



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PEROXIDASA
ANIÓNICA DE *Raphanus Sativus var. longipinnatus* Y SU
APLICACIÓN EN LA DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES EN LA
INDUSTRIA DE ALIMENTOS

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

Garcia Ortiz Hiram Emmanuel

Tutora

Dra. Eva Patricia Bermúdez García





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Dr. Eduardo Bárzana García

VOCAL: Dr. Arturo Navarro Ocaña

SECRETARIA: Dra. Eva Patricia Bermúdez García

1ER SUPLENTE: Dra. Amelia Farrés González Sarabia

2DO SUPLENTE: Dr. Miquel Gimeno Seco

Este Trabajo se realizó en el laboratorio 4A del Departamento de Alimentos y Biotecnología. Edificio A, Facultad de Química, UNAM.

Agradecimientos

A la Doctora Eva Patricia Bermúdez García por permitirme estar bajo su asesoría y formar parte de su grupo de investigación, por sus consejos, ayuda, orientación y paciencia a lo largo del tiempo de conocerla. Mi mayor admiración y respeto.

A la Doctora Amelia Farrés por su orientación, guía y recomendaciones en la elaboración de este proyecto y por abrirme las puertas de su laboratorio.

Al Maestro en Ciencias Bioquímicas Augusto Castro Rodríguez por su colaboración en la enseñanza de técnicas necesarias para la realización de este trabajo, por sus consejos y paciencia.

Al Proyecto PAPIME PE205422 “Diseño de nuevos protocolos y mejora de los existentes de la asignatura de Tecnología Enzimática” del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química UNAM, por el financiamiento de este trabajo.

Al personal de laboratoristas del Departamento de Alimentos y Biotecnología por su apoyo en todo momento. Gracias.

A los miembros del jurado por sus observaciones y valiosos comentarios.

A la Facultad de Química por ser una segunda casa y a su personal docente por ser un ejemplo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación que me ha dado tanto en lo académico como en lo personal.

Índice General

Resumen	1
Objetivo General	3
Objetivos Particulares	3
Hipótesis	4
Marco teórico	5
<i>Generalidades de las peroxidasas</i>	5
<i>Hemo peroxidasas</i>	5
Hemo peroxidasas de la súper familia I (peroxidasas catalasas)	7
Clase I	7
Clase II	7
Clase III	7
No hemo peroxidasas	9
Glutación peroxidasas	10
Halo Peroxidasas	10
Manganeso Peroxidasas	10
Tiol Peroxidasas	11
Principales fuentes de peroxidasas utilizadas	11
Técnicas de Purificación de enzimas	13
Cromatografía.....	13
Aplicaciones de las peroxidasas	16
Aplicaciones médicas o terapéuticas	16
Aplicaciones analíticas	16
Aplicaciones en alimentos	17
Materiales y metodología	21
Análisis Bioinformático	22
Obtención de extracto crudo	22
Precipitación con sulfato de amonio.....	23
Desalado	23
Intercambio iónico.....	24
Perfil proteínico SDS PAGE	24
Caracterización de la fracción purificada.....	25
Estabilidad de las fracciones purificadas en función del pH	25

Caracterización en función de temperatura.	25
Caracterización en función de preferencia de sustrato.	25
Actividad ante iones	26
Determinación de parámetros cinéticos	26
Reacciones de degradación.....	26
Evaluación de la capacidad para degradar colorantes.....	26
Degradación de antibióticos.....	27
Resultados y discusión	29
Análisis de las peroxidasas reportadas en bases de datos	29
Obtención de extractos.	30
Resumen de la estrategia de purificación	32
Purificación de las peroxidasas de rábano blanco	33
Purificación de las peroxidasas de rábano rojo.....	34
Purificación de las peroxidasas de nopal	35
Caracterización de las fracciones purificadas.	36
Perfil proteínico SDS-PAGE	36
Estabilidad frente a pH	38
Caracterización respecto a la preferencia de sustrato.	42
Efecto de iones metálicos sobre la actividad de la enzima	44
Estabilidad Frente a Temperatura	46
Determinación de los parámetros cinéticos	47
Ensayos de Degradación.....	50
Capacidad de la peroxidasa para degradar antibióticos.....	50
Capacidad de la peroxidasa de rábano blanco para degradar colorantes.....	52
Conclusiones	54
Perspectivas	56
Referencias	57
Anexo 1. Ecuaciones utilizadas para el cálculo de los parámetros cinéticos de peroxidasas	65

Índice de Figuras.

Figura 1. Clasificación de peroxidadas	6
Figura 2 Ciclo catalítico de las peroxidadas	8
Figura 3. Mecanismo Ping-pong	9
Figura 4. Cromatografía de exclusión molecular	14
Figura 5 Cromatografía de intercambio iónico	15
Figura 6. Cromatografía de afinidad	15
Figura 7. Cromatografía de interacciones hidrofóbicas.	16
Figura 8. Mecanismo de oxidación y polimerización de compuestos fenólicos catalizado por peroxidadas.....	20
Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología	21
Figura 10. Peroxidadas de fuentes vegetales reportadas en bases de datos	29
Figura 11. Seguimiento Cualitativo de actividad peroxidasa en intercambio iónico.	32
Figura 12 SDS-PAGE de las fracciones de purificación del extracto de <i>Rr. sativus</i> var. <i>Longipinnatus</i>	37
Figura 13. Peroxidasa de 75 KDa	38
Figura 14. Estabilidad frente a pH 60 min de la fracción purificada a partir de rábano blanco	39
Figura 15. Estabilidad frente a pH 180 min de la fracción purificada a partir de rábano blanco	39
Figura 16. Estabilidad frente a pH 60 min de la fracción purificada a partir de rábano rojo.....	40
Figura 17. Estabilidad frente a pH 180 min de la fracción purificada a partir de rábano rojo.....	40
Figura 18. Estabilidad frente a pH 60 min de la fracción purificada a partir de nopal	41
Figura 19 Estabilidad frente a pH 180 de la fracción purificada a partir de min nopal	42
Figura 20 Estabilidad de la fracción purificada con actividad peroxidasa de rábano blanco frente a distintos iones metálicos	45
Figura 21. Estabilidad térmica de la fracción purificada	46
Figura 22. Gráfico de doble recíproco respecto a guayacol.....	47
Figura 23 Gráfico de la intercepción de “y” en función del inverso de la concentración.....	48
Figura 24. Gráfico de doble recíproco respecto a H ₂ O ₂	48
Figura 25 Gráfico de doble recíproco respecto A H ₂ O ₂	48
Figura 26. Gráfico de la intercepción de “y” en función del inverso de la concentración.....	49
Figura 27 Estructura química de la Ampicilina.....	51
Figura 28. Degradación de Ampicilina.....	51
Figura 29 Degradación de Colorantes.....	53

Índice de tablas

Tabla 1 Aplicaciones de peroxidasas en biorremediación	19
Tabla 2. Picos de máxima absorción (nm) de colorantes analizados	27
Tabla 3. Información de peroxidasas de la familia de las Brassicas	30
Tabla 4. Actividad volumétrica y específica de peroxidasa obtenida a partir de los extractos crudos de vegetales de la familia de las brassicas.....	31
Tabla 5 Purificación rábano blanco	33
Tabla 6 Purificación rábano rojo.....	34
Tabla 7 Purificación nopal	35
Tabla 8. Comparación de la actividad de las peroxidasas frente a distintos sustratos	43
Tabla 9. Parámetros cinéticos	49

Resumen

Las enzimas son catalizadores biológicos de carácter proteico que actúan en un gran número de reacciones bioquímicas en los organismos vivos. Además de su función biológica, también pueden extraerse y utilizarse para catalizar una amplia gama de procesos de importancia comercial y de biorremediación. Tienen como ventaja que presentan una alta especificidad por sustratos, generan pocos productos inespecíficos y trabajan bajo condiciones suaves (Robinson P, 2015). Por estas razones las enzimas se utilizan en una gran variedad de aplicaciones en la industria cosmética, la del papel, la textil, alimentaria y la farmacéutica y en aplicaciones de la química fina, además en procesos de biorremediación (Nisha S, 2012). Entre las distintas enzimas que se utilizan con fines biotecnológicos, destacan las peroxidasas (EC 1.11.1.7), que pertenecen al grupo de las oxidoreductasas y que catalizan una reacción de óxido reducción donde el peróxido de hidrógeno actúa como aceptor mientras que otro compuesto actúa como donador de átomos de hidrógeno (Thongsook y Barret, 2005).

Algunas de las aplicaciones de interés en donde las peroxidasas están siendo estudiadas como catalizadores están enfocadas en la degradación de compuestos contaminantes que se generan como subproducto durante procesos industriales, como la biodegradación de colorantes sintéticos de tipo fenólico (Anjaneyulu et al.,2005),degradación de antibióticos presentes en agua residual (Piyangkun et al.,2019) por lo anterior, resulta de interés estudiar y caracterizar peroxidasas obtenidas de distintas fuentes.

Mediante la purificación y caracterización de peroxidasas de distintas fuentes vegetales se buscó comprender su comportamiento y sus condiciones de actividad para proponer posibles aplicaciones. Se diseñó una metodología de purificación utilizando distintas técnicas bioquímica como la precipitación de proteína, cromatografía de exclusión molecular y de intercambio iónico que se aplicó a 4 fuentes vegetales *Rhapanus sativus*, *Brassica rapa*,*Opuntia ficus-indica* y

Rhapanus sativus var. *longipinnatus*. La mayor actividad enzimática y mayor eficiencia de purificación se obtuvo en las fracciones de *R. sativus* var. *longipinnatus* que se caracterizaron para conocer su estabilidad frente a pH y temperatura, uso de cofactores y preferencia de sustrato. una vez determinadas las condiciones óptimas de trabajo se ensayó la capacidad de las peroxidasas para degradar colorantes sintéticos y naturales, y antibióticos de carácter betalactámico que se consideran como contaminantes asociados a la industria de alimentos (Guillemot et al., 1998; Wilke et al., 2005).

Objetivo General

Obtener, purificar y caracterizar una enzima con actividad de peroxidasa a partir de fuentes vegetales con el propósito de obtener sus constantes cinéticas, identificar sus condiciones óptimas de catálisis y proponer aplicaciones potenciales.

Objetivos Particulares

- Realizar la purificación de peroxidasas a partir de las fuentes vegetales seleccionadas: *Raphanus sativus*, *Brassica rapa*, *Opuntia ficus-indica* y *Raphanus sativus* var. Longipinnatus, utilizando técnicas bioquímicas.
- Realizar la caracterización fisicoquímica y cinética de las peroxidasas purificadas para determinar su estabilidad frente a variaciones de pH y temperatura, efecto de iones y preferencia de sustrato.
- Evaluar la capacidad de las peroxidasas purificadas para degradar colorantes sintéticos y naturales, así como antibióticos de tipo betalactámico, que son contaminantes comunes asociados a la industria de alimentos.
- Proponer posibles aplicaciones de las peroxidasas en la biorremediación de compuestos contaminantes generados en procesos industriales, con un enfoque en la industria de alimentos, con base en los resultados obtenidos en la caracterización y evaluación de la capacidad de degradación

Hipótesis

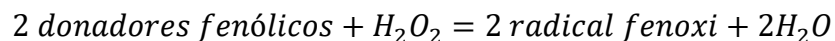
Dado que las peroxidasas son enzimas con propiedades catalíticas específicas y que han demostrado ser efectivas en la degradación de compuestos contaminantes en estudios previos, se plantea que la purificación y caracterización de peroxidasas de diferentes fuentes vegetales, con un enfoque particular en la variedad *Raphanus sativus var. longipinnatus*, revelará propiedades enzimáticas favorables para su aplicación en la degradación de colorantes sintéticos, colorantes naturales y antibióticos de tipo betalactámico. Se espera que, las enzimas purificadas muestren estabilidad en un rango adecuado de pH y temperatura para aplicarlas en reacciones de biorremediación de contaminantes relevantes en la industria alimentaria.

Marco teórico

Generalidades de las peroxidasas

Las enzimas son catalizadores biológicos de origen proteico que actúan en un gran número de reacciones bioquímicas en los organismos vivos. Además de su función biológica, también pueden extraerse y utilizarse para catalizar una amplia gama de procesos de importancia comercial, ya que presentan ventajas frente al uso de catalizadores químicos, como una alta especificidad por sus sustratos o la capacidad de trabajar bajo condiciones suaves de temperatura; lo que conlleva a una menor generación de residuos y un menor coste energético del proceso (Robinson P, 2015). Las enzimas se utilizan en una gran variedad de aplicaciones en la industria cosmética, la del papel, la textil, la alimentaria y la farmacéutica y en aplicaciones de la química fina (Nisha S, 2012).

Entre las distintas enzimas que se utilizan para fines biotecnológicos e industriales, destacan las peroxidasas (EC 1.11.1.7), pertenecientes al grupo de las oxidorreductasas, y que son enzimas ubicuas presentes en bacterias, hongos, plantas y animales que se caracterizan por catalizar una reacción de óxido reducción donde el peróxido de hidrógeno actúa como aceptor mientras que otro compuesto actúa como donador de átomos de hidrógeno (Thongsook y Barret, 2005):



Las peroxidasas se clasifican de acuerdo a la presencia o ausencia de un grupo hemo en su estructura (figura 1). El grupo de las hemo peroxidasas contiene aproximadamente el 80% de las peroxidasas identificadas, mientras el 20% restante corresponde a las peroxidasas libres del grupo hemo (Pontsho et al., 2020).

Hemo peroxidasas

Las hemo peroxidasas son enzimas muy abundantes en la naturaleza presentes en la mayoría de los organismos. Aproximadamente el 80% de los genes de

peroxidasa reportados codifican para hemo peroxidases (Savelli et al., 2019). Estas oxidorreductasas están involucradas en una amplia gama de procesos fisiológicos; los más importantes están involucrados en la respuesta a diversas formas de estrés oxidativo (Shigeoka, 2002). Se caracterizan por la presencia de un cofactor tipo hemo en su sitio activo, el cual es un pirrol macrocíclico de carácter cromático. Las hemo peroxidases constituyen un grupo muy grande de peroxidases que se dividen a su vez en dos súper familias. La primera familia llamada ciclooxigenasas. La segunda superfamilia denominada peroxidasa catalasa incluye peroxidases vegetales, fúngicas y bacterianas, subdivididas a su vez en tres clases (de la I a la III), según la distribución y la homología de sus secuencias de aminoácidos catalizan la oxidación de una variedad de sustratos, incluidos fenoles, aminas aromáticas, tiosanoles, iones de haluro y tiocianato. La selectividad respecto a los sustratos reductores depende del tipo de peroxidasa y de la fuente.

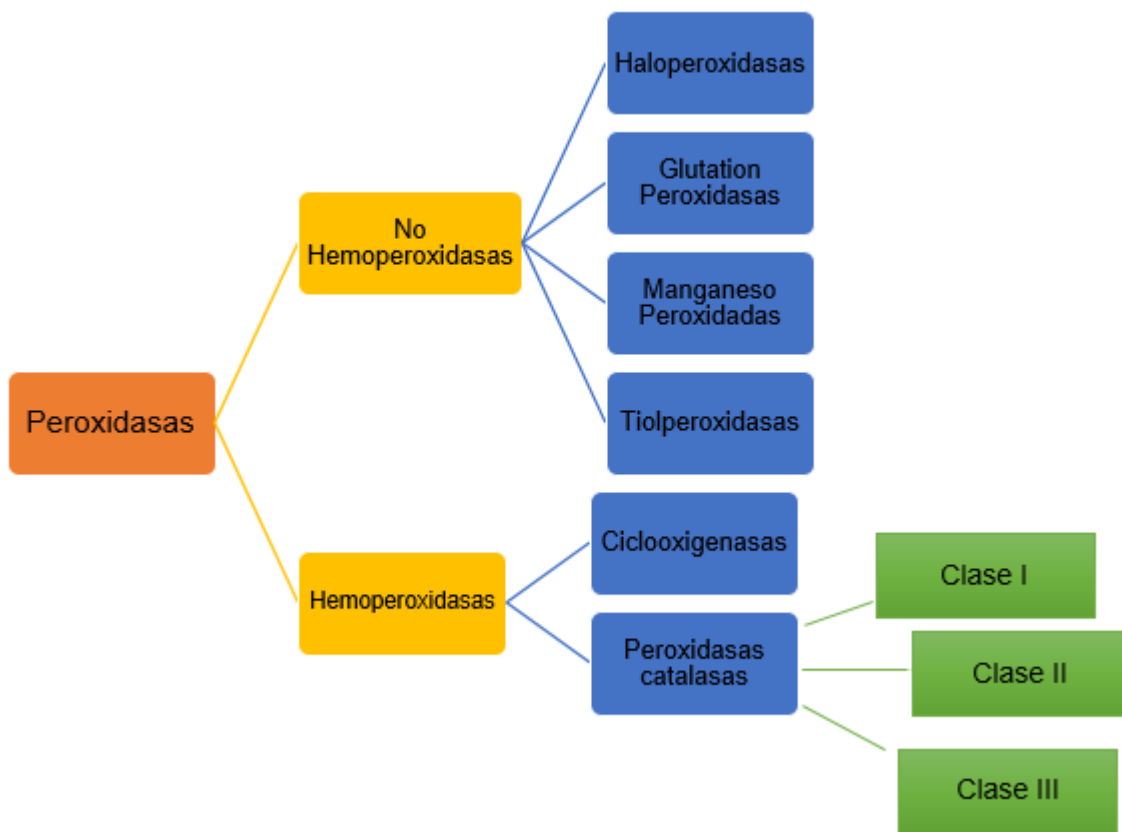


Figura 1. Clasificación de peroxidases

Hemo peroxidasas de la súper familia I (peroxidasas catalasas)

Clase I

Contiene peroxidasas intracelulares de origen procariótico, las cuales son proteínas no glicosiladas, sin puentes disulfuro y unión con iones Ca^{2+} , son las únicas de la familia hemo que poseen una actividad de catalasa ya que oxidan y reducen el peróxido de hidrógeno y conservan características de la peroxidasa/catalasa ancestral. La clase I se ha diversificado ampliamente dentro de sí misma, teniendo actividades que van desde catalasa hasta citocromo C oxidasa (Zámocký, 2010). Algunas peroxidasas de clase I son las producidas por bacterias como *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp.*; o cianobacterias como *Anaeba sp.* (Neelam & Basal, 2013).

