

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Química Física

---



# Nuevas peroxidasas de origen vegetal: aislamiento, caracterización y aplicaciones

Tesis Doctoral

Patricia Pérez Galende

2016



Los trabajos que se presentan han sido financiados por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León y por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL) a través de los siguientes proyectos:

- *“Extracción y caracterización de peroxidasas a partir de materias primas de origen agrario: evaluación de su valor añadido” (Ref.: SA-06-00-0)*
- *“Screening, extracción y purificación de peroxidasas de residuos agrícolas verdes: caracterización y evaluación de algunas de sus aplicaciones biotecnológicas” (Ref.: SA129A07)*
- *“Purificación, caracterización y aplicaciones biotecnológicas de una nueva y versátil peroxidasa de escoba blanca (Cytisus multiflorus), un arbusto leguminoso abundante y endémico de Castilla y León” (Ref.: SA052A10-2)*





VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en los departamentos de Química Analítica, Nutrición y Bromatología y Química Física de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección de los doctores Cándido García de María, Manuel García Roig y Valery L. Shnyrov.

Los directores autorizan su presentación en los términos establecidos por la normativa reguladora de Estudios de Tercer Ciclo y Doctorado de la Universidad de Salamanca con el fin de optar al título de Doctor en Química.

Salamanca, a        de        de 2016

Dr. Manuel García Roig

Dr. Cándido García de María

Dr. Valery L. Shnyrov



## *Agradecimientos*

A lo largo del tiempo empleado para el desarrollo de este trabajo han sido muchas las personas que me han acompañado y de quienes he podido aprender. A todos ellos deseo expresarles mi agradecimiento:

*En primer lugar a mis directores Manuel García Roig, Cándido García de María y Valery Shnyrov, por permitirme llevar a cabo este trabajo bajo su asesoramiento. Muy especialmente a Cándido por su paciencia y buena disposición en la discusión de resultados y elaboración de esta memoria, por sus consejos y su atención permanente en cada etapa de la investigación.*

*A Teresa, con quien comencé mi trabajo en investigación, por ser la luz que ha guiado siempre mi camino.*

*Al instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (IRNASA-CSIC), especialmente a Juan, de quien tanto he aprendido, por sus consejos y ayuda en una parte fundamental de este trabajo.*

*Al Dr. Francisco Gavilanes, del Departamento de Bioquímica de la Universidad Complutense de Madrid y a Nazaret por su ayuda en la realización de los experimentos de dicroísmo circular.*

*A mis compañeros de doctorado Rubén, Omayra y Milton con quienes tantos momentos he tenido la suerte de compartir a lo largo de estos años.*

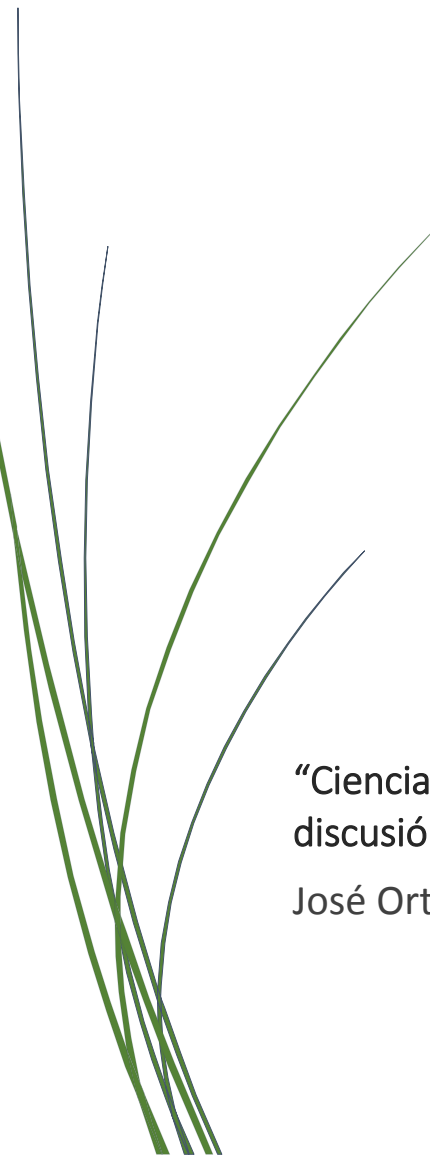
*A todos los compañeros que han pasado por el laboratorio y que de una u otra forma han contribuido en el desarrollo de mi trabajo y mi día a día estos años. Muy especialmente a mi compañera Agustina. A Juan Carlos, Héctor, David, Encarna, Marco, Pablo.*

*Y finalmente a mi familia por sus ánimos y apoyo incondicional y a todos mis amigos que aunque sean externos al mundo de la investigación, de manera personal han contribuido mucho al desarrollo de este proyecto.*

*A todos ellos, muchas gracias.*







“Ciencia es todo aquello sobre lo cuál siempre cabe discusión”

José Ortega y Gasset



## ACRÓNIMOS/SÍMBOLOS

- AH<sub>2</sub>**: notación genérica del sustrato reductor en la reacción catalizada por peroxidasa
- 4-AAP**: 4-Aminoantipirina
- APX**: Ascorbato peroxidasa
- BP1**: Barley Peroxidase (Peroxidasa de cebada)
- CcP**: Citocromo c peroxidasa
- CD**: Circular Dichroism (Dicroísmo circular)
- CLEAs**: Carrier-bound cross linked enzymes aggregates (Agregados enzimáticos mediante entrecruzamiento)
- CMP**: Peroxidasa de escoba blanca (*Cytisus multiflorus* peroxidase)
- CoI, CoII y CoIII**: Intermedios del ciclo catalítico de una peroxidasa
- CPO**: Cloroperoxidasa
- CRDO**: Consejo Regulador de la Denominación de Origen
- CuZn-SOD**: Cu-Zn superóxido dismutasa
- DER**: Desviación Estándar Relativa
- DSC**: Differential Scanning Calorimetry (Calorimetría diferencial de barrido)
- E<sub>A</sub>**: Energía de activación
- ELISA**: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)
- EPR**: Resonancia paramagnética electrónica
- FAD**: Flavín adenín dinucleótido o dinucleótido de flavina y adenina
- FMN**: Flavín mononucleótido o riboflavina-5'-fosfato
- GHS-Px**: Glutación peroxidasa
- GuHCl**: Clorhidrato de guanidina
- HIC**: Hydrophobic Interaction Chromatography (Cromatografía de interacción Hidrofóbica)
- HRGPs**: Proteínas ricas en hidroxiprolina
- HRP**: Peroxidasa de rábano picante
- IAA**: Ácido indol-3-acético
- IEC**: Ionic Exchange Chromatography (Cromatografía de intercambio iónico)
- IGP**: Indicación geográfica protegida
- LiP**: Lignina peroxidasa
- LPP**: Lentil Plant Peroxidase (Peroxidasa de lenteja)

**MnP**: Manganeso peroxidasa

**NADH**: Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida

**NBD-Cl**: 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol

**OPA**: O-ftaldehído

**PEG**: Polietilenglicol

**pI**: Punto isoeléctrico

**PNCL**: Plan Nacional para la calidad de las legumbres

**PNP**: Peanut Peroxidase (Peroxidasa de cacahuete)

**POX**: Peroxidasas

**PPD**: Dominio polifenólico

**PSA**: Prostate Specific Antigen (Antígeno prostático específico)

**PVP**: polivinilpirrolidona

**R<sub>z</sub>**: Factor de Reinheitszahl o número de pureza

**SBP**: Soybean Peroxidase (Peroxidasa de soja)

**SDS**: Dodecilsulfato sódico

**SDS-PAGE**: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

**SEC**: Size Exclusion Chromatography (Cromatografía de exclusión molecular)

**SO**: Sarcosina oxidasa

**TBHBA**: Ácido 2,4,6-triiodo-3-hidroxibenzoico

**TMB**: 3, 3', 5, 5'-Tetrametilbencidina

**U**: Unidades de actividad enzimática

**VIH**: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

## Índice

<b><i>Contexto y objetivos generales</i></b> .....	3
<b><i>Introducción general: peroxidasas</i></b> .....	7
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CLASIFICACIÓN .....	7
2. REACCIONES CATALIZADAS POR PEROXIDASAS .....	9
3. SUPERFAMILIA DE LAS PEROXIDASAS DE PLANTAS .....	10
3.1. Localización tisular y celular. Polimorfismo .....	10
3.2. Características estructurales .....	11
3.3. Mecanismo de catálisis .....	14
3.4. Inactivación por sustrato suicida .....	16
3.5. Funciones en las plantas .....	19
4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS .....	23
4.1. Eliminación de contaminantes fenólicos .....	23
4.2. Decoloración de tintes industriales .....	26
4.3. Síntesis orgánica .....	28
4.4. Análisis enzimático .....	29
4.5. Otras aplicaciones .....	30
<b><i>Capítulo I. Determinación de sarcosina en orina</i></b> .....	31
<b>1. OBJETO Y FUNDAMENTO DEL TRABAJO</b> .....	33
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	35
2.1. PLANTA DE LENTEJA .....	35
2.2. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS ENZIMÁTICOS CON EXTRACTOS VEGETALES .....	37
2.3. SARCOSINA .....	39
2.3.1. Sarcosina y cáncer de próstata .....	40

2.3.2. Métodos de determinación .....	41
2.4. SARCOSINA OXIDASA .....	44
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>46</b>
3.1. REACTIVOS, APARATOS Y MATERIAL.....	46
3.2. PLAN EXPERIMENTAL.....	48
3.3. TOMA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	49
3.4. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN .....	51
3.5. COMPARACIÓN CON LA PEROXIDASA DE RÁBANO PICANTE .....	51
3.6. REACCIÓN INDICADORA.....	54
3.6.1. Elección de sustrato y efecto del pH.....	54
3.6.2. Efecto de otras variables en la reacción indicadora .....	58
3.7. DETERMINACIÓN DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	64
3.7.1. Aplicación a muestras de orina .....	66
3.8. REACCIÓN GLOBAL .....	68
3.8.1. Efecto de variables en la reacción global.....	68
3.9. DETERMINACIÓN DE SARCOSINA .....	71
3.9.1. Aplicación a muestras de orina .....	73
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>75</b>

***Capítulo II. Extracción y purificación de la peroxidasa de escoba blanca.....77***

<b>1. OBJETO Y FUNDAMENTO DEL TRABAJO .....</b>	<b>79</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>81</b>
2.1. ESCOBA BLANCA: DESCRIPCIÓN Y HÁBITAT.....	81
2.2. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN DE PEROXIDASAS VEGETALES ....	82
2.2.1. Extracción con disoluciones tampón.....	82
2.2.2. Extracción con agua.....	83
2.3. TÉCNICAS UTILIZADAS EN LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	84
2.3.1. Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).....	85
2.3.2. Cromatografía de intercambio iónico (IEC) .....	87

2.3.3. Cromatografía de exclusión molecular (SEC) .....	88
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>89</b>
3.1. REACTIVOS, APARATOS Y MATERIAL.....	89
3.2. PLAN EXPERIMENTAL.....	91
3.2.1. Medida de la actividad peroxidasa.....	93
3.2.2. Proteína total .....	93
3.2.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	93
3.3. TOMA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	94
3.4. EXTRACCIÓN DE PEROXIDASA .....	94
3.5. ELIMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS .....	97
3.6. PROCEDIMIENTO PROPUESTO Y SELECCIÓN DE MUESTRAS.....	101
3.7. PURIFICACIÓN DE LA PEROXIDASA.....	103
3.7.1. Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).....	103
3.7.2. Cromatografía de intercambio iónico (IEC) .....	105
3.7.3. Cromatografía de exclusión molecular (SEC) .....	110
3.8. EVALUACIÓN DE LA PUREZA DE LA PEROXIDASA .....	113
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>116</b>

<b><i>Capítulo III. Caracterización de la peroxidasa de escoba blanca</i></b> .....	<b>117</b>
<b>1. OBJETO Y FUNDAMENTO DEL TRABAJO .....</b>	<b>119</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>121</b>
2.1. INTRODUCCIÓN A LA ESTRUCTURA PROTEICA .....	121
2.1.1. Fuerzas que intervienen en la estabilidad de las proteínas.....	122
2.2. ESTABILIDAD TÉRMICA Y FRENTE A CAMBIOS DE pH DE LAS PEROXIDASAS .....	124
2.3. TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD PROTEICA.....	125
2.3.1. Espectroscopia de absorción electrónica.....	125
2.3.2. Espectroscopía de fluorescencia .....	127
2.3.3. Espectroscopía de dicroísmo circular .....	130

2.3.4. Otras técnicas de estudio de la estructura proteica.....	131
2.4. MEDIDA DE LA ESTABILIDAD CONFORMACIONAL DE UNA PROTEÍNA.....	132
2.5. CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE REACCIONES ENZIMÁTICAS BISUSTRATO.....	134
2.5.1. Tipos de mecanismos.....	134
2.5.2. Constantes cinéticas: nomenclatura.....	137
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	138
3.1. REACTIVOS, APARATOS Y MATERIAL.....	138
3.2. PLAN EXPERIMENTAL.....	140
3.2.1. Medida de la actividad peroxidasa.....	141
3.3. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR Y ESTADO DE AGREGACIÓN .....	141
3.4. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA MEDIANTE CD.....	143
3.5. ESTABILIDAD TÉRMICA .....	144
3.5.1. Análisis de estabilidad térmica mediante CD.....	144
3.5.2. Análisis de estabilidad térmica mediante Fluorescencia Intrínseca.....	146
3.5.3. Tratamiento de las curvas de desnaturalización .....	148
3.6. ESTABILIDAD FRENTE AL pH.....	153
3.6.1. Espectros de absorción .....	153
3.6.2. Titulación proteica: desnaturalización inducida por el pH.....	156
3.7. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA.....	159
3.7.1. Estudios sobre la actividad con guayacol .....	159
3.7.2. Especificidad por sustrato .....	164
3.7.3. Estudios sobre el mecanismo catalítico .....	167
3.7.4. Estudios de inhibición.....	176
3.7.5. Características espectrales de los intermedios .....	188
<b>4. CONCLUSIONES</b> .....	191
<b><i>Bibliografía</i></b> .....	193
<b><i>Anexos</i></b> .....	215





## CONTEXTO Y OBJETIVOS GENERALES



## CONTEXTO Y OBJETIVOS GENERALES

El presente trabajo forma parte de dos proyectos con títulos: “*Screening, extracción y purificación de peroxidasas de residuos agrícolas verdes: caracterización y evaluación de algunas de sus aplicaciones biotecnológicas*”<sup>[1]</sup> y “*Purificación, caracterización y aplicaciones biotecnológicas de una nueva y versátil peroxidasa de escoba blanca (Cytisus multiflorus), un arbusto leguminoso abundante y endémico de Castilla y León*”<sup>[2]</sup> que se han llevado a cabo en los Departamentos de Química Física, Bioquímica y Biología Molecular y Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca, con la financiación de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León y del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL).

Tal como reflejan los títulos mencionados, la finalidad esencial del proyecto global ha sido la búsqueda de nuevas fuentes de peroxidasas entre residuos vegetales de origen agrícola y el aislamiento, caracterización y aplicaciones de las peroxidasas encontradas en las fuentes más ricas en estas enzimas.

El interés de esta investigación puede resumirse en dos aspectos fundamentales. Por un lado, las nuevas peroxidasas pueden ser una alternativa a la peroxidasa de rábano picante (HRP), producto prácticamente exclusivo en el mercado de las aplicaciones biotecnológicas con peroxidasas, a pesar de presentar algunos problemas de estabilidad e inactivación. Por otro lado, los residuos vegetales supondrían una fuente de peroxidasas barata y sostenible que proporcionaría un valor añadido a las prácticas agrícolas.

Los trabajos preliminares de esta línea de investigación se orientaron a medir y comparar la actividad peroxidasa de diferentes residuos vegetales de origen agrícola, limitando el estudio a algunas zonas de la provincia de Salamanca, en la Comunidad Autónoma de Castilla y León. Entre todos los residuos investigados, la mayor y más estable actividad peroxidasa se encontró en las plantas de lenteja de la Armuña (*Lens Culinaris* Medikus) y en las de escoba blanca (*Cytisus multiflorus*)<sup>[3]</sup>.

Los trabajos que constituyen la presente Tesis Doctoral tienen como objeto la investigación y estudio de diferentes aspectos de las peroxidasas de estas dos plantas que se han denominado “peroxidasa de planta de lenteja” (LPP, por lentil plant peroxidase) y “peroxidasa de *Cytisus multiflorus*” (CMP, por *Cytisus multiflorus* peroxidase).

Así, en el **Capítulo I** se demuestra la aplicabilidad de los extractos vegetales con actividad peroxidasa (sin necesidad de aislar ni purificar la enzima) en análisis bioquímico, concretamente para el desarrollo de métodos enzimáticos basados en reacciones en las que se produce o consume peróxido de hidrógeno. En este sentido se utiliza el extracto crudo de la planta de lenteja aplicado a la determinación del nivel de sarcosina en orina, parámetro éste que ha generado cierta polémica en los últimos cinco años por su aparente relación con el diagnóstico precoz del cáncer de próstata.

Dado que la mayoría de las aplicaciones conocidas de las peroxidasas se llevan a cabo con enzimas puras, en el **Capítulo II** se estudia y optimiza el proceso de extracción, aislamiento y purificación de peroxidasas vegetales, concretamente de la peroxidasa de la planta de escoba blanca.

Finalmente, puesto que las características cinéticas y de estabilidad de las peroxidasas pueden ser determinantes de sus potenciales aplicaciones biotecnológicas, en el **Capítulo III** se lleva a cabo la caracterización de la peroxidasa de escoba blanca o peroxidasa de *Cytisus multiflorus* (CMP), una vez aislada y purificada según el procedimiento propuesto en el Capítulo II.

La mayor parte de los resultados expuestos en la presente Memoria han sido publicados en los trabajos que se muestran en los *Anexos*.



## INTRODUCCIÓN GENERAL: PEROXIDASAS



## INTRODUCCIÓN GENERAL: PEROXIDASAS

### 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CLASIFICACIÓN

Las peroxidasas (POX, EC 1.11.1.\_) son un tipo de enzimas oxidorreductasas ampliamente distribuidas en los reinos animal y vegetal, en hongos, bacterias y algas. De forma más concreta, el término peroxidasa se refiere a enzimas que catalizan reacciones de oxidación-reducción entre un peróxido (generalmente  $H_2O_2$ ) y un agente reductor <sup>[4]</sup>.

Las peroxidasas pueden ser clasificadas atendiendo a diferentes criterios. Uno de los criterios es la presencia o ausencia de un metal en el centro activo. Aunque la mayor parte de las peroxidasas contiene algún átomo metálico en su centro activo, existen peroxidasas aisladas de bacterias que carecen de cationes metálicos en su estructura <sup>[5]</sup>. Dentro de aquéllas con cationes metálicos, Smith y Veitch realizaron una clasificación en dos grandes grupos, dependiendo de si contienen o no un grupo hemo <sup>[6]</sup>:

- **Peroxidasas con grupo hemo:** denominadas también hemoperoxidasas.

Dentro de ellas existen a su vez dos tipos de enzimas: unas con un solo grupo hemo, encontradas en mamíferos y plantas, y otras con dos grupos hemo como es el caso de la cloroperoxidasa (CPO, EC 1.11.1.10).

- **Peroxidasas sin grupo hemo:** destacan entre ellas las que contienen vanadio como las haloperoxidasas, ampliamente distribuidas en algas y las que contienen selenio como la glutatión peroxidasa (GHS-Px, EC 1.11.1.9).

Por otro lado, existe una clasificación más amplia atendiendo a aspectos estructurales y catalíticos. Según este criterio, se tienen tres superfamilias de peroxidasas:

- **Superfamilia de las peroxidasas animales** <sup>[7]</sup>: todas ellas son enzimas formadas por varias subunidades. Entre estas enzimas han sido caracterizadas la eosinófilo peroxidasa <sup>[8]</sup> y la prostaglandina sintetasa  $H_2$  (EC 1.14.99.1) <sup>[9]</sup>. La glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9) ha sido incluida en la categoría de peroxidasas animales, aunque su actividad se ha detectado también en plantas <sup>[10]</sup>.

- **Superfamilia de las catalasas** (EC 1.11.1.6): consideradas dentro del grupo de las peroxidasas debido a que poseen un grupo hemo y catalizan reacciones similares a las peroxidasas. Todas ellas son tetraméricas.

- **Superfamilia de las peroxidasas bacterianas, fúngicas y de plantas:** sus componentes presentan el mismo plegamiento y están evolutivamente relacionados <sup>[11]</sup>. Esta última familia se puede subdividir en tres clases en base a su estructura primaria <sup>[12]</sup>:

- **Clase I.** Peroxidasas de origen procariota.

Son peroxidasas intracelulares en plantas y bacterias. Carecen en su estructura de puentes disulfuro, carbohidratos e iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Ejemplos de este tipo de peroxidasas son la ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) y la citocromo c peroxidasa (CcP, EC 1.11.1.5), una proteína soluble que participa en la cadena de transporte de electrones mitocondrial cuando la citocromo c oxidasa respiratoria está inhibida <sup>[13]</sup>.

- **Clase II.** Peroxidasas fúngicas.

Engloba proteínas de secreción como la lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14) y la manganeso peroxidasa (MnP, EC1.11.1.13) producidas por hongos ligninolíticos <sup>[14]</sup>. Salvo alguna excepción todas las peroxidasas de esta clase presentan cuatro puentes disulfuro conservados que dotan de elevada rigidez a la estructura. Además contienen dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  y un porcentaje medio de carbohidratos en torno al 5%.

- **Clase III.** Peroxidasas de secreción en plantas.

Estas proteínas (EC 1.11.1.7) al igual que las de la Clase II, son glicoproteínas con dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  estructurales y cuatro puentes disulfuro conservados. El porcentaje de glicosilación es elevado (5-25 %). En esta clase de peroxidasas se encuentra la más utilizada comercialmente, la peroxidasa de rábano picante (HRP). También se han aislado y estudiado peroxidasas de plantas tales como tomate, soja, cebada, tabaco y varias especies de palmeras, entre otras. Generalmente este tipo de peroxidasas son secretadas al medio extracelular; por ello se denominan también peroxidasas de secreción.

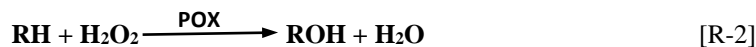


## 2. REACCIONES CATALIZADAS POR PEROXIDASAS

La reacción clásica catalizada por las peroxidasas es la **deshidrogenación oxidativa** <sup>[15]</sup>. Esta reacción está basada en una transferencia monoelectrónica entre un radical  $\pi$  oxo-hierro(IV)porfirina y una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos con peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos orgánicos, perácidos o incluso óxidos inorgánicos. Un ejemplo de este tipo de reacción es la polimerización de fenol o anilina (RH) en un mecanismo a través de radicales libres <sup>[16]</sup>:



La **transferencia de oxígeno** es otro tipo de reacción catalizada por peroxidasas y de gran interés desde el punto de su aplicación en síntesis orgánica. Esta reacción de oxidación es muy similar a la catalizada por enzimas monooxigenasas como la citocromo P450, incluyendo ambas una oxidación de heteroátomos, epoxidación y oxidación de enlaces C-H <sup>[17]</sup>:

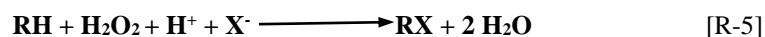


La **actividad catalasa** se describe como la descomposición del peróxido de hidrógeno para formar  $\text{H}_2\text{O}$ , pudiendo también expresarse de forma genérica para cualquier peróxido:



Dos tipos de enzimas pueden catalizar este tipo de reacciones de descomposición: las peroxidasas y las catalasas. De entre todas las peroxidasas estudiadas hasta la fecha, la cloroperoxidasa (CPO) es la que exhibe una mayor actividad catalasa <sup>[18]</sup>.

Por último, las haloperoxidasas catalizan la reacción de **halogenación peroxidativa** de sustratos orgánicos:



Esta reacción está también catalizada por vanadio peroxidasas y otras enzimas que carecen de grupo hemo <sup>[19, 20]</sup>. La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* es la enzima que posee una mayor actividad haloperoxidasa <sup>[21]</sup>.

### 3. SUPERFAMILIA DE LAS PEROXIDASAS DE PLANTAS

#### 3.1. Localización tisular y celular. Polimorfismo

Las peroxidasas vegetales de Clase III están codificadas por una gran familia multigénica <sup>[4]</sup>, mostrando un alto grado de polimorfismo. La totalidad de genes que codifican las peroxidasas de Clase II y III presentan secuencias en el extremo N-terminal que codifican un péptido señal. Las peroxidasas de Clase I, en cambio, carecen de péptido señal. Estos péptidos señal dirigen a las peroxidasas hasta el espacio extracelular siguiendo una ruta que comienza en el retículo endoplasmático donde se forman los puentes disulfuro en un plegamiento cotraduccional <sup>[22]</sup> y se unen dos cationes calcio que estabilizan la estructura de la apoperoxidasa resultante. Posteriormente, tiene lugar un procesamiento adicional de los carbohidratos en el aparato de Golgi, después del cuál las peroxidasas en la mayor parte de los casos son secretadas. Se encuentran también peroxidasas localizadas en tejidos meristemáticos <sup>[23]</sup>, en las células epidérmicas <sup>[24]</sup> y vasculares <sup>[25]</sup>. En todos estos tejidos las peroxidasas están localizadas tanto en las paredes celulares como en las vacuolas <sup>[26]</sup>.

La evolución de una familia multigénica puede estar relacionada con el aumento de complejidad en las plantas y con la diversificación de biotopos y patógenos <sup>[27]</sup>. En *Arabidopsis thaliana* se han usado 73 genes para determinar relaciones filogenéticas entre las peroxidasas del reino vegetal <sup>[28]</sup>.

De acuerdo con su punto isoeléctrico (pI), las isoenzimas de las peroxidasas se clasifican en ácidas (pI < 7), moderadamente básicas (7.0 < pI < 9.0) o fuertemente básicas (pI > 9) <sup>[29, 30]</sup>. Estas distintas isoenzimas muestran una diferente localización celular, pero similar especificidad por sustrato. Todas ellas se encuentran en la pared

celular, pero en las vacuolas solo se han encontrado peroxidasas fuertemente básicas <sup>[31]</sup>. Esto hace pensar que las peroxidasas básicas están relacionadas con procesos llevados a cabo íntegramente en las vacuolas como la biosíntesis de fenoles y alcaloides <sup>[31]</sup>, mientras que ambas, peroxidasas ácidas y básicas, están implicadas en la biosíntesis de lignina.

### 3.2. Características estructurales

La primera peroxidasa cuya estructura fue analizada mediante difracción de rayos-X fue la CcP <sup>[32]</sup> y se convirtió en la base para el análisis estructural así como de las propiedades y funciones del resto de peroxidasas que han sido aisladas y cristalizadas posteriormente.

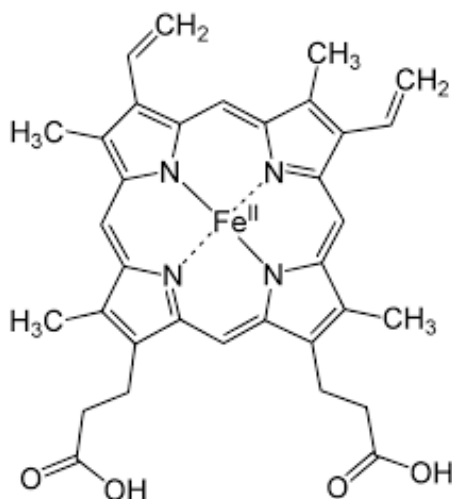
En las tres Clases de peroxidasas (bacterianas, fúngicas y de plantas) se conserva la organización de la estructura secundaria. En todas ellas existe un plegamiento fundamentalmente helicoidal <sup>[33]</sup>, estando compuestas por 10-11  $\alpha$ -hélices unidas sin apenas estructuras  $\beta$ . Se conserva también en todas ellas la existencia de dos dominios estructurales (distal y proximal) unidos por un puente de hidrógeno.

Los sitios de unión de los dos iones calcio en las peroxidasas de Clase II y Clase III están altamente conservados, encontrándose cada uno de ellos en un dominio y estando el ión calcio del dominio proximal más fuertemente unido. Ambos iones parecen estar íntimamente relacionados con la actividad catalítica de la enzima. En algunas peroxidasas como la peroxidasa catiónica de cacahuete (CPRx), al llevar a cabo la eliminación de los cationes calcio se produce una reducción de la actividad catalítica de un 50% <sup>[34]</sup>. En el caso de la eliminación de dichos cationes en la estructura de la MnP de *P. chrysosporium* se produce la inhibición total de la enzima.

El grupo prostético característico y constituyente del centro activo de la enzima es un grupo hemo (protoporfirina IX) pentacoordinado denominado también grupo hemo b (Figura 1). En dicho grupo, la sexta posición de coordinación está vacía y es allí donde tienen lugar las reacciones de la peroxidasa <sup>[35]</sup>. La quinta posición de coordinación está ocupada por el imidazol de una histidina y las otras cuatro posiciones restantes están ocupadas por 4 nitrógenos pirrólicos.

La cavidad proximal del grupo hemo presenta dos residuos invariables en todas las peroxidasas de plantas: una histidina axial y un aspartato, situados en la hélice F y H

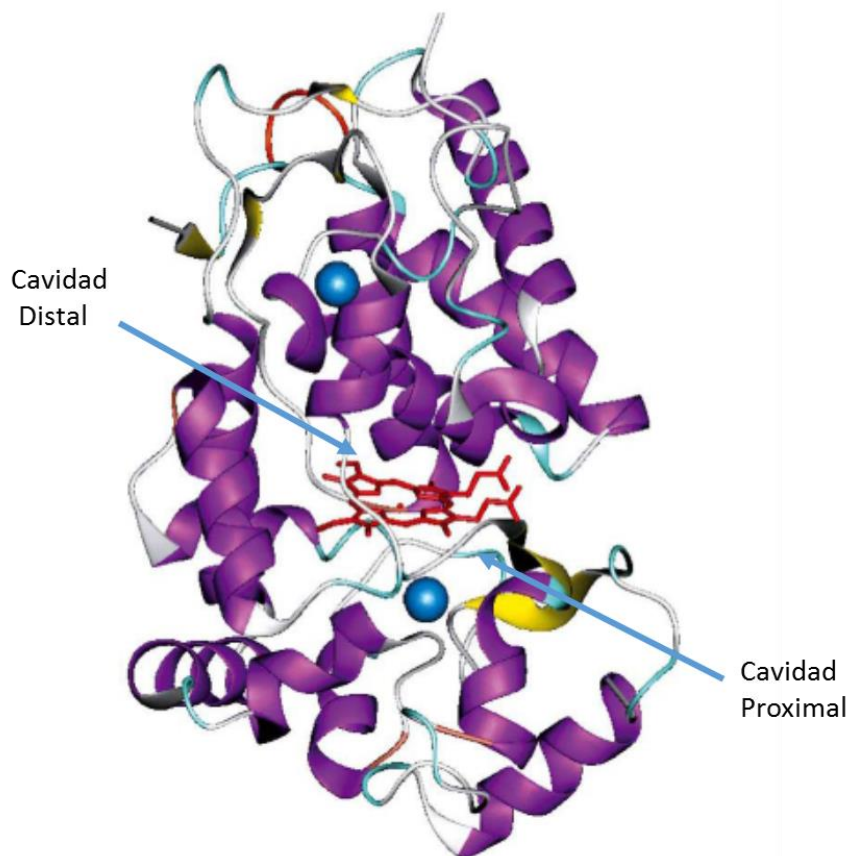
respectivamente <sup>[11]</sup>. En el lado proximal se puede observar también un residuo aromático que varía en las tres clases de peroxidasa. En la Clase II y Clase III se trata de una fenilalanina y en las peroxidasas de Clase I es un triptófano, susceptible de ser oxidado por el radical catiónico del grupo hemo.



**Figura 1.** Grupo hemo tipo b con Fe ligado a los nitrógenos pirrólicos.

En la cavidad distal aparecen residuos conservados de histidina y arginina <sup>[11]</sup>. Tanto los residuos de la cavidad distal como proximal estabilizan los diferentes estados de oxidación del hierro en el ciclo catalítico de las peroxidasas e intervienen directamente en la interacción con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En la Figura 2 se representa la estructura tridimensional de la HRP.

En el caso de la MnP de *P. chrysosporium* mencionada anteriormente, los iones calcio se encuentran unidos a residuos pertenecientes a hélices contiguas a las histidinas del centro activo <sup>[36]</sup>. Estas hélices constituyen la cavidad distal y proximal del grupo hemo, de tal forma que cuando se eliminan los iones Ca<sup>2+</sup> de la MnP, el entorno o dominio distal del grupo hemo sufre un cambio estructural y la histidina que estaba unida a dicho catión se une ahora al hierro del grupo hemo, impidiendo así su unión al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>[37]</sup>. Este cambio estructural explica la pérdida total de actividad enzimática.



**Figura 2.** Estructura tridimensional de la peroxidasa de rábano picante (HRP).

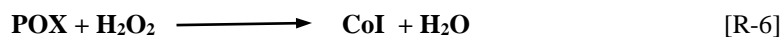
Se representa en rojo el grupo hemo y en azul los dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  [38].

La glicosilación de las peroxididasas de plantas varía entre el 5 y el 25% y constituye uno de los factores determinantes de su estabilidad térmica. Los principales azúcares encontrados en las peroxididasas son la manosa, N-acetilglucosamina, fucosa y xilosa [39]. El porcentaje de glicosilación influye también en la resistencia de estas enzimas a proteasas y en sus propiedades inmunológicas [40]. El glicano se suele presentar hacia el exterior de la molécula [38].

Otro elemento fundamental en la estructura de las peroxididasas son los puentes disulfuro ligados a residuos invariables de cisteína, que estabilizan su estructura terciaria.

### 3.3. Mecanismo de catálisis

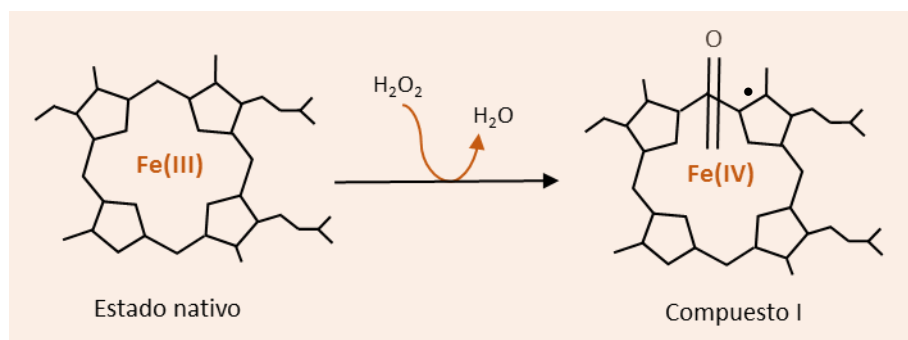
Las peroxidasas de Clase III catalizan la reacción clásica de oxidación de gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos en un ciclo catalítico consistente en tres etapas <sup>[35]</sup>:



Donde POX es la peroxidasa en su estado nativo, CoI es el primer intermedio enzimático denominado Compuesto I, CoII es el segundo intermedio enzimático denominado Compuesto II, AH representa el sustrato reducido y A<sup>•</sup> el producto radicalario de dicho sustrato.

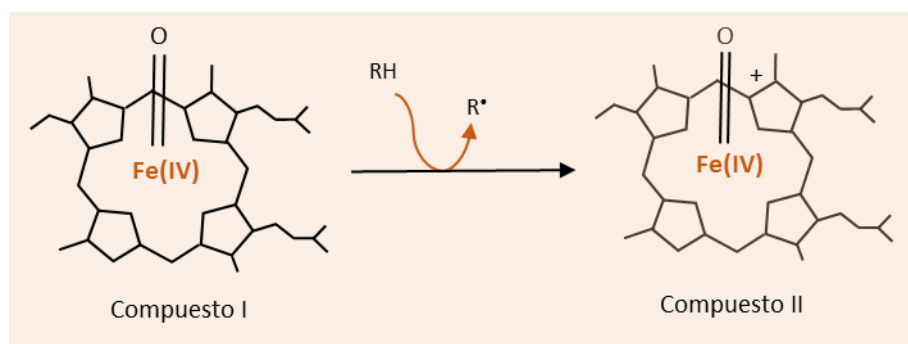
Las etapas del ciclo y características estructurales de cada uno de los intermedios de la reacción son las siguientes:

- En primer lugar se establece un enlace entre el Fe del grupo hemo con el oxígeno de la molécula de peróxido de hidrógeno en la posición 6 de coordinación. Se genera así el denominado Compuesto I (Figura 3), generalmente representado como radical libre  $\pi$ , según estudios de resonancia paramagnética electrónica (EPR) <sup>[41]</sup>. Este Compuesto I contiene el centro activo de oxo-hierro (IV)porfirina.



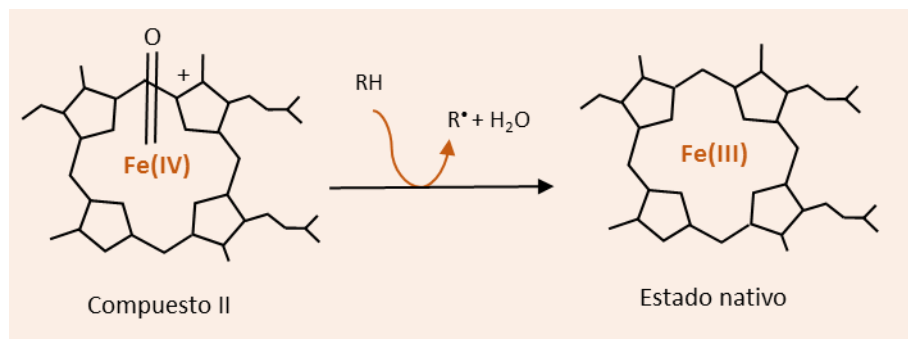
**Figura 3.** Estructura del centro activo de la peroxidasa en estado nativo y el intermedio enzimático denominado Compuesto I.

- La presencia de un agente reductor, tal como un compuesto aromático, puede generar el Compuesto II (Figura 4), una molécula similar a la anterior pero no radicalaria. Como producto de la reacción se obtiene un radical libre derivado del compuesto aromático que participa como reductor.



**Figura 4.** Estructura del intermedio enzimático denominado Compuesto II.

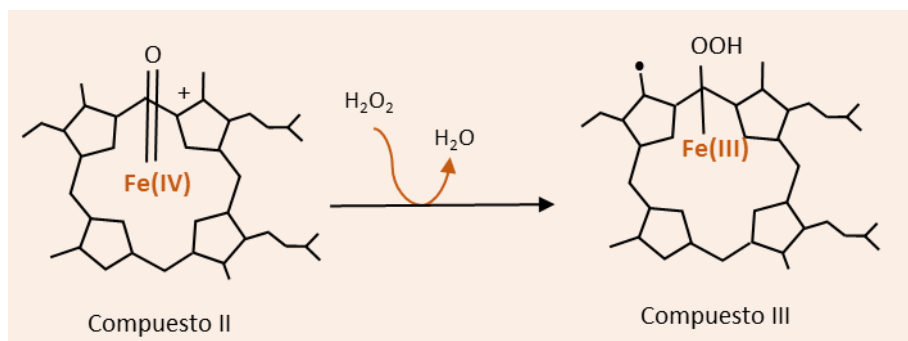
- El Compuesto II oxida una segunda molécula del sustrato reductor para volver de nuevo al estado inicial de hierro(III)-porfirina (Figura 5).



**Figura 5.** Transformación del Compuesto II en la enzima nativa.

### 3.4. Inactivación por sustrato suicida

En ausencia de sustrato reductor o bajo una exposición a elevadas concentraciones de peróxido de hidrógeno, se muestra un comportamiento cinético de inactivación a partir de la conversión del Compuesto II en el Compuesto III (Figura 6). Éste último no es un compuesto que forme parte del ciclo de catálisis clásico de una peroxidasa. Sin embargo su presencia ha sido demostrada mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR) y análisis espectrales en HRP <sup>[42]</sup>, citocromo c peroxidasa <sup>[43]</sup>, lignina peroxidasa <sup>[44]</sup> y manganeso peroxidasa <sup>[45]</sup>, entre otras peroxidasas.



**Figura 6.** Generación del Compuesto III en presencia de  $H_2O_2$ .



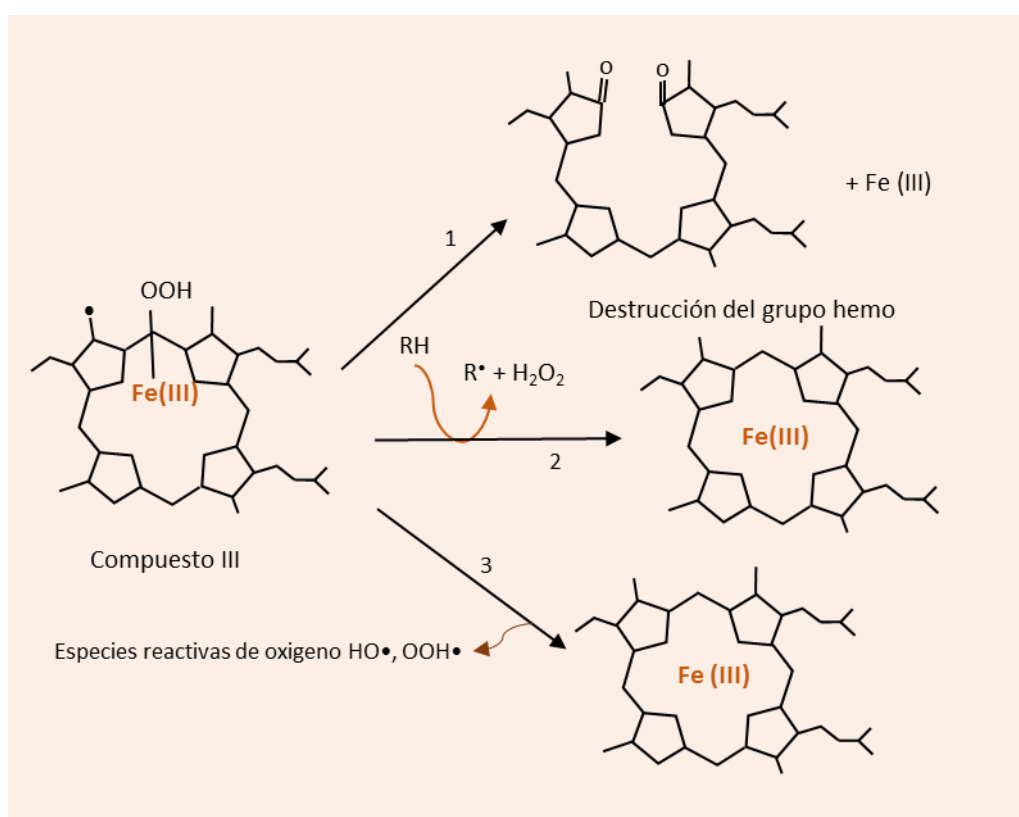
La reacción entre el Compuesto II con especies oxidantes como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  parece estar mediada por radicales superóxido y se obtienen cinéticas de inactivación que llegan a un estado de saturación en estudios con HRP y APX. Este tipo de inactivación generada por la presencia del Compuesto III se conoce habitualmente como inactivación por sustrato suicida. La inactivación por sustrato suicida es un tipo común de inhibición irreversible en la cuál la enzima convierte al inhibidor en una sustancia reactiva en su centro activo o bien, dicho de otro modo, un sustrato ocupa el centro activo de una enzima o compuesto enzimático intermediario en una etapa del mecanismo catalítico que no es la habitual.

La estequiometría de este tipo de reacciones de inhibición por sustrato suicida es variable, encontrándose diferencias con respecto a la afinidad de la molécula enzimática por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las diferentes peroxidasas estudiadas en este sentido. Se concluye, por ejemplo, que son necesarias tan solo 2 moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para inactivar la APX <sup>[46]</sup> mientras que para la inactivación de HRP se requieren 265 moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  <sup>[47]</sup>.

El establecimiento de un mecanismo concertado para la ruta catalítica una vez formado el Compuesto III no es algo trivial. De hecho, dicho Compuesto III puede seguir tres posibles vías de descomposición:

- Es posible que se formen especies reactivas de oxígeno que provocan la escisión de la estructura del tetrapirrol y oxidan el anillo de porfirina (vía 1, Figura 7). Esta suposición está avalada por el hecho de haberse encontrado especies inactivas relacionadas con el Compuesto III después del tratamiento de algunas peroxidasas como APX o HRP con un exceso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- En segundo lugar, el Compuesto III puede volver al estado inicial después de catalizar la oxidación de otras proteínas que se encuentren en las proximidades (vía 2, Figura 7).
- Finalmente, puede producirse la liberación espontánea de radicales libres ya que el radical peroxilo no se encuentra unido de forma covalente al anillo de porfirina (vía 3, Figura 7). Dos moléculas de radicales superóxido pueden transformarse espontáneamente en especies tetraóxido de corta vida que se descomponen en radicales hidroxilo, más reactivos que los peroxilo y de elevada solubilidad, produciendo éstos oxidaciones en los residuos de las cadenas proteicas, siendo los aminoácidos más susceptibles de sufrir esta oxidación la metionina, cisteína,

triptófano, tirosina e histidina. La oxidación de proteínas está relacionada con los procesos de envejecimiento y se considera una causa de trastornos relacionados con el plegamiento anómalo de las mismas tales como el Alzheimer o la enfermedad de Refsum.



**Figura 7.** Vías de transformación del Compuesto III.

### 3.5. Funciones en las plantas

Las peroxidasas son catalizadores de reacciones que llevan a la defensa de las plantas frente a diversos factores. Sin embargo, no es esta la única función que desempeñan. Por el contrario, el papel de las peroxidasas en las plantas lejos de ser claro y concreto, resulta en ocasiones un difícil entramado de funciones muy estrechamente relacionadas entre sí. Para simplificar el concepto, se puede decir que las peroxidasas pueden catalizar un conjunto de reacciones encaminadas a mantener un **equilibrio** en las plantas. Así, aunque una de las reacciones más características de estas enzimas es la actividad catalasa (o descomposición del  $H_2O_2$ ), en ocasiones en algunas reacciones catalizadas por peroxidasas se generan como subproductos especies reactivas de oxígeno que pueden dar lugar a  $H_2O_2$ . Por ello, las peroxidasas mantienen en equilibrio el  $H_2O_2$  endógeno. Estando este último relacionado con procesos de elongación celular, no es difícil suponer la relación de estas enzimas con los procesos de crecimiento en las plantas. A continuación se exponen procesos más concretos en los cuales las peroxidasas juegan un rol importante, casi siempre en colaboración estrecha con otras enzimas.

- *Entrecruzamiento de proteínas y ácido ferúlico*

Las peroxidasas desempeñan un papel fundamental en diversos procesos encaminados al refuerzo de la pared celular de las plantas. Dentro de dichos procesos, el entrecruzamiento de proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) y del ácido ferúlico constituyen mecanismos de defensa temporales. Mientras que otros tales como la lignificación y suberización son característicos de las células altamente diferenciadas capaces de formar paredes celulares secundarias <sup>[48]</sup>.

Las proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) son un tipo de proteínas vegetales secretadas en los apoplastos como monómeros solubles que, después en una reacción posterior mediada por  $H_2O_2$ , forman redes insolubles <sup>[49]</sup>. Esta reacción está catalizada por peroxidasas y a partir de ella se pueden formar uniones de HRGPs con pectinas, constituyéndose así una pared celular mucho más rígida y por tanto difícil de penetrar.

Por otro lado, los residuos de ácido ferúlico unidos a los polisacáridos existentes en la pared celular vegetal pueden formar enlaces covalentes con otros. Se producen de

esta forma entrecruzamientos entre dichos residuos, dotando también de mayor rigidez a la pared celular. El entrecruzamiento de residuos de ácido ferúlico se produce por acoplamiento oxidativo. Esta es también una reacción mediada por peróxido de hidrógeno y catalizada por peroxidasas <sup>[50]</sup>. El residuo resultante (5,5'-deshidrodiverulato) a su vez forma entrecruzamientos con polisacáridos próximos; se forma así un entramado que dificulta la penetración de la pared celular.

- *Lignificación y suberización*

El proceso de lignificación está asociado a la formación de una estructura vascular dentro de la planta.

La lignina representa el segundo compuesto más abundante de la tierra, significando el 25% de la biomasa de una planta. Se trata de un heteropolímero formado por tres tipos de alcoholes hidroxicinámicos denominados monolignoles (alcohol p-cumarílico, coniferílico y sinapílico), diferenciados entre sí en el grado de metoxilación. Las diferentes asociaciones entre los monolignoles anteriormente mencionados generan distintos tipos de lignina con diferente complejidad química.

El entrecruzamiento de los tres monómeros fenólicos (monolignoles) es un proceso de acoplamiento oxidativo que da lugar a las subunidades de lignina y está mediado por una peroxidasa <sup>[48]</sup>. Las peroxidasas ácidas y básicas son capaces de oxidar el alcohol cumarílico y coniferílico. Sin embargo, la oxidación del alcohol sinapílico está catalizada normalmente por peroxidasas ácidas <sup>[51]</sup>. En los procesos de lignificación, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necesario proviene de una difenileno iodo oxidasa sensible a NADPH que genera O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Este O<sub>2</sub><sup>•-</sup> dismuta por acción de la Cu Zn superóxido dismutasa (CuZn-SOD) <sup>[52]</sup>.

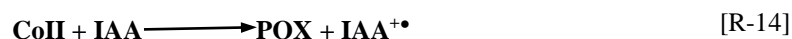
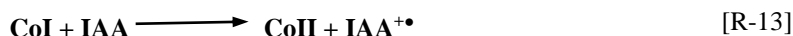
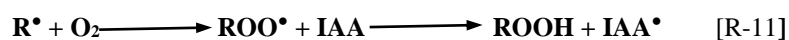
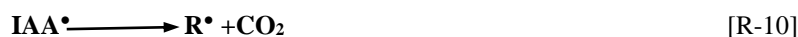
Por otro lado, la suberización consiste en el desarrollo de una película polialifática característica descrita como un poliéster. Dicho poliéster se forma por la unión de componentes alifáticos como los ácidos α,ω-dioicos con ácidos p-hidroxicinámicos, constituyendo así el dominio polifenólico de la planta (PPD).

La suberización es un fenómeno mediado por peroxidasas, puesto que la formación del PPD es también un proceso de acoplamiento oxidativo. De forma similar al caso de la lignificación, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necesario para la reacción de oxidación proviene de una enzima sensible a NADPH <sup>[53]</sup>.

