



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PURIFICACION, CARACTERIZACION Y APLICACION DE LA
PEROXIDASA OBTENIDA A PARTIR DE UN RESIDUO
GENERADO DURANTE EL PROCESAMIENTO DEL NOPAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
FRANCISCO ANTONIO AGUILAR ALONSO



MEXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: Raúl Genaro Aguilar Caballero

Vocal: Arturo Navarro Ocaña

Secretario: Luis Orlando Abrajan Villaseñor

1er Suplente: Criselda Mendoza Milla

2do Suplente: Aurora Lara Nuñez.

Laboratorio 321, Edificio "E", Facultad de Química.

Asesor: Dr. Arturo Navarro Ocaña

Supervisor Técnico: Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

Sustentante: Francisco Antonio Aguilar Alonso

Este trabajo va dedicado de principio a fin a:

Mi madre, que en presencia fue consejera y maestra, en ausencia fue inspiración y en esencia somos uno.

Mi padre, el cual estuvo al pie del cañón siempre y jamás desertó.

Mi hermana, mi alma gemela, fuiste y siempre serás comprensión y la válvula para liberar presión.

Tzitzil, que por tu amor, cariño y comprensión nos has sacado adelante.

Mis tías Aurora, Cata, Chepis y Marú. Las cuales siempre estuvieron para ser madres y amigas.

Mis primos Ariel, César, Héctor, Karla, Rebeca y Víctor, que crecimos juntos, y todo parece indicar que nunca vamos a dejar de hacerlo.

A Jail y Alicia. Gracias por siempre estar y porque juntos demostramos al mundo que géneros diferentes pueden llegar a ser los mejores amigos.

Mis amigos (ustedes saben quienes son) por estar para jugar, reír y compartir hasta los malos momentos.

Al Capítulo 7 (Aarón, Chester, Tufo y Vico), con ustedes he aprendido que no solo de pan vive el hombre y que el lado humano no debe estar al final de todo.

A todos los que he olvidado, pero saben que los quiero y admiro.

CONTENIDO

1. Resumen.....	6
2. Antecedentes	
2.1 El nopal.....	7
2.1.1 Generalidades.....	7
2.1.2 Morfología.....	7
2.1.3 Valor nutrimental.....	9
2.1.4 Variedades de cultivo.....	10
2.1.5 Zonas de producción.....	11
2.2 Aprovechamiento de residuos.....	12
2.2.1 Residuos Agroindustriales.....	12
2.2.2 Producción de residuos agroindustriales.....	13
2.2.3 Producción de residuos en el procesamiento del nopal.....	13
2.2.4 Aprovechamiento de residuos.....	14
a) Obtención de ácidos hidroxycinámicos.....	14
a.1) Ácido ferúlico.....	14
a.2) Ácido caféico.....	15
a.3) Ácido cumárico.....	16
b) Uso de residuos en biotecnología.....	16
b.1) Obtención de enzimas.....	16
- Generalidades de las enzimas.....	16
- Obtención de fitasas.....	17
b.2) Aprovechamiento del bagazo de azúcar.....	18
2.3 Peroxidasas.....	19
2.3.1 Generalidades.....	19
a) Clases de peroxidasas.....	19
b) Reacciones que catalizan.....	21
2.3.2 Distribución en plantas.....	23
i. Peroxidasa de <i>Armoracia rusticana</i> (HRP).....	23
ii. Peroxidasa de <i>Momordica charantia</i> (MCP).....	24
iii. Peroxidasa de <i>Papaver somniferum</i>	24
iv. Peroxidasa de <i>Glycine max</i>	25
v. Peroxidasa de <i>Opuntia ficcus indica</i>	26
2.3.3 Métodos para medir su actividad.....	26

2.3.4 Función de la peroxidasa en el nopal.....	28
a) Lignificación.....	28
b) Pardeamiento enzimático.....	30
2.3.5 Aplicaciones.....	31
2.4 Purificación de enzimas.....	34
2.4.1 Métodos de purificación.....	34
a) Precipitación.....	35
b) Métodos cromatográficos.....	35
- Filtración en gel.....	35
- Cromatografía de intercambio iónico.....	37
- Cromatografía de afinidad.....	38
- Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).....	39
2.4.2 Criterio de pureza.....	41
2.4.3 Caracterización de enzimas.....	42
3. Objetivos.....	44
3.1 Objetivo general.....	44
3.2 Objetivos particulares.....	44
4. Hipótesis.....	44
5. Métodos.....	45
5.1 Diagrama general de la investigación.....	45
5.1.1 Diagrama condensado.....	45
5.1.2 Diagrama desarrollado.....	46
5.2 Metodología.....	48
6. Resultados y discusión.....	60
6.1 Análisis de la actividad en el residuo del desespinado de nopales en diferente estado de madurez.....	60
6.2 Purificación.....	61
6.3 Caracterización de la enzima.....	66
6.4 Biotransformación.....	73
6.4.1 Caracterización del precipitado con sulfato de amonio.....	73
6.4.2 Biotransformaciones.....	76
7. Conclusiones.....	81
8. Bibliografía.....	83

1. RESUMEN.

Con la creciente industrialización de vegetales frescos, se han generado una amplia gama de residuos. Por lo cual, el aprovechamiento de los mismos se hace indispensable.

En estudios anteriores, se observó la presencia de peroxidasas en el tejido generado como residuo durante el desespinado del nopal. Siendo esta enzima una de las causales del pardeamiento enzimático de dicha verdura (Aguilar, 2006).

En este trabajo se encontró que, en dicho residuo, existe una variedad de mínimo 5 isoformas de peroxidasa, de las cuales se aislaron 2 de ellas por métodos cromatográficos. La purificación se llevó a cabo en 3 etapas: Captura de la enzima con una resina catiónica de sedimentación rápida (Streamline SP), separación y concentración de las fracciones activas por el paso de una columna de intercambio iónico CM, finalmente la separación de 2 peroxidasas en una columna de interacción hidrofóbica HIC. Se obtuvo un extracto enriquecido en 2 isoformas de peroxidasa (PM entre 40 y 50KDa). Para la caracterización de dicho extracto se utilizaron como sustratos, Bencidina (BD), Pirogalol (PG), Guaiacol (G) y ABTS, siendo los dos primeros, contra los que se presentó la mayor actividad ($V_{max}=3333$ y 2000 respectivamente). La mezcla de las 2 isoformas presentó máximos de actividad, a $pH=4.5$, $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$ usando PG como sustrato y $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el resto de los sustratos. La presencia de algunos iones presentó efecto de inhibición en concentraciones mayores a 30mM

Con la finalidad de encontrar una posible aplicación a las peroxidasas obtenidas a partir del residuo generado durante el desespinado del nopal, un extracto obtenido con 2 precipitaciones de sulfato de amonio, se le determinaron los parámetros fisicoquímicos óptimos de actividad (usando guaiacol como sustrato). Esto con la finalidad de establecer un protocolo para realizar las biotransformaciones a partir de ácido ferúlico, cumárico y cafeíco, así como mezclas de ellos.

2 ANTECEDENTES.

2.1 El nopal

2.1.1 Generalidades.

El nopal es una planta perteneciente a las cactáceas. Su género puede ser *opuntia* y *nopalea*. Esta planta es originaria del Continente Americano y se distribuye desde Canadá hasta Argentina.

En México, el nopal, además de ser un alimento tradicional, es una imagen de identidad, esto puede hacerse notorio en el emblema nacional, en el cual se observa un águila posada en una nopalera, la cual está devorando una serpiente.

Esta planta es propia de los estados del centro del país, donde crece de manera natural.

Una de las características de esta planta es su alto grado de resistencia a la aridez, y su capacidad de formar cruza cuando se cultiva en espacios reducidos.

Las especies de nopal pertenecientes al género *Opuntia*, son comestibles desde el momento en que son no tóxicas. Cabe mencionar, que a pesar de ser comestibles, existen algunas especies que son más fáciles de utilizar que otras, ya sea por su contenido de espinas o bien por la dureza de su corteza.

Las especies que son silvestres, tienen un mayor contenido de espinas, ya que esta estructura es la que le permite al nopal evitar la pérdida de agua, en cambio, el nopal que tiene fines alimenticios, es cuidado por sistemas de riego o cultivados en zonas poco desérticas. De esta manera la planta desarrollará una menor cantidad de espinas (Flores, 1995).

De las más de 100 especies de *Opuntia* que existen en México, se utilizan para forraje 15 especies, 5 para fruta y 3 para verdura (Cadena 2006).

2.1.2 Morfología

El nopal, tiene un sistema radicular perenne, extenso y superficial. La raíz principal tiene como función ser el sostén de la planta, penetrado de 10 a 20 cm. La raíz secundaria está provista de pelos absorbentes, y tiene como función mejorar la eficiencia en la captura de agua en los breves periodos de lluvia.

Los cladodios, son las hojas de nopal, también son llamadas pencas. Es en esta estructura de la planta es donde se lleva a cabo la fotosíntesis.



Figura 1.- Cladodio de nopal de *Opuntia ficus indica* ecotipo Skohur. Fuente: A. Khaled, M. Baaziz, 2005

En las flores se concentra la actividad reproductiva. Son de carácter diurno y se encuentra en la parte superior de cada cladodio, está flor tarda hasta 55 días en abrir después de la aparición de las yemas florales y permanece abierta durante 24 horas. En ese momento comienza la antesis, el cual es el punto donde comienza la vida del fruto.



Figura 2.- Flor de nopal abierta.
Fuente: <http://community.webshots.com/photo/yahoo/>

El fruto, también conocido como tuna, es una baya ovoide, ubicada en donde alguna vez se encontró la flor.

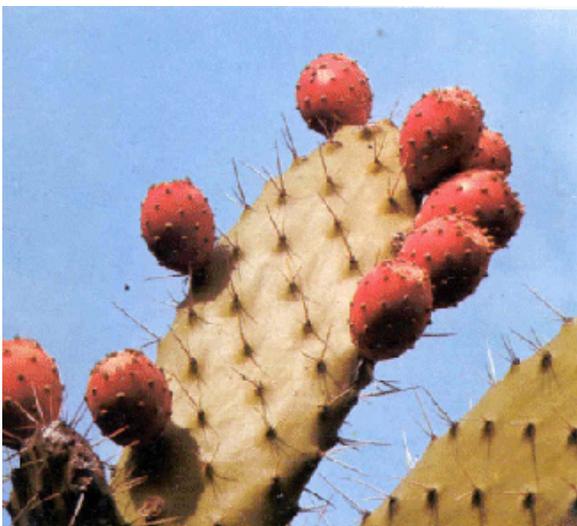


Figura 3.-Fruto de nopal.
Tuna roja de nopal “tapón”.
Fuente: <http://www.jalisco.gob.mx/srias/educacion/dependen/Cedetec/Softwareeduc/sftgeografia/regiones/galerias/flora40.html>

Las espinas tienen como funciones principales la protección del cladodio. Dicha protección es meramente física, ya que protegen de ataques de depredadores, generan sombra y son los responsables de la condensación de la humedad ambiental. Estas espinas corresponden al 8.4% en base seca del total del cladodio y están compuestas principalmente por polisacáridos.

2.1.3 VALOR NUTRIMENTAL

El nopal, es uno de los vegetales con mayor aceptación, debido a su bajo costo y propiedades biológicas como es su fácil digestibilidad por el organismo humano (INE, 2004).

Los principales consumidores de nopal son familias de escasos recursos, ubicadas principalmente en zonas áridas.

Si bien el nopal no es un alimento completo, si es una buena fuente de fibra y de algunos minerales como el calcio, el cual está presente en buenas cantidades en el nopal verdura.

Tabla 1.- Información nutrimental del nopal fresco. (Fuente: PROFECO)

Nopal, valor nutrimental Porción de 100 g de peso neto	
Proporción comestible (%)	78
Aporte energético (kJ)	112.968
Agua (%)	91.5
Proteínas (%)	1.7
Lípidos (%)	0.30
Carbohidratos (%)	5.60
Calcio (mg)	93.00
Hierro (mg)	1.60
Tiamina (mg)	0.03
Riboflavina (mg)	0.06
Niacina (mg)	0.03
Ácido ascórbico (mg)	8.00

2.1.4 Variedades de cultivo

Entre las regiones de cultivo de nopal en territorio nacional, podemos encontrar una gran diversidad de variedades de diferentes características. Por ejemplo: los nopales de mayor calidad sería Atlixco, Copena F1 y Milpa Alta.

El consumo preferencial por variedades de nopal, está basada en las regiones, por ejemplo, en el norte y el altiplano, el nopal criollo y el nopal tapón son buscados por su sabor; mientras que en el centro, el consumo se inclina preferente por nopales de tipo Italiano, como serían Copena y Milpa Alta (INE, 2004).

Tabla 2. Variedades de Nopal verdura cultivados en México.

PRINCIPALES VARIEDADES CULTIVADAS DE NOPAL VERDURA		
Variedad	Entidad de producción	Especie
Milpa Alta	Distrito Federal, Morelos	<i>Opuntia ficus-indica</i>
Atlixco	Puebla, Edo. De México	
Copena IV	Edo. México, Baja California, San Luis, Hidalgo	
Copena F1	Edo. México, Sonora, Baja California	
Moradilla	Edo. México	
Blanco	Michoacán	
Negro	Michoacán, Guanajuato	
Blanco con espinas	Guanajuato	
Polotitlan	Edo. México	
Tamazunchale	San Luis Potosí, Hidalgo	
Tapón *	San Luis Potosí, Zacatecas, Guanajuato, Durango, Aguascalientes, Jalisco, Querétaro	<i>Nopalea cochellinifera</i>
		<i>O. robusta</i>

*Nopal silvestre y plantado como cerco de huertos familiares y paredes agrícolas, objeto de recolección.
Fuente: “Mercado Mundial de nopalito” ACERCA, UAM, CUESTAAM, MÉXICO 1995

2.1.5 Zonas de producción.

México es el principal productor de nopal verdura con 10, 000 ha plantadas, inmediatamente es seguida por Estados Unidos de Norteamérica con un rango de 50 a 100 ha plantadas.

En México, las principales zonas de producción están concentradas en los estados de Aguascalientes, Baja California, Jalisco, Oaxaca, Michoacán, Puebla, San Luis Potosí, Zacatecas y el Distrito Federal, siendo este último en el que se encuentra más del 71 % de la superficie y el 78 % de la producción nacional (INEGI 1997).

En el Distrito Federal, Milpa Alta es la región más importante de producción con un 68% de la superficie total y un 80% de la producción nacional.

Tabla 3.- Producción nacional de nopal verdura por entidades federativas (SAGARPA).

AVANCE DE SIEMBRAS Y COSECHAS							
PERENNES 2006							
SITUACION AL 31 DE MAYO DE 2006							
TOTAL							
(Riego + Temporal)							
DELEGACION	SUPERFICIE (HA.)			PRODUCCION (TON.)		RENDIMIENTO (TON/HA)	
	SEMBRADA	SINIESTRADA	COSECHADA	ESTIMADA	OBTENIDA	ESTIMADO	OBTENIDO
AGUASCALIENTES	240			9,518		39.658	
BAJA CALIFORNIA	627		24	25,505	96	40.710	4.000
BAJA CALIFORNIA SUR	17			138		8.000	
CAMPECHE							
CHIAPAS							
CHIHUAHUA	12		12	300	77	25.000	6.375
COAHUILA							
COLIMA	8		8	94	68	12.533	9.067
DISTRITO FEDERAL	4,337		4,337	318,275	110,491	73.386	25.476
DURANGO							
GUANAJUATO	180	2	166	3,205	1,201	18.017	7.242
GUERRERO	16		1	318	4	19.875	4.000
HIDALGO	49		7	3,680	39	75.866	6.000
JALISCO	488		51	7,020	1,071	14.393	21.000
MEXICO	664		553	119,427	19,822	179.928	35.877
MICHOACÁN	295		131	6,568	2,674	22.264	20.459
MORELOS	2,515		2,425	241,210	118,081	95.909	47.868
NAYARIT	67	2		442		6.774	
NUEVO LEON							
OAXACA	30		30	960	480	32.000	16.000
PUEBLA	119			8,344		70.118	
QUERETARO	25		25	405	134	16.200	5.370
QUINTANA ROO	2		2	48	20	24.000	10.000
REGION LAGUNERA	40		22	804	220	20.100	10.000
SAN LUIS POTOSÍ	388		388	1,164	598	3.000	1.540
SINALOA	9			25		2.778	
SONORA	34			208		6.118	
TABASCO							
TAMAULIPAS	596		266	7,113	2,068	11.925	7.774
TLAXCALA	1		1	8	4	15.000	7.000
VERACRUZ	60		7	1,288	3	21.625	0.357
YUCATÁN	5		1	150	35	30.000	35.000
ZACATECAS	358		103	6,133	618	17.150	6.000
T O T A L	11,179	4	8,558	762,347	255,803	68.217	29.892
COMARCA LAG. DGO.	40		22	804	220	20.100	10.000
COMARCA LAG. COAH.							

FUENTE: SERVICIO DE INFORMACIÓN Y ESTADÍSTICA AGROALIMENTARIA Y PESQUERA (SIAP), CON INFORMACIÓN DE LAS DELEGACIONES DE LA SAGARPA EN LOS ESTADOS.

2.2 APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS.

2.2.1 Residuos agroindustriales

Una parte importante de los residuos que se generan en la industria de transformados vegetales está constituida por la fracción orgánica sólida derivada del tratamiento previo de las materias primas vegetales. En la actualidad esta fracción de sólidos orgánicos se emplea en parte como alimentación animal, una pequeña proporción se destina a otras aplicaciones (Ej. combustible) y el resto de la materia no empleada constituye un residuo destinado a vertedero. El envío de esta materia orgánica a vertedero supone una pérdida de recursos puesto que puede ser un subproducto aprovechable en otros procesos. El reciclaje de los residuos sólidos orgánicos podría verse favorecido, entre otros, por el hecho de que las empresas generadoras normalmente están concentradas en determinadas zonas geográficas y podría aplicarse medidas conjuntas de aprovechamiento de los residuos. Además, el uso del subproducto en alimentación animal puede aumentarse si se realiza una correcta planificación.

Una posible inversión para los industriales, será el procesamiento de estos residuos, los cuales son una fuente alta en fibra dietética y antioxidantes (Schieber et al. 2001). Además muchos de estos residuos, son fuente de algunas enzimas, las cuales, como en el caso de los generados en el procesamiento de algunos cereales, pueden eliminar factores antinutrimientales en algunas leguminosas (Steiner et al. 2006).

Los residuos Agroindustriales pueden clasificarse como lo ha hecho Fadel (1999) de la siguiente manera:

- Misceláneos, los cuales incluyen Vainas de almendras, Bagazo, remolacha, salvado, granos cerveceros, pulpa de cítricos, semillas de algodón y melaza.
- Residuos de cultivos vegetales: frutas, verduras y cereales (trigo, arroz, cebada y maíz).
- Pastas, que son los residuos producidos después de que el aceite fue extraído de plantas.

2.2.2 Producción de residuos agroindustriales

La cantidad de residuos agroindustriales generados por diferentes industrias varía ampliamente dependiendo del país.

Tabla 4.-Residuos agroindustriales producidos en 1993 expresados como 10³ toneladas métricas (TM).

Residuo	México	Egipto	Kenia	Argentina	Corea	China	USA	Mundial
Agrícola								
Misceláneo (10³ TM)	6, 183	2,890	596	2,557	893	40,396	15,030	221,084
Pastas (10³ TM)	2,891	602	34	322	2,658	12,019	23,374	124,105
Residuos Cultivos (10³ TM)	4,720	5,286	434	6,530	3,643	163,444	60,377	651,498
Total (10³ TM)	13,794	8,778	1,064	9,409	7,194	215,852	98,781	996,686

En la tabla 4 podemos observar que China es el país con una mayor producción de residuos agroindustriales con un 21% del total. Seguida por Estados Unidos que genera el 9.9% del total.

2.2.3 Producción de residuos en el procesamiento del nopal.

Del total de nopaleras cultivadas, el 5 % es utilizado para la producción de nopalitos, las cuales tienen una producción promedio de 575, 575 toneladas anuales. De dicha producción se obtiene cerca de un 30% en residuos, ya que el nopal necesita ser, para consumo, desespinado. En esta operación se genera un producto conformado por la espina y el tejido adyacente a ella. Este residuo equivale anualmente a aproximadamente 172, 672 tons de residuos, los cuales son desechados, o en el mejor de los casos, enterrados.

Por lo tanto, el aprovechamiento de este tipo de residuos se hace indispensable, ya que no solo reducirá los costos de procesamiento, sino que también podría extender líneas de producción, las cuales se traducen en un crecimiento empresarial.

2.2.4 Aprovechamiento de residuos.

Como se ha mencionado, los residuos agroindustriales, pueden ser un gran problema si no son correctamente aprovechados. Si consideramos que: los desechos generados durante la producción son también parte del producto inicial, sería lógico pensar que, si bien no tiene las mismas características sensoriales, si podrían ser aprovechadas por su aporte nutricional o por algunos componentes que al ser consumidos, pudieran ofrecer un beneficio a la salud. Otra aplicación que puede darse a estos productos de purga, tienen finalidades industriales, como serían la obtención de biocatalizadores (enzimas) o derivados generados para el tratamiento de aguas (Delval Et. Al, 2006; Marshall Et. Al, 2006).

a) Obtención y distribución de ácidos hidroxicinámicos:

Los ácidos hidroxicinámicos, son un grupo de polifenoles, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en plantas, semillas, frutas y algunos productos derivados, tal es el caso de los vinos. De manera natural, una de sus principales funciones es: actuar como antioxidantes, evitando el deterioro por oxidación. Además, en algunas plantas, son los sustratos de las enzimas responsables del pardeamiento enzimático.

Este tipo de compuestos, los cuales han generado una alta demanda, entre los consumidores que buscan evitar enfermedades y/o mejorar el funcionamiento del organismo a través de productos de origen natural, pueden obtenerse a partir de residuos generados en la agroindustria, como son: cáscara, semilla o algunos otros.

Entre los antioxidantes encontrados en productos de purga industrial, se mencionan 3 de los cuales están altamente distribuidos y son de alta rentabilidad.

a.1) Ácido ferúlico (**ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)prop-2-enóico**):

Se encuentra altamente distribuido principalmente en plantas, es el más abundante de los ácidos hidroxicinámicos en los polisacáridos de las paredes celulares. Se encuentra principalmente en el salvado del maíz (en el cual

representa hasta el 4% del peso neto), avena y trigo (Boninn et al. 2002), también se encuentra en el nejayote (residuo alcalino generado en la nixtamalización del maíz). En los cereales se encuentra principalmente ligado por medio de un enlace éster 0-5 a residuos de arabinosa (Ishii 1997). Sin embargo, también se encuentra ligado a residuos de galactosa.

Este compuesto, se caracteriza no solo por sus propiedades antioxidantes, sino también por ser un antiinflamatorio (Ou 2003), aunque se ha encontrado que dichas cualidades, se ven potenciadas cuando la molécula se presenta en forma de dímeros (Ou 2003).

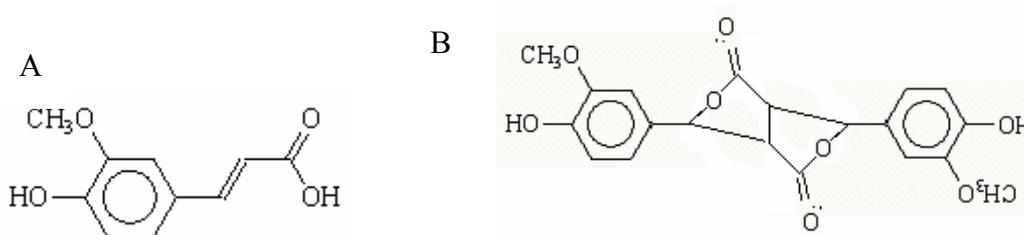


Figura 4.- A: ácido ferúlico.

B: Dehidrómero de ácido ferúlico

a.2) **Ácido caféico ácido (3-3,4-Dihidroxifenil)-2-propenóico:** Se encuentra distribuido en frutas y verduras, en el salvado del maíz, avena y arroz, se encuentra conjugado en forma de ácido clorogénico.

Es una molécula con actividad antioxidante. Se ha observado que si está molécula esta esterificada, tiene altas propiedades antiinflamatorias y anticarcinogénicas (Natarajan 1996).