Clase II

Las peroxidasas de clase II son de origen fúngico (Hatakka, 1994) y se han identificado en levaduras como *Candida Krusei*, basidiomicetos como *Phanerochaete chrysosporium* o actinomicetos como *Streptomyces sp.* (Neelam & Basal, 2013). Se dividen en lignoperoxidasas (EC 1.11.1.14) y manganeso peroxidasas (EC 1.11.1.13), y también efectúan la reducción de H_2O_2 actuando sobre una amplia gama de sustratos. Se ha sugerido que las manganeso peroxidasas están involucradas en la degradación de los compuestos húmicos (Steffenet al, 2002).

Clase III

Las peroxidasas vegetales son enzimas de carácter glicoproteico pertenecientes a la clase III de la Súper familia 1. En las plantas se presentan como diversas isoenzimas o glicofomas con diferente localización dentro de la célula (Cardinalli 2011). Se localizan en las vacuolas, tonoplasto, plasmalema y dentro y fuera de la

pared celular, así como adheridas a membrana. Se han identificado peroxidadas de clase III en así muchas fuentes vegetales como el rábano picante (*Raphanus sativus*), papaya (*Carica papaya*), plátano (*Musa x paradisiaca*) (Neelam & Basal, 2013).

Están involucradas en una amplia gama de funciones en los organismos vegetales tales como: la regulación hormonal de la planta, maduración y senescencia, síntesis de lignina, entre otras. El peso molecular de las peroxidadas vegetales reportadas hasta ahora va de los 30 a los 60 KDa y tienen la capacidad de oxidar una gran variedad de compuestos fenólicos (De Oliveira 2021). Su reactividad sigue el ciclo catalítico que se esquematiza en la figura 2.

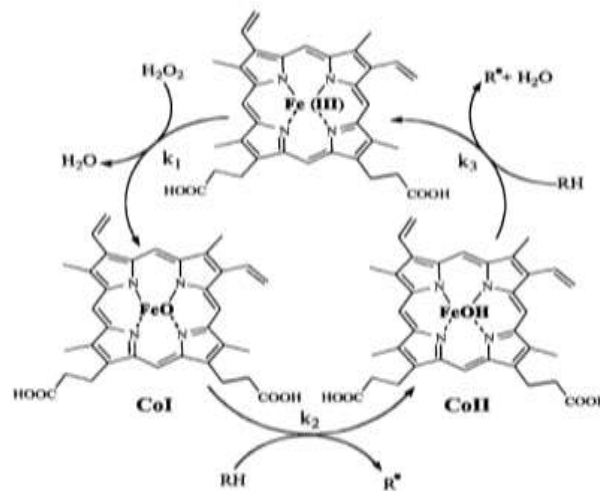


Figura 2 Ciclo catalítico de las peroxidadas clase III recuperada de Barceló (2002)

La reacción con la cual inicia el ciclo catalítico es la oxidación generada por el peróxido de hidrógeno hacia la forma férrica de la enzima (FeIII) mediante una oxidación bioelectrónica, para producir el intermediario CoI. Posteriormente el intermediario CoI, el cual es un catión de oxiferrilo porfirina, acepta un electrón y un protón del sustrato produciendo el radical correspondiente y así se crea el intermediario CoII. En el paso siguiente interviene una segunda molécula de sustrato la cual provoca la reducción a CoII que produce la forma férrica de la peroxidada, cerrando así el ciclo catalítico enzimático (Barceló, 2002).

Al tener ser un sistema de enzima y dos sustratos, los parámetros cinéticos de la

reacción catalizada por las peroxidasas pueden describirse según dos posibles mecanismos generales el modelo secuencial o el de "ping-pong".

El mecanismo secuencial consiste en la interacción entre los dos sustratos y la enzima lo que genera un complejo ternario previo a la catálisis; el otro mecanismo propone la interacción aleatoria (Random BI-BI) o en un orden obligatorio (Bi-Bi) para originar el complejo ternario, por lo cual los productos generados pueden liberarse de forma aleatoria u ordenada (Galende,2015).

En el mecanismo Ping-Pong, no existe la formación de un complejo ternario conformado por enzima y sustratos. Como se muestra en la figura 3, el primer sustrato (A) en un mecanismo ping-pong se combina con la enzima (E) para formar un intermediario enzimático sustituido (E*), con la consecuente liberación del primer producto (P); luego el segundo sustrato (B) interactúa con este intermediario para formar el segundo producto (Q) y regenerar la enzima nativa.

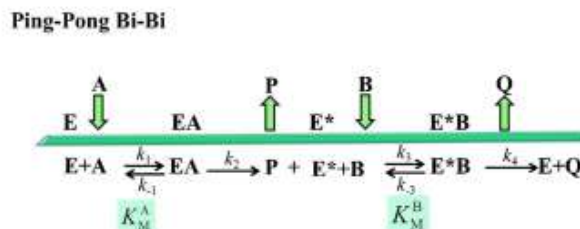


Figura 3. Mecanismo Ping-pong recuperada de Galende (2015)

Los mecanismos de ping-pong y secuenciales pueden diferenciarse mediante un análisis cinético de la reacción en estado estacionario, siguiendo el procedimiento descrito por (Cleland, 1963) que consiste en realizar mediciones de velocidad inicial, en las que las concentraciones de ambos sustratos (H_2O_2 y AH_2) se varían sistemáticamente y los resultados se analizan asumiendo condiciones de estado estacionario. Las tasas iniciales, v , en función de la concentración de peróxido de hidrógeno o AH_2 , se ajustan a la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten mediante un proceso iterativo.

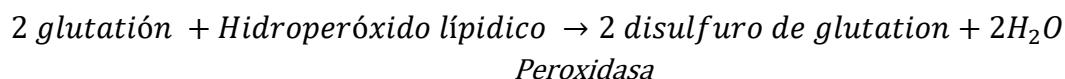
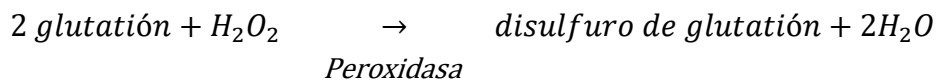
No hemo peroxidasas

Las no hemo peroxidasas son enzimas que en su estructura no poseen un grupo

prostético hemo y que siguen mecanismos de catálisis de acuerdo al cofactor o grupo prostético que poseen por lo que constituyen un grupo heterogéneo de enzimas, entre las que destacan las siguientes:

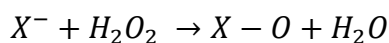
Glutación peroxidasas

Este grupo se caracteriza por la formación de un ácido sulfénico sobre la cisteína catalítica presente en la enzima durante el primer paso de la reducción del peróxido de hidrógeno. Engloba una gran variedad de isoenzimas que catalizan la reducción del peróxido a hidroperóxidos orgánicos, alcoholes correspondientes o agua empleando glutación reducido (Churin 1999), siguiendo el siguiente esquema de reacción:



Halo Peroxidasas

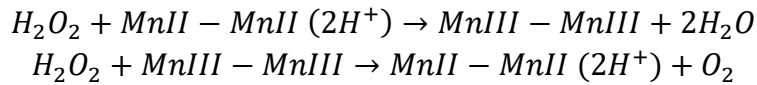
Las halo peroxidasas catalizan la transformación oxidativa de haluros o compuestos orgánicos halogenados en presencia de H_2O_2 , se nombran de acuerdo al haluro más electronegativo, la capacidad de las haloperoxidasas para halogenar una amplia gama de compuestos orgánicos de interés tanto comercial como farmacéutico, así como su alta estabilidad a altas temperaturas, condiciones oxidativas y en presencia de solventes orgánicos, las convierte en buenas candidatas para su uso en biotransformaciones industriales (Petellier 1995). Su mecanismo general de reacción puede esquematizarse como sigue:



Donde X es Halógeno.

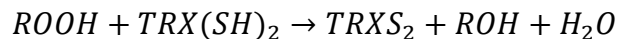
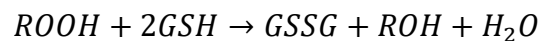
Manganeso Peroxidasas

Forman parte de una familia menor de catalasas y tienen peso molecular que va de 28 a 36 kDa. emplean iones de manganeso en lugar de Fe ferrico en su sitio activo, catalizan la reacción:



Tiol Peroxidasas

Tienen un grupo tiol o seleniol dentro de su sitio catalítico. El peróxido de hidrógeno interactúa con un seleniol o con un sulfidhidrilo que está presente en el sitio activo de la enzima, formando un ácido selénico y un ácido sulfénico. A diferencia del caso del oxígeno, la reacción de los tioles con H₂O₂ es una reacción de espín permitido y por lo tanto no está sujeto a barreras cinéticas. La reacción procede por un nucleófilo biomolecular vía sustitución (SN₂) (Bindoli, 2013).



Principales fuentes de peroxidasas utilizadas.

Como se mencionó anteriormente, las peroxidasas (EC.1.11.1.7) están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son producidas por plantas, microorganismos y animales. De entre todas las que se conocen, la peroxidasa del rábano rojo (HRP, por sus siglas en inglés) es la peroxidasa más caracterizada y comercializada para su uso en distintas aplicaciones. Su principal fuente de extracción es la raíz de rábano picante, una planta que se cultiva en climas fríos (D Oliveira; 2021). Es una molécula glomerular con una estructura secundaria principalmente conformada por alfa hélices con una pequeña región de láminas beta.

Las preparaciones comerciales se obtienen de las raíces de este rábano, y se conforman por una mezcla de isoenzimas.

Debido a la necesidad de obtener isoenzimas específicas se ha optado por la

expresión recombinante de la HRP en distintos organismos huéspedes. De esta forma se pueden producir de proteínas puras y funcionales mediante la inserción de un gen proteico en la célula de un organismo huésped utilizando un vector. Las enzimas recombinantes generalmente presentan una mayor homogeneidad en su estructura, estequiometría determinada y una alta especificidad respecto a las presentes en extracto crudo (Krainer, 2015).

Algunos de los organismos en los que se ha expresado heterológamente la HRP son bacterias levaduras, insectos y plantas. Por ejemplo, el gen HRP se clonó en un vector de expresión que se introdujo a *E.coli*. Un anticuerpo específico confirmó la producción exitosa de la enzima. Para la producción de HRP en bacterias se requiere utilizar sistemas de repliegamiento, y debido a que el rendimiento en su producción es bajo, aún no se utiliza comercialmente para aplicaciones biotecnológicas (Krainer, 2015).

Otros de los huéspedes comúnmente empleados para la inserción del gen de HRP son *Sacharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. La expresión en estas levaduras genera una hipermanosilación de la HRP por lo cual al efectuar una purificación mediante cromatografía de interacción hidrofóbica se

impidió la interacción con la fase estacionaria y se obtuvieron bajos rendimientos (Krainer; 2015).

También se ha reportado la utilización de un baculovirus infeccioso como vector de inserción en larvas de lepidópteros. En las larvas de *Spodoptera frugiperá* se produjo la mayor cantidad de HRP respecto a otros huéspedes de este orden (Krainer; 2015).

Finalmente, como alternativa a la producción de HRP en un huésped heterólogo, se informó una producción *in vitro* de HRP en cultivos de raíces peludas de rábano picante; sin embargo, este método requiere mucho tiempo y produce una mezcla de isoenzimas que deben separarse unas de otras (Krainer; 2015).

Sin embargo, la generación de enzimas recombinantes no es la única alternativa para obtener preparaciones puras. Aprovechando las diferencias que las enzimas presentan en sus parámetros fisicoquímicos, por ejemplo, es posible separar y

caracterizar nuevas peroxidasas de fuentes alternativas. La búsqueda de nuevas enzimas se ha vuelto una tarea de amplio interés con la finalidad de reducir costos, aumentar rendimientos y poder trabajar sobre una mayor variedad de sustratos (D Oliveira; 2021).

Técnicas de Purificación de enzimas.

La purificación de peroxidasas se ha llevado a cabo con el objetivo de poseer información respecto a sus propiedades fisicoquímicas, estructurales y funcionales, con fines de investigación, lo que sirve de base para una posible aplicación biotecnológica.

Para realizar una purificación proteica de una matriz multicomponentes es necesario basarse en alguna propiedad particular de la proteína deseada, dicha purificación puede ser de un solo paso o de varios en forma secuencial y ordenada según el previo análisis o el grado de pureza que se busca (Kumar, 2023).

Los métodos de separación aprovechan distintas características de las proteínas que vienen dadas principalmente por su secuencia de aminoácidos, como su peso molecular, su punto isoeléctrico, su carga neta, así como la respuesta que presentan ante agentes de carácter inmunológico como antígenos y anticuerpos o afinidad química. Algunos de los métodos de purificación más empleados son:

Cromatografía

Está basada en la separación de moléculas a través de su distribución en dos fases, una móvil y otra estacionaria, en la cual el tiempo de permanencia de la molécula en la fase estacionaria dependerá de sus propiedades (Rodríguez, 2021). Existen diversos tipos de cromatografía que aprovechan distintas características de la proteína de interés:

Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular separa las moléculas de acuerdo a su tamaño mediante un gel que está conformado por esferificaciones porosas que tienen una distribución de tamaño específica. Las moléculas se separan de acuerdo

a su tamaño a medida que pasan a través de una columna que contiene dicho gel y se eluyen de forma decreciente a su peso molecular (Kumar,2023).

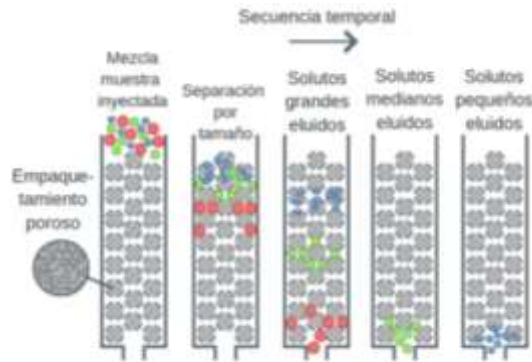


Figura 4. Cromatografía de exclusión molecular recuperada de <https://theory.labster.com/secchromatography-es>

Cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía de intercambio iónico separa moléculas de acuerdo a su carga neta, en la cual la molécula pasa a través de una resina que contiene grupos funcionales cargados negativamente o positivamente y unidos covalentemente a un medio sólido; generando un intercambiador aniónico o catiónico respectivamente. Los compuestos se adhieren a este intercambiador siguiendo un comportamiento coulombico según su carga, mientras que los compuestos neutros o de misma carga pasan a través de la columna sin adherirse. La adhesión de las moléculas en la resina es reversible y los compuestos retenidos generalmente se eluyen con un gradiente salino o de pH. La propiedad que determinará el uso de esta técnica es el punto isoeléctrico de la proteína. (Rodríguez & al. 2021)

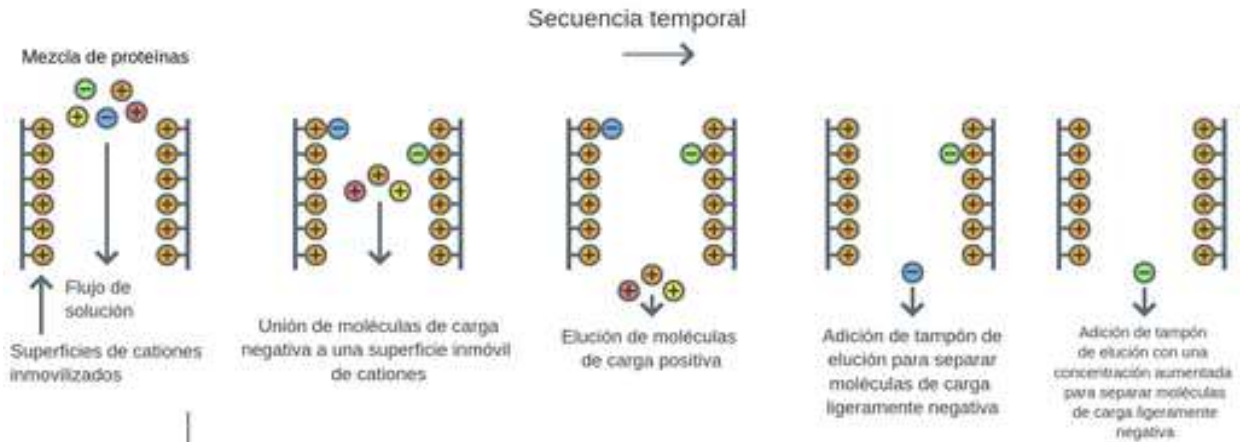


Figura 5 Cromatografía de intercambio iónico recuperada de :<https://theory.labster.com/iexchromatography-es/>

Cromatografía de afinidad

Es un método de separación basado en una interacción de unión específica entre un ligando inmobilizado y su par de unión. El grado de purificación con esta técnica puede ser bastante elevado por la especificidad de la molécula al ligando. Algunas de estas interacciones son: enzima/sustrato, enzima/inhibidor, antígeno/anticuerpo. Coskun; 2016).

