conocimiento de estas enzimas se ha ampliado mucho. Por otro lado, algunas de estas fuentes vegetales estudiadas presentan ningún interés, pues no mejoran las características de la POD de rábano, pero otras, en

cambio, abren un campo de estudio y de aplicación biotecnológica muy interesante, como son, las peroxidasas de nabo o de las que se puedan encontrar en estas fuentes vegetales en estudio.

Las peroxidasas son un grupo enzimático ampliamente distribuido en los reinos animal y vegetal. A lo largo del siglo XX muchos han sido los grupos de investigación que han caracterizado bioquímicamente nuevas peroxidasas procedentes de diferentes fuentes, en su mayor parte, vegetales: cacahuete, tabaco, rábano, maíz, soja, tomate, cebada, arroz, nabo, alcachofa y algunas especies ornamentales como los geranios, entre otras especies. Sus estudios se han basado en purificar estas enzimas y hacer estudios de estabilidad frente al pH, la temperatura y diferentes agentes químicos desnaturizantes. En la década de los 90, el grupo de I. Se ha aislado y estudiado peroxidasas de especies tropicales (palmas)¹⁴, cuando se ha conocido su elevada estabilidad. Así, estudios de estabilidad de este tipo de peroxidasas (rábano picante, palma africana, peroxidasa aniónica de cacahuete, palma real y palma), se observó que son enzimas termoestables, que poseen un intervalo de pH muy amplio en el que son activas y que además poseen una elevadísima actividad en diferentes situaciones. El interés que aporta esta elevada estabilidad es que para muchas aplicaciones biotecnológicas se requieren de PH bajos para que los procesos sean óptimos para el medio ambiente. Por ello, se ha realizado el presente estudio a pH 6.0, pH al que la enzima retiene el 100% de su actividad y su estructura nativa intacta.

El objetivo del presente trabajo fue comparar los patrones electroforéticos de peroxidasas de diferentes fuentes vegetales

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio fue de tipo experimental. La población de estudio estuvo constituida por las raíces de *Brassica napus* "nabo", *Raphanus sativus* "rabanito o rábano común" y frutos de *Sechium edule* "caygua chilena" y *Cucumis sativus* "pepinillo".

El tamaño promedio elegidos para éstos productos vegetales, fue los que corresponden a su estado fresco. Se cuidó que no presenten manchas oscuras en la piel y que su aspecto no fuera maduro o deshidratado y que no presenten signos de maltrato o períodos largos de almacenamiento. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de botánica sistemática para su identificación respectiva.

2.1. PROCEDIMIENTO

2.1.1. Extracción de la Peroxidasa

Las raíces de nabo y rabanito y frutos de caigua china y pepinillo, previamente seleccionados, todas ellas frescas, fueron analizados el mismo día de su recolección, previamente lavadas con agua destilada para remover cualquier suciedad y materiales extraños y fueron conservados en refrigeración.

El extracto crudo se obtuvo por extracción directa de 250 g de nabo en un licuestrator (Oster), se filtró 2 ó 3 veces al vacío con papel whatman de poro decreciente y finalmente se centrifugó por 10 minutos a 3500 rpm. Luego, el sobrenadante obtenido fue diluido con igual volumen de buffer fosfato 20 mM pH 6.0 y se conservó a 0°C.

2.1.2. Medición de la actividad de peroxidasa

Se llevó a cabo en espectrofotómetro a temperatura ambiente (25°C) según el siguiente procedimiento¹⁵. La solución de enzima (50 µL) fue adicionada a 4 mL de buffer fosfato 10 mM de pH 6,0 conteniendo guayacol (20mM) y H₂O₂ (4,4 mM) como sustratos. Se midió los cambios de absorbancia debidos a la oxidación de guayacol por la POD por 2 minutos. La determinación se realizó por triplicado.

Una unidad enzimática (UE) para POD fue definida como el incremento de una unidad de cambio de absorbancia/minuto bajo condiciones estándares.