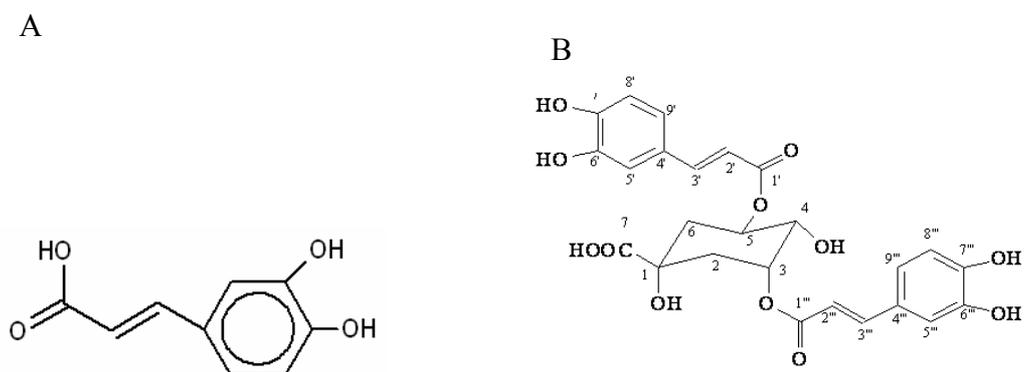


Figura 5.- A: Estructura de ácido caféico. B: ácido 3,5 dicafeilquínico

a.3) **Ácido cumárico ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenóico:** Otro derivado de los ácidos hidroxicinámicos. Existe en 3 formas principales: orto, meta

o para-cumárico, aunque esta última es la más abundante. Se encuentra distribuido mayoritariamente en vegetales como tomates, zanahorias y se encuentra en altas concentraciones en el ajo (Ferguson, 2005).

Se ha encontrado que la ingesta de ácido cumárico reduce el riesgo de cáncer en el estómago, reduciendo la formación de nitrosaminas (Ferguson 2005), aunque no se han encontrado evidencias de que derivados del ácido cumárico ofrezcan mayores beneficios a la salud.

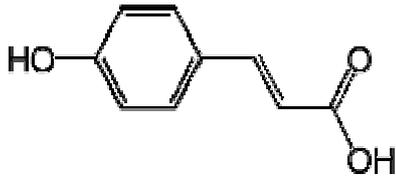


Figura 5. Estructura del ácido cumárico.

Como se ha mencionado, estos ácidos hidroxycinámicos en su forma dimerizada, presentan un efecto benéfico mayor, al que ofrecen como monómeros.

Es este uno de los motivos por los cuales se ha buscado su dimerización por diversos métodos, en los que se destaca la oxidación química y en últimas fechas, la oxidación enzimática por el uso de peroxidasas (Arrieta, 2006; Ou et. Al. 2003).

b) Uso de residuos en biotecnología

Debido a que las materias primas agrícolas son organismos vivos, podemos encontrar en ellas una amplia gama de enzimas, por lo tanto los residuos generados en su procesamiento no serán la excepción.

b.1) Obtención de enzimas

-Generalidades de las enzimas.

Las enzimas son los catalizadores en sistemas biológicos. Son moléculas de gran interés que determinan la pauta de las transformaciones químicas. Entre sus características más sobresalientes están: su alta especificidad y su gran poder catalítico. Todas las enzimas son de carácter proteico. Sin embargo, existen moléculas de RNA catalíticamente activas, lo cual indica que las proteínas no tienen el monopolio absoluto como catalizadores.

Las enzimas aceleran reacciones multiplicando su velocidad por un millón de veces e incluso más. De hecho, la mayoría de las reacciones en

sistemas biológicos no tienen lugar a velocidades perceptibles en ausencia de enzimas. Incluso una reacción tan sencilla como la hidratación del dióxido de carbono viene catalizada por una enzima denominada anhidrasa carbónica. En su ausencia la transferencia del CO₂ desde los tejidos a la sangre y desde está al aire alveolar sería incompleta.

- Obtención de fitasas.

Una de las enzimas que pueden obtenerse a partir del salvado de algunos cereales son las fitasas.

El fitato, sustrato natural de las fitasas, es la sal del ácido mio-inositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfórico. Es una molécula con capacidades quelantes, donde las plantas acumulan sus reservas de fósforo, de esta forma, el fósforo se encuentra poco disponible para los animales no rumiantes (Pointillart et al. 1984), reduciendo también, la biodisponibilidad de algunos cationes como el Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ y Fe²⁺.

Podemos definir a las fitasas como fosfatasas, ya que su actividad se basa en eliminar un grupo orto-fosfato de la molécula de fitato. Estas enzimas, liberan de dicha sal, los grupos fosfato, haciéndolos disponibles para los no rumiantes y eliminando las propiedades quelantes de dicha molécula.

En un estudio realizado en algunas leguminosas, cereales y salvado de cereales, se encontró que la mayor actividad de fitasa se encuentra en el salvado de trigo (Steiner et al. 2006).

Tabla 6. Actividad de fitasa en algunas leguminosas, cereales y salvado de trigo.

Producto	Actividad de fitasa (U/kg)
Semillas de leguminosa:	
Frijoles de campo	290
Chícharos	262
Cereales:	
Avena	496
Trigo	2886
Residuos de cereales:	
Salvado de trigo	9945

b.2) Uso del bagazo de caña de azúcar.

El bagazo de la caña de azúcar es un material complejo, el cual es el residuo mayoritario en el procesamiento de la caña de azúcar. Está constituido por el 50% de celulosa, 25% de hemicelulosa y el 25% de lignina. Este desecho puede ser utilizado en procesos microbianos para la obtención de productos con alto valor agregado como pueden ser: alimento para consumo animal enriquecidos en proteínas, enzimas, aminoácidos y compuestos de importancia farmacéutica.

Un tipo de enzimas con alto valor tecnológico, son aquellas provenientes de hongos. Debido al fácil crecimiento de estos microorganismos y la poca manutención que requieren. Las enzimas fúngicas se han convertido en una herramienta muy rentable para la biotecnología.

Entre las enzimas de mayor interés para el área de la biotecnología, podemos destacar las celulasas, las cuales son las responsables de la sacarificación de la celulosa. La producción de estas celulasas, se ha visto limitada por el alto costo de obtención, por lo cual la bioconversión de celulosa a glucosa, a pesar de ser interés industrial, no ha sido, económicamente, viable. Sin embargo, se ha encontrado que el crecimiento de *Trichoderma reesei* QM-9414 en el bagazo de la caña de azúcar optimiza los rendimientos en la producción de celulasas, además de mejorar el crecimiento de biomasa, obteniendo un producto con un total del 35.5% de proteína cruda, con una digestibilidad del 69.8%.(Pandey Et. Al, 2000)

Dentro de otras aplicaciones que pueden darse al bagazo de la caña de azúcar se encuentra que la producción de ácido láctico por cepas de *Rhizopus oryzae* NRRL 395, se obtienen rendimientos en la producción de ácido láctico de entre 93.8-137 g/l. Mientras que: la obtención de ácido glutámico, a partir del bagazo de la caña de azúcar, ha mostrado que se pueden obtener hasta 80 mg de ácido glutámico/ g de bagazo seco. (Pandey Et. Al, 2000)

Otra aplicación que puede darse a este desecho es que utilizando el bagazo con un tamaño de partícula de 14 mm, la producción de penicilina, por diversas cepas de *Penicillium sp.*, se incrementa hasta en un 37%.(Pandey Et. Al, 2000)

2.3 PEROXIDASAS

2.3.1 Generalidades

En 1835, Shoenbein observó que los extractos de algunos hongos y tejidos animales causaban la formación de un color azul en presencia de soluciones de guaiacol en presencia de aire o con soluciones diluidas de peróxido de hidrógeno. Esta actividad es debida a la catalasa y la peroxidasa. La enzima peroxidasa esta ampliamente distribuida en plantas y la podemos encontrar en altas concentraciones en la savia del higo y en el rábano. También podemos encontrarlos en algunos tejidos animales o incluso en algunos microorganismos. En 1943, Theorell cristalizó la peroxidasa de rábano, aunque en las últimas fechas se cristaliza de diversas fuentes.

a) Clases de peroxidasas.

Las peroxidasas, pueden ser clasificadas como se describe a continuación:

1.- Peroxidasas que contienen hierro:

- Peroxidasa ferriprotoporfirina: Este grupo incluye peroxidasas de plantas (rábano, rábano Japonés, nabo y en la savia del higo), animales (triptofanpirrolasa, yoduro peroxidasa y tiroidea), en microorganismos (citocromo c peroxidasa de levaduras). Todas estas peroxidasas se caracterizan por tener un grupo ferriprotoporfirin III como grupo prostético, el cual puede ser removido de la proteína con tratamientos con ácido-acetona. Estas enzimas son cafés en solución cuando se encuentran altamente purificadas.

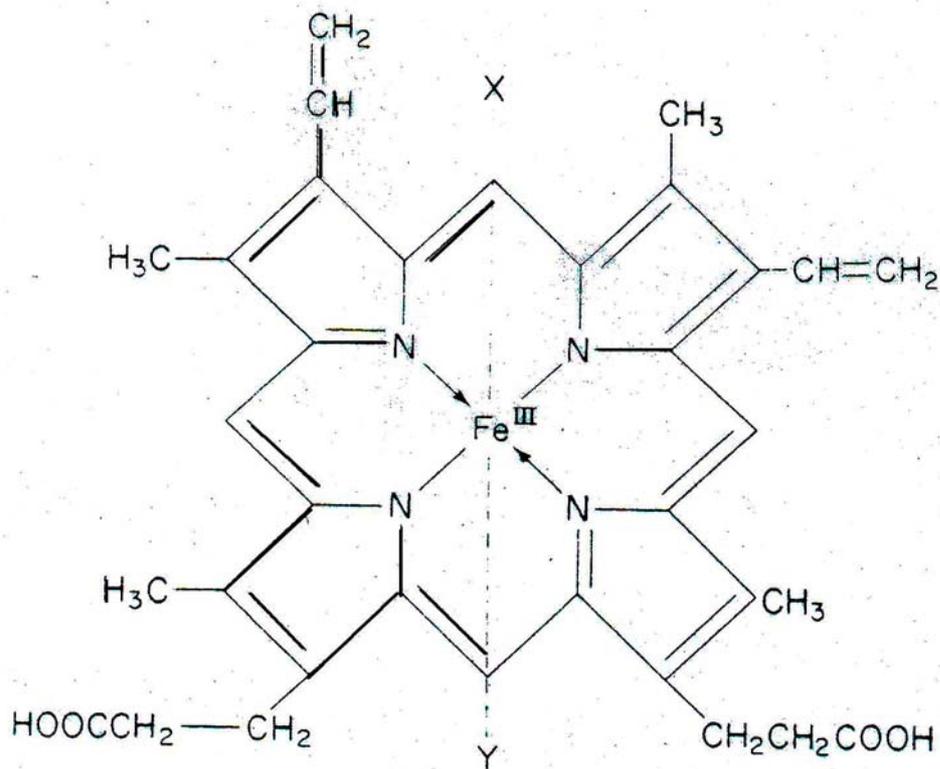


Figura 6.-Estructura de ferriprotoporfirina III (protohemina).

- Verdoperoxidasas: Las verdoperoxidasas se encuentran en mielocitos (mieloperoxidasa), leche (lactoperoxidasa), y en tejidos misceláneos. El grupo prostético de este tipo de enzimas es un núcleo de hierro-porfirina, pero no es un ferriprotoporfirin III. Altamente purificadas las mieloperoxidasas y lactoperoxidasa son verdes, debidos a su absorbancia máxima en 570-690 nm. El grupo prostético no es removido de la proteína por tratamientos con ácido-acetona.

2.- Peroxidasas de flavoproteínas: Estas peroxidasas, han sido purificadas de diversos *Streptococcus*; incluyendo *Streptococcus fecalie* y de una gran variedad de tejidos animales. El grupo prostético de estas peroxidasas es FAD.

b) Reacciones que catalizan.

La catálisis de las peroxidasas está asociada con cuatro tipos de actividad: peroxidativa oxidativa, catalítica e hidroxilaciones, las cuales se describen de manera general en la figura 7.

Bajo las condiciones de ensayo habitual *in vitro* donde un sustrato fenólico es usado, solo la reacción peroxidativa es de importancia. Esta reacción ocurre cuando son usados p-cresol, guaiacol, resorcinol, anilina, etc., como sustratos. Las reacciones oxidativas ocurren cuando los sustratos son: ácido dehidroxifumárico, ácido ascórbico, hidroquinona, etc., y requieren la presencia de O₂.

En la ausencia de un donador de hidrógenos, la peroxidasa puede convertir el peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno. Esta reacción es por lo menos mil veces más lenta que las reacciones peroxidativas o las oxidativas.

En la presencia de algunos donadores de protones, particularmente el ácido dihidroxifumárico, y oxígeno molecular, las peroxidasas pueden hidroxilar una variedad de compuestos aromáticos, incluyendo tirosina, fenilalanina, p-cresol y los ácidos benzóico y salicílico.

En la figura 7, se puede observar los pasos de acción de las peroxidasas. En la etapa peroxidativa, el grupo hemo es oxidado por medio del peróxido de hidrógeno, generando agua. En una segunda etapa, puede derivarse a 2 etapas distintas como pueden ser: la etapa catalítica, en la cual el peróxido de hidrógeno es oxidado hasta O₂, reestableciendo el estado de oxidación del grupo hemo. En caso de existir un donador de protones, la peroxidasa lo oxida, generando un radical libre y un grupo Hierro con estado oxidado en IV, inmediatamente después otra molécula donadora de protones es atacada, dando como resultado final la formación de un polímero de la molécula donadora y la peroxidasa en su estado reducido. Dicho mecanismo se describe con mayor precisión en la dimerización del ácido ferúlico en 2.3.5.

Esta segunda etapa puede acoplarse a una reacción oxidativa, en la cual la enzima no participa pero los radicales formados en la etapa peroxidativa reaccionan con el O₂ para formar radicales peróxido, los cuales pueden reaccionar en la etapa de hidroxilación.

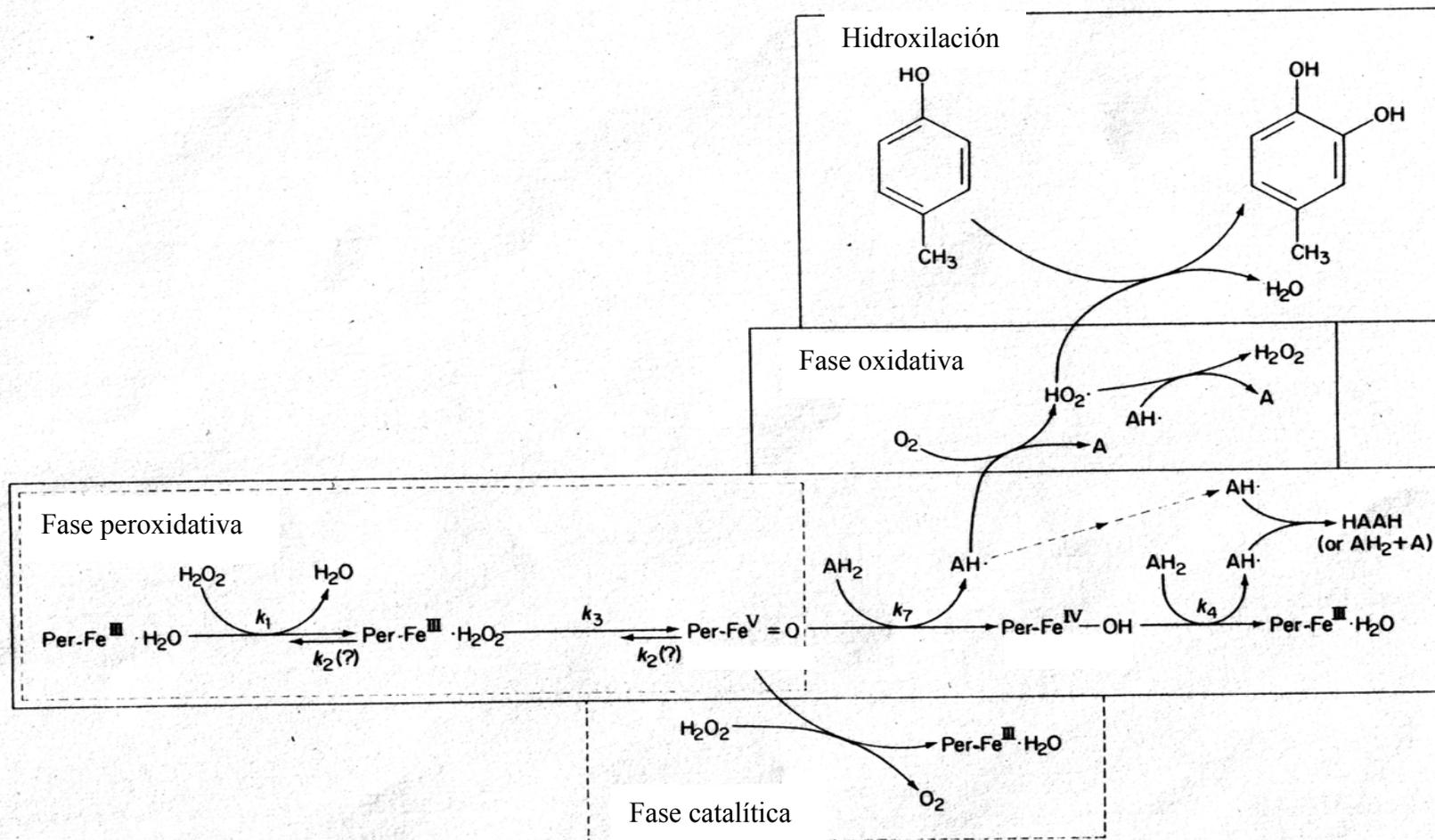


Figura 7.- Mecanismo de acción de las peroxidasas.

2.3.2 Distribución en plantas.

Las peroxidasas se encuentran distribuidas principalmente en plantas. La actividad, número de isoformas y papel que desempeñan, varía dependiendo de su origen. A continuación se enlistan algunas de las peroxidasas vegetales más importantes.

i. Peroxidasa de *Armoracia rusticana* (HRP).

Armoracia rusticana es una planta originaria de Europa, la parte útil es la raíz. La cual por tener un alto contenido de glucósidos, se utiliza en pequeñas cantidades como estimulante y laxante.



Figura 8. Rábano picante.

Obtenida de:
http://www.herbs2000.com/herbs/herbs_horseradish.htm

La peroxidasa de *Armoracia rusticana*, o HRP por sus siglas en inglés, es la más estudiada y conocida por haber sido la primera que fue cristalizada. Está conformada por 40 isoformas con pH's óptimos de 4.2 y 5 (Hoyle 1977), tiene un peso molecular entre 40, 000 y 60, 000 Da, presentando un grupo ferriprotoporfirin III por cada molécula.

ii. Peroxidasa de *Momordica charantia* (MCP).

Momordica charantia, es una flor utilizadas para el tratamiento de la diabetes en la india.



Figura 9. *Momordica charantia*

- Melón amargo (Cucurbitaceae)
- Fruit de Long Key, Florida.
- Noviembre 08, 2003.

Foto por [Forest & Kim Starr \(USGS\)](#)

Disponible en : <http://www.hear.org/starr>

La MCP es una enzima que precipita a partir del 40% de sulfato de amonio, tienen un pH óptimo de 5.0 (usando guaiacol como sustrato), es estable a pH's de 3.8-8 y a temperaturas entre 20-55°C, con un peso molecular de 43 kDa y una actividad específica de 7757 U (Ou et Al.2003). Esta enzima fue utilizada exitosamente para la dimerización del ácido ferúlico, obteniendo principalmente el dehidrodímero (Fig. 4B) (Ou et Al. 2003).

iii. Peroxidasa de *Papaver somniferum*.

Papaver somniferum es una planta originaria de Europa. Su cultivo es ilegal, ya que contiene algunos alcaloides tóxicos, incluyendo principios de opio y morfina.



Figura 10. Flor abierta y capullo de *Papaver Somniferum*.
Foto obtenida de:
Poisonous Plants of North Carolina

Esta enzima se ha encontrado en semillas de *P. somniferum*, al tiempo de la formación de alcaloides, como la morfina, por lo cual se presume que podría ser la responsable de dicha síntesis a partir del precursor (-)reticulina. Es una enzima con un peso molecular de 32 kDa, una actividad específica de 183 U y un pH óptimo de 5.5 y 6.2 (Robinson 1982).

iv. Peroxidasa de *Glycine max*.

Glycine max es una leguminosa originaria del este de Asia, la planta llega a medir hasta 2 metros. Los frijoles generados en vainas son conocidos como frijoles de soya (semilla de soya), la cual ha sido ampliamente usada en la alimentación animal. Su uso en productos para consumo humano tuvo un incremento en los últimos años por su alto contenido en proteína.



Figura 11. Vaina de *G. max* conteniendo la semilla de soya.

Fuente:
<http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Soybean.USDA.jpg>.

La peroxidasa obtenida de la semilla de soya, presenta una $K_m = 200 \mu M$ usando o-dianisidina como sustrato. Su actividad se ve inhibida por la presencia de iones Mn^{2+} y Cu^{2+} (Zancani et al., 1995).

v. Peroxidasa de *Opuntia ficcus indica*.

Se ha encontrado que el género *Opuntia* presenta hasta 9 isoformas. Las cuales varía su peso molecular entre 40 y 60 kDa, siendo la peroxidasa ácida con un peso molecular de 58 kDa (Khales, 2005), un pH óptimo de 5.75, y una actividad específica de 11, 900 U (Padiglia et al., 1994). Estas peroxidases presentan una mayor actividad en las raíces que en los cladodios (Khales, 2005).

En la superficie de los cladodios desempeñan un papel de protección, ya que al sufrir un daño físico, la enzima se activa oxidando a los polifenoles contenidos en el nopal, generando manchas de color oscuro (pardeamiento enzimático) poco atractivas para predadores.

2.3.3 Métodos para determinar su actividad.

Los ensayos para determinar la actividad de peroxidasa, involucra el uso de donadores de protones como pueden ser guaiacol, pirogalol, bencidina, o-dianisidina, entre otros. En estos ensayos se aprovechan la actividad peroxidativa, pero como se ha mencionado anteriormente también existen métodos donde puede aprovecharse la actividad oxidativa de dicha enzima, como en la oxidación del ácido ascórbico. A continuación se en listan algunos métodos que pueden usarse para determinar la actividad de peroxidasa.

Tabla 7. Sustratos que pueden ser usados para la actividad de peroxidasa. Se presentan las longitudes de onda a la que deber determinarse cada ensayo, así como los coeficientes de extinción molar para cada producto.

Donador de protones	λ_{\max} del producto	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	Observaciones	Referencia
Guaiacol	470	2.66×10^4	-No carcinogénico	Castillo Et. Al, 2002.
Bencidina	590	3.4×10^4	-El ensayo debe realizarse en buffer de acetatos pH= 5 para evitar falsos positivos. -Carcinogénico	Sentchouk, 2005.
Pirogalol	340	2.8×10^3	-Requiere tiempo de incubación aproximado 1 minuto	Soysal Et. Al., 2005.
ABTS ácido (2,2'azino(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico	415	3.11×10^4	-Forma un radical libre tóxico.	Castillo Et. Al, 2002.
Ác. Ferúlico	470	6×10^3	-La reacción se lleva a cabo con una desaparición espontánea del color.	Castillo Et. Al, 2002.
o-dianisidina	420	3×10^4	-Método más común.	Castillo Et. Al, 2002.
4-cloro-1-naftol	575		-La reacción es extremadamente rápida.	Khales, 2005.
O-fenilen diamina	445	11.1×10^3		Castillo Et. Al, 2002.
Catecol	295	1.7×10^3	-Usado preferentemente para la determinación de polifenol oxidasa	Castillo Et. Al, 2002.
o-tolidina	582	14×10^3	-Actividad carcinogénica limitada	Sentchouk, 2005.
3,3',5,5',-tetrametilbencidina	655	39×10^3	-No carcinogénico.	Sentchouk, 2005.

2.3.4 Función de la peroxidasa en el nopal.

Como se ha mencionado las peroxidasas participan en diversos tipos de reacciones, generando una gran cantidad de productos y utilizando también una amplia gama de sustratos. A continuación se ejemplificarán dos de los principales procesos (lignificación y pardeamiento enzimático) realizados por peroxidasas.

a) Lignificación

La lignina representa en el nopal el 3.6 % de su peso en base seca (Stintzing et. Al., 2005). Es un heteropolímero fenólico, óptimamente inactivo y covalentemente asociado a la pared celular con polisacáridos y proteínas. Se localiza principalmente en los conductos impermeables de transporte de agua y en algunos tejidos vasculares de plantas terrestres (Lignin institute, 2005).

Dicho polímero, está constituido por monolignoles. Los cuales existen en gran diversidad en las diferentes plantas. Siendo los más representativos, los alcoholes: sinápico, coniférico y p-cumárico. Dichos monolignoles, son polimerizados por reacciones oxidativas catalizadas, principalmente, por peroxidasas (Wikipedia, 2007).

En algunas gimnospermas, como el abeto noruego, la síntesis de la lignina, se lleva a cabo a partir del alcohol coniférico (figura 11) (Wikipedia, 2007).

En la figura 11, se observa que el primer paso para la lignificación, es la formación de radicales libres a partir del alcohol cinámico y H_2O_2 en presencia de la peroxidasa. Lo cual es seguido por la dimerización de dichos radicales. Los principales productos en esta dimerización son neolignanos como: pinosinol (XXVII), alcohol dehidroconiferílico (XXVIII) y el alcohol guaiacilglicerol- β -O-coniferil éter (XXIX). Estos neolignanos pueden, dependiendo de la especie de la planta, existir en su forma pura o en una forma racémica.