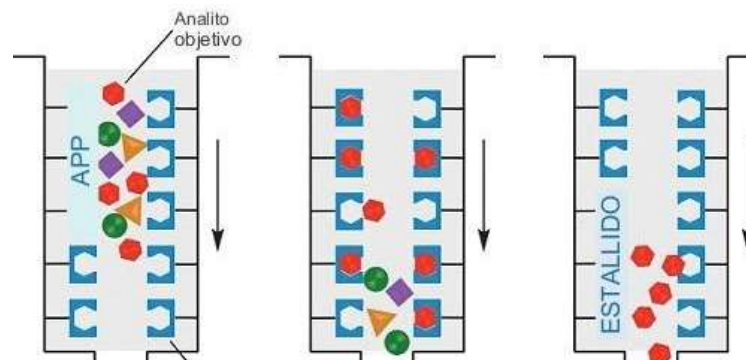


Figura 6. Cromatografía de afinidad recuperada de:<https://thealevelbiologist.co.uk/images/saffi.jpg>

Cromatografía de interacciones hidrofóbicas

Este tipo de cromatografía explota regiones hidrófobas presentes en macromoléculas, las cuales se van a unir a ligantes hidrofóbicos unidos a los adsorbentes de la cromatografía, La polaridad del disolvente se puede controlar mediante la adición de sales o solventes orgánicos, las cuales pueden favorecer o debilitar la interacción con el adsorbente (Coskun, 2016).

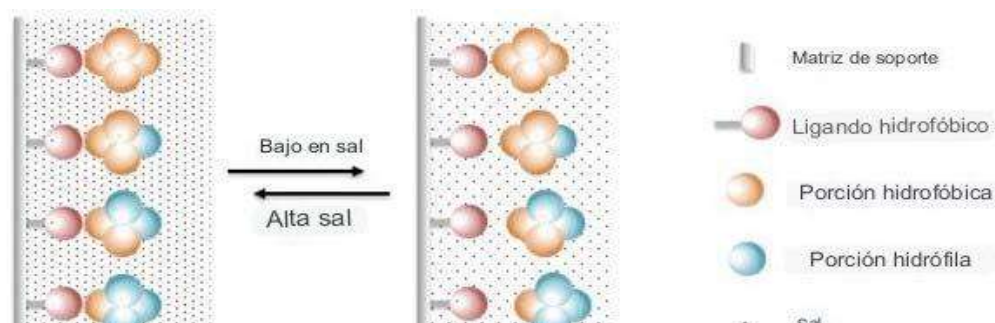


Figura 7. Cromatografía de interacciones hidrofóbicas recuperada de: American Pharmaceutical Review.

Aplicaciones de las peroxidasas

Las peroxidasas son enzimas que pueden transformar una gran variedad de compuestos mediante un mecanismo de radicales libres oxidando o polimerizando compuestos (Bansal, 2013). Se usan en amplia gama de procesos y ensayos en distintas ramas tecnológicas como biomedicina, bioenergía, biorremediación y en aplicaciones en la industria de alimentos, farmacéutica, textil entre otras.

Aplicaciones médicas o terapéuticas

Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) son pruebas diseñadas para detectar antígenos y anticuerpos mediante la producción de un cambio de color desencadenado por una enzima, la HRP (horseradish peroxidase) es comúnmente las enzimas más utilizada en este tipo de ensayos. (Hamid, 2009) se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP para detectar péptidos de la envoltura del VIH-1, Se utilizan en la producción de kits de diagnóstico para glucosa, ácido úrico, triglicéridos y colesterol. (Krainer, 2015)

Aplicaciones analíticas

Los biosensores electroquímicos con electrodos basados en peroxidasas han adquirido una amplia aceptación en el ámbito de los sistemas analíticos debido a su desempeño en la determinación de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos. Esta preferencia se fundamenta en la singular especificidad de las

enzimas utilizadas y en la sensibilidad inherente a las técnicas electroanalíticas.

Estos dispositivos se han destacado en ensayos altamente específicos, aprovechando la capacidad única de las peroxidasas para interactuar selectivamente con sustratos específicos. La ventaja adicional radica en la conveniencia y la sensibilidad que ofrecen las técnicas electroanalíticas, lo que facilita la investigación de diversas facetas relacionadas con las proteínas, como la exploración de la estructura de las proteínas, los mecanismos redox que afectan a las moléculas proteicas y los procesos metabólicos que están intrínsecamente ligados a las transformaciones redox. (Jia et al, 2002).

Aplicaciones en alimentos

Degradación de Micotoxinas

La utilización de peroxidasas ha demostrado un gran potencial en la descontaminación de alimentos contaminados con micotoxinas. Esto se debe a la capacidad enzimática de las peroxidasas para catalizar reacciones de oxidación en una amplia variedad de sustratos orgánicos. Uno de los ejemplos más destacados en este contexto es la reducción de aflatoxina B1 en productos alimenticios como la leche y la cerveza, como lo documentaron Mathé y colaboradores (2010).

Las aflatoxinas, y en particular la aflatoxina B1, son metabolitos tóxicos producidos por ciertos hongos, y su presencia en alimentos es motivo de gran preocupación debido a sus efectos adversos para la salud humana. El uso de peroxidasas para reducir la concentración de aflatoxina B1 en estos productos alimenticios es un enfoque prometedor para mitigar los riesgos asociados con la contaminación de micotoxinas (Mathé et al., 2010).

Monitoreo de la eficiencia del procesamiento térmico.

Las peroxidasas han encontrado aplicación en la evaluación de procesos térmicos en la industria alimentaria debido a su notable capacidad para resistir temperaturas elevadas y su relativa estabilidad térmica. Un ejemplo significativo de esta aplicación es su uso como indicadores de la eficiencia del procesamiento térmico de frutas y verduras, como se señala en el estudio realizado por Dantas y Da Silva

en 2018. La resistencia de las peroxidasas a las altas temperaturas las convierte en marcadores útiles para evaluar el tratamiento térmico al que se someten estos productos.

Su presencia o actividad residual después del procesamiento puede indicar la insuficiente eficacia del tratamiento, lo que puede tener implicaciones en términos de seguridad alimentaria y calidad del producto final.

Además, las peroxidasas también desempeñan un papel fundamental en la evaluación del proceso de esterilización de la leche mediante la tecnología UHT (Ultra Alta Temperatura). En este contexto, su inactivación es un indicador clave de que el tratamiento térmico fue el adecuado (Martins et al.; 2008.)

Cuantificación de glucosa en tubérculos

La cuantificación de glucosa se basa en una reacción de oxidación donde la glucosa se convierte en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, un proceso catalizado por la enzima glucosa-oxidasa. Posteriormente, el peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminoantipiridina y fenol bajo la actividad de la peroxidasa, dando lugar a la formación de un complejo rojo denominado quinoneína. La intensidad del color desarrollado en esta reacción es directamente proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra.

Este método analítico se ha empleado para la cuantificación de glucosa en camotes, particularmente en el contexto de la industria procesadora de este tubérculo. En dicha industria, se requiere que los camotes presenten niveles bajos de azúcares reductores, incluyendo glucosa y fructosa, ya que estos azúcares son responsables de la coloración final del producto una vez que ha sido sometido a procesos de fritura, como se informa en el estudio realizado por Pereira et al. (2008). El control de la concentración de glucosa en los camotes es esencial para garantizar la calidad y características deseadas del producto final en la industria alimentaria, particularmente en el proceso de fritura. La utilización de esta metodología analítica permite una evaluación de los niveles de azúcares reductores en camotes, contribuyendo así al control de la calidad en la producción de alimentos

procesados a base de este tubérculo.

Aplicaciones en biorremediación

La biorremediación se erige como una rama destacada de la biotecnología, que se apoya en la capacidad intrínseca de las plantas y microorganismos para acumular, detoxificar o eliminar compuestos contaminantes (Hlihor 2017).

En el contexto de la biorremediación, la búsqueda de soluciones alternativas que minimicen la cantidad de residuos vertidos al entorno ambiental se manifiesta como una imperiosa necesidad. Dentro de este ámbito, la transformación enzimática ha suscitado un creciente interés en la concepción de procesos innovadores conocidos como "eco-procesos", presentando una perspectiva sumamente atractiva al reemplazar los catalizadores químicos tradicionales por catalizadores biológicos (Shakerian et al. 2020, Stadlmair et al. 2018.)

Una serie de aplicaciones de gran relevancia involucran el uso de peroxidasas como catalizadores en el contexto de la biorremediación, algunas de estas aplicaciones se describen en la tabla 1.

Tabla 1 Aplicaciones de peroxidasas en biorremediación

Proceso	Mecanismo de acción de la peroxidasas	Referencias
Degradación de contaminantes fenólicos	Polimerización de contaminantes	(Catucci G et al. 2020) (Huang et al., 2002) (Xu, L. et al.,2021)
Eliminación de colorantes sintéticos	Reacciones de oxidorreducción y polimerización	(Altahir et al, 2020) (Hamid et al,2007) (Svetozarević et al.,2022)
Desodorización de estiércol porcino	Reacciones de oxidorreducción y polimerización	(Govere et al, 2007) (Yan et al. 2016)
Degradación de antibióticos en fuentes de agua o alimentos	Reacciones de oxidorreducción	(Muhammad et al,2019) (Tufail et al, 2022) (Wu et al. 2022)

Estos enfoques surgen como una respuesta esencial para abordar la necesidad de desarrollar técnicas de saneamiento ambiental capaces de eliminar o reducir sustancias que podrían tener un impacto ambiental perjudicial.

El desarrollo de estos métodos resalta la importancia de buscar enfoques sostenibles y respetuosos con el medio ambiente para la eliminación de agentes contaminantes, contribuyendo así a la preservación y restauración de ecosistemas afectados y al logro de un equilibrio ambiental más saludable.

El principio detrás del uso de peroxidasas en estos procesos, implica reacciones de polimerización oxidativa que resultan en la formación de oligómeros insolubles. Esta insolubilidad facilita la separación, ya que los oligómeros tienden a precipitar o sedimentarse, simplificando así el proceso de filtración (Dordick, 1987). De esta forma, en presencia de peróxido de hidrógeno, las peroxidasas convierten a sustratos fenólicos en radicales fenoxi que se polimerizan entre sí o con otras sustancias reactivas que estén presentes (Torres-Duarte & Vázquez-Duhart, 2010) como se muestra en la figura 8.

En la etapa de oxidación, es crucial contar con una molécula capaz de aceptar electrones. En este contexto, el peróxido de hidrógeno puede cumplir esta función, destacando así la relevancia de las peroxidasas como catalizadores clave en este proceso siguiendo el siguiente mecanismo:

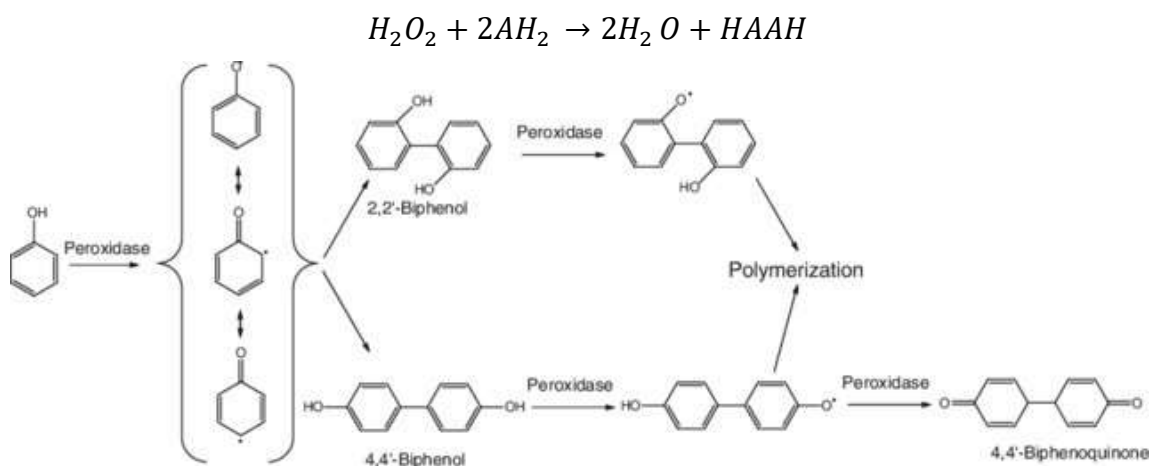


Figura 8. Mecanismo de oxidación y polimerización de compuestos fenólicos catalizado por peroxidasas. Tomada de Torres-Duarte & Vázquez-Duhart, 2010.

Materiales y metodología

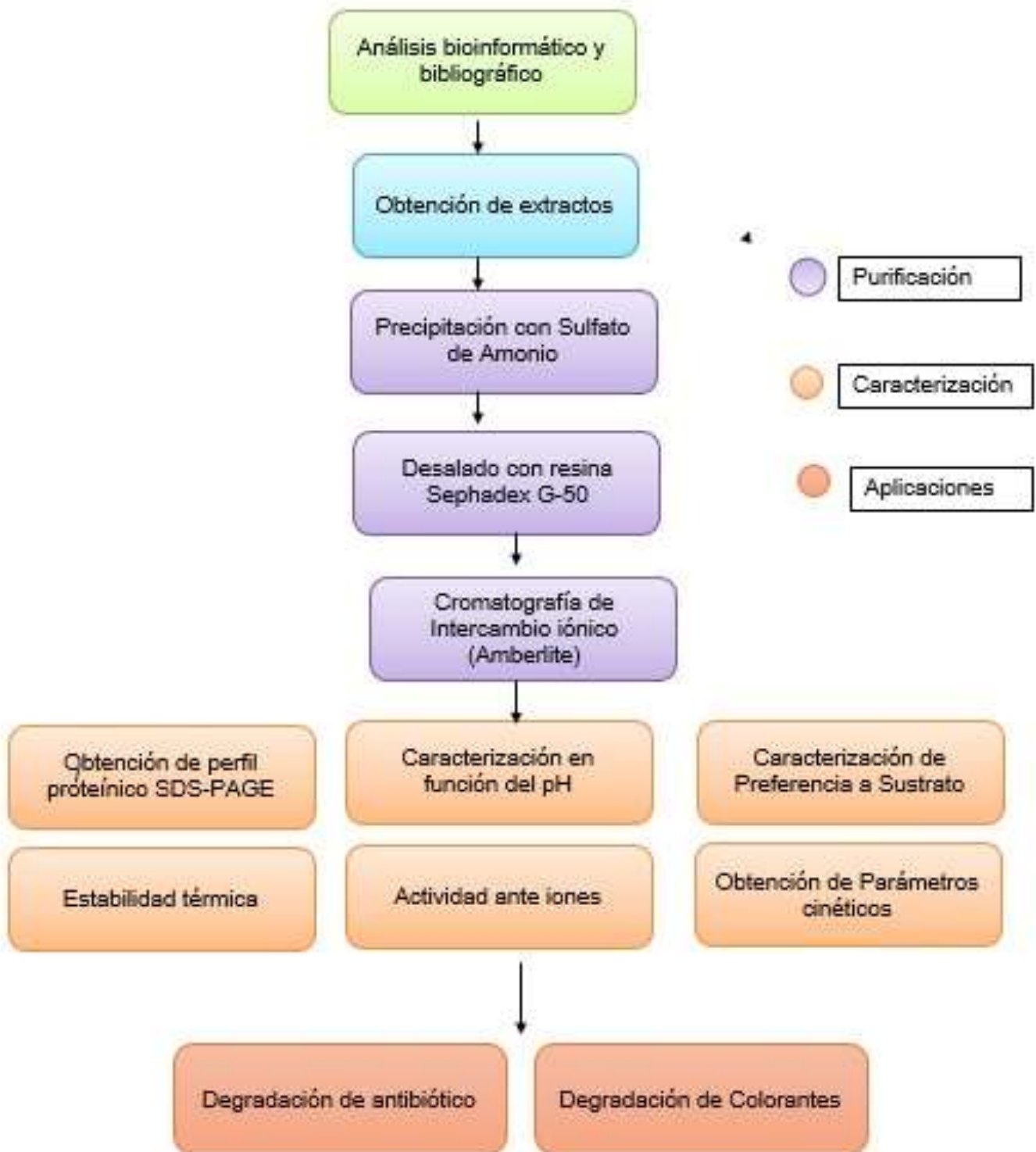


Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología

Muestras utilizadas

Se utilizaron muestras de rábano rojo (*Raphanus sativus*), nabo (*Brassica rapa rapa*) y rábano blanco (*Raphanus sativus* var. *Longipin natus*) provenientes de un mercado local (Mercado de San Juan, Alcaldía Cuauhtémoc. CDMX) así como de nopal (*Opuntia ficus-indica*) proveniente de la alcaldía Milpa Alta y comprado en el mismo mercado local.

Análisis Bioinformático:

Se realizaron búsquedas en las bases de datos BRENDA (Disponible en <https://www.brenda-enzymes.org/>) y UNIPROT (Disponible en <https://www.uniprot.org>) con la finalidad de obtener información sobre los parámetros fisicoquímicos de las peroxidases vegetales ya reportadas, para planear la estrategia de purificación.

Obtención de extracto crudo

Para obtener el extracto crudo, las muestras vegetales previamente lavadas y desinfectadas se trataron en un procesador de alimentos marca Molinex©. El extracto obtenido se filtró a vacío y el sobrenadante se aforó a un volumen final de 200 mL con buffer de fosfatos 0.1M pH 7.0.

Cuantificación de Proteína y medición de actividad:

Para la cuantificación de proteína en las muestras, se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm de la solución enzimática debidamente diluida usando como blanco el buffer de trabajo. La concentración de proteína se obtuvo empleando el siguiente algoritmo:

$$\text{Concentración de proteína} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = 1.55.A_{280} - 0.76.A_{260}$$

La actividad de peroxidasa (POD) se determinó espectrofotométricamente utilizando como sustratos guayacol y peróxido de hidrógeno. Se monitoreó la reacción a 420 nm en modo cinética durante 1 minuto con mediciones cada 5

segundos. La mezcla de reacción contenía 500µL de extracto enzimático, 2100µL de buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0, 300 µL de guayacol 40 mM y 100µL de peróxido de hidrógeno al 1%, a partir de lo reportado por Thongsook y Barret (2005).