2.2.3. Determinación de proteínas¹⁶

Se realizó según el método de Bradford (1976) el cual consiste en determinar la concentración de proteínas solubles, por la adición del colorante de Coomassie ácido a la solución de proteínas y la subsecuente medición a 595 nm en espectrofotómetro, utilizando suero de albúmina bovino (BSA) como patrón.

2.2.4 Análisis electroforético de peroxidasas en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio -PAGE-SDS^{8, 18-19}

PAGE y SDS-PAGE se llevó a cabo en geles verticales de poliacrilamida de 1mm de espesor, empleando cubetas "Mini Protean II" de Biorad. Cada gel estuvo formado por una fase inferior (gel de separación) y una superior (gel de concentración) con la siguiente composición:

Gel de separación (acrilamida 11,5% y bisacrilamida 0,32%): 2,5 mL de Tris-Hcl 1,5 M, pH 8,8; 4 mL de una solución de acrilamida 29%-bisacrilamida 0,8%, 50 µL de persulfato

amónico 10%, 5 µL de TEMED y agua hasta un volumen final de 10 mL.

Gel de concentración (acrilamida 1,9% y bisacrilamida 0,05%): 2,5 mL de Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 1,3 mL de la solución acrilamida 29%-bisacrilamida 0,8%, 50 µL de persulfato amónico, 10 µL de TEMED y agua hasta un volumen final de 10 mL.

Para PAGE las muestras fueron diluidas (1:4) en tampón de muestra, el estuvo compuesto por Tris-Hcl 62,5mM, pH 6,8; azul de bromofenol 0,025% y glicerol 8,7%. El tampón de electroforesis se preparó mezclando 3 g de Tris-base con 14,4 g de glicina en agua hasta un volumen final de 1L. Para SDS-PAGE los geles y el tampón de electroforesis se prepararon con SDS 0,1%, y las muestras se hirvieron 5 minutos en tampón de muestra con SDS 2% y β-mercaptoetanol 5% antes de ser cargadas en el gel.

El potencial aplicado para correr las muestras fue de 25 V hasta su entrada en el gel de concentración, y de 100 a 125 V durante el proceso de separación.

Finalizada la electroforesis, el gel fue teñido en una solución compuesta por: azul de Coomassie R-250 0,2%, metanol 40% y ácido acético 10%. Por último fue decolorado con una solución de metanol-ácido acético-agua (30:10:60).

Para la determinación del peso molecular mediante 5-PAGE se utilizó patrones de alto (45-200 kDa) y bajo peso molecular (14.4 - 97.4 kDa) de Biorad.

La *electroforesis aniónica*²⁰ se efectuó a 4°C e intensidad constante (2 mA/pocillo) durante 150 minutos. Mientras que la *electroforesis catiónica*²¹, se realizó utilizando como tampón de corrido ácido acético/b-alanina 0,01 M (pH 4,5). La electroforesis se desarrolló a intensidad constante usando 3 mA/pocillo durante aproximadamente 120 minutos.

Posteriormente, ambos geles fueron coloreados con una solución compuesta por bencidina 3,8 mM (en solución alcohólica al 50 %) y H₂O₂ 21 mM en tampón acetato de sodio/ácido acético 0,5 M (pH 4,6) a temperatura ambiente, hasta aparición de bandas azules. Seguidamente éstos fueron lavados varias veces con agua destilada, vislumbrándose las bandas que se tornarán de color marrón²²⁻²³.

Análisis estadístico

Como criterio de evaluación, se utilizó una estadística descriptiva en base a los resultados de los patrones electroforéticos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1, se observa la determinación de la actividad enzimática de POD de las diferentes fuentes de hortalizas, se encontró una mayor actividad en el extracto crudo de *Raphanus sativus* "rabanito" (272,00 U/g) y una menor actividad en *Cucumis sativus* "pepinillo" (12,40 U/g) respectivamente.

Tabla 1. Actividad de Peroxidasa (POD) de raíces o frutas de diferentes fuentes de hortalizas.