- *Catabolismo de auxinas*

Las auxinas son hormonas vegetales que intervienen en el desarrollo de fototropismo positivo en las plantas, entre otras funciones. Una de las auxinas más ampliamente conocidas es el ácido indol-3-acético (IAA). En 1999, Savitsky y colaboradores descubrieron que una peroxidasa mediaba el catabolismo del IAA en ausencia de peróxido de hidrógeno añadido <sup>[54]</sup>. En realidad, estas enzimas pueden mediar en el proceso metabólico tanto en presencia de peróxido añadido como en ausencia de éste. Cuando la planta presenta elevados niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta de forma importante la actividad peroxidasa, constituyendo este hecho un mecanismo de defensa frente al estrés peroxidativo. Sin embargo, puesto que la degradación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> va asociada a una degradación de IAA, existe una repercusión negativa en el crecimiento de la planta <sup>[38]</sup>.

En el catabolismo de IAA en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> externo es necesaria una etapa de iniciación en la que se genere un peróxido necesario para el proceso. El mecanismo en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue establecido por Dunford y es el siguiente <sup>[55]</sup>:



Donde IAA<sup>+</sup>• es el radical catiónico del ácido indol-3-acético, IAA<sup>•</sup> es el radical indólico, R<sup>•</sup> el radical escatoilo, ROO<sup>•</sup> el radical indol-3-metilhidroperóxido, ROOH el indol-3-metilhidroperóxido, ROH el indol-3-metanol, POX la peroxidasa en su forma nativa y CoI y CoII los intermedios enzimáticos de la reacción catalizada por peroxidasa.

Tal como se observa en la R-11, el peróxido necesario se forma a partir de R<sup>•</sup>, generado por descarboxilación del radical catiónico IAA<sup>+</sup>• [R-10], que proviene a su vez de la oxidación monoelectrónica de IAA.

- *POX en otras respuestas defensivas de la planta*

Uno de los mecanismos más extendidos de defensa frente a agentes patógenos en las plantas es la oxidación. Las especies reactivas de oxígeno (ROS: reactive oxygen species) son intermedios tóxicos en cuya producción y destrucción intervienen las peroxidasas, entre otras enzimas.

En la reducción de  $O_2$  a  $H_2O$ , se generan como subproductos ROS, destacando entre los más tóxicos  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  <sup>[48]</sup>. Ya se ha visto en otros apartados cómo las peroxidasas son capaces de regular niveles endógenos de  $H_2O_2$ . Es también conocido que determinadas especies reactivas de nitrógeno como  $NO^{\bullet}$  se unen reversiblemente al grupo hemo de peroxidasas de plantas <sup>[56]</sup>. Esta unión y la formación de un complejo debido a la transferencia electrónica de  $NO^{\bullet}$  al grupo prostético de la peroxidasa quedan comprobadas mediante estudios ópticos y de resonancia paramagnética electrónica <sup>[57]</sup>. Sin embargo, el papel de las peroxidasas en el metabolismo de estas especies reactivas de nitrógeno no está muy claro aún.

Por otro lado, ha sido propuesta también la participación de las peroxidasas en la síntesis de fitoalexinas, compuestos antimicrobianos que se acumulan en las plantas después de una infección fúngica o bacteriana. Se cree también que las peroxidasas están de alguna manera involucradas en la biosíntesis de metabolitos secundarios de reconocidas propiedades medicinales y terapéuticas. Es el caso de la peroxidasa básica aislada de la planta vinca de Madagascar (*Catharanthus roseus*), capaz de producir una reacción de dimerización entre la catarantina y vindolina para producir  $\alpha$ -3',4'-anhidrovinblastina <sup>[58]</sup>. Este compuesto es uno de los alcaloides mayoritarios en esta planta y es precursor de productos antitumorales como la vinblastina y vincristina, utilizadas en el tratamiento de la leucemia.

#### 4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Las peroxidasas son biocatalizadores utilizados en la producción de una gran variedad de compuestos en biomedicina, como biosensores y en tratamientos de residuos. Además, las peroxidasas pueden sustituir a algunos catalizadores químicos que son tóxicos para el medio ambiente. Es el caso del cloro en el proceso de blanqueo del papel durante su reciclaje y de agentes cancerígenos como el formaldehído, utilizado en la fabricación de resinas fenólicas.

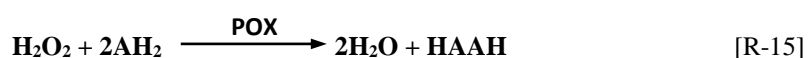
##### 4.1. Eliminación de contaminantes fenólicos

Los compuestos aromáticos, especialmente fenoles y aminas aromáticas, constituyen una de las clases de contaminantes más abundantes en aguas residuales y suelos. Estos compuestos se pueden encontrar en elevadas concentraciones en aguas residuales industriales que resultan de procesos tales como la conversión del carbón, refinado del petróleo, revestimientos metálicos, industrias químicas y textiles y minería [59].

En los últimos años se han propuesto procedimientos enzimáticos para llevar a cabo la detoxificación de aguas y suelos contaminados por este tipo de sustancias orgánicas en sustitución a los métodos convencionales, convirtiéndose así determinados tipos de enzimas en firmes candidatas como base para el desarrollo de tecnologías de biorremediación [59]. La utilización de enzimas en la detoxificación de aguas y suelos presenta ciertas ventajas con respecto a los tratamientos convencionales. La primera ventaja es la elevada especificidad y selectividad que tienen las enzimas. En segundo lugar, son menos susceptibles de ser inhibidas por compuestos que pueden resultar tóxicos para los microorganismos y sus costes pueden ser menores que otro tipo de procedimientos, sobre todo porque es común la utilización de enzimas que no estén totalmente puras sino en forma de extractos vegetales y a veces es posible la reutilización si la enzima está convenientemente inmovilizada en soportes de diferente naturaleza. Además, las enzimas pueden trabajar en un amplio margen de concentración de compuestos aromáticos [60].

La eficacia de los procesos depende de parámetros claves para la enzima como el pH, temperatura o concentraciones de sustrato. En este sentido, existen en la literatura

numerosos trabajos que tratan de optimizar estas condiciones para procesos concretos de eliminación de compuestos fenólicos. Las enzimas más utilizadas en este campo han sido las oxidoreductasas y el fundamento de la mayoría de dichos procesos es la eliminación de compuestos fenólicos mediante una reacción de polimerización oxidativa, generando oligómeros insolubles que precipitan y pueden ser fácilmente eliminados por filtración o sedimentación <sup>[61]</sup>. En la reacción de oxidación es necesaria una molécula aceptora de electrones. El peróxido de hidrógeno puede ser la molécula aceptora y, de esta forma las peroxidasas juegan un papel importante como catalizadores. La reacción en forma esquemática es la siguiente:



Donde HAAH es el producto de polimerización del sustrato orgánico donador de electrones AH<sub>2</sub> (fenol o amina aromática).

La HRP ha sido la enzima más utilizada en aplicaciones de este tipo. Vasileva y cols. desarrollaron en el año 2009 membranas de etilendiamina con HRP inmovilizada que aplicaron a la detoxificación de aguas residuales contaminadas con elevadas concentraciones de fenol (100 ppm). Estos mismos autores comparan la eficacia en el proceso de soportes de la misma membrana modificados con NaOH y sin modificar. Con las membranas modificadas y con HRP consiguen un 95.4% de rendimiento y el soporte mantiene el 50% de la actividad peroxidasa inicial después de 20 días de reutilización <sup>[62]</sup>.

Asimismo, se han utilizado otras peroxidasas extraídas de diferentes fuentes vegetales y de pureza variada. Duarte-Vázquez y cols. <sup>[63]</sup> en 2002 estudiaron la eficacia de la peroxidasa de nabo para la eliminación de diferentes compuestos fenólicos mediante polimerización oxidativa. Entre estos compuestos se encontraban el 2-clorofenol, 3-clorofenol, o-cresol, m-cresol, 2,4-clorofenol y bisfenol. Consiguieron un rendimiento de eliminación del 85% en la mayoría de los fenoles en un rango de pH entre 4 y 8. Enzimas fúngicas como la LiP o MnP tienen también en la literatura numerosas aplicaciones en el campo de la descontaminación de suelos y aguas residuales industriales. La LiP fue aislada en 1983 del hongo *Phanerochaete chrysosporium* y es capaz de oxidar un gran número de compuestos policíclicos aromáticos <sup>[64]</sup>. En 1989, Aitken y cols. <sup>[65]</sup> habían optimizado las condiciones de la eliminación de fenoles, teniendo la máxima actividad de



polimerización a pH por encima de 4.0. Posteriormente, Cornwell y cols. [66] inmovilizaron LiP en soportes de cerámica porosos consiguiendo elevados rendimientos de eliminación de fenoles.

Como se ha mencionado anteriormente, existen factores determinantes de la eficacia de todo proceso biotecnológico que utilice enzimas. Uno de ellos es la concentración de  $H_2O_2$  en el caso de las peroxidases. Son muchos por tanto, los estudios realizados con el objetivo de comparar la relación entre enzima y  $[H_2O_2]$  y el rendimiento de eliminación de compuestos fenólicos. En el caso de la peroxidasa de soja, la relación  $[H_2O_2]/[POX]$  óptima fue de 1.2 [67]. En la peroxidasa de nabo [63], concentraciones de  $H_2O_2$  por encima de 1.2 mM producen la inhibición de la enzima. Dicha inhibición puede ser debida a una inactivación por sustrato suicida y también a la adsorción de la enzima sobre el polímero que resulta en la reacción, limitándose así la difusión de las moléculas del sustrato al centro activo de la enzima. Por eso, en algunos procesos se ha estudiado la influencia de concentraciones añadidas de PEG (polietilenglicol) o gelatina, aumentando en todos los casos el rendimiento debido a que se limitan así los procesos de adsorción de la enzima [68]. Humaira y Qayyum consiguieron un 94% de eliminación de p-bromofenol presente en aguas en concentraciones de 0.3 mM utilizando extractos de peroxidasa de calabaza amarga y PEG como aditivo ( $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) [69].

Más recientemente, se han focalizado las tecnologías que utilizan peroxidases en la eliminación de contaminantes emergentes en aguas residuales. Este es el caso de los disruptores endocrinos y antibióticos. Los disruptores endocrinos son compuestos capaces de alterar el sistema hormonal tanto en animales como en seres humanos y por tanto capaces de alterar funciones vitales como el crecimiento o el desarrollo sexual. En 2011 Taboada-Puig y cols. sintetizaron agregados enzimáticos insolubles o CLEAs (*Carrier-bound cross-linked enzyme aggregates*) utilizando peroxidasa de *Bjerkandera adusta* y glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*. Posteriormente, estos autores utilizaron los agregados anteriormente mencionados para la eliminación de disruptores endocrinos bisfenol A, nonilfenol, triclosano y las hormonas  $17\alpha$ -etinilestradiol y  $17\beta$ -estradiol, en disolución acuosa. Consiguieron una total eliminación de todos ellos, excepto del triclosano, cuya eliminación fue de 74% en las condiciones propuestas [70].

Zoheb Karim y Qayyum Husain [71], inmovilizaron 1113 U de peroxidasa de calabaza amarga sobre cenizas volátiles que se obtienen de diversos tratamientos de depuración de efluentes gaseosos industriales. Este tipo de reactor enzimático fue

utilizado en batch y en continuo para el tratamiento de disoluciones acuosas que contenían bisfenol A. La reacción tiene lugar en presencia de guayacol como mediador redox y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Obtuvieron oxidaciones del Bisfenol A con elevados rendimientos a temperaturas de 40 y 60°C. Además el producto de oxidación, 4-isopropenilfenol no mostró genotoxicidad.

Xianghua y cols. utilizaron un extracto de MnP de *Phanerochaete chrysosporium* como catalizador para la degradación oxidativa de tetraciclina y oxitetraciclina, antibióticos de uso común. Los porcentajes de degradación en disoluciones de 50 ppm de tetraciclina y oxitetraciclina fueron 72.5% y 84.3% respectivamente, utilizando 40 U/L de peroxidasa. El rango de pH de máxima actividad de oxidación de ambos compuestos fue 2.9-4.8 [72].

## 4.2. Decoloración de tintes industriales

El color es el primer contaminante que se reconoce en las aguas residuales. El principal problema ambiental derivado del aporte de color a las aguas es la reducción de la transparencia de las mismas y la disminución del oxígeno disuelto. Los colorantes son sustancias capaces de conferir color a otras. Dentro de los colorantes se engloban tintes y pigmentos.

Los tintes industriales tienen su mayor aplicación en la industria textil [73, 74], aunque también se utilizan en la industria del papel y de la fotografía. Químicamente, los tintes son compuestos orgánicos, generalmente sintéticos que presentan en su estructura molecular anillos aromáticos y se agrupan en diferentes familias de las cuales los tintes azo, caracterizados por un enlace -N=N-, son los de mayor importancia industrial.

El desarrollo de la tecnología adecuada para el tratamiento de efluentes textiles, caracterizados por la presencia de elevadas concentraciones de estos tintes sintéticos, ha sido objeto de gran interés en los últimos años. Las principales técnicas utilizadas en la decoloración de este tipo de efluentes se pueden agrupar en tratamientos químicos, físicos y biológicos [75].

Los tratamientos químicos están basados en procesos oxidativos. Uno de los métodos más utilizados es la oxidación utilizando el reactivo de Fenton, una mezcla de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe(II). El producto de la reacción precipita con el ión férrico y otros compuestos orgánicos [76]. Dentro de las técnicas químicas se incluyen también otros tratamientos más modernos, como la ozonización [77], la oxidación fotoquímica y la hidrólisis del colorante mediante un potencial a través de agentes generados electrolíticamente. Los principales inconvenientes de este tipo de procesos son el elevado coste, lentitud y dificultades de implementación a gran escala [78]. En muchos casos, la generación de lodos es un problema añadido y en ocasiones los compuestos generados tienen mayor carácter tóxico que los colorantes de partida [79].

Entre los tratamientos físicos más utilizados cabe destacar la adsorción, uso de membranas de filtración, intercambio iónico y coagulación-floculación. En muchos casos se producen también residuos con mayor concentración del contaminante [80].

La eficacia de tratamientos anaerobios en la degradación de tintes ha sido ampliamente estudiada, tanto con cultivos mixtos como con cepas aisladas [81]. La identificación química de los productos de degradación de los tintes muestra que la decoloración tiene lugar por vía reductiva y este mecanismo de reducción en los tintes azo da lugar a aminas aromáticas [81] que carecen de color, pero tienen un alto carácter tóxico, mutagénico y cancerígeno [82]. Los tratamientos aerobios utilizan consorcios de bacterias que provocan la eliminación de tintes industriales por adsorción sobre lodos [83]. En ocasiones se pueden combinar métodos aerobios y anaerobios.

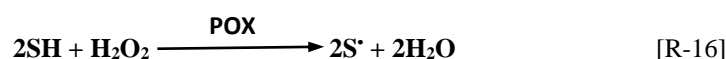
Los hongos ligninolíticos han sido microorganismos muy estudiados en la eliminación de compuestos xenobióticos. Su capacidad para degradar un compuesto complejo como la lignina ha hecho considerar a estos hongos una alternativa para la eliminación de otros compuestos de baja biodegradabilidad. Por otra parte, enzimas ligninolíticas como las peroxidasas han sido propuestas también para la degradación de tintes o colorantes sintéticos. Entre las ventajas de la utilización de enzimas como las peroxidasas frente a otro tipo de tratamiento biológico es necesario destacar que no requieren de otros componentes celulares para el desarrollo de su función, además de su elevada especificidad por sustrato. Enzimas como LiP o MnP han sido ampliamente estudiadas en los últimos años como catalizadores en la degradación de compuestos recalcitrantes [84], en concreto de tintes azo, como el Naranja Ácido II [85]. La peroxidasa de rábano picante HRP degrada ciertos compuestos recalcitrantes a través de un mecanismo de polimerización mediante radicales libres [86]. En 2002 Brunia y cols. [87] realizaron un estudio sobre la especificidad de HRP en la degradación oxidativa de tintes

sintéticos como el Azul Ramazol y Rojo Cibacron. Estos autores obtuvieron degradaciones lentas de ambos colorantes en comparación con el uso de fenol directamente como sustrato y los rendimientos más elevados se encontraron a valores de  $\text{pH} < 6.0$ . A pesar de la baja velocidad de reacción, las peroxidasas se presentan en la actualidad como firmes candidatas para catalizar este tipo de reacciones de oxidación, por las ventajas ya mencionadas con respecto a otros tratamientos biológicos.

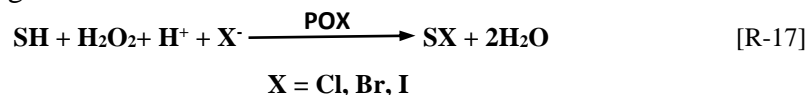
### 4.3. Síntesis orgánica

Las peroxidasas catalizan diferentes tipos de reacciones orgánicas <sup>[88]</sup>:

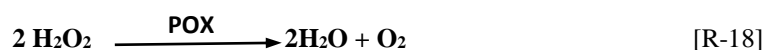
- Deshidrogenación oxidativa:



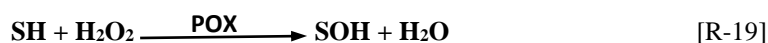
- Halogenación oxidativa:



- Dismutación del peróxido de hidrógeno:



- Reacción de transferencia de oxígeno:



Las reacciones anteriormente expuestas facilitan la síntesis de diferentes compuestos orgánicos, permitiendo además la posibilidad de llevar a cabo reacciones regio y enantioselectivas. Kim y cols. en 2003 utilizaron peroxidasa de soja para catalizar la polimerización oxidativa de cardanol. Para ello utilizaron diferentes disolventes, encontrando un 62% de rendimiento en el caso del 2-propanol <sup>[89]</sup>.

La producción de polímeros conductores ha sido el foco de muchas investigaciones recientes, dada la variedad de aplicaciones de dichos polímeros, entre las que destacan los diodos emisores de luz y protectores anticorrosivos <sup>[90]</sup>. Uno de los polímeros más estudiados es la polianilina, cuya síntesis química se lleva a cabo por polimerización del monómero anilina utilizando persulfato amónico como iniciador de la polimerización y en condiciones de baja temperatura y pH ácido <sup>[91]</sup>. En 2003 Sakharov y cols. utilizaron una peroxidasa aniónica purificada de palmera africana para llevar a cabo la síntesis de polianilina <sup>[92]</sup>.

#### **4.4. Análisis enzimático**

Las peroxidasas se utilizan en el análisis de gran variedad de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos <sup>[93, 94]</sup>.

De forma directa, la oxidación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalizada por peroxidasa permite la determinación de los diferentes tipos de sustancias (cosustratos, activadores, inhibidores) que intervienen o pueden intervenir en la reacción catalizada. Por otro lado, las reacciones catalizadas por peroxidasas se pueden acoplar a otras reacciones, tanto enzimáticas como no enzimáticas, y esto permite la determinación indirecta de cualquier tipo de sustancia que participe en un proceso en el que globalmente se produzca o se consuma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las posibilidades son enormes y de ahí deriva la extraordinaria difusión e interés de estas enzimas en el análisis químico y bioquímico. Como en otras aplicaciones, la peroxidasa más común en los procedimientos analíticos es la HRP que se utiliza tanto en disolución como inmovilizada en diferentes dispositivos (biosensores y reactores enzimáticos de diferentes tipos).

Particularmente, para el diagnóstico clínico se utilizan una amplia variedad de métodos analíticos (en sangre, suero, orina y otros fluidos) basados en la acción catalítica de la peroxidasa, normalmente acoplada a otras reacciones enzimáticas. Ese es el caso de la determinación de compuestos como glucosa, ácido úrico, colesterol, triglicéridos o creatinina. La peroxidasa se utiliza también como enzima marcadora en inmunoensayo enzimático (ELISA) <sup>[95]</sup>. Alrededor del 80 % de los ensayos inmunoenzimáticos utilizan esta enzima como marcador. El test para la detección del VIH es uno de ellos.

#### 4.5. Otras aplicaciones

Recientemente las peroxidasas han pasado a formar parte de los detergentes. Tienen como función potenciar la acción blanqueante o decolorante de los peróxidos <sup>[96, 97]</sup>.

La degradación de lignina en la industria del reciclado del papel es un paso importante para la eliminación del color marrón del mismo. Para degradarla y conseguir el blanqueo del papel se utilizan enzimas como la LiP, MnP y lacasas <sup>[98]</sup>.

La HRP ha sido considerada como alternativa en la desodorización de estiércol animal. Como consecuencia de la transformación anaerobia de los residuos animales se producen compuestos como fenoles, amonio, sulfuro de hidrógeno, ácidos grasos volátiles y mercaptanos que provocan desagradables olores <sup>[99]</sup>. La peroxidasa de rábano en presencia de peróxido consigue reducir la concentración de fenol en el estiércol en un 70% y un 45% en el caso de ácidos grasos volátiles <sup>[100]</sup>.

En la actualidad, la biomasa lignocelulósica y en especial los subproductos agroindustriales han dejado de ser productos de desecho, para convertirse en materia prima potencial para diversos procesos tanto de tipo agrícola como industrial, siendo la producción de etanol uno de los más importantes. Sin embargo, son muchas las limitaciones que se han presentado en torno a la obtención de etanol a partir de este tipo de materiales, debido a su estructura de compleja degradación. Una de las etapas en la obtención de etanol a partir de residuos agrícolas es la detoxificación, en la cuál las peroxidasas son buenas candidatas para llevar a cabo la degradación oxidativa de fenoles y aminas aromáticas <sup>[59]</sup>.

En los últimos años se presentan también las peroxidasas como enzimas con una posible aplicación en terapia cancerígena. Se ha comprobado que el ácido indol-3-acético y algunos derivados pueden ser oxidados a especies citotóxicas, en presencia de HRP como catalizador <sup>[101]</sup>. Este último campo de aplicación está aún poco desarrollado.



## Capítulo I. DETERMINACIÓN DE SARCOSINA EN ORINA





## 1. OBJETO Y FUNDAMENTO DEL TRABAJO

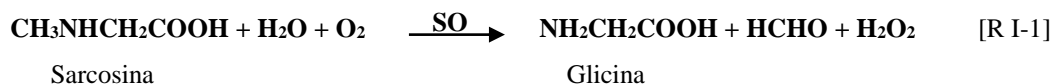
El objetivo del presente capítulo es demostrar la aplicabilidad de la peroxidasa de la planta de lenteja Rubia de la Armuña (LPP) en los métodos enzimáticos de análisis. Tomando como referencia otros procedimientos enzimáticos basados en extractos vegetales, se considera inicialmente la posibilidad de utilizar directamente el extracto de la planta de lenteja, dejando como segunda opción la separación y purificación de la LPP de este extracto como paso previo a su aplicación analítica. Como ejemplo de aplicación se propone la determinación del nivel de sarcosina en orina, parámetro con interés clínico debido a su aparente relación con el diagnóstico precoz del cáncer de próstata.

Las aplicaciones de las peroxidasas (POX) en análisis enzimático se fundamentan en la siguiente reacción, catalizada por estas enzimas.



Desde el punto de vista analítico, la oxidación por  $\text{H}_2\text{O}_2$  con medida del Sustrato(ox) producido permite la determinación directa de los diferentes tipos de sustancias que pueden intervenir en la reacción catalizada (Sustratos(red), efectores de POX).

Por otro lado, esta reacción se puede también acoplar a otras en las que se forma o consume  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La reacción R I-0 pasa a ser una reacción indicadora y la medida de la forma Sustrato(ox) permite la determinación indirecta de cualquier tipo de sustancia que participe en la reacción acoplada produciendo o consumiendo una cantidad proporcional de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La determinación de sarcosina es un ejemplo de estos procedimientos indirectos. En condiciones adecuadas, la oxidación de sarcosina, catalizada por la enzima sarcosina oxidasa (SO) origina, entre otros productos, una cantidad proporcional de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



El acoplamiento de esta reacción a la reacción indicadora R I-0 permite la determinación indirecta de sarcosina.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. PLANTA DE LENTEJA

La lenteja (*Lens culinaris*) es una planta herbácea de ciclo anual. Su aspecto recuerda a un pequeño arbusto ya que presenta ramificaciones basales tan vigorosas como el tallo del que parten <sup>[102]</sup>. En la Figura I-1 se muestra una ilustración clásica de la obra de Thomé <sup>[103]</sup> en la que se pueden apreciar algunas de las características de la planta de lenteja.

Su altura varía generalmente entre 15 y 50 cm. Es una planta con tallos y ramas cuadrangulares con nervios en los ángulos. Sus flores son típicamente papilionáceas, de 4 a 8 mm de longitud y de coloración azul pálido, púrpura, blanco o rosa <sup>[104]</sup>. Éstas se reparten por la planta en racimos formados por 1 a 4 flores <sup>[105]</sup>.

Su sistema radicular está formado por una delgada raíz principal de la que parten finas raíces secundarias. En dichas raíces puede apreciarse la presencia de nódulos, especialmente en la parte más próxima a la superficie del suelo, lo cual permite la simbiosis que establece con la bacteria *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* <sup>[106]</sup>. Esta asociación, al igual que en otras leguminosas, favorece la fijación del nitrógeno atmosférico.

El fruto es de tipo legumbre, conocido comúnmente como vaina, de forma romboidal y aplastado lateralmente, con una longitud de 6 a 20 mm. En su interior se alojan una, dos o tres semillas con forma de lente más o menos aplastada <sup>[107]</sup>. Tradicionalmente se han considerado dos tipos de lenteja, diferenciadas en el diámetro de la semilla: Macrosperma y Microsperma. El tipo Macrosperma se caracteriza por tener semillas con un diámetro comprendido entre 6 y 8 mm, grandes flores casi siempre blancas y altura de 25 a 75 cm <sup>[105]</sup>. El tipo Microsperma se distingue por presentar semillas con un diámetro máximo de 6 mm, flores pequeñas blancas o violetas y una altura que no sobrepasa los 35 cm <sup>[105]</sup>. Hasta hace poco tiempo, en España la mayoría de los tipos de lentejas cultivadas eran Macrosperma <sup>[102]</sup>.



**Figura I-1.** Planta de lenteja (Thomé, 1885).

### **Situación actual del cultivo de lenteja en Castilla y León**

El principal uso que se hace de la lenteja es en la alimentación humana. En este sentido, el tipo de lenteja y las formas de preparación, varían según las regiones. En España se consumen los tipos “Pardina”, “Verdina” y “Castellana” [108]. Su composición nutritiva, al igual que la de otras leguminosas, hace de ellas un alimento adecuado para incluirlo en la Dieta Mediterránea.

El grano seco ha sido utilizado también en alimentación animal así como la planta completa como forraje, siendo este último el uso menos extendido por existir una producción reducida en comparación con otras forrajeras y porque el mayor valor que se obtiene en su cultivo es comercializando el grano.

La lenteja está considerado un cultivo tradicional en la región de Castilla y León. Sin embargo, de todo el territorio dedicado al cultivo herbáceo tan solo un 4,8% está dedicado al cultivo de leguminosas [109]. Este hecho puede deberse principalmente a los bajos e inestables rendimientos en comparación con otros cultivos de la zona tales como los cereales.

El 90% de la superficie de lenteja cultivada en Castilla y León se encuentra bajo alguna denominación de calidad, siendo las más importantes la I.G.P. “Lenteja de la

Armuña” en Salamanca y la I.G.P. “Lenteja Pardina de Tierra de Campos”, en Valladolid y Palencia. Dichas denominaciones de calidad suponen ayudas para los cultivos y un sobreprecio del producto. Además a partir del año 2009, con la entrada en vigor del Plan Nacional para la Calidad de las Legumbres (PNCL), estas zonas con denominación de calidad resultaron claramente beneficiadas.

Actualmente, se están investigando otras posibles nuevas aplicaciones de este cultivo con objeto de aumentar su valor añadido. Ejemplo de ello son la utilización de la lenteja en la producción de extractos proteicos hidrolizados utilizados para mejorar las propiedades funcionales en la formulación de alimentos <sup>[110]</sup>, o en la preparación de productos hipoalergénicos <sup>[111]</sup>. Han sido propuestas también aplicaciones alternativas como absorbentes de metales pesados como el cobre <sup>[112]</sup> o como fuente de nitrógeno para la producción de ácido láctico en fermentaciones anaerobias <sup>[113]</sup>.

En el presente trabajo se plantea la posibilidad de revalorizar este cultivo a partir de su uso como potencial fuente de peroxidasa.

## 2.2. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS ENZIMÁTICOS CON EXTRACTOS VEGETALES

El uso de enzimas purificadas de origen vegetal como reactivos químicos o analíticos es un hecho habitual y ampliamente difundido.

Algo menos frecuente es la utilización de enzimas sin purificar, en forma de extractos brutos o de tejidos procedentes de diversas especies vegetales. Esta forma de aprovechamiento de la actividad catalítica de las enzimas está cobrando en la actualidad un considerable interés en numerosos campos ya que supone una simplificación y reducción del coste de los procesos catalíticos y a veces una mayor estabilidad de las enzimas en comparación con los preparados de enzimas purificadas.

En el campo analítico, se han propuesto algunos procedimientos enzimáticos basados en extractos o tejidos vegetales para la determinación de analitos con interés alimentario, ambiental, farmacéutico o industrial. En la Tabla I-1 se resumen los más significativos.

**Tabla I-1. Determinaciones enzimáticas con extractos vegetales.**

Analito	Enzima	Fuente	Ref.
Ácido ascórbico	ASO	Pepino, repollo , alfalfa, uva	114, 115
	POX	Calabacín	116
Ácido oxálico	OXO	Pulpa de banana, tejido de espinaca	114, 117
	AMO-Cu		
Aminas	AMO-FAD	Avena, pepino, soja, haba	114
Catecolaminas	POX	Calabacín	118
		Remolacha ,espinaca, patata, coco	114
Compuestos Fenólicos	PPO	Jackfruit	119
		Banana	95
Dopamina	PPO	Raíz de boniato	120
		Aguacate	121
L-Dopa Carbidopa Etanol	POX	Calabacín	122
	PPO	Raíz de boniato	123
Fluoruro Glutamato	ADH	Tabaco, algodón, girasol, soja, pimiento	114
		PO (inhibición)	Espárrago
Hidroquinona	L-GAD	Calabaza	114
		POX	Boniato
Metildopa Paracetamol	POX	Jengibre	93
		PPO	Raíz de boniato,
Pectinas	PPO	Aguacate, calabacín	94, 124
		PME	Tomate, naranja, limón
Peróxido de hidrógeno	POX	Espárrago, tabaco, uva	114
		Calabacín	125
Sulfito	SUO	Malva	126
Urea	UR	Soja, judía	114

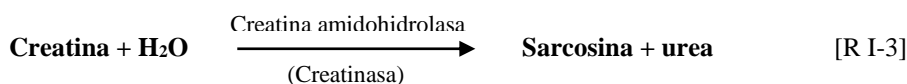
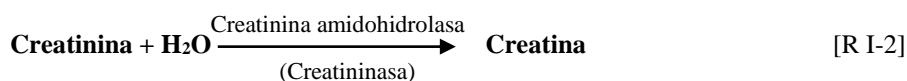
APX: Ascorbato oxidasa (EC 1.10.3.3); POX: Peroxidasa (EC 1.1.11.7); OXO: Oxalato oxidasa (EC 1.2.3.4). ADH: Alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.2); PPO: Polifenol oxidasa (EC 1.14.18.1); AMO-Cu: amina oxidasa con Cu (EC 1.4.3.6); AMO-FAD: Amina oxidasa con flavina (EC 1.5.3.3); L-GAD: L-glutamato descarboxilasa (EC 4.1.1.15); PME: Pectin metil esterasa (EC 3.1.1.11); SUO: Sulfito oxidasa (EC 1.8.3.1); UR: Ureasa (EC: 3.5.1.5).

### 2.3. SARCOSINA

La sarcosina o N-metilglicina ( $\text{CH}_3\text{NHCH}_2\text{COOH}$ ) es un aminoácido metilado que procede de la degradación de la acetilcolina. En el sistema nervioso, la acción de la colinesterasa hidroliza el neurotransmisor, liberando un aminoalcohol que es la colina. Ésta se oxida con facilidad en una sucesión de reacciones pasando del aminoalcohol a un aldehído y finalmente a un aminoácido trimetilado que es la betaína. La betaína es una fuente de metilos y participa en la ruta de regeneración, por ejemplo, de la metionina, a partir de homocisteína.

La eliminación desde la molécula de betaína de dos grupos metilos como formaldehídos y ante la intervención de las flavoproteínas, da lugar a la sarcosina y ésta por transmetilación produce el aminoácido glicina.

El nivel de sarcosina en orina de individuos sanos es 1-20  $\mu\text{mol}$  en orina de 24 h. La concentración en sangre está en torno a 0.5-2.5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  [124]. La determinación de sarcosina endógena en fluidos como sangre, plasma u orina no es habitual ya que los niveles de este compuesto son muy bajos, normalmente no detectables. Sin embargo, parámetros muy frecuentes como son los niveles de creatina y creatinina se evalúan a través de su transformación en sarcosina según las siguientes reacciones:



La determinación de creatinina es una prueba de rutina realizada diariamente en los laboratorios de análisis clínicos. La creatinina es un compuesto generado a partir de la degradación de creatina, siendo esta última un nutriente importante para los músculos. La creatinina es por tanto un producto de desecho normal del metabolismo de los músculos, que el cuerpo produce habitualmente en un nivel constante que depende de la masa muscular y que es filtrada por los riñones y excretada por la orina.

El incremento de la concentración de sarcosina en sangre (sarcosinemia) y en orina (sarcosinuria) parece estar relacionado con una rara malformación congénita asociada a retraso mental y a diversos trastornos neurológicos [125]. De hecho, la sarcosina se utiliza en el tratamiento de enfermedades mentales como la esquizofrenia.

Sarcosinemia y sarcosinuria son aparentemente una condición autosómica recesiva producida en origen por una deficiencia de sarcosina deshidrogenasa <sup>[126]</sup>, una enzima que se encuentra en la matriz mitocondrial y que cataliza la conversión de sarcosina en glicina. Las concentraciones se elevan hasta 200-300  $\mu\text{mol L}^{-1}$  en sangre y se puede llegar a los 5420  $\mu\text{mol}$  en la orina de 24 h <sup>[127, 128]</sup>.

### 2.3.1. Sarcosina y cáncer de próstata

Aunque la relación del nivel de sarcosina con las enfermedades mentales presenta un considerable interés, la elección de este aminoácido como analito en el presente trabajo ha tenido una motivación basada en hechos mucho más recientes. Trabajos publicados en 2009 <sup>[129]</sup> describen una aparente relación entre el metabolito sarcosina y el cáncer de próstata. En estos trabajos se pone de manifiesto la existencia de un fuerte incremento de la concentración de sarcosina durante la progresión del cáncer de próstata hasta la metástasis. Este incremento es elevado en muestras de tejido y más modesto aunque significativo en muestras de orina (sedimento y sobrenadante). Analizando 1126 metabolitos diferentes en 262 muestras clínicas (42 muestras de tejido epitelial, 110 de orina y 110 de plasma) de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata, se observa un aumento de la concentración de algunos de ellos como la sarcosina, uracilo, quinurenina, glicerol-3-fosfato, leucina y prolina. Más aún, en los trabajos se concluye que durante la progresión del cáncer de próstata hacia el estado metastático hay un incremento en el metabolismo de ciertos aminoácidos, existiendo un aumento en la actividad metiltransferasa en los tejidos con metástasis.

En relación con los niveles de sarcosina, se observa que el incremento de concentración está en torno al 79% en el caso de muestras de pacientes con metástasis y es del orden del 42% en pacientes con cáncer de próstata en estadio temprano.

De todo lo expuesto, se deduce que los niveles de sarcosina no sólo parecen estar relacionados con la presencia del cáncer sino que además pueden servir para monitorizar su progresión y diagnosticar su agresividad.

Sin embargo, publicaciones más actuales <sup>[130, 131, 132]</sup> ponen en duda, e incluso rebaten la validez de la sarcosina como indicador del cáncer de próstata. En trabajos realizados con 106 individuos enfermos y 33 sanos, los autores de estos trabajos no aprecian diferencias significativas en el nivel de sarcosina de ambos grupos, encontrando



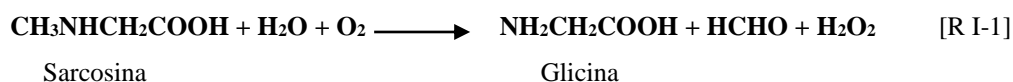
incluso un valor medio menor en los enfermos ( $6.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) que en los sanos ( $9.6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ).

La polémica acerca de la validez de la sarcosina como biomarcador del cáncer de próstata está aún en el aire. Más allá de entrar a valorar estas discusiones de tipo médico, parece interesante disponer de un método rápido y de bajo coste que permita cuantificar el contenido de sarcosina de forma no invasiva para el paciente, que resultaría de gran utilidad si se demuestra la validez de la sarcosina como marcador tumoral y se propone en sustitución del actual marcador PSA (Prostate Specific Antigen).

### 2.3.2. Métodos de determinación

La determinación de sarcosina endógena en fluidos como sangre, plasma u orina no es habitual ya que los niveles de este compuesto son muy bajos, normalmente no detectables. En la evaluación de los niveles de creatina y creatinina mediante su transformación en sarcosina se alcanzan concentraciones de ésta en torno a  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ .

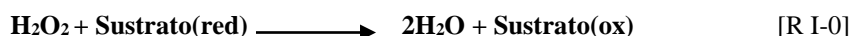
La mayor parte de los métodos de determinación de sarcosina se basan en la reacción de oxidación de la sarcosina, catalizada por la enzima sarcosina oxidasa (SO, EC 1.5.3.1) (RI-1).



La enzima SO cataliza la oxidación de sarcosina con oxígeno, formándose glicina, formaldehído y peróxido de hidrógeno.

Una parte de los métodos se basan en la reducción y medida amperométrica del  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado. Los procedimientos más recientes <sup>[133, 134]</sup> utilizan SO inmovilizada en diferentes electrodos de trabajo (biosensores amperométricos). También se utiliza la medida del formaldehído producido. Éste se hace reaccionar con acetilacetona o compuestos similares en presencia de amonio (reacción de Hantzsch) y se miden los productos resultantes por espectrofotometría o fluorimetría <sup>[135]</sup>.

Finalmente, en el grupo de métodos más utilizados, la reacción RI-1 se acopla con otras catalizadas por una peroxidasa de forma que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado se hace reaccionar con un sustrato adecuado midiéndose el color o la intensidad de fluorescencia de los productos de reacción (RI-0).



Se utilizan una gran variedad de sustratos, algunos de ellos mezclados con potenciadores del color. En la Tabla I-2 se muestran los más habituales.

En los últimos años se pueden encontrar en la bibliografía nuevos métodos de determinación de sarcosina. Entre ellos puede destacarse la utilización de cromatografía iónica <sup>[136]</sup>, nuevos biosensores amperométricos de sarcosina oxidasa inmovilizada <sup>[137]</sup> y alguna aplicación de nanotecnología que persigue el objetivo de imitar la catálisis enzimática de las peroxidasas <sup>[138]</sup> y que utiliza detección colorimétrica.

Las determinaciones de sarcosina no enzimáticas son escasas. Puede determinarse por cromatografía, según los métodos habituales para el análisis de aminoácidos, lo que incluye diferentes procesos de derivatización pre-columna con *o*-ftaldehído (OPA) o post-columna con ninhidrina y detección colorimétrica, fluorimétrica o por espectrometría de masas <sup>[139]</sup>. Bellon y Lundy <sup>[124]</sup> han determinado sarcosina en orina y suero mediante cromatografía en capa fina previa derivatización con OPA y NBD-Cl (7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol). Struys et al. <sup>[140]</sup> determinan sarcosina mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas utilizando sarcosina marcada con isótopos estables como patrón interno. Finalmente, el contenido de sarcosina en orina ha sido evaluado mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, previa separación por extracción en fase sólida y derivatización <sup>[129, 141, 142]</sup>.

**Tabla I-2. Sustratos habituales para la determinación de sarcosina a través de la reacción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalizada por peroxidadasas.**

Sustrato	Detección
Fenol (+ 4-AAP)	Colorimétrica (480 nm)
Pirogalol	Colorimétrica (420 nm)
Guayacol	Colorimétrica ( 436-470 nm)
ABTS	Colorimétrica (420 nm)
OPD	Colorimétrica (492 nm)
TMB	Colorimétrica (450 nm)
5-ASA (+ 4-AAP)	Colorimétrica (450 nm)
2,4-DCP (+ 4-AAP)	Colorimétrica (510 nm)
DMA (+ 4-AAP)	Colorimétrica (565 nm)
DMT (+ 4-AAP)	Colorimétrica (545 nm)
ESPMT (4-AAP)	Colorimétrica (545 nm)
TBHBA (+ 4-AAP)	Colorimétrica (515 - 630 nm)
TIHBA (+ 4-AAP o 4-APH)	Colorimétrica (515 - 630 nm)
HMMPS (+ 4-AAP)	Colorimétrica (600-700 nm)
DDF	Fluorimétrica ( $\lambda_{ex}$ : 337; $\lambda_{em}$ : 517)

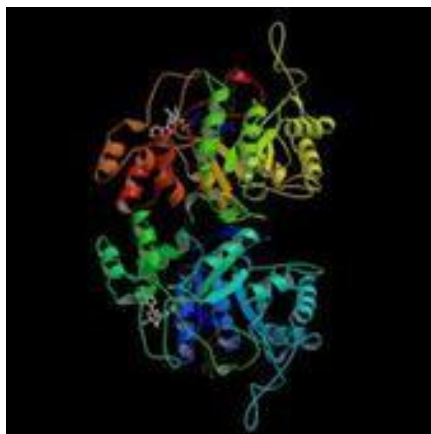
4-AAP: 4-aminoantipirina; ABTS: sal amónica del ácido 2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico); 5-ASA: ácido 5-aminosalicílico; 2,4-DCP: 2,4- diclorofenol; DDF: diacetildiclorofluoresceína; DMA: N,N-dimetilanilina; DMT: N,Ndietyl- m-toluidina; ESPMT: N-etil-N-sulfopropil-m-toluidina; HMMPS: N-(3- sulfopropil)-3-metoxi-5-metil-anilina; OPD: 1,2-fenilendiamina; TBHBA: ácido 2,4,6- tribromo-3-hidroxibenzoico; TIHBA: ácido 2,4,6-triiodo-3-hidroxibenzoico; TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.

## 2.4. SARCOSINA OXIDASA

La sarcosina oxidasa (SO, EC 1.5.3.1) es una flavoproteína que, como se ha visto, cataliza la oxidación de sarcosina para dar glicina, formaldehído y peróxido de hidrógeno <sup>[143]</sup>. Se purificó por primera vez a partir de *Corynebacterium sp.* U-96, obteniéndose una enzima heterotetramérica, con cuatro subunidades diferentes:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  con masas de 110.000, 44.000, 21.000 y 10.000 Da, respectivamente <sup>[144]</sup>.

También se han obtenido enzimas tetrámeras a partir de *Corynebacterium sp.* P-1 <sup>[145]</sup>, *Arthrobacter urefaciens* <sup>[146]</sup> y *Arthrobacter sp.* 1-IN <sup>[147]</sup>.

En la Figura I-2 se muestra la estructura de la SO-U96. La subunidad  $\beta$  contiene flavín cofactores (un FAD no covalente y un FMN covalente) y una dimetilglicina. La subunidad  $\delta$  contiene un átomo de Zn. Se cree que el centro activo de la enzima se encuentra en la subunidad  $\beta$  y que se establece un flujo de electrones desde la sarcosina hasta el oxígeno siguiendo la siguiente secuencia:



**Figura I-2.** Vista en tres dimensiones de la estructura de la SO-U96.

La SO en disolución presenta máxima actividad catalítica en el intervalo de pH de 8 a 9 <sup>[148]</sup>. El comportamiento frente a la temperatura es normal: la actividad aumenta con la temperatura y es máxima en torno a los 37-39 °C, disminuyendo rápidamente a temperaturas superiores debido a la desnaturalización de la enzima <sup>[148]</sup>.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. REACTIVOS, APARATOS Y MATERIAL

##### 3.1.1. Reactivos

- Ácido bórico,  $H_3BO_3$ , 99,5 %, P.A (Panreac).
- Dihidrógeno fosfato sódico monohidratado,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , P.A., 98%, (Panreac).
- Ácido acético glacial,  $CH_3COOH$ , P.A., 99,5-100,5 % (Panreac).
- Guayacol, 2-metoxifenol ( $CH_3OC_6H_4OH$ ), 98 %, PRS (Panreac).
- Polietilenglicol (PEG)10000,  $HO(C_2H_4O)_n H$ , reactivo para síntesis (Merck).
- Sulfato amónico,  $(NH_4)_2 SO_4$ , 98,5 %, PRS, (Panreac).
- Hidróxido sódico,  $NaOH$ , 98,0-100,5 %, PRS, (Panreac).
- 4-aminoantipirina (4-AAP),  $C_{11}H_{13}N_3O$ , (Sigma-Aldrich).
- Sarcosina,  $C_3H_7NO_2$ , (Sigma-Ultra).
- Ácido 2,4,6-tribromo-3-hidroxibenzoico (TBHBA),  $C_7H_3Br_3O_3$ , 97 % (Sigma-Aldrich).
- Sarcosina oxidasa (SO), EC 1.5.3.1), de *Bacillus sp.*, 49 U  $mg^{-1}$  (Sigma-Aldrich).
- Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), 30 % p/v, P.A, (Panreac).
- Ácido clorhídrico (HCl), 35 % p/v, P.A., (Panreac).
- 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB ),  $[C_6H_2(CH_3)_2NH_2]_2$ , >90 %. (Sigma- Aldrich).

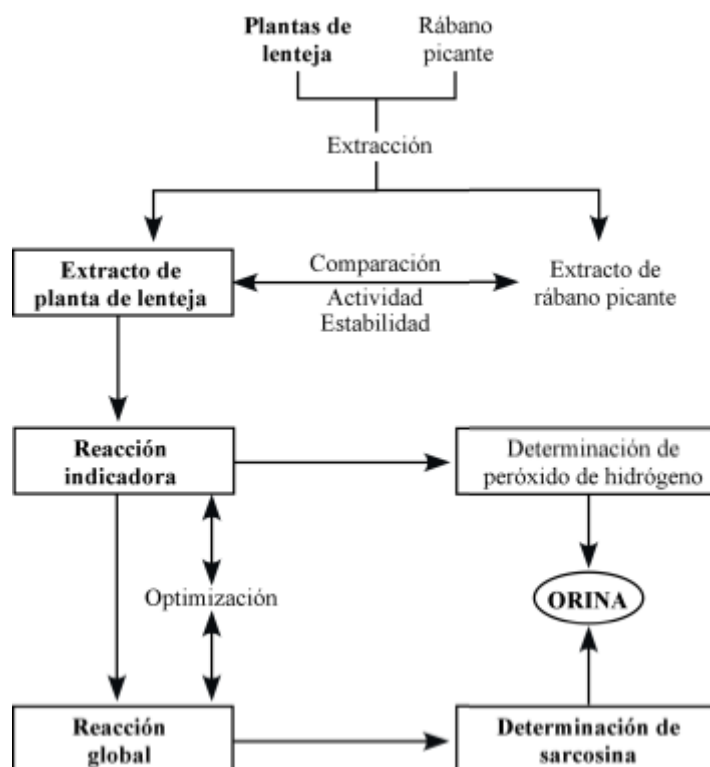
##### 3.1.2. Aparatos y material

- Espectrofotómetro Beckman UV/VIS Dn-7 con cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico (Hellma). Intervalo 190-800nm, con precisión de 0,2 nm.
- Espectrofotómetro de doble haz Hitachi 15C-20 con cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico (Hellma).
- Lector de placas Biorad Model 680 con agitación, control de temperatura y filtros de longitudes de onda de 405, 415, 475, 490 y 655 nm. Placas Biorad de 96 pocillos (12x8). La adquisición de datos se hizo con ordenador a través de la aplicación Microplate Manager Software (Bio-Rad) y el posterior tratamiento con Microsoft Excel y Simfit (<http://www.simfit.man.ac.uk>).

- pH-metros Crison micro 2001 y Mettler Toledo SevenEasy.
- Trituradora-picadora Moulinette (Moulinex)
- Frigoríficos (4 °C) y congeladores (-20 ° C y -80 °C)
- Agitador orbital Rotabit (Selecta) con controlador electrónico de velocidad.
- Micropipetas electrónicas Proline® (Biohit) 50-1000 y 500-5000 µL.
- Micropipeta Biopette E® (Labnet) de 10 a 200 µL, 8 puntas.
- Centrífuga 8000 rpm (Selecta).
- Centrífuga 20000 rpm (Sorvall).
- Baño termostático con recirculación (Selecta).
- Material de uso frecuente en el laboratorio.

## 3.2. PLAN EXPERIMENTAL

Los diferentes experimentos realizados se desarrollaron siguiendo el plan que se muestra a continuación (los detalles de las diferentes etapas que se mencionan se describen en los apartados subsiguientes):



Tras la toma de muestra, las plantas de lenteja trituradas se someten a uno de los procesos de extracción de peroxidasas descritos en bibliografía <sup>[149]</sup> y ya utilizado en trabajos anteriores. Con fines comparativos, se aplica el mismo proceso de extracción a muestras trituradas de rábano picante y se mide y compara la actividad peroxidasa de los extractos de ambos vegetales y su estabilidad con el tiempo, utilizando guayacol como sustrato.

A continuación, utilizando directamente el extracto de lenteja como disolución de peroxidasa, se procede a elegir una reacción indicadora (reacción R I-0) adecuada y a la optimización de las condiciones de esta reacción, teniendo como fin la cuantificación de peróxido de hidrógeno para su posterior aplicación a la cuantificación indirecta de sarcosina. Se ensayan diferentes sustratos y se estudia el efecto de algunas variables



importantes (pH, temperatura, concentraciones de sustrato y enzima) en la reacción indicadora. Como resultado de estos estudios se propone un procedimiento para la cuantificación de peróxido de hidrógeno que es aplicado a la determinación de este compuesto en muestras de orina.

Finalmente, se estudia y optimiza la reacción global (reacción indicadora elegida acoplada a la oxidación de sarcosina). Como resultado de los estudios se propone un procedimiento para la cuantificación de sarcosina que es aplicado a la determinación de este compuesto en muestras de orina.