La medición de actividad y proteína se realizó de este modo después de cada paso de purificación.

Protocolo de purificación de proteínas con actividad peroxidasa

Precipitación con sulfato de amonio.

Con la finalidad de concentrar la fracción de enzimas de interés, se llevó a cabo una precipitación de proteína usando sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se probaron dos combinaciones de saturación de sal al 30% y 50% y al 60% y 80% partiendo de lo reportado por Khurdish (2012).

Se utilizó la herramienta bioinformática Ammonium Sulfate Calculator (Disponible en <https://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>) para efectuar el cálculo de la cantidad de sulfato necesaria para esas concentraciones.

Desalado

Para eliminar el sulfato de amonio después de la precipitación, se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular utilizando como matriz resina Sephadex G-50 y siguiendo el protocolo básico descrito por Ausubel y colaboradores (1999). En el primer paso de elución, se procedió a lavar la columna con 3.0 mL de un buffer de fosfatos 0.1M pH de 7.0. Posteriormente, se inyectaron 800 µL de la muestra de interés en la columna, seguido de la adición de 400 µL del mismo buffer y se dejó eluir por gravedad. Los primeros 200 µL recuperados se consideraron como el volumen muerto.

Luego de la obtención del volumen muerto, se añadieron 500 µL de buffer adicional y se siguió con la elución por gravedad para recolectar un volumen de 1.5 mL correspondiente al cuerpo del producto de interés. Finalmente, se procedió a lavar la columna con 400 µL de buffer para asegurar la eliminación de cualquier material

no deseado.

Intercambio iónico

La fracción de proteínas, previamente desalada, fue sometida a un proceso de cromatografía de intercambio iónico utilizando una resina Amberlite. Esta resina se fabrica a partir de polímeros de estireno reticulado que pueden ser funcionalizados con grupos específicos para adaptarla a procesos de intercambio iónico.

El proceso de cromatografía se llevó a cabo en una columna previamente equilibrada con un buffer de fosfatos 50 mM pH de 7.0. La elución de las proteínas se realizó mediante la aplicación de un gradiente de NaCl, de concentración 0.1 a 0.5 Mm, a partir de la metodología descrita por Thongsook en 2005, con algunas adaptaciones específicas. Estas modificaciones incluyeron el ajuste de la altura de la columna a 3.0 cm y un tiempo de incubación de la muestra en la columna de 20 minutos a una temperatura de 4°C. La muestra inyectada en la columna constó de 250 µL, la cual fue posteriormente eluída a través de las diferentes concentraciones de NaCl colectando fracciones de 500 µL cada una.

Perfil proteínico SDS PAGE

Para visualizar el avance de la purificación y el perfil de proteínas de las fracciones se realizó una electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a una concentración del 12% de acrilamida, según el método de Laemmli (1970).

Se cargaron 20µL de fracción proteica en cada pozo con una concentración de 50µg/mL y se utilizó un marcador de peso molecular con un intervalo de 20 a 250 KDa (Bio-Rad).

La electroforesis se corrió a 4°C en una cámara MiniProteanII (Bio-Rad) con un voltaje inicial de 80 mV que se incrementó a 120 mV para la separación. Luego de la electroforesis los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie al 20% en donde permanecieron con condiciones de agitación durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de teñido, el gel se sumergió en una solución desteñidora

con el objetivo de eliminar el exceso de colorante y visualizar las bandas de proteína, según la metodología de Bermúdez (2013).

Los geles se digitalizaron en un sistema Gel Doc (Bio-Rad) utilizando el software Image Lab (Bio-Rad).

Caracterización de la fracción purificada

Estabilidad de las fracciones purificadas en función del pH

Para conocer la estabilidad frente a pH de la fracción purificada obtenida, se midió la actividad de las fracciones después de incubarse durante 60 y 180 minutos en buffers con pHs de 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0 cada uno. Para esto se colocaron 5 unidades de enzima en un volumen final de 1000 μL con el respectivo buffer de trabajo.

Los buffers utilizados fueron: acetatos ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$) 50 mM para pH 5.0, buffer de fosfatos ($\text{HPO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4$) 50 mM para pH 6.0 y 7.0 y buffer TRIS 50 mM para pH 8.0 y 9.0. La medición de proteína y actividad se realizó como se describió anteriormente.

Caracterización en función de temperatura.

Se colocaron 100 μL del extracto enzimático en 900 μL de buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0 y se incubaron durante 10 minutos en un baño de agua a temperaturas de 20, 30, 35, 40, 50 y 60°C. Una vez que la solución alcanzó la temperatura ambiente, se tomaron 500 μL y se les añadió 500 μL de guayacol y 100 μL de H_2O_2 en 1900MI de buffer de fosfatos pH 7.0 y se midió la actividad residual de la enzima espectrofotométricamente respecto a guayacol 40mM con la técnica ya mencionada.

Caracterización en función de preferencia de sustrato.

Para caracterizar las fracciones en función de su actividad específica frente a distintos sustratos, se realizaron cinéticas de actividad durante 1 minuto utilizando distintos compuestos fenólicos a concentraciones 40mM: guayacol y pirogalol ($\lambda=$

420 nm), ácido ferúlico y ácido cafeico ($\lambda = 515$ nm.) e hidroquinona ($\lambda = 215$ nm). En estos ensayos, la actividad contra los distintos sustratos se reportó como los milimoles de sustrato consumidos en 1 min.

Actividad ante iones

La peroxidasa purificada se incubó durante 20 min con agitación constante a 30° C a 50 rpm en una incubadora de agitación y temperatura controlada (Thermo Fisher) con los distintos iones ensayados: K^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} y con el agente quelante EDTA a una concentración de 1.0 mM. Se midió la actividad residual frente a la actividad a la enzima sin adición de iones o agente secuestrante que se consideró el 100%.

Determinación de parámetros cinéticos

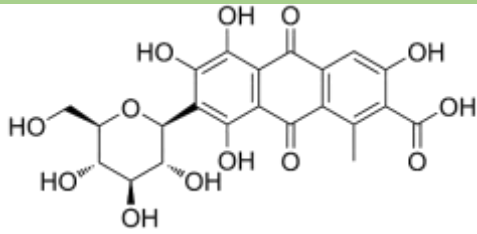
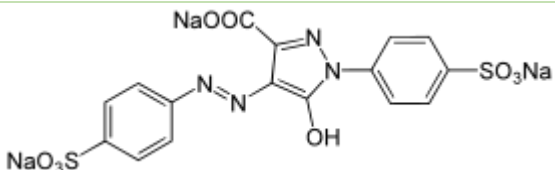
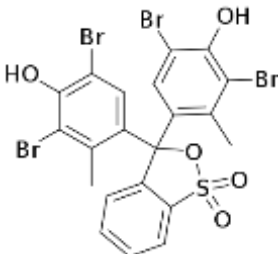
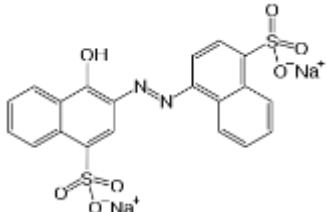
Para la obtención de los parámetros cinéticos de la enzima se realizó la medición de la velocidad inicial a diferentes concentraciones de guayacol y peróxido de hidrógeno como lo describen (Cleland, 1963; Galende, 2015), variando primero las concentraciones del sustrato reductor (guayacol) entre 2 y 15 mM y manteniendo fija la concentración de H_2O_2 a 0.5 mM, y posteriormente, variando las concentraciones de H_2O_2 entre 0.5 y 10 mM, y manteniendo fija la concentración de guayacol a 6.6 mM. Las reacciones se llevaron a cabo a 25 °C en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.0. A partir de las velocidades iniciales obtenidas, se calculó la K_m y la V_{max} para ambos sustratos siguiendo los cálculos detallados en el Anexo 1.

Reacciones de degradación

Evaluación de la capacidad para degradar colorantes

Se evaluó la capacidad de la peroxidasa para degradar colorantes de distinta naturaleza mediante ensayos espectrofotométricos. Primero se prepararon curvas patrón de cada uno de los colorantes a ensayar: rojo carmín, amarillo naranja, verde de bromocresol, rojo no.5 en un intervalo de concentración de entre 0 y 100 mg/L. Se midió la absorbancia de cada concentración a las longitudes de onda señaladas en la tabla 2.

Tabla 2. Picos de máxima absorción (nm) de colorantes analizados

Colorante	Longitud de máx absorción (nm)	Estructura
Rojo Carmín	485	
Amarillo Naranja	485	
Verde de Bromocresol	428	
Rojo No.5	516	

Para la reacción de degradación enzimática se utilizaron 3.0 mL de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.0 con 500µL de extracto enzimático purificado y se añadieron 500 µL de colorante a concentración 5mg/L con una relación 2:1 H₂O₂/colorante. La mezcla de reacción se incubó durante 72 h a 30° C y con agitación de 100 rpm y se monitoreó el cambio de absorbancia cada 24 horas para conocer la concentración residual del colorante.

Degradación de antibióticos

Para observar la capacidad de las peroxidasas para degradar antibióticos betalactámicos, se utilizó Ampicilina, (Marovilina® , Atlantis® pharma). Se adaptó la metodología de Asan (2022) que la cual consiste en el uso de un método

espectrofotométrico aprovechando la reacción de formación de un complejo entre el antibiótico y el verde de bromocresol, empleando como solventes DMSO/Acetonitrilo con una relación 1:1.

Primeramente, se generó una curva patrón del antibiótico con un intervalo de concentraciones de 2, 6, 10, 14 y 18 $\mu\text{g/L}$. Para llevar a cabo la reacción de complejación se tomaron 250 μL de cada concentración en la mezcla de disolventes y se mezclaron con 250 μl de verde de bromocresol 2.5 mM. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 90 segundos y se cuantificó su absorbancia a 630 nm.

La reacción de degradación enzimática se realizó con 5U de peroxidasa purificada y una concentración inicial de antibiótico de 17 $\mu\text{g/L}$ en DMSO/Acetonitrilo relación 1:1. La mezcla de reacción se incubó a 30°C y 100 rpm durante 72 h, con muestreos de 24 h en los que se tomó una muestra de reacción de 500 μL para medir la concentración residual de antibiótico de forma indirecta utilizando la reacción de formación del complejo.

Resultados y discusión

Análisis de las peroxidasas reportadas en bases de datos

Para conocer algunas de las propiedades fisicoquímicas de las peroxidasas de fuentes vegetales de interés, se realizó una búsqueda con el objetivo de conocer el número de peroxidasas reportadas para fuentes vegetales, en bases de datos de enzimas BRENDA en donde están reportadas, 165 peroxidasas, de las cuales 70 provienen de fuentes vegetales como se observa en la figura 9. A partir de este análisis, la búsqueda se enfocó a la familia *Brassicaceae*, debido al gran número de peroxidasas reportadas para esta familia.

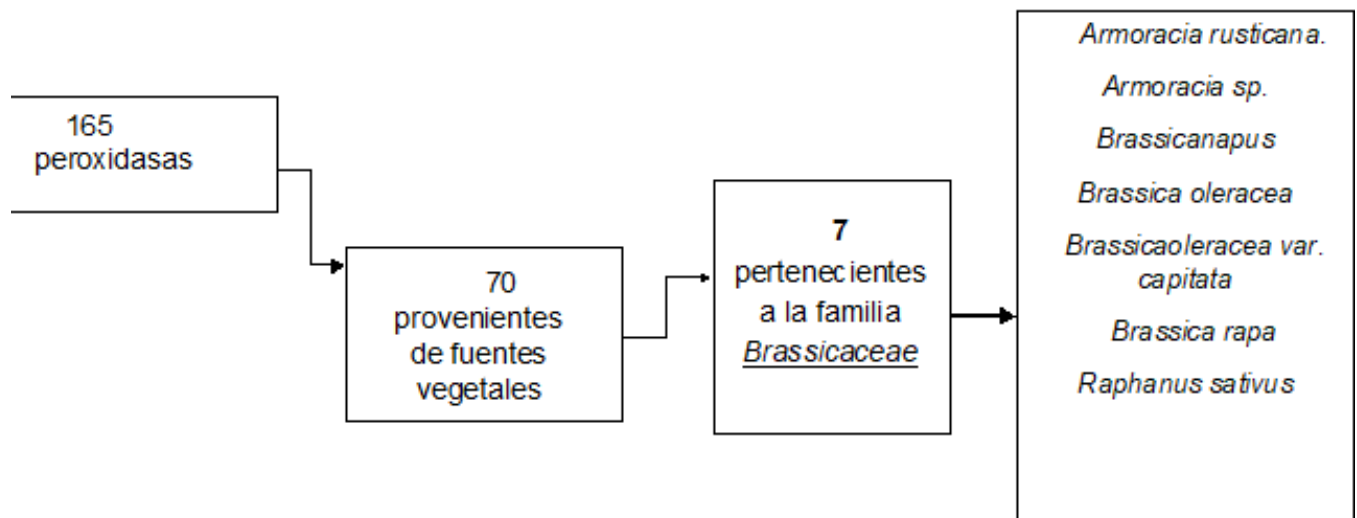


Figura 10. Peroxidasas de fuentes vegetales reportadas en bases de datos

Como se observa en la tabla 3 se han identificado un total de 10 peroxidasas con masas moleculares que oscilan en el rango de 35 a 60 kilodaltons (kDa). Además, se observa una notable variabilidad en sus puntos isoeléctricos (pI). Algunas de estas peroxidasas presentan pI cercanos a 5, mientras que otras muestran valores más cercanos a 9. Esta diversidad en las masas moleculares y los pI refleja la heterogeneidad de estas enzimas.

Tabla 3. Información de peroxidasas de la familia de las Brassicas

Fuente	Identificador (UNIPROT)	pI	Peso molecular (KDa)	Referencia
<i>Armoracia rusticana</i>	K7ZW28*	4.8	35.029	Krainer FW (2014)
<i>Armoracia rusticana</i>	K7ZW57*	4.8	37.94	
<i>Armoracia rusticana</i>	K7ZWW6*	4.8	38.825	
<i>Armoracia rusticana</i>	No reportado	6.4	60	Spadiut(2012)
<i>Armoracia rusticana</i>	No reportado		40	Lavery(2010)
<i>Armoracia rusticana</i>	No reportado	8.8		
<i>Armoracia rusticana</i>	No reportado	8.8	44	GuoS.(2008)
<i>Armoracia rusticana</i>	K7ZW28*	9	35.029	Krainer FW (2014)
<i>Armoracia rusticana</i>	K7ZW57*	9	37.94	
<i>Armoracia rusticana</i>	K7ZWW6*	9	38.825	
<i>Brassica oleracea</i>	No reportado	8	43	Thongsook T (2005).

Obtención de extractos.

Se obtuvieron los extractos crudos con actividad de peroxidasa provenientes de 4 fuentes vegetales estudiadas: rábano rojo (*Raphanus sativus*), nabo (*Brassica rapa rapa*) rábano blanco (*Raphanus sativus var. longipin natus*) y nopal (*Opuntia ficus-indica*). Como se presenta en la tabla 4, es posible observar que el extracto que

presentó la mayor actividad específica fue el de rábano blanco, mientras que el extracto con menor actividad específica fue el del nopal.

Tabla 4. Actividad volumétrica y específica de peroxidasa obtenida a partir de los extractos crudos de vegetales de la familia de las brassicas

Fuente	Actividad volumétrica (U*)	Actividad Específica (U/mg)
Rábano rojo	5.23 ± 0.16	0.54
Rábano Blanco	7.9 ± 0.30	4.83
Nabo	7.6	1.87
Nopal	0.122	0.016

*Una unidad de actividad enzimática se define como los milimoles de guayacol transformados por min. Thongsook (2005).

Nota: En el caso del nabo y nopal solo se efectuó una extracción, por lo cual no se reporta desviación estándar.

Se realizó la purificación de los extractos de rábano rojo, rábano blanco y nopal. Se decidió caracterizar el extracto del nopal porque existe muy poca información respecto a las peroxidases presentes en este vegetal. Además, se trabajó con rábano blanco por ser el extracto que presentó mayor actividad y con rábano rojo debido a los numerosos reportes que ya existen sobre las peroxidases de esta fuente (Lavery CB, M. M. 2010).

Purificación de fracciones con actividad peroxidasa

Como primer paso de purificación se llevó a cabo la precipitación con sulfato de amonio. En este paso se realizó la optimización de las concentraciones de sal que permitieran concentrar las proteínas de interés, y eliminar otros compuestos presentes en el extracto. Se ensayaron dos pares de concentraciones de saturación de sal: 50% y 85%; y 30% y 90%. Para los tres extractos utilizados la combinación que permitió obtener una mayor actividad específica en la fracción precipitada fue la de 30% y 90% por lo que se decidió utilizar estas condiciones en todas las precipitaciones.

Las fracciones precipitadas y previamente desaladas, que demostraron actividad enzimática, fueron sometidas a una etapa de intercambio de tipo aniónico. Se optó

por mantener un pH de 7.0, ya que el análisis bioinformático previo identificó varias peroxidasas provenientes de plantas del género *Brassica*, las cuales se caracterizan por tener puntos isoeléctricos (pI) inferiores a este valor. Esto sugiere que, bajo condiciones de pH neutro, estas enzimas podrían ser identificadas de manera más efectiva.

Para llevar a cabo el proceso de intercambio iónico, se empleó una columna de resina Amberlite. Durante el proceso de elución de la columna, se manejó un rango de concentraciones de NaCl, que varió desde 0.1 hasta 0.5 mM, utilizando un tampón de fosfatos pH7.0 a una concentración de 50 mM.