Fuentes	Actividad POD U/g (raíz o fruto)
<i>Brassica napus</i> "nabo"	128,00
<i>Raphanus sativus</i> "rabanito"	272,00
<i>Sechium edule</i> "caigua"	27,20
<i>Cucumis sativus</i> "pepinillo"	12,40

Se logró la pre-purificación de peroxidasa a partir de cuatro fuentes vegetales: *Brassica napus*, "nabo", *Raphanus sativus* "rabanito", *Sechium edule* "caigua china", *Cucumis sativus* "pepinillo".

Cabe resaltar que en el presente trabajo se realizó una pre-purificación, es indudable que un proceso de purificación más profundo, elevaría el contenido de enzima en la muestra si es que se toma en cuenta que el proceso de purificación también elimina contaminantes proteicos no enzimáticos y se eleva la concentración relativa de la POD. También se podría afirmar que la relación de proteína extraída/actividad de la POD puede variar, si se utiliza acetona dentro del proceso de extracción, debido a la reacción que ocurre entre el reactivo de Bradford y los polifenoles presentes en el material vegetal, esto implica la importancia de realizar tratamientos con acetona a fin de retirar estos compuestos fenólicos que interfieren en la determinación de proteínas²³.

En las figuras 1,2,3 y 4 se muestran los zimogramas y sus esquemas de los extractos crudos de Peroxidasa de las diferentes fuentes estudiadas, observándose un número de cinco bandas entre claras e intensas; las bandas del zimograma de peroxidasa en los extractos crudos de nabo y rabanito presentaron un color más intenso que no dejan observar a otras bandas junto a ellas. Se observó la presencia de isoenzimas de

bajo peso molecular. Los perfiles isoenzimáticos y el número de isoenzimas de peroxidasa son semejantes en peroxidasa de túberos (raíces) y en peroxidasa de frutos en las hortalizas estudiadas.

En el zimograma se corrió el extracto crudo de POD + SDS, se observa en nabo 4 bandas, en pepinillo 3 bandas, en rabanito 7 bandas y en caigua 1 banda; en el zimograma cuando se corrió solamente el extracto crudo de POD, se observa también 4 bandas para nabo, 4 para pepinillo y 6 bandas para rabanito y 5 bandas para caigua.

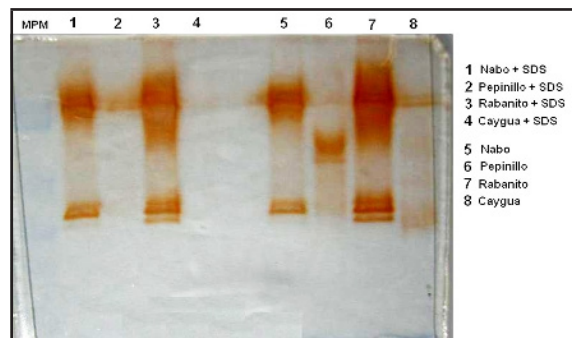


Figura 1: Patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida con (1-4) o sin (5-8) dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), en condiciones reductoras de POD en el extracto crudo de las diferentes fuentes estudiadas, indicando el número y posición de bandas electroforéticas.

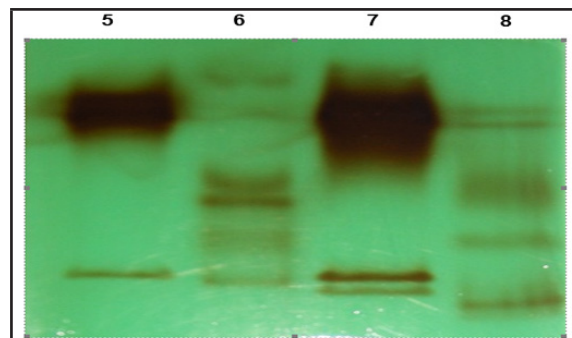


Figura 2: Patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida (5-8) o sin dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), en condiciones reductoras de POD en el extracto crudo de las diferentes fuentes estudiadas, indicando el número y posición de bandas electroforéticas.