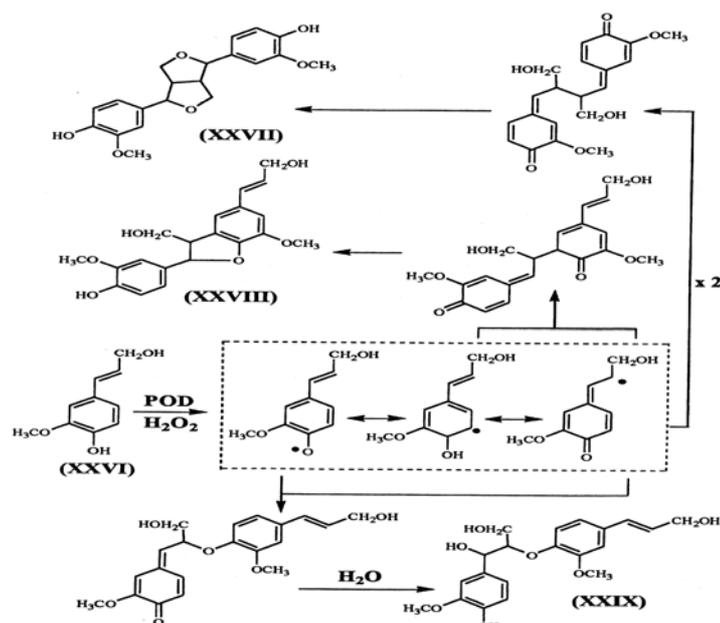


Figura 11.- Generación oxidativa de los precursores de la lignina. (XXVI: alcohol coníferico; XXVII: pinoresinol; XXVIII: alcohol dehidroconiferílico; XXIX: O-coniferil éter)

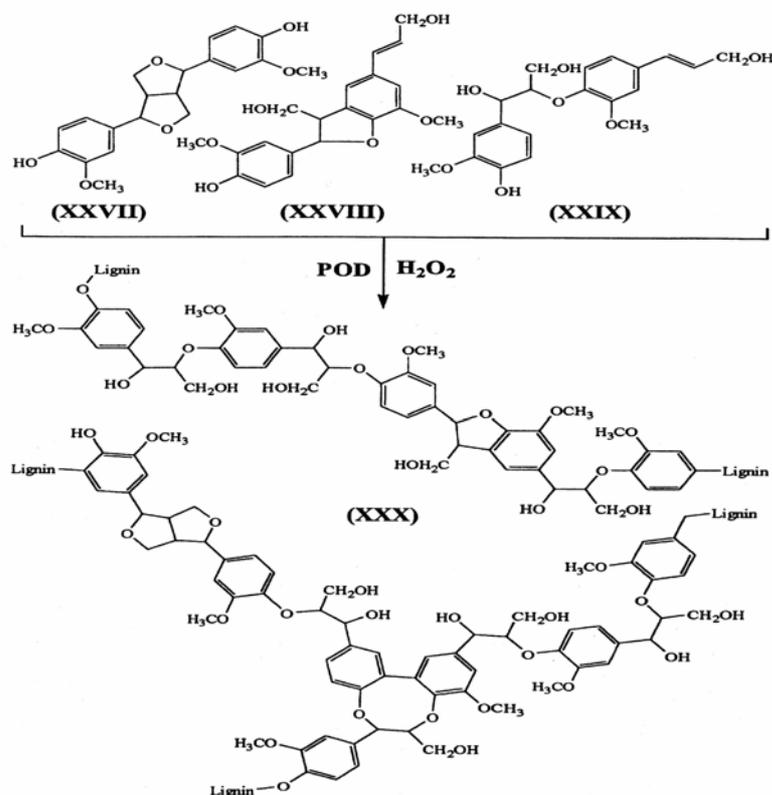


Figura 12. Polimerización de precursores por medio de la peroxidasa para generar el polímero lignina. (XXVII: pinoresinol; XXVIII: alcohol dehidroconiferílico; XXIX: O-coniferil éter; XXX polímero de lignina).

Como se observa en la figura 12, estos dímeros nos son los productos finales de esta vía. Estos productos son oxidados nuevamente en la presencia de la peroxidasa para generar un creciente polímero de lignina (XXX).

b) Pardeamiento enzimático.

La aparición de manchas oscuras en algunas plantas y sus frutos, se debe, principalmente, a una oxidación enzimática, llevada a cabo por peroxidasas (POX) y polifenoloxidasas (PPO). Este fenómeno es llamado pardeamiento enzimático.

El pardeamiento enzimático es una reacción que se busca exitosamente en algunos procesos concretos como son la fermentación del té, la desecación de dátiles y la fermentación del cacao. Sin embargo, esta reacción es generalmente indeseada porque genera manchas que aparecen cuando algunos tejidos se cortan, magullan, enferman, congelan o son sometidos a cualquier otra acción que cause ruptura celular. Los sustratos de esta reacción son fenoles simples (p. Ej. Catecol y ácido gálico), derivados del ácido cinámico (como el ácido clorogénico y la dopamina), flavonoides (catequina y epicatequina) y flavonoles (quercetina y dihidroquercetina) (Fennema 2000). En el tejido intacto, estos polifenoles se encuentran atrapados en vacuolas, por lo cual la actividad de la PPO y la POX se encuentran bajo estricto control biosintético. Cuando se presenta un daño mecánico sobre el tejido, los polifenoles son liberados y oxidados enzimáticamente (Tucker 1991).

La tendencia de un tejido al pardeamiento presenta grandes variaciones de un cultivar a otro, debido a diferencias en los contenidos enzimáticos (principalmente a los contenidos de polifenoloxidasa y peroxidasa) y, en algunas ocasiones, en el tipo y cantidad de los sustratos fenólicos (Fennema 2000). Por ejemplo, en el nopal se ha encontrado una alta actividad de peroxidasa y una traza de actividad de polifenol oxidasa (Aguilar, 2006)

Entre los métodos que se utilizan para evitar el desarrollo de esta reacción durante el procesado de los alimentos, pueden citarse la exclusión de oxígeno, el empleo de acidulantes, la inactivación por calor (escaldado) y el uso de algunos inhibidores como los sulfitos (Fennema 2000).

Los principales polifenoles contenidos en el nopal, son los ácidos: ferúlico, vainillínico, p-hidroxifenólico, kampferol, quercetina y sus derivados (Stintzing et. Al., 2005). Sin embargo, no existen evidencias, para señalar a alguno de ellos como el responsable del pardeamiento en el nopal. El mecanismo por el cual se oxidan estos compuestos es similar al presentado en el punto 2.3.5 en la oxidación de la catequina.

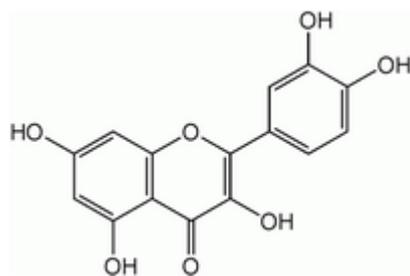


Figura 13.- Estructura de la quercetina.

2.3.5 Aplicaciones

A nivel industrial, las peroxidasas son utilizadas con diversos fines y con diferentes propósitos. Un ejemplo clásico del uso de estas enzimas, es en la elaboración de té negro, el cual se obtiene con una mal nombrada, fermentación. Esta operación se lleva a cabo después de la cosecha de las hojas, y consta de generarles ligeras rupturas para promover su pardeamiento (Tucker 1991).

Los cambios más evidentes durante la fermentación es el color, el cual se hace notoriamente más intenso. Este fenómeno se realiza, debido a las altas cantidades de catequina contenidas en el té (30% de su masa seca), en presencia de la peroxidasa y polifenoloxidasa (Tucker 1991).

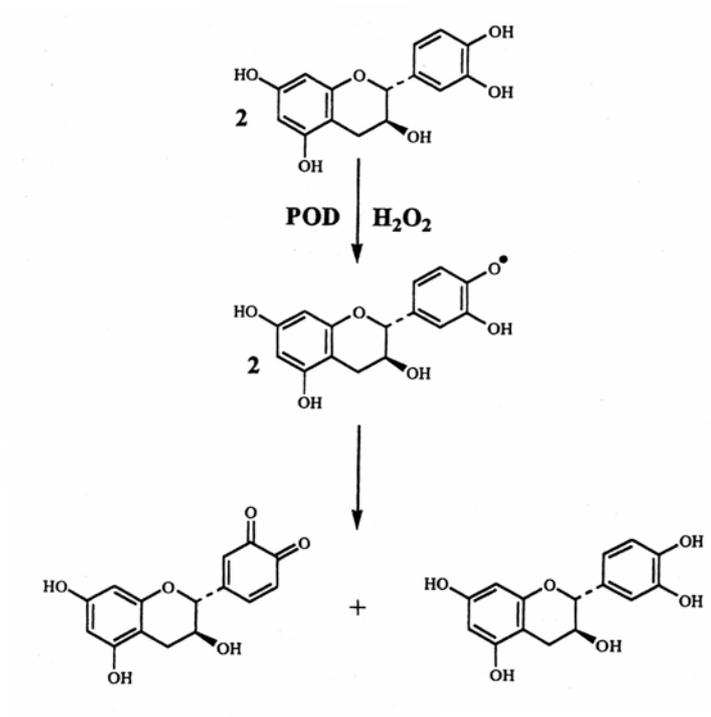


Figura 14. Oxidación de la catequina por medio de la peroxidasa. (2: Catequina)

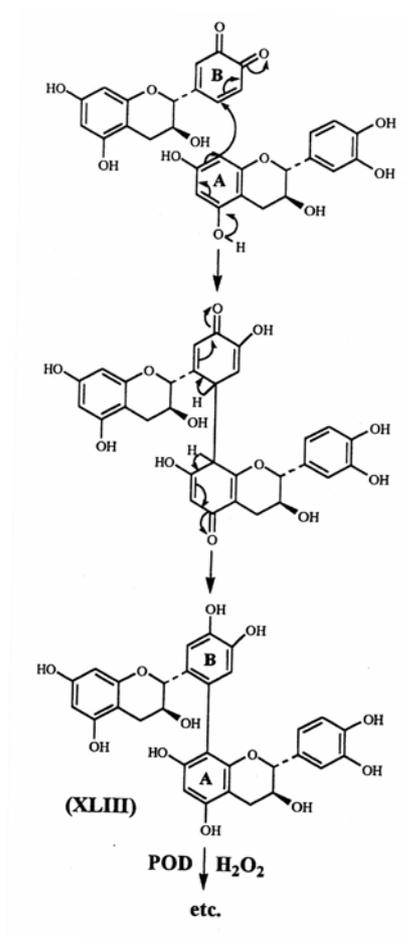


Figura 15. Formación de polímeros de catequina. (XLIII: polímero de catequina).

En la figura 13, podemos observar el mecanismo por el cual la peroxidasa oxida a la catequina(2) formando un radical libre, el cual es estabilizado por la formación de enlaces oxo. En la figura 14, se ilustra la dimerización espontánea, estos dímeros son nuevamente oxidados en la presencia de la peroxidasa para formar polímeros de catequina.

La más termoestable de las enzimas de hortalizas es la peroxidasa (con valores z entre 15 y 49°C). Motivo por el cual, es utilizada como indicador en el escaldado de frutas y hortalizas. El escaldado es un proceso térmico importante en la preparación de hortalizas y frutas para su enlatado, congelación o deshidratación. En principio, el escaldado tiene como objeto inactivar las enzimas o destruir sus sustratos, como los peróxidos. El escaldado se lleva a cabo calentando el producto a una temperatura fija durante un tiempo determinado, para posteriormente enfriarlo rápidamente. Un mal escaldado permite la presencia de actividad enzimática residual, dando como resultado la aparición de olores, colores y sabores anómalos durante el procesado y almacenamiento(Brennan et. Al., 1998).

En algunos alimentos con la presencia de glucosaoxidasas, la presencia de H_2O_2 es un producto resultante de su tratamiento, o bien debido a determinados procesos de conservación. Un ejemplo es la pasteurización de la leche con H_2O_2 (debido a dificultades tecnológicas). La leche así conservada está también perfectamente indicada para la fabricación de quesos, debido a que el sensible sistema de la caseína puede ser dañado por el aumento de la temperatura. Después de pasteurización, el peróxido sobrante puede ser eliminado con la ayuda de peroxidases o catalasas (Belitz 1988).

Sin embargo, en las leches frescas un ensayo sencillo con peroxidasa y guaiacol puede ser utilizado como prueba de calidad y frescura, ya que la presencia de H_2O_2 en este tipo de productos es asociado con malas prácticas de manufactura.

Como catalizadores hemo, la peroxidasa y la catalasa, aceleran la oxidación del ácido ascórbico a dehidroascórbico. Por tanto, debe tenerse en cuenta la presencia de ambas enzimas en la acción del ácido ascórbico como mejorador de harinas(Belitz, 1988).

Las peroxidases de diferentes fuentes son actualmente utilizadas a nivel investigación. Son aprovechadas para la identificación de proteínas, algunas de ellas, utilizadas como factor diagnóstico de algunas enfermedades, como es el VIH, el cual es diagnosticado por métodos inmunológicos (ELISA), donde se utiliza ABTS y peroxidasa para hacer visible resultados positivos.

Otra aplicación que tiene esta enzima en investigación, es para determinar la actividad antirradical de algunas moléculas antioxidantes. La enzima participa en la formación de un radical libre de ABTS, el cual es posteriormente, es estabilizado por el antioxidante en estudio.

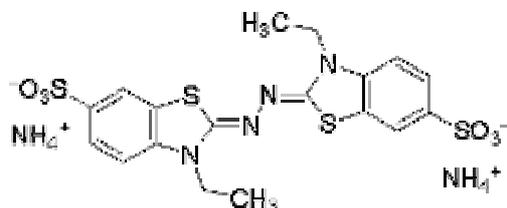


Figura 16. Estructura del ABTS (ácido (2,2' azino(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico)

Otro uso que puede dársele a este tipo de enzimas es en biotransformaciones para generar compuestos bioactivos. Un ejemplo de estas biotransformaciones puede ser la formación de dímeros del ácido ferúlico. En la figura 17, podemos observar el mecanismo por el cual las peroxidadas oxidan al ácido ferúlico, para su posterior dimerización.

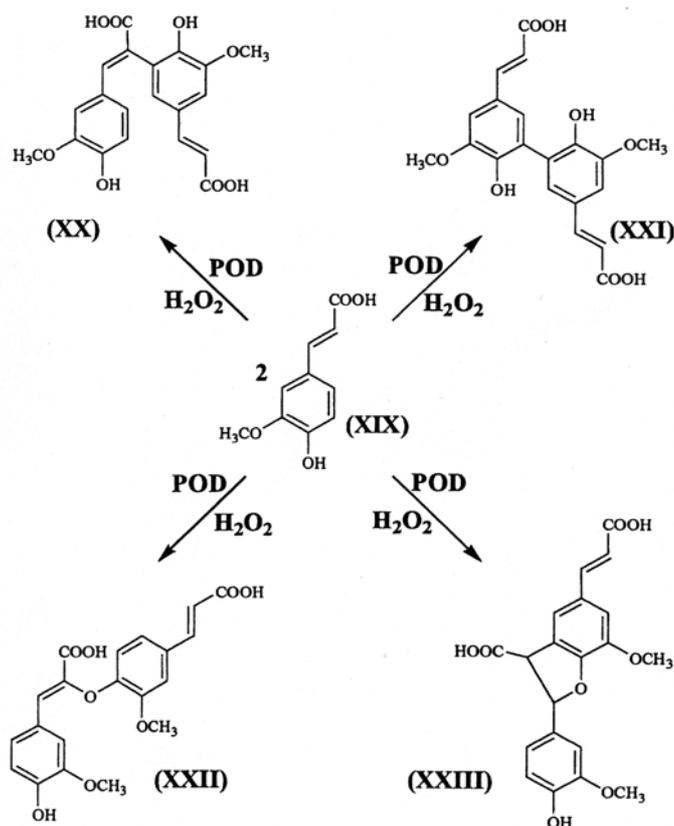


Figura 17. Dimerización del ácido ferúlico por peroxidadas. (XIX: ác. Ferúlico; XX: ácido 8,1-diferúlico; XXI: ácido 5,5-diferúlico; XXVII y XXIII Dehidrodímero del ácido ferúlico.

2.4 Purificación de enzimas.

En estos días de revolución biotecnológica, los requerimientos de proteínas purificadas pueden variar de unos microgramos para caracterización, hasta altas cantidades requeridas para su aplicación en la industria farmacéutica. En dichas aplicaciones resulta indispensable el amplio conocimiento de las proteínas de interés, ya sea para optimizar su obtención o bien simplemente para que los rendimientos en su uso sean los mejores posibles.

2.4.1 Métodos de purificación.

Actualmente existen un gran variedad de métodos de purificación de proteínas, los cuales van desde los más gruesos como serían la precipitación con iones o la precipitación con solventes orgánicos, hasta los métodos cromatográficos, los cuales ofrecen no solo una mayor rentabilidad en su uso sino que también son más flexibles y más sencillos de utilizar. A continuación se explican algunos métodos utilizados para la purificación de proteínas:

a) Precipitación: Las principales fuerzas de atracción que dan a una proteína su conformación estable en un estado de mínima energía son: ion-ion, ion-dipolo (incluyendo puentes de hidrógeno), fuerzas dipolo-dipolo e interacciones hidrofóbicas. La estructura de una proteína en un tejido, en solución o asociadas con fibras insolubles, esta influenciada por la naturaleza del medio acuoso determinado por la presencia de otras moléculas o algunos iones. El agua, ofrece una interacción bipolar con la proteína, así como con otras sustancias en el medio. Los iones en el medio afectan de una manera competitiva las interacciones iónicas con el polipéptido. Las sustancias hidrofóbicas en el medio, pueden atacar directamente los centros hidrofóbicos de las proteínas, dando como resultado una reorganización de el agua alrededor de la proteína y generando polímeros de proteína que precipitan. De igual manera, al alterarse la cantidad de agua disponible por la adición de un ion altamente hidrofílico (como las sales de sulfato de amonio), la proteína se encuentra en una situación desfavorable, ocasionando que los grupos hidrofóbicos se expongan y los polipéptidos generen polímeros proteicos que precipitan. Una vez precipitada la

proteína, se lleva a cabo una centrifugación, donde la proteína se encuentra en el precipitado y puede ser separada fácilmente del sobrenadante por una decantación.

b) Métodos cromatográficos.

Existe una gran variedad de métodos cromatográficos en la purificación de proteínas. La diversidad de ellos, radica en las diferentes propiedades de los polipéptidos que quieran ser aprovechados. En la mayoría de los casos no basta con hacer uso de un solo método, por lo tanto para obtener mejores resultados es necesario hacer diferentes combinaciones de estos procedimientos. A continuación se enlistan algunos métodos cromatográficos:

-Filtración en gel: Dado que las proteínas son polipéptidos, una de las características que las hace diferentes entre sí es su peso molecular y tamaño. Esta es una cualidad que es aprovechada para su separación. La filtración en gel separa moléculas dependiendo de su tamaño. A diferencia de la cromatografía de intercambio iónico o la cromatografía de afinidad, las moléculas no se unen al medio cromatográfico por lo que la composición del buffer no afecta la resolución (grado de separación entre una especie proteica y otra). Una de las principales ventajas que ofrece este método es que las condiciones (tamaño del poro en la resina) pueden variarse dependiendo de los requerimientos de la muestra.

Para desarrollar una mejor separación, el medio de filtración es empacado en una columna para formar una cama. La matriz porosa es formada por partículas esféricas que han sido seleccionadas por su estabilidad física y química. La cama de filtración es equilibrada con un buffer que llena los poros de la matriz y los espacios entre las partículas. El líquido dentro de los poros es referido comúnmente como la fase estacionaria, y el líquido que se encuentra en equilibrio con el líquido fuera de las partículas es conocido como la fase móvil.

Sephadex G-10, G-25 y G-50 son usadas para la separación en un sistema en el cual se encuentran moléculas de diversos tamaños. Las moléculas más grandes son separadas en o justo antes del volumen de exclusión V_0 (primeras fracciones, antes de que se de la separación), debido a que pasan a través de la columna al mismo flujo que el buffer. Las pequeñas moléculas como algunos iones tienen un total acceso a los poros de la resina y se desplazan en todas las partículas de la columna, pero no pueden separarse entre ellos. Estas moléculas generalmente son eluidas después del volumen

total de la columna (V_t). Una vez separadas las proteínas, son detectadas monitoreando su absorbancia en la zona del UV, generalmente a 280 nm. En caso de separar una enzima, puede obtenerse la actividad de las fracciones con pico en el cromatograma (registro gráfico del contenido de proteína en cada fracción).

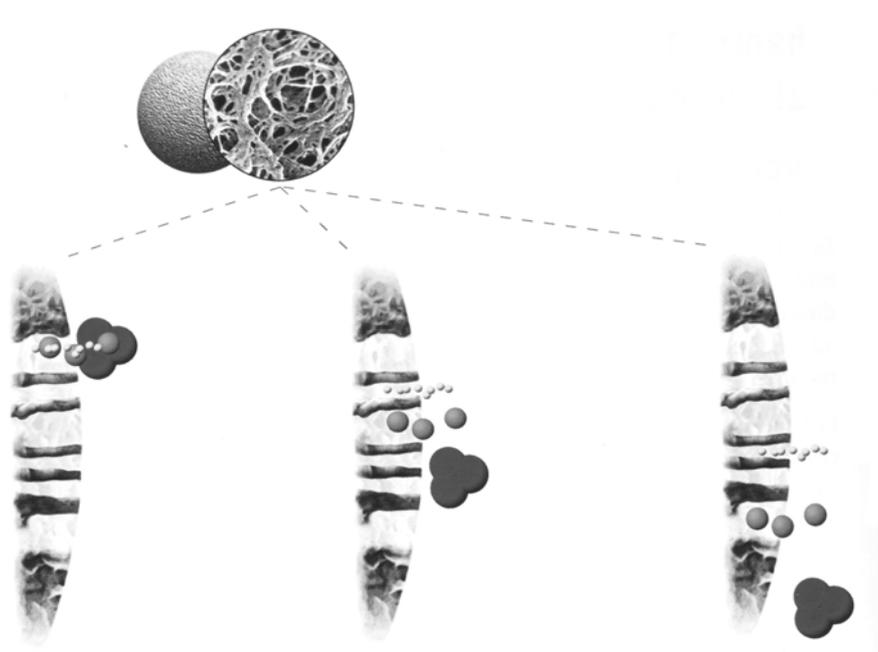


Figura 18. Representación del flujo de moléculas en una filtración en gel. Se observa que las moléculas llegan a la matriz porosa y que las moléculas pequeñas entran a los poros, mientras que las moléculas grandes no entran.

- Cromatografía de intercambio iónico.

Las proteínas pueden separarse también en función de su carga eléctrica mediante la cromatografía de intercambio iónico. Si una proteína tiene a pH de 7 una carga positiva, normalmente se unirá a una columna con una resina con grupos carboxilato, mientras que una proteína cargada negativamente no lo hará. Una proteína con carga positiva unida a la columna, puede ser eluida aumentando la concentración de cloruro de sodio u otra sal en el tampón eluyente. Los cationes de sodio compiten con los grupos positivos de la proteína en su capacidad de unirse a la columna. Las proteínas de baja densidad de cargas positivas se eluirán primero, seguidas por las de mayor densidad de carga. Otros factores, además de la densidad de carga, son la afinidad por la matriz soporte, que también influye en el comportamiento de las proteínas en este tipo de columnas. Para separar las proteínas con carga negativa (aniónicas) se utilizan columnas con resinas cargadas positivamente, como, por ejemplo, dietilaminoetilcelulosa (DEAE-celulosa). Inversamente las proteínas

positivas (catiónicas) pueden separarse por columnas negativas, como las de carboximetilcelulosa (CM-celulosa).

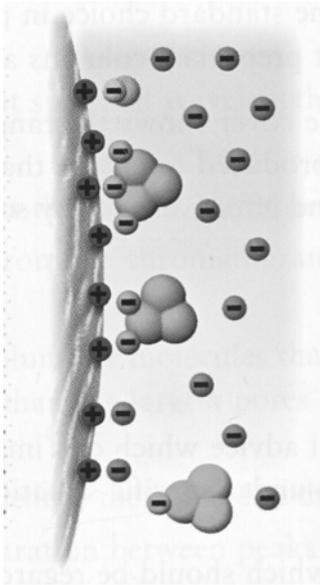


Figura 19.- Esquema de una cromatografía de intercambio iónico con una resina catiónica. La resina con carga positiva, atrapa a las moléculas con carga negativa.