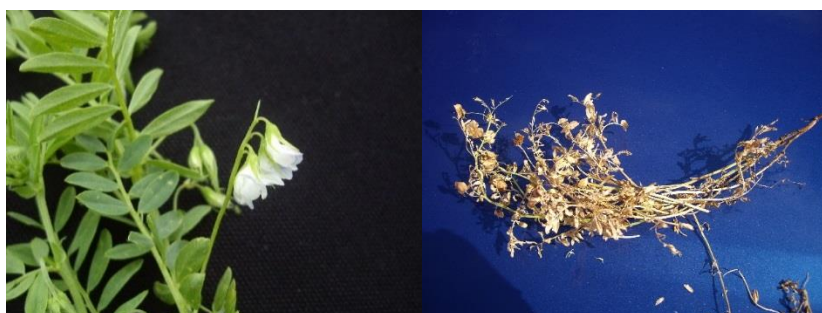
### 3.3. TOMA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Con el asesoramiento de agricultores y del Consejo Regulador de la I.G.P. lenteja de la Armuña se tomaron muestras de planta de lenteja antes, durante y después de la recolección de las cosechas.

La toma de muestra se realizó personalmente por miembros del equipo de trabajo. Para ello se tomaron de 100 a 500 g de cada muestra en bolsas etiquetadas y precintadas que se transportaron en neveras portátiles a 4 °C hasta el laboratorio donde se almacenaron a -80°C. En la Tabla I-3 se detallan los datos de muestreo y conservación de las muestras de lenteja utilizadas. En la Figura I-3 se muestra la planta de lenteja, en flor y tras la cosecha. La Figura I-4 permite apreciar la dimensión de los residuos que se generan en una plantación de lenteja tras la recolección. El rábano picante fue importado (22/11/09) desde Kartmp (Palau, Austria) y conservado a -80 °C.

**Tabla I-3. Muestreo y conservación de la planta de lenteja Rubia de la Armuña.**

Muestra	Descripción	Fecha	Origen	Conservación
Lenteja	Planta verde	05/07/09	I.G.P. La Armuña	-80°C
	Planta en flor	30/04/09		
	Trillada	05/07/09		



**FIGURA I-3**  
**Plantas de lenteja en flor y trillada.**



**FIGURA I-4**  
**Residuos generados tras la cosecha de la lenteja Rubia de La Armuña.**

### 3.4. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Considerando los resultados de trabajos anteriores, se ha utilizado un procedimiento de extracción con agua y polietilenglicol (PEG) <sup>[149]</sup>.

La materia vegetal (planta de lenteja o raíz de rábano picante) se corta en trozos de 2-3 cm de longitud y se tritura. Partiendo de 25.0 g de muestra triturada, se llevan a cabo dos etapas. En la primera, se extraen las proteínas solubles en agua. Para ello, a la muestra triturada se le añade 125 mL de agua destilada, se incuba durante 24 h, se filtra y se centrifuga (10 min a 10000 rpm), recogándose el sobrenadante. A esta disolución se le denomina **Crudo I**.

En la segunda etapa, se separan los compuestos fenólicos que se han extraído junto con las proteínas. Para ello, al Crudo I se le añade primero PEG, poco a poco y con agitación continua hasta alcanzar una concentración del 14 % p/v. A continuación y de la misma forma se añade  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta concentración del 10 % p/v y se deja decantar en embudo de decantación durante 24 h. Al cabo de este tiempo se observan dos fases: la fase superior contiene el PEG y la mayor parte de los compuestos fenólicos, mientras que la fase inferior es acuosa y en ella se encuentra la peroxidasa. Una vez efectuada la decantación, la fase acuosa se centrifuga a 10000 rpm durante 10 min y se recoge el sobrenadante. A esta disolución se le denomina **Crudo II**.

### 3.5. COMPARACIÓN CON LA PEROXIDASA DE RÁBANO PICANTE

Para la medida de la actividad peroxidasa de los extractos de planta de lenteja y raíz de rábano picante se utilizaron  $\text{H}_2\text{O}_2$  y guayacol como cosustratos, y se siguió el procedimiento de trabajos anteriores <sup>[149, 150]</sup>: en la cubeta de un espectrofotómetro se colocan 2.0 mL de reactivo ( $\text{H}_2\text{O}_2$   $5.0 \times 10^{-3}$  M y guayacol  $1.8 \times 10^{-2}$  M en tampón fosfato 0.020 M a pH 6.0) junto con 20  $\mu\text{L}$  del extracto, diluido adecuadamente si es necesario. Se agita suavemente para favorecer la mezcla y se mide el incremento de absorbancia a 470 nm durante 2 min ( $\Delta A$ ). Se efectúa un ensayo en blanco con 2.0 mL de reactivo y 20  $\mu\text{L}$  de agua destilada. La temperatura se mantiene a 25 °C. La actividad en unidades por mL de extracto ( $\text{U mL}^{-1}$ ) se calcula según se indica a continuación, a partir del  $\Delta A$  neto, una vez descontado el valor del blanco.

$$\text{Actividad (U mL}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta A}{2 \text{ min}} \frac{2.02 \times 10^{-3} \text{ L } 10^6 \mu\text{mol mol}^{-1}}{1 \text{ cm } 5200 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \frac{1}{0.020 \text{ mL}}$$

Unidad de actividad peroxidasa, U: oxidación de 1  $\mu$  mol de guayacol por minuto

Para guayacol,  $\epsilon_{470}$ : 5200 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> [146]

Volumen total en cubeta: 2,020x10<sup>-3</sup> L

Se comparó la actividad peroxidasa de los extractos frescos de lenteja y rábano picante así como el mantenimiento de la actividad con el tiempo de almacenamiento. De forma preliminar y para establecer si la comparación de actividad (medidas a pH 6.0, con guayacol como sustrato) era o no significativa, se estudió el efecto del pH en la actividad de los diferentes extractos. En la Figura I-5, se observa que ambos extractos presentan un pH de máxima actividad común y próximo a 6.0. La comparación de actividades, medidas según se ha indicado anteriormente sí es, por tanto significativa. En la Tabla I-4 se detallan las actividades en U mL<sup>-1</sup> de los extractos Crudo I y Crudo II de las diferentes muestras de lenteja recolectadas y del rábano picante. El extracto obtenido a partir de planta de lenteja verde y en flor presenta una actividad muy superior a la del extracto de rábano picante obtenido en las mismas condiciones. El extracto obtenido a partir de planta de lenteja trillada, residuo generado en la cosecha de la lenteja, es similar al del extracto de rábano picante.

Por otro lado, se estudió la estabilidad de los extractos, es decir la evolución de su actividad con el tiempo. Para ello, se midió la actividad de los extractos tras diferentes períodos de almacenamiento en frigorífico a 4°C. Después de 6 meses, el Crudo II de lenteja conserva un 90% de su actividad inicial, tanto para la planta verde como para la trillada. En el caso del extracto de rábano picante, tras 6 meses de almacenamiento la actividad del Crudo II es sólo del 68 %. Al cabo de 15 meses, la actividad del Crudo II de lenteja disminuye hasta el 86 % de la inicial. Por tanto, el extracto obtenido a partir de la planta verde de lenteja Rubia de la Armuña presenta no sólo una mayor actividad peroxidasa que el obtenido a partir de rábano picante, sino también una mayor estabilidad en las condiciones de almacenamiento. El extracto de planta de lenteja trillada, a pesar de no observarse diferencias significativas en la actividad enzimática, sí presenta una mayor estabilidad con el tiempo en comparación con el extracto obtenido a partir de la raíz del rábano picante. En el resto de experimentos de este capítulo, se decidió trabajar con el extracto de la planta verde por presentar la mayor actividad peroxidasa.

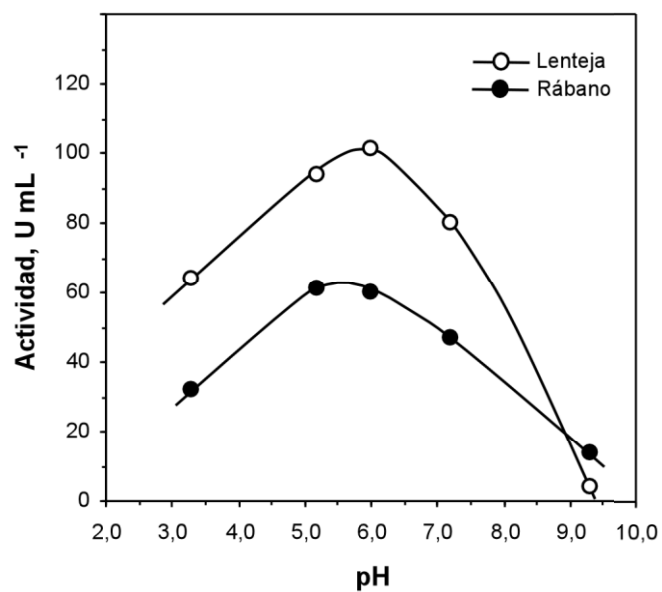


FIGURA I-5

Variación de la actividad peroxidasa con el pH en el extracto Crudo II.

Tabla I-4. Actividad en los extractos de lenteja y rábano.

Muestra	Descripción	Actividad*, U mL <sup>-1</sup>	
		Crudo I	Crudo II
Lenteja	Planta verde	53	113
	Planta en flor	60	132
	Trillada	22	52
Rábano picante	Raíz	29	60

\*: Media de tres determinaciones

### 3.6. REACCIÓN INDICADORA

En el estudio de la reacción indicadora se consideró la elección de un sustrato adecuado y el efecto de variables significativas.

#### 3.6.1. Elección de sustrato y efecto del pH

Por su rapidez y sensibilidad, el procedimiento descrito para la medida de la actividad peroxidasa utilizando guayacol y  $H_2O_2$  como cosustratos, es uno de los utilizados habitualmente para la medida de la actividad peroxidasa o para cuantificaciones indirectas basadas en la medida del  $H_2O_2$  generado en otras reacciones enzimáticas acopladas.

Sin embargo, la elevada volatilidad del guayacol y su olor penetrante hacen que la aplicación continuada de la reacción resulte una actividad molesta y potencialmente no exenta de riesgo. Por esta razón, para la determinación de  $H_2O_2$  y para su posterior acoplamiento a la determinación de sarcosina se decidió sustituir el guayacol por otro sustrato más inocuo.

Se realizaron pruebas con sustratos habituales de peroxidasa aparte del guayacol. El estudio se centró en establecer el perfil de actividad de la peroxidasa de lenteja en función del pH. Uno de los criterios de mayor peso para llevar a cabo la elección del sustrato de la reacción indicadora fue la proximidad del pH óptimo con cada uno de los sustratos estudiados y el pH óptimo de actividad de la sarcosina oxidasa.

Como posibles sustratos de la reacción indicadora se evaluaron el TMB (3,3,5,5'-tetrametilbenzidina) y la mezcla de 4-AAP (4-aminoantipirina) y TBHBA (2,4,6-tribromo-3-hidroxibenzoico).

Según trabajos publicados <sup>[151, 152, 153]</sup>, el TMB en presencia de  $H_2O_2$  y de peroxidasa origina un compuesto azul con máximos de absorbancia a 655 y 370 nm que permiten el seguimiento espectrofotométrico de la reacción enzimática.

A  $pH > 2$ , la magnitud y posición de estos máximos es independiente del pH, pero en medios fuertemente ácidos ( $pH < 1$ ) las disoluciones azules se vuelven amarillas y sus espectros de absorción presentan un único máximo a 450 nm, con mayor coeficiente de absorptividad que los anteriores. Este comportamiento se aprovecha para mejorar la

sensibilidad en determinaciones basadas en medidas a tiempo prefijado. Primero se desarrolla la reacción enzimática a un pH adecuado. Después, a un tiempo prefijado, se añade un exceso de ácido que provoca la parada de la reacción y el cambio de color de azul a amarillo, efectuándose entonces las medidas a 450 nm.

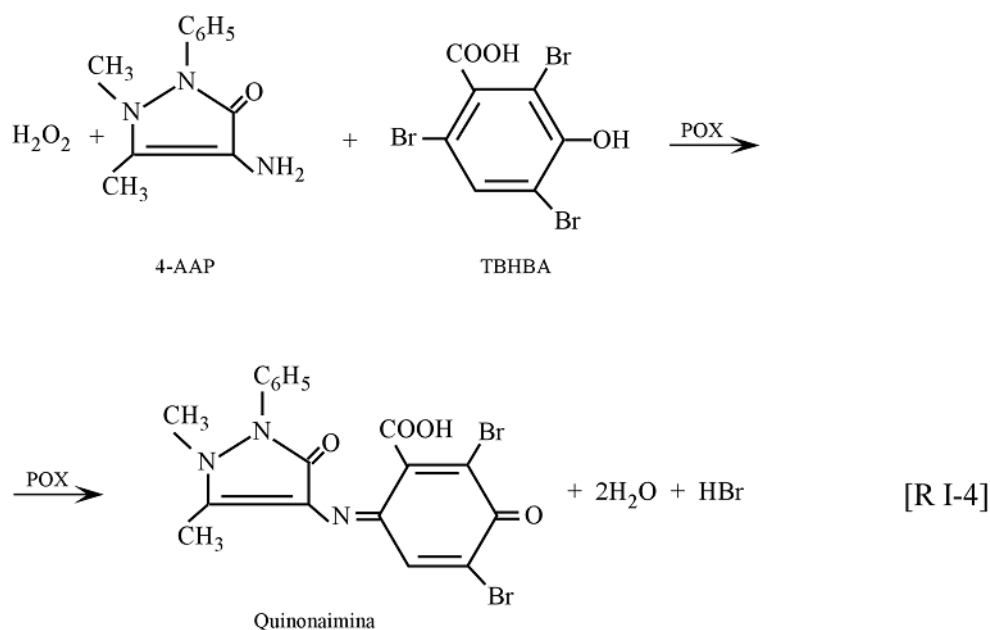
En una serie de tubos de ensayo se colocaron 4 mL de tampón universal con pH comprendido entre 2.2 y 9.3. En cada tubo se añadieron 2 ml de TMB  $5 \times 10^{-3}$  M (en etanol), 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $8.8 \times 10^{-4}$  M y 2 mL de una disolución preparada por dilución 1:10 del extracto Crudo II.

Con cada uno de los tubos, la disolución recién preparada se pasó a la cubeta de un espectrofotómetro y se registró el espectro de absorción entre 700 y 300 nm, repitiendo el espectro a intervalos de 5 minutos durante una hora. El aumento de absorbancia a 370 o a 655nm con el tiempo se tomó como medida de la actividad peroxidasa.

La máxima actividad se observó en los tubos con pH en torno a 4, mientras que a pH 2.2 y superiores a 8, no se apreció evolución alguna de la reacción. El hecho de que la máxima actividad se observara a valores de pH relativamente ácidos, podría deberse a la baja solubilidad y a la inestabilidad del TMB en medios acuosos poco ácidos <sup>[154]</sup>. En cualquier caso, el pH de máxima actividad estaba demasiado alejado del pH óptimo descrito para la actividad catalítica de la sarcosina oxidasa (pH 8), y esto llevó a descartar el TMB como sustrato de la reacción indicadora.

Descartado el TMB, se pasó a considerar la posible utilización de la mezcla de 4-aminoantipirina (4-AAP) con un derivado fenólico, en este caso el ácido 2, 4, 6-tribromo-3-hidroxibenzoico (TBHBA), mezcla que es también uno de los reactivos frecuentes en los ensayos con peroxidases (Tabla I-2).

TBHBA y 4-AAP originan un compuesto de condensación que en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de peroxidasa se oxida dando lugar a un compuesto coloreado, una quinonaimina, con un máximo de absorbancia en torno a 510 nm (reacción R I-4). Las medidas a esta longitud de onda hacen posible el seguimiento espectrofotométrico de esta reacción enzimática o de otras acopladas a ella.



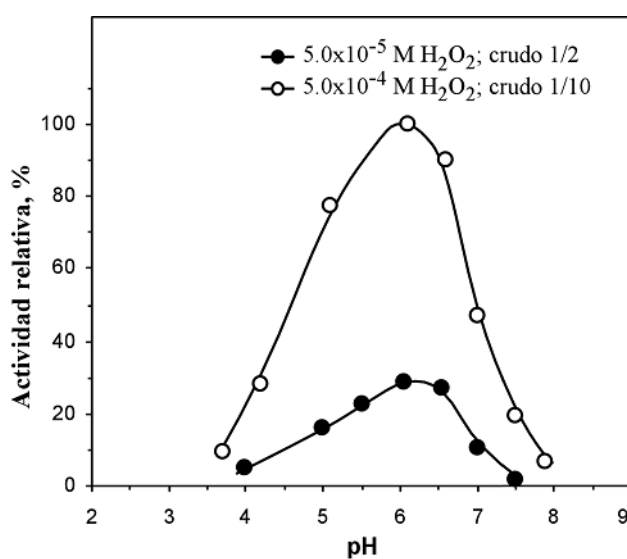
Como en el caso del TMB, se estudió el pH de máxima actividad en la reacción de oxidación. El estudio se llevó a cabo con el lector de placas Biorad 680, efectuando las medidas con el filtro de 490 nm, el más próximo a los 510 nm del máximo de absorbancia del producto de reacción. Se efectuaron experimentos en el intervalo de pH de 3 a 9, aproximadamente, con tampón universal 0.030 M. Para cada experimento se utilizó un pocillo de la placa en el que se mezclaron en este orden: 200  $\mu\text{l}$  de tampón, 10  $\mu\text{l}$  de una disolución de 4-AAP  $3.8 \times 10^{-2}$  M, 25  $\mu\text{l}$  de una disolución de TBHBA  $2.0 \times 10^{-2}$  M, 10  $\mu\text{l}$  de una disolución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1.3 \times 10^{-2}$  o  $1.3 \times 10^{-3}$  M) y 10  $\mu\text{l}$  del Crudo II diluido 1/10 o 1/2.

Las disoluciones de 4-AAP, TBHBA y  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la dilución del Crudo II se prepararon en tampón universal al pH de cada experimento. Para cada valor de pH se efectuó un experimento en blanco sustituyendo la disolución de Crudo II por el mismo volumen de tampón. En todos los casos se efectuaron 8 réplicas, dispuestas según las columnas de la placa y realizando las adiciones simultáneamente mediante la micropipeta multicanal de 8 puntas. La temperatura de la placa se ajustó a 37 °C. Tras un período de agitación/mezcla de 5 s, se midió la evolución de la absorbancia durante 3 minutos, a intervalos de 20 s. Una vez representados los valores de absorbancia frente al tiempo, se



tomó como medida de la actividad enzimática el valor medio de la pendiente ( $\Delta A/\text{tiempo}$ ) de las rectas ajustadas.

Los resultados indicaron que la actividad catalítica de la peroxidasa de lenteja Rubia de la Armuña en la oxidación de 4-AAP/TBHBA con  $\text{H}_2\text{O}_2$  es máxima a valores de pH próximos a 6, tal como puede observarse en la Figura I-6. Teniendo en cuenta la relativa proximidad de este pH con el de máxima actividad de la enzima sarcosina oxidasa (pH 8.0) así como la buena solubilidad de los reactivos utilizados y la estabilidad de sus disoluciones, se decidió utilizar esta reacción como reacción indicadora en la determinación espectrofotométrica de peróxido de hidrógeno. Todos los posteriores experimentos con esta reacción se llevaron a cabo a pH 6.0.



**FIGURA I-6**

**Efecto del pH en la reacción indicadora (R I-4).**

En pocillo: TBHBA:  $2.0 \times 10^{-3}$  M; 4-AAP:  $1.5 \times 10^{-3}$  M; T: 37 °C

### 3.6.2. Efecto de otras variables en la reacción indicadora

Una vez establecido el pH de máxima actividad, se pasó a estudiar el efecto de las siguientes variables:

- Temperatura
- Concentración de TBHBA
- Concentración de 4-AAP
- Concentración de peroxidasa
- Concentración de peróxido de hidrógeno

Todos los estudios se llevaron a cabo en el lector de placas Biorad 680, efectuando las medidas a 490 nm y con la temperatura de las placas ajustada a 37 °C, excepto en el caso del estudio variando la temperatura. Se utilizaron disoluciones independientes de TBHBA, 4-AAP, peroxidasa y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de concentración variable, todas ellas preparadas en tampón universal 0.030 M de pH 6.0. Para cada experimento se utilizó un pocillo de la placa en el que se mezclaron volúmenes fijos de las diferentes disoluciones, según la siguiente secuencia:

- 200 µl de tampón
- 25 µl de disolución de TBHBA
- 10 µl disolución de 4-AAP
- 10 µl de disolución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 10 µl disolución de extracto con peroxidasa

En los experimentos en blanco se sustituyó la disolución de la variable estudiada por el mismo volumen de tampón. En todos los casos se efectuaron 8 réplicas, dispuestas según las columnas de la placa y realizando las adiciones simultáneamente mediante la micropipeta multicanal de 8 puntas. Tras un período de agitación/mezcla de 5 s, se midió la evolución de la absorbancia durante 3 minutos, a intervalos de 20 s. Una vez representados los valores de absorbancia frente al tiempo, se tomó como medida de la actividad enzimática el valor medio de la pendiente ( $\Delta A/\text{tiempo}$ ) de las rectas ajustadas.

El efecto de la temperatura se estudió entre 25 y 45°C (Figura I-7). Al igual que ocurre en otras muchas enzimas que se encuentran en vegetales o animales, la actividad peroxidasa aumenta progresivamente hasta alcanzar un máximo a 37°C, y decae después

debido probablemente a procesos de desnaturalización de la proteína. Se tomó por tanto el valor de 37°C como óptimo para llevar a cabo la reacción indicadora y será el que se utilice en los experimentos posteriores.

Para el estudio del efecto de la concentración de TBHBA, el contenido de las disoluciones de trabajo se ajustó de forma que la concentración de este compuesto tras la mezcla se varió entre  $1.0 \times 10^{-4}$  y  $1.1 \times 10^{-2}$  M. Se utilizó el extracto Crudo II diluido 1/2 y la concentración de  $H_2O_2$  resultante en el pocillo fue  $5.0 \times 10^{-5}$  M. El estudio se realizó a dos concentraciones diferentes de 4-AAP. En la Figura I-8 se observa que la actividad peroxidasa en la reacción indicadora presenta un máximo a concentraciones de TBHBA próximas a  $2 \times 10^{-3}$  M, cuando la concentración de 4-AAP es de  $1.5 \times 10^{-3}$  M. En el caso de concentraciones menores de 4-AAP, como es el caso de  $7.5 \times 10^{-4}$  M, el máximo en la actividad peroxidasa se alcanza para valores de la concentración de TBHBA próximos a  $1 \times 10^{-3}$  M. Por encima de estas concentraciones decrece gradualmente. El hecho de obtener los mayores valores de actividad en concentraciones de TBHBA similares a la de 4-AAP puede explicarse si se tienen en cuenta procesos competitivos de dimerización de TBHBA <sup>[155]</sup>, que adquieren mayor importancia cuanto mayor es el exceso de reactivo. Se consideró  $2 \times 10^{-3}$  M como concentración óptima de TBHBA.

A continuación, el contenido de las disoluciones de trabajo se ajustó de forma que la concentración de 4-AAP en el pocillo se varió entre  $1.0 \times 10^{-4}$  y  $3.5 \times 10^{-3}$  M. En todos los casos se utilizó igualmente el extracto Crudo II diluido 1/2 y las concentraciones resultantes de TBHBA y  $H_2O_2$  fueron  $2.0 \times 10^{-3}$  M y  $5.0 \times 10^{-5}$  M, respectivamente. En lugar de sufrir una disminución acusada como en el caso anterior, la actividad parece estabilizarse cuando la concentración de 4-AAP es igual o ligeramente superior a la del TBHBA. El máximo en la actividad se presenta a concentraciones de 4-AAP entre  $1.5 \times 10^{-3}$  y  $3.0 \times 10^{-3}$  M, tal como se muestra en la Figura I-9. Para todos los experimentos posteriores,  $1.5 \times 10^{-3}$  M fue elegida como concentración óptima de 4-AAP.

El efecto de diferentes concentraciones del extracto de peroxidasa de lenteja se estudió a partir del extracto Crudo II sin diluir y con varias diluciones (1/2, 1/5, 1/10). En todos los casos, las concentraciones de TBHBA, 4-AAP y  $H_2O_2$  resultantes tras la mezcla fueron  $2.0 \times 10^{-3}$  M,  $1.5 \times 10^{-3}$  M y  $5.0 \times 10^{-5}$  M, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I-5. La actividad aumenta conforme aumenta la concentración

del extracto, como cabía esperar. Esto indica que no existen otros componentes en el extracto que interfieran de manera significativa en la reacción indicadora. Aunque es necesario remarcar que en las diluciones 1/5 la actividad no aumenta de forma notable con respecto a la dilución 1/10.

En el caso del extracto sin diluir, los cambios en la absorbancia son muy rápidos e intensos, alcanzándose rápidamente valores de absorbancia superiores a 1. En consecuencia con lo expuesto y como compromiso entre sensibilidad, precisión y consumo de extracto, para posteriores experimentos se optó por el extracto Crudo II diluido 1/2 como disolución de peroxidasa de trabajo.

Para el estudio del efecto de la concentración  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el contenido de las disoluciones de trabajo se ajustó de forma que la concentración de este compuesto en el pocillo se varió entre  $1.0 \times 10^{-8}$  y  $1.1 \times 10^{-3}$  M. En todos los casos se utilizó el extracto Crudo II diluido 1/2 y las concentraciones resultantes de TBHBA y 4-AAP fueron  $2.0 \times 10^{-3}$  M y  $1.5 \times 10^{-3}$  M respectivamente.

En la Figura I-10 se observa como la actividad de la peroxidasa del extracto de lenteja aumenta con la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  hasta valores próximos a  $1 \times 10^{-4}$  M. Con concentraciones mayores, la actividad disminuye debido seguramente al efecto de inhibición por sustrato ampliamente descrito para todas las peroxidasas <sup>[155, 156]</sup>.

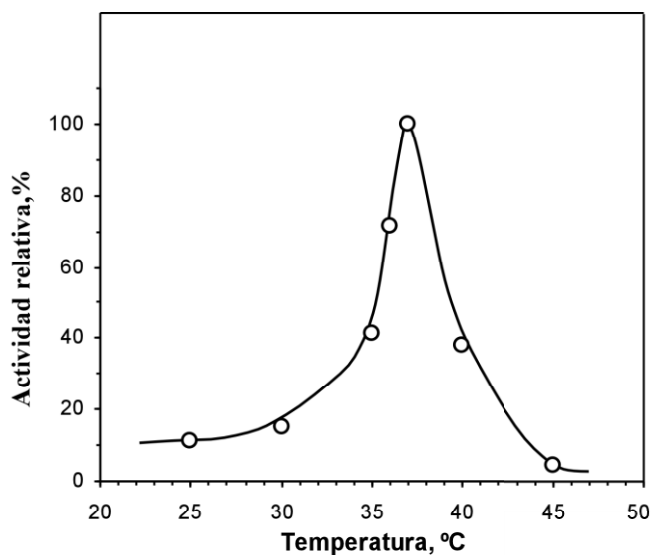


FIGURA I-7

**Influencia de la temperatura en la reacción indicadora (R I-4).**

En pocillo: pH 6.0; TBHBA:  $2.0 \times 10^{-3}$  M; 4-AAP:  $1.5 \times 10^{-3}$  M;  $H_2O_2$ :  $5.0 \times 10^{-5}$  M; Crudo II diluido 1/2.

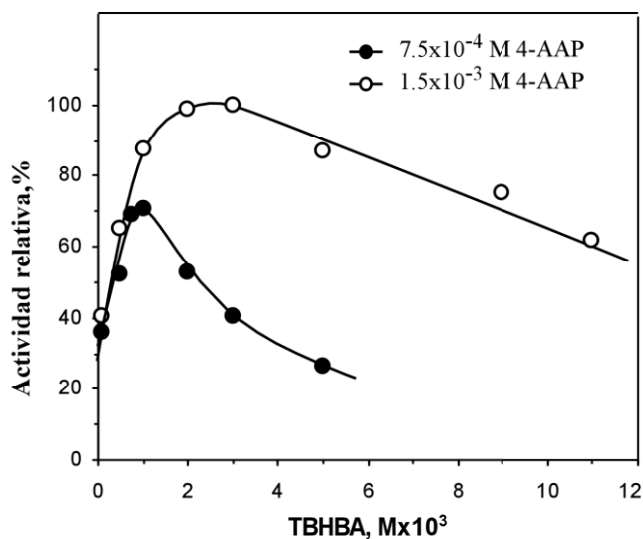
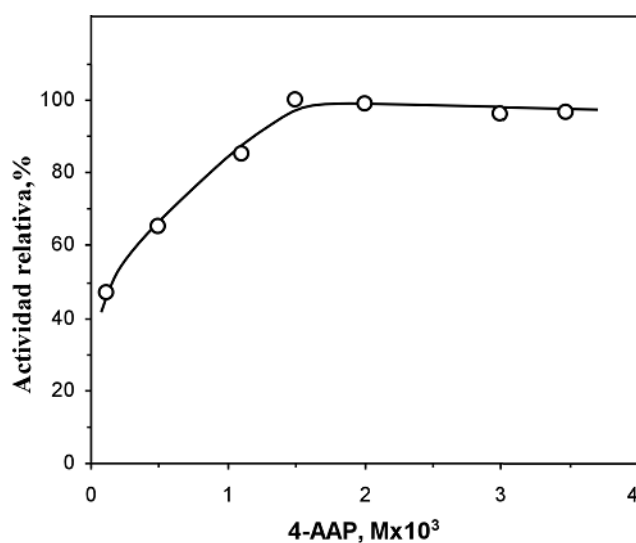


FIGURA I-8

**Influencia de la concentración de TBHBA en la reacción indicadora (R I-4).**

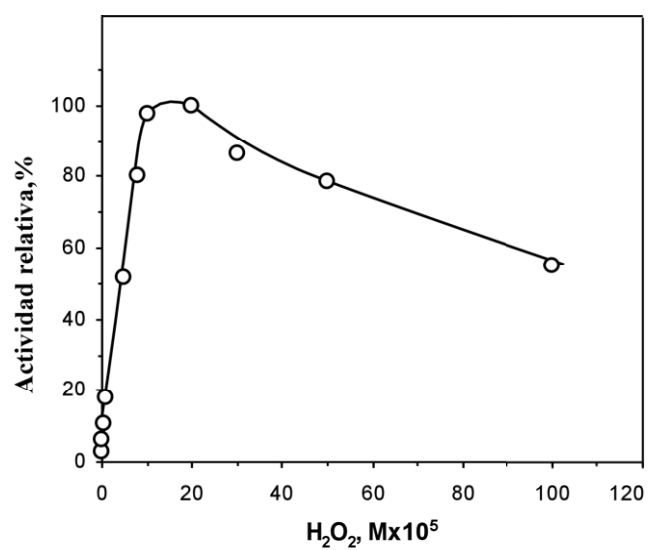
En pocillo: pH 6.0;  $H_2O_2$ :  $5.0 \times 10^{-5}$  M; Crudo II diluido 1/2; T: 37 °C.

**FIGURA I-9****Influencia de la concentración de 4-AAP en la reacción indicadora (R I-4).**

En pocillo: pH 6.0; TBHBA:  $2.0 \times 10^{-3}$  M;  $H_2O_2$ :  $5.0 \times 10^{-5}$  M; Crudo II diluido 1/2; T: 37 °C.

**Tabla I-5. Influencia de la concentración de peroxidasa en la reacción indicadora (R I-4).**

Disolución de peroxidasa de lenteja	Actividad relativa, %
Crudo II	100
Crudo II diluido 1/2	60.3
Crudo II diluido 1/5	15.5
Crudo II diluido 1/10	14.5

**FIGURA I-10****Influencia de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la reacción indicadora (R I-4).**

En pocillo: pH 6.0; TBHBA:  $2.0 \times 10^{-3}$  M; 4-AAP:  $1.5 \times 10^{-3}$  M; Crudo II diluido 1/2; T: 37 °C.

### 3.7. DETERMINACIÓN DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Considerando los resultados de los estudios precedentes, se propone el siguiente procedimiento y condiciones experimentales para la determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### *Procedimiento*

Con el lector de placas Biorad 680 provisto del filtro de 490 nm y la temperatura de las placas ajustada a 37 °C, en cada pocillo de la placa se efectúa la mezcla que se indica en la siguiente secuencia:

- 200 µl de tampón universal 0,030 M de pH 6.0.
- 25 µl de TBHBA en tampón
- 10 µl de 4-AAP en tampón
- 25 µl de patrón/muestra de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua o de agua destilada (blanco)
- 10 µl de extracto Crudo II diluído 1/2 en tampón.

Tras un período de agitación/mezcla de 5 s, se miden los valores de absorbancia durante 3 minutos, a intervalos de 20 s, tomándose como parámetro analítico el valor de la pendiente ( $\Delta A/\text{tiempo}$ ) de las rectas ajustadas. Para cada medida (patrón, muestra o blanco) se efectúan 8 réplicas dispuestas según las columnas de la placa y preparadas simultáneamente mediante una micropipeta multicanal de 8 puntas.

Mediante el procedimiento descrito (cuyas condiciones aparecen resumidas en la Tabla I-6) pueden detectarse concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en pocillo superiores a  $5 \times 10^{-8}$  M (esta es la mínima concentración detectada, que proporciona un valor de pendiente de  $S_B + 3\sigma_B$ , siendo  $S_B$  y  $\sigma_B$  el valor del blanco y la desviación estándar del blanco, respectivamente) y existe un margen lineal de cuantificación entre  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M, aproximadamente ( $\Delta A \text{ min}^{-1} = (2.20 \pm 0.08) \times 10^3 [\text{H}_2\text{O}_2] + (1.0 \pm 0.5) \times 10^{-2}$ ;  $R^2 = 0.999$ ). Para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $4 \times 10^{-6}$  M se obtuvo una DER (n=8) de la pendiente del 3.9 %. Siendo el factor de dilución 270/25 aproximadamente, el límite de detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la disolución de muestra es  $5.4 \times 10^{-7}$  M, con un margen de cuantificación lineal entre  $1.1 \times 10^{-6}$  y  $1.1 \times 10^{-3}$  M.



**Tabla I-6. Condiciones propuestas para la determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

<b>Variable</b>	<b>Rango estudiado</b>	<b>Valor propuesto</b>
pH	3 - 8	6.0
Temperatura (°C)	25 - 45	37
TBHBA (M)*	$1.0 \times 10^{-4}$ - $1.1 \times 10^{-2}$	$2.0 \times 10^{-3}$
4-AAP (M)*	$1.0 \times 10^{-4}$ - $3.5 \times 10^{-3}$	$1.5 \times 10^{-3}$
Peroxidasa de lenteja (Crudo II)	Sin dilución - Dilución 1/10	Dilución 1/2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (M)*	$1.0 \times 10^{-8}$ - $1.1 \times 10^{-3}$	

\*: concentraciones en pocillo

### 3.7.1. Aplicación a muestras de orina

El procedimiento descrito se aplicó al análisis de 6 muestras de orina, cada una de ellas dopada con 2 concentraciones distintas de  $H_2O_2$ . Como único tratamiento, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min, tomando los sobrenadantes. Una parte del sobrenadante se mezcló con un pequeño volumen de disolución acuosa de patrón de peróxido de hidrógeno, obteniéndose así una disolución madre de cada muestra dopada. Las muestras finalmente analizadas se prepararon por dilución adecuada de la madre con el resto de sobrenadante.

Los resultados, resumidos en la Tabla I-7 indican una coincidencia significativa entre las concentraciones añadidas y las encontradas según el procedimiento propuesto, por lo que se puede concluir que éste es adecuado para la determinación de  $H_2O_2$  en muestras de orina.

Es importante resaltar aquí el hecho de que no se haya observado ningún tipo de interferencia en las muestras de orina, ya que éstas presentaron un comportamiento similar al de las muestras patrón de  $H_2O_2$  preparadas en agua destilada. Esto indica que no existe interacción aparente del resto de componentes del extracto Crudo II con la matriz de las muestras y que el extracto puede utilizarse directamente, sin purificar, como disolución de trabajo de peroxidasa. El procedimiento propuesto presenta además la ventaja de poder analizar un total de 96 muestras en un tiempo de 3 minutos.

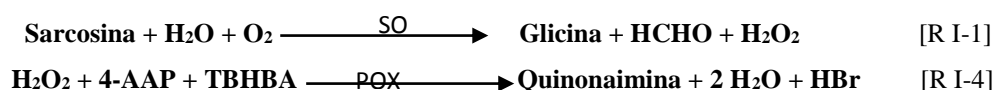
**Tabla I-7. Determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en muestras de orina dopadas. Concentraciones añadidas y encontradas mediante el procedimiento propuesto.**

Muestra	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en la muestra, M	
	Añadida	Encontrada*
HP-1	0	<5.4x10 <sup>-7</sup>
	1.00x10 <sup>-5</sup>	(1.04 ± 0.08)x10 <sup>-5</sup>
	5.10x10 <sup>-4</sup>	(5.1 ± 0.1)x10 <sup>-4</sup>
HP-2	0	<5.4x10 <sup>-7</sup>
	1.00x10 <sup>-5</sup>	(1.05 ± 0.08)x10 <sup>-5</sup>
	5.10x10 <sup>-4</sup>	(5.2 ± 0.1)x10 <sup>-4</sup>
HP-3	0	<5.4x10 <sup>-7</sup>
	1.00x10 <sup>-5</sup>	(0.94 ± 0.08)x10 <sup>-5</sup>
	5.10x10 <sup>-4</sup>	(5.0 ± 0.1)x10 <sup>-4</sup>
HP-4	0	<5.4x10 <sup>-7</sup>
	1.00x10 <sup>-5</sup>	(1.07 ± 0.08)x10 <sup>-5</sup>
	5.10x10 <sup>-4</sup>	(5.1 ± 0.1)x10 <sup>-4</sup>
HP-5	0	<5.4x10 <sup>-7</sup>
	1.00x10 <sup>-5</sup>	(1.05 ± 0.08)x10 <sup>-5</sup>
	5.10x10 <sup>-4</sup>	(5.0 ± 0.1)x10 <sup>-4</sup>
HP-6	0	<5.4x10 <sup>-7</sup>
	1.00x10 <sup>-5</sup>	(1.08 ± 0.08)x10 <sup>-5</sup>
	5.10x10 <sup>-4</sup>	(5.2 ± 0.1)x10 <sup>-4</sup>

\*: media de 8 determinaciones con confianza del 95 %

### 3.8. REACCIÓN GLOBAL

Una vez establecida y estudiada la reacción indicadora, se pasó a estudiar el proceso o reacción global resultante del acoplamiento de esta reacción con la reacción de oxidación de la sarcosina catalizada por SO.



#### 3.8.1. Efecto de variables en la reacción global

Se estudiaron las diferentes variables:

- pH
- Concentración de SO
- Concentración de sarcosina

Para el estudio del pH se siguió un procedimiento similar al de los apartados precedentes, manteniendo las condiciones experimentales propuestas para la cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con la excepción obvia del pH de trabajo que se varió entre 6.0 (pH de máxima actividad encontrado para la peroxidasa en la reacción indicadora) y 8.0, pH en torno al que según fuentes bibliográficas, se produce la máxima capacidad catalítica de la sarcosina oxidasa <sup>[149, 157, 158]</sup>.

En experimentos adicionales se midió el pH de las mezclas en los momentos iniciales y al cabo de 5 y 30 min de reacción, no observándose en ningún caso desviaciones significativas respecto al valor del tampón.

En la Figura I-11 se muestran los perfiles de actividad relativa frente a pH para una concentración de sarcosina de 4.0x10<sup>-5</sup> M y a dos concentraciones diferentes de SO (0.45 y 4.5 U mL<sup>-1</sup>). Para ambas concentraciones de SO estudiadas se obtiene una máxima actividad de la reacción indicadora acoplada a valores de pH en torno a 7.1, un valor intermedio entre el óptimo pH para la reacción indicadora y el de la reacción de transformación de la sarcosina catalizada por la SO.

Tal y como era de esperar, se obtiene una mayor actividad cuanto mayor es la concentración de SO, para los tiempos de reacción que se proponen. Sin embargo, se decide elegir una concentración de SO de 0.45 U mL<sup>-1</sup>, teniendo en cuenta sensibilidad y consumo de SO, puesto que se trata del reactivo más caro de los utilizados. No obstante,

si se desea dar prioridad a la sensibilidad en el método, podrían utilizarse mayores concentraciones de SO.

Manteniendo las condiciones experimentales propuestas, la concentración de sarcosina en pocillo se varió entre  $1.0 \times 10^{-8}$  y  $1.1 \times 10^{-3}$  M. Como se observa en la Figura I-12, la actividad global aumenta con la concentración de sarcosina hasta valores próximos a  $1.5 \times 10^{-4}$  M, estabilizándose por encima de esta concentración.

A diferencia de la Figura I-10 (Pág 63), aquí no se observa el efecto de inhibición por sustrato asociado a un exceso de  $H_2O_2$ . Esto parece indicar que la velocidad de generación de este compuesto en la oxidación de sarcosina es equiparable a la de su descomposición en la reacción indicadora o, lo que es lo mismo, que la reacción catalizada por SO es el paso limitante de la reacción global. La estabilización observada a concentraciones elevadas de sarcosina puede ser achacada al agotamiento del oxígeno necesario para la oxidación de sarcosina.

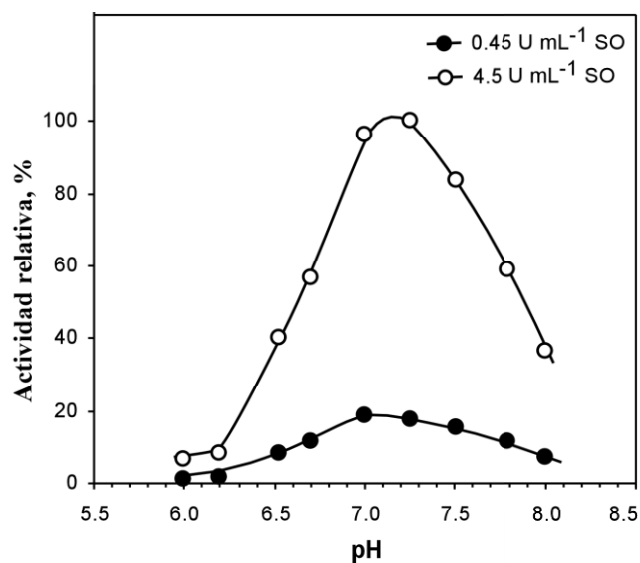


FIGURA I-11

**Influencia del pH en la reacción global.**

En pocillo: TBHBA:  $2.0 \times 10^{-3}$  M; 4-AAP:  $1.5 \times 10^{-3}$  M; Crudo II diluido 1/2; sarc.:  $4.0 \times 10^{-5}$  M; T: 37 °C.

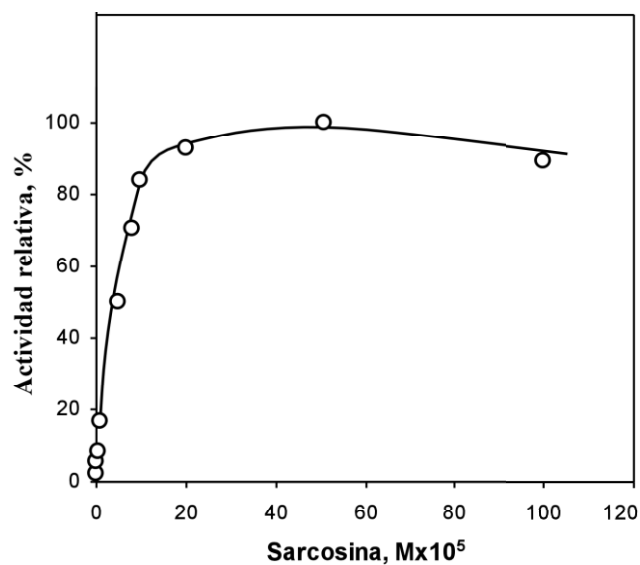


FIGURA I-12

**Influencia de la concentración de sarcosina en la reacción global.**

En pocillo: pH 7.1; TBHBA:  $2.0 \times 10^{-3}$  M; 4-AAP:  $1.5 \times 10^{-3}$  M; Crudo II diluido 1/2; SO: 0.45 U mL<sup>-1</sup>; T: 37°C.

### 3.9. DETERMINACIÓN DE SARCOSINA

Considerando los resultados de los estudios precedentes, se propone el siguiente procedimiento y condiciones experimentales para la determinación de sarcosina.

#### *Procedimiento*

Con el lector de placas Biorad 680 provisto del filtro de 490 nm y la temperatura de las placas ajustada a 37 °C, en cada pocillo de la placa se efectúa la mezcla que se indica en la siguiente secuencia:

- 150 µl de tampón universal 0,030 M de pH 7.0.
- 25 µl de TBHBA en tampón
- 10 µl de 4-AAP en tampón
- 25 µl de patrón/muestra de sarcosina en agua o de agua destilada (blanco)
- 50 µl de SO disuelta en tampón
- 10 µl de extracto Crudo II diluído 1/2 en tampón.

Tras un período de agitación/mezcla de 5 s, se miden los valores de absorbancia durante 3 minutos, a intervalos de 20 s, tomándose como parámetro analítico el valor de la pendiente ( $\Delta A/\text{tiempo}$ ) de las rectas ajustadas. Para cada medida (patrón, muestra o blanco) se efectúan 8 réplicas dispuestas según las columnas de la placa y preparadas simultáneamente mediante una micropipeta multicanal de 8 puntas.

Las condiciones propuestas para la determinación de sarcosina se resumen en la Tabla I-8. En dichas condiciones, se detectan concentraciones de sarcosina en pocillo mayores o iguales a  $5 \times 10^{-8}$  M.

La relación entre la concentración y la pendiente (Figura I-12) no es lineal, pero en el intervalo de  $1.0 \times 10^{-7}$  a  $1.5 \times 10^{-4}$  M, se ajusta a un polinomio de segundo grado ( $\Delta A \text{ min}^{-1} = (-6.1 \pm 4.6) \times 10^6 [\text{Sar}]^2 + (2.3 \pm 0.4) \times 10^3 [\text{Sar}] + (8.5 \pm 5.9) \times 10^{-3}$ ,  $n=8$ ;  $R^2=0.999$ ). El valor de la pendiente para una concentración de sarcosina de  $5.0 \times 10^{-6}$  M presenta una DER ( $n=8$ ) de 4.2%.

Con un factor de dilución de 270/25 aproximadamente, el límite de detección de sarcosina en las disoluciones de muestra es de  $5.4 \times 10^{-7}$  M, con un margen de cuantificación entre  $1.1 \times 10^{-6}$  y  $1.6 \times 10^{-3}$  M.

Además el procedimiento propuesto permite el análisis de un gran número de muestras en poco tiempo. Según la distribución de pocillos en la placa se pueden llegar a analizar un total de 96 muestras en un tiempo de tan solo 3 minutos.

**Tabla I-8. Condiciones propuestas para la determinación de sarcosina.**

Variable	Rango estudiado	Valor propuesto
pH	3 - 8	7.1
Temperatura (°C)	25 - 45	37
TBHBA (M)*	$1.0 \times 10^{-4}$ - $1.1 \times 10^{-2}$	$2.0 \times 10^{-3}$
4-AAP (M)*	$1.0 \times 10^{-4}$ - $3.5 \times 10^{-3}$	$1.5 \times 10^{-3}$
Peroxidasa de lenteja (Crudo II)	Sin dilución - Dilución 1/10	Dilución 1/2
SO (U mL <sup>-1</sup> )*	0.45 - 4.5	0.45
Sarcosina (M)*	$1.0 \times 10^{-8}$ - $1.0 \times 10^{-3}$	

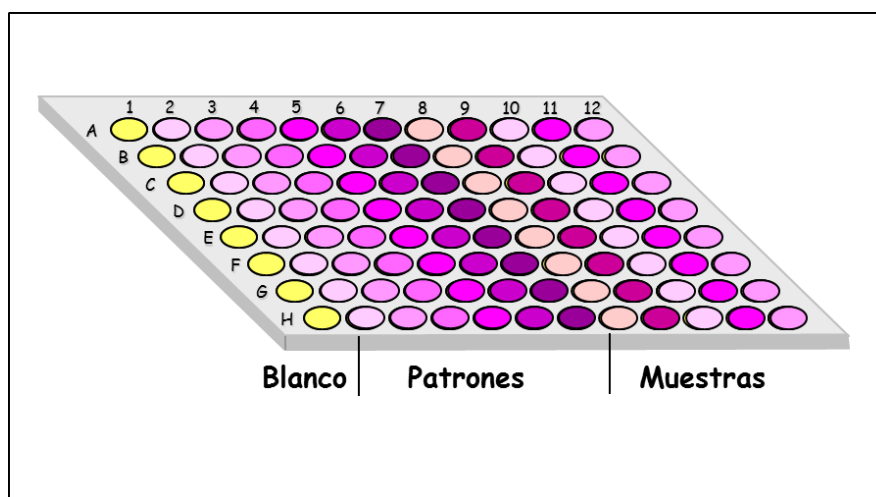
\*: concentraciones en pocillo



### 3.9.1. Aplicación a muestras de orina

El procedimiento descrito se aplicó al análisis de 6 muestras de orina de individuos sanos (concentración de sarcosina esperable  $\leq 1 \mu\text{mol/}$  orina de 24 h), cada una de ellas dopada con 2 concentraciones distintas de sarcosina. Como único tratamiento, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min, tomando los sobrenadantes. Una parte del sobrenadante se mezcló con un pequeño volumen de disolución acuosa de patrón de sarcosina, obteniéndose así una disolución madre de cada muestra dopada. Las muestras finalmente analizadas se prepararon por dilución adecuada de la madre con el resto de sobrenadante.

En la Figura I-13 se muestra un esquema de la placa en el análisis de las diferentes muestras de orina. Los resultados, resumidos en la Tabla I-9, indicaron una coincidencia significativa entre las concentraciones añadidas y las encontradas según el procedimiento propuesto, por lo que se puede concluir que éste es adecuado para la determinación de sarcosina en muestras de orina.



**FIGURA I-13**

**Esquema de la placa en el análisis de las muestras de orina dopadas.**

**Tabla I-9. Determinación de sarcosina en muestras de orina dopadas.** Concentraciones añadidas y encontradas mediante el procedimiento propuesto.