Con el propósito de identificar el punto óptimo de elución de las proteínas de interés, se realizó un seguimiento cualitativo de la actividad de la peroxidasa, como se ilustra en la Figura 10. Esta estrategia permitió determinar que la fuerza iónica generada por el cloruro de sodio permitía la elución efectiva de las proteínas a concentraciones de 0.1 mM y 0.2 mM de NaCl. Estas fracciones con mayor actividad fueron combinadas en un pool, consolidando así el material de interés.

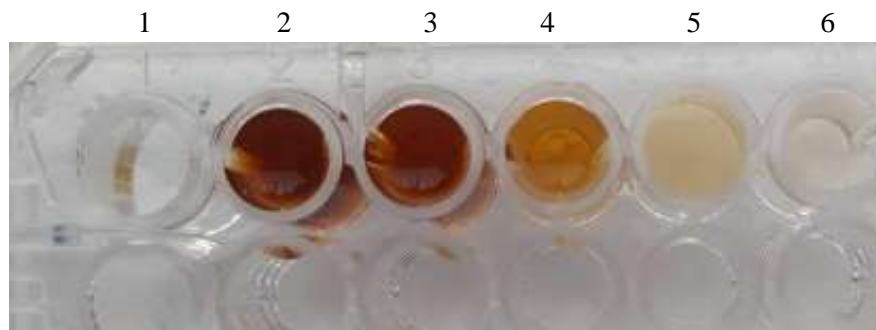


Figura 11. Seguimiento Cualitativo de actividad peroxidasa en intercambio iónico. El pozo 1 muestra el blanco de reacción, del pozo 2 con una concentración de 0.1 mM, pozo 3-0.2 Mm, pozo 4-0.3 mM, pozo 5-0.4mM y finalmente el pozo 6 a 0.5 mM

Resumen de la estrategia de purificación.

En las tablas 5, 6 y 7 se muestra el resumen de las etapas de purificación. Como se puede apreciar, la estrategia de purificación fue eficaz ya que permitió obtener para todos los extractos, luego del intercambio iónico, fracciones enriquecidas en

las proteínas de interés, con una alta actividad específica que es el resultado del cociente entre la actividad total (U) y la cantidad de proteína (mg) Como se esperaba para una estrategia de purificación se observa un incremento de actividad conforme avanzamos en cada paso de la purificación, lo cual denota un enriquecimiento de las proteínas con actividad de peroxidasa presentes en los diferentes extractos. En las tablas también se indica el cálculo del número de veces de purificación obtenido, que nos habla sobre el enriquecimiento de la peroxidasa en cada paso. Una consecuencia de la purificación, es la eliminación de proteínas que no tiene actividad de tipo peroxidasa bajo las condiciones ensayadas, lo que repercute en la disminución de la concentración de proteínas totales conforme avanzamos en los pasos de purificación. Esto se ve reflejado en el rendimiento obtenido que fluctuó entre 0.87 y 6.4% para las fracciones aniónicas obtenidas.

Tabla 5 Purificación rábano blanco

Rábano Blanco	Vol. (mL)	mg P totales	U totales. Actividad	Act. Específica (U/mg P)	Rendimiento (%)	Veces de Purificación
Extracto	200.0	326.7	1581.2	4.84	100.00	1.00
Precipitación (pp 90%)	40.0	36.0	1080.4	30.09	68.30	6.22
Fracción desalada	20.0	20.0	3.73	117.02	27.60	24.18
Pool Intercambio iónico	10.0	0.1	17.9	179.00	1.13	36.98

Purificación de las peroxidasas de rábano blanco

En el caso del rábano blanco, se obtuvo una fracción aniónica con una actividad específica de 121.04 U/mg proteína, y con 36.98 veces de purificación. Khurdish (2012) reporta la purificación de enzimas de esta misma fuente obteniendo 27 veces de purificación y una menor actividad específica (39.30 U/mg proteína),

utilizando únicamente la precipitación por sulfato de amonio al 80% de saturación con su correspondiente desalado. El hecho de que no se haya utilizado otro paso de purificación, repercute en que en el extracto obtenido todavía persistan proteínas sin actividad de peroxidasa.

Contrastando ese reporte con los resultados que se obtuvieron en este trabajo, se destaca la importancia de utilizar más pasos de purificación, como el intercambio iónico que permite recuperar enzimas de interés en función de su punto isoeléctrico. Además, se puede observar que al utilizar una saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 90% durante la precipitación, se logró obtener una fracción con una mayor actividad específica respecto a lo reportado por Khurdish (2012).

Tabla 6 Purificación rábano rojo

Rábano Rojo	Vol. (mL)	mg P totales	U totales. Actividad	Act. Específica (U/mg P)	Rendimiento (%)	Veces de Purificación
Extracto	200	5526.60	1010.82	0.18	100	1,00
Precipitación (pp 90%)	40	34.36	107.92	3.14	10.68	17.17
F4 A (desalado G50)	20	25.04	88.09	3.50	8.72	19.24
Pool FIA	10	1.73	8.78	5.07	0.87	27.71

Purificación de las peroxidasas de rábano rojo

Para el rábano rojo se obtuvieron 27.71 veces de purificación con una actividad específica final de 5.07 U/mg proteína. Si bien, el procedimiento empleado permitió obtener una fracción semipurificada con alta actividad específica, la eficiencia de purificación es menor respecto a la del rábano blanco. Cabe destacar que para el rábano rojo están reportadas numerosas peroxidasas básicas con puntos

isoelectrónicos mayores a 7.0 (Guo S., 2008; Lavery, 2010 y Krainer, FW., 2014), por lo que al centrar el procedimiento de purificación en la recuperación de enzimas con tendencia ácida mediante intercambio aniónico a pH 7.0, no se logró la recuperación de estas otras enzimas, lo que puede explicar la menor actividad específica final.

Tabla 7 Purificación nopal

Nopal	Vol. (mL)	mg P totales	U totales. Actividad	Act. Específica (U/mg P)	Rendimiento	Veces de Purificación
Extracto	200	1467.6	24.47	0.017	100	1
Precipitación (pp 90%)	40	576.96	16.64	0.029	68	1.73
F4 A (desalado G50)	20	44.08	3.89	0.088	15.90	5.1
Pool FIA	10	5.70	1.57	0.275	6.4	16.2

Purificación de las peroxidasas de nopal

La actividad específica de peroxidasa para el extracto de *Opuntia Indicata* es mucho menor respecto a las otras fuentes estudiadas, ya que se partió únicamente de 0.017 U/mg proteína en el extracto crudo. Esto está en concordancia con algunos reportes preliminares que existen sobre la obtención de peroxidasas a partir del nopal en donde la actividad reportada está en el orden de U por nano moles (Aguilar, 2007). Sin embargo, la metodología empleada permitió obtener hasta 16.5 veces de purificación, con un rendimiento que es el mayor de los tres extractos, lo que nos indica que buena parte de las peroxidasas presentes en el nopal tienen carácter aniónico. Un reto que se presentó al realizar la purificación de este extracto

fue la presencia de lignina en pared celular del nopal y la formación de un gel al momento de la obtención del extracto por la alta presencia de polisacáridos. Para poder obtener el extracto se realizó una doble filtración con distinto tamaño de poro y se utilizó una cama de celita para eliminar compuestos coloridos que interfieren en la colorimetría.

La fracción purificada a partir de rábano blanco obtuvo la mayor actividad específica de las tres fuentes ensayadas y también se obtuvieron las mayores veces de purificación.

Caracterización de las fracciones purificadas.

Perfil proteínico SDS-PAGE

Con el propósito de verificar la eficacia de la metodología de purificación y estimar el peso molecular de la peroxidasa obtenida, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en la fracción purificada que presentó la mayor actividad enzimática, que corresponde a la fracción aniónica del extracto de rábano blanco.

Como se puede apreciar en la Figura 11, a través de los pasos de purificación se logró un enriquecimiento evidente de una banda proteica con un peso molecular cercano a los 60 kDa. Esta banda ya se encontraba presente en el extracto crudo y parece ser la más abundante en la fracción obtenida tras el intercambio aniónico. El peso molecular observado en la electroforesis se asemeja al de una peroxidasa previamente reportada en la literatura por Žieciolu (2010), proveniente del rábano negro.

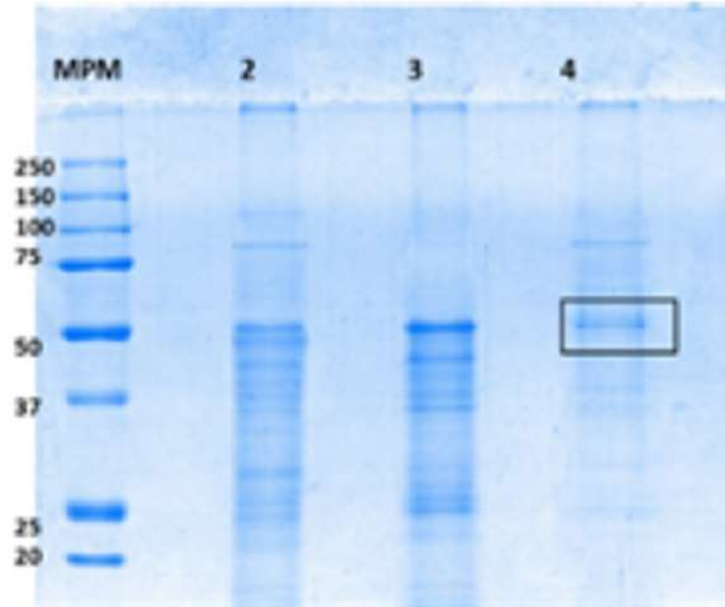


Figura 12 SDS-PAGE de las fracciones de purificación del extracto de *Rr. sativus* var. *Longipinnatus*. MPM: Marcador de Peso Molecular All Blue (Biorad) 2: Fracción recuperada de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3: Fracción recuperada de la cromatografía de exclusión molecular. 4: Fracción recuperada de la cromatografía de intercambio aniónica. En el recuadro se muestra una banda con peso aproximado de 60 KDa

Para complementar la información sobre la peroxidasa que presentó un PM aproximado de 60 KDa, según lo observado por SDS-PAGE, se realizó otra búsqueda bioinformática enfocada en otras peroxidosas de peso molecular cercano a los 60 KDa. De la familia de las *Brassicas* únicamente existe un reporte previo (Žieciolu, 2010), sin embargo, no se indica una posible estructura o la secuencia de aminoácidos que permitiría modelarla. A través del Protein Data Bank se encontró una proteína con número de identificación 4A5G proveniente de *Raphanus Sativus* reportada por Jiménez Arroyo (2012) que corresponde a una peroxidasa aniónica y que está glicosilada con residuos de xilopiranososa y manopiranososa. Esta proteína tiene un peso molecular de 75.74 KDa, y 308 residuos de aminoácidos en su estructura primaria. Su estructura secundaria se compone en su mayor parte de motivos tipo hélices α , y dos hojas β . Su estructura tridimensional monomérica se determinó mediante cristalografía de rayos X y el modelo obtenido se presenta en la figura 12, en donde puede verse los numerosos sitios de unión a carbohidratos, así como la predominancia de hélices α que rodean al grupo hemo.

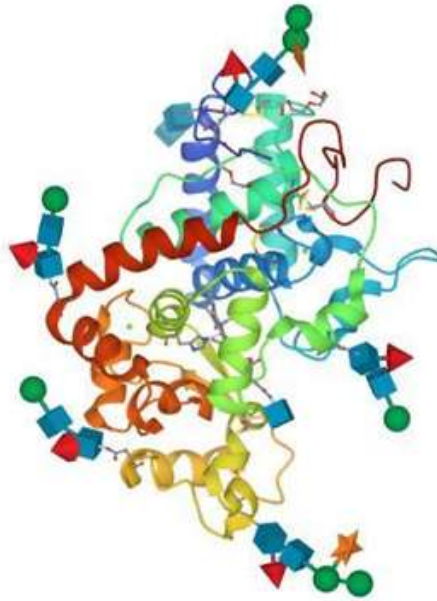


Figura 13. Peroxidasa de 75 KDa Recuperada de Protein Data Bank, disponible en: <https://www.rcsb.org/structure/4a5g>

Estabilidad frente a pH

Las enzimas presentan un valor de pH en el cual tiene mayor actividad, a este pH se le conoce como pH óptimo, sin embargo, para la mayoría de ellas existe un intervalo de pH bajo el cual conservan su actividad incluso durante tiempos prolongados, lo que les proporciona una estabilidad a estas condiciones. Caracterizar la estabilidad de los catalizadores frente al pH es importante para elegir las aplicaciones en las que podría emplearse la enzima, ya que así se conocerá bajo qué valores se mantiene un nivel aceptable de actividad.

En las figuras 13,14,15,16 y 17 que se muestran a continuación se aprecia el comportamiento de las fracciones purificadas con actividad de peroxidasa de las

tres fuentes vegetales estudiadas luego de 60 y 180 minutos de incubación a distintos valores de pH. Se reporta la actividad residual tomando como el 100% el valor máximo obtenido.

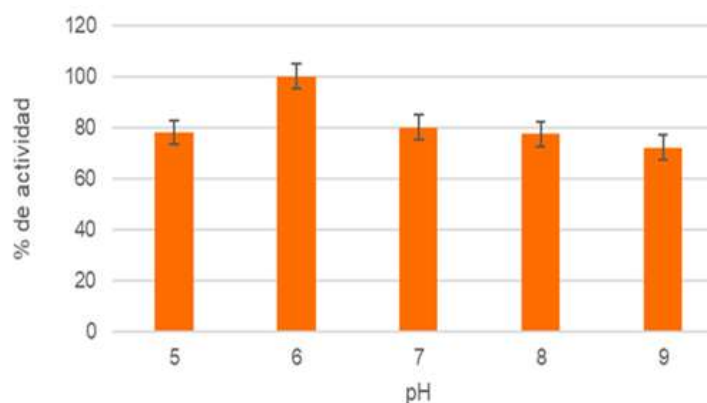


Figura 14. Estabilidad frente a pH 60 min de la fracción purificada a partir de rábano blanco

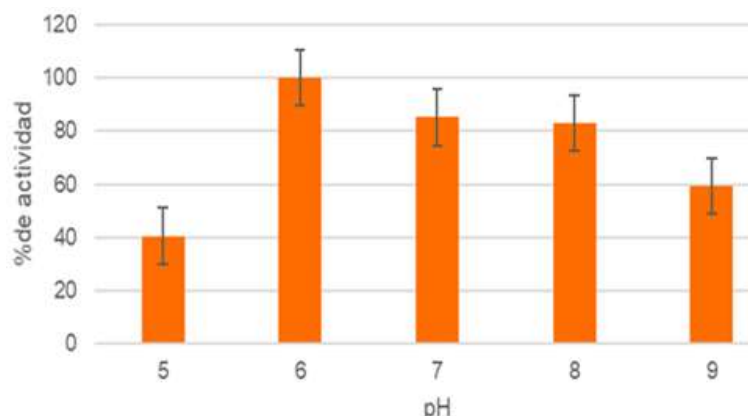


Figura 15. Estabilidad frente a pH 180 min de la fracción purificada a partir de rábano blanco

La fracción purificada del rábano blanco presentó actividad en el intervalo de pH de 5.0 a 9.0, con una actividad máxima a un pH de 6.0, lo que es concordante con las condiciones de trabajo de la enzima reportadas previamente por Schomberg (1993), que marca un intervalo de estabilidad de 5.0 a 9.0, con un valor máximo entre 6.0 a 6.5. En figura 13 también se observa que luego de 60 minutos de incubación, la fracción enzimática conserva el 80% de actividad en todos los pH probados (5.0 a 9.0); mientras que en la figura 14 se observa que luego de 180

minutos de incubación, a valores entre pH 7.0 y 8.0 no se observa una disminución de actividad notable ya que se conserva más del 80% de actividad. En contraste a valores de pH menores a 6.0 y mayores a 8.0 se observa un descenso de la actividad ya que a pH 9.0 se pierde un 40% de actividad y a pH 5.0 se pierde más del 50%. Tras estas características podemos inferir que la mayor parte de peroxidasas recuperadas de la fracción aniónica en el rábano blanco son de carácter ligeramente ácido y/o neutras y pueden trabajar bajo condiciones de pH entre 5.0 y 9.0 durante 60 minutos conservando más del 60% de su actividad; mientras que luego de 180 minutos conservan más del 80% de actividad en el intervalo de pH de 6.0 a 9.0.