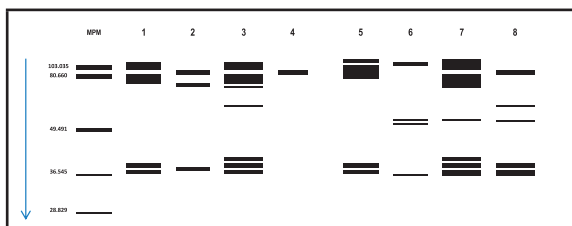


Figura 3: Esquemas de los patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida con (1-4) o sin (5-8) dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), en condiciones reductoras de POD en el extracto crudo de las diferentes fuentes estudiadas, indicando el número y posición de bandas electroforéticas. Proteínas standards: Fosfolipasa B 103,035 D; Albúmina bovina 80,660 D, Ovoalbúmina 49,491 D; Anhidrasa carbónica 36,545 e Inhibidor de Tripsina soya 28,829 Daltons.

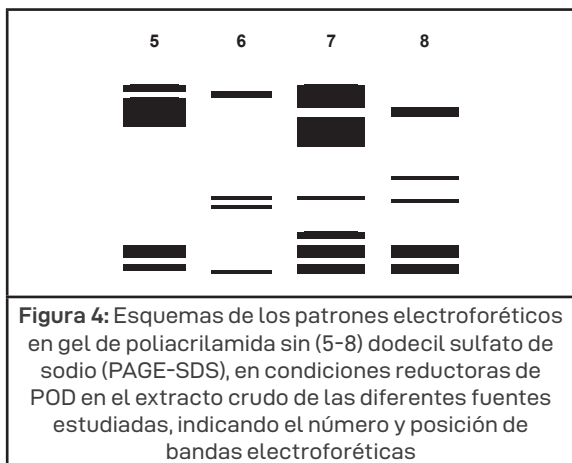


Figura 4: Esquemas de los patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida sin (5-8) dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), en condiciones reductoras de POD en el extracto crudo de las diferentes fuentes estudiadas, indicando el número y posición de bandas electroforéticas

Respecto a los resultados bioquímicos obtenidos del análisis de los sistemas enzimáticos de peroxidasas, revelaron variaciones en los patrones electroforéticos (Figuras 1 y 2). En el enzimograma donde se corrió el extracto crudo de POD + SDS, se observa en nabo 4 bandas, en pepinillo 3 bandas, en rabanito 7 bandas en caigua 1 banda. En el enzimograma donde se corrió solamente el extracto crudo de POD, se observa también 4 bandas para nabo, 4 para pepinillo y 6 bandas para rabanito y 5 bandas para caigua. Se observa también la presencia bandas claras y bandas intensas, todas ellas en el rango de peso molecular bajo entre 80,660 y mayor igual a 103,035 Daltons y otras entre 28,829 y 36,545 Daltons (Prestained SDS-PAGE standards, BIO_RAD).

Las bandas encontradas en el extracto crudo POD de nabo guarda relación con las que se reporta en Enzyme Database – BRENDA un número máximo de 5 isoenzimas, no reportándose isoenzimas para las peroxidasas de las otras fuentes vegetales utilizadas en el presente trabajo.

Las bandas que migran a la misma distancia indicarían que presentan homología en estructura y función molecular y una distancia de migración diferente necesariamente correspondería a otra estructura molecular de POD (isoenzimas).

Este trabajo constituye una primera aproximación al estudio de los patrones electroforéticos de diversas fuentes de POD, en el futuro, debería complementarse con aspectos moleculares de las isoenzimas.