Muestras	Sarcosina en muestra, M	
	Añadida	Encontrada*
S-1	0	$<5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.00 \pm 0.06) \times 10^{-5}$
	$1.00 \times 10^{-4}$	$(1.07 \pm 0.08) \times 10^{-4}$
S-2	0	$<5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.00 \pm 0.06) \times 10^{-5}$
	$1.00 \times 10^{-4}$	$(1.02 \pm 0.08) \times 10^{-4}$
S-3	0	$<5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.00 \pm 0.06) \times 10^{-5}$
	$1.00 \times 10^{-4}$	$(0.98 \pm 0.08) \times 10^{-4}$
S-4	0	$<5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.00 \pm 0.06) \times 10^{-5}$
	$1.00 \times 10^{-4}$	$(0.95 \pm 0.08) \times 10^{-4}$
S-5	0	$<5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.01 \pm 0.06) \times 10^{-5}$
	$1.00 \times 10^{-4}$	$(1.03 \pm 0.08) \times 10^{-4}$
S-6	0	$<5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.05 \pm 0.06) \times 10^{-5}$
	$1.00 \times 10^{-4}$	$(0.99 \pm 0.08) \times 10^{-4}$

\*: media de 8 determinaciones con confianza del 95 %

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados del trabajo realizado pueden resumirse en las siguientes conclusiones:

- ❖ Se ha puesto de manifiesto la aplicabilidad de la peroxidasa de la planta de lenteja Rubia de la Armuña en métodos analíticos, en sustitución de la peroxidasa de rábano picante. En este sentido, se propone un procedimiento para la determinación de  $H_2O_2$  a niveles de concentración adecuados para numerosos procedimientos enzimáticos, directos o indirectos, basados en la determinación de este compuesto, entre ellos una gran variedad de análisis en suero utilizados para el diagnóstico clínico. El procedimiento propuesto ha sido aplicado a la determinación de  $H_2O_2$  en muestras de orina dopadas. Los resultados satisfactorios obtenidos indican que también sería aplicable en cualquier proceso analítico basado en la cuantificación de  $H_2O_2$  en orina.
  
- ❖ Como ejemplo de aplicación de lo indicado en el punto precedente, se propone un procedimiento para la determinación de sarcosina, un metabolito cuyo aumento de concentración en orina podría estar relacionado con la existencia y evolución inicial del cáncer de próstata. Las concentraciones de sarcosina analizables son adecuadas para el diagnóstico de individuos enfermos (valores típicos entre  $2 \times 10^{-6}$  y  $3 \times 10^{-5}$  M en orina de 24 h, en contraste con niveles no detectables o inferiores a  $2 \times 10^{-6}$  M en individuos sanos). El procedimiento propuesto se ha aplicado satisfactoriamente al análisis de muestras de orina dopadas con sarcosina.
  
- ❖ Finalmente, cabe destacar que en las aplicaciones analíticas descritas para la peroxidasa de lenteja Rubia de la Armuña se ha utilizado directamente el extracto vegetal, concretamente el denominado extracto Crudo II diluído adecuadamente. Al no haberse observado ningún tipo de interacción entre el resto de componentes del extracto y la matriz de las muestras de orina, no ha sido necesario llevar a cabo la separación y purificación de la enzima, hecho que repercute de forma drástica en la simplicidad y en el coste de las aplicaciones analíticas.





## Capítulo II. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PEROXIDASA DE ESCOBA BLANCA

---



## **1. OBJETO Y FUNDAMENTO DEL TRABAJO**

En el presente capítulo se pretende la puesta a punto y optimización de un procedimiento para el aislamiento y purificación de la peroxidasa de la planta de escoba blanca (CMP).

Se ha tomado como referencia el proceso descrito por Sakharov et al. <sup>[64, 154]</sup> para la purificación de la peroxidasa de palma, proceso que se fundamenta en tres etapas genéricas basadas en separaciones por extracción y diferentes tipos de cromatografía:

1. Aislamiento y concentración de la proteína deseada.
2. Eliminación de sustancias interferentes, particularmente de los compuestos fenólicos que son inhibidores de las peroxidases.
3. Eliminación de otras proteínas y de trazas de impurezas para conseguir un elevado grado de pureza de la enzima deseada.





## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. ESCOBA BLANCA: DESCRIPCIÓN Y HÁBITAT

La especie *Cytisus multiflorus* es conocida como escoba blanca, retama o marihuela, entre otros nombres. Es una leguminosa arbustiva de altura entre 1–3 m <sup>[159]</sup>. El nombre “multiflorus” se le otorga debido a que presenta un gran número de flores <sup>[160]</sup> tal como puede apreciarse en la Figura II-1. Tiene numerosas ramas, flexibles y de color ceniza <sup>[161]</sup> y sus frutos son legumbres vellosas de forma aplastada y unos 2.5 cm de largo <sup>[161]</sup>.

El área de distribución de esta especie se reduce a la Península Ibérica <sup>[162]</sup>. No obstante, existen algunas citas de apariciones esporádicas en Italia y Francia <sup>[163]</sup>. Habita en terrenos silíceos (granitos, gnéises y cuarcitas), lugares pedregosos, claros y linderos de los bosques. Su distribución es amplia en el cuadrante central-oeste de la Península Ibérica <sup>[164]</sup>.

Su crecimiento se ve favorecido por climas templados (Encinar lusitano, Arribes, robledal del sur y quejigal del centro). Aunque se trata de una especie muy resistente que puede aparecer en climas subhúmedos e hiper-húmedos <sup>[164]</sup>.

El uso de esta especie de escoba es menos extendido que el de la escoba amarilla (*Cytisus scoparius*). A diferencia de esta última, que incluso posee algunas propiedades medicinales, la escoba blanca se utiliza principalmente como especie ornamental.



**Figura II-1.** Escoba Blanca en flor.

## 2.2. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN DE PEROXIDASAS VEGETALES

Las peroxidasas se encuentran formando parte de mezclas complejas en el interior y exterior de células junto a otras enzimas. Además, en el interior de la célula existe la posibilidad de que la enzima de interés se encuentre en disolución en el citoplasma o bien asociada a estructuras celulares. Para llevar a cabo el estudio de una enzima en particular el primer paso necesario es el aislamiento de dicha enzima del resto del contenido celular.

Existen en la literatura diferentes métodos de extracción de peroxidasas. Puesto que las peroxidasas de plantas son fundamentalmente proteínas de secreción, la gran mayoría de estos métodos se basan en la obtención de un extracto homogéneo de la peroxidasa en medio acuoso. Sin embargo, en la extracción pueden añadirse aditivos tales como sales o surfactantes que ayudan a extraer y estabilizar fracciones de proteína que puedan encontrarse unidas a membranas.

Junto con las proteínas se encuentran en los extractos vegetales otros componentes no proteicos como es el caso de compuestos fenólicos que pueden inhibir la actividad peroxidasa y que deben ser separados. Esta separación puede llevarse a cabo mediante intercambio iónico, por adición de reactivos secuestradores de fenoles o por extracción con polímeros orgánicos en presencia de sales.

Se describen a continuación algunos de los procedimientos utilizados para la extracción de peroxidasas de especies vegetales.

### 2.2.1. Extracción con disoluciones tampón

- *Extracción con polivinilpirrolidona (PVP)* <sup>[165]</sup>

La muestra vegetal fresca se congela en nitrógeno líquido y después se tritura. A continuación se homogeniza utilizando un volumen doble de tampón acético/acetato 0,050 M a pH 4.0 al que se ha añadido 1/3 de la masa como NaCl sólido y una cantidad de polivinilpirrolidona (PVP) de tal forma que su composición final sea de un 1% (p/v). La mezcla se centrifuga durante 30 min (6000 rpm) y se recoge el sobrenadante. Con el residuo de la centrifugación se repite el mismo procedimiento de extracción un par de veces y se juntan los sobrenadantes. Es posible liofilizar la muestra antes de su uso.

- *Procedimiento con acetato* <sup>[63]</sup>

La materia vegetal se homogeniza a 24 °C con tampón acético/acetato 0,020 M a pH 6.0. Los extractos que se obtienen se centrifugan a 12000 rpm y el sobrenadante se concentra 10 veces mediante ultrafiltración.

- *Procedimiento con tampón fosfato* <sup>[166]</sup>

La materia vegetal se incuba con 10 veces su volumen de tampón fosfato a pH 6,0 durante 24h. Esta mezcla se centrifuga un par de veces a 725 x g durante 15 min y después a 13600 rpm durante 10 min. Al final, el sobrenadante se almacena a 4°C.

- *Procedimiento López-Molina* <sup>[167]</sup>

La materia vegetal se somete a trituración y homogenización en un medio acuoso constituido por agua o solución acuosa salina, opcionalmente tamponada, en un intervalo de pH comprendido entre 3.0 y 10.0. Además, dicho medio acuoso puede contener uno o más aditivos seleccionados entre antioxidantes, secuestradores de fenoles, agentes quelatantes de cationes, polímeros para el reparto de fases, disolventes orgánicos y/o inhibidores o activadores de proteasas que pudieran estar presentes en los tejidos. Tras la homogenización, la parte soluble se separa del residuo sólido para obtener una primera fracción soluble. El residuo sólido se somete a uno o más ciclos adicionales de lavado, homogenización en el medio acuoso previamente mencionado y separación sólido-líquido para obtener un segundo residuo sólido y diferentes fracciones solubles.

### 2.2.2. Extracción con agua

- *Procedimiento de precipitación con metanol* <sup>[168]</sup>

La muestra triturada se extrae con agua. La enzima se precipita con metanol y el precipitado se disuelve en agua. De esta disolución, se obtiene el crudo de la enzima, por precipitación por efecto salino con sulfato de amonio. La enzima se disuelve en agua. Se puede desalinizar y concentrar mediante ultramicrofiltración.

- *Procedimiento con polietilenglicol (PEG)* <sup>[169]</sup>

La materia vegetal se tritura y se divide en dos porciones. A la primera porción se le agrega agua en proporción 1:4 y se deja en reposo durante una noche a temperatura ambiente. Después se filtra a vacío con un embudo Büchner. El extracto obtenido se añade a la segunda porción triturada, y se deja reposar otra noche. Después se centrifuga durante 15 min a 25 °C y se separa. Al extracto se agrega PEG y sulfato amónico sólido dejando reposar unas 8 horas, a 4°C. Se forman dos capas; la superior es oscura, orgánica y contiene compuestos polifenólicos; la inferior es clara, acuosa y contiene la peroxidasa.

### 2.3. TÉCNICAS UTILIZADAS EN LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Una vez llevada a cabo la etapa de aislamiento o extracción de la enzima, en la etapa de purificación se pretende la separación de la proteína de interés de otras presentes en el extracto. En la purificación se utilizan procesos cromatográficos que explotan las diferencias en las propiedades químicas, estructurales y funcionales de las diferentes proteínas presentes en el extracto.

El término purificación en su acepción más general se refiere a la eliminación de impurezas o imperfecciones para que “algo” recupere su esencia. Si se habla de purificación de proteínas se refiere entonces a un proceso o conjunto de procesos encaminados al aislamiento de una proteína en particular, separándola de otros componentes presentes en una mezcla (de naturaleza proteica o no).

Una vez aislada la proteína de interés los procesos de separación de proteínas posteriores se encuentran dominados principalmente por la cromatografía líquida (CL). La resolución de mezclas proteicas por CL se basa en el principio de que bajo un conjunto dado de condiciones, los solutos disueltos en una fase móvil líquida interactúan en diferente forma y grado con las fases móvil y estacionaria, estando esta última generalmente contenida en una columna. El tipo de interacción depende de las propiedades físicas y químicas de los tres componentes: fase estacionaria, fase móvil y analito. La CL aplicada a la purificación de proteínas explota las diferencias en las características inherentes de dichas biomoléculas como son tamaño, hidrofobicidad o carga con el fin de lograr su separación <sup>[170]</sup>.

Dentro de la CL con aplicación para la separación de proteínas en una mezcla se tienen diferentes técnicas clasificadas en: cromatografía de exclusión

molecular o filtración en gel (*Size Exclusion Chromatography, SEC*), intercambio iónico (*Ion Exchange Chromatography, IEC*), interacción hidrofóbica (*Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC*) y fase inversa (*Reverse Phase Chromatography, RPC*).

A continuación se describen los fundamentos de las técnicas cromatográficas elegidas en el presente capítulo para la purificación de la peroxidasa de escoba blanca.

### 2.3.1. Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

La HIC se basa en la interacción reversible entre la superficie hidrofóbica de una proteína y una fase estacionaria formada por un ligando hidrofóbico a moderadas concentraciones de sal <sup>[171]</sup>.

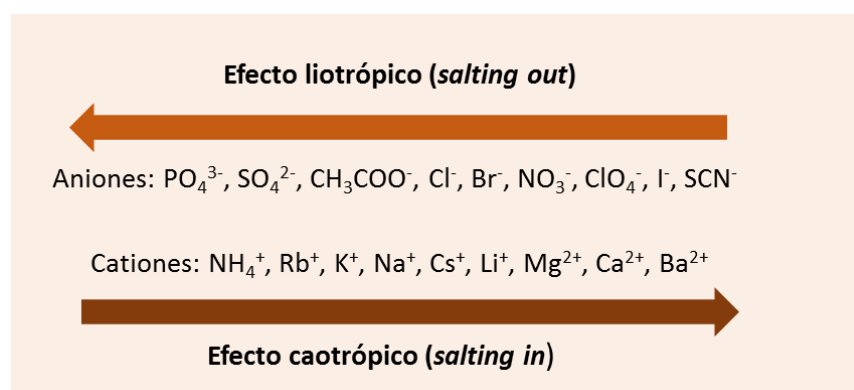
Las interacciones hidrofóbicas son las fuerzas no covalentes más importantes relacionadas con la estructura y plegamiento de las proteínas y con la unión de enzimas a un sustrato y aparecen cuando se colocan compuestos no polares en un ambiente o entorno acuoso <sup>[172]</sup>.

La fase estacionaria en HIC (grupos hidrofóbicos) se encuentra unida a un soporte de polímeros hidrofílicos. Las distintas columnas empleadas pueden diferir en la naturaleza química del soporte, así como en la naturaleza química o la concentración del ligando hidrofóbico <sup>[171]</sup>.

La unión y la elución de proteínas en HIC se logran normalmente con la adición y eliminación de sales. Las sales son compuestos polares que se unen al agua fuertemente. Este hecho induce la exclusión de las moléculas de agua sobre la proteína y se traduce por tanto en el aumento de las interacciones hidrofóbicas entre la proteína y el ligando de la matriz <sup>[171, 172]</sup>. En la Figura II-2 se muestran las series de Hofmeister o liotrópicas, las cuales organizan los iones desde los que promueven las interacciones hidrofóbicas (salting-out/efecto liotrópico) hasta los que las disminuyen (salting-in/efecto caotrópico). El sulfato de amonio es una de las sales más frecuentemente empleadas en HIC debido a la combinación entre su elevada solubilidad y buenas propiedades liotrópicas <sup>[173]</sup>.

En general, la unión de la proteína a la fase estacionaria se logra en presencia de determinadas concentraciones de sal que, como se ha dicho anteriormente

favorece las interacciones hidrofóbicas. Posteriormente la reducción en la concentración de sal posibilita la elución de las proteínas, bien de forma brusca, escalonada o bien en gradiente. En HIC la elución en gradiente presenta problemas que se traducen en una mala resolución de los picos cromatográficos debido a procesos de agregación proteicos (salting-out). Este problema se solventa utilizando una elución escalonada o con la presencia de una pequeña cantidad de algún disolvente orgánico en el tampón de elución, por ejemplo etanol 0,1-5% <sup>[173]</sup>.



**Figura II-2.** Series de Hofmeister.

### 2.3.2. Cromatografía de intercambio iónico (IEC)

La cromatografía de intercambio iónico separa las moléculas atendiendo a su carga iónica neta. Actualmente, la IEC es una de las técnicas más utilizadas para la separación de una mezcla de proteínas. Las proteínas con diferentes grupos cargados compiten por su unión con grupos de carga opuesta.

En IEC el parámetro crítico es el pH, puesto que una proteína que no tiene carga neta no podrá interactuar con la fase estacionaria. Esto ocurre a un valor de pH igual o muy próximo al punto isoeléctrico de la proteína. Por el contrario, a un pH por encima de su punto isoeléctrico, una proteína puede unirse a una fase estacionaria cargada positivamente mientras que a un pH por debajo de su punto isoeléctrico la proteína puede unirse a una fase estacionaria cargada negativamente.

En este sentido, en la cromatografía de **intercambio aniónico** se intercambian grupos cargados negativamente mientras que en la cromatografía de **intercambio catiónico** se intercambian grupos funcionales cargados positivamente [170]. La elección de una fase estacionaria adecuada ha de hacerse atendiendo a distintos criterios:

- La fuerza del intercambiador de iones.
- Flujo o volumen de la muestra.
- Propiedades de la muestra tales como su conductividad, punto isoeléctrico de la proteína de interés, etc.

Anteriormente se ha mencionado que existen dos tipos de cromatografías de intercambio iónico: intercambio aniónico o catiónico. Existen por tanto matrices con fases estacionarias formadas por grupos funcionales cargados positivamente como dietilaminoetil (DEAE) y amonio cuaternario y por grupos funcionales cargados negativamente como carboximetil o sulfometil. Ambos tipos de intercambiadores pueden además ser clasificados como fuertes o débiles, refiriéndose en este caso a los valores de  $pK_a$  del grupo funcional en cuestión. De esta forma, los intercambiadores iónicos fuertes están totalmente ionizados en un amplio rango de pH. Los intercambiadores débiles requieren unas condiciones de elución más suaves que los fuertes, siendo por tanto la primera elección evaluada en la purificación de una nueva proteína y sobre todo en el caso de tratarse de proteínas lábiles [170].

### 2.3.3. Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

La cromatografía de exclusión molecular (SEC) es el nombre que describe en general los procesos de separación de biomoléculas de acuerdo a su tamaño cuando la disolución de mezcla de proteínas fluye a través de un soporte poroso <sup>[175]</sup>.

El proceso de separación depende por tanto del tamaño y volumen hidrodinámico, que definen la capacidad de una determinada molécula de penetrar o no en los poros del soporte. En el perfil cromatográfico resultante, se observarán primero picos correspondientes a moléculas de alto peso molecular que pasan rápidamente por la columna empaquetada con el soporte poroso, puesto que son excluidas de los poros debido a efectos estéricos. Sin embargo, las moléculas más pequeñas tienen diferente accesibilidad a las cavidades del soporte y tardan más en ser eluidas. Con respecto a dicho soporte poroso, en SEC son frecuentes los polímeros naturales como la agarosa o el dextrano, pudiendo estar compuestos también por poliacrilamida <sup>[176]</sup>.

En contraste con los otros tipos de cromatografías anteriormente expuestos, la selectividad de una columna de SEC no se ajusta cambiando la composición de la fase móvil. Parámetros críticos en este tipo de separación son por ejemplo el tamaño de poro y el volumen de muestra a tratar. Dado que las moléculas no son adsorbidas, las proteínas se eluyen en modo isocrático <sup>[176]</sup>. Este tipo de cromatografía suele utilizarse frecuentemente como etapa de pulido en el proceso de purificación proteica.



### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. REACTIVOS, APARATOS Y MATERIAL

##### 3.1.1. Reactivos

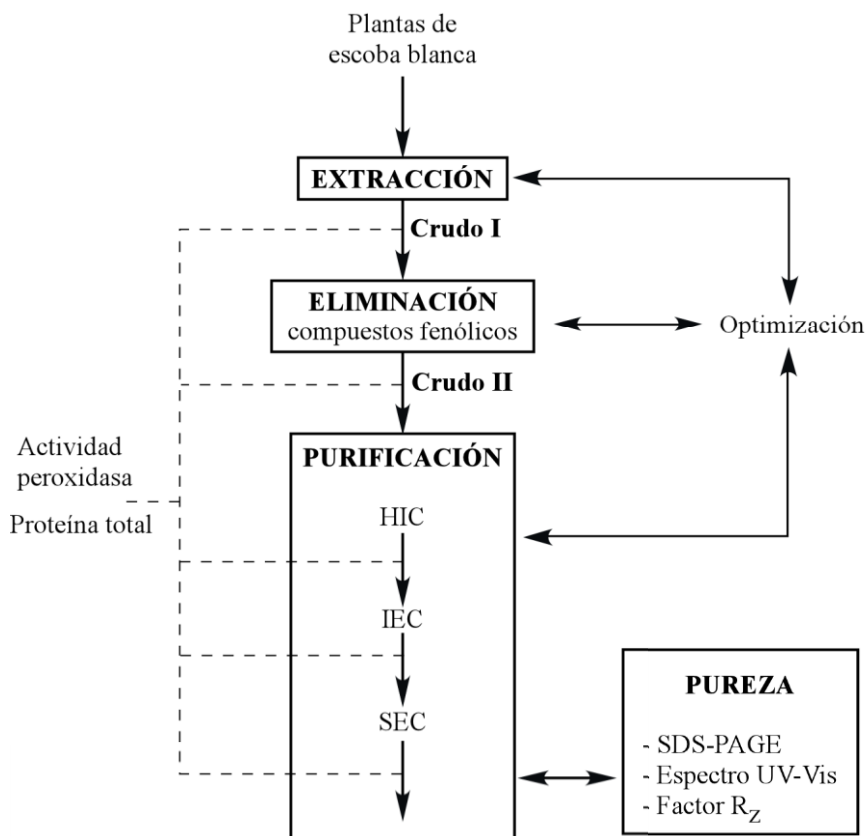
- Ácido bórico,  $H_3BO_3$ , 99.5 %, P.A (Panreac).
- Dihidrógeno fosfato sódico monohidratado,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , P.A., 98 %, (Panreac).
- Ácido acético glacial,  $CH_3COOH$ , P.A., 99.5-100.5 % (Panreac).
- Guayacol, 2-metoxifenol ( $CH_3OC_6H_4OH$ ), 98 %, PRS (Panreac).
- Polietilenglicol (PEG)10000,  $HO(C_2H_4O)_n H$ , reactivo para síntesis (Merck).
- Sulfato amónico,  $(NH_4)_2 SO_4$ , 98.5 %, PRS, (Panreac).
- Hidróxido sódico,  $NaOH$ , 98.0-100.5 %, PRS, (Panreac).
- Cloruro sódico,  $NaCl$ , PRS, (Panreac).
- N, N, N', N'-tetrametiletildiamina (TEMED),  $(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$ , > 99.5 %, (Sigma).
- Persulfato amónico (APS),  $(NH_4)_2S_2O_8$ , ACS Reagent, > 98.0 %, (Sigma).
- Dodecilsulfato sódico (SDS),  $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$  para biología molecular, > 98.5 % (Sigma).
- Azul de Coomassie R-2500 (Sigma).
- Ácido acético glacial,  $CH_3COOH$ , 99.5- 100.5 %, PA (Sigma).
- Etanol absoluto,  $CH_3CH_2OH$ , > 99.8 % (Sigma).
- Solución comercial Proteogel, 99 %: acrilamida/bisacrilamida 37, 5:1. Laboratorios Conda, S.A. Pronadisa.
- Albúmina de suero bovino (BSA), (Sigma).
- Carbonato de sodio anhidro ( $Na_2CO_3$ ), PA, (Panreac).
- Sulfato de cobre ( $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ ), PA, (Panreac).
- Kit de calibración dual para electrophoresis SDS-PAGE (Fermentas UK Ltd., Cambridge, UK).

### 3.1.2. Aparatos y material

- Equipo de cromatografía líquida FLPC ÄKTA (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).
- Espectrofotómetro de doble haz T80+ PG UV/Vis (Instruments LTD, Leicester, UK). Cubetas de absorción de cuarzo de 1 x 2cm (Hellma GMBH and Co. KG, Mühlheim, Alemania).
- Centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B Superspeed (E.I. du Pont Instruments Canada Company, Ontario L5M2H3, Canadá).
- Ultracentrífuga Optima XL-100K (Beckman Coulter, Madrid, España).
- Centrifonas Amicon Ultra 15 de MWCO 30000 (Millipore Corp., Billerica, MA, USA).
- Cassettes de diálisis de MWCO 12000 (Pierce Biotechnology, INC., Rockford, IL, USA).
- Filtros para jeringa 0.45 µm (Interchim Inc, San Pedro, USA).
- Conductímetro ATC HI 9835 (PCE Group Ibérica S.L. 02500, Albacete, España).
- Picadora (Moulinex, 92979, París, Francia).
- Columna de vidrio 50 mL (1,4 x 35 cm) (BioRad, Madrid, España) empaquetada con Fenil-Sefarosa CL-4B (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).
- Columna cromatográfica Superdex-200 10/30 HR (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).
- Columna cromatográfica de intercambio aniónico TSK gel-DEAE (Tosoh Corp., Tokyo, Japan).
- Columna cromatográfica de intercambio catiónico HiTrap<sup>TM</sup> SP HP (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).
- Material de uso corriente en laboratorio de química y bioquímica.

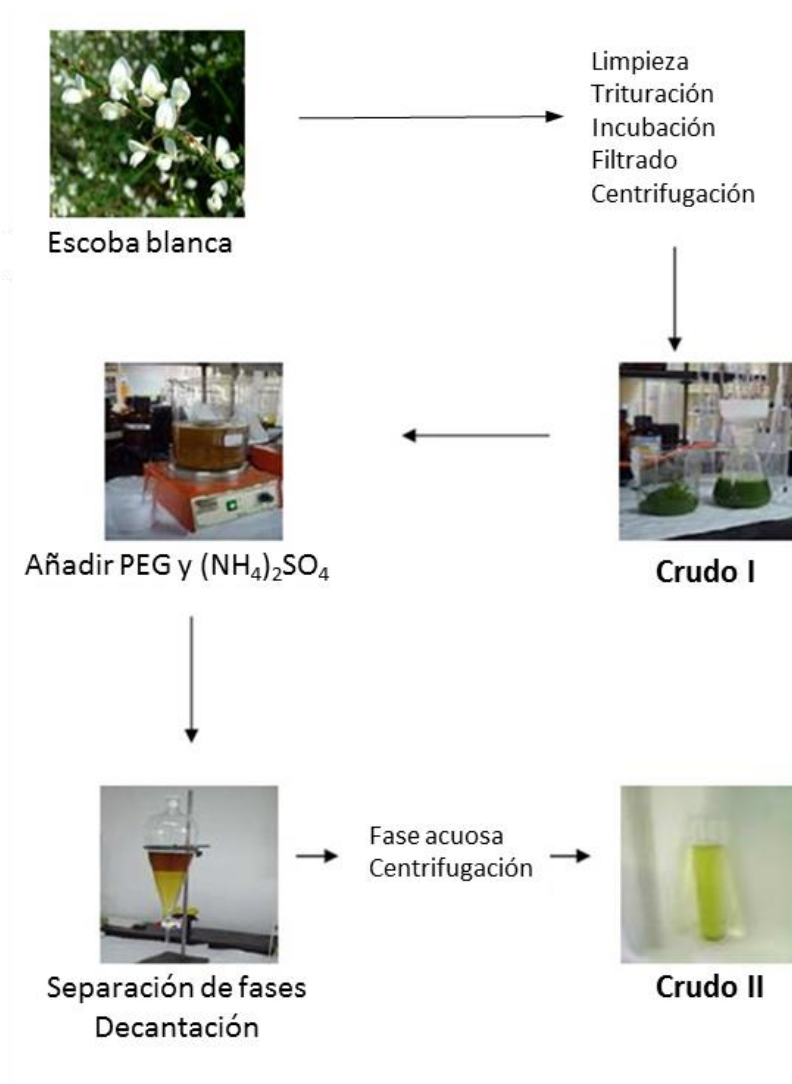
### 3.2. PLAN EXPERIMENTAL

Los diferentes experimentos realizados se desarrollaron según las etapas que se muestran a continuación (los detalles de las diferentes etapas se describen en los apartados subsiguientes):



Tras la toma de muestra, las plantas de escoba trituradas se someten a la extracción de la peroxidasa en medio acuoso tamponado y se estudian y optimizan los efectos del pH, del tiempo de extracción y de la presencia de sales y surfactantes en el proceso.

A continuación se procede a eliminar los compuestos fenólicos, extraídos junto con las proteínas, del sobrenadante de la primera etapa o Crudo I. La eliminación se lleva a cabo añadiendo PEG y sulfato amónico sólidos, adición que conduce a la formación de dos fases, una acuosa con la peroxidasa y otra con PEG y los compuestos fenólicos. En esta etapa se estudia y optimiza el efecto de las cantidades de PEG y sulfato amónico añadidas. En la Figura II-3 se muestra un esquema de las dos primeras etapas que conducen al extracto acuoso final o Crudo II, que contiene la peroxidasa en ausencia de compuestos fenólicos.

**FIGURA II-3.**

**Proceso de extracción y eliminación de compuestos fenólicos.**

En la etapa de purificación siguiente, la peroxidasa del Crudo II es separada de otras proteínas y compuestos extraídos utilizando de forma consecutiva las modalidades cromatográficas de interacción hidrofóbica (HIC), intercambio iónico (IEC) y exclusión molecular (SEC). En esta etapa se estudian y optimizan las variables más significativas de los diferentes procesos cromatográficos (pH, fuerza iónica y tipo de intercambio iónico).

El estudio, la optimización y la evaluación de la eficacia de cada una de las etapas de aislamiento y purificación se basan en medidas de la actividad peroxidasa y de la concentración total de proteínas después de cada etapa y en la pureza de las disoluciones o fracciones obtenidas, caracterizada mediante técnicas electroforéticas (SDS-PAGE) y espectrofotométricas (morfología del espectro de absorción UV-Visible y factor o número de pureza,  $R_z = A_{403}/A_{280}$ ).

### 3.2.1. Medida de la actividad peroxidasa

El control de la actividad peroxidasa se realizó con  $H_2O_2$  y guayacol como cosustratos y medidas de absorbancia a pH 6.0 y 25 °C, tal y como se describe en el apartado 3.5 del Capítulo I (Pág. 51) (Comparación con la peroxidasa de rábano picante).

### 3.2.2. Proteína total

La concentración total de proteínas se evaluó siguiendo el método descrito por Bradford <sup>[177]</sup> basado en el reactivo azul de Coomassie y medidas de absorbancia a 595 nm. Se utilizó albúmina de suero bovino como patrón.

### 3.2.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La evaluación de la pureza de la proteína obtenida en las diferentes etapas cromatográficas y la estimación del su peso molecular se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), de acuerdo al método descrito por Laemmli <sup>[178]</sup>.

En el sistema electroforético se utilizaron dos geles de diferente porosidad y pH: el superior, llamado concentrador y cuya función es compactar las muestras,

con un pH de 6.8 y el inferior, denominado separador y cuya función es separar las proteínas presentes en la muestra, con un pH de 8.3.

La disolución-muestra de peroxidasa se preparó en tampón TRIS (Tris-[hidroximetil]aminometano) 20 mM y pH 8.3 con un contenido de 10% de glicerol, 2 mM de AEDT, 0.2 % de dodecil-sulfato sódico (SDS), 4% de 2-mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol. El tampón de electroforesis utilizado fue TRIS 25 mM con 250 mM de glicina y 0.1% SDS a pH 8.3. Se utilizó un Kit de calibración dual para electroforesis SDS-PAGE.

Después de la electroforesis, se realizó la tinción de las proteínas con una solución de azul de Coomassie y un proceso de lavado durante toda la noche con una disolución de metanol (10 %) y ácido acético (7.5 %).

### 3.3. TOMA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Como parte de los objetivos del proyecto global (búsqueda de nuevas fuentes de peroxidasa) y ante una potencial fluctuación del contenido de peroxidasa en las plantas, para disponer de una muestra representativa, se tomaron muestras de escoba blanca en diferentes zonas de la provincia de Salamanca y en diferentes épocas del año a lo largo del ciclo vegetativo. En la Tabla II-3, (Pág. 102) pueden observarse los detalles del muestreo.

La toma de muestra se realizó personalmente por miembros del equipo de trabajo. Para ello se tomaron de 100 a 500 g de cada muestra en bolsas etiquetadas y precintadas que se transportaron en neveras portátiles a 4 °C hasta el laboratorio.

### 3.4. EXTRACCIÓN DE PEROXIDASA

Una vez limpias, las hojas y tallos de las plantas de escoba, fueron cortados, triturados e incubados durante un tiempo determinado a temperatura ambiente en medios tamponados a diferentes pH. El proceso de incubación se llevó a cabo con agitación constante. Tras la incubación, los homogenatos fueron filtrados y centrifugados a 10000 rpm durante 15 min a 4 °C, tomando los sobrenadantes o extractos Crudo I en los que se midió la actividad peroxidasa y la concentración total de proteínas. Se estudió la influencia del tiempo de incubación, del pH del medio y

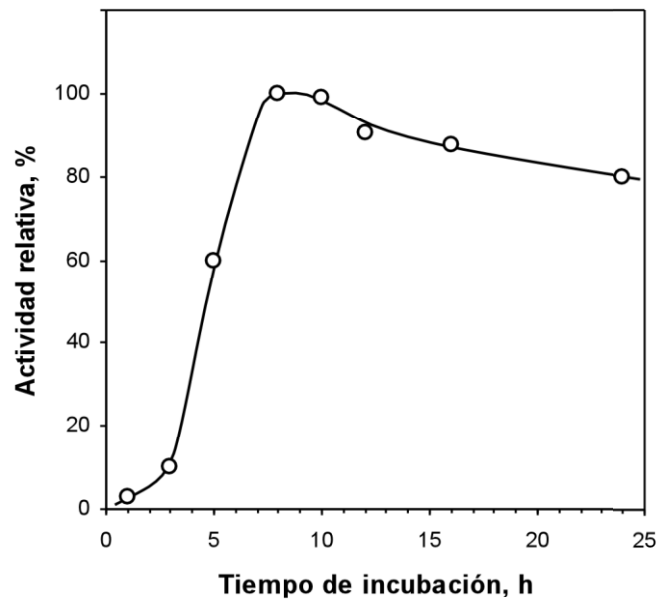
de la presencia de algunos aditivos en el medio de extracción, como sales (NaCl) y surfactantes (Tritón-XD). En todos los experimentos se partió de la misma cantidad de material vegetal (100g) que se incubaron con 500 mL de tampón universal 100 mM al pH elegido.

El pH del medio de extracción se varió en el intervalo de 3 a 9 y no se encontraron diferencias significativas en la actividad peroxidasa de los extractos obtenidos a los diferentes pH estudiados. Para posteriores experimentos se eligió un pH de extracción/incubación de 7.0.

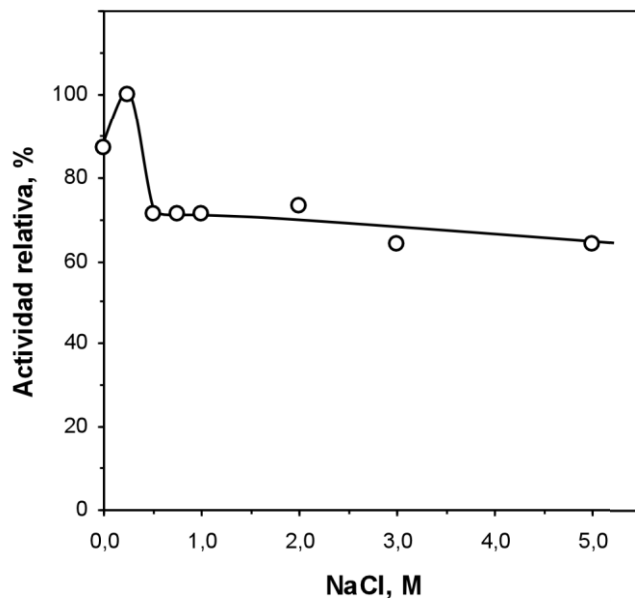
El tiempo de incubación se varió entre 1 y 24 h y se observó que la actividad peroxidasa de los extractos era máxima tras 8-10 h de incubación (Figura II-4). El descenso de la actividad peroxidasa con tiempos de incubación superiores a 10 h puede deberse, entre otras causas, a una inactivación enzimática por los compuestos fenólicos extraídos junto a la peroxidasa <sup>[179]</sup>. Se eligió, por tanto, un tiempo de incubación de 8 h para posteriores extracciones.

La concentración de NaCl en el medio de extracción se varió entre 0 y 5 M. En la Figura II-5 puede observarse que la mayor actividad peroxidasa de los extractos se obtuvo con concentraciones de NaCl próximas a 250 mM.

Al añadir 0.1% de Tritón-XD al medio de extracción no se observó un cambio significativo de la actividad del extracto en comparación con la del obtenido en ausencia del surfactante.

**FIGURA II-4**

**Variación de la actividad peroxidasa en el Crudo I con el tiempo de incubación.**

**FIGURA II-5**

**Variación de la actividad peroxidasa del Crudo I con la concentración de NaCl.**



### 3.5. ELIMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Para la eliminación de compuestos fenólicos se pueden usar mecanismos de intercambio iónico <sup>[180]</sup>. El método es eficiente, sin embargo las columnas son materiales caros y si la concentración de polifenoles es elevada se puede producir una modificación irreversible del soporte <sup>[181]</sup>.

En este caso, para la eliminación de compuestos fenólicos del primer extracto o Crudo I, se propone la utilización de un sistema bifásico formado por un polímero soluble (PEG 10000) y una sal (sulfato amónico). El fundamento de este sistema bifásico consiste en un ajuste estructural entre el agua y la macromolécula de polímero, generándose así un cambio en la polaridad del medio. Factores que perturben la estructura del agua, tales como la presencia de urea o de sales inorgánicas, repercuten de forma directa en la separación de fases. Esto, unido a un efecto de salting-in sobre las proteínas, provoca la separación y estabilización de las mismas en la fase acuosa.

La adición de PEG y sulfato amónico sólidos se realizó con agitación constante y la mezcla resultante se dejó reposar unas 8 horas, tiempo necesario hasta la clara separación de las fases. Tras la decantación, la fase acuosa se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min a 4 °C y se separó el sobrenadante (Crudo II) en el que se midió la actividad peroxidasa y la proteína total. De forma similar, la fase superior orgánica se sometió a centrifugación en las mismas condiciones y se midió la actividad peroxidasa y la proteína total en el sobrenadante.

Tomando como base el procedimiento de extracción descrito por Sakharov <sup>[169]</sup> la concentración de sulfato amónico sólido añadido se varió entre el 8 y el 20 % p/v, manteniendo constante la concentración de PEG en 14 % p/v. Una vez fijada la concentración óptima de sulfato amónico, la concentración de PEG se varió entre el 10 y el 25 % p/v.

La elección de un criterio de evaluación del rendimiento de la separación de compuestos fenólicos resulta una tarea compleja. El extracto Crudo I de escoba blanca presenta un color marrón rojizo y su espectro se muestra en la Figura II-6.

Los anillos bencénicos presentan un máximo de absorbancia a 280 nm. La absorbancia a dicha longitud de onda puede considerarse como un índice válido del

conjunto de compuestos fenólicos. Sin embargo, a esa longitud de onda absorben también otras moléculas presentes en el extracto vegetal, tales como las proteínas.

Además, la obtención de valores de absorbancia a esa longitud de onda comprendidos en un intervalo entre 0.3 y 0.7 supondría una elevada dilución del extracto.

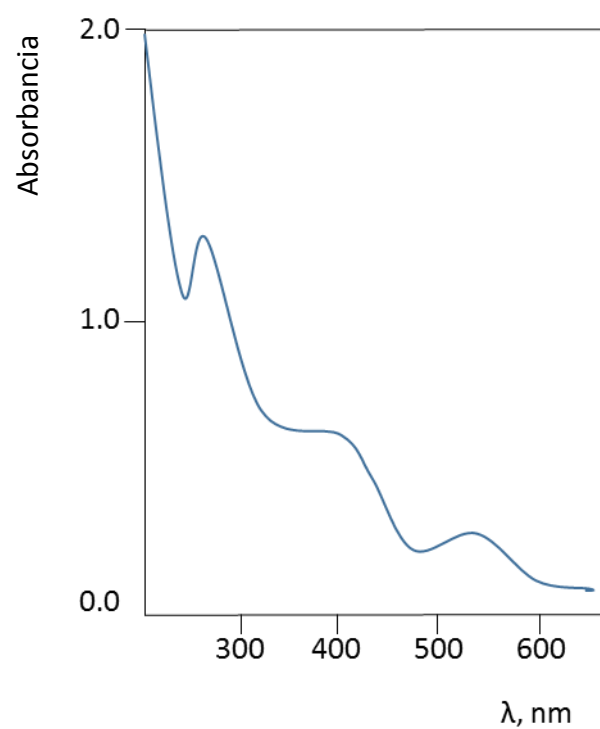
Tal como se observa en la Figura II-6, el Crudo I de escoba blanca presenta también un máximo cercano a 520 nm, asociado a determinados compuestos fenólicos flavonoideos (antocianos) <sup>[182]</sup>. Para la medida de la absorbancia a esta longitud de onda no es necesaria una dilución previa del extracto.

Finalmente, se decidió utilizar como criterio de evaluación de compuestos fenólicos las medidas de actividad peroxidasa, absorbancia a 280nm y absorbancia a 520 nm en los extractos Crudo II.

En la Tabla II-1 se muestran los valores de actividad peroxidasa de los extractos finales obtenidos con las diferentes concentraciones experimentadas, así como las absorbancias a 520 y 280 nm. Sulfato amónico al 12 % p/v junto con PEG al 17 % p/v proporcionaron el mayor rendimiento de eliminación de compuestos fenólicos. Estos valores proporcionan la mayor recuperación de actividad peroxidasa correlacionada con el descenso más significativo de la absorbancia a 520 nm. Valores por encima de 12 % p/v de sulfato amónico proporcionan un descenso en la actividad peroxidasa recuperada y no disminuyen significativamente la  $A_{520}$ . Parece ser el PEG el reactivo que más influye en el descenso de la absorbancia a 520 nm. Porcentajes de PEG inferiores al 10 % no se probaron puesto que se encontró en fuentes bibliográficas que dichos porcentajes no daban lugar a una separación de fases en otros extractos vegetales <sup>[181]</sup>.

Relacionar estas conclusiones con los valores de absorbancia a 280 nm resulta mucho más complicado debido a la cantidad de compuestos que absorben a esa longitud de onda. Es cierto sin embargo, que los valores de PEG y sulfato amónico que proporcionan una mayor actividad peroxidasa recuperada en el Crudo II así como una menor  $A_{520}$  proporcionan también las menores  $A_{280}$ , con la excepción de sulfato amónico 20 % p/v que a pesar de producir un descenso en la absorbancia a 280 nm, no produce descenso significativo en la absorbancia a 520 nm y disminuye la actividad peroxidasa.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores y como compromiso también con el coste del proceso se decidió elegir como cantidades óptimas 17% p/v de PEG 10000 y 12 % p/v de sulfato amónico.



**FIGURA II-6**

**Espectro de absorción UV-Vis del Crudo I.**

**Tabla II-1. Actividad y absorbancias de los extractos finales (Crudo II) con diferentes concentraciones de sulfato amónico y PEG.**

Compuesto	Concentración % p/v	Actividad relativa* %	A* <sub>520</sub> %	A* <sub>280</sub> %
<b>Sulfato amónico**</b>	8	63.5	45	63
	10	79.0	38	51
	12	99.5	29	40
	15	90.2	31	40
	20	87.0	30	22
	<b>PEG***</b>	10	51.3	87
13		69.0	73	55
15		91.3	56	42
17		98.5	33	39
20		87.0	32	41
25		83.0	30	40

\*: Referidas a los correspondientes valores en el Crudo I.

\*\* : Concentración de PEG fija en 17 % p/v.

\*\*\* : Concentración de sulfato amónico fija en 12% p/v.

### 3.6. PROCEDIMIENTO PROPUESTO Y SELECCIÓN DE MUESTRAS

En la Tabla II-2 se resumen las condiciones propuestas para las dos primeras etapas de extracción de la peroxidasa y eliminación de los compuestos fenólicos con plantas de escoba blanca. Al aplicar estas condiciones a las diferentes muestras almacenadas, se observaron notables diferencias en la actividad peroxidasa de los extractos finales, dependiendo de la zona de origen de las plantas y de la época del año en la que fueron recogidas. En la Tabla II-3 se resumen los valores de la actividad peroxidasa en unidades (U) por gramo de material vegetal para los extractos finales (Crudos II) obtenidos de las diferentes muestras recolectadas en distintos lugares y épocas del año.

Los mayores valores de actividad se encontraron en las plantas recolectadas en el área del embalse de la Almendra durante el periodo de floración (de Febrero a Marzo). Todos los experimentos posteriores, dirigidos a optimizar el proceso de purificación de la peroxidasa de escoba blanca se llevaron a cabo partiendo de los extractos finales de estas muestras.

**Tabla II-2. Condiciones propuestas para la extracción y eliminación de compuestos fenólicos.**

Etapa/condiciones
<p><b>Extracción</b>            Tampón universal: 100 mM, pH 7, 250 mM NaCl            Tiempo de incubación: 8 h, temperatura ambiente.            Filtrado/Centrifugación, 10000 rpm, 15 min, 4 °C.</p>
<p><b>Eliminación de compuestos fenólicos</b>            Sulfato amónico: 12 % p/v, PEG: 17 % p/v            8 h para separación de fases            Centrifugación fase acuosa, 10000 rpm, 20 min, 4 °C.</p>

**Tabla II-3. Actividad peroxidasa de los extractos (Crudo II) de las diferentes plantas recolectadas.**

Área de muestreo Muestra	Descripción planta J: joven ; M: madura	Fecha de recolección	Actividad U g <sup>-1</sup>
<b>Barruecopardo</b>			
M1	J	28/05/2010	58
M2	J	13/11/2010	14
M3	M	28/05/2010	11
M4	M	13/11/2010	10
<b>Almendra</b>			
A1	J	27/02/2008	570
A2	J	13/11/2010	11
A3	J	12/03/2011	665
A4	M	13/11/2010	6
A5	M	12/03/2011	535
A6	M	10/05/2011	400
A7	M	25/02/2012	360
A8	M	01/07/2012	21
<b>Saelices</b>			
S1	J	28/05/2010	92
S2	M	28/05/2010	27
<b>Framontanos</b>			
Z1	J	07/03/2011	209
Z2	J	21/03/2011	224
Z3	M	03/05/2010	132
Z4	M	07/03/2011	288
Z5	M	21/03/2011	348

### 3.7. PURIFICACIÓN DE LA PEROXIDASA

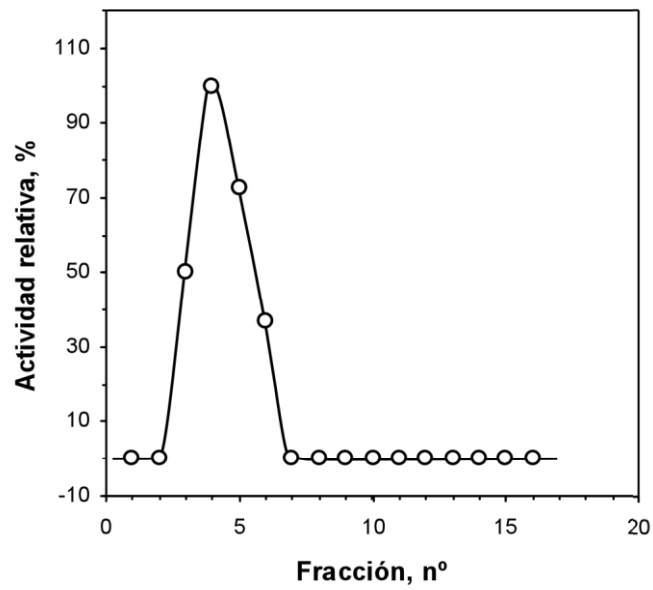
La purificación de la peroxidasa a partir de los extractos seleccionados se llevó a cabo mediante cromatografía líquida, aplicando de forma consecutiva las modalidades de interacción hidrofóbica, intercambio iónico y exclusión molecular.

#### 3.7.1. Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

En esta primera etapa cromatográfica, la muestra de extracto se hizo pasar por gravedad a través de una columna de fenil-sefarosa. En todos los casos se partió de 100 mL de los extractos obtenidos en la etapa previa de extracción, efectuada al pH de trabajo. La columna se equilibró con tampón universal 100 mM al pH de trabajo y 1.7 M de sulfato amónico. La proteína retenida se eluyó reduciendo la concentración de sulfato amónico hasta 200 mM en el mismo tampón. Para el seguimiento y valoración del proceso se midió la actividad peroxidasa y la concentración de proteína total en las diferentes fracciones eluidas.

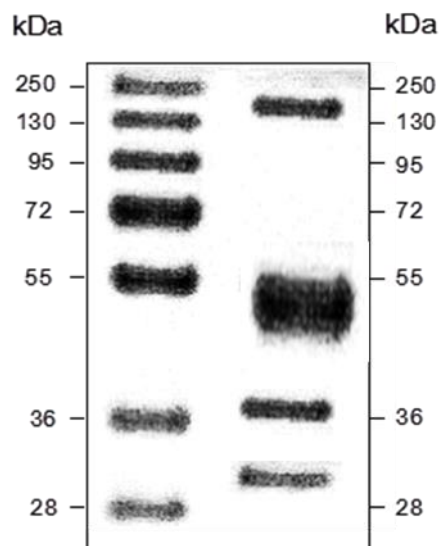
Se estudió la influencia del pH de las muestras de extracto y su contenido salino en la retención de la peroxidasa. El efecto del pH se estudió con extractos de pH variable entre 6 y 9. Para cada pH, la fuerza iónica de las muestras se incrementó con diferentes cantidades de sulfato amónico sólido de forma que la conductividad resultante se varió en el intervalo de 150 hasta 250 mS cm<sup>-1</sup>. La retención de la peroxidasa resultó ser óptima para las muestras de extracto con pH 7 y 230 mS cm<sup>-1</sup> de conductividad. Con valores de pH inferiores a 7 se obtenía una baja retención y conductividades por encima de 230 mS cm<sup>-1</sup> producían turbidez y precipitación de la peroxidasa (efecto “salting out”). En la Figura II-7 se muestra el perfil de elución obtenido al medir y comparar la actividad peroxidasa de las diferentes fracciones eluidas tras efectuar la retención en las condiciones propuestas. Para evaluar la eficacia de la separación, las fracciones con mayor actividad peroxidasa fueron agrupadas y concentradas por centrifugación (35 min, 3000 rpm, 4°C utilizando centricones Amicon Ultra 15 de MWCO 30000) y se realizó un análisis de la disolución resultante mediante electroforesis (SDS-PAGE). Efectuada la separación, se observó (Figura II-8) la existencia de al menos cuatro bandas, lo que indica la elución de al menos otras tres proteínas junto con la peroxidasa de interés. La banda

cercana a 55 kDa podría tratarse de una banda doble. Por los valores de masa molecular una de ellas podía ser la peroxidasa de interés.