-Cromatografía de afinidad: Este es otro medio poderosos, y en general útil para purificar proteínas. Esta técnica utiliza la elevada afinidad de muchas proteínas para grupos químicos específicos. Por ejemplo, la concanavalina A, una proteína vegetal puede purificarse pasando el extracto crudo a través de una columna que contenga residuos de glucosa entrelazados covalentemente. La concanavalina A se adhiere a esta columna a causa de su afinidad por la glucosa, mientras que la mayoría de las otras proteínas no son adsorbidas. La proteína adherida puede ser liberada de la columna mediante la adición de una disolución concentrada de glucosa. La glucosa disuelta desplaza a los residuos de glucosa unidos a la columna de los puntos de enlace con la concanavalina A. En general, la cromatografía de afinidad puede ser eficaz para aislar una proteína capaz de reconocer un grupo X mediante los siguientes pasos: (1) unión covalente de X o un derivado suyo a la columna, (2), adición de una mezcla de proteínas a esa columna, lavando a continuación para separar las proteínas no enlazadas, y (3) elusión de la proteína deseada de una concentración elevada de una forma soluble de X.

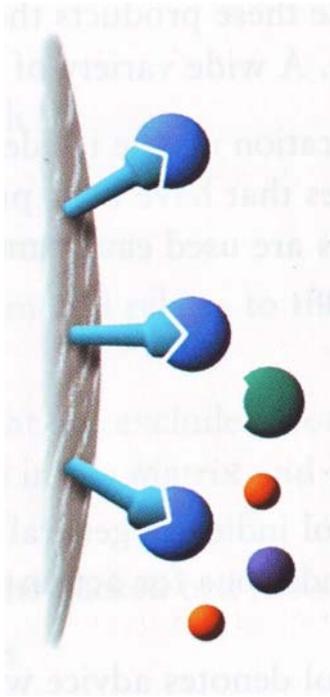


Figura 20. Cromatografía de afinidad. Se observa que las moléculas con afinidad (semicírculos azules) por la columna (varillas azul claro) se adhieren, mientras que las otras moléculas no lo hacen.

-Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC): Las interacciones hidrofóbicas son un fenómeno de gran significado biológico. Estas fuerzas son unas de las que mantienen a las proteínas en su estructura tridimensional. También participan en las reacciones antígeno-anticuerpo y enzima-sustrato.

Una interacción hidrofóbica (HI) es la repulsión entre un compuesto no polar y un ambiente polar (como agua). Cuando un compuesto no polar es colocado en agua, se obtienen condiciones energéticas desfavorables. El compuesto hidrofóbico obliga a su entorno acuoso a rodearlo de una manera ordenada formando así una cavidad.

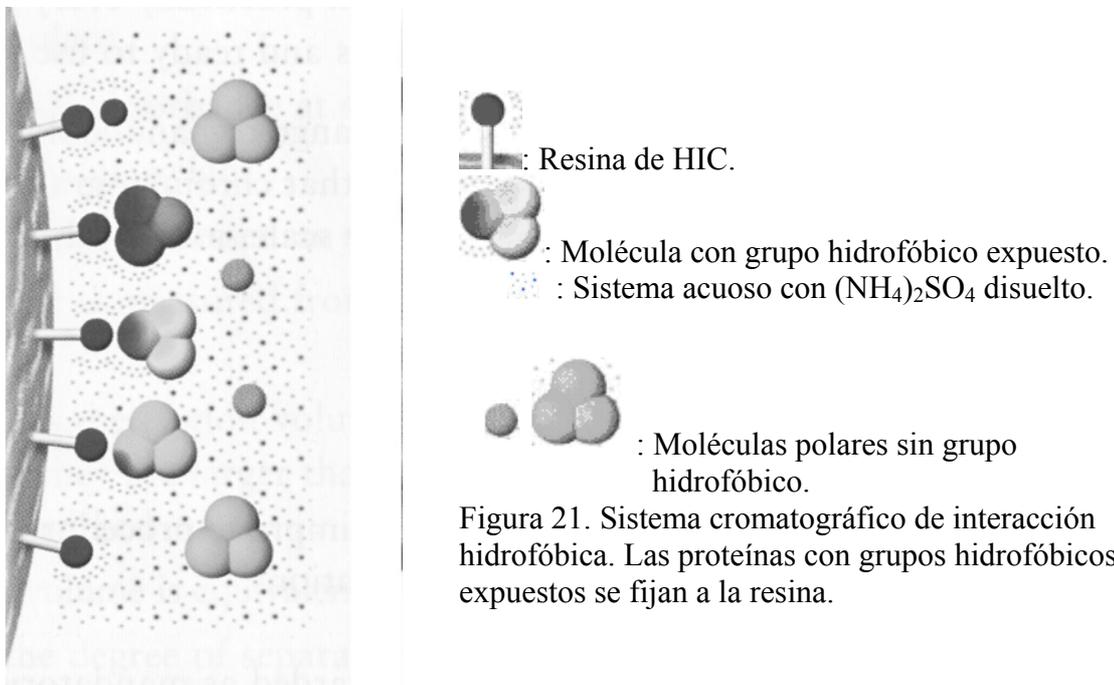
Si dos compuestos no polares son colocados en agua, ellos se agregarán espontáneamente. Esta agregación es llamada interacción hidrofóbica y es energéticamente favorable por la ganancia en entropía.

Dado que es la estructura del agua la que crea las HI's, si uno cambia su estructura disolviendo sales o compuestos orgánicos en ella, estas interacciones se verán afectadas. En pocas palabras, al aumentar la fuerza iónica, también se aumentan las HI's. Los aniones y cationes pueden enlistarse de manera decreciente según su capacidad para generar HI's:

Tabla 8. Ordenamiento de iones por su decreciente capacidad para formar interacciones hidrofóbicas en soluciones acuosas.

	Aniones	Cationes
(+)	PO_4^{3-}	NH_4^+
	SO_4^{2-}	Rb^+
	CH_3COOH^-	K^+
	Cl^-	Na^+
	Br^-	Cs^+
(-)	NO_3^-	Li^+
	ClO_4^-	Mg^{2+}
	I^-	Ca^{2+}
	SCN^-	Ba^{2+}

Si uno coloca a una solución acuosa, donde se encuentran presentes proteínas, una cantidad de sulfato de amonio, los grupos hidrofóbicos de las proteínas se verán expuestos por tener una gran competencia por el disolvente. Si esta solución es pasada a través de una resina de HIC, las proteínas se fijarán a la resina, las cuales pueden ser retiradas pasando un buffer en el que la concentración de iones sea menor a la inicial (pasando un gradiente negativo en la concentración de sulfato de amonio).



2.4.2 Criterio de pureza (electroforesis).

Una molécula con carga se desplaza en un campo eléctrico. Este fenómeno, llamado *electroforesis*, ofrece un método poderoso para separar las proteínas y otras macromoléculas, tales como el DNA y RNA. La velocidad (v) de migración de una proteína (o de cualquier otra macromolécula) en un campo eléctrico depende de la fuerza del campo, de la carga neta de la proteína y del coeficiente de fricción.

Las proteínas pueden separarse muy bien, según sus masas moleculares, utilizando electroforesis sobre un gel de poliacrilamida, en condiciones desnaturizantes. La mezcla de proteínas se disuelve primero en un medio con dodecilsulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico capaz de romper casi todas las interacciones no covalentes en las proteínas nativas. También se añade mercaptoetanol o ditioneitol para reducir los puentes disulfuro. Los aniones de SDS se unen a la cadena principal a razón de un SDS por cada 2 aminoácidos, lo que da al complejo SDS-proteína desnaturizada una carga negativa aproximadamente proporcional a la masa de la proteína. Los complejos SDS-proteína se someten entonces a una electroforesis sobre gel de poliacrilamida, que normalmente se utiliza como un bloque delgado dispuesto verticalmente. La dirección de la electroforesis es vertical descendente. Por último, las proteínas pueden visualizarse sobre el gel tiñéndolas con plata o con un colorante tal como el azul de Coomassie, que revela una serie de bandas.

Las proteínas pequeñas se desplazan rápidamente a través del gel, mientras que las grandes permanecen arriba, cerca del punto de aplicación de la mezcla. Esta relación empírica no es universal; algunas proteínas ricas en azúcares y las proteínas de membrana migran de forma anómala. Cuando se tiñe con azul de Coomassie, basta 0.1 μg de proteína (aprox. 2 pmol) para dar una banda diferenciada, mientras que con tinción de plata se necesita menor cantidad (aprox. 0.02 μg). Pueden habitualmente distinguirse entre sí proteínas que difieran en su masa sólo en un 2% (p. Ej., 40 y 41 kDa, lo que supone una diferencia aproximada de 10 residuos).

En base a lo anterior, con una electroforesis puede determinarse la variedad de proteínas que existen en una solución. Es decir, si colocamos una alícuota de un

extracto podemos determinar cuantas proteínas existen dependiendo del número de bandas que se presenten al realizar la tinción del gel.

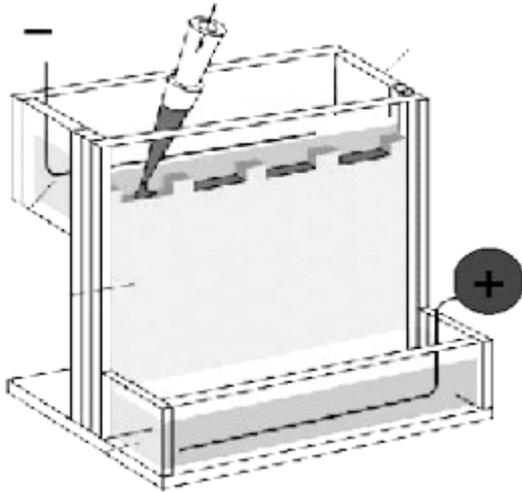


Figura 22. Equipo para electroforesis. Se presenta un gel de poliacrilamida que está siendo cargado con proteína.

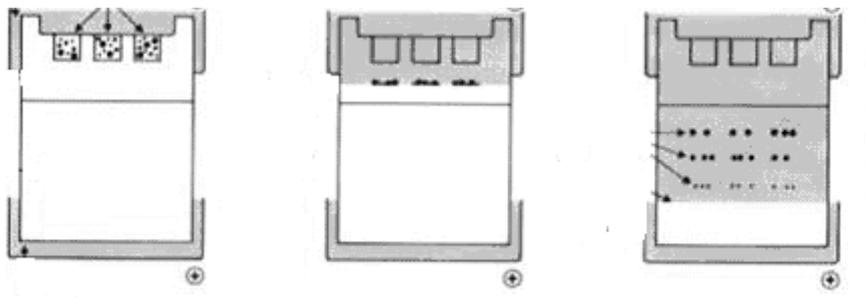


Figura 23. Corrimiento de un gel de electroforesis. Carga de proteína, migración y las proteínas separadas.

2.4.3 Caracterización de enzimas

A nivel de investigación, la purificación de enzimas es utilizada principalmente para poder evaluar el comportamiento de la enzima frente a diferentes condiciones, de tal manera que su aplicación se lleve a cabo en óptimas condiciones. Algunas de las características que resulta indispensable conocer son:

-Concentración de enzima: Se varía la cantidad de enzima adicionada a la cubeta de ensayo y se determina cual es la cantidad de enzima mínima que presenta un óptimo de actividad. Este ensayo es útil cuando se requiere caracterizar la enzima usando un mínimo de la misma.

-pH óptimo de actividad: En este ensayo se evalúa el efecto que tiene el pH y el uso de diferentes amortiguadores en la actividad de la enzima en estudio. Este ensayo,

tiene la finalidad de cómo se comporta la enzima a diferentes condiciones de acidez o basicidad, dándonos una idea de las condiciones óptimas para manejarla.

-Temperatura óptima: Se realizan ensayos de actividad a diferentes temperaturas, para conocer a que temperatura se obtiene la mayor actividad de la enzima. También nos habla de manera ambigua y no directa de la estabilidad de la proteína.

-Estabilidad a temperatura: En este ensayo se evalúa la pérdida de la actividad enzimática con respecto al tiempo a una temperatura constante. Este ensayo puede realizarse a diferentes temperaturas. Es aquí donde podemos conocer bajo que temperatura de almacenamiento se conserva la mayor actividad o bien, en caso de requerirse a la enzima activa durante un largo periodo de tiempo, cual es la temperatura a la que se debe trabajar.

-Estabilidad a pH: Este ensayo se lleva a una temperatura constante y se evalúa la pérdida de la actividad enzimática después de un tiempo de incubación a pH's dados. El pH de mayor estabilidad no es necesariamente el óptimo de actividad.

-Efecto de iones: Aquí se evalúa que efecto puede tener la presencia de algunos iones a diferentes concentraciones, utilizando un blanco de actividad y un blanco con EDTA. Cabe mencionar que no todas las enzimas reaccionan igual a la presencia de iones. Por lo cual la selección en el rango de concentraciones que se usará será establecida por los resultados obtenidos. Aquí pueden encontrarse algunos inhibidores o activadores de la(s) enzimas en estudio.

-Determinación de K_m y V_{max} : Sin lugar a dudas, estos 2 parámetros son los que nos ofrecen un mayor conocimiento de la enzima. Son llevados a las condiciones óptimas de los ensayos anteriores variando únicamente la concentración del sustrato. La V_{max} , nos revela el número de moléculas convertidas en producto por unidad de tiempo por una molécula de enzima cuando éste está totalmente saturado de sustrato. La K_m que es el valor de concentración de sustrato a la cual la mitad de los sitios activos están ocupados. En otras palabras, K_m es igual a la constante de disociación del complejo enzima-sustrato.

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

- Purificar y caracterizar la peroxidasa obtenida de un residuo generado durante el desespinado del nopal. Así como evaluar su capacidad para realizar biotransformaciones de ácidos hidroxicinámicos.

3.2 Objetivos específicos.

- Determinar los niveles de peroxidasa en los residuos obtenidos a partir de nopales en diferentes estados de madurez.
- Diseñar un protocolo experimental para la purificación de la peroxidasa.
- Obtener pH, temperatura óptima de actividad de las enzimas purificadas, así como el efecto de algunos iones.
- Determinar los valores de K_m y V_{max} de la enzima purificada utilizando diferentes sustratos.
- Evaluar la capacidad, de la peroxidasa contenida en el residuo estudiado, para dimerizar los ácidos ferúlico, cumárico y caféico.

4. HIPÓTESIS.

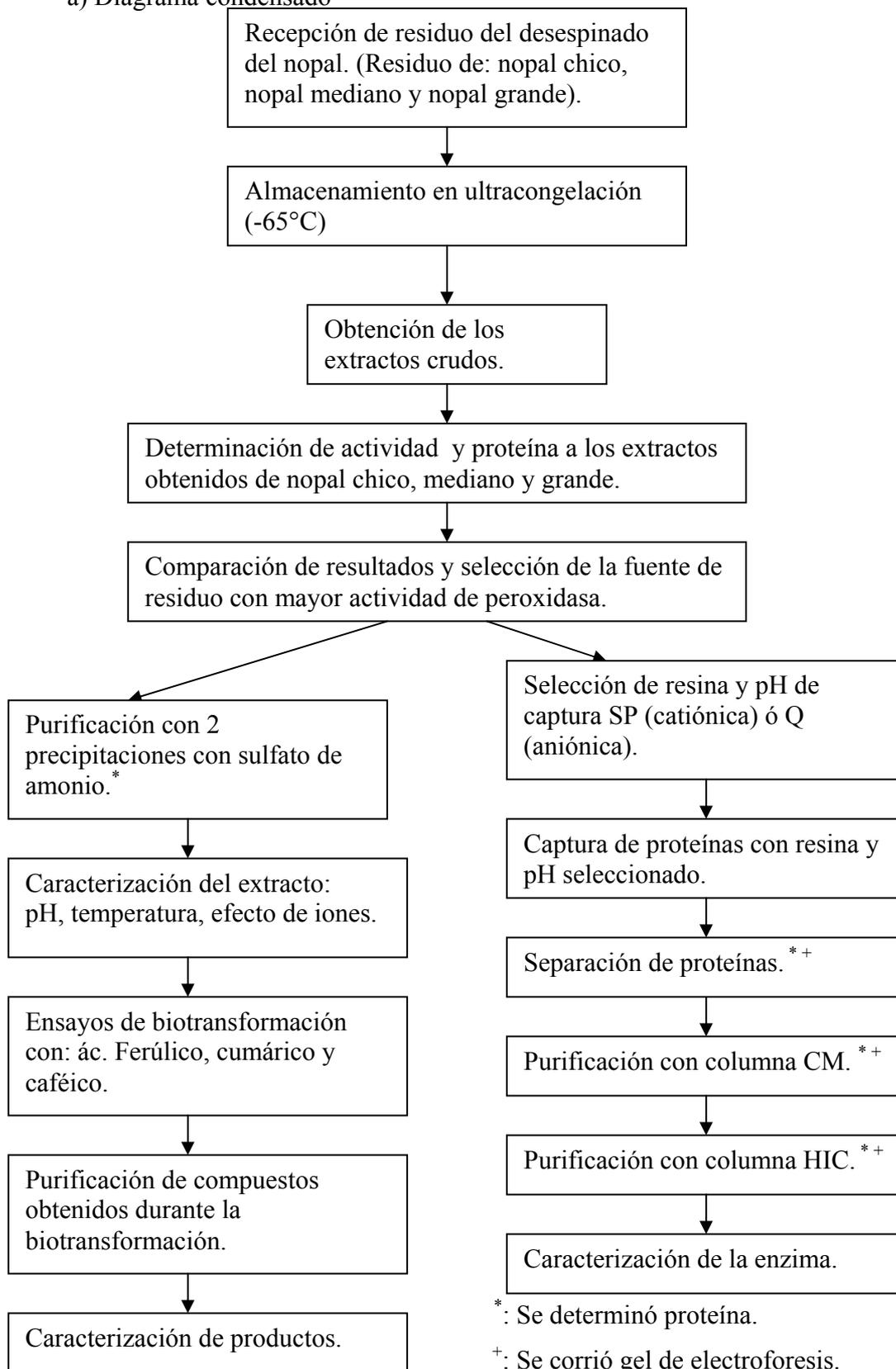
- Si el pardeamiento enzimático, en el nopal, es debido a peroxidasas. Entonces dicha enzima, puede obtenerse de los tejidos generados como residuo en el desespinado del nopal.

- Utilizando un extracto con actividad de peroxidasa, obtenido a partir de un residuo generado durante el procesamiento del nopal, se pueden llevar a cabo dimerizaciones de los ácidos hidroxicinámicos: caféico, ferúlico y cumárico.

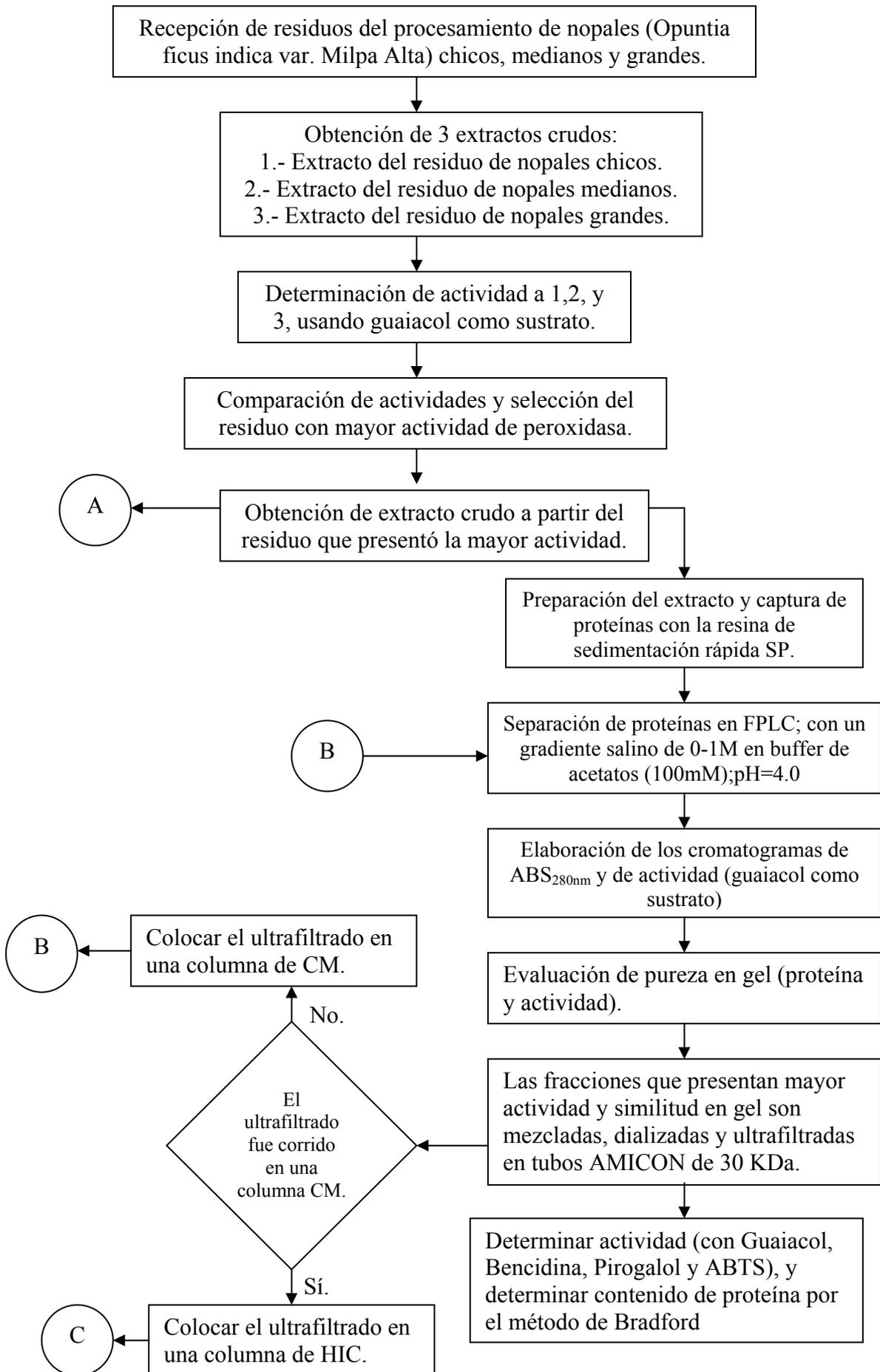
5. MÉTODOS

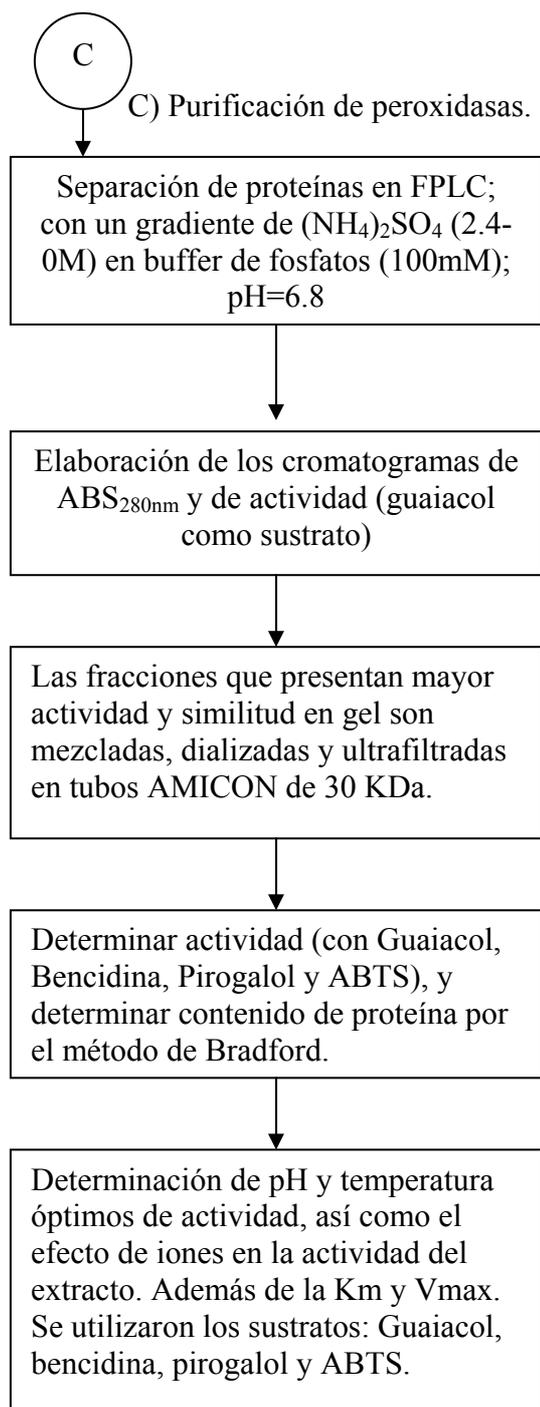
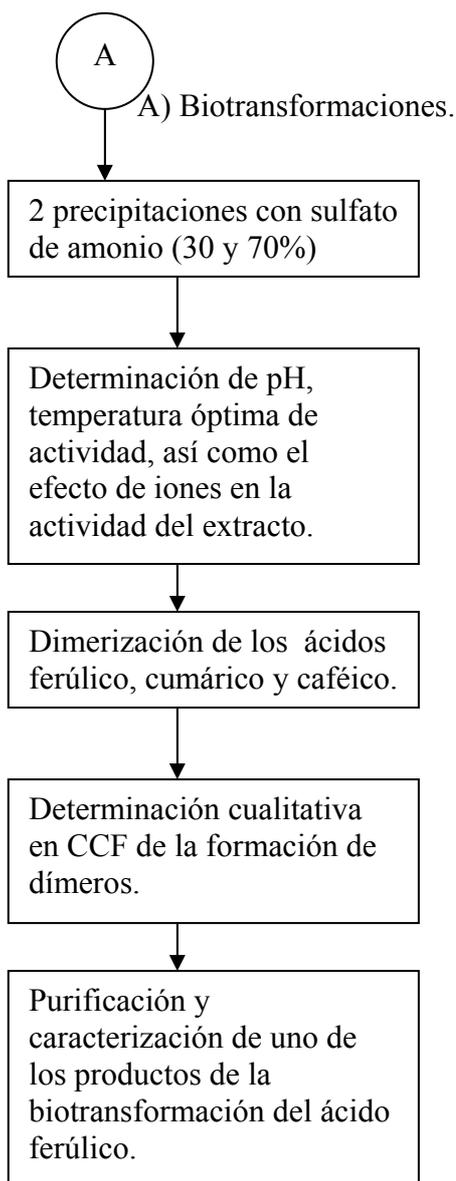
5.1 Diagrama general de la investigación.

a) Diagrama condensado



b) Diagrama desarrollado





5.2.2 Metodología

El residuo del procesamiento del nopal, se refiere al tejido que se obtiene durante el desespinado de nopales frescos.