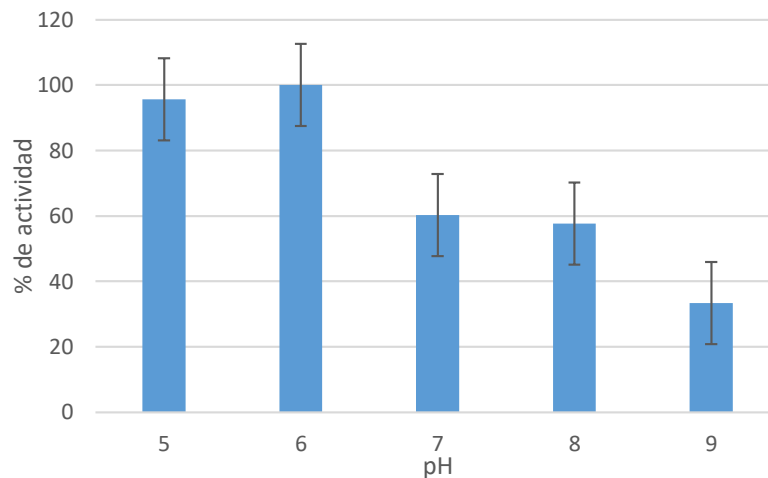


Figura 16. Estabilidad frente a pH 60 min de la fracción purificada a partir de rábano rojo

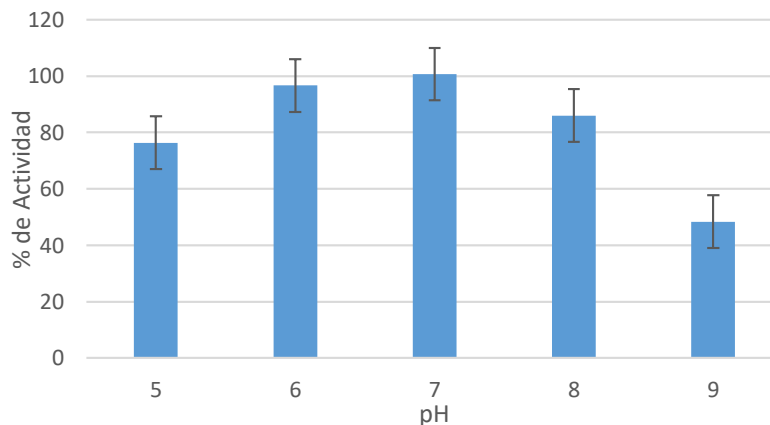


Figura 17. Estabilidad frente a pH 180 min de la fracción purificada a partir de rábano rojo

Para el rábano rojo como se muestra en la figura 16 la actividad es máxima en valores de pH entre 5.0 y 6.0 luego de 60 minutos de incubación, mientras que en la figura 17 nos muestra que después de 180 minutos se tiene una mayor actividad entre 6.0 y 7.0 y a pH 5.0 se pierde aproximadamente el 15% de actividad. Como se observa, las mayores actividades se presentaron en condiciones ligeramente ácidas o neutras, que era lo esperado debido al carácter ácido de la fracción aniónica caracterizada. Esto contrasta con reportes previos en los que se caracterizaron peroxidasas básicas del rábano rojo, estudio en el cual se contrasto la estabilidad de este frente a la peroxidasa de otra fuente vegetal (Saud Al-Bagmi et al., 2019).

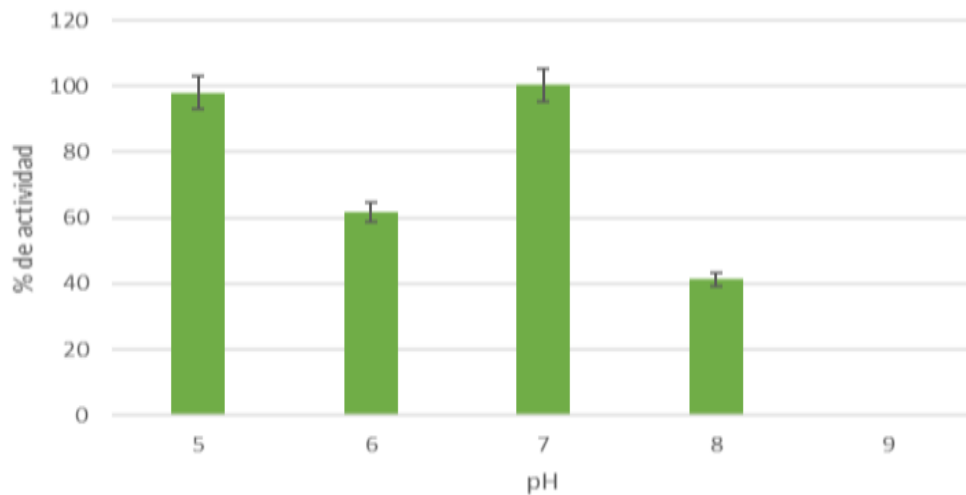


Figura 18. Estabilidad frente a pH 60 min de la fracción purificada a partir de nopal

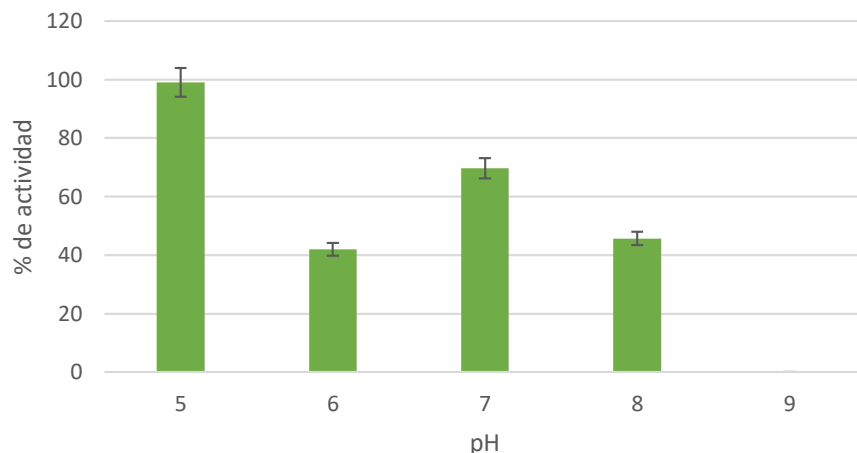


Figura 19 Estabilidad frente a pH 180 de la fracción purificada a partir de min nopal

Los resultados obtenidos para la estabilidad frente a pH de la fracción purificada a partir de nopal, mostrados en las figuras 18 y 19 no muestran un comportamiento Gaussiano en el que se tiene un sólo pico de actividad. A los 60 minutos de incubación, se tiene un máximo de actividad a 7.0, pero también hay otro máximo a pH 5.0. A los 180 minutos el máximo de actividad ocurre a pH 5.0 y se tiene un repunte a 7.0. Una posible explicación de este comportamiento es la presencia de isoformas enzimáticas con diferentes características y comportamiento. Para comprobar esta hipótesis sería necesario correr geles de electroforesis para observar el perfil de proteínas purificadas. A pH 9 no posee actividad.

Los resultados obtenidos para el nopal permitirían trabajar en condiciones de pH más ácidas respecto a las otras fuentes y constituyen información novedosa ya que a la fecha no hay referencias que reporten su intervalo de estabilidad frente a pH debido a que las peroxidasas de esta fuente no ha sido suficientemente caracterizadas.

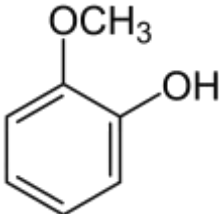
Caracterización respecto a la preferencia de sustrato.

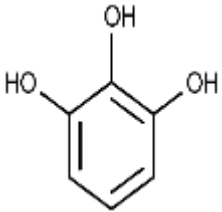
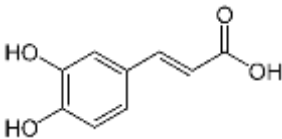
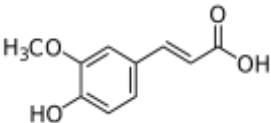
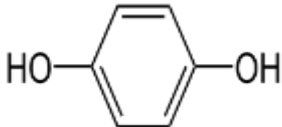
Para la caracterización de las peroxidasas purificadas en función de la preferencia de sustratos, se utilizaron compuestos fenólicos con distintos sustituyentes, con distinta polaridad y largo de cadena. En este caso, para poder comparar la actividad de una misma enzima entre los distintos sustratos, las actividades se reportan como

el cambio de absorbancia en función del tiempo para 1 mg de enzima.

Como se observa en la tabla 8, las peroxidases de rábano rojo y blanco presentaron mayor actividad por sustratos con sustituyentes de cadena corta y con menor polaridad como el guayacol y el pirogalol, mientras que su actividad disminuye al aumentar el largo de cadena y la polaridad de los sustituyentes como ocurre con el ácido cafeico y el ferúlico. En el caso del nopal, se obtuvo una mayor actividad frente a guayacol y en segundo lugar frente al ácido cafeico. Este comportamiento podría reforzar la hipótesis sobre la presencia de isoenzimas que tendrían distinta afinidad de sustrato. En contraste, ninguna de las peroxidases presentó actividad frente a la hidroquinona, esto puede deberse a que la catálisis sobre este sustrato se ve favorecida por la presencia de un cofactor metálico adicional como el magnesio o el calcio, el cuál no fue suplementado en este ensayo (Meng, et. al., 2004). Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado para peroxidases de la clase III que presentan una mayor afinidad por sustratos como guayacol y pirogalol (deOliveira, et. al., 2021).

Tabla 8. Comparación de la actividad de las peroxidases frente a distintos sustratos

Fuente Vegetal/ Sustrato	Rábano Blanco Abs/ mg de proteína min	Rábano Rojo Abs/ mg de proteína min	Nopal Abs/ mg de proteína min
<p style="text-align: center;">Guayacol</p> 	771.6±12.36	32.31±18.31	1.75±0.1

<p>Pirogalol</p> 	654.3± 6.54	45.46±5.8	1.01±0.10
<p>Ácido cafeico</p> 	325.2± 7.65	6.6± 1.9	0.72±0.16
<p>Ácido ferúlico</p> 	368.4±9.2	8.7±1.6	Sin actividad
<p>Hidroquinona</p> 	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad

Efecto de iones metálicos sobre la actividad de la enzima

Algunas enzimas dependen para su actividad simplemente de su estructura como proteínas, sin embargo algunas otras necesitan de una estructura no proteica o cofactores para su actividad, en tales enzimas el ion metálico puede actuar desempeñando uno o dos posibles papeles, como grupo puente para unir el sustrato con la enzima, formando un complejo de coordinación o como un grupo catalítico propio (Lehninger, 2018). Para conocer si las peroxidasas purificadas requieren la presencia de estos cofactores, se midió su actividad frente a algunos de los iones más comunes y también frente a un agente secuestrante de iones.

Como se observa en la figura 20 no se observaron variaciones importantes en la actividad en presencia de los iones adicionados o el EDTA, sin embargo, los que tuvieron un mayor impacto sobre la actividad enzimática fueron el Ca^{2+} el K^+ y el

Fe³⁺.

En el caso del ion Fe³⁺, el incremento observado en la actividad de la hemo peroxidasa puede atribuirse posiblemente a la capacidad de los átomos de hierro de la propia enzima para catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Al aumentar la disponibilidad de estos átomos de hierro, se genera un aumento en la actividad de la enzima. Esto se debe a su participación en la unión y, de acuerdo al mecanismo propuesto, en la formación del compuesto I.

En el caso del ion Ca²⁺, se observó un aumento moderado en la actividad enzimática, tal como se ha reportado en el estudio de Ajila (2009). El calcio actúa como un cofactor que contribuye a mantener la integridad conformacional del sitio activo de la enzima, lo que potencialmente favorece su actividad catalítica. Por otro lado, la presencia de un ion monovalente también conlleva un aumento en la actividad enzimática, resultados que concuerdan con lo reportado por Pérez (2016) en su estudio con el ion Li⁺. Estos resultados sugieren que la interacción con iones monovalentes puede tener un efecto estimulante en la actividad de la hemo peroxidasa. Sin embargo, al introducir un agente secuestrante de iones, como el EDTA, no se aprecia una disminución significativa de la actividad enzimática.

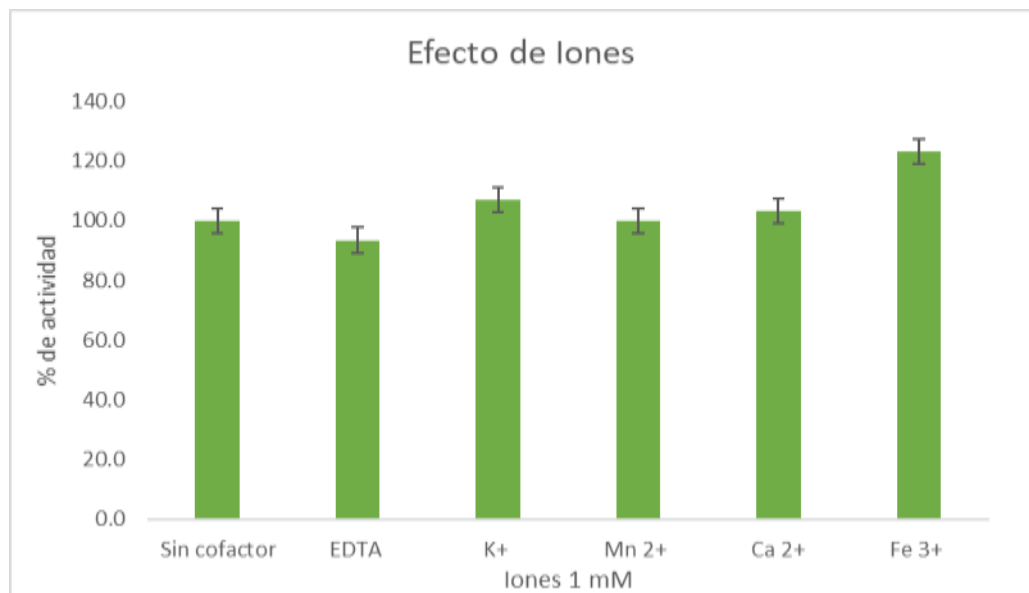


Figura 20 Estabilidad de la fracción purificada con actividad peroxidasa de rábano blanco frente a distintos iones metálicos

Estabilidad Frente a Temperatura

Siguiendo la teoría cinética, al aumentar la temperatura de reacción, aumentan los choques efectivos entre las moléculas, elevando la actividad catalítica; pero si la temperatura continúa elevándose fuera del intervalo de estabilidad de la enzima, ocurre la inactivación térmica. (Illanes, 2008).

Para poder establecer las condiciones de trabajo de la peroxidasa estudiada se efectuó el análisis de su estabilidad térmica luego de incubarla durante 10 minutos a temperaturas de 20, 30, 40, 50 y 60 °C como lo muestra la figura 21 la peroxidasa de rábano blanco presentó la mayor estabilidad a 35°C, y conservó más del 80% en el intervalo de 20 a 50° C, mientras que a los 60°C se observa un decremento de actividad del 25.3% respecto a su máximo. En el estudio reportado Žieciolu (2008) la peroxidasa de rábano negro un comportamiento térmico similar en el cual se muestra un intervalo amplio de estabilidad térmica.

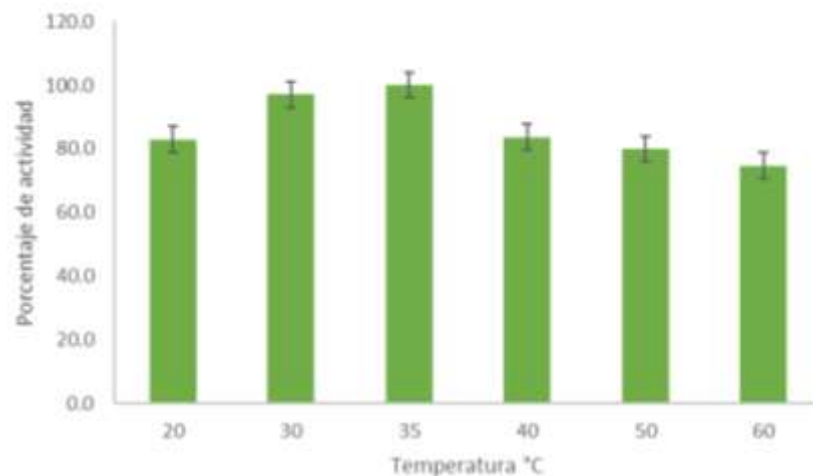


Figura 21. Estabilidad térmica de la fracción purificada a partir de rábano blanco. Se representa la actividad residual tomando como cien por ciento la actividad a temperatura ambiente.

Determinación de los parámetros cinéticos

Se calcularon los parámetros cinéticos de la peroxidasa de rábano blanco frente a guayacol y H₂O₂ a partir del cálculo de las velocidades iniciales según la metodología de Cleland (1963) y Galende (2015). Esto permitió conocer y diferenciar si el mecanismo catalítico de la enzima es secuencial o de ping-pong.

A partir de las figuras 22 y 24, se observa un comportamiento lineal de la representación de A frente a B es representativo de las reacciones bisustrato que siguen un mecanismo ping pong.

Para la obtención de los parámetros cinéticos presentados en la tabla 9 se consideró la pendiente obtenida de las figuras 23 y 25 en las cuales la intercepción en el eje y enmarca velocidad considerando un sustrato en concentraciones no variables.