**FIGURA II-7**

**Perfil actividad/elución de la HIC.**



**FIGURA II-8**

**SDS-PAGE tras la etapa de HIC.**



### 3.7.2. Cromatografía de intercambio iónico (IEC)

Una vez establecidas las condiciones más adecuadas para la separación por HIC, se pasó a evaluar la eficacia de la IEC como siguiente etapa de purificación. En esta etapa se consideró la posible retención en una columna de intercambio catiónico (HiTrap™ SP HP) y otra de intercambio aniónico (TSK gel-DEAE) de la peroxidasa de las fracciones eluidas en la etapa HIC. Se estudió el efecto del pH en la retención y recuperación en cada columna. Para ello, las fracciones de mayor actividad eluidas en la etapa HIC bajo las condiciones propuestas se mezclaron y homogeneizaron, dividiendo la disolución resultante en alícuotas que fueron dializadas durante 8 h frente a tampón universal 5 mM con pH variable entre 5 y 9, centrifugadas a 30000 rpm durante 15 min, filtradas utilizando una jeringa y un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  y posteriormente concentradas (35 min, 3000 rpm, 4°C utilizando centricones Amicon Ultra 15 de MWCO 30000). Las alícuotas dializadas a cada pH se introdujeron en la columna, previamente equilibrada con tampón universal 5 mM del mismo pH. En todos los casos, la elución se realizó mediante gradiente lineal de cloruro sódico (de 0 a 1 M) en el mismo tampón, con un caudal de 1 mL min<sup>-1</sup>. Para la evaluación de la retención, las columnas se conectaron a un equipo de purificación FLPC-ÄKTA con detector UV-Vis múltiple en el que se registraron simultáneamente los cromatogramas a 403 nm (hemoproteínas) y 280 nm (proteínas). Los cromatogramas se complementaron con medidas de la actividad peroxidasa y de la concentración total de proteínas en las fracciones eluidas.

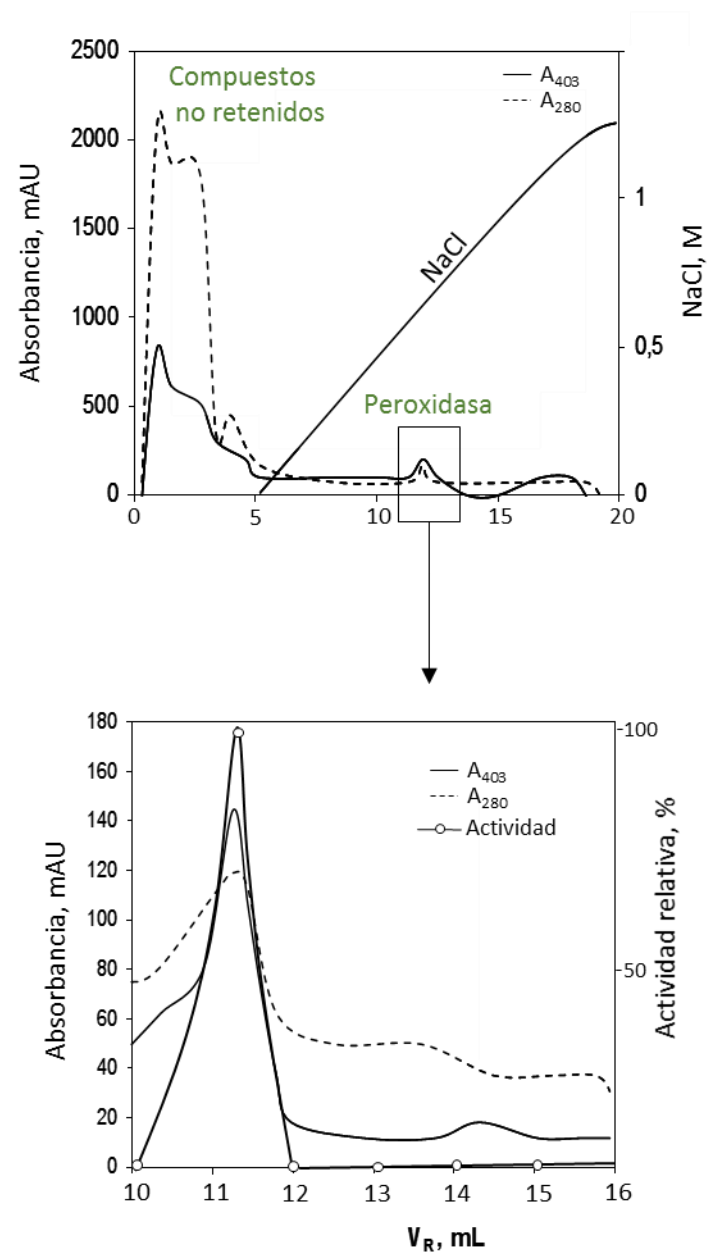
En experimentos preliminares se concluyó que la peroxidasa era retenida en la columna de intercambio catiónico ya que, para algunos de los pH estudiados, se observaba actividad peroxidasa en fracciones recogidas después de iniciado el gradiente de elución.

Por el contrario, en la columna de intercambio aniónico y a cualquiera de los pH estudiados, la actividad peroxidasa se observaba en la fracción recogida en residuo antes de comenzar el gradiente de elución, lo cual indica que la proteína pasaba por la columna sin quedar retenida. A diferencia de la peroxidasa, otros compuestos presentes en las alícuotas dializadas sí mostraron una elevada afinidad por la fase estacionaria de esta columna a los valores de pH estudiados. Algunas sustancias coloreadas quedaban inicialmente retenidas, siendo posteriormente

eluídas en el tramo final del gradiente. Debido a la presencia de estas sustancias, las alícuotas iniciales presentaban una coloración marrón oscura. Tras el paso por la columna y la retención de las sustancias coloreadas, las fracciones con peroxidasa, no retenida, presentaban un aspecto mucho más limpio que las alícuotas iniciales. A la vista de este comportamiento, se propone la utilización de la columna de intercambio aniónico como una etapa de limpieza de la muestra, previa a la cromatografía de intercambio catiónico.

Tras los experimentos preliminares, la optimización de la separación de la peroxidasa en esta etapa de purificación se basó en los criterios de retención y recuperación.

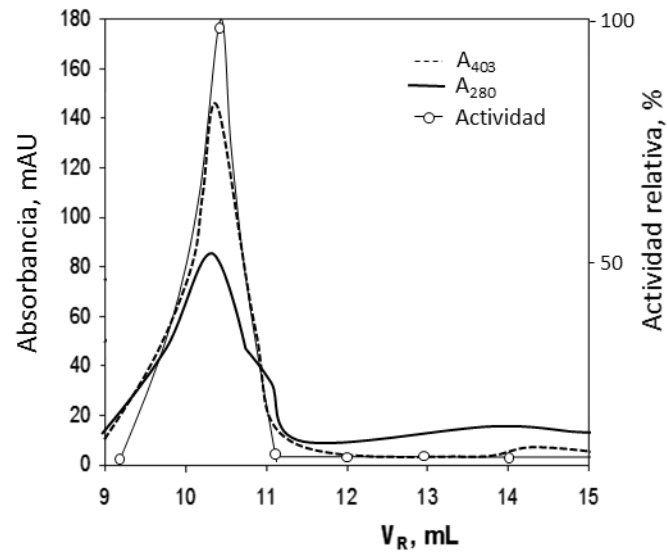
La retención de la peroxidasa en la columna de intercambio catiónico se observó a valores de pH comprendidos entre 5 y 7. A valores de pH superiores a 6, la actividad de las fracciones con peroxidasa no alcanzaba el 100 % de la actividad inicial y, además, el factor  $R_z$  era muy bajo, todo lo cual indicaba una baja recuperación. A pH 5.0 (Figura II-9), las fracciones con peroxidasa presentaban prácticamente el 100 % de la actividad inicial, lo que indicaba la recuperación total de la peroxidasa. Sin embargo, y como puede observarse por la relación de absorbancias a 403 y 280 nm, el valor del factor  $R_z$  también era bajo, lo cuál sugiere que la peroxidasa era eluída acompañada de otras impurezas, probablemente proteínas.

**FIGURA II-9****Cromatograma de intercambio catiónico a pH 5.0.**

Columna HiTrap™ SP HP

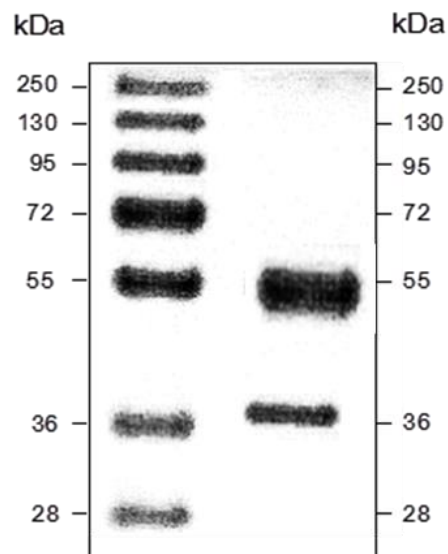
A pH 5.5 (Figura II-10), la actividad de las fracciones con peroxidasa era del 100 % y el valor de  $R_z$  era próximo a 2. Teniendo en cuenta la retención y recuperación de la peroxidasa se eligió un valor de pH de 5.5 como óptimo para esta etapa cromatográfica.

Como puede observarse en la Figura II-10, la señal de absorbancia a 280 nm presenta un pequeño hombro. Al tratarse de un proceso de cromatografía preparativa, habría sido posible desechar la fracción correspondiente a dicho hombro. Sin embargo, se decidió agrupar todas las fracciones con actividad peroxidasa y considerar la posibilidad de separar las pequeñas impurezas presentes en la siguiente etapa cromatográfica. El perfil electroforético de dichas fracciones agrupadas se muestra en la Figura II-11, en la que puede observarse la presencia de otra proteína.

**FIGURA II-10**

**Detalle del cromatograma de intercambio catiónico a pH 5.5.**

Columna HiTrap™ SP HP

**FIGURA II-11**

**SDS-PAGE tras la cromatografía de intercambio catiónico.**

### 3.7.3. Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Las fracciones con elevada actividad peroxidasa obtenidas en la etapa IEC bajo las condiciones propuestas (pH 5.5) se agruparon y mezclaron. La mezcla se sometió a concentración por centrifugación (35 min, 3000 rpm, 4°C utilizando centrífugas Amicon Ultra 15 de MWCO 30000) y posteriormente a diálisis durante 8 h frente a tampón universal 5mM de pH 5.5, con el fin de eliminar las sales incorporadas durante la elución. La disolución resultante se sometió a la última etapa de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular.

El equilibrado y elución en la columna (Superdex-200) se llevó a cabo con NaCl 150 mM en tampón universal 5 mM a pH 5.5, con un caudal de 0.5 mL min<sup>-1</sup>. Como en la etapa anterior, y para evaluar la eficacia de la separación, la columna se conectó al equipo con detector UV-Vis múltiple en el que se registraron simultáneamente los cromatogramas a 403 y 280 nm. Los cromatogramas se complementaron con medidas de la actividad peroxidasa y de proteína total.

En el cromatograma de la Figura II-12 se muestran los perfiles de absorbancia a 403 y 280 nm y los valores comparativos de actividad peroxidasa de las diferentes fracciones obtenidas. El solapamiento de los picos de A<sub>403</sub> y actividad indica que, en las condiciones propuestas, la elución de la peroxidasa tiene lugar a volúmenes próximos a los 10 mL. Los picos de A<sub>280</sub> que se observan a volúmenes de elución en torno a 8 y 11 mL indican la presencia de otros componentes separados en la muestra. Uno de dichos componentes podría ser de naturaleza proteica, en base al perfil electroforético obtenido al final de la etapa anterior, con diferente peso molecular, sin grupo hemo (A<sub>403</sub> es despreciable) y sin actividad peroxidasa.

Las condiciones experimentales propuestas para las diferentes etapas cromatográficas se resumen en la Tabla II-4.

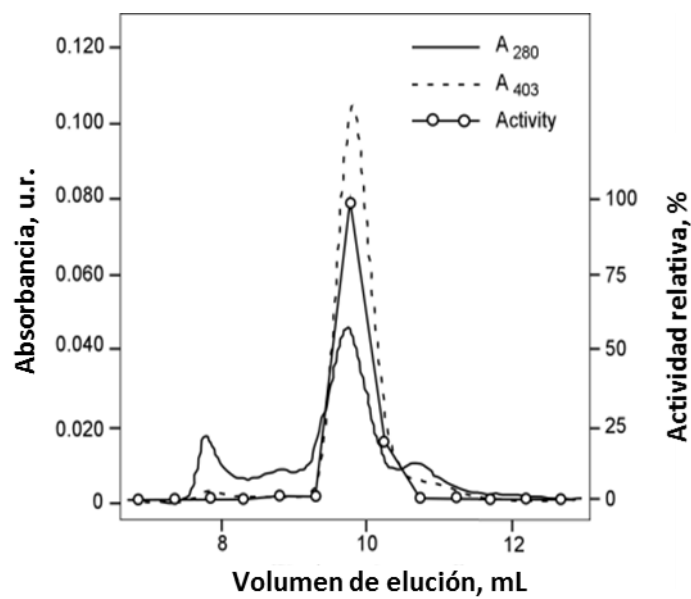


FIGURA II-12

Cromatogramas de absorbancia y actividad en la etapa SEC.

**Tabla II-4. Condiciones propuestas para las etapas cromatográficas.**

<b>Etapas/condiciones</b>
<p><b>Cromatografía hidrofóbica</b>            Columna: Fenil-sefarosa CL-4B            - Equilibrada con 100 mM tampón universal, pH 7, 1.7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>            Retención: muestras en 100 mM tampón universal, pH 7, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (230 mS cm<sup>-1</sup>)            Elución: 100 mM tampón universal, pH 7, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>
<p><b>Cromatografía de Intercambio Iónico</b>            Columna: intercambio catiónico, HiTrap™ SP HP            - Equilibrada con 5 mM tampón universal, pH 5.5            Retención: muestras en 5 mM tampón universal, pH 5.5            Elución: 0-1 M NaCl, gradiente lineal            Columna de limpieza: intercambio aniónico TSKgel-DEAE            - Equilibrada con 5 mM tampón universal, pH 5.5</p>
<p><b>Cromatografía de exclusión molecular</b>            Columna: Superdex-200            - Equilibrada con 5 mM tampón universal, pH 5.5, 150 mM NaCl            Elución: 5 mM tampón universal, pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.5 mL min<sup>-1</sup></p>



### 3.8. EVALUACIÓN DE LA PUREZA DE LA PEROXIDASA

Las fracciones con actividad peroxidasa obtenidas tras la última etapa cromatográfica se agruparon y mezclaron. La mezcla se sometió a concentración por centrifugación (35 min, 3000 rpm, 4°C utilizando centricones Amicon Ultra 15 de MWCO 30000) y posteriormente a diálisis durante 8 h frente a tampón universal 5 mM (pH 5.5). La disolución de peroxidasa purificada se almacenó a 4°C.

En la Tabla II-5 se muestran algunos parámetros significativos de cada una de las etapas del proceso de extracción y purificación. El rendimiento obtenido en el proceso global resultó ser del 38%.

La pureza de la peroxidasa obtenida tras las diferentes etapas de extracción y purificación se evaluó a través del perfil electroforético (SDS-PAGE) y del espectro de absorción UV-Vis de la disolución final obtenida.

En el desarrollo electroforético (Figura II-13) se observa una sola banda, y por tanto un único componente, correspondiente a una masa molecular en torno a 55 kDa, valor que está en concordancia con la masa molecular encontrada para otras peroxidasas vegetales <sup>[183]</sup>.

El espectro de absorción UV-Vis (Figura II-14) se registró con una disolución de peroxidasa en tampón universal 5 mM a pH 5.5 y 25 °C. Además de la banda a 280 nm, propia de las proteínas, en él se observa la banda de Soret (a 403 nm), característica de las hemoproteínas y bandas a 507 y 648 nm que son típicas de las peroxidasas vegetales. El valor del factor Reinheitszhal o número de pureza, calculado directamente del espectro mediante la relación de absorbancias a 403 y 280 nm, es 3.3 ( $R_z = A_{403}/A_{280} = 3.3$ ).

A la vista del perfil SDS-PAGE y teniendo en cuenta que los valores de  $R_z$  encontrados para las hemoproteínas puras están entre 2.5 y 4.2 <sup>[184]</sup>, puede considerarse que la separación y purificación de la peroxidasa de la planta de escoba blanca mediante las etapas propuestas se ha llevado a cabo de forma satisfactoria y con un elevado grado de pureza del producto final.

A lo largo del estudio realizado en el presente trabajo ha sido necesaria la purificación en otras épocas del año diferentes al periodo de floración de la escoba blanca. En todas las purificaciones llevadas a cabo se ha comprobado la reproducibilidad de los cromatogramas obtenidos en las diferentes etapas así como de los perfiles electroforéticos obtenidos y mostrados en este capítulo. Se encontraron

diferencias sin embargo en la concentración de proteína presente en las diferentes etapas así como en el rendimiento final del proceso, influenciado entre otras cosas, por la temperatura ambiente del laboratorio durante las diferentes etapas del proceso de extracción y purificación. El rendimiento final varió desde el 38-40 % obtenido en la etapa de floración (Febrero-Marzo), hasta un 23 % en Junio/Julio, pasando por un 33 % en Diciembre/Enero.

**Tabla II-5. Parámetros significativos en las etapas de extracción y purificación.**

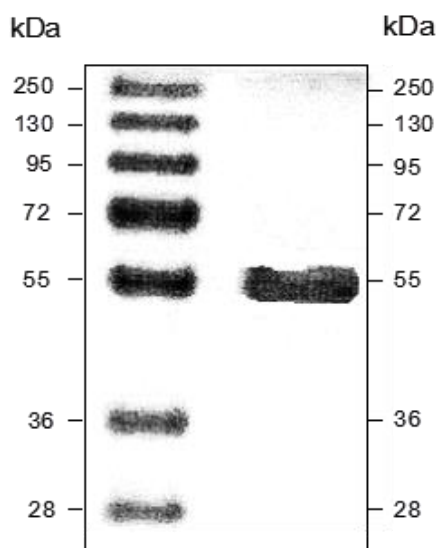
Etapa	Proteína total <sup>a</sup> mg g <sup>-1</sup>	Actividad total <sup>a</sup> U g <sup>-1</sup>	Actividad específica <sup>b</sup> U mg <sup>-1</sup>	Factor de purificación <sup>c</sup>	Rendimiento <sup>d</sup> %
<b>Extracción</b>	34.4	530	15	1	100
<b>Eliminación de fenoles</b>	2.71	332	123	8	63
<b>C. hidrofóbica</b>	0.300	309	1029	67	58
<b>C. de intercambio iónico</b>	0.054	229	4222	275	43
<b>C. de exclusión molecular</b>	0.011	200	17962	1168	38

<sup>a</sup> Por gramo de material vegetal

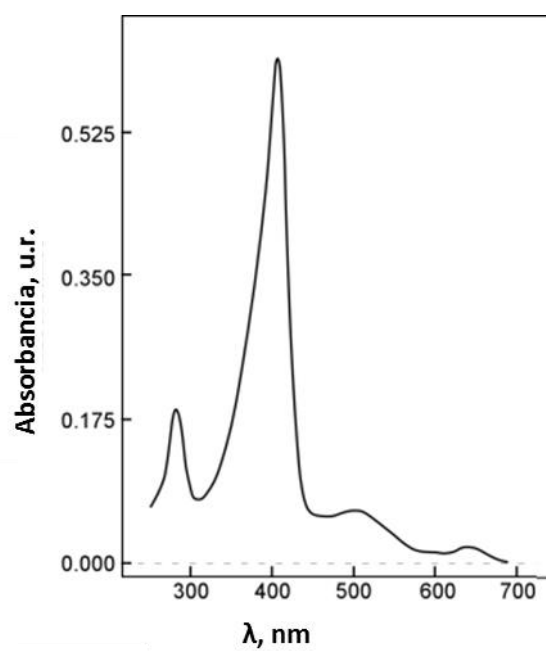
<sup>b</sup> Actividad específica = Actividad total/ Proteína total

<sup>c</sup> Factor de purificación = Actividad específica de cada etapa/Actividad específica tras la extracción

<sup>d</sup> Rendimiento= Actividad total de cada etapa/Actividad total tras la extracción

**FIGURA II-13**

**SDS-PAGE tras la etapa de SEC.**

**FIGURA II-14**

**Espectro de absorción UV-Vis de la peroxidasa de escoba blanca.**

## 4. CONCLUSIONES

Las conclusiones del trabajo realizado en el presente capítulo pueden resumirse en las siguientes:

- ❖ La elevada actividad peroxidasa encontrada en plantas de escoba blanca recolectadas en diferentes lugares y estaciones pone en evidencia que esta especie representa una fuente rica en dicha enzima.
- ❖ Se ha propuesto un procedimiento para la extracción y purificación de la peroxidasa de escoba blanca manteniendo el equilibrio entre rendimiento, tiempo y coste de producción.
- ❖ El perfil electroforético de la proteína una vez aplicado el procedimiento de extracción y purificación propuesto, así como el valor de  $R_z$  encontrado (3.3) ponen de manifiesto la elevada pureza de la peroxidasa obtenida.
- ❖ Como resultado de los estudios realizados, se propone la escoba blanca como posible alternativa al rábano picante como fuente de la peroxidasa (HRP) más comúnmente utilizada en aplicaciones comerciales. Esta alternativa proporcionaría un valor añadido a las elevadas cantidades de residuos de esta leguminosa obtenidos en la comunidad de Castilla y León.



### Capítulo III. CARACTERIZACIÓN DE LA PEROXIDASA DE ESCOBA BLANCA

---



## 1. OBJETO Y FUNDAMENTO DEL TRABAJO

El objetivo último del presente capítulo es caracterizar la nueva peroxidasa extraída y purificada de la planta escoba blanca. Los objetivos concretos que se pretenden alcanzar son los siguientes:

1. Adquirir un mayor conocimiento de la estructura de la nueva peroxidasa.
2. Llevar a cabo estudios de funcionalidad cuando la enzima es sometida a varias manipulaciones físicas o químicas. En dichos estudios se pretende, por un lado evaluar la estabilidad térmica y por otro la estabilidad frente al pH y las curvas de titulación proteica.
3. Caracterizar la nueva enzima desde un punto de vista cinético, de cara a sus posibles aplicaciones biotecnológicas.
4. Comparar sus características con otras peroxidasas vegetales aisladas y purificadas y poder así evaluar las ventajas e inconvenientes de su utilización en nuevas aplicaciones biotecnológicas o como sustituta de otras peroxidasas vegetales comúnmente utilizadas.





## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. INTRODUCCIÓN A LA ESTRUCTURA PROTEICA

La estructura tridimensional de una proteína es un factor clave del que depende su funcionalidad. Una proteína aislada adopta una única estructura tridimensional o un pequeño número de ellas. Las proteínas que se encuentran en cualquiera de sus conformaciones funcionales y plegadas se denominan proteínas nativas o en estado nativo. Es posible reconocer algunas estructuras de las más comunes que ayudan en la organización del conocimiento sobre la estructura proteica.

La conformación única o estado nativo de una proteína aparece cuando la macromolécula se encuentra en unas condiciones termodinámicas similares a las del medio fisiológico en el que desempeña su función. Sin embargo, por cambios en su entorno, las proteínas fácilmente pueden perder su estructura tridimensional. Este proceso, conocido con el nombre de desnaturalización, puede deberse a diversos factores tales como una variación de pH, temperatura o la adición de agentes desnaturalizantes, como son la urea o el GuHCl.

El proceso de desnaturalización puede ser reversible o irreversible. Cuando la proteína recupera el estado nativo al eliminar la causa de la desnaturalización, se trata de una desnaturalización reversible. La desnaturalización, en cambio es irreversible cuando la proteína pierde su estructura tridimensional y no la vuelve a recuperar aun eliminando la causa de la desnaturalización, perdiendo por tanto la capacidad de realizar su función biológica.

Los factores desnaturalizantes no afectan de igual modo a todas las proteínas. El estudio del efecto de dichos agentes desnaturalizantes en la estructura de una proteína en cuestión puede ayudar a entender el proceso de su plegamiento. Para desempeñar bien su función biológica, la estructura de una determinada proteína ha de ser ligeramente flexible. De ahí la importancia de todas las fuerzas que contribuyen a mantener la estabilidad proteica <sup>[185]</sup>.

### 2.1.1. Fuerzas que intervienen en la estabilidad de las proteínas

Si bien es cierto que la estructura tridimensional de una proteína viene determinada por su secuencia de aminoácidos, las fuerzas más importantes que estabilizan dicha estructura son de naturaleza no covalente. Uno de los tipos de tales fuerzas son las **interacciones electrostáticas**. Dentro de ellas puede distinguirse entre pares iónicos y puentes salinos. Un par iónico se define como la interacción entre dos residuos con carga opuesta. El par iónico se considera un puente salino cuando los centroides de los grupos cargados de los dos residuos se encuentran a una distancia de 4 Å y cuando al menos un átomo de oxígeno del grupo carboxílico de la cadena lateral de un aminoácido se encuentra a una distancia de 4 Å de un átomo de nitrógeno de otro <sup>[185]</sup>.

En ausencia de disolvente, las interacciones electrostáticas entre las cadenas laterales de los residuos de los diferentes aminoácidos que forman el puente salino y de estos puentes con residuos vecinos son más fuertes en el interior proteico <sup>[186]</sup>. Estas interacciones pueden estabilizar o desestabilizar las proteínas. La mayor parte de ellas estabilizan la proteína en estado nativo con una contribución de aproximadamente 3.5-4.0 kcal mol<sup>-1</sup> <sup>[186]</sup>. Por ejemplo, estudios de mutagénesis de puentes salinos (Glu34-Lys38) en la proteína de unión al ADN, HU de *Bacillus stearothermophilus* indican que estas interacciones incrementan la estabilidad térmica y que este efecto es más marcado en proteínas termófilas <sup>[187]</sup>.

Los pares iónicos de la superficie proteica contribuyen en menor medida a la estabilidad proteica (con menos de 1 kcal mol<sup>-1</sup>) en comparación con los puentes salinos presentes en el interior proteico <sup>[188]</sup>.

Otro tipo de interacciones relevantes en el mantenimiento de la estructura proteica son las **interacciones hidrofóbicas**. Se definen éstas como las que aparecen entre dos residuos apolares que se encuentran en el interior proteico. Fueron propuestas en un principio como las fuerzas dominantes de la estabilidad proteica. Sin embargo, en estudios posteriores se comprobó que los enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals de los grupos polares contribuyen casi del mismo modo <sup>[185]</sup>. De cualquier modo su contribución al mantenimiento de la estabilidad de la estructura proteica ha sido comprobada en numerosos estudios de mutagénesis dirigida. En dichos estudios, al sustituir un residuo apolar por otro de la misma naturaleza pero de menor tamaño y verse reducida por tanto la interacción hidrofóbica, se produce una desestabilización de la estructura proteica, debido probablemente a la presencia de huecos en el interior de dicha estructura <sup>[189]</sup>.

Como se ha mencionado con anterioridad, los **enlaces de hidrógeno e interacciones entre los grupos polares** de una proteína son también fuerzas que contribuyen significativamente al establecimiento de una estructura proteica nativa y a su estabilización. En una proteína desplegada, muchos grupos polares forman enlaces de hidrogeno con moléculas de agua. En cambio, en una proteína plegada, la mayoría de los grupos polares forman uno o más enlaces de hidrógeno intramoleculares con otros grupos del interior proteico. En las proteínas plegadas, suele existir un promedio de 1.1 enlaces de hidrogeno por residuo <sup>[190]</sup>. Los enlaces de hidrógeno más frecuentes son  $>C=O \cdots H-N<$  (68.1%) seguidos de  $>C=O \cdots$  Cadena lateral (10.9%),  $-H-N \cdots$  Cadena lateral (10.4%) y Cadena lateral  $\cdots$  Cadena lateral (10.6%) <sup>[190]</sup>.

La energía del enlace de hidrógeno depende de la constante dieléctrica y de su geometría. Una gran parte de los estudios experimentales indican que cada enlace de hidrógeno intramolecular contribuye entre 1 y 2 kcal mol<sup>-1</sup> a la estabilidad proteica <sup>[191]</sup>.

La contribución de un grupo concreto a la estabilidad depende, en gran medida, del entorno. Los grupos apolares internos generalmente estabilizan la proteína en estado nativo <sup>[192]</sup>. Sin embargo, los grupos polares internos estabilizan el estado nativo solo cuando el sitio está acomodado para albergar ese residuo <sup>[192]</sup>. Normalmente, si estos grupos forman enlaces de hidrógeno, contribuyen favorablemente a la estabilidad proteica ya que aumenta la densidad de empaquetamiento en el interior proteico y se incrementa así la contribución de las fuerzas de van der Waals.

En una proteína nativa, la densidad de empaquetamiento es muy alta y, como consecuencia de ello, las fuerzas de van der Waals son más grandes en el estado nativo que en el estado desplegado. A estas fuerzas contribuyen en mayor medida los residuos polares que los no polares. Por ello, los enlaces de hidrógeno, de manera indirecta, incrementan la densidad de empaquetamiento <sup>[193]</sup>.

## 2.2. ESTABILIDAD TÉRMICA Y FRENTE A CAMBIOS DE pH DE LAS PEROXIDASAS

Todas las peroxidasas presentan elevadas estabilidades térmicas y frente a los cambios de pH, si bien las peroxidasas de plantas son las más estables debido a elementos presentes en su estructura tales como los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , glicanos, puentes disulfuro, enlaces de hidrógeno y algunos residuos altamente conservados en el entorno del grupo hemo. Todos estos elementos estructurales parecen proteger a la enzima de la desnaturalización y éstos no se encuentran o se encuentran en menor proporción en las peroxidasas de Clase I y Clase II.

La cHRP es la peroxidasa hémica más estudiada. Desde que se descubrió su elevada estabilidad, se comenzó a utilizar en múltiples aplicaciones biotecnológicas y comenzó el estudio acerca de los componentes estructurales responsables de esta gran estabilidad.

Se ha estudiado su desnaturalización térmica mediante calorimetría diferencial de barrido al pH extremo de 3.0, donde la proteína aún mantiene su estructura y actividad intactas. La cHRP tiene una  $T^*$  (temperatura a la cual la constante cinética de primer orden toma el valor de  $1 \text{ min}^{-1}$ ) de 344.4 K y una  $E_A$  (energía de activación) de 38.4 kcal  $\text{mol}^{-1}$  [194]. Esta desnaturalización térmica es un proceso irreversible y controlado cinéticamente [194]. La enzima pierde actividad con el aumento de temperatura, observándose cambios en su estructura secundaria y en el entorno del Trp117 mediante medidas de dicroísmo circular a 222 nm y fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 297 \text{ nm}$ ), respectivamente.

Otros estudios han demostrado la elevada estabilidad de la cHRP frente al pH, manteniendo su estructura secundaria intacta en un intervalo de pH de 2.2-12.0.

Aunque la cHRP es la primera que se caracterizó y la más empleada industrialmente, en los últimos años se han encontrado peroxidasas en otras especies vegetales mucho más estables que la cHRP.

La desnaturalización térmica de la peroxidasa de soja (SBP) también es un proceso irreversible y ocurre a 90.5 °C (pH 8.0), a diferencia de cHRP cuya desnaturalización en las mismas condiciones ocurre a 81.5 °C [195]. A pH neutro, por medidas de dicroísmo circular a 410 nm, se registra una transición a 43 °C. En el caso de cHRP se registra a 45 °C. Como consecuencia de dichas transiciones se genera una reducción de la elipticidad observada del 13% en SBP y del 30% en cHRP. Estos datos indican una mayor estabilidad de la cavidad hémica en la SBP.

El descenso de pH, tanto en SBP como en cHRP, reduce la estabilidad térmica debido a la alteración de los enlaces de hidrógeno, estabilizadores tanto de la estructura secundaria como de la cavidad hémica [196]. Si se comparan los parámetros termodinámicos, se encuentra que  $\Delta G^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$  SBP es de  $\sim 43 \text{ kJ mol}^{-1}$  y  $\Delta G^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$  cHRP es de  $\sim 17 \text{ kJ mol}^{-1}$ . La estabilidad conformacional es, por tanto 2.5 veces mayor en SBP [196].

La peroxidasa de cebada (BP1) ha sido también caracterizada estructural y funcionalmente. BP1 es estable en un margen de pH 3.0-11.0, modificándose su banda Soret (máximo a 403 nm) en ese intervalo de pH. Es una enzima térmicamente muy estable, con una temperatura de transición de  $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (pH 6.6) y de  $67 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (pH's 4.0 y 8.3) [197].

Un grupo de peroxidasa con estabilidades muy altas son las que se encuentran en las hojas de plantas tropicales como las palmeras [198]. La primera peroxidasa de palma caracterizada fue la peroxidasa de palma africana (*Elaeis guineensis*). Su desnaturalización térmica a pH 3.0 es un proceso irreversible y controlado cinéticamente, como ocurre en el caso de la cHRP [197]. La peroxidasa de palma africana tiene una  $T^*$  de 347.5 K y una  $E_A$  de  $99.7 \text{ kcal mol}^{-1}$  [199] y es estable en el margen de pH 2.2-12.0.

## 2.3. TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD PROTEICA

### 2.3.1. Espectroscopia de absorción electrónica

Las medidas de absorbancia en el UV-Vis se usan comúnmente para la determinación de concentraciones de macromoléculas biológicas, a través de la relación entre la absorbancia y la concentración establecida en la ley de Beer-Lambert. La absorción por parte de cadenas polipeptídicas en la región de 220-300 nm está fundamentalmente determinada por los residuos aromáticos de aminoácidos. De entre los residuos aromáticos presentes en las proteínas, el espectro UV-Vis está dominado por los residuos triptófano y tirosina debido al mayor valor de los coeficientes de absorptividad, presentando una banda de absorción electrónica centrada en torno a 280 nm [200].

En la Tabla III-1 se resumen los coeficientes de absorptividad molar de cada uno de los tres aminoácidos aromáticos, así como la longitud de onda en la que suelen presentar un máximo de absorbancia. Aunque los aminoácidos aromáticos son los que contribuyen al espectro de absorción de una proteína en mayor medida, también los puentes disulfuro pueden tener una absorción débil alrededor de los 250 nm [200].

Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el espectro de absorción de los diferentes aminoácidos depende del entorno en el cuál éstos se encuentren. Los cambios en los espectros de absorción pueden ser observados en función de cambios en el disolvente utilizado.

**Tabla III-1. Propiedades de la absorbanza de aminoácidos aromáticos** <sup>[200]</sup>.

Compuesto	Absorbancia*	
	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ (L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
Triptófano	280	5600
Tirosina	274	1400
Fenilalanina	257	200

\*: Valores en medio acuoso a pH 12

Son más interesantes los cambios en el entorno de los diferentes aminoácidos que tienen lugar durante el proceso de desnaturalización proteico. En la mayor parte de las estructuras proteicas, los aminoácidos aromáticos están dispuestos hacia el núcleo hidrofóbico en la estructura cuaternaria, quedando expuestos al disolvente durante el proceso de desnaturalización. Esta exposición a un entorno fundamentalmente hidrófilo da lugar a un descenso del valor de absorbanza en la región de 285-295 nm <sup>[201]</sup>.

Determinadas familias de proteínas tales como las hemoproteínas exhiben, además de la banda de absorción característica de todas las proteínas centrada a 280 nm, otra banda característica en torno a 400 nm denominada banda Soret, debida a la unión del grupo hemo. En los procesos de desnaturalización se producen cambios en la intensidad y posición de la banda Soret asignados a la pérdida del grupo hemo.

### 2.3.2. Espectroscopía de fluorescencia

En las estructuras proteicas, la fluorescencia está casi siempre dominada por los residuos de triptófano <sup>[200]</sup>. En la Tabla III-2 se resumen las propiedades de la fluorescencia de aminoácidos aromáticos. En ella se observa un mayor rendimiento cuántico para este aminoácido, lo que se traduce en una sensibilidad mucho mayor en el caso del triptófano en comparación con fenilalanina y tirosina.

El máximo de emisión de una proteína se encuentra en general a longitudes de onda menores o iguales a 350 nm, que corresponde al máximo de fluorescencia del triptófano en disolución acuosa <sup>[200]</sup>. La emisión por parte de la tirosina y el triptófano se observa con una excitación cercana a 280 nm. La fluorescencia debida al triptófano puede ser investigada selectivamente excitando a longitudes de onda próximas a 295 nm <sup>[201]</sup>. Por lo tanto, una comparación de los espectros de fluorescencia con excitación a 280 y 295 nm puede darnos idea de la contribución de ambos aminoácidos a la estructura proteica.

La localización exacta de este máximo depende en gran medida del entorno del aminoácido. En un entorno totalmente hidrofóbico, como puede ser el interior de la estructura proteica totalmente plegada, la emisión debida a residuos de triptófano se da a longitudes de onda menores, teniendo en cuenta que una disolución de triptófano en hexano presenta un máximo de emisión a 320 nm <sup>[200]</sup>.

Los cambios en la conformación de una proteína en el proceso de desnaturalización habitualmente se traducen en cambios importantes en el espectro de fluorescencia. En el caso de las proteínas que no contienen triptófano, los cambios en el entorno de la tirosina son fundamentalmente cambios en la intensidad de fluorescencia. En este sentido, la fluorescencia en el estado nativo puede ser más o menos intensa que en el estado desnaturalizado. Dependerá de si existen otros residuos aromáticos cercanos que puedan actuar como quenchers. En las proteínas que sí contienen triptófano ocurren además de cambios en la intensidad, desplazamientos de los picos. En este caso es difícil generalizar en cuanto al comportamiento. El desplazamiento puede ser hacia longitudes de onda mayores o menores dependiendo del caso concreto y los cambios en las intensidades pueden ser también para dar lugar a intensidades mayores o menores.

**Tabla III-2. Propiedades de la fluorescencia de aminoácidos aromáticos** <sup>[200]</sup>.

Compuesto	Fluorescencia		
	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\Phi_F^{b*}$	Sensibilidad ( $\epsilon_{\max} \Phi_F^b$ )
Triptófano	348	0.20	1100
Tirosina	303	0.14	200
Fenilalanina	282	0.04	8

\* : Rendimiento cuántico de la fluorescencia

### *Modelo de los estados discretos del triptófano*

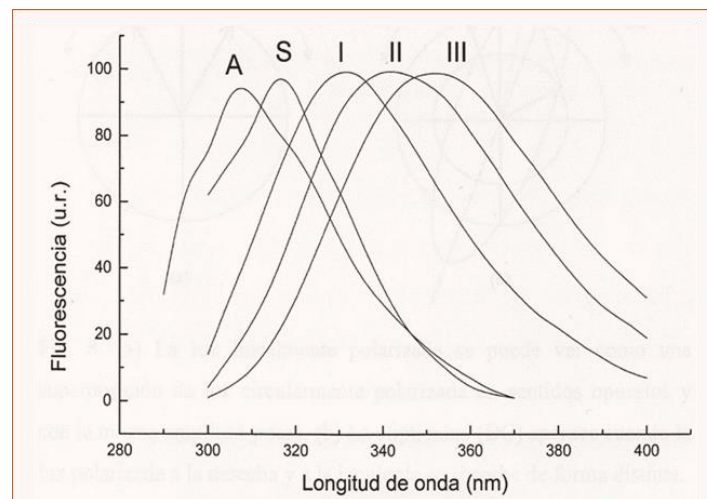
Un análisis de deconvolución del perfil de los espectros de fluorescencia del triptófano de un gran número de proteínas en varias condiciones, permitió a Burstein en 1976 <sup>[202]</sup> formular el modelo de los estados discretos del triptófano en las proteínas. Según este modelo existen cinco posibles estados físicos para los residuos triptófano de las proteínas, denominados A, S, I, II, III. Cada estado se caracteriza por su propio espectro de fluorescencia (Figura III-1):

- **Estado A:** El triptófano se encuentra en un ambiente totalmente hidrofóbico. El máximo de emisión aparece entre 310-315 nm. Es un estado muy poco frecuente, sólo ha sido detectado en la azurina.
- **Estado S:** El triptófano se encuentra en un ambiente apolar, pero formando un complejo 1:1 con algún grupo polar vecino. Aparece un máximo entre 315-320 nm y hombros en 305-307 nm y 320-330 nm.
- **Estado I:** Corresponde a un entorno apolar alrededor del triptófano. Dicho aminoácido se encuentra formando un complejo 2:1 con algún grupo polar vecino. El máximo aparece a 330-332 nm y con una anchura de 48-50 nm.
- **Estado II:** En este estado los residuos de triptófano se encuentran en el exterior de la proteína en contacto con moléculas de agua con movimientos limitados (agua ligada). El máximo aparece a 340-342 nm y con una anchura de 53-55 nm.



- **Estado III:** Se corresponde en este caso con triptófano superficial rodeado de moléculas de agua. El espectro es igual al de emisión de una disolución de triptófano, con un máximo a 350-353 nm y una anchura de la banda entre 59 y 61 nm.

Estudiando las transiciones de un estado a otro de los triptófanos se pueden caracterizar cambios en el entorno de estos residuos, lo que permite obtener información estructural y algunos parámetros fisicoquímicos de la proteína objeto de estudio.



**Figura III-1.** Espectros de los distintos estados discretos del triptófano.

### 2.3.3. Espectroscopía de dicroísmo circular

El dicroísmo circular (CD: *Circular dichroism*) es una de las técnicas espectroscópicas más sensibles para obtener información estructural de una proteína [203]. En este sentido, a partir de los espectros de CD se puede establecer el contenido de estructuras secundarias de una proteína (porcentaje de  $\alpha$ -hélice y de láminas- $\beta$ ), pudiéndose determinar también cómo determinados tratamientos físicos o químicos alteran la estructura secundaria [204].

Cuando la luz circularmente polarizada atraviesa una muestra ópticamente activa, sus componentes se absorben en distinta magnitud a derecha y a izquierda ( $\epsilon_D \neq \epsilon_L$ ), lo que genera luz elípticamente polarizada.

Los espectros de CD miden la elipticidad molar ( $\Theta$ ) frente a la longitud de onda [205]. El cromóforo más importante presente en las proteínas en el UV-lejano (180-250 nm) es el grupo amida del enlace peptídico, que posee un  $C_\alpha$  asimétrico. El CD es por tanto, una técnica muy sensible a cambios en la estructura secundaria. Por otro lado, en el UV-cercano (250-340 nm), se reflejan contribuciones de cadenas laterales, puentes disulfuro, aminoácidos aromáticos y grupos prostéticos. En la Tabla III-3 se resumen los máximos y mínimos que aparecen en los espectros de CD de las proteínas en función de su estructura secundaria.

La determinación de la estructura secundaria de una proteína por análisis de los espectros de CD tiene diferentes grados de exactitud en función de la estructura que se esté determinando. Este hecho es debido a la diferencia en la intensidad de las señales características de cada tipo de estructura secundaria. Si la estructura es de  $\alpha$ -hélice se tiene un 97% de exactitud, en el caso de láminas- $\beta$  la exactitud es de un 75% aproximadamente y para giros u otro tipo de estructura es del 50% y del 89%, respectivamente [206].

La determinación de la estructura secundaria de una proteína a partir de su espectro de CD se realiza mediante bases de datos de espectros de CD de proteínas de referencia, compuestas de elementos de estructura secundaria conocida. La combinación de los resultados de ajustes procedentes de varios programas que utilizan diferentes funciones matemáticas permite construir el grupo de proteínas de referencia [207, 208].

**Tabla III-3. Bandas que aparecen en los espectros de CD de proteínas.**

Estructura secundaria	Máximos (nm)	Mínimos (nm)
Todo $\alpha$	191-193	222 y 208-210
Todo $\beta$	190-200	215-218
Mixta* ( $\alpha + \beta$ )	190-195	222 y 208-210
Giro desordenado	212	195
Proteína desnaturalizada	220-230	200

\*: En la estructura mixta predominan las  $\alpha$ -hélices

#### 2.3.4. Otras técnicas de estudio de la estructura proteica

La **presión hidrostática** es una herramienta para el estudio termodinámico del plegamiento de proteínas y la interacción entre ellas, así como la dinámica y la estructura de los intermedios plegados. Ésta última constituye una de las principales innovaciones de la alta presión, puesto que la estabilización de estructuras de intermedios plegados permite la caracterización de dichos intermedios y un mejor conocimiento del plegamiento y de anomalías en el plegamiento proteico <sup>[209]</sup>.

La **calorimetría diferencial de barrido** (DSC: *Differential Scanning Calorimetry*) es una de las técnicas experimentales más reproducibles para estudiar los cambios estructurales inducidos por el incremento de temperatura en proteínas <sup>[210]</sup>, ácidos nucleicos <sup>[211]</sup> y biomembranas <sup>[212, 213]</sup>. Resulta además, una técnica adecuada para la caracterización termodinámica de sistemas macromoleculares y para realizar estudios de desnaturalización térmica de proteínas, determinando los factores que afectan a su estabilidad <sup>[214]</sup>.

## 2.4. MEDIDA DE LA ESTABILIDAD CONFORMACIONAL DE UNA PROTEÍNA

La estabilidad de una determinada proteína, especialmente de las enzimas, es un concepto interesante de conocer puesto que puede limitar su utilización en determinadas aplicaciones biotecnológicas <sup>[215]</sup>. Los estudios de estabilidad de diferentes proteínas ayudan a comprender mejor las fuerzas que estabilizan dichas estructuras plegadas o funcionales. Por un lado, se puede hablar de estabilidad química de la estructura covalente, referida a cambios en la estructura primaria de la proteína y tratándose normalmente de procesos irreversibles. Por otro lado, se puede hablar de estabilidad conformacional, entendiendo ésta como la estabilidad del estado plegado o nativo de la proteína, en ausencia de cambios en su estructura primaria <sup>[216]</sup>.

El primer punto a resolver en un estudio de la estabilidad proteica es la elección de una o varias técnicas que permitan el seguimiento del proceso de cambio en su conformación. En la Figura III-2 se muestra una **curva de desnaturalización** térmica típica. Dicha curva monitoriza una propiedad física determinada (rotación óptica en este ejemplo) frente al agente determinante de la estabilidad (en este caso la temperatura). Las conformaciones ordenadas que las proteínas adoptan sufren cambios profundos cuando se alteran las condiciones termodinámicas del sistema. Estos cambios profundos se denominan **transiciones**. La transición conformacional está provocada, en general, por variaciones pequeñas en parámetros tales como temperatura, pH, presión, disolvente, etc.

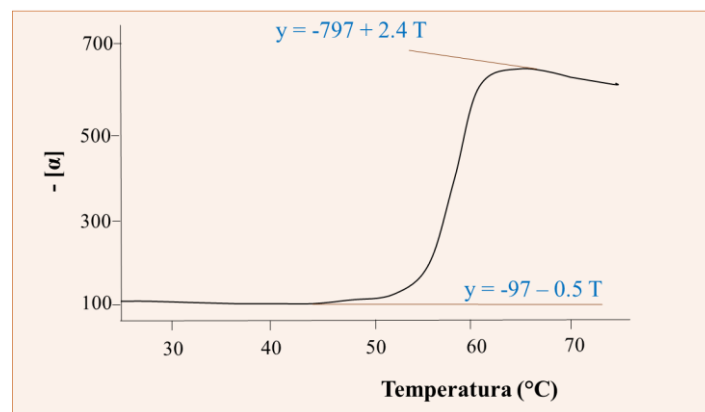
Una curva de desnaturalización está dividida en tres zonas fundamentales:

- La **región pre-transición**, que muestra la variación de la propiedad seguida en la proteína nativa.
- La **región de transición**, que muestra cómo varía la propiedad que se monitoriza a medida que va produciéndose la desnaturalización por acción de la temperatura.
- Y la **región post-transición**, que muestra la variación de la propiedad física estudiada en la conformación desnaturalizada. En la Figura III-2 la curva en el estado pre y post-transicional se ha ajustado a sendas rectas mediante regresión lineal por mínimos cuadrados <sup>[200]</sup>.

Para investigar la reversibilidad del proceso de desnaturalización, una vez finalizado éste se invierte el proceso, es decir, si se ha calentado con el fin de estudiar la desnaturalización térmica, se enfriará midiendo la propiedad correspondiente y comparando con el estado inicial. Es adecuado también producir un nuevo calentamiento,

registrando de nuevo la curva de desnaturalización, comprobándose si se obtiene una curva similar a la anterior o por el contrario se obtiene una curva que carece de transición, lo cuál evidencia que la desnaturalización térmica ocurrió y no hubo posibilidad de recuperar la conformación inicial. Esta proteína muy probablemente habrá perdido su funcionalidad.

Para el estudio de una desnaturalización térmica **reversible** se utiliza un análisis termodinámico, considerando la existencia de un equilibrio químico entre los estados de la proteína significativamente poblados. El ajuste de los datos experimentales puede llevarse a cabo con un modelo teórico de dos estados o al modelo de equilibrio de varios estados conocido también como modelo de multiestados. Cuando la transición conformacional es **irreversible**, dicha transición se ve distorsionada por la cinética del proceso. Es por ello que, el estudio de transiciones irreversibles, se aborda desde un punto de vista cinético. Dentro de los modelos teóricos a los cuáles es posible ajustar los datos correspondientes a una transición conformacional irreversible, destaca el modelo de Lumry-Eyring y su aproximación al modelo de dos estados, ampliamente utilizado para el ajuste y cálculo de parámetros de numerosas peroxidasas.



**Figura III-2.** Ejemplo de una curva de desnaturalización térmica.

## 2.5. CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE REACCIONES ENZIMÁTICAS BISUSTRATO

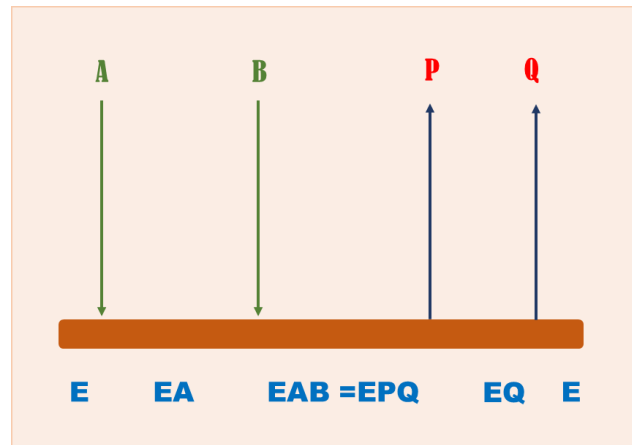
### 2.5.1. Tipos de mecanismos

El 60% de las reacciones enzimáticas conocidas involucran más de un reactivo y generan también más de un producto. Suelen tratarse de reacciones de transferencia, en las cuales la enzima cataliza la transferencia de un grupo funcional de un reactivo o sustrato a otro, o de reacciones de oxidación-reducción, en las cuales se transfieren equivalentes de reducción entre dos sustratos <sup>[217]</sup>.