CONCLUSIONES

- El extracto crudo de Peroxidasa de raíz de rabanito presenta mayor actividad que las otras fuentes vegetales estudiadas.
- El extracto crudo de POD de nabo y pepinillo presenta 4 isoenzimas.
- El extracto crudo de POD de rabanito presenta 7 isoenzimas.
- El extracto crudo de POD de caigua presenta 5 isoenzimas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Welinder, K.G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 2 (1992) 388-393.
2. Zheng, J., & Fenna, R.E. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 226 (1992) 185-207.
3. Bolscher, B.G.J.M., Plat, H., & Wever, R. Some properties of human eosinophil peroxidase, a comparison with other peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta* 784 (1984) 177-186.
4. Merlie, J.P., Fagan, D., Mudd, J., & Needleman, P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J. Biol. Chem.* 263 (8) (1988) 3550-3553.
5. Picot, D., Loll, P.J., & Garavito, M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* 367 (1994) 243-249.
6. Murthy, M.R.N., Reid III, T.J., Sicignano, A., Tanaka, N., Rossmann, M.G. Structure of beef liver catalase. *J. Mol. Biol.*, 152 (1981) 465-499.
7. Hu, C., Smith, R., van Huystee, R. Biosynthesis and localization of peanut peroxidases. A comparison of the cationic and anionic isoenzymes. *J. Plant Physiol.* 135 (1989) 391-397.
8. Tabatabaie M.; Khaleghparast Sh.; Monsef HR. Purification and some partial characterization of peroxidase isoenzyme from *Brassica oleracea capitata* L. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran.* 2002. 13 (2): 107 – 112.
9. Mostacero J.; Mejía F.; Gamarra O. *Fanerógamas del Perú: Taxonomía, Utilidad y Ecogeografía.* Edit Concytec, Trujillo-Perú. 2009. 1331 pp
10. Duarte-Vázquez, MA. Purificación, caracterización bioquímica y estudios de cristalización de peroxidasa de nabo. PROPAC, UAQ, Querétaro, (Méjico). 2002. 4pp
11. Mejía CL.; Regalado C.; García B. Purificación de peroxidasa de nabo. Facultad de Química, Departamento de Investigación y Postgrado en Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, México. 2004. 5pp
12. Lema C.; Carbajal R.; Pantoja MR.; Sánchez L. Evaluación de la especie *Raphanus sativus* como fuente alternativa para la purificación de peroxidasa y su utilización en pruebas de inmunodiagnóstico. *BIOFARBO*, 1995. Vol. IV, 5 – 13.
13. Villegas MLO. Utilización de la peroxidasa de chayote (*Sechium edule* (jacq.) sw.) en el tratamiento de aguas contaminadas con sustancias orgánicas tóxicas. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Ambientales, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2003. 155pp
14. Sakharov IY.; Bautista AG.; Sakharova IV.; Rojas A.; Pletjuschkino YO. Peroxidasa de Plantas Tropicales. *Rev. Colombiana de Química.* 1999. 28 (1): 97 – 106
15. Civello PM.; Martínez GA.; Chaves AR.; Añon MC. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch): Partial purification and determination of some properties. *J. Agric. Food Chem.* 1995. 43 (10): 2596 – 2601.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive Method for the quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Bioch.* 1976. 72: 248-254.
17. Cáceres IG.; De La Jara F.; Rodríguez D.; Cadena MA. Comparación de patrones electroforéticos de proteínas e isoenzimas en tubérculos sanos y con síntomas de punta morada de siete variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Rev. Mex. Fitopatología.* 2003. 21 (002): 102 – 108.
18. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. 227: 680 – 685.
19. Agostini E.; Hernandez-Ruiz J.; Arnao MB.; Milrad SR.; Tigier HA.; Acosta M. "A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits". *Biotechnol Appl Biochem.* 2002. 35 (1): 1 – 7.

20. Reisfeld R.; Lewis V.; Williams D. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* (London), *Nature*. 1962. 195: 281 - 283.
21. Milrad de Forchetti S.; Tigier HA. Oxidasa del ácido indol-3-acético y actividades siringaldazina oxidasa de las isoenzimas de la peroxidasa en las raíces de soja nódulos. *Physiologia Plantarum*. 1990. 79 (2): 327-330.
22. Sohel Munishwar NGD. Purificación y caracterización de isoenzimas de peroxidasa de nabo raíces indias. *J. Agric.FoodChem*. 2010, 58 (9): 5545 - 5552.
23. Smith, A.T., & Veitch, N.C. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Current opinion in chemical biology* 2(2)1998) 269-278.

wmoyaf@upao.edu.pe