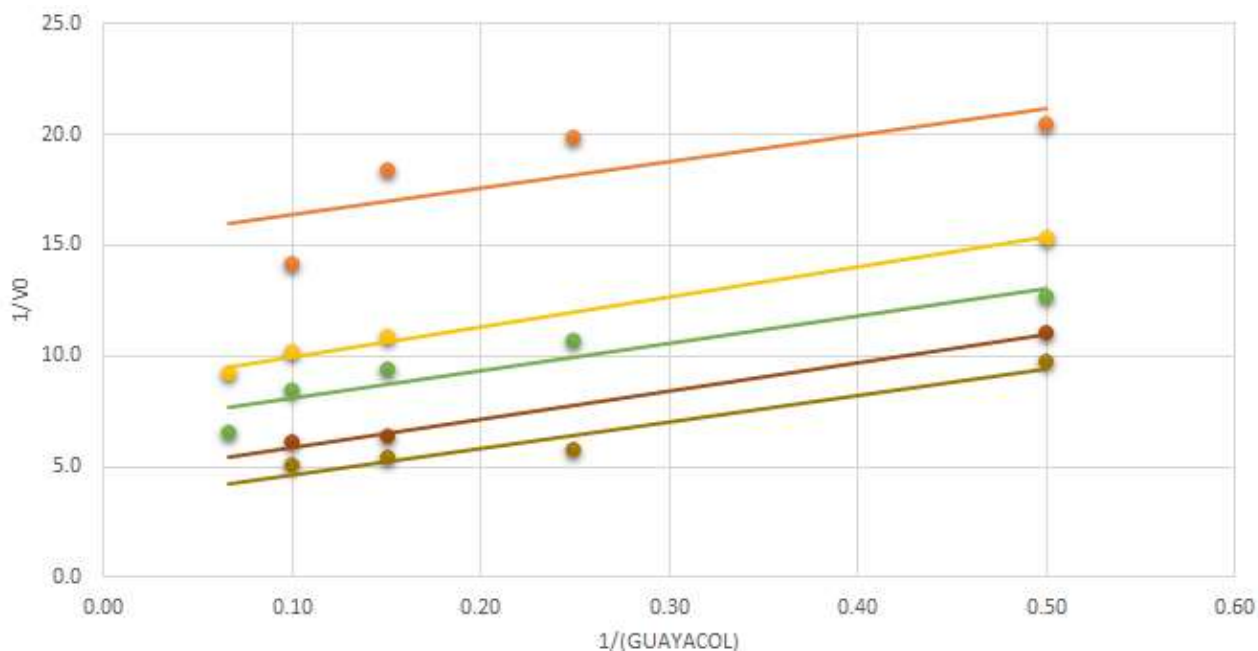


Figura 22. Gráfico de doble recíproco respecto a guayacol

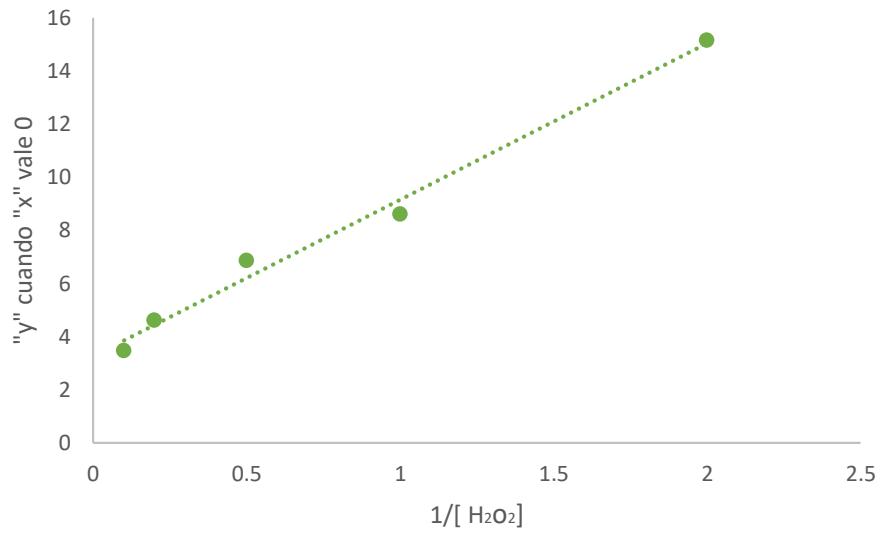


Figura 23 Gráfico de la intercepción de "y" en función del inverso de la concentración.

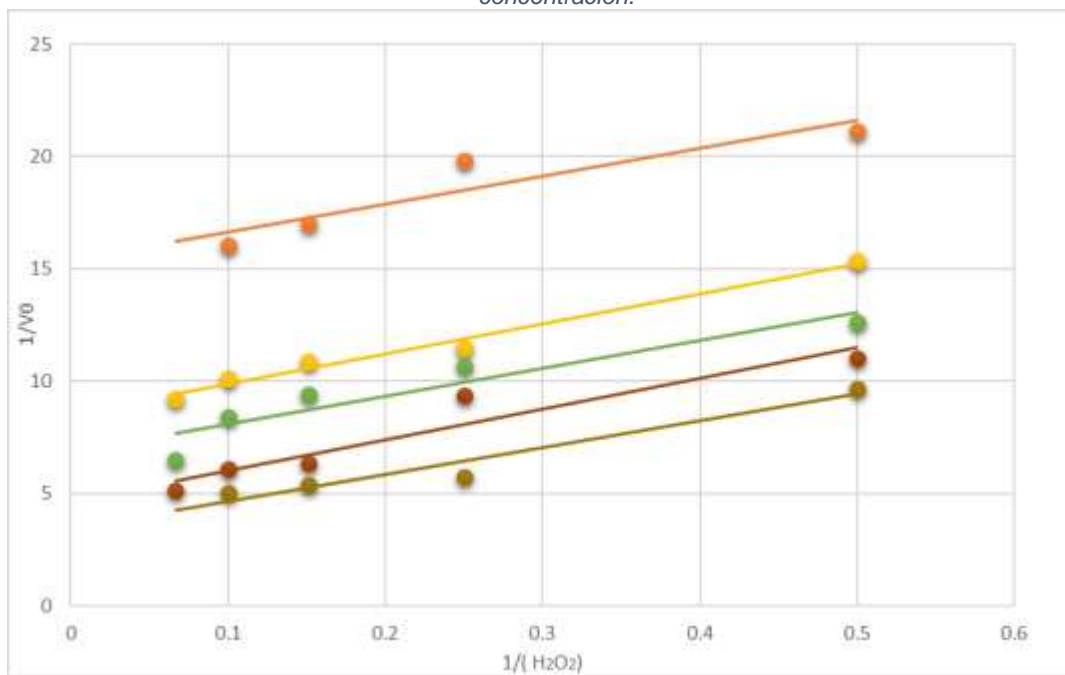


Figura 25 Gráfico de doble recíproco respecto A H₂O₂

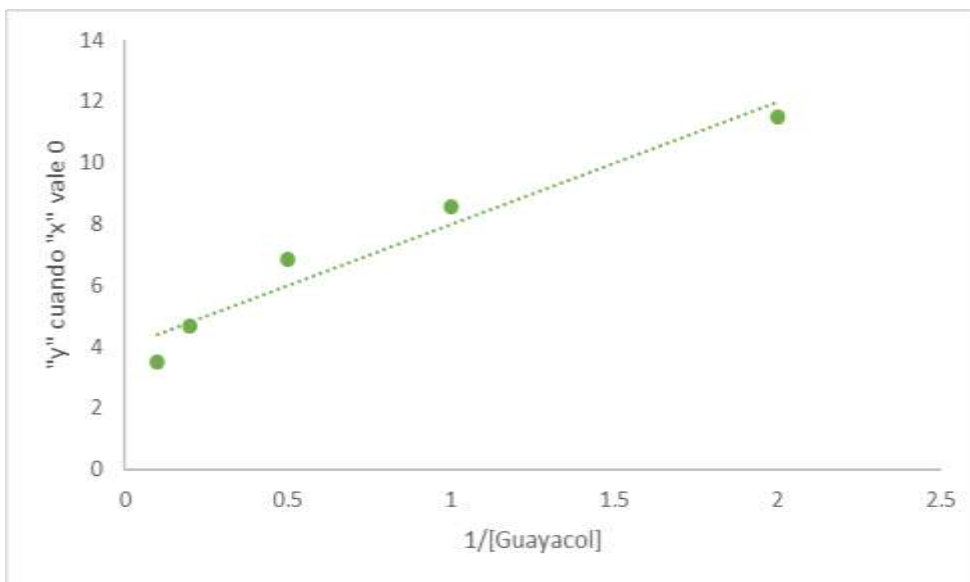


Figura 26. Gráfico de la intercepción de "y" en función del inverso de la concentración.

Tabla 9. Parámetros cinéticos

Sustrato	Vmax	Km
Guayacol	305.07 μM /mg de proteína min.	73.69 μM
H ₂ O ₂	251.05 μM /mg proteína minuto	3.19 μM

Ensayos de Degradación.

Capacidad de la peroxidasa para degradar antibióticos.

Los contaminantes persistentes incluyen amplios grupos de compuestos como tintes sintéticos, productos farmacéuticos, hidrocarburos aromáticos, pesticidas, entre otros (Alharbi, 2018). Los residuos de antibióticos son las sustancias inhibidoras artificiales más comunes presentes en la leche de vaca con un efecto negativo a la salud humana, procesamiento y calidad de la leche. Además, las aguas residuales de la industria láctea pueden contener residuos de estos compuestos que al ser vertidos al drenaje pueden contribuir al desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos y presentar riesgos para la salud humana y el medio ambiente.

Los antibióticos β -lactámicos se utilizan ampliamente en el tratamiento de infecciones bacterianas en el ganado, particularmente en el manejo de la mastitis. La vía de administración de estos influye en la concentración y tiempos de permanencia de los residuos de dichos fármacos (Fejzc, 2015), por lo que es importante contar con métodos de degradación que permitan eliminarlos en tiempos cortos antes de verter los desechos al drenaje.

Piyangkun (2019) ya había reportado el uso de manganeso peroxidasas para la degradación de antibióticos como: tetraciclina, doxicilina, amoxicilina y ciprofloxacino, sin embargo, no existen reportes para peroxidasas de origen vegetal. Con la finalidad de probar si la peroxidasa purificada (de clase III) tiene la capacidad de degradar estos compuestos, se realizó un estudio cinético sobre ampicilina (figura 26), antibiótico de carácter β -lactámico usado en el ganado bovino.

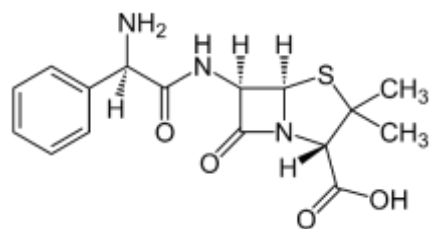


Figura 27 Estructura química de la Ampicilina

Como se observa en la figura 28, la peroxidasa fue capaz de degradar ampicilina desde las 24 horas. Obteniendo luego de 72 horas de, un 80.39% de degradación.

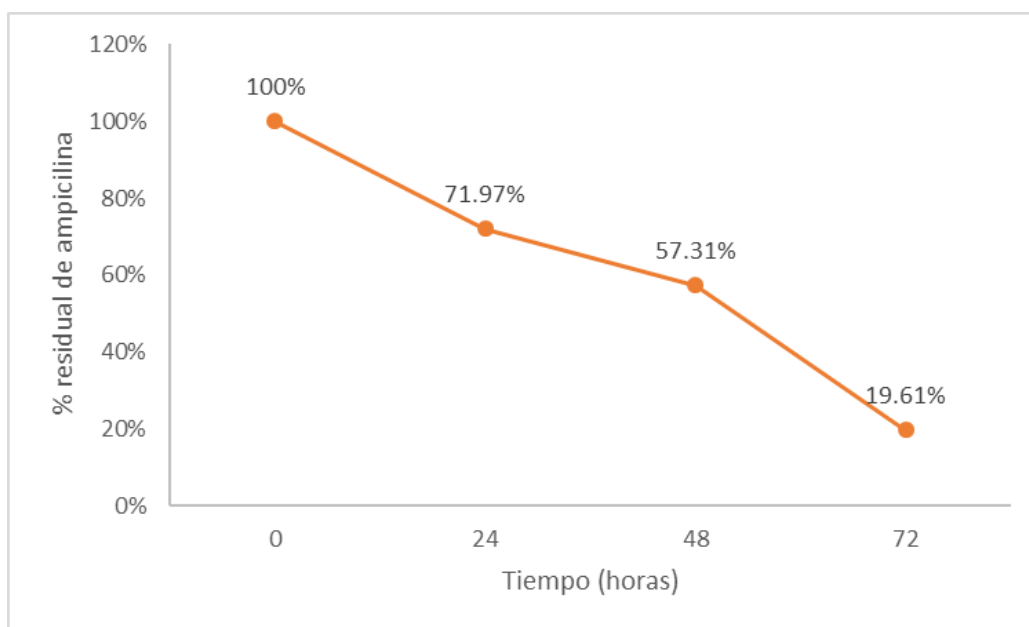


Figura 28. Degradación de Ampicilina

Capacidad de la peroxidasa de rábano blanco para degradar colorantes.

Entre los efluentes industriales, las aguas residuales de la industria textil y de los colorantes son unos de los más difíciles de tratar, ya que los tintes poseen una amplia variedad estructural, contienen estructuras aromáticas complejas que confieren de una alta estabilidad por consiguiente son estructuras difíciles de degradar (Padmesh et.al 2005). En la industria de alimentos los colorantes se emplean principalmente con la finalidad de favorecer una experiencia sensorial satisfactoria al consumidor (Pavithra, 2019). Las aguas residuales coloreadas (ARC), comunes en la industria textil y alimentaria y en laboratorios, contienen múltiples sustancias orgánicas recalcitrantes y no biodegradables), por lo que su descarga directa sobre los ecosistemas es una fuente de contaminación con alto impacto ambiental que puede inducir perturbaciones en la vida acuática. (Lozada et al., 2017)

Ante tales premisas y con la finalidad de proponer otra aplicación de la peroxidasa caracterizada se estudió su capacidad para degradar colorantes de distinto origen: Rojo Carmín, de carácter glucosídico de antraquinona, Amarillo-Naranja, Rojo no.5 de carácter azoico y verde de bromocresol, perteneciente al grupo de las sulfoneftaleinas.

La acción degradativa de la POD caracterizada actuó sobre el colorante natural y el colorante de carácter sulfoneftalico como se observa en la figura 29 con porcentajes de degradación del 43.5% y 25.2% respectivamente. Sin embargo, no tuvo actividad sobre los colorantes azoicos probados bajo las condiciones de ensayo.

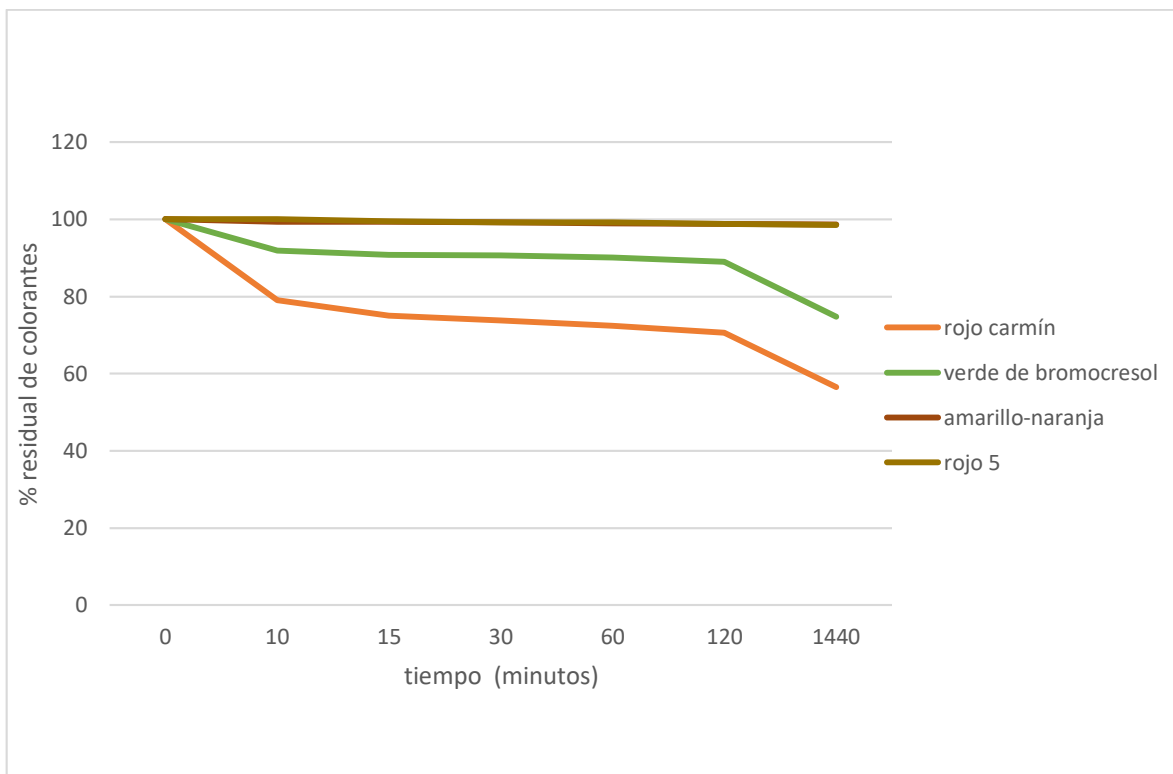


Figura 29 Degradación de Colorantes

Conclusiones

La estrategia experimental optimizada en este trabajo basada en la precipitación con sulfato de amonio seguida de una cromatografía de exclusión molecular y de otra cromatografía de intercambio iónico, permitió obtener fracciones aniónicas purificadas con actividad peroxidasa a partir de extractos de rábano blanco, rábano rojo y nopal con **36.40, 27.71 y 16.50 veces de purificación** respectivamente.

La fracción purificada que presentó mayor actividad específica fue la de rábano blanco, seguida de la de rábano rojo y finalmente la de nopal. La baja actividad mostrada por el extracto de nopal puede deberse a que la matriz dificultó la extracción de las enzimas o a que estas se encuentran adheridas a la membrana celular.

En la electroforesis SDS-PAGE del extracto purificado de rábano blanco se identificó una banda que se enriquece al avanzar el proceso de purificación, con un peso molecular alrededor de los 60 KDa y que no coincide con alguna peroxidasa reportada previamente, por lo que se propone que se trata de una enzima novedosa.

Las peroxidasas de rábano rojo y rábano blanco presentaron estabilidad en un intervalo de pH de 5.0 a 9.0, conservando el 80% de actividad luego de 60 minutos de incubación en estas condiciones; con una estabilidad máxima entre pH 6.0 y 7.0, lo que las clasifica como peroxidasas de carácter ácido.

Las peroxidasas de nopal presentaron estabilidad frente a pH entre 5.0 y 8.0, mientras que a pH 9.0 no tuvieron actividad, presentando tienen un carácter más ácido respecto a las de rábano. En la fracción purificada se detectan 2 máximos de estabilidad frente a pH por lo que podrían estar presentes isoenzimas.

Las peroxidasas de rábano blanco y rábano rojo caracterizadas tuvieron mayor afinidad por sustratos con sustituyentes de cadena corta y no polar, mientras que

las del nopal exhibieron afinidad por sustratos con sustituyentes de mayor largo de cadena como el ácido cafeico.