Todas las muestras fueron almacenadas en ultracongelación (-65°C) hasta el momento del análisis.

Obtención del extracto crudo: En esta etapa se mantuvo en baño de hielo todas las fracciones para evitar pérdidas de actividad.

Se tomó una parte del residuo del procesamiento de nopal de cada tipo de nopal (chico, mediano y grande) y se molió en licuadora con 3 partes de buffer de fosfatos (100mM; pH= 6.8) durante 1 minuto. Los extractos obtenidos fueron filtrados con gasa para eliminar partículas sólidas de gran tamaño, posteriormente el sobrenadante fue filtrado al vacío con una cama de celita con la finalidad de eliminar partículas sólidas pequeñas y algunas partículas responsables de la coloración. Finalmente el filtrado fue centrifugado a 10,000 rpm durante 15 min. a 4°C, en una centrífuga Beckman.

Comparación de la actividad en residuos del desespinado de nopales en diferente estado de madurez: Dado que se procesan nopales en diferentes etapas de madurez, definidos por los productores como: nopal chico, mediano y grande, se comparó la actividad de peroxidasa, en los extractos crudos, obtenidos a partir de cada uno de los residuos (de nopal chico, mediano o grande).

A cada extracto crudo se le determinó actividad de peroxidasa usando guaiacol como sustrato.

Los resultados de actividad fueron comparados y se seleccionó para el resto del trabajo el residuo que presentó la mayor actividad específica.

Los resultados de actividad específica se expresan en U/mg de proteína. Siendo U la cantidad de micromol de sustrato transformado por segundo.

Protocolo de purificación:

Preparación de buffer y soluciones para el FPLC: Todos los buffer preparados para trabajar en este equipo fueron filtrados con equipo millipore en membrana de 0.45µmm, y posteriormente fueron desaireados durante 30 min en un sonicador.

- a) Selección de la resina de captura: Se tomaron 6 fracciones de un extracto purificado con sulfato de amonio y se dividieron en 3 lotes de 2 fracciones cada uno, los cuales se utilizaron de la siguiente manera:
- Lote 1: Consta de los blancos. Son las fracciones a las que no se le aplicó ninguna resina. Fueron almacenados durante una noche a pH 4.0 y 6.0 respectivamente a 4°C y con agitación constante.
 - Lote 2: A estas fracciones se les aplicó la resina aniónica de sedimentación rápida Q al 1%_{v/v}. Fueron almacenados en las mismas condiciones que los blancos.
 - Lote 3: Este lote fue tratado de la misma manera que al lote 2, la diferencia radica en el tipo de resina aplicada, en este caso se utilizó una resina catiónica SP.

Después del tiempo de incubación, la resina fue removida y se le determinó actividad a los sobrenadantes. La resina y el pH seleccionado para la captura de la enzima, fueron aquellos en los que el sobrenadante presentó una menor actividad.

Con la finalidad de comprobar que la resina seleccionada retuvo la enzima de interés, esta fue lavada con 15 ml de buffer de acetatos pH=4.0 y 1 M de NaCl. El extracto obtenido fue dializado, se le determinó actividad (usando guaiacol como sustrato), así como el contenido de proteína.

b) *Purificación:*

b.1) Captura y obtención de la enzima: Este paso tiene como finalidad separar y concentrar la peroxidasa de otras proteínas, y de la fase líquida del extracto crudo. Una de las cualidades que ofrece este método es que es altamente eficiente y muy sencillo de utilizar.

Se utiliza un extracto crudo obtenido a partir del residuo del desespinado de nopales chicos. El extracto obtenido es diluido 1:1 con agua desionizada, y ajustado a pH: 4.0 con ácido sulfúrico al 1%. A este diluido se le agregó el 1%_{v/v} de la resina de sedimentación rápida SP, y se mantiene en agitación toda la noche, a 4°C.

La resina es colocada en una columna, montada sobre un equipo de cromatografía líquida de separación rápida (FPLC). Una vez teniendo empacada la columna, fue prelavada con 5 ml de buffer de acetatos 100 mM;

pH=4.0, y eluida con un gradiente positivo en la concentración de NaCl de 0-1 M durante 80 min, a un flujo de 1 mL/min. Una vez finalizado el gradiente, se pasaron por la columna 20 mL más de buffer pH 4.0 y 1 M de NaCl. Se colectaron 110 fracciones, a las cuales se les realizó un cromatograma, estimando la cantidad de proteína, leyendo ABS a 280 nm. A las fracciones con mayor ABS_{280nm} , se les determinó actividad. Las fracciones con mayor actividad fueron mezcladas y ultrafiltradas en un tubo Amicon, hasta obtener un volumen final de 250 μ L. El sobrenadante, el cual contiene las proteínas de un peso molecular mayor a 30 KDa, fue dializado durante 4 h.

A este dializado se le determinó el grado de pureza y fue congelado para una nueva purificación.

- b.2) Paso por la columna CM: Dado que la captura anterior muestra una amplia variedad de proteínas, el extracto obtenido en el inciso anterior fue purificado nuevamente. En esta ocasión, se utilizó una columna para la cromatografía de proteínas conteniendo una resina catiónica de carboximetil celulosa.

La columna es colocada en el equipo FPLC y lavada utilizando el método sugerido por el fabricante. Posteriormente se aplicó el extracto de captura a la columna y se corrió un gradiente positivo de 0-1 M en la concentración de NaCl durante 60 min., con un flujo de 1 mL/min. Transcurrido los 60 minutos del gradiente, se mantiene el flujo del buffer con 1 M de NaCl durante 20 ml más. De las 65 fracciones obtenidas, se obtuvo el cromatograma a 280 nm y se determinó cuales eran las fracciones con actividad de peroxidasa. Las fracciones con actividad fueron mezcladas y ultrafiltradas en un tubo Amicon, hasta obtener un volumen final de 250 μ L. El sobrenadante, el cual contiene las proteínas de un peso molecular mayor a 30 KDa, fue dializado durante 4 h.

A este dializado se le determinó el grado de pureza y fue congelado para una nueva purificación.

- b.3) Paso por la columna HIC: El extracto obtenido de la purificación con la columna CM, fue purificado nuevamente, utilizando una resina de intercambio hidrofóbico.

La columna fue colocada en el FPLC, y preparada para la purificación, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Al extracto purificado en la columna CM se le agregó sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración

de 2.4 M. Una vez que ha sido preparado el extracto, se coloca en la columna de HIC, la cual es eluida en buffer de fosfatos 100 mM, pH=6.8, con un gradiente de 2.4-0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durante 50 min., a un flujo de 1 ml/min. De las 50 fracciones obtenidas, se obtuvo el cromatograma de absorbancia a 280 nm y se determinó cuales fueron las fracciones con actividad de peroxidasa. Las fracciones con actividad fueron mezcladas y ultrafiltradas en un tubo Amicon, hasta obtener un volumen final de 250 μL . El sobrenadante, el cual contiene las proteínas de un peso molecular mayor a 30 KDa, fue dializado durante 4 h.

Se determinó la pureza del extracto, el cual fue utilizado para la caracterización de actividad.

c) *Criterio de pureza:*

Para evaluar la pureza de la enzima, se utilizaron geles SDS-PAGE.

La preparación de las soluciones necesarias para realizar los geles se encuentran en el Apéndice 1.

Las soluciones del gel separador se mezclaron en un matraz de 25 ml, y fueron adicionadas en el orden en el que se presentan en la tabla 10. Una vez adicionado el persulfato y el TEMED a la mezcla, se transfirió al equipo correspondiente, con la finalidad de evitar la polimerización de la acrilamida en el matraz. Cuando la mezcla se encontraba cargada en el equipo, se adicionaron 100 μL de butanol, esto con el objetivo de evitar el contacto con el oxígeno, el cual podría afectar en la polimerización de la acrilamida. Se dejó reposar durante 1 h o hasta obtener un gel homogéneo. Después de esto, se decantó el butanol y se preparó la solución para el gel concentrador, el cual fue cargado sobre el gel separador, se coloca el peine que formará los pozos de carga y se deja reposar nuevamente durante 1 h.

Una vez preparado el gel, se transfirió a un equipo de electroforesis, donde se colocó en un baño de buffer de corrimiento (APÉNDICE 1).

La muestra a correr, es preparada, por cada carril que se cargará con muestra, colocando 5 μL de muestra y 5 μL del buffer de tratamiento (APÉNDICE 1).

La muestra preparada es cargada en los pozos del gel (10 μL /pozo) y se corrió a 133 mA (33 V) durante 1 h.

c.1) *Tinción del gel SDS-PAGE:*

- Tinción de Coomassie: Transcurrido el tiempo de electroforesis, el gel es transferido a un recipiente y se le agregan 50 ml de azul de Coomassie al 0.025% (APÉNDICE 1), donde es mantenido por 1 h. Inmediatamente el gel es colocado en 50 ml de una solución desteñidora (APÉNDICE 1). Este último paso se mantiene por media hora, y es repetido hasta que se observen bandas bien definidas. En caso de no observarse ninguna banda puede utilizarse el método de tinción con plata, descrito a continuación.
- Tinción con plata: Esta tinción puede realizarse con un gel que ha sido teñido con azul de Coomassie, o bien, con un gel recién salido de la cámara de electroforesis.

En caso de tener un gel previamente teñido: El gel se colocó en un buffer correctivo (APÉNDICE 1), con la finalidad de eliminarle el colorante. Esta etapa puede dejarse durante una noche.

Transcurrido el tiempo correctivo, el gel fue lavado 3 veces con agua desionizada, y colocado durante 15 min. en 100 ml de una solución oxidativa del kit de tinción en plata. Después se realizaron 3 lavados de 2 min. Con 100 ml de agua desionizada cada uno, e inmediatamente se mantuvieron durante 15 min. en el reactivo de plata del kit. Un enjuague con agua destilada y se agregaron 100 mL de la solución reveladora. Esta última etapa se repite hasta la aparición de un precipitado, que formará las bandas respectivas a cada proteína.

La reacción es detenida con 100 ml de una solución de ácido acético al 5%, donde el gel puede almacenarse indefinidamente.

- Zimograma: Un zimograma es un gel SDS-PAGE, el cual después de ser sometido a una electroforesis, es renaturalizado para revelar actividad enzimática.

El gel es preparado y corrido como se mencionó en el punto anterior. Pero en lugar de ser colocado en una solución teñidora, es colocado en 50 ml de buffer renaturalizante 1 X (APÉNDICE 1), donde se mantiene 30 min. Después de este tiempo, se repite la operación un par de veces o hasta que el frente del gel se observe sin colorante.

Finalizada esta etapa el gel es incubado en una solución de buffer de acetatos 100 mM; pH=5.0*, conteniendo 1% de bencidina y 0.3% de H₂O₂. Se mantiene al abrigo de la luz hasta que aparezcan bandas azul oscuro.

*: La variación del pH puede afectar el color de las bandas y la solubilidad de la bencidina.

Caracterización de enzima: La actividad de la enzima fue evaluada utilizando 4 sustratos (Guaiacol, ABTS, Pirogalol y Bencidina), determinando efecto del pH, temperatura, y la presencia de algunos iones. Estos ensayos se llevaron a cabo de la misma forma que la caracterización del extracto purificado con sulfato de amonio, excepto el efecto de iones, el cual se realizó utilizando los iones Fe⁺⁺, Ca⁺⁺, Zn⁺⁺, Na⁺, en concentraciones de 5, 10, 30, 50 y 100 mM.

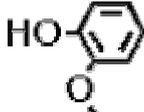
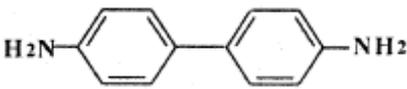
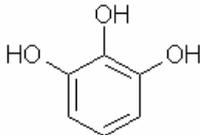
Para la determinación de Km y Vmax se utilizaron, por ser a los que la enzima mostró mayor afinidad, Pirogalol y Bencidina como sustratos. A cada donador de protones se determinó el efecto en la actividad, variando su concentración, y la concentración de H₂O₂.

Ensayos de actividad: Se utilizaron 4 sustratos (Guaiacol, ABTS, Pirogalol, Bencidina) para la determinación de actividad de peroxidasa, el protocolo general se describe a continuación:

En una celda de vidrio se colocaron 200 µL de un stock del donador de protones al 1%_{v/v}, 100 µL de H₂O₂ al 1%, 1.6 ml de buffer de fosfatos (100 mM; pH=6.8) y 100 µL del extracto crudo. Al final se registra el incremento en la absorbancia a 470, 415, 590 y 340 nm (para: guaiacol, ABTS, bencidina y pirogalol respectivamente) cada 10 s durante 5 min., usando $\epsilon_{470}=2.66 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (para guaiacol), $\epsilon_{415}=3.11 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (para ABTS), $\epsilon_{590}=3.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (para bencidina), $\epsilon_{340}=2.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (para pirogalol).

A continuación se enlistan las concentraciones finales y los productos formados en los ensayos de actividad:

Tabla 11. Se muestra la concertación final a la que se usaron los donadores de protones en los ensayos de actividad.

Donador de protones	Concentración del donador en la celda(mM)
Guaiacol 	10.0
ABTS	18
Bencidina 	6.0
Pirogalol 	8.0

Determinación de proteína: Se utilizó un Kit para la determinación de proteína por el método de Bradford. Cada muestra y estándar de la curva patrón se analizaron mínimo por duplicado.

Para realizar la curva patrón, se partió de un stock 1 mg/ml y se tomaron alícuotas para obtener concentraciones de 0, 10, 50 y 100 µg/ml, se agregó el reactivo de Bradford y se ajustó con agua destilada para alcanzar un volumen final de un mililitro, se dejó reaccionar durante 30 min y se leyó en el espectrofotómetro a 595 nm. A continuación se describe la forma en que se realizó esta curva:

Stock (μL)	Proteína (μg)	Reactivo de Bradford (mL)	Agua destilada (mL)	Total (mL)
0	0	0.2	0.8	1.0
10	10	0.2	0.790	1.0
50	50	0.2	0.750	1.0
100	100	0.2	0.700	1.0
200	200	0.2	0.600	1.0

Tabla 12. Curva patrón para la determinación de proteínas.

Al final, se calcula la cantidad de proteína en el tubo de reacción con la siguiente ecuación:

$$ABS_{595nm} = 9.7 \times 10^{-3} (\mu\text{g de proteína}) + 1.45 \times 10^{-2} \dots\dots\dots \text{ecuación 1.}$$

De cada muestra analizada se cargaron 10 μL^a, 200 μL del reactivo de Bradford y se ajustó con agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 1 ml. La reacción se mantuvo durante 30 min y se leyó absorbancia a 595 nm. La cantidad de proteína se determinó utilizando la ecuación 1 y se ajustó según diluciones.

^a: En caso de no obtenerse datos dentro de la curva patrón se efectuaron las diluciones pertinentes.

Precipitación con sulfato de amonio: Este método se realizó a dos niveles de saturación. El primero, se realizó saturando con sulfato de amonio al 30 %, esto se consigue agregando 164 g/L, y manteniendo en agitación durante 4 horas a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 15 min a 4°C. Se eliminó el precipitado, y el sobrenadante fue saturado nuevamente al 70% agregando 249 g/L, manteniéndolo en agitación toda la noche a 4°C. Se centrifugó a 8000 rpm durante 15 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en el mínimo volumen necesario de buffer de fosfatos 100 mM pH=6.8; se dializó toda la noche a 4°C. El dializado se mantuvo en congelación hasta el momento de su uso.

La caracterización del extracto obtenido en el inciso c, se caracterizó de la siguiente manera:

-pH: Se realizó un barrido de actividad con buffer de acetatos 100 mM para los pH's de 3.5-5.5, y buffer de fosfatos 100 mM para los pH's de 6-7.

-Temperatura: Se llevó a cabo un barrido de actividad a diferentes temperaturas, controladas a lo largo de todo el ensayo. El rango de temperaturas evaluado fue de; 20-65°C, con incrementos de 5°C.

-Efecto de iones: Se evaluó el efecto de, EDTA, Ca⁺⁺, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺ y Mg⁺⁺, en la actividad de la peroxidasa. Este ensayo se realizó agregando a 1 ml del extracto enzimático, un volumen de un stock 0.5 M de cada ion para obtener concentraciones de

10, 30, 50, 70 y 100 mM, y ajustando a 1.5 ml con buffer de acetatos 100 mM pH=4.5. Para el caso del EDTA solo se estudió el efecto a una concentración de 100 mM.

Biotransformaciones: 1 g de ácido hidroxicinámico (en caso de los ensayos efectuados con mezclas de estos ácidos, se colocaron cantidades equimolares que sumarán 1 g final) disuelto en 25 ml de acetona, se aforaron a 125 ml con buffer de acetatos 100 mM; pH= 4.5. Se adicionó un volumen del extracto enzimático igual a 2 mg de enzima, y 400 μ L de peróxido de hidrógeno. Al observar la formación color rojizo, es indicador de que la reacción se lleva a cabo. Al desaparecer el color rojo de la solución, se agregaron nuevamente 400 μ L de H₂O₂. Esta operación, será repetida hasta que ya no exista la formación del color rojo.

Se realizaron 3 extracciones con 15 ml de acetato de etilo cada una, y posteriormente se llevó a sequedad en rotavapor a 40 °C. Una alícuota del producto seco fue disuelta en acetona, y se analizó la presencia de productos por medio de una cromatoplaca, eluida con una mezcla cloroformo:ácido acético (9:1).

El producto de la biotransformación del ácido ferúlico fue corrido 2 veces en una cromatoplaca preparativa, usando como eluyente una mezcla diclorometano:metanol (8:2). Se cortó la banda correspondiente a un dímero, extrayéndolo en acetato de etilo y llevado a sequedad para su análisis en resonancia magnética nuclear y espectroscopia de masas.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD EN RESIDUOS DEL DESESPINADO DE NOPALES EN DIFERENTE ESTADO DE MADUREZ:

Con la finalidad de determinar si la madurez del nopal, del cual es desprende el residuo utilizado, afecta los niveles de actividad de peroxidasa, se determinó actividad al residuo obtenido a partir de nopales en diferente estado de madurez. Los resultados reflejan que: el residuo con mayor actividad es el obtenido a partir de nopales chicos, mientras que el residuo obtenido de nopales grandes es el menos activo.

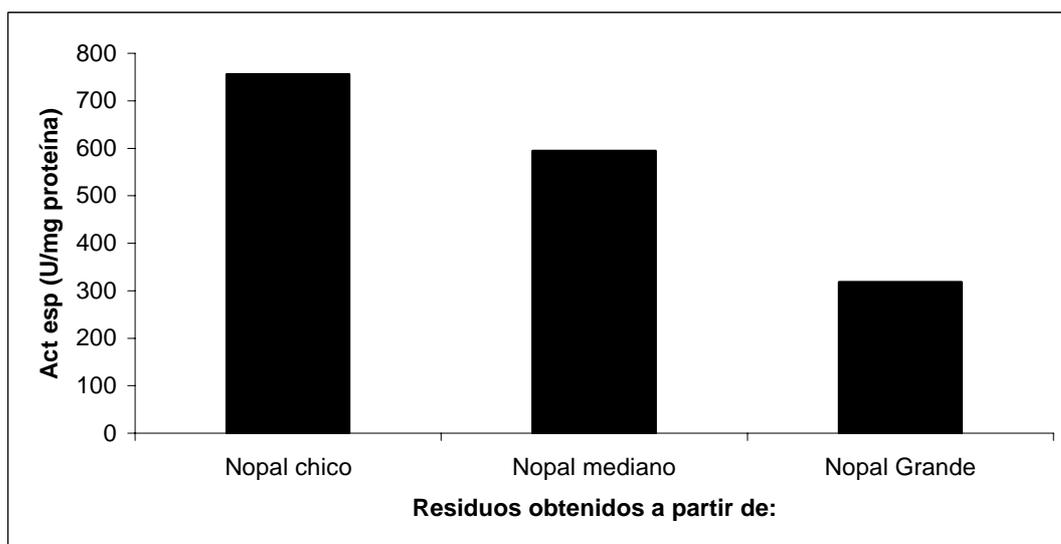


Figura 24.- Se presenta comparativamente la actividad obtenida de 3 extractos, obtenidos a partir de un residuo generado durante el procesamiento de nopales en diferente etapa de maduración.

El residuo obtenido del desespinado de nopales chicos, presentan mayor actividad de peroxidasa con respecto al obtenido de nopales medianos o grandes. Este efecto se debe a que, en etapas tempranas de maduración del nopal se requiere una alta actividad de peroxidasa para la biosíntesis y protección de la planta. Este es un efecto que se ha observado en los plátanos, en los cuales la mayor actividad se da durante la maduración y disminuye alcanzada la madurez (Kaur, 1989).

6.2 **PURIFICACIÓN:** Con la finalidad de conocer más finamente la peroxidasa contenida en el residuo en estudio, esta fue purificada por métodos cromatográficos, utilizando resinas de intercambio iónico y de HIC. Dicha purificación se llevó a cabo en 3 etapas.

La primera etapa consta de la separación de las peroxidases contenidas en el extracto crudo. Dicha separación debía realizarse con el mayor rendimiento posible, para lo cual se probaron dos resinas de intercambio iónico, una catiónica (SP) y una aniónica (Q), a diferentes pH's. Los resultados para la selección de la resina de captura se muestran a continuación:

a) *Selección de la resina de captura:*

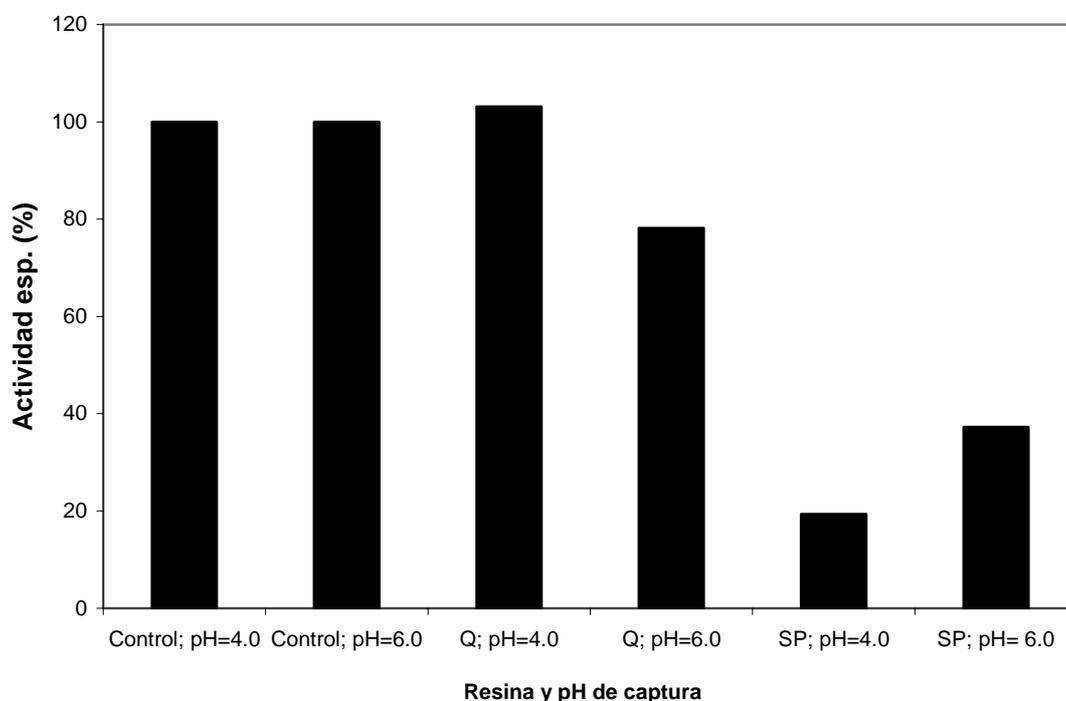


Figura 25. Se presenta las actividades residuales (%), después de la incubación con resinas de captura de 6 extractos enzimáticos a diferentes pH's

Se puede observar que: al incubar el extracto con la resina SP a pH=4.0 durante una noche, y posteriormente separar la resina de la fase líquida, el extracto presenta solo el 20 % de la actividad inicial. Mientras que, al extraer la enzima de la resina se obtuvo un extracto enriquecido en actividad (3322 U/mg). Por lo tanto la captura se llevó a cabo con SP a pH=4.0.