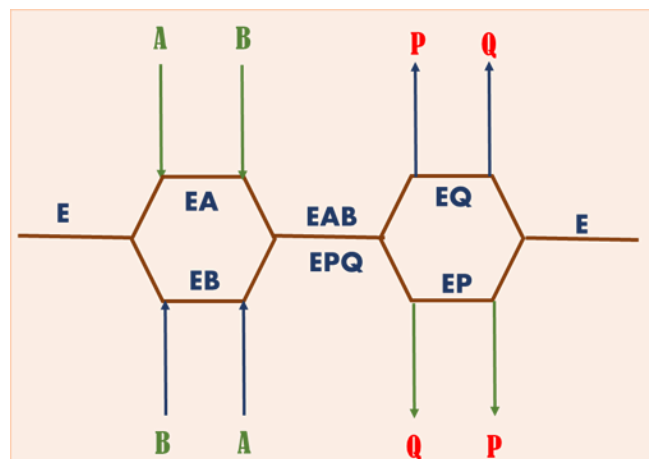
En principio, las reacciones bisustrato podrían llevarse a cabo por medio de una gran variedad de mecanismos. Sin embargo, dos de ellos son los que se observan comúnmente. El primer tipo de mecanismo recibe el nombre de **secuencial**. Se consideran reacciones secuenciales aquellas en las cuales todos los sustratos se combinan con la enzima antes de la generación de cualquier producto <sup>[217]</sup>. En algunos textos este tipo de reacciones recibe también el nombre de reacciones de desplazamiento simple. Las reacciones que siguen un mecanismo secuencial están clasificadas en dos subcategorías:

- Reacciones que siguen un **mecanismo secuencial ordenado**: son aquellas en las que la adición de los sustratos a la enzima tiene un orden obligatorio. En este tipo de reacciones la unión del primer sustrato a la enzima parece ser condición necesaria para que se produzca la unión con el segundo sustrato <sup>[217]</sup>, probablemente como consecuencia de cambios conformacionales en la estructura enzimática.
- Reacciones que siguen un **mecanismo secuencial al azar**: son aquellas en las que no existe un orden preferente en la unión de los sustratos al centro activo de la enzima <sup>[217]</sup>. Dependiendo del orden de adición de reactivos y salida de productos se tienen diferentes intermedios de la enzima.

En las Figuras III-3 y III-4 aparecen representados esquemáticamente los mecanismos secuenciales ordenado y al azar respectivamente, siguiendo la nomenclatura de Cleland <sup>[218]</sup>. Según dicha nomenclatura, los sustratos aparecen designados con las letras A y B en el orden en el cual se agregan a la enzima. Los productos se designan con las letras P y Q y aparecen también en el orden en el cual dejan libre a la enzima. Por último, la enzima en su estado nativo (E), así como otros estados intermedios (complejos enzima-sustrato, etc.) se encuentran en una línea horizontal.



**Figura III-3.** Mecanismo secuencial ordenado según la nomenclatura de Cleland.

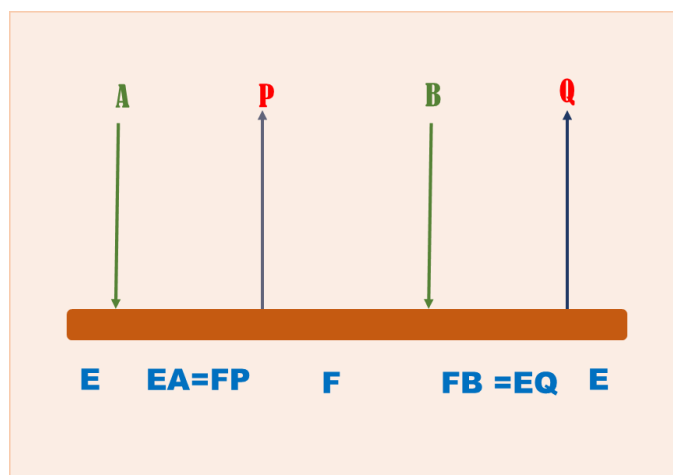


**Figura III-4.** Mecanismo secuencial al azar según la nomenclatura de Cleland.

El segundo tipo de mecanismo habitual en las reacciones enzimáticas bisustrato es el mecanismo **ping-pong**. En dicho mecanismo uno o varios productos se generan antes de que se produzca la unión de todos los sustratos a la enzima <sup>[217]</sup>. El esquema de este tipo de reacciones siguiendo la nomenclatura de Cleland <sup>[218]</sup> se muestra en la Figura III-5. En este caso un grupo funcional del primer sustrato es desplazado por la enzima para generar el primer producto (P) y una forma intermedia estable de la enzima en la cual el grupo funcional desplazado suele encontrarse covalentemente unido a la enzima (**ping**). A continuación, se produce el desplazamiento de dicho grupo funcional por un segundo sustrato, generando el producto Q y recuperando la enzima en su forma nativa (**pong**).

Los términos Uni, Bi, Ter, etc. indican reacciones enzimáticas de uno, dos, tres, etc. reactivos en un sentido determinado de la reacción. Así, una reacción enzimática de dos sustratos y dos productos que sigue un mecanismo ping-pong, recibe el nombre de reacción ping-pong Bi-Bi.

Para elucidar el tipo de mecanismo que sigue una reacción enzimática bisustrato se utilizan medidas cinéticas en el estado estacionario.



**Figura III-5.** Mecanismo ping-pong según la nomenclatura de Cleland.



### 2.5.2. Constantes cinéticas: nomenclatura

Se pretende en este apartado introducir la nomenclatura y significado de las constantes cinéticas que aparecen a lo largo del presente capítulo.

La letra  $K_m$  acompañada de un superíndice referido a un determinado reactivo hace referencia a la constante de Michaelis-Menten para dicho sustrato o reactivo en cuestión. Se define en términos generales como la concentración de reactivo que produce la mitad de la máxima velocidad de reacción, en condiciones saturantes del resto de reactivos y suponiendo que no existe una concentración significativa de producto <sup>[218]</sup>.  $K_m$  tiene unidades de concentración y da idea de la afinidad de la enzima por un determinado sustrato. En este capítulo se evalúan diferentes sustratos reductores en presencia de un sustrato fijo para peroxidasas, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Los diferentes sustratos reductores se denotan con la expresión general  $AH_2$ . Se tendrán entonces las constantes  $K_m^{H_2O_2}$  y  $K_m^{AH_2}$ .

El término  $K_I$  se reserva para todas las constantes de inhibición. De nuevo, en el caso de tener la necesidad de distinguir entre constantes de inhibición propias de un determinado sustrato u otro, se indicará con un superíndice ( $H_2O_2$  o  $AH_2$ ).

$k_{cat}$  es conocida como número de recambio y tiene habitualmente unidades de tiempo<sup>-1</sup>. Literalmente su significado es el tiempo necesario para cambiar de un mol de sustrato a un mol de producto en condiciones óptimas. Constituye por tanto, una medida directa de la producción catalítica en dichas condiciones <sup>[218]</sup>. No debe confundirse con el número de recambio en un proceso de inhibición ( $r$ ) definido como la concentración del inhibidor que produce una inhibición del 100%.

La relación  $k_{cat}/K_m$  se denomina eficacia catalítica. Constituye una medida de la eficiencia y especificidad de la enzima por un sustrato en concreto <sup>[218]</sup>, permitiendo en este sentido la comparación entre diferentes sustratos.

Cada uno de los pasos individuales en un ciclo catalítico lleva asociada una constante cinética. Se trata en este caso de las **constantes microscópicas**, cuya notación suele ser una  $k$  acompañada de un subíndice numérico para indicar el paso concreto del ciclo al que se refiere. Dependiendo de si la etapa concreta es de primer orden o de segundo orden, las constantes tendrán unidades de concentración<sup>-1</sup> tiempo<sup>-1</sup> (segundo orden) o simplemente tiempo<sup>-1</sup> (primer orden).

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. REACTIVOS, APARATOS Y MATERIAL

##### 3.1.1. Reactivos

- Guayacol (2-metoxifenol),  $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{OH}$ , 98 %, PRS (Panreac).
- 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) sal diamónica (ABTS),  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4$ , >98 %, (Sigma).
- o-dianisidina,  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ , peroxidase substrate (Sigma).
- o-fenilendiamina,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2$ , > 99.5 % (Sigma).
- Catecol (1,2-bencenodiol).  $\text{C}_6\text{H}_4$ -1,2-(OH)<sub>2</sub>, > 99 %, (Sigma).
- Ácido ferúlico,  $\text{HOC}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$ , (Sigma).
- Peróxido de hidrógeno,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30 % p:v, PA (Panreac).
- Ácido clorhídrico, HCl, 35 % p:v, PA, (Panreac).
- Hidróxido sódico, NaOH, 98.0-100.5 %, PRS (Panreac).
- Tampón HEPES,  $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ , > 99.5 % (Sigma).
- Kit de calibración de baja masa molecular (LMW) GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia (20-4038-41).
- Kit de calibración de alta masa molecular (HMW) GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia (28-4038-42).
- Acetato sódico anhidro,  $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ , Molecular Biology Grade, (CALBIOCHEM).
- Cloruro sódico, NaCl, P.A. (Panreac).
- Membrana de diálisis de celulosa, 12000 MW, (Sigma Chemical Co).
- Ácido bórico,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 99.5 %, P.A. (Panreac).
- Dihidrógeno fosfato sódico monohidratado,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 98 %, P.A. (Panreac).
- Pirogalol (1,2,3-trihidroxibenceno),  $\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_3$ , >98 %, (Sigma).
- Cloruro de zinc,  $\text{ZnCl}_2$ , 99.999 %, (Sigma).
- Cloruro de litio, LiCl, ACS Reag. Ph. Eur., (Merck Millipore).
- Cloruro de magnesio hexahidratado,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Ph. Eur. (Merck Millipore).
- Cloruro de bario,  $\text{BaCl}_2$ , P.A. (Panreac).
- Cloruro de manganeso,  $\text{MnCl}_2$ , P.A. (Panreac).
- Cloruro de cobre,  $\text{CuCl}_2$ , >98 % (Sigma).
- Cloruro de cadmio,  $\text{CdCl}_2$ , P.A. (Panreac).
- Cloruro de calcio,  $\text{CaCl}_2$ , P.A. (Panreac).

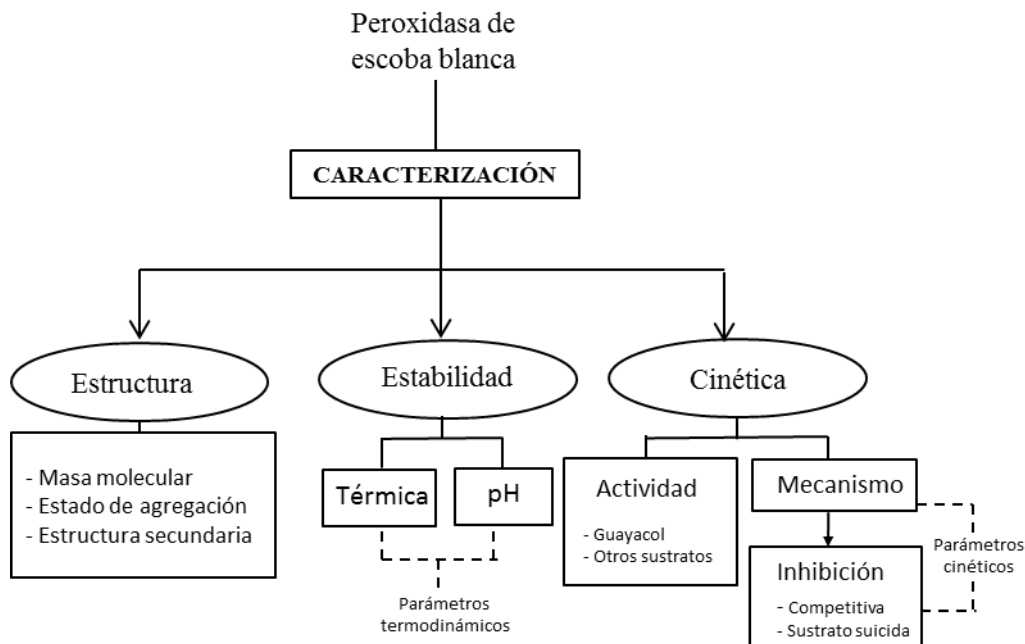
- Cloruro férrico,  $\text{FeCl}_3$ , P.A. (Panreac).
- Cloruro de aluminio,  $\text{AlCl}_3$ , P.A. (Panreac).
- Cloruro potásico,  $\text{KCl}$ , P.A. (Panreac).
- Cloruro ferroso,  $\text{FeCl}_2$ , P.A. (Panreac).
- Cloruro de mercurio,  $\text{HgCl}_2$ , P.A. (Panreac).

### 3.1.2. Aparatos y material

- Espectrofluorímetro Perkin Elmer LS50B (Waltham, Massachusetts). Cubetas de cuarzo para fluorescencia. 1 x 2 cm y 0.2 x 2 cm (Hellma GMBH and Co. KG, Mülheim, Alemania).
- Espectropolarímetro Jasco J-715 (JASCO Inc. Easton, MD).
- Equipo FLPC ÄKTA (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).
- Columna Superdex-200 10/300 GL. GE Healthcare Life Sciences.
- Columna Superdex-75 10/300 GL. GE Healthcare Life Sciences.
- Espectrofotómetro de doble haz T80+ PG UV/Vis (Instruments LTD, Leicester, UK). Cubetas de absorción de cuarzo. 1 x 2 cm (Hellma GMBH Co. KG. Mülheim, Alemania).
- Conductímetro ATC HI 9835 (PCE Group Ibérica S.L. 02500, Albacete, España).
- Microelectrodo de pH 6 mm (Crison Instruments, SA, E-08328, Alella, Barcelona, España).
- pHmetro digital Crison micropH 2001 (Crison Instruments, SA, E-08328, Alella, Barcelona, España).
- Aparato de electroforesis vertical en placa (BioRad Laboratories, Hercules, CA).
- Baño Speed-Vac Savant (GMI, Inc. Minnesota 55303, USA).
- Baño termorregulable Neslab RT-111 Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA).
- Material de uso común en laboratorio de química y bioquímica.

## 3.2. PLAN EXPERIMENTAL

Los diferentes experimentos realizados se desarrollaron según las etapas que se muestran a continuación (los detalles de las diferentes etapas se describen en los apartados subsiguientes):



En primer lugar se determinan características estructurales de la nueva peroxidasa, tales como la masa molecular, el estado de agregación y el tipo de estructura secundaria.

A continuación, se estudia la estabilidad de la molécula de enzima frente a cambios de temperatura y de pH. Se utilizan para ello las técnicas de fluorescencia intrínseca de proteínas, dicroísmo circular y espectroscopía de absorción UV-Vis, obteniéndose y comparándose los parámetros termodinámicos del proceso de desnaturalización proteica.

Finalmente, se procede a la caracterización cinética de la nueva enzima. Por un lado, se estudia la actividad catalítica y por otro, se establece el mecanismo de catálisis. Respecto a la actividad, se estudia la especificidad por sustrato, considerando la influencia del pH y la composición del medio tamponante. Además, y dado que el guayacol es un sustrato de referencia en las medidas de actividad peroxidasa, se estudia el efecto de algunas variables significativas en la actividad con este sustrato. En cuanto al mecanismo, se calculan los parámetros cinéticos característicos de la reacción bisustrato y se estudian los procesos de inhibición competitiva por sustrato e inhibición por sustrato suicida.

### 3.2.1. Medida de la actividad peroxidasa

El control de la actividad peroxidasa se realizó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y guayacol como cosustratos y medidas de absorbancia a pH 6.0 y 25 °C, tal y como se describe en el apartado 3.5 del Capítulo I (Pág. 51) (Comparación con la peroxidasa de rábano picante).

### 3.3. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR Y ESTADO DE AGREGACIÓN

La masa molecular de la peroxidasa de escoba blanca se ha determinado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y mediante SEC. Con el fin de establecer el estado de agregación de la peroxidasa de escoba blanca, ambos valores han sido comparados.

El protocolo experimental aplicado para llevar a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida se describe en el Capítulo II (Pág 93) (Electroforesis en gel de poliacrilamida).

Para obtener la masa molecular mediante SEC, se ha hecho pasar un kit de proteínas de GE Healthcare Life Science de masa molecular conocida a través de una columna de exclusión molecular, registrando los correspondientes valores del volumen de elución. Se utilizaron dos tipos de columnas, Superdex-75 y Superdex-200 en un equipo ÄKTA<sub>FPLC</sub>. Ambas columnas se diferencian por el rango de masas moleculares que son capaces de separar. Las columnas se equilibraron en tampón acético/acetato 5 mM pH 5.5 y 150 mM de NaCl. La temperatura fue 20 °C, el volumen de inyección 100 µl y la velocidad de flujo 0.4 ml min<sup>-1</sup>.

A partir de los volúmenes de elución frente a la masa molecular de las proteínas utilizadas como patrón se construyó la correspondiente recta de calibrado. Finalmente se inyectó la proteína de interés en las mismas condiciones obteniéndose su masa molecular por interpolación en la recta de calibrado. En la Tabla III-4 se resumen las características de las proteínas que constituyen el kit de calibración utilizado con la columna Superdex-75. El kit utilizado para la columna Superdex-200 es similar, pero con una constitución de proteínas con pesos moleculares mayores, en un intervalo desde 43 kDa hasta 669 kDa.

La masa molecular de la peroxidasa de escoba blanca determinada mediante SDS-PAGE resultó ser de 55 ± 2 kDa (Figura II-13, Pág 115).

El calibrado en la columna Superdex-200 tiene como ecuación lineal:  $\text{Log MW} = 6.44 - 0.17 V$  ( $R^2 = 0,991$ ), mientras que el calibrado en la columna Superdex-75 tiene como ecuación:  $\text{Log MW} = 7,93 - 0,216 V$  ( $R^2 = 0,993$ ). En ambos casos MW (Molecular Weight) es la masa molecular de la proteína y V es el volumen de elución en las condiciones propuestas. Se obtiene como resultado una masa molecular de  $49 \pm 4$  kDa y  $55 \pm 3$  kDa en Superdex-75 y Superdex-200, respectivamente. Puesto que los valores de masa molecular obtenidos en condiciones nativa y desnaturizante no muestran diferencias significativas, se concluye que la peroxidasa de escoba blanca es monomérica.

**Tabla III-4. Kit de calibración de la columna Superdex-75.**

Proteína	M (Da)	Origen	Concentración (mg mL <sup>-1</sup> )
Aprotinina	6500	Hígado bovino	3
Ribonucleasa A	13700	Páncreas bovino	3
Anhidrasa carbónica	29000	Eritrocitos bovinos	3
Ovoalbúmina	43000	Huevo de gallina	4
Conalbúmina	75000	Clara de huevo de pollo	3

## 3.4. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA MEDIANTE CD

Los espectros de CD en el UV lejano (190-250 nm) de la peroxidasa de escoba blanca se han registrado en un espectropolarímetro JASCO, utilizando un paso de banda de 2 nm y células de 1 mm de paso óptico. La concentración proteica fue 0,05 mg mL<sup>-1</sup>. Cada espectro obtenido es un promedio de cuatro; registrados con una velocidad de barrido de 50 nm min<sup>-1</sup> y corregidos mediante la sustracción de la línea base. Las señales se convierten en valores de elipticidad molar según la siguiente ecuación:

$$[\Theta] = 10 M_{\text{res}} \Theta_{\text{obs}} l^{-1} p^{-1} \quad (\text{Ec. III-1})$$

$M_{\text{res}}$ : masa molar media por residuo calculada a partir de la secuencia primaria de la proteína. Tiene un valor de 116 gmol<sup>-1</sup>.

$\Theta_{\text{obs}}$ : valor de la elipticidad en grados a una longitud de onda determinada (222 nm).

$l$ : longitud de paso óptico en dm.

$p$ : concentración de la proteína en mg mL<sup>-1</sup>.

Los espectros de la proteína en el estado nativo se registraron a 20 °C y en tampón HEPES 10 mM pH 7.0. La estimación cuantitativa de la estructura secundaria de la peroxidasa de escoba blanca se ha realizado con el Software CDPro con tres programas diferentes: SELCON3, CDSSTR y CONTIN [219, 220] y utilizando como referencia la base SDP42.

En la Tabla III-5 se resumen los resultados de la estimación de la estructura secundaria de la peroxidasa de escoba blanca. Se observan algunas diferencias significativas con otras peroxidases de Clase III en las cuáles el contenido de hélices  $\alpha$  en su estructura nativa suele estar en torno al 40 %, con una ausencia casi total de láminas  $\beta$ . Por el contrario, la estructura secundaria de la peroxidasa de escoba blanca en su estado nativo está caracterizada por una cantidad considerable de láminas  $\beta$ , en torno al 30 %.

**Tabla III-5. Elementos de la estructura secundaria de la peroxidasa de escoba blanca.**

Proteína	Hélice $\alpha$ , %			Lámina $\beta$ , %			Giros $\beta$ , %	Estruc. Desor., %
	Regular	Desordenada	Total	Regular	Desordenada	Total		
Nativa	22	13	35	15	14	29	16	20

### 3.5. ESTABILIDAD TÉRMICA

#### 3.5.1. Análisis de estabilidad térmica mediante CD

Además del registro del espectro de la proteína en estado nativo para determinar su estructura secundaria, se ha llevado a cabo el registro del espectro en función de la temperatura, con el fin de evaluar el proceso de desnaturalización térmica. El calentamiento de la disolución enzimática se realizó con un baño termorregulable, entre 20-80°C a una velocidad de calentamiento de 0.5 K min<sup>-1</sup>.

El espectro de DC en el UV lejano de la peroxidasa de escoba blanca se muestra en la Figura III-6 tanto para la proteína en estado nativo como térmicamente desnaturalizada. Después de la desnaturalización térmica la forma del espectro cambia, teniéndose entonces un aumento de la cantidad de láminas  $\beta$  a expensas de una reducción en la cantidad de hélices  $\alpha$ . El aumento significativo de estructuras  $\beta$  laminares, indica que como consecuencia de la desnaturalización se produce agregación proteica, lo cual se justifica también por la observación de un aumento de la turbidez en la disolución de proteína. El porcentaje de elementos estructurales en la proteína desnaturalizada térmicamente se resume y compara con la estructura nativa en la Tabla III-6. Al igual que en el apartado anterior, la estimación cuantitativa de la estructura secundaria de la peroxidasa de escoba blanca se ha realizado con el Software CDPro con tres programas diferentes: SELCON3, CDSSTR y CONTIN<sup>[219, 220]</sup> y utilizando como referencia la base SDP42.

Finalmente, la muestra se enfrió de nuevo después del calentamiento y se registró su espectro a 20 °C. El espectro obtenido en este caso es similar al de la proteína desnaturalizada, no observándose transición alguna por la temperatura al calentar de nuevo de forma gradual. Se puede concluir por tanto, a la vista de los datos de CD que la transición conformacional al estado desnaturalizado de la proteína de escoba blanca es un proceso irreversible.



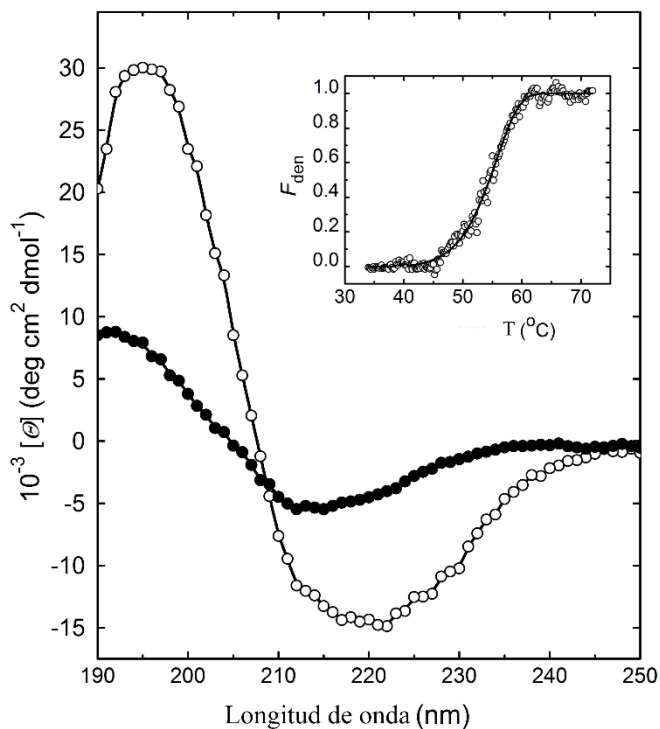


FIGURA III-6

**Espectro CD de la peroxidasa de escoba blanca.**

Círculos blancos proteína nativa. Círculos negros proteína desnaturalizada térmicamente.

En el interior: fracción desnaturalizada frente a la Temperatura.

**Tabla III-6. Elementos de la estructura secundaria de la peroxidasa de escoba blanca.**

Proteína	Hélice $\alpha$ , %			Lámina $\beta$ , %			Giros $\beta$ , %	Estruc. Desor., %
	Regular	Desordenada	Total	Regular	Desordenada	Total		
Nativa	22	13	35	15	14	29	16	20
Desnatu.	2	3	5	29	15	44	22	29

### 3.5.2. Análisis de estabilidad térmica mediante Fluorescencia Intrínseca

Los espectros de emisión de fluorescencia de la peroxidasa de escoba blanca se han registrado en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS50B, entre 300 y 400 nm, con una velocidad de barrido de  $240 \text{ nm min}^{-1}$ . La longitud de onda de excitación se ha fijado en 295 nm y la anchura de la rendija de los monocromadores de excitación y emisión fue de 3 nm. Se trabajó con disoluciones proteicas con una absorbancia a 280 nm inferior a 0.2 en tampón HEPES 10 mM pH 7.0.

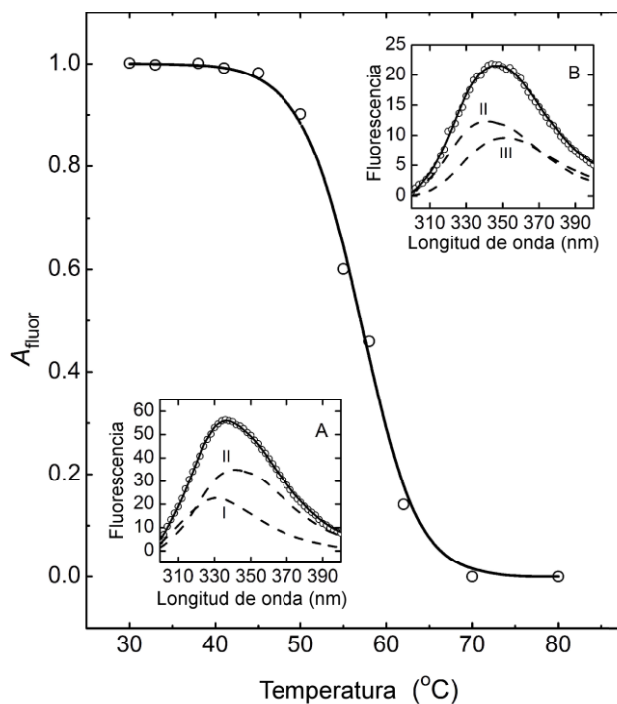
La intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda se ha registrado para la proteína en estado nativo y desnaturalizada (después de haber sido calentada a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A continuación se aplicó el modelo de los estados discretos del triptófano <sup>[202]</sup> a ambos espectros.

Por otro lado, se investigó la dependencia de las características del espectro de fluorescencia con la temperatura. Para ello, se utilizó un termostato con recirculación de agua alrededor del soporte de la célula óptica. La temperatura se monitorizó con un termómetro introducido en la muestra. La velocidad de calentamiento fue  $1 \text{ K min}^{-1}$ .

En el interior de la Figura III-7 pueden observarse los espectros de fluorescencia de la peroxidasa de escoba blanca en estado nativo (A) y térmicamente desnaturalizada (B) así como el análisis de dichos espectros de acuerdo con el modelo de los estados discretos del triptófano. Se observa un mayor rendimiento cuántico en el espectro de la peroxidasa nativa, lo cual revela que no existen gran cantidad de residuos de triptófano próximos al grupo hemo y por tanto no hay transferencia de energía significativa desde dichos residuos al grupo hemo. Cuando se produce la desnaturalización térmica, la intensidad de fluorescencia se reduce revelando que como consecuencia del proceso de desnaturalización tiene lugar una reorientación del grupo hemo. Los resultados experimentales indican que en este estado desnaturalizado, el grupo hemo se acerca a los residuos de triptófano produciéndose el “quenching” o transferencia de energía. El análisis del espectro de emisión de la peroxidasa de escoba blanca nativa en el marco del modelo de los estados discretos del triptófano revela una contribución a dicho espectro de las formas I y II. El mismo análisis del espectro de la proteína térmicamente desnaturalizada revela una contribución significativa de las formas II y III con la desaparición de la contribución por parte de la forma I que se observaba en el espectro de la proteína nativa. A partir del análisis de los estados discretos del triptófano se deduce

que en su estado desnaturalizado térmicamente la peroxidasa de escoba blanca no se encuentra totalmente desplegada.

Al enfriar de nuevo la muestra y registrar su espectro de fluorescencia se obtiene un espectro idéntico al de la forma desnaturalizada (espectro B mostrado en el interior de la Figura III-7). A partir de los espectros de fluorescencia, se comprueba también que la transición conformacional al estado térmicamente desnaturalizado de la peroxidasa de escoba blanca es un proceso irreversible y por lo tanto controlado cinéticamente.



**FIGURA III-7**

**Perfil de la desnaturalización térmica de la peroxidasa de escoba blanca.**

En el interior: espectro de fluorescencia de la peroxidasa nativa (A) y desnaturalizada (B) y estados del triptófano que contribuyen a ambas estructuras.

### 3.5.3. Tratamiento de las curvas de desnaturalización

Como se ha expuesto en apartados precedentes, la curva de desnaturalización se obtiene realizando el seguimiento de una determinada propiedad en función del agente desnaturalizante. En el presente trabajo se han obtenido las curvas de desnaturalización térmicas de la peroxidasa de escoba blanca mediante CD y fluorescencia intrínseca de proteínas. Las propiedades que se han monitorizado en función de la temperatura han sido la elipticidad molar y el área bajo el máximo en el espectro de fluorescencia.

Una vez obtenidas las curvas de desnaturalización, los datos experimentales se transformaron en ambos casos en fracción de proteína desnaturalizada:

$$F_d = (y - y_N) / (y_D - y_N) \quad (\text{Ec. III-2})$$

$y$ : propiedad seguida en función de la temperatura

$y_N$ : valor medio de dicha propiedad en la región pre-transición de la curva de desnaturalización.

Obtenido mediante regresión lineal ( $y_N = a_1 + a_2x$ ).

$y_D$ : valor medio de la propiedad seguida en la zona post-transición de la curva. Obtenido mediante regresión lineal ( $y_D = b_1 + b_2x$ ).

En ambas curvas de desnaturalización se observa una única transición conformacional a 45 °C.

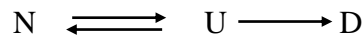
A continuación y asumiendo una transición conformacional irreversible, tal como se deduce en los apartados anteriores, se ha realizado el ajuste de los datos experimentales a un modelo teórico adecuado. En el presente trabajo se ha optado por comenzar probando la adecuación de los datos experimentales a un modelo de dos estados, por tratarse del modelo teórico más simple en el estudio de transiciones conformacionales irreversibles de proteínas.

Una curva de desnaturalización que muestre más de una zona de transición es indicativa de un proceso de desnaturalización más complejo que el correspondiente a un modelo de dos estados. Este comportamiento se observa frecuentemente en proteínas formadas por multidominios en las cuales durante el proceso de desnaturalización, los diferentes dominios sufren un desplegamiento individual <sup>[201]</sup>. Sin embargo, una curva con un solo paso de transición por sí misma no es indicativa de un proceso que se ajuste al modelo de dos estados. Es necesario comprobarlo utilizando al menos dos técnicas

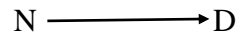
experimentales diferentes y analizando la semejanza de los valores de  $F_d$  y parámetros termodinámicos característicos obtenidos por ambas técnicas <sup>[201]</sup>.

- **Modelo de dos estados**

En el estudio de la desnaturalización térmica irreversible destaca como modelo teórico de ajuste el Modelo de **Lumry-Eyring** <sup>[221]</sup>. En la desnaturalización térmica en el marco de dicho modelo están implicados dos pasos: un desplegamiento reversible de la proteína nativa (N) y una alteración irreversible de la proteína desplegada (U) hasta alcanzar el estado final (D). Esta alteración irreversible puede ser causada por fenómenos de agregación, autólisis o alteración química de los aminoácidos.



El modelo de dos estados es un caso limitante del modelo de Lumry-Eyring. Considera fundamentalmente dos estados macroscópicos poblados, el estado nativo (N) y el desnaturalizado (D):



La transición entre ambos estados está determinada por una constante de velocidad de primer orden ( $k$ ). Esta constante es dependiente de la temperatura, tal como indica la ecuación de Arrhenius:

$$k = \exp \left\{ \frac{E_A}{R} \left( \frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) \right\} \quad (\text{Ec. III-3})$$

$E_A$ : energía de activación de la transición.

R: constante de los gases

$T^*$ : temperatura a la cual la constante cinética de primer orden toma el valor de  $1 \text{ min}^{-1}$ .

La fracción de proteína desnaturalizada ( $F_d$ ) se analizó con un ajuste no lineal por mínimos cuadrados:

$$F_d = 1 - \exp \left\{ - \frac{1}{v} \int_{T_0}^T \exp \left[ \frac{E_A}{R} \left( \frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) \right] dT \right\} \quad (\text{Ec. III-4})$$

$v = dT/dt$ .

$E_A$ : energía de activación de la transición.

$R$ : constante de los gases

$T^*$ : temperatura a la cual la constante cinética de primer orden toma el valor de  $1 \text{ min}^{-1}$ .

En el interior de la Figura III-6 (Pág. 145) se expone el ajuste de los datos de la fracción de proteína desnaturalizada obtenida a partir del espectro de CD frente a la temperatura. Siguiendo el ajuste de la Ec. III-4, se obtuvieron los parámetros  $E_A = 281.8 \pm 6.7 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $T^* = 337.0 \pm 0.8 \text{ K}$ .

En la Figura III-7 (Pág. 147) se representa la curva de desnaturalización siguiendo el área normalizada bajo el espectro de fluorescencia frente a la temperatura. Dichos datos se han ajustado también a un modelo de regresión no lineal por mínimos cuadrados según la ecuación Ec. III-4. A partir del ajuste se han obtenido los valores  $E_A = 291.8 \pm 7.7 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $T^* = 336.9 \pm 1 \text{ K}$ .

Los valores obtenidos mediante CD y fluorescencia son semejantes. Estas dos metodologías independientes (fluorescencia y CD), así como las curvas de desnaturalización consistentes en una sola transición en el intervalo estudiado, apoyan la idea de que la desnaturalización térmica de la peroxidasa de escoba blanca puede interpretarse en términos del modelo cinético de dos estados. Se trata por lo tanto, de un proceso irreversible controlado cinéticamente y donde tan solo dos estados poblados han de tenerse en cuenta: el estado nativo (N) y desnaturalizado (D).

La velocidad de inactivación térmica depende de factores tales como pH, tiempo de calentamiento, fuerza iónica y del estado físico de la enzima.

La elevada estabilidad térmica de numerosas peroxidasas se atribuye a la presencia de azúcares en la estructura proteica [222]. El principal proceso que tiene lugar

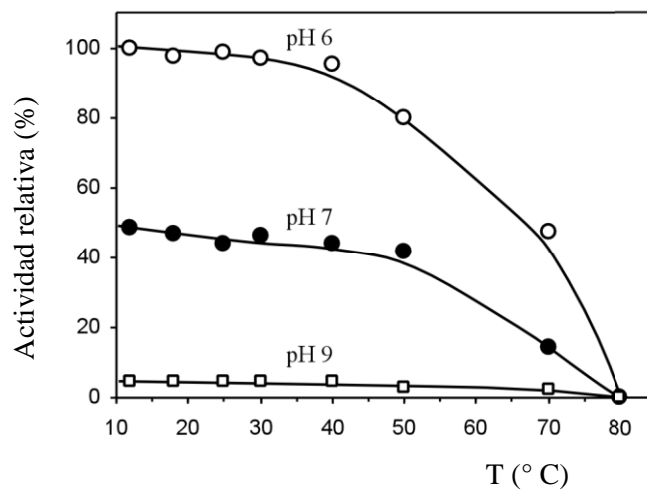
en la inactivación térmica de las peroxidasa son cambios o degradación del grupo prostético [222].

En la Figura III-8 se pueden observar los cambios en la actividad de la peroxidasa de escoba blanca en función de la temperatura a tres valores de pH y un tiempo de calentamiento prefijado (15 min). Para la medida de la actividad peroxidasa, se tomaron alícuotas de las diferentes disoluciones de proteína (de la misma concentración) incubadas a las distintas temperaturas y se siguió el procedimiento general descrito en el plan experimental. Tal como se observa, a pH 6 y 7 la actividad comienza a descender de forma significativa cuando la enzima se incuba durante 15 min a temperaturas superiores a los 40°C, coincidiendo con el comienzo de la zona de transición en las curvas de desnaturalización construídas a partir de medidas de CD y fluorescencia. El descenso en la actividad peroxidasa resulta ser más gradual a valores de pH en torno a 6. A pH 9 no se observa actividad peroxidasa significativa a ninguna de las temperaturas de incubación.

La comparación de la estabilidad térmica de diferentes peroxidasa y de sus parámetros termodinámicos ha de hacerse teniendo en cuenta esta dependencia del pH. Así a pH neutro, la temperatura de transición para la peroxidasa de escoba blanca (45 °C) es similar a la de HRP en las mismas condiciones y más alta que la de SBP (43°C).

La desnaturalización de la peroxidasa de palma real a pH 7.0, es a diferencia de la peroxidasa de escoba blanca, un proceso reversible. Este hecho es importante tenerlo en cuenta para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas con esta peroxidasa. La reversibilidad del proceso puede estar relacionada con la naturaleza dimérica de la peroxidasa de palma real a ese pH.

El elevado valor de  $E_A$  de la peroxidasa de escoba blanca en comparación con el correspondiente valor para cHRP a pH 3.0 ( $159.9 \pm 2.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) [194] demuestra un alto grado de cooperatividad en el proceso de desnaturalización a pH neutro.

**FIGURA III-8**

**Influencia de la temperatura de incubación en la actividad.**



### 3.6. ESTABILIDAD FRENTE AL pH

#### 3.6.1. Espectros de absorción

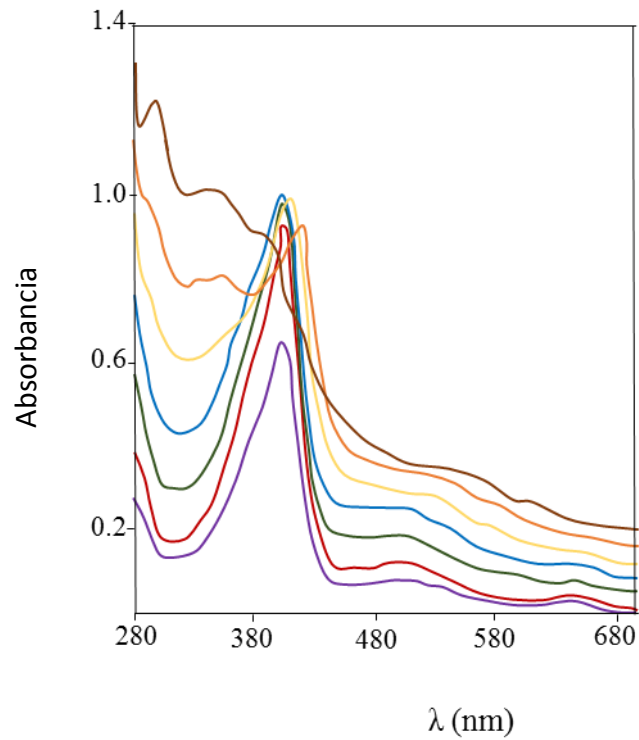
Para el registro de los espectros UV-Vis frente a cambios de pH se tomaron alícuotas de una disolución de la peroxidasa de escoba blanca en tampón universal 10 mM a valores de pH ajustados en el intervalo de 1 a 14. Los espectros se registraron en un espectrofotómetro de doble haz T80+ PG UV/Vis, entre 250 y 700 nm a 25°C y con una velocidad de barrido de 400 nm min<sup>-1</sup>.

En la Figura III-9 se observan los cambios en el espectro de absorción electrónica de la peroxidasa de escoba blanca en la zona básica. El espectro con menor intensidad de la banda Soret corresponde a la peroxidasa en estado nativo a pH 6. El aumento del pH hasta 7 provoca un aumento considerable en la intensidad, aunque no cambia la posición de la banda Soret. Entre pH 7 y 9 no se modifica significativamente la posición de la banda Soret, pero sí aumenta la absorbancia a 280 nm, disminuyendo significativamente el factor  $R_z$ , de tal forma que a pH 8 el valor  $R_z$  es 1,9. Por encima de pH 9 comienza a desplazarse la banda Soret a valores mayores de longitud de onda, disminuye su intensidad y a partir de pH 11 comienza a desaparecer, probablemente por la pérdida del grupo hemo. En el espectro de absorción aparecen además de la banda Soret, dos bandas a 490-500 nm y a 635-640 nm denominadas banda  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente. Las bandas  $\alpha$  y  $\beta$  van convirtiéndose en dos pequeños hombros a valores de pH elevados.

En la Figura III-10 se observa el cambio de la banda Soret a pH ácido. Conforme desciende el pH, el desplazamiento de esta banda a valores mayores de longitud de onda es muy poco significativo. Sí se observa un cambio significativo en la intensidad de esta banda. Conforme el pH disminuye aumenta la intensidad entre pH 6 y 2. A pH 2 desciende bruscamente la intensidad de la banda Soret y a pH 1 la banda Soret se reduce a un pequeño máximo.

En la Tabla III-7 se resumen los principales picos en el espectro de absorción electrónica de la peroxidasa de escoba blanca en función del pH.

La transición alcalina en las peroxidasas, consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno de una molécula de agua de la cavidad distal con la consiguiente unión del grupo OH<sup>-</sup> al hierro hémico. La transición ácida consiste en la hexacoordinación del grupo hemo con una molécula de agua. Las localizaciones de la banda Soret en ambos valores extremos de pH coinciden con las encontradas para la peroxidasa de soja [223], la metmioglobina, cHRP [224] y palma real [225].

**FIGURA III-9**

**Variación del espectro de absorción de la peroxidasa de escoba blanca con el pH en la zona básica.**

La línea morada corresponde a la peroxidasa en estado nativo (pH=6,0), roja (pH=7), verde (pH= 8), azul (pH=9,0), amarillo (pH= 10), naranja (pH=12) y marrón (pH=13).

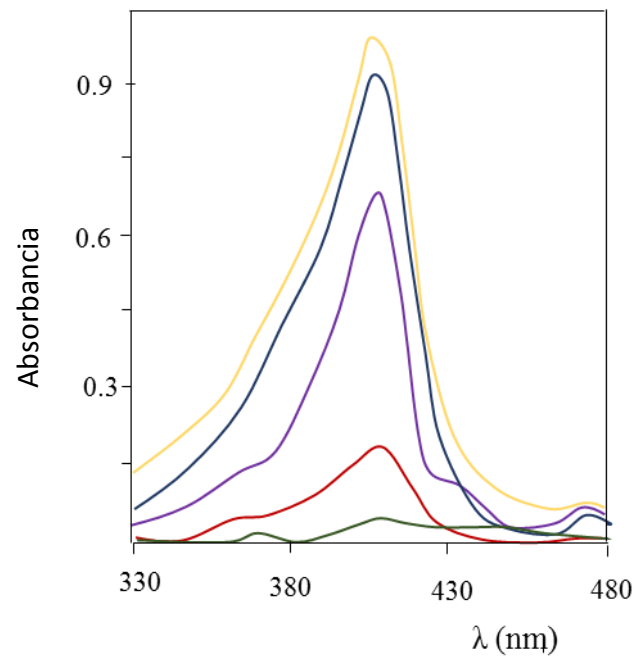


FIGURA III-10

### Cambio en la banda Soret de la peroxidasa de escoba blanca a pH ácido.

Morado (pH=5), azul (pH=4), amarillo (pH =3), rojo (pH=2) y verde (pH=1).

**Tabla III-7. Principales picos y hombros del espectro electrónico de la peroxidasa de escoba blanca a diferentes valores de pH.**

Estado proteico	Picos	Hombros
Nativa (pH= 6)	403 nm (banda Soret) 490-500 nm 635-640 nm	
Básica (pH=11)	416 nm (banda Soret)	540 nm 402 nm 360 nm 370 nm
Ácida (pH= 2)	405 nm (banda Soret)	490-510 nm 640 nm

### 3.6.2. Titulación proteica: desnaturalización inducida por el pH

La estabilidad estructural así como la actividad enzimática dependen del pH [194, 225], siendo mayor el aprovechamiento industrial de una determinada enzima cuanto mayor sea su intervalo de estabilidad. Una titulación por fluorescencia en las zonas ácida y básica a partir de pH 7 permite observar cambios en la estructura terciaria de la proteína. El pH puede afectar a la actividad enzimática, no sólo porque la enzima puede desnaturalizarse sino también por cambios que pueden producirse en la forma iónica de aminoácidos del centro activo. La actividad enzimática a distintos pH proporciona información adicional en la curva de titulación proteica.

La dependencia de las características del espectro de fluorescencia de la peroxidasa de escoba blanca con el pH se investigó en el intervalo de pH 1-14 realizando medidas aproximadamente cada 0.2 unidades de pH.

La proteína se dializó frente a tampón universal 10 mM. La concentración de la proteína en la disolución resultante fue 5  $\mu\text{M}$ . La variación del pH se realizó empleando una pipeta Pasteur de vidrio cerrada en su punta; se introdujo en el ácido o base, se retiró el exceso de líquido y se introdujo en la muestra. A continuación, se comprobó el pH en un pHmetro micropH 2001. Durante la medida de la fluorescencia intrínseca la muestra se mantuvo en todo momento en agitación constante y a temperatura controlada de 20 °C. El registro de los espectros se llevó a cabo en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50B, entre 300 y 400 nm con una velocidad de barrido de 240 nm min<sup>-1</sup>. La longitud de onda de excitación se fijó en 295 nm y la anchura de rendija de los monocromadores de excitación y emisión fue de 3 nm.

Simultáneamente se realizaron medidas de actividad peroxidasa a los diferentes valores de pH. Para ello, de disoluciones proteicas (distintas a la de la cubeta de fluorescencia) y sometidas a los mismos cambios de pH de la misma manera que se ha descrito en el párrafo anterior, se tomaron alícuotas y se ensayó la actividad siguiéndose el procedimiento general descrito en el plan experimental.

En la Figura III-11 se muestra el efecto del pH sobre la actividad enzimática (A) y sobre los parámetros de fluorescencia (B). Dentro de los parámetros de fluorescencia se han considerado la relación entre las intensidades de emisión a 350 y 320 nm (R) y la posición del máximo ( $\lambda_{\text{max}}$ ), que refleja el grado de accesibilidad de las moléculas del disolvente a los cromóforos.

Como se observa en la Figura III-11 la peroxidasa de escoba blanca es estable en el intervalo de pH de 3 a 11.5. Además, la posición del máximo de emisión permanece constante en un rango de pH de 2 a 11, lo cuál implica que la accesibilidad de las moléculas de agua a los residuos triptófano que se encuentran en el interior de la estructura proteica permanece invariante en ese rango de pH. Este margen de estabilidad del máximo de emisión coincide con los cambios espectroscópicos observados en la banda Soret que son especialmente significativos a partir de pH 2 en la zona ácida y pH 11 en la zona básica. La intensidad de fluorescencia no cambia en el intervalo de pH de 4 a 11 indicando la ausencia de transferencias de carga o “quenching” en el entorno de los residuos de triptófano en ese intervalo de pH. Por tanto ese intervalo de 4 a 11 parece ser el idóneo para llevar a cabo estudios de caracterización físico química de la peroxidasa de escoba blanca.

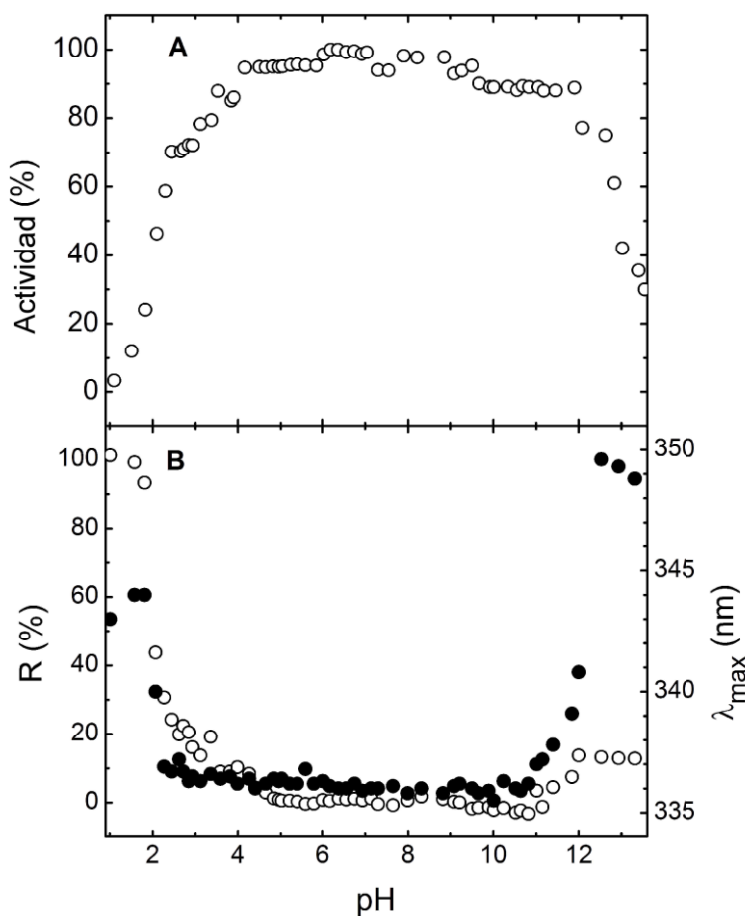
A un pH en torno a 2.2 se produce el desplazamiento del máximo de fluorescencia hacia el rojo, seguido a continuación de un desplazamiento hacia el azul a valores de pH inferiores a 1.8. Este fenómeno se debe probablemente, a procesos de agregación proteica, hecho que puede comprobarse por la aparición de turbidez en la celda de fluorescencia. El aumento en la relación de las intensidades a 350 y 320 nm indica que el triptófano en el proceso de desnaturalización ácida se aleja aún más del grupo hemo.