La actividad específica de la peroxidasa de rábano blanco se incrementa con la adición de iones K^+ Ca^{2+} y Fe^{3+} a una concentración de 1.0mM y es estable a temperaturas entre 20 y 50° C, conservando más del 80% de su actividad.

La enzima presenta una cinética para dos sustratos (guayacol y H_2O_2) de tipo ping-pong con una $V_{max_{guayacol}}$ de 305.07 $\mu M/mg$ proteína y una $K_{m_{guayacol}}$ de 73.69 μM .

La peroxidasa caracterizada fue capaz de degradar ampicilina en medios orgánicos, obteniendo un 80.39% de degradación a las 72h de reacción.

La enzima de rábano blanco no degradó de manera significativa los colorantes de carácter azoico, y logró degradar el colorante natural rojo carmín, en un 43.5% y uno de carácter sulfoneftalico en un 25.2% luego de 24 h.

Perspectivas.

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación sobre la purificación y caracterización de peroxidasas de distintas fuentes vegetales, así como su potencial aplicabilidad en la degradación de contaminantes y su actividad frente a diferentes sustratos, se plantean las siguientes perspectivas para futuros estudios:

A. Dado que se observaron dos máximos de estabilidad frente a pH en las peroxidasas de nopal, es relevante investigar si pudiera tratarse de isoenzimas con propiedades específicas. Esto podría incluir estudios más detallados de electroforesis y análisis de las distintas formas enzimáticas presentes en la fracción purificada.

B. Exploración de otros cofactores pues se ha demostrado que la peroxidasa de rábano blanco es sensible a la adición de iones K^+ , Ca^{2+} y Fe^{3+} a concentraciones de 1 mM. Se podría explorar la influencia de otros cofactores y moduladores en la actividad de estas enzimas, lo que podría ampliar su versatilidad y aplicabilidad en distintos contextos.

C. Efectuar ensayos de glicosilación a la peroxidasa de rábano blanco con el objetivo de conocer si tiene moléculas de azúcares unidas, que pudieran incidir en su estabilidad, actividad enzimática y su capacidad para interactuar con otras moléculas.

D. Obtener la secuencia de aminoácidos de la peroxidasa de 60 KDa identificada en este estudio para poder modelar una posible estructura, ya que no está reportada en ninguna base de datos.

E. Exploración de otras aplicaciones de degradación de contaminantes ya que las peroxidasas también pueden tener aplicaciones ante otro tipo de compuestos contaminantes.

Referencias

1. Ajila, C., & Rao, U. P. (2009). Purification and characterization of Black gram (*Vigna Mungo*) husk peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic*, 60(1-2), 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.03.014>
2. Al-Bagmi, M. S., Khan, M. S., Ismael, M. A., Al-Senaidy, A. M., Bacha, A. B., Husain, F. M., & Alamery, S. (2019). An efficient methodology for the purification of date palm peroxidase: stability comparison with horseradish peroxidase (HRP). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(2), 301-307. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.04.002>
3. Alharbi, O. M., Basheer, A. A., Khattab, R. A., & Ali, I. (2018). Health and environmental effects of persistent organic pollutants. *Journal of Molecular Liquids*, 263, 442-453. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.05.029>
4. Anjaneyulu, Y., Chary, N., & Raj, D. (2005). Decolourization of Industrial Effluents – Available Methods and Emerging Technologies – A review. *Reviews In Environmental Science And Bio/technology*, 4(4), 245-273. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-1246-z>
5. Asan, A. (2022). A simple spectrophotometric determination of amoxicillin in drug samples. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 9(2), 423-432. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.978686>
6. Ausubel, F. M., Dracopoli, N. C., & Wildermuth, M. C. (2011). Informatics for molecular Biologists. *Current protocols in molecular biology*, 96(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1900s96>
7. Bansal, N., & Kanwar, S. S. (2013). Peroxidase(s) in environment protection. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2013/714639>
8. Barceló, A. R., & Pomar, F. (2002). Plant peroxidases: versatile catalysts in the synthesis of bioactive natural products. En *Studies in natural products chemistry* (pp. 735-791). [https://doi.org/10.1016/s1572-5995\(02\)80047-3](https://doi.org/10.1016/s1572-5995(02)80047-3)
9. Bermudez Garcia, Eva Patricia. (2013). "Bases moleculares y bioquímicas para el estudio del sistema cutinolitico de aspergillus nidulans". (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/126071>

10. Bilal, M., Ashraf, S. S., Barceló, D., & Iqbal, H. M. (2019). Biocatalytic degradation/redefining "removal" fate of pharmaceutically active compounds and antibiotics in the aquatic environment. *Science of The Total Environment*, 691, 1190-1211. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.224>
11. Bindoli, A., & Rigobello, M. (2013). Peroxidase biochemistry and redox signaling. En *Elsevier eBooks* (pp. 407-412). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-378630-2.00179-1>
12. Cardinali, A., Tursi, N., Ligorio, A., Giuffrida, M. G., Napolitano, L., Caliandro, R., Sergio, L., Di Venere, D., Lattanzio, V., & Sonnante, G. (2011). Purification, biochemical characterization and cloning of a new cationic peroxidase isoenzyme from artichoke. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(4), 395-403. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.01.028>
13. Catucci, G., Valetti, F., Sadeghi, S. J., & Gilardi, G. (2020). Biochemical features of dye-decolorizing peroxidases: current impact on lignin degradation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 67(5), 751-759. <https://doi.org/10.1002/bab.2015>
14. Churin, Y., Schilling, S., & Börner, T. (1999). A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (Barley). *FEBS Letters*, 459(1), 33-38. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01208-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01208-9)
15. Coşkun, Ö. (2016). Separation techniques: CHROMATOGRAPHY. *İstanbul Kuzey Klinikleri*. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
16. Cui, R., Huang, H., Yin, Z., Gao, D., & Zhu, J. (2008). Horseradish Peroxidase-Functionalized Gold Nanoparticle Label for Amplified Immunoanalysis based on Gold Nanoparticles/carbon Nanotubes Hybrids Modified Biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(11), 1666-1673. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.01.034>
17. De Oliveira, F. K., Santos, L. O., & Garda-Buffon, J. (2021). Mechanism of action, sources, and application of peroxidases. *Food Research International*, 143, 110266. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110266>
18. Dordick, J.S.; Marletta, M.A. and Klivanov, A.M. Polymerization of phenols catalysed by peroxidase in non-aqueous media (1987). *Biotechnol. Bioeng.*

19. Fejzić, N., Begagić, M., Šerić–Haračić, S., & Smajlović, M. (2014). Beta lactam antibiotics residues in cow's milk: Comparison of efficacy of three screening tests used in Bosnia and Herzegovina. *Biomolecules and Biomedicine*, *14*(3), 155-159. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2014.3.109>
20. Galende, P. P., Cuadrado, N. H., Kostetsky, E. Y., Roig, M. G., Villar, E., Shnyrov, V. L., & Kennedy, J. F. (2015). Kinetics of Spanish broom peroxidase obeys a Ping-Pong Bi–Bi mechanism with competitive inhibition by substrates. *International Journal of Biological Macromolecules*, *81*, 1005-1011. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.042>
21. Govere, E. M., Tonegawa, M., Bruns, M. A., Wheeler, E. F., Heinemann, P., Kephart, K. B., & Dec, J. (2005). Deodorization of swine manure using minced horseradish roots and peroxides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(12), 4880-4889. <https://doi.org/10.1021/jf0404290>
22. Guillemot, D., Carbon, C., Balkau, B., Geslin, P., Lecœur, H., Vauzelle-Kervroedan, F., Bouvenot, G., & Eschwège, É. (1998). Low dosage and long treatment duration of B-Lactam. *JAMA*, *279*(5), 365. <https://doi.org/10.1001/jama.279.5.365>
23. Guo, S., Cao, R., Lu, A., Zhou, Q., Lu, T., Ding, X., Li, C. J., & Huang, X. (2008). One of the possible mechanisms for the inhibition effect of TB(III) on peroxidase activity in horseradish (*Armoracia rusticana*) treated with TB(III). *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *13*(4), 587-597. <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0347-x>
24. Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *Fems Microbiology Reviews*, *13*(2-3), 125-135. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00039.x>
25. Hlihor, R. M., Gavrilesco, M., Tavares, T., Favier, L., & Olivieri, G. (2017). Bioremediation: An overview on current practices, advances, and new perspectives in environmental pollution treatment. *BioMed Research International*, *2017*, 1-2. <https://doi.org/10.1155/2017/6327610>
26. Illanes, A. (2008). Enzyme biocatalysis. En *Springer eBooks*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7>

27. Kariminiaae-Hamedani, H., Sakurai, A., & Sakakibara, M. (2007). Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus. *Dyes and Pigments*, 72(2), 157-162. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.08.010>
28. Khurshid, S., Qureshi, M. Z., Ibrahim, A., Nawaz, Z., Sajid, A., & Ikram, M. (2012). Production and purification of horseradish peroxidase in Pakistan. *International Journal of Physical Sciences*, 7(19). <https://doi.org/10.5897/ijps11.724>
29. Krainer, F., & Glieder, A. (2015). An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1611-1625. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6346-7>
30. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
31. Lavery, C. B., MacInnis, M. C., MacDonald, M. J., Williams, J. B., Spencer, C. A., Burke, A. A., Irwin, D. J., & D'Cunha, G. B. (2010). Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8471-8476. <https://doi.org/10.1021/jf100786h>
32. Lueangjaroenkit, P., Teerapatsakul, C., Sakka, K., Sakka, M., Kimura, T., Kunitake, E., & Chitradon, L. (2019). Two manganese peroxidases and a laccase of *Trametes polyzona*KU-RNW027 with novel properties for dye and pharmaceutical product degradation in Redox Mediator-Free system. *Mycobiology*, 47(2), 217-229. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1589900>
33. Mathé, C., Barre, A., Jourda, C., & Dunand, C. (2010). Evolution and expression of Class III peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(1), 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.007>
34. Meng, X., Guo, Y., Hu, C., & Zhang, X. (2004). Mimic models of peroxidase – Kinetic studies of the catalytic oxidation of hydroquinone by H₂O₂. *Journal*

- of *Inorganic Biochemistry*, 98(12), 2107-2113.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.09.019>
35. Padmesh, T., Vijayaraghavan, K., Sekaran, G., & Velan, M. (2005). Batch and column studies on biosorption of acid dyes on fresh water macro alga azolla filiculoides. *Journal of Hazardous Materials*, 125(1-3), 121-129.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.05.014>
36. Pavithra, K. G., Kumar, P., Jaikumar, V., & Rajan, P. S. (2019). Removal of colorants from wastewater: A review on sources and treatment strategies. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 75, 1-19.
<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.02.011>
37. Pelletier, I., Altenbuchner, J., & Mattes, R. (1995). A catalytic triad is required by the non-heme haloperoxidases to perform halogenation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1250(2), 149-157.
[https://doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00055-y](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00055-y)
38. Pereira, E. I. P., Emanuelli, T., Bisognin, D. A., & De Freitas, S. T. (2008). Otimização e validação de um método enzimático para a determinação de glicose em tubérculos de batata. *Ciencia Rural*, 38(5), 1227-1232.
<https://doi.org/10.1590/s0103-84782008000500004>
39. Robinson, P. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1-41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>
40. Savelli, B., Li, Q., Webber, M., Jemmat, A. M., Robitaille, A., Zámocký, M., Mathé, C., & Dunand, C. (2019). RedoxiBase: a database for ROS homeostasis regulated proteins. *Redox Biology*, 26, 101247.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101247>
41. Schomburg, D., Salzmann, M., & Stephan, D. (1993). *Enzyme Handbook 7: Class 1.5–1.12: Oxidoreductases*. Springer.
42. Shakerian, F., Zhao, J., & Li, S. (2020). Recent development in the application of immobilized oxidative enzymes for bioremediation of hazardous micropollutants – a review. *Chemosphere*, 239, 124716.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124716>

43. Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., & Yoshimura, K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, *53*(372), 1305-1319. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1305>
44. Spadiut, O., Rossetti, L., Dietzsch, C., & Herwig, C. (2012). Purification of a recombinant plant peroxidase produced in *Pichia pastoris* by a simple 2-step strategy. *Protein Expression and Purification*, *86*(2), 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.09.008>
45. Stadlmair, L. F., Letzel, T., Drewes, J. E., & Graßmann, J. (2018). Enzymes in Removal of Pharmaceuticals from Wastewater: A Critical review of challenges, applications and screening methods for their selection. *Chemosphere*, *205*, 649-661. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.142>
46. Steffen, K., Hofrichter, M., & Hatakka, A. (2002). Purification and characterization of manganese peroxidases from the litter-decomposing basidiomycetes *Agrocybe praecox* and *Stropharia coronilla*. *Enzyme and Microbial Technology*, *30*(4), 550-555. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(01\)00525-7](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(01)00525-7)
47. Svetozarević, M., Šekuljica, N. Ž., Onjia, A., Barać, N., Mihajlović, M., Knežević-Jugović, Z., & Mijin, D. Ž. (2022). Biodegradation of synthetic dyes by free and cross-linked peroxidase in microfluidic reactor. *Environmental Technology and Innovation*, *26*, 102373. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102373>
48. Thongsook, T., & Barrett, D. M. (2005). Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. *italica*) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(8), 3206-3214. <https://doi.org/10.1021/jf048162s>
49. Torres Duarte, Vazquez- Duhalt & all (2010) Applications and prospective of peroxidase Biocatalysis in the environmental field. DOI: 10.1007/978-3-642-12627-7_8

50. Tufail, A., Al-Rifai, J., Kelso, C., Fida, Z., Price, W. E., & Hai, F. I. (2022). Coupling horseradish peroxidase based bioreactor with membrane distillation: elucidating antibiotics degradation and membrane fouling mitigation. *Desalination*, *542*, 116039. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2022.116039>
51. Twala, P. P., Mitema, A., Baburam, C., & Feto, N. A. (2020). Breakthroughs in the discovery and use of different peroxidase isoforms of microbial origin. *AIMS microbiology*, *6*(3), 330-349. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020020>
52. Vidal, A. M. C., Rossi, O. D., Salotti, B. M., Bürger, K. P., Cortez, A., & Cardozo, M. V. (2008). Efeito do processamento UAT (Ultra alta temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. *Food Science and Technology*, *28*(2), 295-298. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612008000200005>
53. Wilke, M. S., Lovering, A. L., & Strynadka, N. (2005). B-Lactam antibiotic Resistance: A current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, *8*(5), 525-533. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.08.016>
54. Ww, C. (1963). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products☆I. Nomenclature and rate equations. *Biochimica et Biophysica Acta*, *67*, 104-137. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(63\)91800-6](https://doi.org/10.1016/0006-3002(63)91800-6)
55. Yan, Z., Wei, X., Yuan, Y., Liu, Z., Liu, D., Liu, X., & Gao, L. (2016). Deodorization of pig manure using lignin peroxidase with different electron acceptors. *Journal of the Air & Waste Management Association*, *66*(4), 420-428. <https://doi.org/10.1080/10962247.2016.1144660>
56. Zámocký, M., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2010). Evolution of structure and function of Class I peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *500*(1), 45-57. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.03.024>
57. Žieciolu, M., Guuml, L., Lccedil, Ccedil, M., Ankaya, Atasever, A., Žehitolu, M. H., Kaya, H. B., Ouml, H., & Zdemir. (2010). Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus*

l.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(12), 1187-1196.
<https://doi.org/10.5897/jmpr10.071>

Anexo 1. Ecuaciones utilizadas para el cálculo de los parámetros cinéticos de peroxidasas

Para la determinación del tipo de mecanismo se llevó a cabo un estudio cinético en el estado estacionario que presenta Galende (2016) en el cual se estableció una concentración fija de sustrato H_2O_2 modificando la concentración de sustrato reductor (guayacol) y viceversa. De este modo se obtuvieron los perfiles de velocidad inicial frente a la concentración del sustrato variable en contra la concentración del sustrato variable para el sustrato estudiado.

Posteriormente se ajusta a una cinética Michaeliana, se efectúan las representaciones de dobles inversos ($1/V$ vs $1/C$) para cada concentración de sustrato constante para conocer qué tipo de comportamiento cinético presenta la enzima. Para el modelo ping pong se observa un comportamiento lineal característico; en un mecanismo secuencial el comportamiento es parabólico.

Una vez conocido el tipo de mecanismo, se realizó el cálculo de algunos parámetros cinéticos a partir de la ecuación de la velocidad general (1) para una reacción enzimática que sigue un mecanismo ping-pong con dos sustratos, en ausencia de un producto:

$$V \quad (1)$$
$$= \frac{V[H_2O_2][AH_2]}{K_m^{H_2O_2}[AH_2] + K_m^{AH_2}[H_2O_2] + [H_2O_2][AH_2]}$$

Donde:

V velocidad general

K_m hace referencia a la constante de Michaelis-Menten para dicho sustrato o reactivo en cuestión.

AH_2 Sustrato reductor en nuestro caso guayacol

La cual puede transformarse en una hipérbola rectangular como en la ecuación (2)

si la concentración de sustrato reductor permanece constante.

$$V = \frac{V[H_2O_2]}{K + [H_2O_2]} \quad (2)$$

donde los parámetros V y K se describen con las ecuaciones (3) (4) respectivamente:

$$V = \frac{Vmax}{1 + \left(\frac{K_m^{AH_2}}{[AH_2]}\right)} \quad (3)$$

$$K = \frac{K_m^{H_2O_2}}{1 + \left(\frac{K_m^{AH_2}}{[AH_2]}\right)} \quad (4)$$

A partir de la pendiente y ordenada al origen de las rectas que se obtuvieron a partir de las gráficas de dobles inversos se obtienen los parámetros $K_m^{H_2O_2}$, $K_m^{AH_2}$ y Vmax para cada sustrato.