Una vez seleccionada la resina de captura, esta se adicionó a un extracto obtenido a partir del residuo generado durante el desespinado del nopal, y se dejó en

agitación una noche. Transcurrido el tiempo de captura, se colocó en una columna y se procedió a la separación de la peroxidasa. Obteniendo los siguientes resultados:

b) *Cromatografía de intercambio iónico*: Con la finalidad de lograr la separación de las peroxidasas contenidas en el extracto crudo, se utilizó la resina SP, la cual, de acuerdo a los resultados obtenidos, fue la más apropiada. Dicha proceso, entregó el siguiente cromatograma:

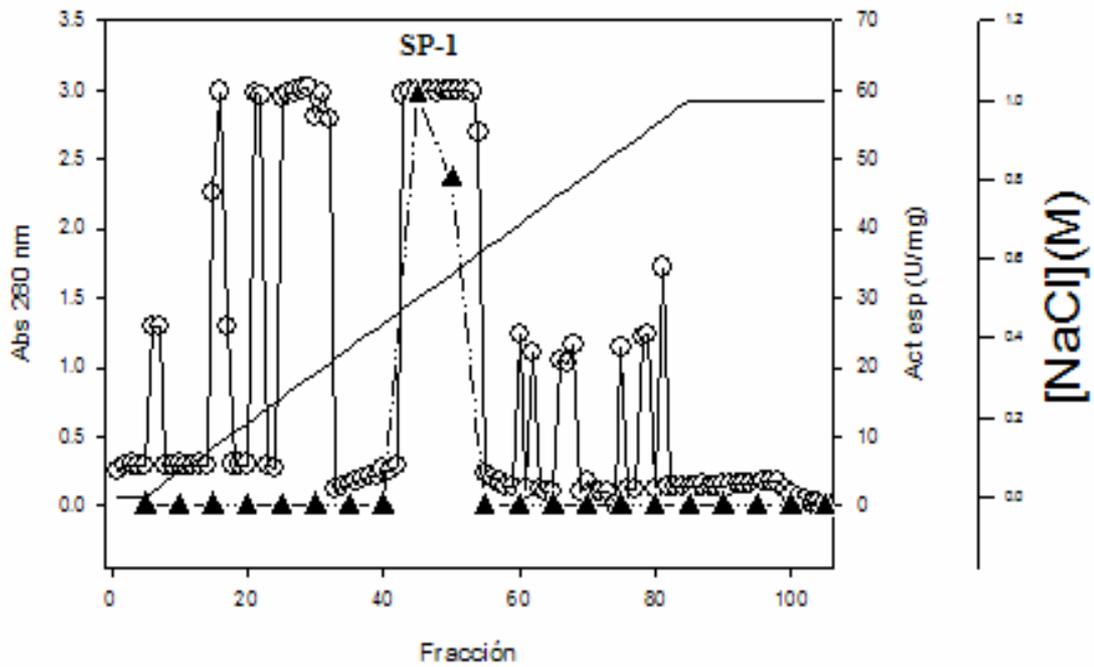


Figura 26. Cromatograma obtenido de la purificación de la peroxidasa en FPLC, aplicando un gradiente de NaCl sobre una resina catiónica SP. ○: $ABS_{280\text{ nm}}$, ▲: Actividad específica (U/mg), — [NaCl] (M). SP-1 corresponde a las fracciones 45-50.

La captura de la enzima con la resina SP, muestra que se tienen más de 2 isoformas.

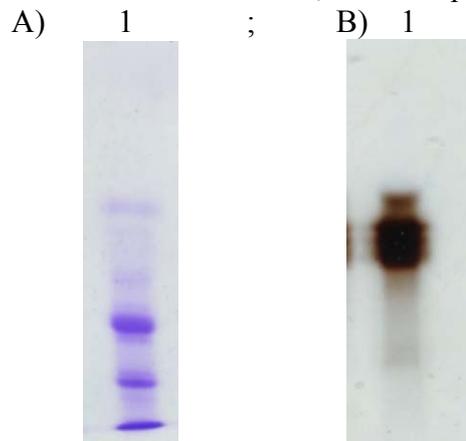


Figura 27. Geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida. A) gel de proteína con tinción de Coomassie. B) Zimograma revelado con bencidina. En el gel de proteína, 1 es el extracto capturado con resina SP (dilución 1/100). A la derecha 1 corresponde a la muestra mencionada (dilución 1/100).

De las fracciones 45-48, fueron mezcladas, dializadas y ultrafiltradas. Posteriormente fueron colocadas sobre una columna con resina CM, donde, la peroxidasa fue separada con un gradiente 0-1M de NaCl en buffer de acetatos 100mM; pH=4.0.

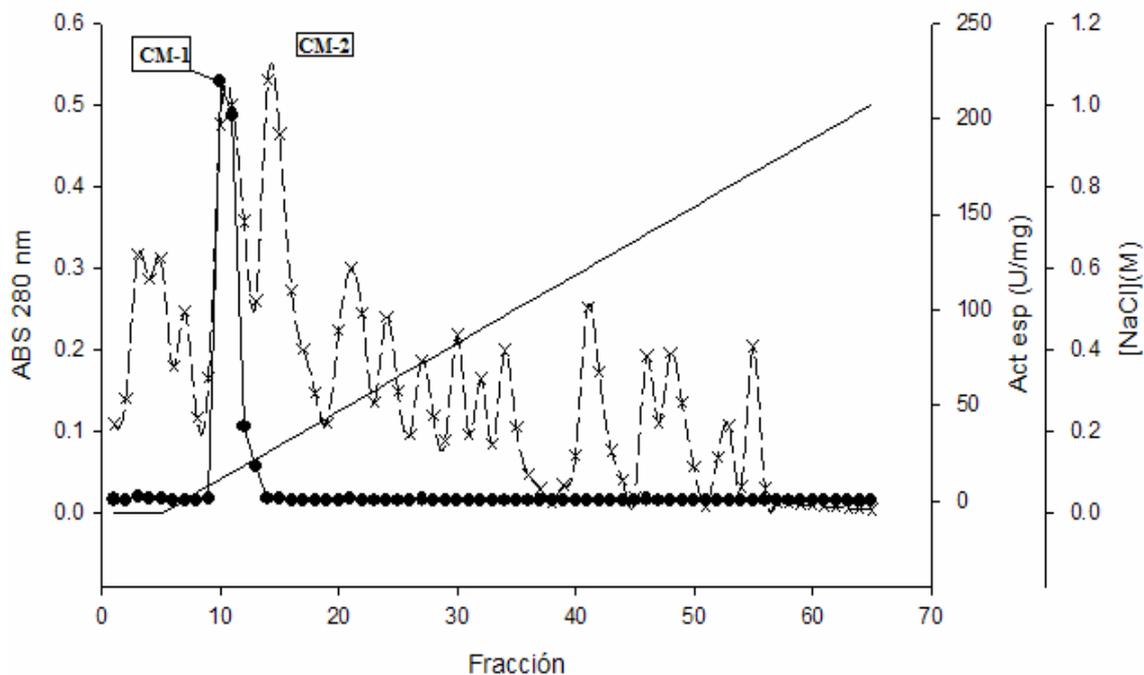


Figura 28. Cromatograma de Abs a 280 nm y de actividad, de la purificación de la peroxidasa utilizando una columna CM. Se aplicó un gradiente de NaCl (0-1M).

x: ABS_{280nm} , ●: Actividad específica (U/mg), -: [NaCl] (M); CM-1: corresponde a las fracciones 10 y 11, CM-2: corresponde a la fracción 14.

Las fracciones activas (10 y 11), fueron mezcladas, dializadas y ultrafiltradas. Para afinar la purificación, la mezcla fue colocada en una columna de intercambio hidrofóbico (HIC). Esta última etapa, se llevó a cabo pasando un gradiente en la concentración de $(NH_4)_2SO_4$ de 2.4 a 0 M.

Se recolectaron 50 fracciones, de las cuales solo 3 presentaron actividad. Las dos fracciones más activas corresponden al máximo HIC-11. Sin embargo HIC-1, alcanza una actividad de 200 U/mg_{prot.}

Los resultados de esta cromatografía se presentan a continuación:

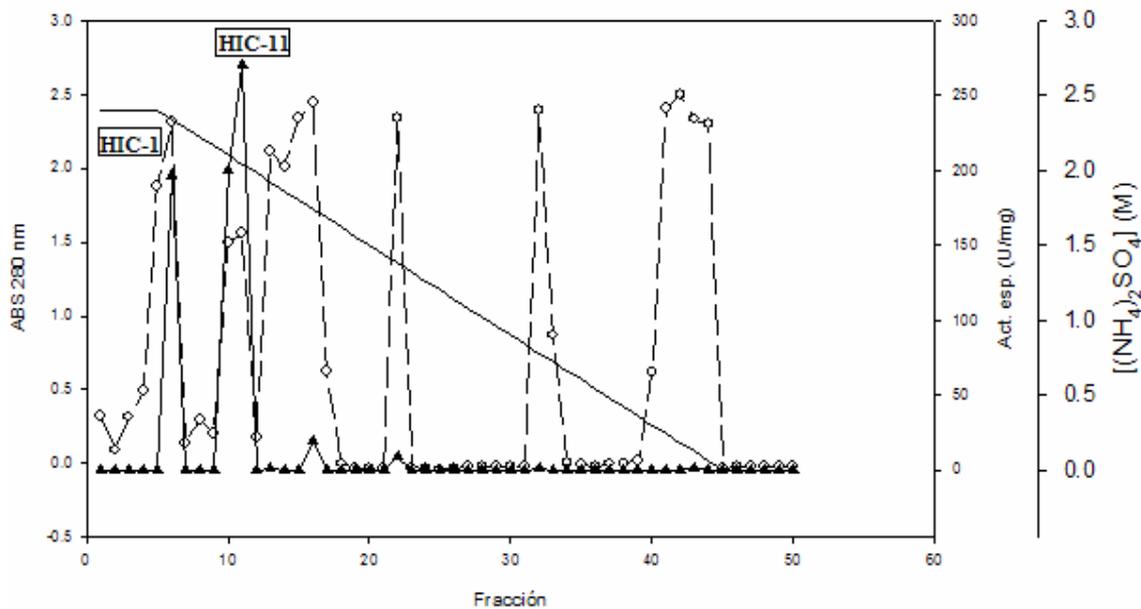


Figura 29. Cromatograma de purificación de la peroxidasa de residuo del desespinado de nopal, en una columna HIC. ○: ABS_{280nm}, ▲: Actividad específica (U/mg), -: [NaCl] (M); HIC-1: corresponde a la fracción 6, HIC-11: correspondiente a las fracciones 10 y 11.

Se purificó la peroxidasa, siguiendo el protocolo ya detallado, los resultados obtenidos muestran que se tienen 2 isoformas con actividad.

A) 1 2 ; B) 1 2

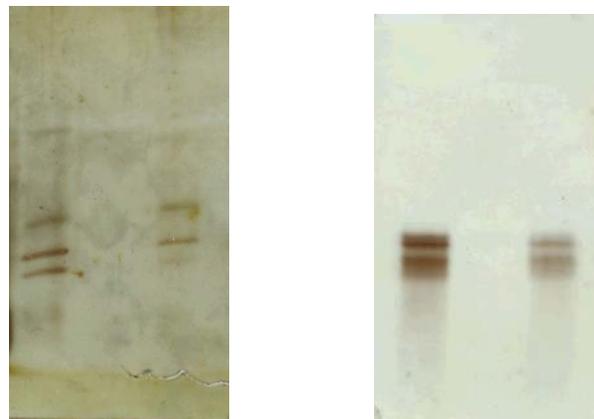


Figura 30.- Geles SDS-PAGE al 8% de acrilamida. A) Gel de proteína con tinción en plata. B) Zimograma revelado con bencidina. (1) HIC-1 (fracción 6); (2) HIC-11.

Se obtuvieron 2 formas de la peroxidasa con un peso molecular entre 40 y 50 KDa. Mientras que, los estudios realizados por Padiglia (1995), revelaron una peroxidasa del cladodio del nopal con un peso molecular de 58 KDa. Sin embargo, Baaziz (2005), obtuvo peroxidases de cladodio de nopal con un Rf de 0.5 y 0.56.

Si comparamos, por peso, las formas de peroxidasa obtenida, encontramos que son proteínas de mayor peso molecular, a las de 37 KDa obtenidas a partir de tubérculos de papa por Castillo (2002), y las de 42 KDa de semillas de papa por Floris

(1984), así como las de nabo de 36.9 KDa (Singh 2003) y 34 KDa de ginseng indiano (2005). Por el contrario, se encontraron peroxidasas de menor peso molecular a las encontradas en zanahoria de 71 KDa (Soysal 2005)

Tabla 13.- Purificación de peroxidasa obtenida a partir de un residuo en el desespinado del nopal.

	Proteína (mg/ml)	Proteína Total(mg)	Rend. %	Actividad específica (U/mg)				Factor de purificación			
				Guaiacol	ABTS	Pirogalol	Bencidina	Guaiacol	ABTS	Pirogalol	Bencidina
Extracto crudo	5.96	11934.69	100	1.87	1.58	173	13.6	1	1	1	1
Extracto crudo después de resina SP	0.7037	2815.13	23.58	0.0042	0.0728	0.104	0.0545	(0.0022)	(0.0461)	(0.000599)	(0.004)
SP-1	85.47	512.83	4.29	21.3	5.72	659	184	11.4	3.62	3.80	1.35
CM-1	32.88	65.97	0.55	1.14	2.81	585	150	0.609	1.78	3.37	11.0
HIC-1	4.10	12.31	0.103	2.57	0.941	1220	2090	1.38	0.597	7.05	153

En la tabla 13 se muestra un compendio de los resultados obtenidos en la purificación de la peroxidasa obtenida, a partir de un residuo en el desespinado de nopales chicos.

Bajo la premisa de que se partió de 1 Kg de nopal, el contenido de proteína es de 1.19%, lo cual concuerda con los valores teóricos reportados.

La captura con la resina catiónica SP, separación y posterior concentración, nos entrega un extracto enzimático enriquecido en proteína (85.47 mg/ml) y con una actividad de 626 U/mg. Sin embargo, dicha actividad mejora en el extracto obtenido en la resina HIC, siendo esta hasta 2090 U/mg.

A pesar de obtenerse un extracto con alta actividad, esta es menor que la obtenida a partir de la tuna (11 900 U) (Padiglia et. Al., 1994)

Se observa que el campo de purificación para guaiacol y bencidina disminuye en el paso por la columna CM y HIC, esto puede deberse a que, se eliminan isoformas de la peroxidasa.

Para los sustratos Pirogalol y bencidina, el campo de purificación mejora. Siendo las peroxidasas obtenidas, mas afines a bencidina y menos para guaiacol. Este resultado es similar al obtenido por Baaziz, a partir de cladodios de *Opuntia ficcus indica* var. Marrakech, el cual obtuvo extractos poco específicos para guaiacol y más específicos para O-dianisidina.

6.3 CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA:

Con el extracto obtenido de la purificación se determinaron los parámetros fisicoquímicos óptimos de actividad, así como el efecto de algunos iones. Esta parte de la investigación, se realizó utilizando 4 sustratos (Guaiacol, Bencidina, Pirogalol y ABTS) para los ensayos de pH y temperatura. Mientras que para determinar el efecto por la presencia de iones, así como la determinación de Km y Vmax, se probaron solo Bencidina y Pirogalol.

a) Efecto del pH:

Se determinó el efecto del pH en un rango de 3.0 – 7.0, sobre la actividad de las peroxidasas purificadas.

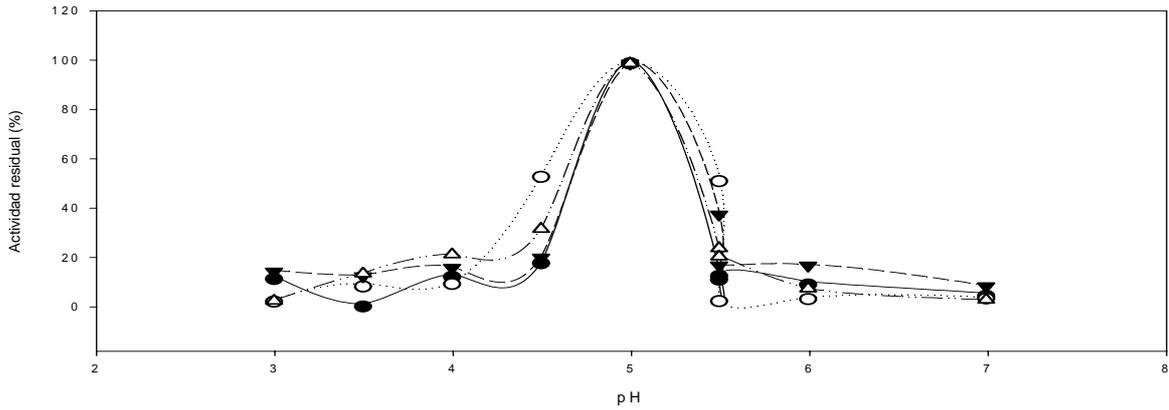


Figura 31. Efecto del pH sobre la actividad de la peroxidasa. Los resultados se presentan como actividad residual. ○: ABTS; ▼: Pirogalol; ●: Guaiacol; ▲ Bencidina

Se observa que para todos los sustratos utilizados, la actividad óptima se presenta a un pH=5.0. En los estudio realizado por Padiglia (1995), se obtuvieron isoformas con un pH óptimo de 5.5 (usando guaiacol como sustrato).

Sin embargo, el rango de pH óptimo de actividad de las peroxidasas, es muy diferente dependiendo de la fuente y la región de origen. Dicho rango va desde el 4.0 obtenido del árbol de lamarula (Mdluli 2005), hasta el pH de 7.0 de la peroxidasa de semillas de papa (Floris 1984).

b) Efecto de la temperatura:

También se llevó a cabo un barrido de temperaturas 25-60°C

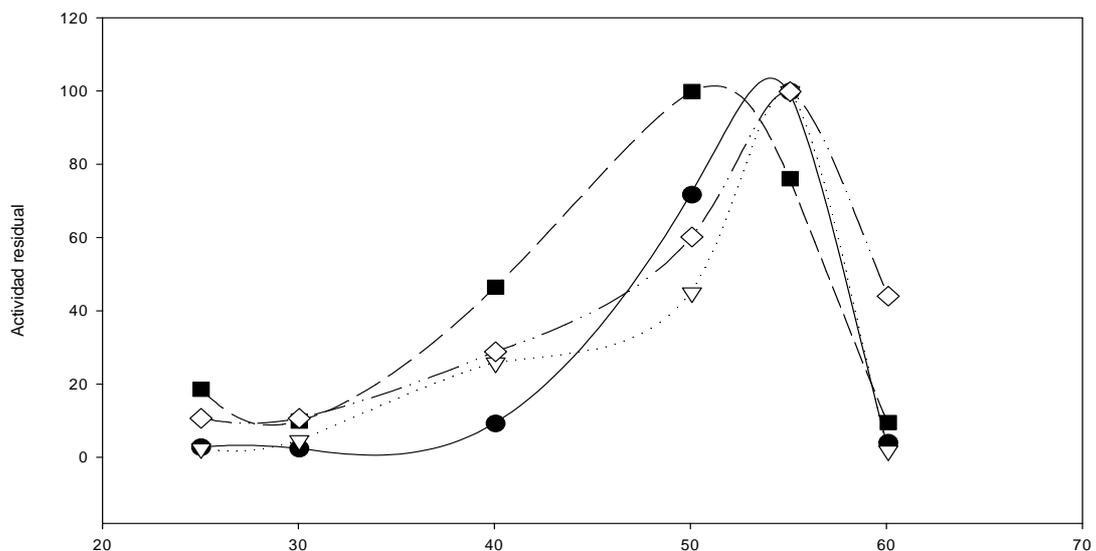


Figura 32. Determinación de la temperatura óptima. ◇: Bencidina; ●: Guaiacol; ■: Pirogalol; ◻... : ABTS

Las 2 isoformas con un peso molecular entre 40 y 50 KDa. Tienen un pH óptimo de 5.0, con los cuatro sustratos utilizados, así como un máximo de actividad a 50°C para pirogalol, y de 55°C para bencidina, guaiacol y ABTS. Dichos resultados no concuerdan con los encontrados por Padiglia (1995), por lo tanto las peroxidasa purificadas del residuo del desespinado *Opuntia ficcus* var. Milpa Alta, son diferentes a las obtenidas de la tuna. Sin embargo, se observa cierta similitud con las obtenidas por Baaziz (2005), las cuales fueron obtenidas de cladodios de *Opuntia ficcus indica* Mill.

Para determinar el efecto de algunos iones sobre la actividad de la peroxidasa, fue realizado un barrido de Fe^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} , Na^+ a concentraciones de 5, 10, 30 y 50 mM. En este ensayo solo se tomaron como sustratos bencidina y pirogalol, los cuales fueron los donadores de protones que presentaron la mejor actividad en la determinación de pH y temperatura.

c) Efecto de iones.

Para determinar el efecto de iones sobre la actividad de la peroxidasa, se utilizaron Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ .

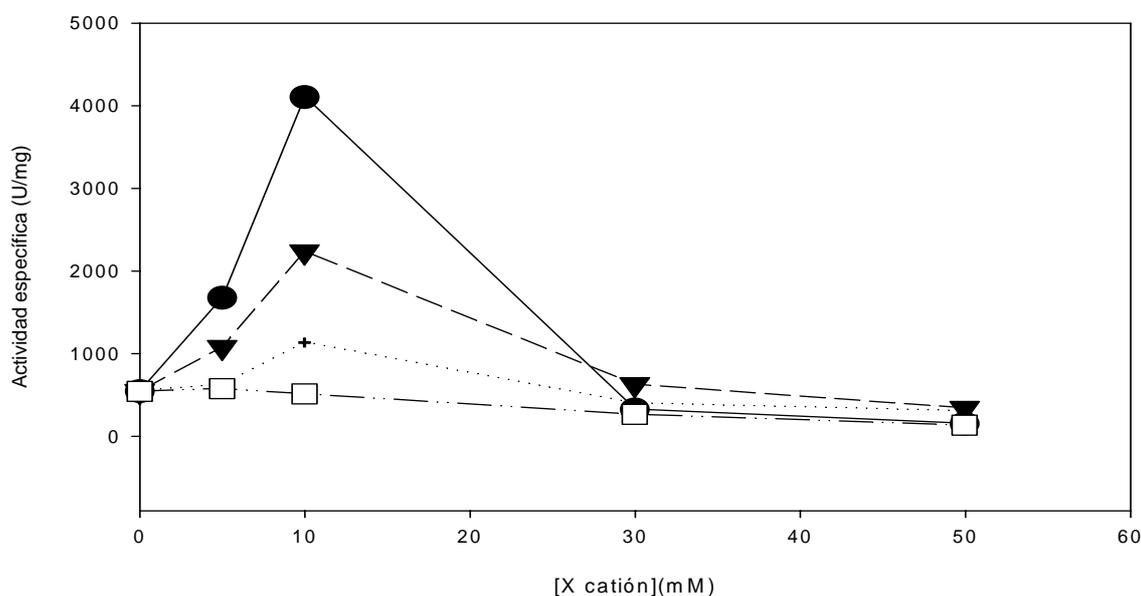


Figura 33. Se presenta el efecto de algunos iones sobre la actividad de la peroxidasa pura, utilizando pirogalol como sustrato. \bullet : $\text{X}=\text{Fe}^{3+}$; \blacktriangledown : $\text{X}=\text{Zn}^{2+}$; \blacklozenge : $\text{X}=\text{Ca}^{2+}$; \square : $\text{X}=\text{Na}^+$.

En la figura 33, podemos observar que, utilizando pirogalol como sustrato, los iones bivalentes presentan una activación de la peroxidasa en concentraciones de 5 y 10 mM, mientras que en concentraciones mayores a 30 mM comienza a observarse una

inhibición de la actividad. Para el caso del sodio, se observa que la actividad no se afecta a concentraciones de 5 mM, y en concentraciones de 10 a 50 mM se observa una ligera inhibición.