Aumentando el pH por encima de 11 se produce un desplazamiento del máximo de emisión hacia el rojo, asociado a un aumento de la polaridad en el entorno de los residuos triptófano y seguido de un desplazamiento hacia el azul a pH mayores de 13, relacionado este último con procesos de agregación proteica que evitan la hidratación de los residuos de triptófano. Se produce también a partir de pH 11 un aumento significativo de la relación entre la intensidad de emisión a 350 y 320 nm.

La comparación de los cambios en la actividad enzimática y en los parámetros de fluorescencia inducidos por el pH indican que tanto la intensidad de fluorescencia como la posición del máximo que refleja la polaridad de los aminoácidos aromáticos, influyen en la actividad enzimática de la peroxidasa de escoba blanca. A la vista de los valores de actividad peroxidasa se puede concluir que la peroxidasa de escoba blanca mantiene su actividad prácticamente intacta en el intervalo de pH de 4 a 12 (con sustrato guayacol), siempre y cuando la temperatura permanezca constante a 20 °C.

La estabilidad de la peroxidasa de escoba blanca es menor que en el caso de algunas peroxidases de plantas tropicales, como es el caso de RPTP cuyo intervalo de

estabilidad es de 2 a 13. En el caso de la desnaturalización ácida de la peroxidasa de Prx y palmera real (RPTP) la polaridad de los aminoácidos no se ve alterada, debido a que no se observan cambios en la posición del máximo en el espectro de fluorescencia [225]. La desnaturalización básica de RPTP va acompañada de cambios menos significativos en la actividad enzimática [225]. De los cambios aparentes en la posición del máximo correlacionados con cambios en la actividad se pueden deducir valores de pKa de 2 y 12, lo cuál indicaría que el pI de la proteína se encuentra en torno a 7.



**FIGURA III-11**

**Dependencia de la actividad enzimática (A) y los parámetros de fluorescencia (B) con respecto a los cambios de pH.**

En (B) los círculos blancos se corresponden con cambios en la relación entre la intensidad de fluorescencia a 350 y 320 nm ( $R = I_{350}/I_{320}$ ) y los círculos negros se corresponden con los cambios en el máximo del espectro de emisión.

### 3.7. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA

#### 3.7.1. Estudios sobre la actividad con guayacol

Se ha estudiado el efecto de las siguientes variables en la actividad de la peroxidasa de escoba blanca con guayacol como sustrato:

- pH
- Concentración de guayacol y  $H_2O_2$
- Fuerza iónica
- Temperatura
- Presencia de efectores

##### • *Efecto del pH*

El efecto del pH en la actividad enzimática se determinó con medidas de actividad peroxidasa llevadas a cabo con sustrato guayacol y peróxido de hidrógeno. En la cubeta del espectrofotómetro se colocan 2.0 mL de reactivo ( $H_2O_2$  5 mM y guayacol 18 mM en tampón universal 50 mM a los diferentes pH objeto de estudio), junto con 20  $\mu$ L de la enzima convenientemente diluida disuelta en tampón universal pH 7. Se agita suavemente y se mide el incremento de absorbancia a 470 nm durante dos minutos. A partir de los datos de las pendientes de las rectas de absorbancia frente a tiempo se obtienen los valores de actividad (en  $U\ mL^{-1}$ ), tal y como se ha expuesto en apartados precedentes. La máxima actividad de la peroxidasa de escoba blanca se encontró para pH 6.0 (Figura III-12, A). En este caso, los cambios en la actividad no solo se deben a cambios en la proteína como ocurre en el experimento anterior sino también a cambios en los propios sustratos  $H_2O_2$  y guayacol.

##### • *Efecto de las concentraciones de sustratos*

El efecto de la concentración de los sustratos guayacol y  $H_2O_2$  en la actividad peroxidasa se investigó siguiendo el procedimiento de medida de la actividad descrito anteriormente. Se varió en este caso la concentración de cada uno de ellos, mientras la concentración del otro cosustrato permanece constante en la de saturación.

El efecto del guayacol sobre la actividad se muestra en la Figura III-12 (B). La concentración de guayacol se varió desde 0 hasta 60 mM manteniendo fijo el  $H_2O_2$  en 4.9 mM. La actividad aumenta a medida que aumenta la concentración de guayacol hasta un valor de 18 mM. A concentraciones más altas se observa una pérdida gradual de la actividad. Este descenso en la actividad enzimática puede deberse a procesos de

inhibición competitiva por sustrato. Sin embargo, dicha disminución puede deberse también a cambios en las propiedades ópticas del producto medido, puesto que a concentraciones elevadas de guayacol la oxidación espontánea puede llevar a la formación de tetrámeros y dímeros sin necesidad de una participación enzimática. La polimerización espontánea del guayacol y precipitación de dichos polímeros producen turbidez en disoluciones con elevadas concentraciones de guayacol.

El efecto de la concentración de  $H_2O_2$  se puede observar en la Figura III-12 (C). La concentración de peróxido de hidrógeno se varió entre 0 y 20 mM manteniendo fija la concentración de guayacol en 18 mM. La actividad aumenta conforme aumenta la concentración de  $H_2O_2$  hasta valores de 5 mM. Concentraciones más elevadas causan una pérdida de actividad enzimática. Este hecho es debido a un proceso de inactivación por sustrato suicida ampliamente descrito para las peroxidasas de Clase III.

#### • *Efecto de la fuerza iónica*

Para evaluar el efecto de la fuerza iónica en la actividad peroxidasa, se varió la concentración de NaCl en el medio de reacción en el intervalo de 0 a 5 M mediante la adición de volúmenes de disoluciones de NaCl (en tampón fosfato) lo suficientemente concentradas como para no producir cambios significativos en la concentración de los distintos reactivos.

La actividad enzimática se registró espectrofotométricamente utilizando guayacol como sustrato en las condiciones descritas en apartados anteriores. Los resultados se expresaron en términos de actividad relativa, definiéndose ésta como la relación entre la actividad peroxidasa de la enzima en ausencia de NaCl y la actividad medida en presencia de las diferentes concentraciones de NaCl. En la Figura III-12 (D) se muestra el efecto de la fuerza iónica en la actividad de la peroxidasa de escoba blanca. A medida que aumenta la concentración de NaCl, la actividad aumenta fuertemente, alcanzando un máximo en concentraciones de NaCl de 0.5 M. Por encima de esta concentración la actividad decrece gradualmente manteniendo un valor estable en torno al 65 % de la actividad inicial para concentraciones superiores a 3 M.



### • *Efecto de la temperatura*

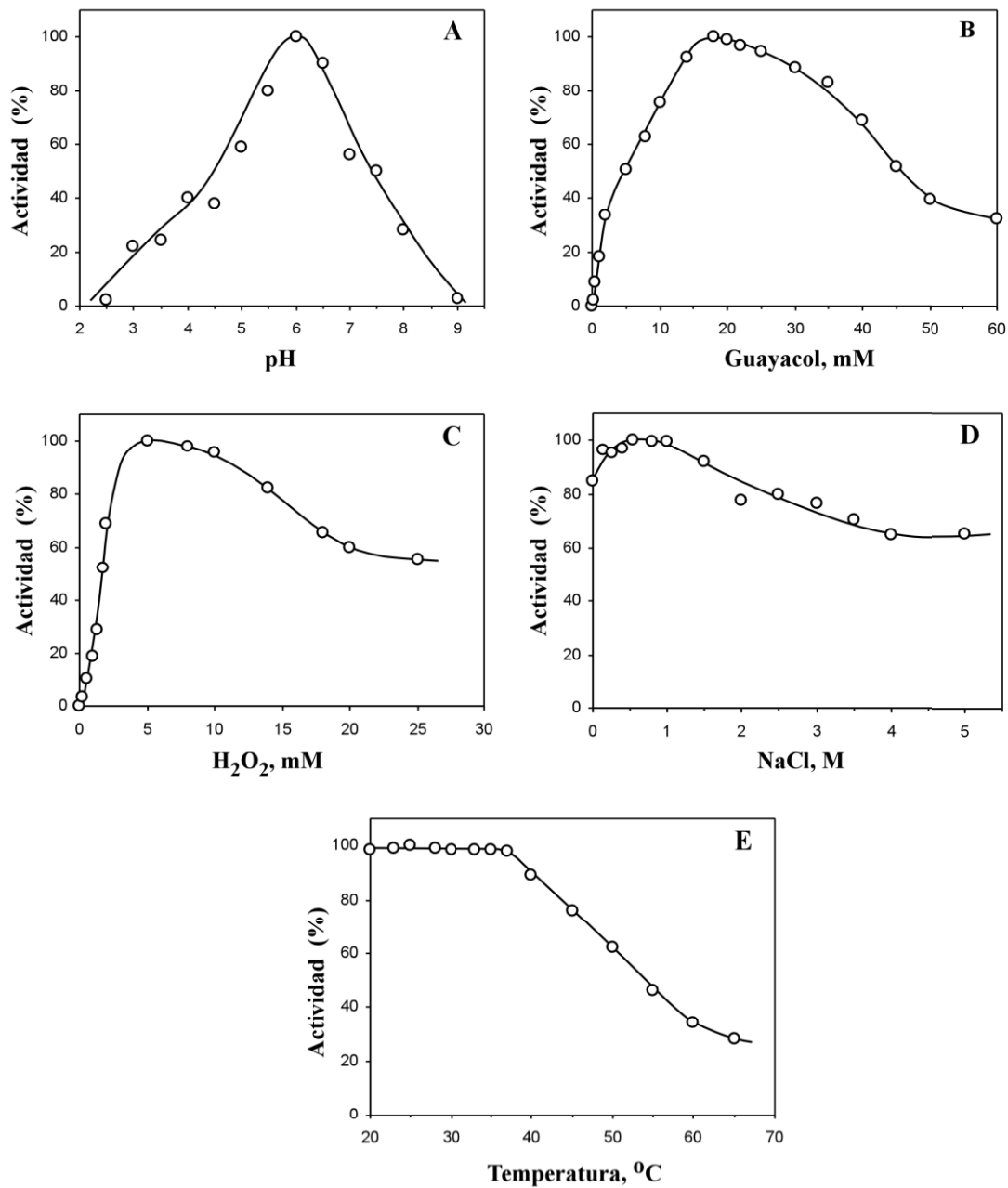
Para estudiar cómo afecta la temperatura a la actividad de la peroxidasa de escoba blanca, se varió dicha temperatura entre 20 y 90 °C en la celda de reacción utilizando para ello un baño termostático con recirculación. La temperatura dentro de la celda de reacción se comprobó siempre con un termómetro antes de iniciar la medida de la actividad.

A temperaturas entre 20 y 37 °C no se observa ningún cambio significativo en la actividad enzimática (Figura III-12 E). A temperaturas por encima de 37 °C la actividad decrece drásticamente. Este hecho puede deberse a la desnaturalización de la enzima aunque, dado que la temperatura se varía directamente en el medio de la reacción pueden también ocurrir procesos de descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a temperaturas por encima de 40 °C.

### • *Efecto de efectores*

El efecto de algunos iones metálicos y otros compuestos en la actividad peroxidasa se investigó añadiendo concentraciones de 10 mM. El tiempo de incubación con los diferentes compuestos fue de 30 min. Tras ese tiempo, se determinó la actividad peroxidasa utilizando guayacol como sustrato. Los resultados se expresaron en actividad relativa, considerando la actividad peroxidasa en ausencia de efectores como el 100%.

En la Tabla III-8 se comparan las actividades de la peroxidasa de escoba blanca en presencia de algunos iones metálicos y compuestos orgánicos. Hg<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup> dan lugar a un fuerte efecto inhibitor. Hg<sup>2+</sup> causa la inhibición irreversible de muchas enzimas debida a su unión con grupos tiol cercanos al centro activo [226]. Por el contrario, tanto Ca<sup>2+</sup> como Fe<sup>3+</sup> provocan un aumento en la actividad peroxidasa de 120% y 156%, respectivamente. Ca<sup>2+</sup> es un cofactor que sirve para mantener la estructura del centro activo [227]. Los resultados de actividad en presencia de iones metálicos son similares a los encontrados en otras peroxidases vegetales [226, 228]. La azida sódica, tiourea y ácido oxálico tienen un fuerte efecto inhibitor en la actividad.

**FIGURA III-12**

**Efecto de algunas variables en la actividad de la peroxidasa de escoba blanca con guayacol como sustrato: pH (A), guayacol (B), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C); fuerza iónica (D) y temperatura (E).**

**Tabla III-8. Efecto de algunos iones metálicos y compuestos orgánicos en la actividad de la peroxidasa de escoba blanca con guayacol como sustrato.**

Compuesto 10 mM	Actividad %	Compuesto 10 mM	Actividad %
---	100	---	100
ZnCl <sub>2</sub>	100	FeCl <sub>3</sub>	156
LiCl	100	AlCl <sub>3</sub>	91
MgCl <sub>2</sub>	97	KCl	87
BaCl <sub>2</sub>	99	FeCl <sub>2</sub>	56
MnCl <sub>2</sub>	93	HgCl <sub>2</sub>	49
CuCl <sub>2</sub>	10	Azida sódica	5
CdCl <sub>2</sub>	89	Tiourea	10
CaCl <sub>2</sub>	120	Ácido oxálico	22

### 3.7.2. Especificidad por sustrato

Para comparar diferentes compuestos de naturaleza fenólica y no fenólica como sustratos reductores de la peroxidasa de escoba blanca, se ha determinado la actividad peroxidasa en presencia de dichos sustratos. La medida de la actividad se ha basado en el seguimiento espectrofotométrico del producto de oxidación de dichos sustratos reductores. Para la elección de las condiciones adecuadas en cada caso (longitud de onda de medida, concentraciones de los sustratos, tiempos de reacción, etc.), se ha tenido en cuenta la bibliografía al respecto <sup>[228]</sup>.

Las condiciones variadas han sido pH y composición del tampón utilizado. Para ello se ha utilizado en todos los casos tampón universal de concentración variable y el pH se ha cambiado ajustando con disoluciones de HCl y NaOH concentradas. La temperatura ha sido en todos los casos de 25 °C para realizar las medidas espectrofotométricas. La actividad se ha medido en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico, adicionando mezclas de reacción de 2 ml que contienen las concentraciones adecuadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y AH<sub>2</sub> <sup>[228]</sup>. La reacción se inicia con la adición de 20 µl de una disolución de la peroxidasa en tampón universal 50 mM y pH 7 y en todos los casos, los resultados son los valores medios de tres determinaciones. Los resultados finales se expresan en términos de actividad relativa, considerando el mayor valor de actividad encontrado para cada sustrato estudiado como el 100%.

La peroxidasa de escoba blanca presenta actividad enzimática con sustratos como guayacol, o-dianisidina, pirogalol, ácido ferúlico, o-fenilendiamina, catecol y ABTS. El efecto del pH en la actividad de la peroxidasa con estos sustratos se muestra en la Tabla III-9. Esta peroxidasa cataliza la oxidación de la mayoría de los sustratos mencionados anteriormente en un intervalo de pH óptimo de 4.5-6.0, con las excepciones de ABTS y catecol que necesitan un medio más ácido (pH en torno a 3.5). La actividad máxima se observó para concentraciones de tampón universal por debajo de 100 mM y en la mayoría de los sustratos en torno a 50 mM (Tabla III-10). Las diferencias de actividad con respecto a la concentración del tampón sugieren que los sustratos investigados se unen a la enzima por diferentes partes <sup>[179]</sup>. La dependencia más fuerte con respecto a la concentración del tampón se observa para el caso del ABTS. Un efecto similar con este sustrato se encontró por ejemplo en el caso de la peroxidasa de palma real <sup>[228]</sup> y la peroxidasa de boniato <sup>[179]</sup>.

**Tabla III-9. Efecto del pH en la actividad de la peroxidasa de escoba blanca con diferentes sustratos.**

pH	Actividad relativa*, %						
	Guayacol	ABTS	Pirogalol	o-Dia	o-Fen	Ácido ferúlico	Catecol
2.5	2	65,1	5	0	2	19	6
3.0	22	80	27	4	5	41	59
3.5	24	<b>100</b>	25	20	16	63	<b>100</b>
4.0	40	90,5	31	40	43	<b>100</b>	84
4.5	38	87,7	38	60	54	<b>100</b>	58
5.0	59	83	62	89	86	96	36
5.5	80	78,9	62	<b>100</b>	<b>100</b>	76	19
6.0	<b>100</b>	66	<b>100</b>	90	95	61	12
6.5	90	7	93	70	76	38	6
7.0	56	0	86	42	53	21	0
7.5	50	0	79	10	39	9	0
8.0	28	0	75	0	21	3	0
9.0	3	0	0	0	12	0	0

ABTS: 2,2'-Azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ; o-Dia: o-dianisidina ; o-Fen: o-Fenilendiamina.

\* Para cada sustrato independiente en tampón universal 50 mM.

**Tabla III-10. Efecto de la concentración del tampón en la actividad de la peroxidasa de escoba blanca con diferentes sustratos.**

Concentración mM	Actividad relativa*, %						
	Guayacol	ABTS	Pirogalol	o-Dia	o-Fen	Ácido ferúlico	Catecol
0	0	0	81	50	19	81	80
10	90	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	54	94	79
20	90	94	98	<b>100</b>	54	<b>100</b>	83
30	93	85	50	<b>100</b>	60	96	89
40	<b>100</b>	83	52	<b>100</b>	54	87	92
50	99	80	45	<b>100</b>	69	86	95
75	90	57	31	99	87	86	<b>100</b>
100	79	44	29	80	93	81	93
150	80	37	21	76	<b>100</b>	79	90
200	80	20	15	73	96	65	87
300	10	0	0	65	73	62	83
400	0	0	0	59	59	56	83
500	0	0	0	54	55	55	81

ABTS: 2,2'-Azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ; o-Dia: o-dianisidina ; o-Fen: o-Fenilendiamina.

\* Para cada sustrato independiente al máximo pH de actividad.

### 3.7.3. Estudios sobre el mecanismo catalítico

- *Medida de la velocidad inicial*

En los apartados subsiguientes encaminados a la caracterización cinética de la peroxidasa de escoba blanca, se necesita en numerosos casos la medida de la velocidad inicial de la reacción enzimática.

La velocidad inicial se define como la pendiente de las rectas cinéticas en los instantes iniciales de la reacción catalítica. En este capítulo, se determina a partir de la pendiente de las rectas de absorbancia frente a tiempo. Para cada uno de los sustratos elegidos se tuvieron en cuenta las condiciones propuestas en bibliografía [228], el pH y concentración de tampón fueron los elegidos en el apartado de especificidad por sustrato. Se tomaron en todos los casos las pendientes de las rectas antes de alcanzarse el 5% del valor de la absorbancia correspondiente a la saturación de la cinética.

- *Determinación del tipo de mecanismo*

La comprobación del tipo de mecanismo (secuencial o ping-pong) que sigue una determinada enzima en reacciones bisustrato puede llevarse a cabo a partir de estudios cinéticos en el estado estacionario.

Se fijó la concentración del sustrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  modificándose la concentración del sustrato reductor ( $\text{AH}_2$ ) y viceversa. Se obtuvieron así los perfiles de velocidad inicial de la reacción frente a la concentración del sustrato variable para cada uno de los sustratos estudiados.

Una vez comprobado que dicho perfil de velocidad inicial frente a concentración del sustrato variable se ajusta a una cinética Michaeliana, se realizan las representaciones de dobles inversos ( $1/v$  versus  $1/C$ ) para cada concentración de sustrato constante.

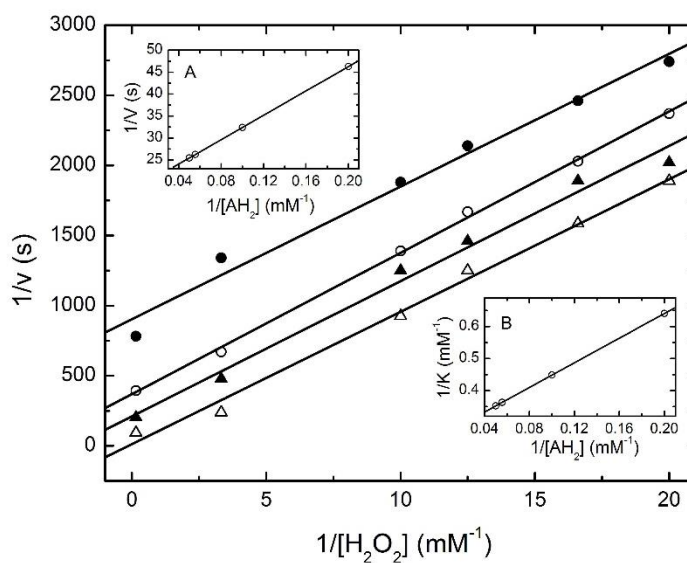
En la Figura III-13 se observa que la representación de dobles inversos genera un conjunto de líneas paralelas para la oxidación de guayacol. La obtención de rectas paralelas es indicativa de un mecanismo de tipo ping-pong [229]. Los resultados obtenidos para el resto de los sustratos fueron similares.

Sin embargo, para comprobar que se cumple uno de los dos mecanismos y descartar totalmente el otro deben realizarse estudios cinéticos complementarios.

Uno de estos estudios consiste en analizar el comportamiento cinético de una serie de disoluciones en las cuales se mantenga constante la relación  $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{AH}_2]$ . En este caso, la representación de dobles inversos que presenta una tendencia lineal es

indicativa de un mecanismo ping-pong, mientras que una tendencia parabólica se corresponde con un mecanismo secuencial [225].

En la Figura III-14 se muestra dicha representación para los sustratos estudiados. La obtención de líneas con tendencia lineal descarta la existencia de un mecanismo secuencial en la oxidación de los diferentes sustratos reductores estudiados en presencia de la peroxidasa de escoba blanca. La Figura III-14 muestra los valores experimentales encontrados cuando la relación  $[H_2O_2]/[AH_2]$  es aproximadamente 2. Se obtuvieron también líneas rectas para todos los sustratos cuando la relación fue 4 y 8.



**FIGURA III-13**

**Representación de dobles recíprocos para el sustrato  $H_2O_2$ .**

En el interior: Representación de dobles recíprocos para el sustrato Guayacol (A). Representación del inverso de la concentración del sustrato guayacol frente al inverso de K (B).



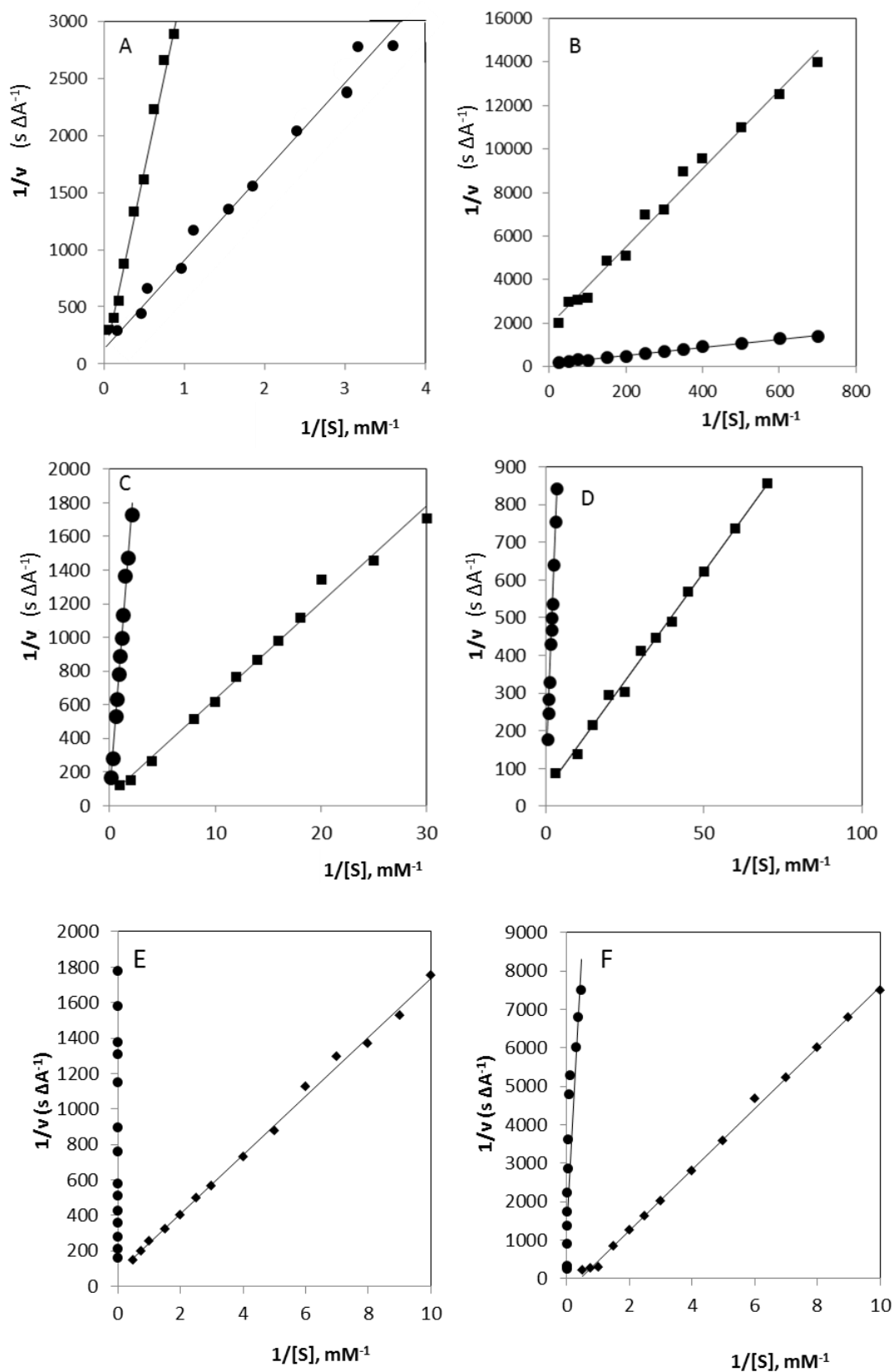


FIGURA III- 14

**Representación de dobles recíprocos manteniendo constante la relación entre las concentraciones de ambos sustratos,  $H_2O_2$  (●) y  $AH_2$  (◻).**

$AH_2 =$  guayacol (A), ABTS (B), o-dianisidina (C) y ácido ferúlico (D), o-fenilendiamina (E), catecol (F)

La HRP ha sido pionera en el estudio de las características cinéticas de este grupo de enzimas. Dicha peroxidasa oxida a compuestos de naturaleza fenólica siguiendo un mecanismo ping-pong, al igual que otras peroxidases estudiadas más tarde, entre las que se encuentran la peroxidasa de nabo <sup>[230]</sup> o CcP de levadura <sup>[231]</sup>. Existen algunas excepciones a este mecanismo ping-pong general que se han observado con sustratos sulfito o yoduro.

- **Constantes macroscópicas**

Una vez establecido el tipo de mecanismo, se pasó a realizar el cálculo de algunos parámetros cinéticos característicos a partir de la ecuación de velocidad general para una reacción enzimática que sigue un mecanismo ping-pong con dos sustratos, en ausencia de producto. Dicha ecuación es la siguiente:

$$v = \frac{V[\text{H}_2\text{O}_2][\text{AH}_2]}{K_m^{\text{H}_2\text{O}_2}[\text{AH}_2] + K_m^{\text{AH}_2}[\text{H}_2\text{O}_2] + [\text{H}_2\text{O}_2][\text{AH}_2]} \quad (\text{Ec. III-5})$$

La Ec. III-5 puede transformarse en una hipérbola rectangular (Ec. III-6), si la concentración del sustrato reductor permanece constante.

$$v = \frac{V[\text{H}_2\text{O}_2]}{K + [\text{H}_2\text{O}_2]} \quad (\text{Ec. III-6})$$

Donde los parámetros V y K vienen dados, a su vez, por las siguientes ecuaciones:

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + (K_m^{\text{AH}_2} / [\text{AH}_2])} \quad (\text{Ec. III-7})$$

$$K = \frac{K_m^{\text{H}_2\text{O}_2}}{1 + (K_m^{\text{AH}_2} / [\text{AH}_2])} \quad (\text{Ec. III-8})$$

A partir de la pendiente y ordenada en el origen de las rectas que resultan de la representación de dobles inversos se obtienen los valores de los parámetros  $K_m^{\text{H}_2\text{O}_2}$ ,  $K_m^{\text{AH}_2}$ ,  $V_{\max}$  y  $k_{\text{cat}}$ . Las representaciones de los dobles inversos de las ecuaciones Ec. III-7 y Ec. III-8 se muestran en el interior de la Figura III-13 para el caso del guayacol (Pág

168). Los valores de los parámetros cinéticos para los sustratos estudiados se resumen en la Tabla III-11.

El mayor número de recambio se obtiene para el ácido ferúlico seguido de guayacol, ABTS, catecol, o-dianisidina y o-fenilendiamina. La afinidad por la enzima viene dada por  $1/K_m$  y en el caso de la peroxidasa de escoba blanca es máxima para la o-dianisidina, mientras que la mayor eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) se observa para el ácido ferúlico. La elevada eficacia catalítica con ácido ferúlico, sustrato natural de peroxidasas, indica que la peroxidasa de escoba blanca puede participar en el entrecruzamiento de ácido ferúlico y lignificación.

**Tabla III-11. Parámetros cinéticos de la oxidación catalizada por la peroxidasa de escoba blanca para diferentes sustratos.**

Sustrato	$K_m^{H_2O_2}$ $\times 10^3 M$	$K_m^{AH_2}$ $\times 10^3 M$	$V_{max}$ $\times 10^5 Ms^{-1}$	$k_{cat}^*$ $\times 10^{-2} s^{-1}$	$k_{cat}/K_m^{H_2O_2}$ $\times 10^{-5} M^{-1}s^{-1}$	$k_{cat}/K_m^{AH_2}$ $\times 10^{-5} M^{-1}s^{-1}$
Guayacol	$3.7 \pm 0.4$	$7.4 \pm 0.3$	$5.3 \pm 0.2$	$11 \pm 1$	$2.8 \pm 0.4$	$1.4 \pm 0.1$
ABTS	$2.5 \pm 0.5$	$0.8 \pm 0.1$	$0.5 \pm 0.2$	$9.1 \pm 0.5$	$3.6 \pm 0.3$	$11 \pm 4$
Ácido ferúlico	$2.1 \pm 0.2$	$0.42 \pm 0.09$	$5.3 \pm 0.2$	$12.6 \pm 0.4$	$5.9 \pm 0.7$	$26 \pm 7$
o-Dianisidina	$0.71 \pm 0.07$	$0.53 \pm 0.02$	$0.83 \pm 0.02$	$1.67 \pm 0.01$	$2.4 \pm 0.9$	$3.16 \pm 0.07$
o-Fenilendiamina	$4.1 \pm 0.2$	$3.2 \pm 0.3$	$0.61 \pm 0.04$	$1.23 \pm 0.07$	$0.28 \pm 0.08$	$0.38 \pm 0.06$
Catecol	$3.86 \pm 0.03$	$1.03 \pm 0.06$	$20 \pm 2$	$4.10 \pm 0.03$	$1.06 \pm 0.02$	$3.98 \pm 0.01$

\*:  $k_{cat} = V_{max} [E]$

- **Constantes microscópicas**

Para calcular las constantes microscópicas ( $k_1$  y  $k_3$ ), se representaron las velocidades iniciales de oxidación de los compuestos en función de diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{AH}_2$ . Cuando se varió la concentración de uno de los dos sustratos, la del otro se mantuvo constante.

Teniendo en cuenta la aproximación del estado estacionario y suponiendo que  $k_2 > k_3$  (como ocurre en el mecanismo de reacción generalmente aceptado para la mayoría de las peroxidasas), la ecuación de velocidad para el mecanismo cinético, según Morales y Ros-Barceló <sup>[232]</sup> sería la siguiente:

$$v = \frac{2 [E] k_3 [\text{AH}_2][\text{H}_2\text{O}_2]}{\left(\frac{k_3}{k_1}\right)[\text{AH}_2] + [\text{H}_2\text{O}_2]} \quad (\text{Ec. III- 9})$$

De la ecuación anterior, se puede determinar la dependencia de la velocidad con las concentraciones de ambos sustratos:

$$v = \frac{A [\text{H}_2\text{O}_2]}{B + [\text{H}_2\text{O}_2]} \quad (\text{Ec. III- 10})$$

$$v = \frac{A^* [\text{AH}_2]}{B^* + [\text{AH}_2]} \quad (\text{Ec. III- 11})$$

$$A = 2 [E] k_3 [\text{AH}_2]$$

$$B = (k_3/k_1) [\text{AH}_2]$$

$$A^* = 2 [E] k_1 [\text{H}_2\text{O}_2]$$

$$B^* = (k_1/k_3) [\text{H}_2\text{O}_2]$$

[E]: concentración de la enzima.

A partir de los valores de la pendiente y ordenada en el origen de la representación de dobles inversos (Ec. III-12 y Ec. III- 13), es posible calcular los valores de los diferentes parámetros A, B, A\* y B\*. Por otro lado, de la pendiente de la representación de A frente a B se deduce el valor de  $k_1$  (Ec. III- 14) y la pendiente de la recta de A\* frente a B\* posibilita el cálculo de la constante microscópica  $k_3$  (Ec. III- 15).

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{A} + \frac{B}{A} \frac{1}{[\text{H}_2\text{O}_2]} \quad (\text{Ec. III- 12})$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{A^*} + \frac{B^*}{A^*} \frac{1}{[\text{AH}_2]} \quad (\text{Ec. III- 13})$$

$$A = 2 [\text{E}] k_1 B \quad (\text{Ec. III- 14})$$

$$A^* = 2[\text{E}] k_3 B^* \quad (\text{Ec. III- 15})$$

En la Figura III-15 puede observarse la representación de los parámetros A frente a B para los sustratos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y guayacol según las ecuaciones Ec.III-14 y Ec. III-15. Dichas representaciones presentan un comportamiento lineal. Las rectas pasan por el origen de coordenadas. Este comportamiento lineal de la representación de A frente a B es característico de las reacciones bisustrato que siguen un mecanismo ping pong. Se trata, por tanto, de un nuevo hecho que corrobora el mecanismo propuesto a raíz de los estudios cinéticos anteriormente detallados. El mismo comportamiento lineal se ha observado en la representación de A frente a B para el resto de los sustratos objeto de estudio.

Las constantes microscópicas pueden relacionarse con la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) a partir de las ecuaciones teóricas Ec. III- 16 y Ec. III- 17.

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{2 k_3 [\text{AH}_2]}{\left(\frac{k_3}{k_1}\right)[\text{AH}_2]} = 2 k_1 \quad (\text{Ec. III- 16})$$

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{2k_1 [\text{H}_2\text{O}_2]}{\left(\frac{k_1}{k_3}\right)[\text{H}_2\text{O}_2]} = 2 k_3 \quad (\text{Ec. III- 17})$$

En la Tabla III-12 se resumen los valores de las constantes microscópicas calculadas para los distintos sustratos. Dichas constantes han sido calculadas a partir de las representaciones de A vs. B para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sustrato reductor.

La reactividad de la enzima con el peróxido de hidrógeno viene determinada por la constante  $k_1$ , mientras que la constante  $k_3$  determina la reactividad de la enzima con el sustrato reductor. La *o*-dianisidina tiene la mayor constante de reactividad de la peroxidasa de escoba blanca con  $H_2O_2$ , mientras que la mayor reactividad con  $AH_2$  se observa en el caso del ácido ferúlico. Comparando con otras peroxidosas, la de soja (SBP) y cacahuete (PNP) son más reactivas con el guayacol que con las aminas. Las peroxidosas de HRP y TcPx son igualmente reactivas con guayacol y *o*-dianisidina. La diferente reactividad de estas enzimas se debe a las diferencias existentes en su secuencia de aminoácidos, lo cuál provoca modificaciones en el centro activo y modifica la accesibilidad de los sustratos al mismo.

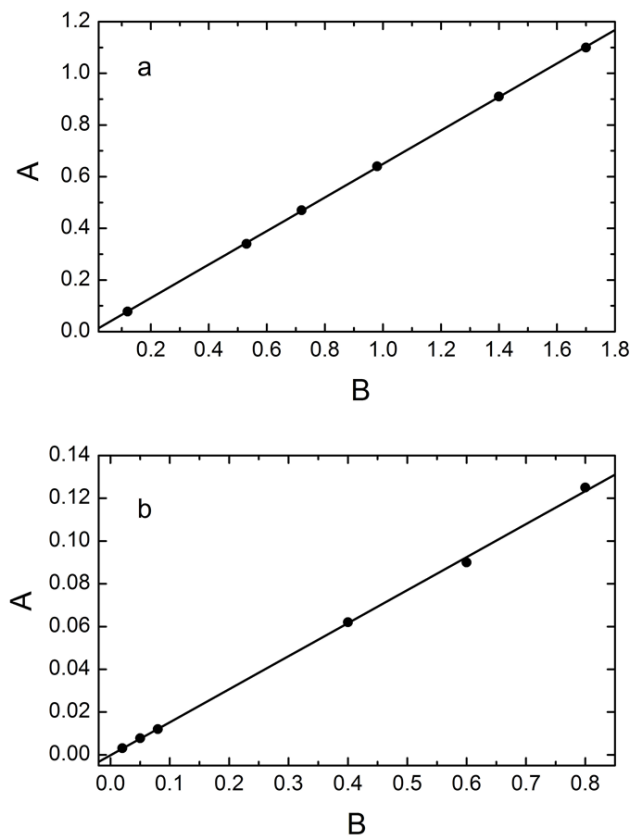


FIGURA III-15

### Representación de los parámetros A (nmol s<sup>-1</sup>) frente a B (mM).

(a): Representación para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y seis concentraciones de guayacol (3, 5, 8, 10, 12 y 18 mM). (b): Representación para el guayacol a seis concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4 mM).

**Tabla III-12. Constantes microscópicas para la oxidación de diferentes sustratos estudiados.**

Sustrato	$k_1^*$ $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_3^*$ $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
Guayacol	$0.54 \pm 0.04$	$0.13 \pm 0.07$
ABTS	$0.25 \pm 0.05$	$0.26 \pm 0.01$
Ácido ferúlico	$0.35 \pm 0.09$	$1.4 \pm 0.2$
o-Dianisidina	$0.96 \pm 0.01$	$0.52 \pm 0.03$
o-Fenilendiamina	$0.15 \pm 0.05$	$0.49 \pm 0.09$
Catecol	$0.36 \pm 0.12$	$0.19 \pm 0.09$

\*: Determinadas a partir de las representaciones de A vs B.

### 3.7.4. Estudios de inhibición

- *Inhibición competitiva por sustrato*

La comprobación de la existencia de procesos de inhibición competitiva por sustrato constituye un estudio cinético complementario que ayuda a elucidar el tipo de mecanismo que sigue la reacción bisustrato.

Los estudios cinéticos de inhibición competitiva por sustrato se basan en la medida de la velocidad inicial de la reacción catalítica cuando se varía la concentración de uno de los sustratos a concentraciones inhibitorias del otro. Una vez registrados los datos de velocidad inicial frente a concentración del sustrato inhibidor, se realiza la representación de dobles inversos ( $1/v$  versus  $1/C$ ).

Si la inhibición competitiva por ambos sustratos  $H_2O_2$  y  $AH_2$  tiene lugar, la correspondiente ecuación de velocidad sería la siguiente:

$$v = \frac{V[H_2O_2][AH_2]}{K_m^{H_2O_2}[AH_2](1 + [AH_2]/K_{IS}^{AH_2}) + K_m^{AH_2}[H_2O_2](1 + [H_2O_2]/K_{IS}^{H_2O_2}) + [H_2O_2][AH_2]} \quad (\text{Ec. III-18})$$

Fijada una concentración de  $AH_2$ , los datos de la velocidad inicial frente a la concentración del otro sustrato  $H_2O_2$ , pueden ajustarse a la siguiente ecuación de velocidad de inhibición competitiva:

$$v = \frac{V_{\max}[H_2O_2]}{K_m^{H_2O_2} \left( 1 + \left( \frac{[AH_2]}{K_{IS}^{AH_2}} \right) \right) + [H_2O_2]} \quad (\text{Ec. III-19})$$

Un ajuste similar podría hacerse manteniendo constante la concentración de  $H_2O_2$  y variando la de  $AH_2$ . El comportamiento cinético en la inhibición competitiva por sustrato consiste en la obtención de rectas con la misma ordenada en el origen y diferente pendiente <sup>[233]</sup> cuando se representan los dobles inversos de la ecuación Ec. III-19. Este comportamiento es el que se observa para el caso de la peroxidasa de escoba blanca en la oxidación de guayacol en las Figuras III-16 y III-17. Para el resto de los sustratos investigados se obtiene un comportamiento similar.

Los resultados de dichas representaciones demuestran la existencia de un proceso de inhibición competitiva por sustrato en todos los sustratos reductores evaluados



y confirman la existencia de un mecanismo ping-pong pudiéndose descartar por tanto el mecanismo secuencial.

Para la inhibición competitiva, los parámetros  $K$  y  $V$  vienen definidos a partir de las ecuaciones:

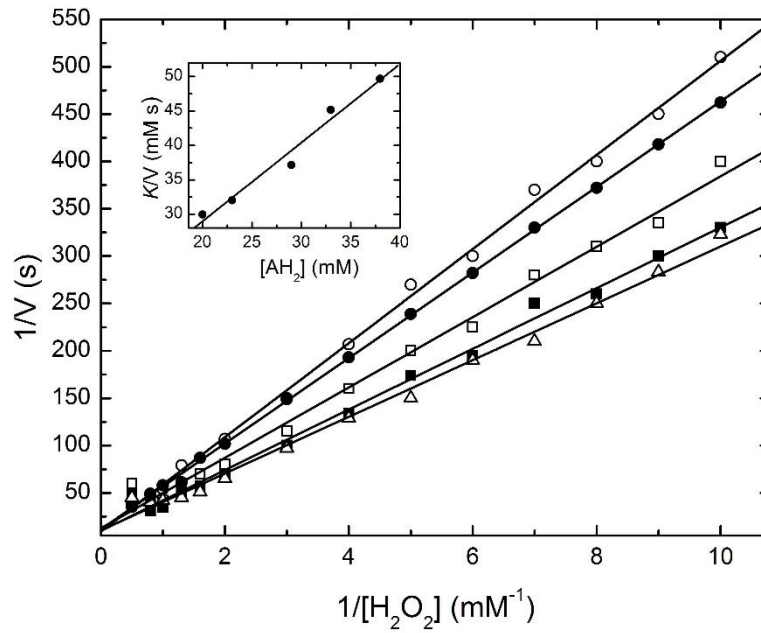
$$V = \frac{V_{\max}}{1 + (K_m^{\text{AH}_2} / [\text{AH}_2])} \quad (\text{Ec. III-20})$$

$$K = \frac{K_m^{\text{H}_2\text{O}_2} \left( 1 + ([\text{AH}_2] / K_{\text{IS}}^{\text{AH}_2}) \right)}{1 + (K_m^{\text{AH}_2} / [\text{AH}_2])} \quad (\text{Ec. III-21})$$

Además la representación de  $K/V$  frente a  $[\text{AH}_2]$  o  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  debe ser también lineal, tal como indica la Ec. III-22. Este comportamiento lineal se verifica en el caso de la oxidación de los sustratos reductores aquí estudiados en presencia de peroxidasa de escoba blanca. En el interior de la Figura III-16 y Figura III-17 se muestra la representación de  $K/V$  frente a  $[\text{AH}_2]$  y  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  respectivamente, cuando se utiliza guayacol como sustrato reductor.

$$\frac{K}{V} = \frac{K_m^{\text{H}_2\text{O}_2}}{V} + \frac{K_m^{\text{H}_2\text{O}_2} [\text{AH}_2]}{K_{\text{IS}}^{\text{AH}_2} V_{\max}} \quad (\text{Ec. III-22})$$

A partir de la pendiente y ordenada en el origen de la Ec. III-22, es posible el cálculo de la constante de inhibición para los sustratos que participan en la reacción de oxidación. Los datos de  $K_{\text{IS}}$  calculados para los diferentes sustratos reductores que se han investigado aparecen resumidos en la Tabla III-13.

**FIGURA III-16**

**Representación de dobles recíprocos a diferentes concentraciones inhibitorias de guayacol.**

En el interior:  $K/V$  frente a dichas concentraciones de guayacol.

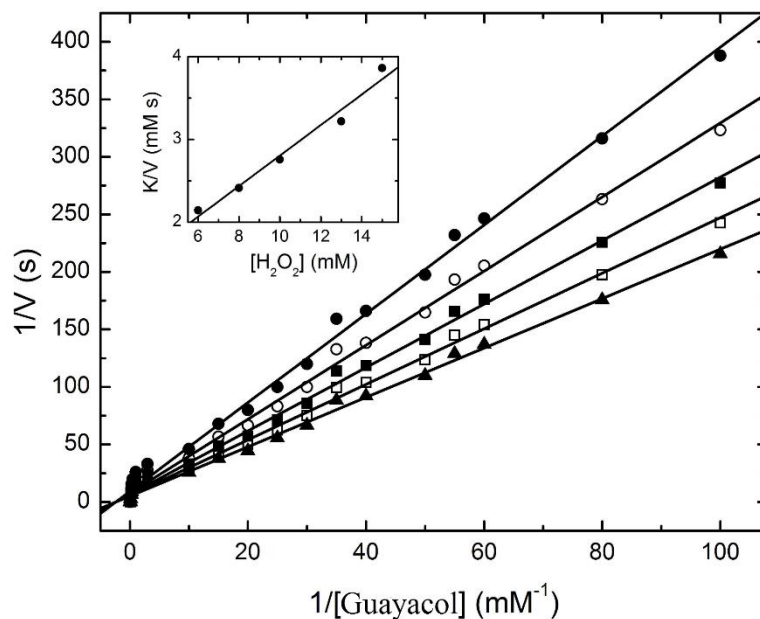


FIGURA III-17

**Representación de dobles recíprocos utilizando guayacol como sustrato reductor a diferentes concentraciones inhibitorias de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

En el interior: K/V frente a dichas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tabla III-13. Constantes de inhibición competitiva.

Sustrato	$K_{IS}^{H_2O_2}$ mM	$K_{IS}^{AH_2}$ mM
Guayacol	$5.3 \pm 0.5$	$7.6 \pm 0.7$
ABTS	$1.1 \pm 0.4$	$0.005 \pm 0.002$
Ácido ferúlico	$1.9 \pm 0.1$	$7.6 \pm 1.0$
o-Dianisidina	$0.86 \pm 0.08$	$0.06 \pm 0.02$
o-Fenilendiamina	$0.80 \pm 0.04$	$0.0021 \pm 0.0003$
Catecol	$2.7 \pm 0.4$	$1.9 \pm 0.6$

- ***Inactivación por sustrato suicida***

El estudio de la inactivación por sustrato suicida de la peroxidasa de escoba blanca llevado a cabo en el presente capítulo ha consistido, en primer lugar en la evaluación de la sensibilidad de dicha enzima al inhibidor suicida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), seguido en segundo lugar del estudio de la cinética de inactivación.

Para investigar la sensibilidad de la enzima al inhibidor  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se ha calculado el número de recambio ( $r$ ), definido como el exceso de inhibidor necesario para que la inactivación catalítica sea del 100%. Para calcular el número de recambio se ha representado la actividad residual de la enzima incubada durante un tiempo determinado en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor  $\text{H}_2\text{O}_2$ , frente al valor de dichas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . De acuerdo con la Ec. III- 23, la intersección en la zona lineal de esa representación con el eje de abscisas determina el valor del número de recambio.

$$A_R = \frac{A_t}{A_0} = 1 - \frac{1}{1-r} \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]}{[E]} \quad (\text{Ec. III- 23})$$

$A_0$ : actividad peroxidasa sin incubación con el inhibidor

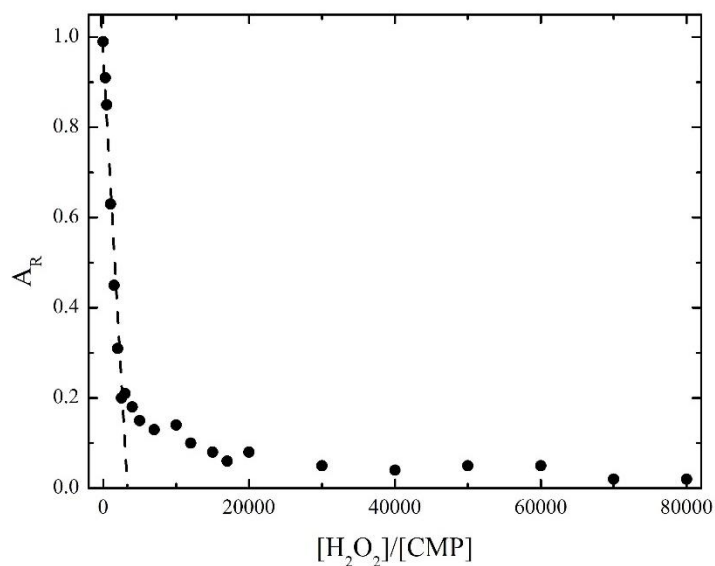
$A_t$ : actividad peroxidasa a tiempo final en cada una de las incubaciones

El tiempo de incubación utilizado en este experimento fue de 24 h. El medio fue tampón universal 10 mM a pH 7 y la concentración de la enzima fue de 130 nM en cada uno de los experimentos.

Para la determinación de la actividad peroxidasa se siguió el método espectrofotométrico descrito en el plan experimental con las modificaciones evidentes de pH y longitud de onda de medida, para cada sustrato reductor de estudio [228].

Tal como se observa en la Figura III-18 para el caso de guayacol como sustrato reductor, la representación de  $A_R$  frente a la relación de concentraciones ( $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{CMP}]$ ; siendo CMP la peroxidasa de escoba blanca) no es siempre lineal. En este caso se observa una tendencia lineal por encima del 20% de la actividad residual, un valor que se corresponde con lo encontrado en bibliografía para otras peroxidases monoméricas, como es el caso de la HRP [46]. Asimismo, este valor difiere del observado en el caso de peroxidases de palma cuya linealidad se mantiene hasta el 45-50% de la actividad residual, hecho que probablemente se relacione con su naturaleza dimérica.

Los sustratos reductores investigados han sido guayacol, ABTS, ácido ferúlico y o-dianisidina. De las pendientes de las zonas lineales se calcularon los números de recambio para los diferentes sustratos. Dichos valores se resumen en la Tabla III-14.



**FIGURA III-18**

**Sensibilidad a la inactivación por sustrato suicida.**

CMP: peroxidasa de escoba blanca (*Cytisus multiflorus* peroxidase).