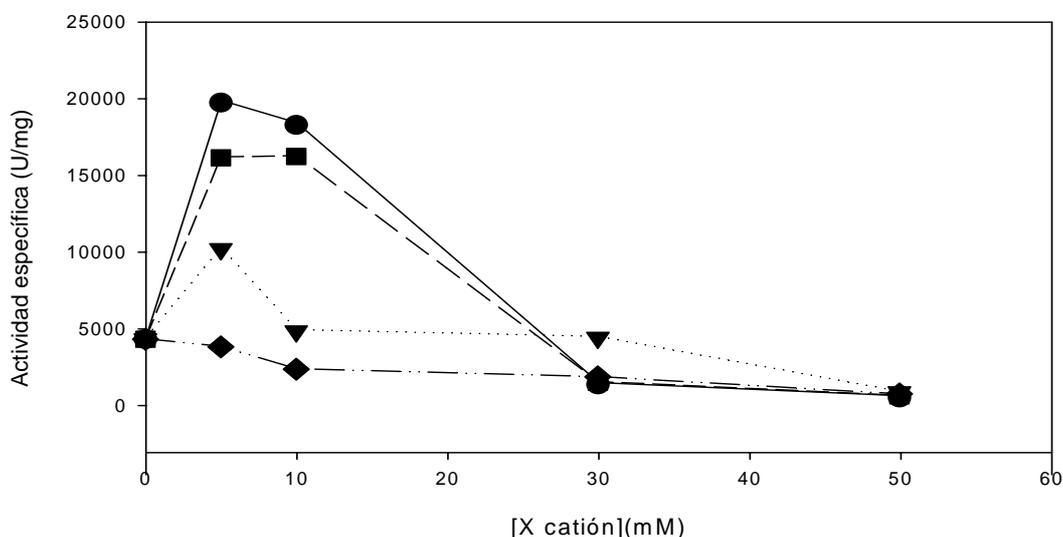


Figura 34. Se presenta el efecto de algunos iones sobre la actividad de la peroxidasa pura, utilizando pirogalol como sustrato. ●: X=Fe³⁺; ■: X=Zn²⁺; ▼: X=Ca²⁺; ◆: X=Na⁺.

Utilizando bencidina como sustrato, se observa que los iones bivalentes tienen una máxima activación a concentraciones de 5 mM, mientras que para el ion calcio a concentraciones de 5-30 mM, la actividad es la misma con respecto al blanco. En concentraciones de 30 a 50 mM, los iones hierro, zinc y sodio presentan una inhibición de la actividad con respecto al blanco.

El ion Fe⁺⁺, es el mejor proactivante de los iones estudiados. Esto da la pauta a pensar que se trata de una peroxidasa ferriprotoporfirina.

Sin embargo, el uso de concentraciones mayores a 30 mM de hierro y zinc, dan como resultado una buena inhibición de la enzima. Mientras que en la presencia de calcio hasta 50mM, no se presenta inhibición.

La incubación de la enzima con el ion sodio, no presenta activación, pero si presenta un ligera inhibición, lo cual nos sugiere que este ion, al estar ligado al sitio alostérico de la enzima, genera una disminución en su poder óxido-reductor.

d) Determinación de Km y Vmax:

Para la determinación de Km y Vmax, se utilizaron bencidina y pirogalol como sustrato. Realizando 4 experimentos diferentes; dos de ellos se llevaron a cabo variando

la concentración de H_2O_2 y manteniendo constante la concentración de bencidina o pirogalol, los dos ensayos restantes se realizaron manteniendo constante la concentración de H_2O_2 y variando, en su respectivo caso, la concentración de bencidina o pirogalol.

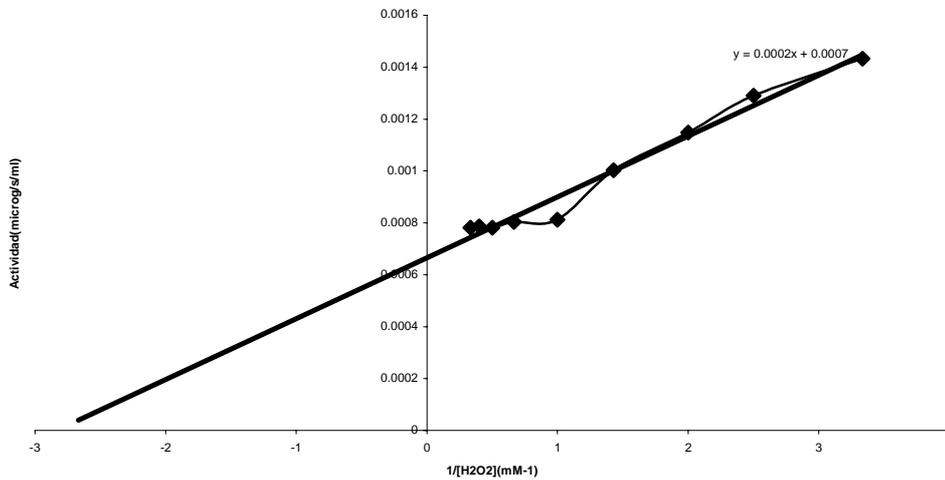


Figura 35. Determinación de K_m y V_{max} , por el método de lineweaver-Burk, de la peroxidasa, utilizando pirogalol como sustrato.

Se obtiene una $K_m=0.28$ mM, y una $V_{max}= 1428.57$ U.

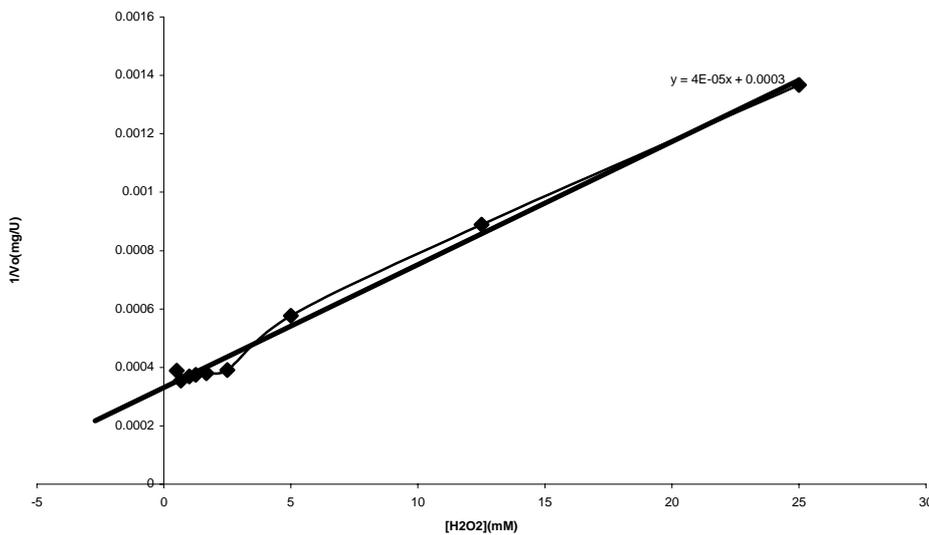


Figura 36. Determinación de K_m y V_{max} , para el H_2O_2 , por el método de lineweaver-Burk, de la peroxidasa, utilizando pirogalol como sustrato.

Se obtiene una $K_m=0.13$ mM, y una $V_{max}= 3333.33$ U.

En las Figuras 35 y 36, podemos observar que la enzima es más específica para bencidina que para pirogalol. Si comparamos la K_m (0.13mM) obtenida para el H_2O_2 , utilizando pirogalol como sustrato, con la K_m (0.34mM) de la peroxidasa obtenida a partir de zanahoria, (Soysal, 2005), observamos que nuestra enzima requiere menos de la mitad de sustrato para alcanzar la mitad de la saturación de los sitios activos, lo que se puede traducir como el doble de transformación.

Cabe mencionar que los resultados obtenidos dan la pauta para pensar que, se trata de más de 1 K_m , lo cual puede deberse a que la enzima tiene 2 etapas de activación o que se trata de dos enzimas diferentes.

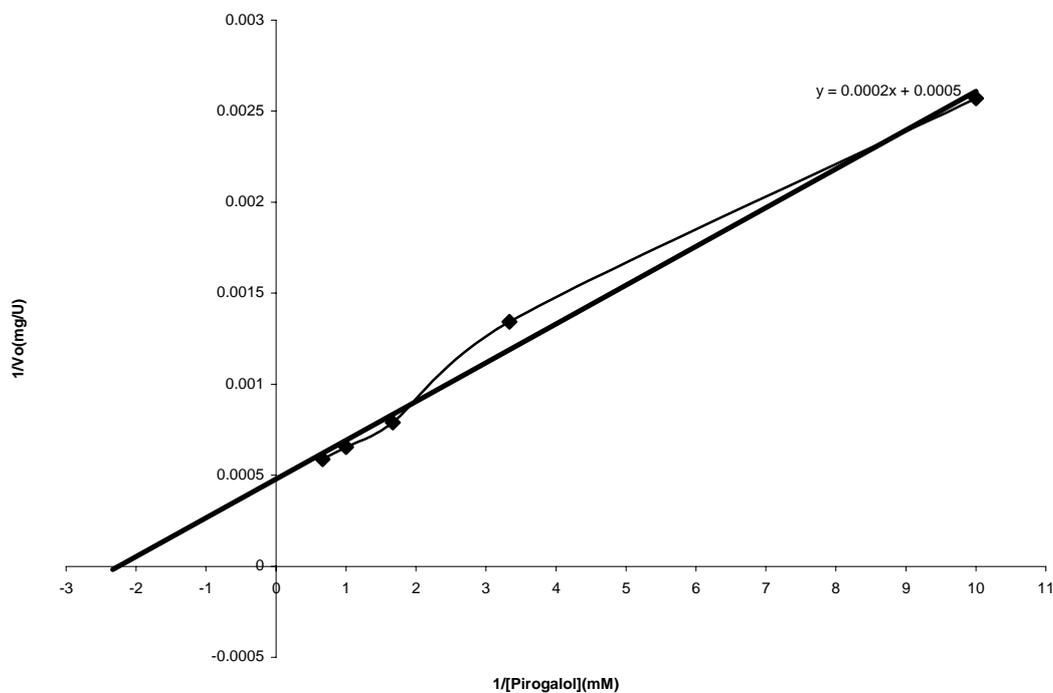


Figura 37. Determinación de K_m y V_{max} de la peroxidasa, por el método de lineweaver-Burk. Utilizando pirogalol como sustrato.

Se obtiene una $K_m=0.41$ mM, y una $V_{max}= 2000$ U.

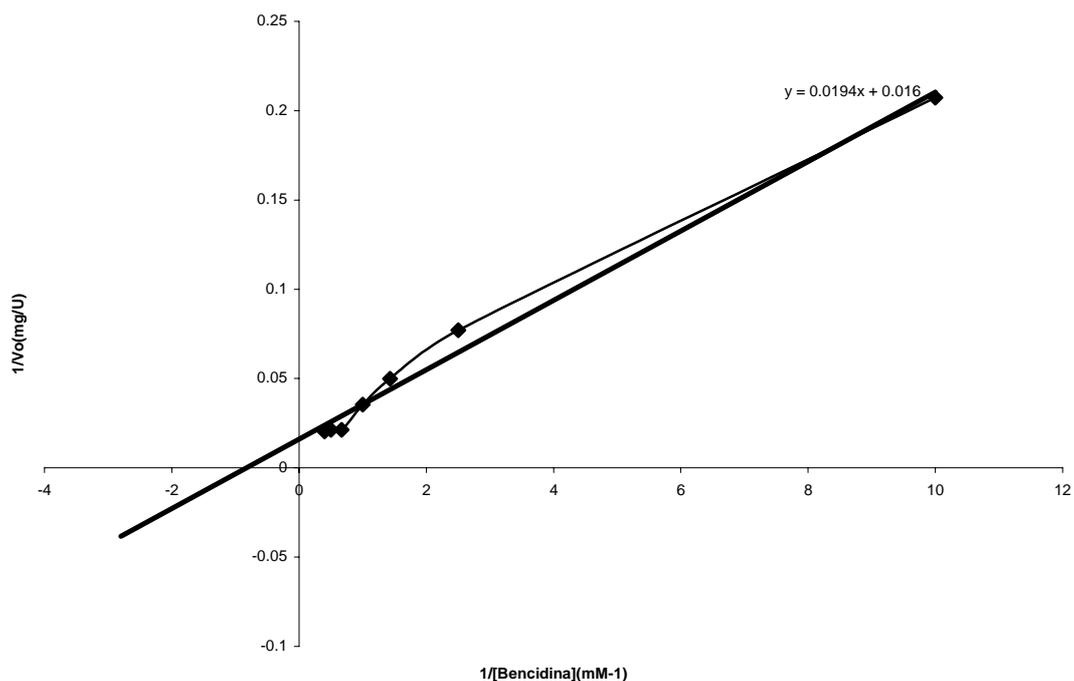


Figura 38. Determinación de K_m y V_{max} de la peroxidasa, por el método de lineweaver-Burk. Utilizando bencidina como sustrato. Se obtiene una $K_m=0.33$ mM, y una $V_{max}= 3333.33$ U.

Para los valores de K_m (0.33 mM) de la bencidina, nuevamente se obtiene que nuestra peroxidasa requiere una menor cantidad de sustrato que la obtenida a partir de las hojas de algodón (Akhunov Et. Al., 2004), la cual muestra una K_m de 2.3 mM utilizando el mismo sustrato. De hecho, la enzima en estudio, muestra, utilizando bencidina como sustrato, una K_m similar (pero aún menor) a la de la peroxidasa tiroidea humana, la cual presenta un valor de 0.49 mM (Sentchouk 2004).

En las figuras 37 y 38, se muestran las K_m y V_{max} de la peroxidasa obtenida a partir de un residuo del desespinado de nopales chicos. Se observa que en este caso no es tan notorio la existencia de 2 K_m 's, sin embargo sigue sin observarse de manera concluyente.

Las K_m y V_{max} de las peroxidases obtenidas son:

Tabla 14. K_m y V_{max} de las peroxidases obtenidas a partir del residuo generado del desespinado de nopales chicos.

Sustrato	K_m (mM)	V_{max} (microg/s/mg)
H ₂ O ₂ Con bencidina	0.13	3333.33
H ₂ O ₂ Con pirogalol	0.28	1428.57
Pirogalol	0.41	2000
Bencidina	0.33	3333.33

Los valores mostrados en la tabla 14, nos indica que se trata de enzimas con alta actividad específica. Además de necesitar bajas concentraciones de sustrato para tener la mitad del máximo de actividad.

En las gráficas de lineweaver-Burk, se presume que: el extracto purificado puede tener más de una K_m . Esto, es más notorio en los ensayos donde se determinó la constante de catálisis de H_2O_2 . Sin embargo, si observamos la figura 7, donde se muestra que la oxidación de la enzima, antes de actuar sobre la molécula donadora de protones, es oxidada 2 veces por la reducción del peróxido de hidrógeno y no necesariamente es referida a que las 2 formas obtenidas tengan diferentes características.

Cabe recalcar que, también en la determinación de K_m para los sustratos, pirogalol y bencidina (por el método de Lineweaver-Burk), se observa poca linealidad. Por lo cual no puede se afirmar las dos enzimas purificadas, en efecto, sean totalmente iguales.

6.4 BIOTRANSFORMACIONES.

Esta parte del estudio, tiene como finalidad dar una perspectiva sobre algunas de las aplicaciones que pueden darse a la peroxidasa contenida en residuos de nopal. Por lo tanto cabe mencionar que: los resultados obtenidos son preliminares y falta profundizar en ellos, como sería realizarlas con la peroxidasa purificada. Sin embargo, se observó que la dimerización de los ácidos ferúlico, caféico y cumárico, se lleva a cabo a partir de un precipitado con sulfato de amonio con actividad de peroxidasa.

Con la finalidad de obtener mejores rendimientos en las biotransformaciones, se procedió a determinar los parámetros óptimos, así como la influencia de algunos iones, sobre la actividad, de peroxidasa, en un precipitado con sulfato de amonio.

6.4.1 CARACTERIZACIÓN DEL PRECIPITADO CON SULFATO DE AMONIO:

En una primera etapa, se determinó el efecto del pH con un barrido de 3.5-7.0. La concentración de los buffers utilizados para esta prueba, fueron a una concentración 100 mM. Para los pH's 3.5-5.0 se utilizó buffer de acetatos, mientras que para los pH's de 5.5-7.0 se utilizó de fosfatos.

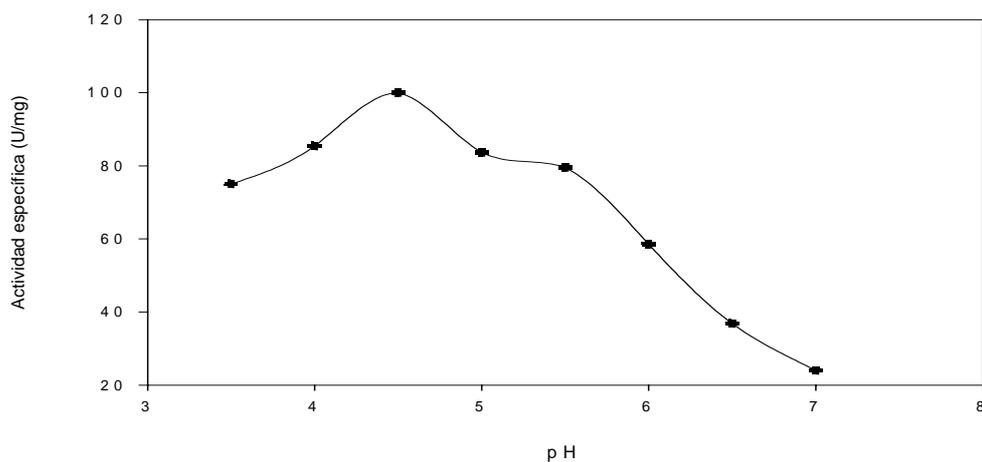


Figura 39. Efecto del pH sobre la actividad de peroxidasa en el precipitado con sulfato de amonio.

Se encontró que la mayor actividad de este extracto se presenta a pH=4.5, mientras que la actividad a pH=7.0 se presenta solo el 15 % de la actividad en condiciones más ácidas.

El efecto de un barrido de temperaturas en un rango de 20-65°C presentó los siguientes resultados:

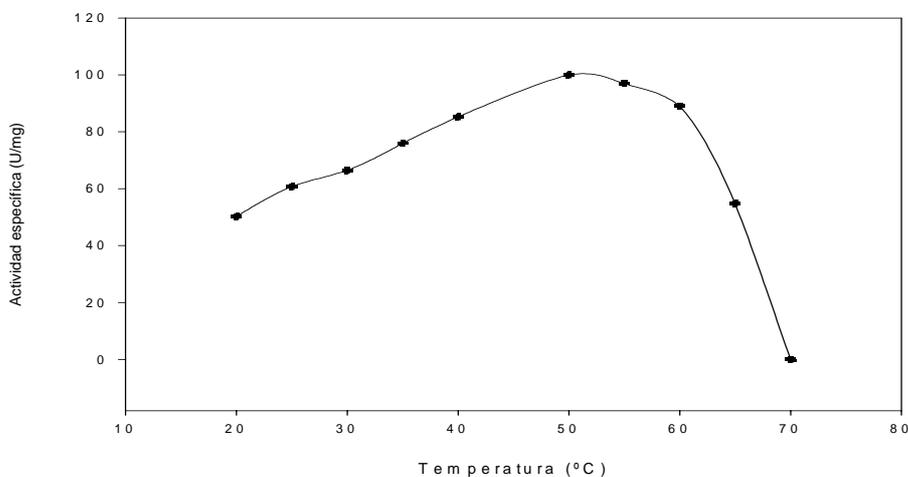


Figura 40. Efecto de la temperatura sobre la actividad de peroxidasa en el precipitado con sulfato de amonio.

La temperatura óptima de actividad se presentó a 50°C.

Se observa que a pH=4.5 la mayor actividad de peroxidasa se presenta en una temperatura de 50°C, aunque la diferencia de actividades a 50 y 55°C es mínima. La actividad a 20 y 65°C es aproximadamente el 54.52%.

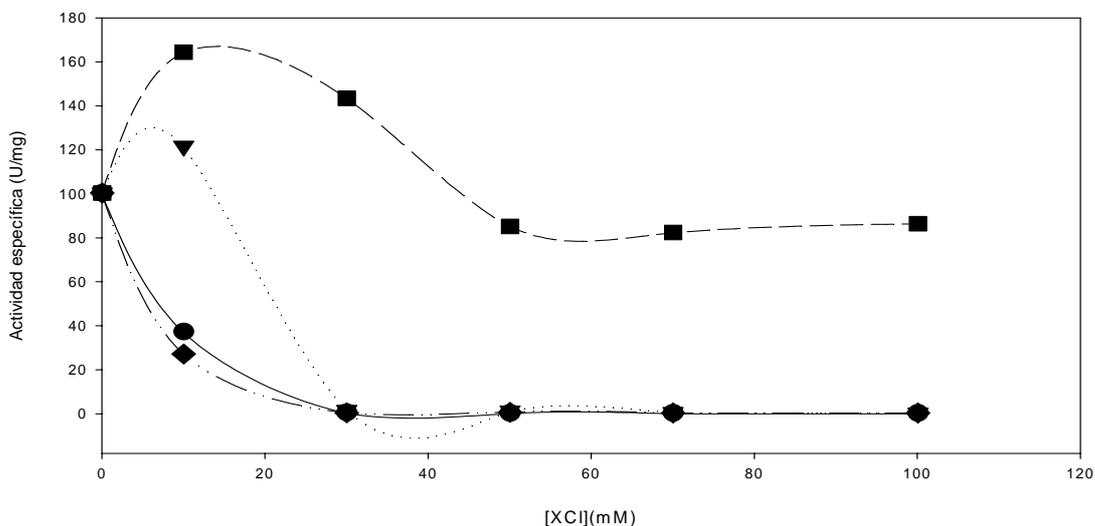


Figura 41. Efecto de algunos iones divalentes. ■: X= Ca⁺⁺ ; ▼: X= Mn⁺⁺ ; ●: X= Zn⁺⁺; ◆: X=Cu⁺⁺.

Se observa que el calcio es un proactivante hasta las concentraciones de 30 mM, mientras que de 50-100 mM, la actividad no se ve afectada con respecto al blanco. Con respecto a los demás iones, se observó una pérdida total de la actividad, a partir de concentraciones de 30 mM. El efecto de 100 mM de EDTA, reflejó la pérdida del 50% de la actividad.

Las diferencias encontradas en los parámetros fisicoquímicos óptimos de actividad, entre el extracto purificado con sulfato de amonio, y el extracto purificado por métodos cromatográficos, aunque es mínimo, puede deberse a que el extracto purificado con sulfato de amonio presenta varias isoformas que, no necesariamente tienen las mismas características (de actividad) y que el resultado obtenido es aquel de las formas más activas.

Tabla 15.- Cuadro comparativo entre los parámetros de actividad óptimo de dos extractos purificados por diferentes métodos. N/R= No se realizó.

	Extracto purificado con sulfato de amonio.	Extracto purificado por métodos cromatográficos.
Temperatura óptima	50°C	55°C
pH óptimo	4.5	5.0
Concentración mínima inhibitoria de: Ion Calcio		
	No presentó inhibición	No presentó inhibición
Ion Hierro	30mM	N/R
Ion Zinc	30mM	30mM
Ion Manganeso	30mM	N/R
Ion Sodio	N/R	10mM

6.4.2 BIOTRANSFORMACIONES.

Un extracto purificado con 2 precipitaciones con sulfato de amonio, fue utilizado para las biotransformaciones. Las cuales, fueron realizadas a pH=4.5, a 4h de reacción en agitación constante. Inmediatamente se realizó una extracción con acetato de etilo.

Los resultados obtenidos de dichos experimentos, fueron los siguientes:

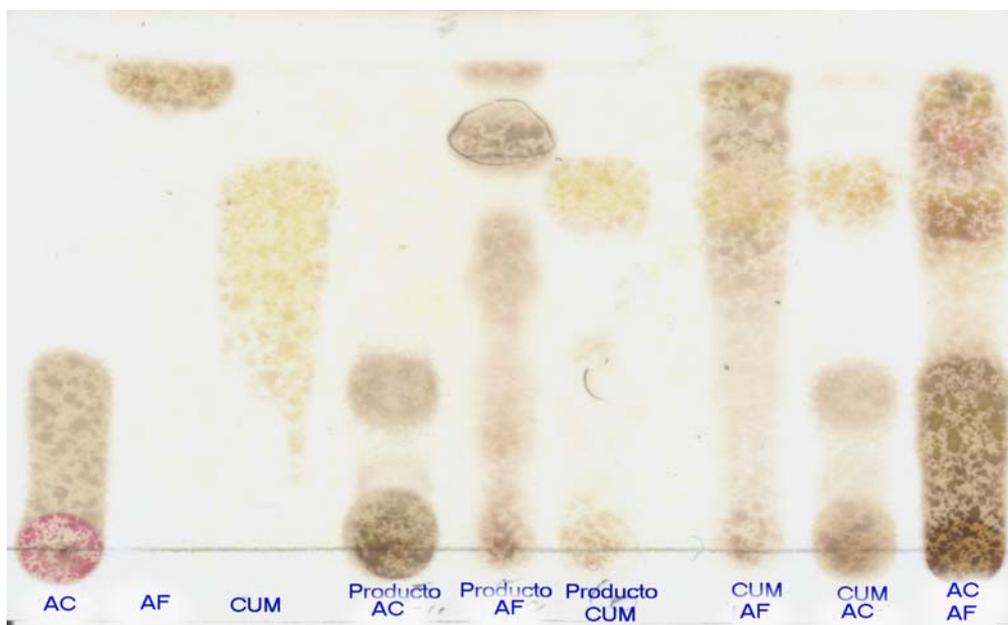


Figura 42. Cromatoplaque que, presenta los productos de las biotransformaciones y los patrones de los ácidos caféico (CAF), ferúlico (FER) y cumárico (CUM). La placa fue corrida en un sistema cloroformo:ác. Acético (9:1).

En la figura 42, se observa que la formación de productos del ácido ferúlico es evidente, observándose la formación de 4 compuestos de menor polaridad. El ácido cumárico muestra la formación de productos de menor polaridad. Sin embargo, en el caso de las mezclas, no puede afirmarse la formación de productos debidos a la formación de heterodímeros.

Dada la poca resolución observada para el ácido caféico. Los productos obtenido a partir del ácido caféico, fueron eluidos en una mezcla Diclorometano:Acetato de etilo (9:1).



Figura 43. Se muestran la cromatoplaca donde se corrieron los productos de la biotransformación del ácido caféico. AC= ácido caféico, DAC 1H= producto después de una hora de reacción, DAC 4H= producto después de 4 horas de reacción. Se eluyó con una mezcla diclorometano:acetato de etilo 9:1).

En la figura 43, se observa que después de 1 h de reacción, existe la presencia de compuestos de menor polaridad que el estándar de ácido caféico. Sin embargo, se observa que a 4 horas de reacción, le resolución de la transformación disminuye. Esto se debe a que a mayores tiempos de reacción, se genera una mayor variedad de productos.

De todos los productos formados, se eligió para la purificación, los obtenidos a partir del ácido ferúlico. Los compuestos purificado, tiene un punto de fusión de 171°C y un $R_f = 0.48$ (corrido en el sistema cloroformo:ác. Acético (9:1)).

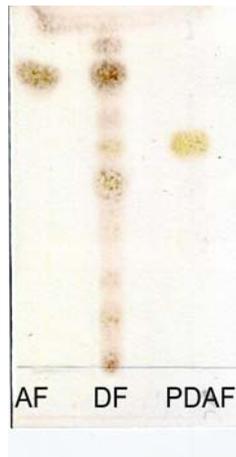


Figura 44. Se muestra el producto purificado. AF: estándar de ácido ferúlico, DF: patrón de dímeros de ácido ferúlico, PDAF: Producto purificado de la dimerización del ácido ferúlico.

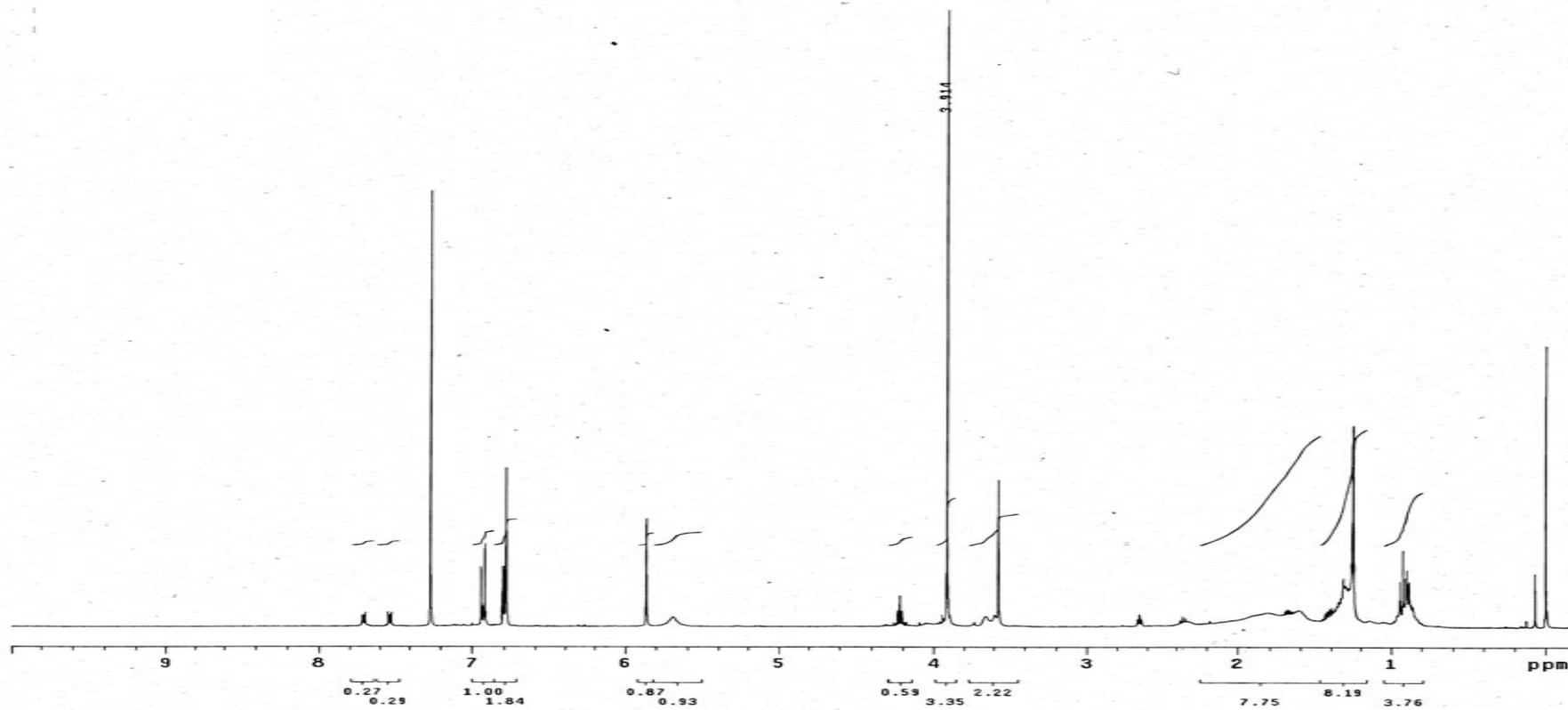


Figura 45.- Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del dímero del ácido ferúlico purificado.

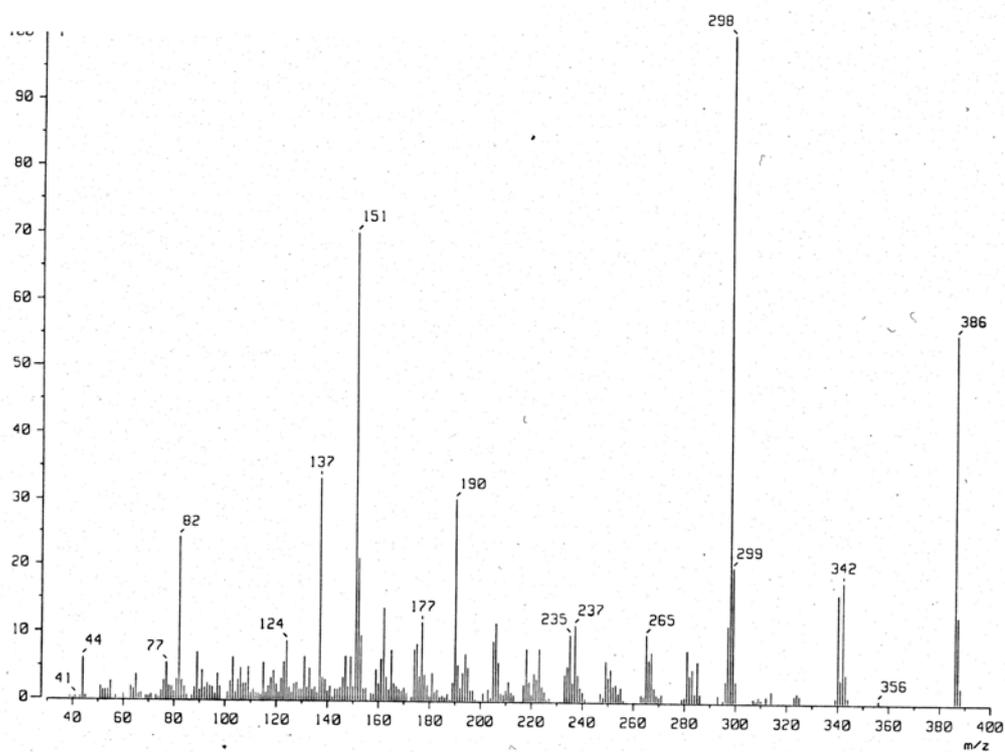
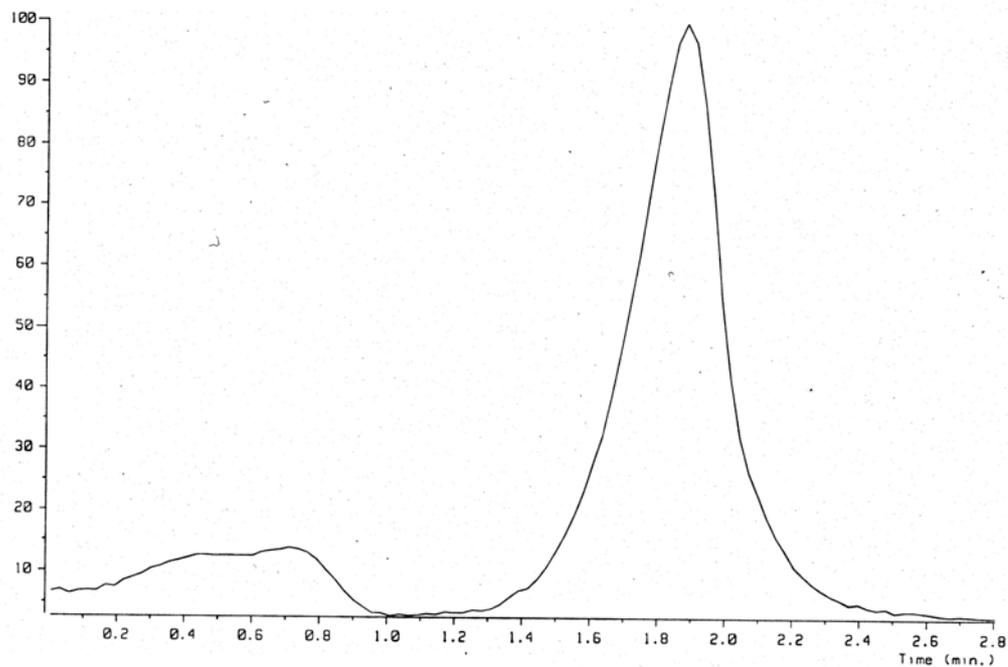


Figura 46.- Espectro de masas del dímero del ácido ferulico purificado.

En la figura 46, podemos observar que el producto se encuentra relativamente puro, el cual tiene un peso molecular de 386 g/mol. En la figura 45, se deduce que se trata del 8,8'-diferulato:

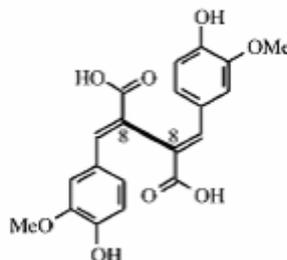


Figura 47.- Estructura del ácido 8-8' diferúlico.

Este dímero del ácido ferúlico, es el mismo que se obtiene utilizando la peroxidasa de *Bupleurum salicifolium* (Luis, 2005), y diferente al dehidrodímero (Fig. 4B) obtenido a partir del melón amargo (Ou et. Al., 2003)

La biotransformación del ácido ferúlico, caféico y cumárico, realizada con un extracto purificado con 2 precipitaciones de sulfato de amonio, presenta la formación de una variedad de productos. Esto puede deberse a que, debido a que este extracto presenta una amplia variedad de isoformas. Por lo tanto, podría presumirse que cada isoforma genera un radical libre diferente, los cuales, al estabilizarse, con otro radical, de una manera azarosa, forman varios dímeros enlazados en diferentes posiciones.

Otra de posibles causas de la formación de esta variedad de productos, puede deberse simplemente a que, la resonancia electrónica de cada molécula, coloca al radical libre en diversas posiciones.

No se tiene evidencia de la formación de heterodímeros en las biotransformaciones realizadas con mezclas de los ácidos hidroxicinámicos. Sin embargo, en los casos de las mezclas donde está presente el ácido ferúlico, si se observa la formación de los productos propios de este. Lo cual nos hace pensar que estas peroxidases son más afines a ferúlico que a caféico o cumárico.

A pesar de haber caracterizado uno de los productos obtenidos en la dimerización del ácido ferúlico, quedan varios productos por caracterizar.

7. CONCLUSIONES.

- El residuo obtenido del desespinado de nopales chicos, presenta mayor actividad que, el obtenido de nopales medianos, y es más del doble de la actividad presentada por el residuo del desespinado de nopales grandes.
- La captura con la resina catiónica SP, nos entrega un extracto enriquecido en actividad para los cuatro sustratos estudiados, y muestra la existencia de más de 2 isoformas de peroxidasas.
- Se purificaron 2 formas ácidas de peroxidasas, con peso molecular entre 40 y 50 KDa, las cuales son más específicas para pirogalol (1220 U/mg) y bencina (2090 U/mg), que para guaiacol (2.57 U/mg) y ABTS (0.94 U/mg).
- El extracto enriquecido en 2 formas de peroxidasa, tienen como parámetros fisicoquímicos óptimos de actividad: pH= 5.0; T= 55°C (para guaiacol, ABTS y bencidina) y 50°C (usando pirogalol como sustrato).
- Los iones bivalentes estudiados, son proactivantes de peroxidasa a concentraciones menores o iguales a 10mM. Mientras que, son inhibidores a concentraciones mayores a 30 mM.
- El ion sodio no funciona como activador de la peroxidasa. Sin embargo, mostró inhibir ligeramente la actividad de dicha enzima a concentraciones mayores a 10 mM.
- No puede afirmarse que las 2 peroxidasas purificadas sean iguales.
- La enzima purificada, tiene una buena actividad específica, (2090 U/mg; usando bencidina como sustrato) comparada con la obtenida del melón amargo (757 U/mg; usando guaiacol como sustrato) y la soya (183 U/mg; usando guaiacol como sustrato). Sin embargo, presenta una menor actividad a la obtenida en la tuna (11600 U/mg; usando guaiacol como sustrato).
- Se encontró que, el residuo generado durante el desespinado del nopal, es una buena fuente de la enzima peroxidasa. Y puede ser utilizada en la dimerización de los ácidos ferúlico, caféico y cumárico.
- De los 3 ácidos hidroxicinámicos utilizados para la biotransformación, es el ácido ferúlico el que genera una mayor cantidad de productos. De los cuales se identificó el ácido 8,8'-diferúlico.

- No se encontró evidencia experimental que pueda afirmar que, la biotransformación realizada con la mezcla de ácidos hidroxicinámicos, da como resultado la producción de heterodímeros.

8. BIBLIOGRAFÍA.

Aguilar Ledesma Damián (2006), Inhibición del pardeamiento enzimático en nopales frescos desespinaados., *Tesis licenciatura*, UNAM, México, DF.

Akhinov A., Golubenko Z., Beresneva V., Ibragirov A., Abdurashidova N., Mustakornova E., Kashirnova N., Akbarova G., (2004), Physicochemical properties of cotton-leaf peroxidase, *Chesitry of natural compounds*, 40(5), 506-509.

Arrieta-Baez D., Stara R., (2006), Modeling suberization with peroxidase-catalyzed polymerization of hydroxycinnamic acids: Cross-coupling and dimerization reactions, *Phytochemistry*, 67, 743-753

Balen B., Krsnik M., Simeon V., (2003), Isoenzymes of peroxidase and esterase related to morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. Tissue culture. *Journal of Plant Physiology*, 160, 1401-1406.

Bonnin E., Saulnier L., Brunel M., Marot C., Lesage-Messen L., Asther M.m Thibault J.,(2002), Release of ferulic acid from agroindustrial by-products by the cell wall-degrading enzymes produces by *Aspergillus niger* I-1472, *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 1000-1005

Cadena Santos V. (2006), Nopal (*Opuntia spp.*): Estudio para valorar la utilización de residuo de cladodio como fuente de fibra dietética y antioxidantes., *Tesis licenciatura*, UNAM, México, DF.

Castillo J., Alpeeva I.S., Chibar T.A., Galaev I., Csoregi E., Sakharov I.,(2002), Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers, *Plant Science*, 163, 1011-1019.

Cigdem S., Söylemez Z., (2005), Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment, *Journal of Food Engineering*, 68, 348-356

Delval F., Crin G., Lebré J.,(2006) Removal of organic pollutants from aqueous solutions by adsorbents prepared from agroalimentary by-products, *Bioresource Technology*, 97, 2173-2181.

Deutscher Murray P., Guide to protein purification, Academic Press, vol. 182, USA, 1990, pp:285-301, 309-392.

Dimitrios B.(2006), Sources of natural phenolic antioxidants, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 505-512.

Dok-Go H, Lee K.H, Lee H., Lee J., Song Y., Lee Y.H., Jin C., Lee Y.S., Cho J., (2003), Neuroprotective effects of antioxidative flavonoid, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolates from *Opuntia ficus-indica*, *Brain research*, 965 (1-2); 130-136.

Fadel J.G (1999). Quantitative analyses of selected plant by-product feedstuffs, a global perspective. *Animal Feed Science and Technology*. 79, 255-268.

Fennema Owen R., Química de alimentos, editorial ACRIBIA, 2da edición en español, España, 2000. pp.: 515-625, 1139-1146, 1176.

Ferguson L., Zhu S., Harris P.,(2005), Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells, *Molecular Nutrition Food Research*, 49(6), 585-593.

Flores, C., Luna J., Ramírez, P., Mercado mundial del nopalito en línea, disponible en www.infoasercas.gob.mx/proafex/NOPAL.pdf.

Gel filtration manual principles and methods, Amersham Biosciences, 2002.

Floris G., Medda R., Rinaldi A., (1984), Peroxidase from *Euphorbia characias latex*: purification and properties, *Phytochemistry*, 23(5), 953-956.

Floris G., Medda R., Rinaldi A., (1984), Peroxidase from *Ipomoea batatas* seedlings: purification and properties, *Phytochemistry*, 23(8), 1527-1529.

Hoyle M.,(1977) High resolution of peroxidase-indoleacetic acid oxidase isoenzymes from Horseradish by isoelectric focusing, *Plant physiology*, 60, 787-793.

Indoor biotechnologies, disponible en línea:

<http://www.inbio.com/protocols/solution.html>

Instituto Nacional de Ecología, (2004) Nopal Verdura, (en línea, disponible en www.ine.gob.com.mx).

Internacional Food Information Council (IFIC), en línea disponible www.ific.org.

Ishii T., (1997), Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, 127, 111-127.

Johri S., Jamwal U., Rasiik S., Kumar A., Verna V., Qazi G.N., (2005), Purification and characterization of peroxidases from *Withania somnifera* (AGB 002) and their ability to oxidize IAA., *Plant Science*, 169, 1014-1021.

Kamel M., Saleh N., Ghazy M., (1977), Gallic acid oxidation by turnip peroxidase, *Phytochemistry*, 16, 521-524.

Kaur M, Wadhwa R, Sharma SP, (1989) Effect of sodium selenite on antioxidative enzymes of banana fruitfly, *Journal of Gerontology*, 35(4), 188-191.

Khales A., Baaziz M.,(2005), Quantitative and qualitative aspects of peroxidases extracts from cladodes of *Opuntia ficus indica*, *Scientia Horticulturae*, 103, 209-218.

Lignin Institute (2005), disponible en línea: <http://www.lignin.org>.

Liu G., et. Al., (2006), Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica*, *Fish and Shellfish immunology*, 20, 47-57.

Luis Juan C., (2005), Dimerization of ferulic acid and caffeic acid by purified peroxidase isolated from *Bupleurum saliciformum* callus culture, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 35, 231-241.

Marshall Wayne E., Wartelle Lynda H.,(2006), Chromate (CrO_4^{2-}) and cooper (Cu^{2+}) adsorption by dual-functional ion exchange resins made from agricultural by-products., *Water Research*, 40, 2541-2548.

Mdluli K, (2005), Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra), *Food Chemistry*, 92, 311-323.

NatarajanK., Singh s., Burke T., Grunberger D., Aggarwal B., (1996), Caffeic acid phenethyl is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- κ B, *Proc. Natl . Acad. Sci.*, 93, 9090-9095.

Ou Li, Kong Ling-Yi, Zhang Xian-Ming, Niwa M.,(2003), Oxidation of Ferulic Acid by *Mordica charantia* peroxidase an related Anti-inflammation activity changes, *Biol. Pharm. Bull*, 26(11), 1511-1516.

Padiglia A., Cruciani E., Pazzaglia G., Medda R., Floris G., (1995), Purification and characterization of *Opuntia* peroxidase, *Phytochemistry*, vol 38, N° 2, 295-297.

Pandey A., Socol C., Nigam P., Socol V.,(2000) Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse (review paper), *Bioresource Technology*, 74, 69-80.

PROFECO,(2006), (en línea, disponible en:
http://www.profeco.gob.mx/revista/publicaciones/adelantos_06/nopal_sep06.pdf).

Pointillart, A., (1988), Phytate phosphorus utilization in growing pigs. In Proceeding of the 4th international Seminar on Digestive Physiology in pigs. Polish Academy of Sciences, Jablonna, Poland, pp 319-326.

Robinson T., Nagel W., (1982), Peroxidases of *Papaver Somniferum*, *Phytochemistry*, Vol 21 N° 3, 535-537

Russell A., Hardin J., Grand L., Fraser A., (1997), Poisons plants of north california, North California State University.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA),

(en línea disponible en: http://www.siea.sagarpa.gob.mx/ar_comagr2c.html).

Schieber A., Stintzing F.C., r. Carle. (2001), By-products of plant food procesing as a source of functional compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 401-413.

Sentchouk V., Grintsevich E., (2004), Oxidation of benzidine and its derivates by thyroid peroxidase, *Biochemistry*, 69(2), 201-207.

Siegel S., Chen J., Kottenmeier W., Clark K., Siegerl B., Chang H., (1982), Reduction in peroxidase in *Cucumis brassica* and other seedling cultured in saline waters, *Phytochemistry*, 23(3), 539-542.

Singh N., Singh J., (2003), A method for large scale purification of turnip peroxidase and its characterisation, *Preparative biochemistry & biotechnology*, 33(2), 125-135.

Soysl C., Söylemez Z., (2005), Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment, *Journal of food engineering*, 68, 349-356.

Steiner T, Mosenthin R., Zimmermann B., Greiner., Roth S., Distribution of phytase activity, total phosphorus and phytate phosphorus in legume seeds, cereals and cereal by-products as influenced by harvest year and cultivar, *Animal Feed Science and Technology*, 2006, en línea 2006.

Stintzing F.C., Carle R., (2005), Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology and uses. *Molecular Nutrition Food Research*, 49, 175-194.

Stryer Lubert., Bioquímica, Editorial Reverté S.A., Cuarta edición, Tomo 1, España, pp.181-199.

Tucker G.A, Woods L., Enzymes in food processing, Blackie & son Ltd., USA, 1991, pp.195-198.

Whitaker J.R., Et. Al., Handbook of food enzymology, Edit, Marcel Dekker, inc., Nueva York 2003.

Wikipedia (2007), disponible en línea: <http://en.wikipedia.org/wiki/Lignin>.

Zancani M., Nagy G., Vianello A., Macrì F., Copper-inhiited NADH-dependent peroxidase activity of purified soya bean plasma membranes, *Phytochesitry*, Vol 40 N° 2, 367-371.

APÉNDICE 1:

Soluciones:

1. Acrilamida (30% T, 2.7% Cbis)

Acrilamida		58.4 g
Bis		1.6 g
H ₂ O	a	200 mL

Guardar en frasco ámbar a 4°C

2. Buffer 4X Running (1.5 M tris - HCl pH 8.8) Tris

		36.3 g
--	--	--------

Ajustar pH a 8.8 con HCl

H ₂ O	a	200 mL
------------------	---	--------

3. Buffer 4X Stocking gel (0.5 M tris - HCl pH 6.8)

Tris		3.0 g
------	--	-------

Ajustar pH 6.8 con HCl

H ₂ O	a	50 mL
------------------	---	-------

4. SDS 10%

SDS		50g	10g
H ₂ O	a	500 mL	en 100 mL

5. Iniciador (Persulfato de amonio 10%)

Pesar Persulfato de amonio 0.1 g y colocarlos en ependorfs de 1 mL y al momento de usar agregar 1 mL de agua checar que cruja al momento de adicionar el agua, si no sucede el reactivo no sirve.

6. Buffer **2X** de tratamiento (tris 0.125 M. -CL pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%).

Tris	2.5 mL	(Soln. No 3)
SDS	4.0 mL	(Soln. No 4)
Glicerol	2.0 mL	Directo de la botella
2-mercaptoetanol	1.0 mL	Directo de la botella
H ₂ O	a	10 mL

Dividir en alicuotas de 1 mL y congelar

7. Buffer del tanque (EB 10X) (Tris 0.025 M pH 8.3, glicina 0.192 M, SDS 0.1 %)

Tris	0.5 g
Glicina	14.4 g
S DS	10 mL de la solución 4

H₂O a 1.0 L Disolver con agua caliente.