**Tabla III-14. Valores del número de recambio (r).**

Sustrato	r
ABTS	3790
Ácido ferúlico	1610
Guayacol	3000
o-Dianisidina	980

Para el sustrato ABTS a pH 3.0, la peroxidasa de escoba blanca presenta un número de recambio de 3790, mucho mayor que el correspondiente para HRP cuyo  $r$  es tan solo 625 cuando se mide su actividad residual con ABTS a pH 4.5<sup>[47]</sup> y similar a los números encontrados para peroxidases de algunas especies de palmeras<sup>[229, 234]</sup>. Este número de recambio elevado es interesante tenerlo en cuenta en aplicaciones biotecnológicas que impliquen la presencia de elevadas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para llevar a cabo la cinética de inactivación, la disolución de la enzima en una concentración 130 nM se incubó con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (0-300 mM). El medio fue tampón universal 10 mM a pH 7.0. Se tomaron alícuotas de la peroxidasa incubada a diferentes tiempos y se midió su actividad con guayacol siguiendo el procedimiento descrito en el plan experimental.

La cinética de inactivación de la peroxidasa de escoba blanca en presencia de diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y guayacol se representa en la Figura III-19. Se realizaron medidas de actividad con otros tres sustratos reductores de los estudiados en apartados precedentes. El logaritmo de la actividad residual frente al tiempo se corresponde con una recta cuya pendiente es la constante de inactivación  $k_{obs}$ :

$$\ln \frac{[A_a]}{[A_0]} = -k_{obs} t \quad (\text{Ec. III-24})$$

La dependencia de la constante  $k_{obs}$  frente a las diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viene dada por la siguiente ecuación:

$$k_{obs} = \frac{k_{inac}^{app} [H_2O_2]}{K_1^{app} + [H_2O_2]} \quad (\text{Ec. III-25})$$

En la Figura III-20 se muestra la curva de saturación correspondiente a la Ec. III-25. A partir de la representación de dobles recíprocos de  $k_{obs}$  frente a [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] es posible el cálculo de las constantes  $K_1^{app}$  y  $k_{inac}^{app}$  (datos mostrados en el interior de la Figura III-20). La  $k_{inac}^{app}$  es la constante de la fase de inactivación rápida y  $K_1^{app}$  es el valor de la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor. Además existe una dependencia del número de recambio con las constantes  $k_{inac}^{app}$  y  $k_{cat}^{app}$  según la Ec. III-26. Dicha

ecuación posibilita el cálculo de  $k_{cat}^{app}$ . Todos los parámetros cinéticos de la inactivación por  $H_2O_2$  se resumen en la Tabla III-15.

$$r = \frac{k_{cat}^{app}}{k_{inact}^{app}} \quad (\text{Ec. III-26})$$

Con el fin de comprender con más facilidad el significado de las diferentes constantes calculadas, puede consultarse el esquema mostrado en la Figura III-21. En dicha Figura C- $H_2O_2$  es el complejo formado entre el Co I del ciclo catalítico y el  $H_2O_2$  y X es el intermedio o estado de transición de dicho complejo. Este estado de transición tiene dos rutas evolutivas posibles cada una de ellas con sus correspondientes constantes: hacia la catálisis o hacia la inactivación.

La etapa de inactivación está regulada por la constante  $k_{inac}$ , mientras que la etapa de catálisis está regulada por la constante  $k_{cat}$ .

La magnitud de ambas constantes condiciona a la enzima a una mayor o menor susceptibilidad a la inhibición por peróxido de hidrógeno. Dicha inactivación es por tanto, un proceso controlado cinéticamente y que depende del sustrato reductor presente, puesto que en función de la naturaleza de dicho sustrato y de su afinidad por la enzima bajo unas determinadas condiciones la ruta evolutiva hacia la catálisis estará más o menos favorecida.

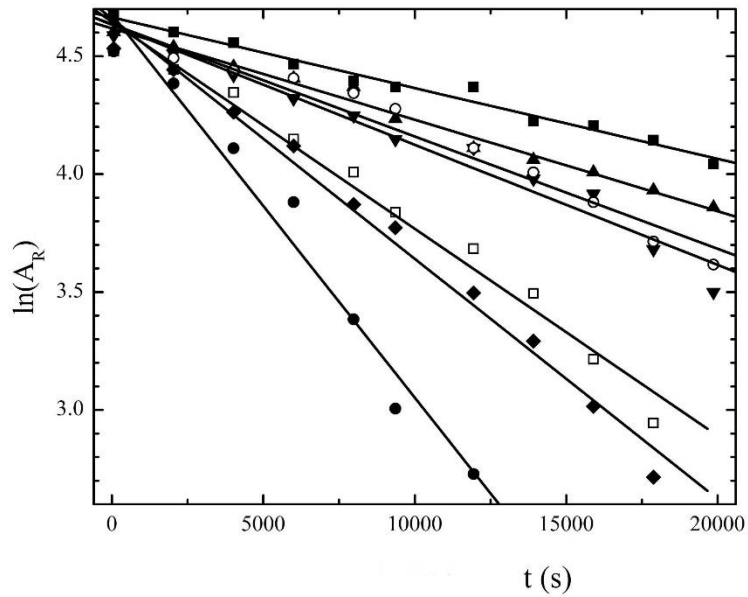


FIGURA III-19

### Cinética de inactivación por $H_2O_2$ de la peroxidasa de escoba blanca.

$H_2O_2$ : (■) 14 mM, (▲) 10mM, (▼) 15 mM, (○) 50 mM, (□) 100 mM, (◆) 150mM, (●) 300 mM. La actividad residual se midió con guayacol.

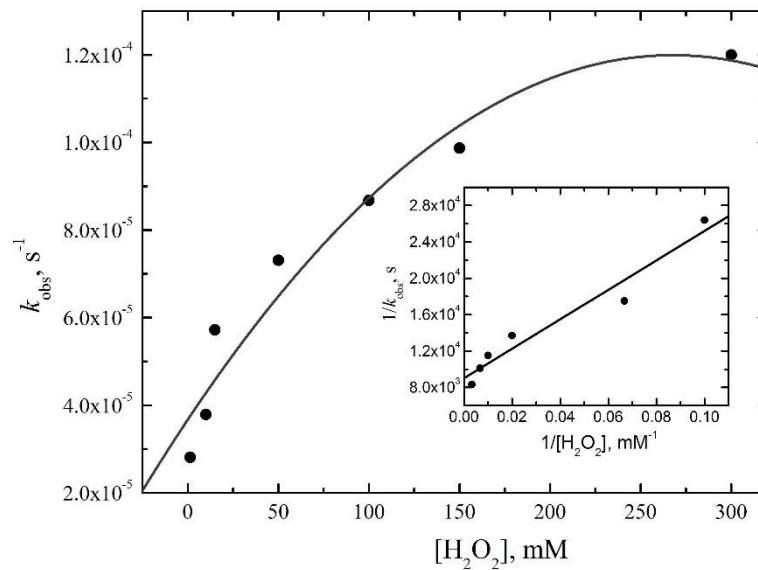


FIGURA III-20

### Curva de inactivación por $H_2O_2$ de la peroxidasa de escoba blanca.

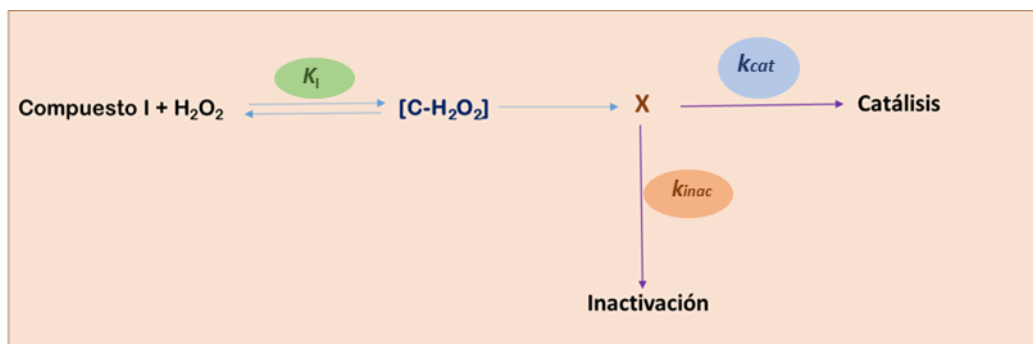
En el interior representación de dobles recíprocos de  $k_{obs}$  (constante de velocidad de inactivación de primer orden) frente a la concentración de  $H_2O_2$ .



**Tabla III-15. Constantes cinéticas aparentes calculadas para la inactivación de la peroxidasa de escoba blanca.**

Sustrato	$k_{\text{inac}}^{\text{app}}$ $\times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_I^{\text{app}}$ <b>(mM)</b>	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ $\times 10^2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{cat}}^{\text{app}} / K_I^{\text{app}}$ $\times 10^3 \text{ (s}^{-1} \text{ mM}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{inac}}^{\text{app}} / K_I^{\text{app}}$ $\times 10^7 \text{ (s}^{-1} \text{ mM}^{-1}\text{)}$
<b>ABTS</b>	1.54	36	58	16	43
<b>Ácido ferúlico</b>	1.48	34	24	7.06	44
<b>Guayacol</b>	1.11	18	33	18	62
<b>o-Dianisidina</b>	1.40	51	14	2.75	28

$k_{\text{inac}}^{\text{app}}$ : constante de inactivación;  $K_I^{\text{app}}$ : constante de disociación del complejo [Compuesto III-  $\text{H}_2\text{O}_2$ ];  $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ : constante de velocidad catalítica;  $k_{\text{cat}}^{\text{app}} / K_I^{\text{app}}$ : eficiencia de la catálisis;  $k_{\text{inac}}^{\text{app}} / K_I^{\text{app}}$ : eficiencia de la inactivación.



**FIGURA III-21**

**Esquema de la inactivación por sustrato suicida.**

La comparación de la estabilidad en presencia de peróxido de hidrógeno con otras peroxidasas estudiadas es compleja y han de tenerse en cuenta casos muy concretos. Si comparamos los valores encontrados en la peroxidasa de escoba blanca con los calculados para la HRP, se observa un mayor valor de la  $k_{\text{inac}}^{\text{app}}$  para la HRP (midiendo la actividad con ABTS como cosustrato). El hecho de que la  $k_{\text{inac}}^{\text{app}}$  sea mayor para HRP [47], indica que la fase de inactivación es más rápida para HRP y por tanto, la estabilidad frente a  $\text{H}_2\text{O}_2$  es menor. De todos los valores calculados se deduce que en las mismas condiciones de medida de la actividad, la peroxidasa de escoba blanca presenta una mayor estabilidad al  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

A elevadas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en ausencia de sustrato reductor o bajas concentraciones del mismo, la inactivación de la peroxidasa de escoba blanca es un proceso dependiente del tiempo y de la concentración del inhibidor ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). El mecanismo propuesto involucra la cooperación entre dos etapas, una reversible y otra irreversible que pueden también tener lugar de forma independiente. La contribución individual de cada una de las etapas al mecanismo de inactivación global parece depender de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En la Figura III-22 se muestra un esquema del mecanismo de inactivación propuesto.

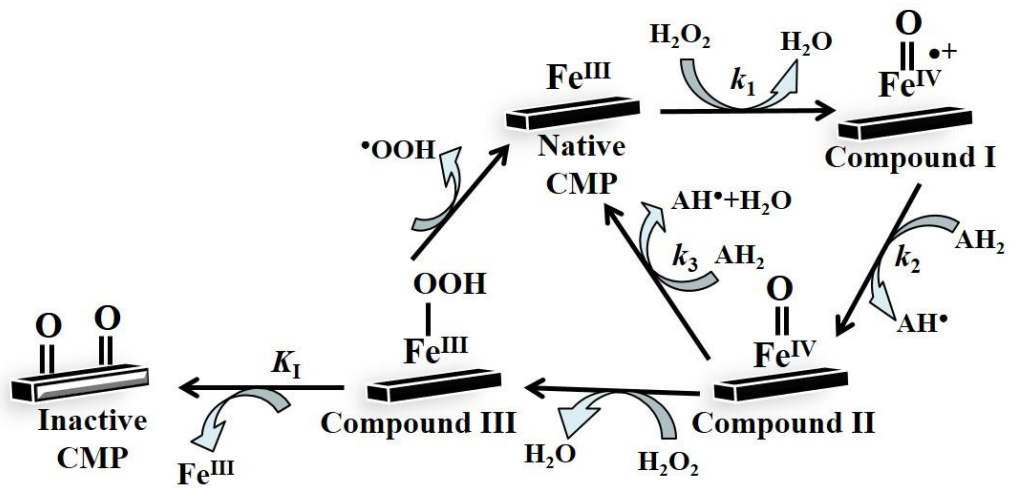


FIGURA III-22

Esquema del proceso de inactivación por sustrato suicida propuesto para la peroxidasa de escoba blanca.

### 3.7.5. Características espectrales de los intermedios

Para conocer detalles sobre la estructura de los diferentes intermedios enzimáticos que participan en el ciclo catalítico, se preparó una disolución proteica de concentración 6  $\mu\text{M}$ . La enzima purificada se encuentra disuelta en tampón acético/acetato 5 mM pH 5.5. La proteína se dializó frente a tampón universal 10 mM pH 7.0 durante 8 horas.

El CoI se detecta trabajando con una concentración de peróxido de hidrógeno 3  $\mu\text{M}$  en 2 mL de la disolución proteica anterior. El CoII se observa con un exceso de peróxido de hidrógeno de cuatro veces superior a la concentración enzimática y el CoIII con excesos de  $\sim 500$  de peróxido de hidrógeno.

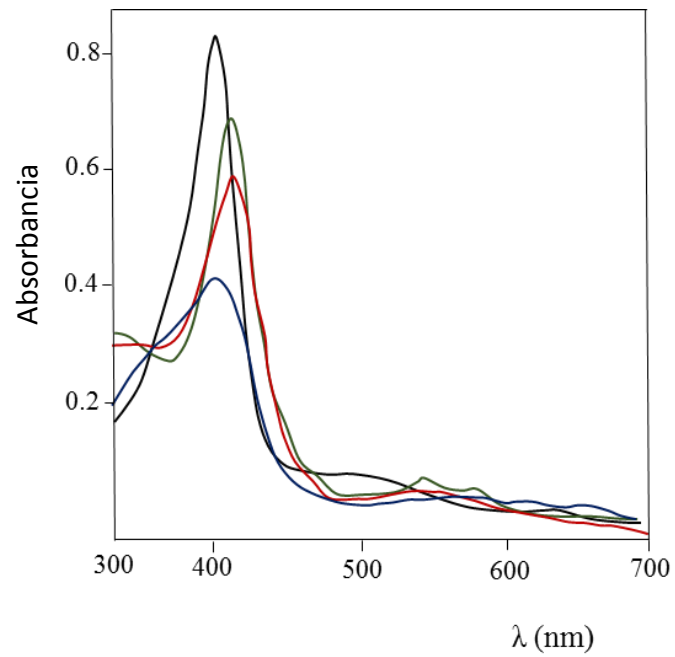
Para el registro de los diferentes espectros de absorción a diferentes tiempos y en las diferentes condiciones mencionadas anteriormente, la temperatura se mantuvo a 25 °C. El registro se llevó a cabo en un espectrofotómetro de doble haz T80+ PG UV/Vis a longitudes de onda entre 300 y 700 nm, con una velocidad de barrido de 400  $\text{nm min}^{-1}$ , en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Las características espectrales de los compuestos CoI, CoII y CoIII se muestran en la Figura III-23.

En el espectro del **CoI** se observa la banda Soret a 400 nm. Aparece un hombro a 350 nm y no hay máximos significativos a partir de 500 nm. El CoI es muy poco estable en el tiempo, se observan sus bandas características en el primer minuto de reacción y posteriormente evoluciona al CoII. El CoII es por tanto, un intermedio más estable que el CoI. Es de esperar que la velocidad con la que cambia de CoI a CoII sea diferente dependiendo de la relación utilizada de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a menores concentraciones de peróxido con respecto a la concentración de la enzima, más lentamente evolucionará CoI hasta CoII. Es por esto que al utilizar una relación  $[\text{E}]/[\text{H}_2\text{O}_2]$  de 0,5 se obtiene el espectro de la Figura III-23. Sin embargo, al utilizar una relación de 0,2 aparece un máximo claro a 650 nm. Este mismo comportamiento se ha observado en el caso de otras peroxidasas vegetales, como es el caso de algunas peroxidasas de palmeras.

En el espectro del **CoII** se observa la banda Soret a 414 nm y un hombro en torno a 340 nm. Presenta también un máximo a 550 nm. Con el transcurso del tiempo, las intensidades de la banda Soret y del hombro van aumentando. Después de una hora de reacción el proceso se invierte.

El espectro del **CoIII** está caracterizado por la presencia de la banda Soret a 413 nm y máximos a 541-576 nm. El **CoIII** aparece a los 2 minutos de reacción y, a medida que transcurre el tiempo se reduce la intensidad de la banda Soret. El espectro a tiempo infinito (después de 24 horas de reacción) presenta una banda Soret mucho más pequeña que la inicial (Figura III-23). Esto indica que el **CoIII** no es un compuesto muy estable en el tiempo, ya que parece que al cabo de 20 min de reacción comienzan a desaparecer las bandas características de este compuesto. Comparando el espectro de **CoIII** con la enzima en su estado nativo, la absorbancia de la banda Soret se reduce aproximadamente un 20 % en el **CoIII**. El espectro del **CoIII** de la peroxidasa de escoba blanca es similar al obtenido para peroxidases de algunas especies de palmeras anteriormente estudiadas en el grupo de investigación, sin embargo cambia la estabilidad puesto que en algunas especies como la palma real, el **CoIII** se mantiene íntegro durante casi una hora y media [225], en este caso ya a los 20 min de reacción comienzan a desaparecer las bandas características, si bien es cierto que a las 24 horas de reacción, el espectro del **CoIII** de la peroxidasa de escoba blanca es muy similar al de la peroxidasa de palma real después de transcurrir el mismo tiempo de reacción.

**FIGURA III-23****Espectros de los compuestos CoI, CoII y CoIII.**

La línea negra corresponde a la enzima en su estado nativo y el resto son en orden el CoI (línea azul), CoII (línea roja) y CoIII (línea verde).

#### 4. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones son las siguientes:

- ❖ Se ha comprobado que la peroxidasa de escoba blanca es una enzima monomérica en su estado nativo. Los análisis de su estructura secundaria por CD revelan que tiene un porcentaje elevado de láminas  $\beta$  en comparación con otras peroxidases de Clase III estudiadas hasta la fecha.
- ❖ Se ha estudiado la estabilidad térmica de la peroxidasa a pH 7.0. Su desnaturalización térmica se ajusta a un modelo irreversible de desnaturalización simple de dos estados controlado cinéticamente. Mediante fluorescencia y CD se han determinado los parámetros termodinámicos  $T^*$  y  $E_A$  obteniéndose valores similares mediante ambas técnicas experimentales.
- ❖ La peroxidasa de escoba blanca es estable en el intervalo de pH de 3.0 a 11.5. Sus parámetros de fluorescencia permanecen sin cambios aparentes en el intervalo de 2 a 11. En este sentido dichos cambios se producen en la zona ácida a valores de pH inferiores frente a los que se producen dichos cambios en la peroxidasa de cacahuete (pH 3) [223], HRP (pH 3) [194] y *Chamaerops excelsa* (pH 2.5) [235].
- ❖ El estudio del comportamiento gráfico de los datos cinéticos en el estado estacionario, junto con la comprobación de la existencia de inhibición competitiva por sustrato, permiten concluir que la catálisis de la oxidación de los diferentes sustratos estudiados sigue un mecanismo ping pong.
- ❖ La peroxidasa aislada de escoba blanca presenta además inactivación por sustrato suicida, un tipo de inhibición clásica de este tipo de enzima.
- ❖ El conocimiento de la enzima en relación a su estructura, estabilidad y cinética hace posible la comparación con otras peroxidases vegetales aisladas y purificadas. Muchas de sus características de estabilidad son similares a la peroxidasa de HRP. Sin embargo, en algunos aspectos se tiene una mejora con respecto a esta última, como es el caso de su mayor estabilidad frente a elevadas concentraciones de  $H_2O_2$  bajo determinadas condiciones. Todo ello permite proponer a la peroxidasa de escoba blanca como enzima interesante en diferentes aplicaciones biotecnológicas.







## Bibliografía

---



## BIBLIOGRAFÍA

- 1- “Screening, extracción y purificación de peroxidasas de residuos agrícolas verdes: caracterización y evaluación de algunas de sus aplicaciones biotecnológicas” (Ref.: SA129A07)
- 2- “Purificación, caracterización y aplicaciones biotecnológicas de una nueva y versátil peroxidasa de escoba blanca (*Cytisus multiflorus*), un arbusto leguminoso abundante y endémico de Castilla y León “ (Ref.: SA052A10-2)
- 3- Hidalgo Cuadrado, N.; Pérez Galende, P.; Manzano, T.; García de María, C.; Shnyrov, V.L. and Roig, M.G. Screening of postharvest agricultural wastes as alternative sources of peroxidases: characterization and kinetics of a novel peroxidase from Lentil (*Lens culinaris* L.) stubble. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (19) (2012) 4765-4772.
- 4- Hiraga, S.; Sasaki, K.; Ito, H.; Ohashi, Y. and Matsumi, H. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42(5) (2001) 462-468.
- 5- Wolfframm, C.; Lingens, F.M.R. and van Pée, K.H. Chloroperoxidase-encoding gene from *Pseudomonas pyrrocinia*-sequence, expression in heterologous hosts and purification of the enzyme. *Gene* 130 (1993) 131-135.
- 6- Smith, A.T. and Veitch, N.C. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Current opinion in chemical biology* 2 (2) (1998) 268-278.
- 7- Kimura, S.; Ikeda-Saito, M. Human myeloperoxidase and thyroid peroxidase, two enzymes both with separate and distinct physiological functions are evolutionarily related members of the same gene family. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 3 (1988) 113-120.
- 8- Bolscher, B.G.J.M.; Plat, H. and Wever, R. Some properties of human eosinophil peroxidase, a comparison with other peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta* 784 (1984) 177-186.
- 9- Picot, D.; Loll, P.J. and Garavito, M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*, 367 (1994) 243-249.
- 10- Churin, Y.; Schilling, S. and Borner, T. A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (barley). *FEBS Lett.* 459 (1999) 33-38.
- 11- Welinder, K.G.; Gajhede, M. Structure and evolution of peroxidases. In: Greppin, H.; Ramussen, S.K.; Welinder, K.G. et al (eds) *Plant peroxidases: biochemistry and physiology*. University of Copenhagen and University of Geneva, Geneva. 1993, 35-42.

- 12- Welinder, K.G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2 (1992) 388-393.
- 13- Erecinska, M.; Oshino, N.; Lolh, P. and Brocklehurst, E. In vitro studies on yeast cytochrome c peroxidase and its possible function in the electron transfer and energy coupling reactions. *Biochim. Biophys. Acta* 292 (1973) 1-12.
- 14- Hatakka, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi-Production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13 (1994) 125-135.
- 15- Valderrama, B.; Ayala, M.; Vázquez-Duhalt, R. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry and Biology* 9 (2002) 555-565.
- 16- Liu, W.; Kumar, J.; Tripathy, S.; Senecal, K.J. and Samuelson, L. Enzymatically synthesized conducting polyaniline. *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 71-78.
- 17- Van Rantwijk, F. and Sheldon, R.A. Selective oxygen transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11 (2000) 554-564.
- 18- Sun, W.; Kadima, T.A.; Pickard, M.A. and Dunford, H.B. Catalase activity of chloroperoxidase and its interaction with peroxidase activity. *Biochem. Cell Biol.* 72 (1994) 321-331.
- 19- Simonishi, M.; Kuwamoto, S.; Inone, H.; Wever, R.; Oshiro, T.; Izumi, Y. and Tanabe, T. Cloning and expression of the gene for a vanadium-dependent bromoperoxidase from a marine macro-algae, *Corallina pilulifera*. *FEBS Lett.* 362 (1998) 105-110.
- 20- Pfeifer, O.; Pelletier, I.; Altenbuchner, J. and von Pée, K.H. Molecular cloning and sequencing of a non-haem bromoperoxidase gene from *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762 and *Ge. Microbiol.* 138 (1992) 1123-1131.
- 21- Thomas, J.A.; Morris, D.R. and Hager, L.P. Chloroperoxidase VII: Classical peroxidase, catalytic and halogenating forms of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 3129-3134.
- 22- Freedman, R.B. Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell* 57 (1989) 1069-1072.
- 23- Crevacoeur, M.; Pinedo, M.; Greppin, H. and Penel, C. Peroxidase activity in shoot apical meristem from *Spinacia*. *Acta Histochemica*, 99 (2) (1997) 177-186.

- 24- Ros Barceló, A.; Zapata, J.M. and Calderón, A.A. Tissue –specific expression of peroxidase activity in seedless grapes (*Vitis vinifera* c.v. Thompson and Flame). *Rev. Esp. Cienc. Technol. Alim.* 34 (1994) 110-116.
- 25- Ros Barceló, A.; Pomar, F.; Ferre, M.A.; Martínez, P.; Ballesta, M.C. and Pedreño, M.A. In situ characterization of a NO-sensitive peroxidase in the lignifying xylem of zinnia elegans. *Physiologia Plantarum*, 114 (1) (2002) 33-40.
- 26- Bednarek, S.Y.; Wilkins, T.A.; Dombrowski, J.E. and Raikhel, N.V. A carboxyl terminal pro-peptide is necessary for proper sorting of barley lectin to vacuoles of tobacco. *Plant Cell* 2 (1990) 1145-1155.
- 27- Passardi, F.; Longet, D.; Penel, C. and Dunand, C. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, 65 (13) (2004) 1879-1893.
- 28- Duroux, L. and Welinder, K.G. The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *J. Mol. Evol.* 53 (2003) 397-407.
- 29- Ros Barceló, A.; Pomar, F. Oxidation of cinamyl alcohol and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Z. elegans* hypocotyls. *Phytochemistry* 57 (2001) 1105-1113.
- 30- Quiroga, M.; Guerrero, C.; Botella, M.A.; Barceló, A.; Amaya, I.; Medina, M.I.; Alonso, F.J.; Forchetti, S.M.; Tigier, M. and Vapuesta, V. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology*, 122 (2000) 1119-1127.
- 31- Bernal, M.A.; Pedreño, M.A.; Calderón, A.A.; Muñoz, R.; Ros Barceló, A. and De Cáceres, F.M. The subcellular localization of isoperoxidases in *Capsicum annuum* leaves and their different expression in vegetative and flowered plants. *Ann. Bot.* 72(5) (1993) 415-421.
- 32- Finzel, B.C.; Polons, T.L. and Krant, J. Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7-Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, 259 (10) (1984) 13027-13036.
- 33- Schuller, D.J.; Ban, N.; van Huystee, R.B.; Mc Pherson, A. and Poulos, T.L. The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure* 4 (1996) 311-321.
- 34- Barber, K.R.; Rodríguez, M.J.; Shaw, G.S. and Van Huystee, R.B. Structural influence of calcium on the heme cavity of cationic peanut peroxidase as determined by H-NMR spectroscopy. *European Journal of Biochemistry* 232 (3) (1995) 825-833.

- 35- Dunford, H.B. Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. Peroxidases in Chemistry and Biology, vol. II Everse, J.; Everse, K.E.; Grisham, M.B. Eds. CRC Press Boca Raton, F.L. (1991) 1-24.
- 36- Banci, L. Structural properties of peroxidases. Journal of Biotechnology 53 (2-3) (1997) 253-263.
- 37- Sutherland, G.R.; Zapanta, L.S.; Tien, M. and Aust, D.S. Role of calcium in maintaining the heme environment of manganese peroxidase. Biochemistry 36 (12) (1997) 3654-3662.
- 38- Veitch, N.C. Structural determinants of plant peroxidase function. Phytochemistry Reviews 3 (2004) 3-18.
- 39- Wilson, I.B.M. Glycosilation of proteins in plants and invertebrates. Current Opinion in Structural Biology 13(1) (2002) 569-577.
- 40- Duarte-Vázquez, M.A.; García-Almendárez, B.E.; Rojo-Domínguez, A.; Whitaker, J.R. and Arroyave-Hernández, C. Monosaccharide composition and properties of a deglycosylated turnip peroxidase isozyme. Phytochemistry, 62(1) (2003) 5-11.
- 41- Hiner, A.N.P.; Martínez, J.I.; Arnao, M.B.; Acosta, M.; Turner, D.D.; Raven, E.L. and Rodríguez-López, J.N. Detection of a tryptophan radical in the reaction of ascorbate peroxidase with hydrogen peroxide. Eur. J. Biochem. 268 (2001) 3091-3098.
- 42- Adediran, S.A. and Lambeir, A.M. Kinetics of the reaction of compound II of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide to form compound III. Eur. J. Biochem. 186 (1989) 571-576.
- 43- Barr, D.P. and Mason, R.P. Mechanism of radical production from the reaction of cytochrome c with organic hydroperoxides, an ESR spin-trapping investigation. J. Biol. Chem. 270 (1995) 12709-12716.
- 44- Waririshi, H. and Gold, M.H. Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. J. Biol. Chem. 265 (1990) 2070-2077.
- 45- Waririshi, H.; Akileswaran, L. and Gold, M.H. Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. Biochemistry 27 (1988) 5365-5370.
- 46- Hiner, A.N.P.; Rodríguez-López, J.N.; Arnao, M.B.; Lloyd Raven, E.; García-Cánovas, F. and Acosta, M. Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide. Biochem. J. 348 (2000) 321-328.

- 47- Hiner, A.N.; Hernández-Ruiz, J.; García-Cánovas, F.; Smith, A.T.; Arnao, M.B. and Acosta, M. A comparative study of the inactivation of wild-type, recombinant and two mutant horseradish peroxidase isoenzymes c by hydrogen peroxide and m-chloroperoxybenzoic acid. *Eur. J. Biochem.* 234 (1995) 506-512.
- 48- Almagro, L.; Gómez Ros, L.V.; Belchi-Navarro, S.; Bru, R.; Ros Barceló, A. and Pedreño, A. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of experimental botany*, 60 (2) (2009) 377-390.
- 49- Fry, S.C. Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: intra and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimmers and larger products and possible role in inter-polymeric crosslinking. *Phytochemistry Reviews* 3 (2004) 97-111.
- 50- Ralph, J.; Lundquist, K.; Brunow, G.; Lu, F.; Kim, H.; Schatz, P.F.; Marita, J.M.; Hatfield, R.D.; Ralph, S.A., Christesen, J.M. and Boerjam, W. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. *Phytochemistry Reviews* 3 (2004) 29-60.
- 51- Bernards, M.A.; Fleming, W.D.; Lewellyn, D.B.; Priefer, R.; Yang, X.; Sabatino, A. and Plourde, G.L. Biochemical characterization of the suberization associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiology* 121 (1999) 135-145.
- 52- Srivastava, V.; Schinkel, H.; Witzell, J.; Hertzberg, M.; Torp, M.; Srivastava, M.K.; Karpinska, B.; Melzer, M.; Wingsle, G. Downregulation of high-isoelectric-point extracellular superoxide dismutase mediates alterations in the metabolism of reactive oxygen species and developmental disturbances in hybrid aspen. *The plant journal* 49 (2007) 135-148.
- 53- Bernards, M-A-; Summerhurst, D.K.; Razen, F.A. Oxidases, peroxidases and hydrogen peroxide: the suberin connection, *Phytochemistry Reviews* 3 (2004) 113-126.
- 54- Savitsky, P.A.; Gazaryan, I.G.; Tishkov, V.I.; Lagrimini, L.M.; Ruzgas, T. and Gorton, L. Oxidation of indole-3-acetic acid by doxygen catalysed by plant peroxidase: specificity for the enzyme structure. *Biochem. J.* 340 (1999) 579-583.
- 55- Dunford, M.B. Heme peroxidases. Wiley-Vch, Nueva York USA (1999).
- 56- Ascenzi, P.; Brunon, M.; Coletta, M. and Desideri, A. pH effects on the haem iron coordination state in the nitric oxide and deoxy derivatives of ferrous horseradish peroxidase and cytochrome c peroxidase. *Biochemical Journal* 258 (1989) 473-478.

- 57- Yonetani, T.; Yamamoto, H.; Erman, J.E.; Leigh, Jr J.S. and Reed, G.H. Electromagnetic properties of hemoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 247 (1972) 2447-2455.
- 58- Costa, M.M.R.; Hillion, F.; Duarte, P.; Pereira, L.G.; Almeida, I.; Leech, M.; Memelink, J.; Ros Barceló, A.; Sottomayor, M. Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharantus roseus*. *Plant physiology* 146 (2008) 403-417.
- 59- Hamid, M. and Khalil-ur-Rehman. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry* 115 (2009) 1177-1186.
- 60- Siddique, M.H.; St. Pierre, C.C.; Biswas, N.; Bewtra, J.K. and Taylor, K.E. Immobilized enzyme catalysed removal of 4-chlorophenol from aqueous solutions. *Water research* 27 (1993) 883-890.
- 61- Dordick, J.S.; Marletta, M.A. and Klivanov, A.M. Polymerization of phenols catalysed by peroxidase in non-aqueous media. *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1987) 31-36.
- 62- Vasileva, N.; Godjevargova, T.; Ivanova, D. and Gabrovska, K. Application of immobilized horseradish peroxidase onto modified acrylonitrile copolymer membrane in removing of phenol from water. *International Journal of Biological Macromolecules* 44 (2009) 190-194.
- 63- Duarte- Vázquez, M.A.; Ortega-Tovar, M.A.; García Almendáred, B.E.; Regalado, C. Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Bassica narpus* L. Var) purple tap white globe peroxidase. *Journal of Chemical Technol. Biotechnol.* 78 (2002) 42-47.
- 64- Aitken, M.D.; Massey, I.J.; Chen, T.P. and Heck, P.E. Characterization of reaction products from the enzyme catalysed oxidation of phenolic pollutants. *Water Research* 28 (1994) 1879-1889.
- 65- Aitken, M.D.; Venkatachi, R. and Irvine, R.L. Oxidation of phenolic pollutants by a lignin degrading enzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete Chrysosporium*. *Water Research* 23 (1989) 443-450.
- 66- Cornwell, K.L.; Tinland-Butez, M.F.; Tardone, P.J.; Cabasso, I. and Hammel, K.E. Lignin degradation and lignin peroxidase production in cultures of *Phanerochaete Chrysosporium* immobilized on porous ceramic supports. *Enzyme Microbiology and Technology* 12 (1990) 916-920.



- 67- Caza, N.; Bewtra, J.K.; Biswas, N. and Taylor, K.E. Removal of phenolic compounds from wastewater using soybean peroxidase. *Water Research* 33 (1999) 3012-3018.
- 68- Kinsley, C. and Nicell, J.A. Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Bioresource and Technology* 73 (2000) 139-146.
- 69- Humaira, A. and Qayyum, H. Studies on bitter gourd peroxidase catalysed removal of p-bromophenol from wastewater. *Desalination* 262 (2010) 267-272.
- 70- Taboada-Puig, R.; Junghanns, C.; Demarche, P.; Moreira, M.T.; Feijoo, G.; Lema, J.M. and Agathos, S.N. Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: production, partial characterization and application for the determination of endocrine disruptors. *Bioresource Technology* 102 (2011) 6593-6599.
- 71- Zoheb, K. and Qayyum, H. Application of fly ash absorbed peroxidase for the removal of bisphenol A in batch process and continuous reactor: assessment of genotoxicity of its product. *Food and Chemical Toxicology* 48 (2010) 3385-3390.
- 72- Xainghna, W.; Yannan, J. and Jiayi, L. Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from *Phanerochaete Chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials* 177 (2010) 924-928.
- 73- O'Neil, C.; Hawkes, F.R.; Hawkes, D.L.; Lourenço, N.D.; Pinheiro, H.M. and Delée, W. Colours in textile effluents: sources, measurements, discharge consents and simulations. A review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74 (1999) 1009-1018.
- 74- Guratini, C.C.I. and Zanoni, M.V.B. Textile dyes. *Quimica Nova* 23 (1) (2004) 71-78.
- 75- Forgacs, E.; Cserháti, T. and Oros, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environmental International* 30 (2004) 953-971.
- 76- Lin, S.H. and Peng, C.F. A continuous Fenton's process for treatment of textile wastewaters. *Environmental Technology* 16 (1995) 693-699.
- 77- Ince, N.H. and Gonenc, D.T. Treatability of a textile azo dye by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Environmental Technology* 18 (1997) 179-185.
- 78- Kunz, A.; Peralta-Zamora, P.; Gomes de Moraes, S. and Durán, N. New tendencies on textile effluent treatment. *Quimica Nova* 25 (1) (2002) 78-82.
- 79- Gutiérrez, M.C. and Crespi, M. A review of electrochemical treatments for colour elimination. *Journal of Society of Dyers and Colourists* 115 (11) (1999) 342-345.

- 80- Gahr, F.; Hermantz, F. and Opperman, W. Ozonation: an important technique to comply with new German law for textile wastewater treatment. *Water Science and Technology* 30 (1994) 255-263.
- 81- Méndez- Paz, D.; Omil, F. and Lema, J.M. Anaerobic treatment of azo dye acid orange 7 under fed-batch and continuous conditions. *Water Research* 39 (2005) 771-778.
- 82- Chung, K.T.; Stevens, S.E. and Cerniglia, C.R. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Critical Reviews of Microbiology* 18 (1992) 175-190.
- 83- Pagga, U. and Brown, D. The degradation of dyestuffs: part II. Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere* 15(4) (1986) 479-491.
- 84- Torres, E.; Bustos-Jaimes, I. and Le Borgne, S. Potential use of oxidative enzymes for the catalysis B: environmental 46 (2003) 1-15.
- 85- Chivukula, M.; Spadaro, J.P. and Renganathan, V. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochemistry* 34 (1995) 7765-7772.
- 86- Tatsumi, K.; Wada, J.; Ichikawa, H. Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering* 51 (1996) 126-130.
- 87- Bhunia, A.; Durani, S. and Wangikar, P.P. Horseradish peroxidase catalysed degradation of industrially important dyes. *Biotechnology and Bioengineering* 72 (2002) 562-567.
- 88- Colonna, S.; Gaggero, N.; Richelmi, C.; Pasta, P. Recent biotechnological developments in the use of peroxidase. *Elsevier Science* 17 (1999) 163-168.
- 89- Kim, Y.H.; An, E.S.; Song, B.K.; Kim, D.S. and Chelikani, R. Polymerization of cardanol using soybean peroxidase and its potential application as anti-biofilm coating material. *Biotechnology Letters* 25 (2003) 1521-1524.
- 90- Raitman, O.A.; Katz, E.; Buckmann, A.F. and Willner, I. Integration of polyaniline/poly(acryl acid) films and redox enzymes on electrode supports: an in situ electrochemical/surface plasmon resonance study of the bioelectrocatalyzed oxidation of glucose or lactate in the integrated bioelectrocatalytic systems. *Journal of American Chemical Society* 124 (2002) 6487-6496.
- 91- Rannon, P.; Gawlicka, A.; Berner, D.; Pron, A.; Nechtsschein, M. and Djurado, D. Spectroscopic structural and transport properties of conducting polyaniline processed from fluorinated alcohols. *Macromolecular* 31 (1998) 1307-1315.

- 92- Sakharov, I.Y.; Vorabiev, A.C. and Leon, J.J.C. Synthesis of polyelectrolyte complexes of polyaniline and sulfonated polystyrene by palm tree peroxidase. *Enzyme Microbiology and Technology* 33 (2003) 661-667.
- 93- Bergmeyer, J.; Grassl, M. *Methods of enzymatic analysis*. VCH 1985.
- 94- Guilbault, G.G. *Analytical uses of immobilized enzymes Vol.2 Modern monographs in analytical chemistry*. Editor M. Dekker, 1984.
- 95- Regalado, C.; García-Almendárez, B.E.; Duarte-Vázquez, M.E. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Reviews* 3 (2004) 243-256.
- 96- Sekhon, B.S.; Sangha, M.K. Detergents-zeolites and enzymes excel clearing power. *Resonance* 9 (2004) 35-45.
- 97- [http://articles.jimtrade.com/1/59\\_2.htm](http://articles.jimtrade.com/1/59_2.htm)
- 98- Hatakka, A.; Hakacla, T.; Lundell, T.; Horichter, M. and Maijala, P. Manganese peroxidase the key enzyme in the lignin biodegradation and biopulping by white rot fungus. Abstracts of papers 223<sup>rd</sup> ACS national meeting (CELL-028) April 7-11, Orlando, F.L., Washington.
- 99- Zahn, J.A.; Hartfield, J.L.; Do, Y.S.; Di Spirito, A.A.A; Laird, D.A.A and Pfeiffer, R.L. Characterization of volatile organic emission and wastes from a swine production facility. *Journal of Environmental Quality*, 26 (1997) 1687-1696.
- 100- Govere, E.M.; Tonegawa, M.; Bruns, M.A.; Wheeler, E.F.; Kephart, K.B.; Voigt, J.W. and Dec, J. Using minced horseradish roots and peroxidase for the deodorization of swine manure: a pilot scale study. *Bioresource Technology* 98 (2007) 1191-1198.
- 101- Folkes, L.K. and Wardman, P. Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species- a potential new role for plant auxins in cancer therapy. *Biochemical Pharmacology* 61 (2001) 129-136.
- 102- Alonso, J. and Cristóbal, M.D. *Las lentejas*. Franco, F.; Ramos, A. El cultivo de las leguminosas de grano en Castilla y León. Junta de Castilla y León, Valladolid (1996) 399-442.
- 103- Thomé, O.W. *Flora von Deutschland Österreich and der Schweiz*. [www.Biolib.de](http://www.Biolib.de) de produziert.
- 104- Duke, J.A. *Legume Species. Handbook of Legumes of Economic Importance*. Springer (1981) 67-102.
- 105- Muehlbauer, F.J.; Tulu, A. *Lens culinaris* Medik. In: *NewCROP FactSHEET*. (1997) <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/CropFactSheets/lentil.html>.

- 106- Aparicio-Tejo, P.M.; Arrese\_Igor, C.; Becana, M. Fijación de nitrógeno. En: Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (eds). Fisiología y Bioquímica Vegetal. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid (1993) 193-213.
- 107- International Board of Plant Genetic Resources. Rome, International Centre for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo (1985). Lentil Descriptors. IBPGR Secretariat, 19.
- 108- Pérez de la Vega, M.; Fratini, R.; Muehlbauer, F.J. Lentil. En: Pérez de la Vega, M.; Torres, A.M.; Cubero, J.I.; Kole, C. (eds). Genomic and Breeding of Cool Season Grain Legumes. Science Publishers (2011) 448.
- 109- “La agricultura y la ganadería de Castilla y León en cifras”. Conserjería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León (2012).
- 110- Boye, J. New uses of Legumes. Acta de la Asociación Española de Leguminosas 3 (2008) 52-56.
- 111- Millán, F.; Pedroche, J.; Yust, M.M.; Megías, C.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M.; Vioque, J. Las leguminosas: fuente potencial de componentes bioactivos. En: De los Mozos Pascuala, M.; Giménez Alvear, M.J.; Rodríguez Conde, M.F.; Sánchez Vioque, R. (coord.). Nuevos retos y oportunidades de las leguminosas en el sector agroalimentario español: 2ª jornada de la Asociación Española de Leguminosas, Cuenca, 25-27 de Abril de 2006, 419-426.
- 112- Aydin, H.; Buluta, Y.; Yerlikaya, C. Removal of copper (II) from aqueous solution by absorption onto low-cost adsorbents. Journal of Environmental Management 87 (2008) 37-45.
- 113- Altaf, M.; Venkateshwar, M.; Sirijana, M.; Reddy, G. An economic approach for L-(+)-lactic acid fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using inexpensive carbon and nitrogen sources. Journal of Applied Microbiology, 103 (2007) 372-380.
- 114- Fatibello-Filho, O.; Lupetti, K.O.; De Leite, O.; Vieira, I.C. Electrochemical biosensors base on vegetables and crude extracts for environmental, food and pharmaceutical analysis. Comprehensive Analytical Chemistry, 49 (2007) 357-377.
- 115- Tomita, I.N.; Manzoli, A.; Fertronami, F.L.; Yamanaka, H. Amperometric biosensor for ascorbic acid. Electrochimica Acta, 30(2) (2005) 37-43.
- 116- Fatibello-Filho, O. and Vieira, I.C. L-ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). Journal of Brazilian Chemical Society, 11(4) (2000) 412-418.

- 117- Sezguntürk, M.K.; Dinçkaya, E. A novel amperometric biosensor based on spinach (*Spinacea oleracea*) tissue homogenate for urinary oxalate determination. *Talanta*, 59 (2001) 545-551.
- 118- Leite, O.D.; Lupetti, K.O.; Fatibello-Filho, O.; Vieira, I.C.; Barbosa, A.M. Synergic effect of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltametric biosensor of catecolamines. *Talanta*, 59 (2003) 889-896.
- 119- Fatibello-Filho, O.; Lupetti, K.O.; Vieira, I.C. Procedure 23 Determination of total phenols in wastewaters using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of jack fruit (*Artocarpus integrifolia*, L.). *Comprehensive Analytical Chemistry*; 49 (2007) 163-168.
- 120- Cruz-Silva, R.; Romero-García, J.; Angulo-Sánchez, J.L.; Ledesma-Pérez, A.; Arias-Marín, E.; Moggio, I.; Flores-Loyola, E. Template-free enzymatic synthesis of electrically conducting polyaniline using soybean peroxidase. *European Polymer Journal*, 41(5), (2005) 1129-1135.
- 121- Rannou, P.; Gawlicka, A.; Berner, D.; Pron, A.; Nechtsschein, M. and Djurado, D. Spectroscopic, structural and transport properties of conducting polyaniline processed from fluorinated alcohols. *Macromolecular*, 31 (1998) 1307-1315.
- 122- Liu, W.; Kumar, J.; Tripathy, S.; Kris, J.S. and Samuelson, L. Enzymatically Synthesized conducting polyaniline. *Journal of Analytical Chemistry Society*, 121 (1999) 71-78.
- 123- Sakharov, I.Y.; Vorobiez, A.C.; Castillo León, J.J. Synthesis of polyelectrolyte complexes of polyaniline and sulfonated polystyrene by palm tree peroxidase. *Enzyme and microbial Technology*, 83(5) (2003) 661-667.
- 124- Bellon, G.; Lundy, A.M.; Malgras, A. and Boel, J.P. Fluorimetric evaluation of sarcosine in urine and serum. *Journal of Chromatography*, 311 (1984) 405-410.
- 125- Gritsen, T.; Waisman, H.A. Hypersarcosinaemia an inborn error of metabolism. *New England Journal of Medicine*, 275 (1966) 66-69.
- 126- Lee, S.Y.; Chan, K.Y.; Chan, A.Y.W.; Lai, C.K. A report of two families with sarcosinaemia in Hong Kong and revising the pathogenetic potential of Hypersarcosinaemia. *Annals Academy of Medicine*, (2006) 582-584.
- 127- Meisner, T.; Mayatepek, E. Sarcosinaemia in a patient with severe progressive neurological damage and hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Metabolism Disease*, 20 (1997) 717-718.
- 128- *The Journal of Pediatrics* (1970).

- 129- Sreekumar, A.; Pisson, L.M.; Rajendiran, T.M. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 457 (2009) 910-915.
- 130- Jentzmik, F.; Stephan, C.; Miller, K.; Schrader, M.; Ebersdobler, A.; Kristiansen, G.; Lein, M.; Jung, K. Sarcosine in urine after digital rectal examination fails as a marker in prostate cancer detection and identification of aggressive tumours. *European Urology*, 58 (2010) 12-18.
- 131- Schalken, J.A. Is urinary sarcosine useful to identify patients with significant prostate cancer? The trials and tribulations of biomarkers development. *European Urology*, 58 (2010) 19-21.
- 132- Stephan, C.; Jentzmik, F.; Jung, K. Reply authors re: Is urinary sarcosine useful to identify patients with significant prostate cancer? The trials and tribulations of biomarker development. *European Urology*, 58 (2010) 19-20.
- 133- Lad, U.; Khokhar, S.; Kale, G.M. Electrochemical creatinine biosensors. *Analytical Chemistry*, 80(21) (2008) 7910-7917.
- 134- Ramanavicius, A. Amperometric biosensor for the determination of creatine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(5) (2007) 1899-1906.
- 135- Li, Q.; Thikhuni, P.S.; Motomiza, S. Development of novel reagent Hantzsch reaction for the determination of formaldehyde by spectrophotometry and Fluorimetry. *Analytical Sciences*, 23 (2007) 413.
- 136- Bianchi, F.; Dugheri, S.; Musci, M.; Bonacchi, A.; Salvadori, E.; Arcangeli, G.; Cupelli, V.; Lanciotti, M.; Masieri, L.; Serni, S.; Carini, M.; Cereri, M. and Mangia, A. Fully automated solid-phase microextraction-fast gas chromatography-mass spectrometry method using a new ionic liquid column for high-throughput analysis of sarcosine and N-ethylglycine in human urine and urinary sediments. *Analytica Chimica Acta* 707 (2011) 197-203.
- 137- Rebelo, T.S.C.R.; Pereira, C.M.; Sales, M.G.F.; Noronha, J.; Costa-Rodrigues, J.; Silva, F. and Fernandes, M.H. Sarcosine oxidase composite screen-printed electrode for sarcosine determination in biological samples. *Analytica Chimica Acta* 850 (2014) 26-32.
- 138- Lan, J.; Xu, W.; Wan, Q.; Zhang, X.; Lin, J.; Chen, J. and Chen, J. Colorimetric determination of sarcosine in urine samples of prostatic carcinoma by mimic enzyme palladium nanoparticles. *Analytica Chimica Acta* 825 (2014) 63-68.

- 139- Pandey, A.; Webb, C.; Sccol, C.R.; Larroche, C. *Enzyme Technology*. Springer Science, Business Media, INC. and Asiatech Publisers, Inc (2006).
- 140- Struys, E.A.; Heijboer, A.C.; Van Moorselaar, J.; Jackobs, C.; Blankenstein, M.A. Serum sarcosine is not a marker for prostate cancer. *Annals of Clinical Biochemistry*, 47(3) (2010) 282.
- 141- Benabdelkamel, H.; Di Donna, L.; Macchiones, B.; Naccarato, A.; Tagarelli, A.; Sindona, G. Rapid determination of sarcosine in biological human fluids samples based on derivatization followed by SPME-GC-MS/MS using the isotope dilution method. *Proceedings XXIII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana, Sorrento (Italia) (2009)*.
- 142- Cavaliere, B.; Macchione, B.; Monteleone, M.; Naccarato, A.; Sindona, G. and Tagarelli, A. Sarcosine as a marker in prostate cancer progression: a rapid and simple method for its quantification in human urine by solid-phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400 (2011) 2903-2912.
- 143- Suzuki, H. Sarcosine oxidase structure, function and the application to creatinine determination. *Amino acids*, 7 (1994) 27-43.
- 144- Ida, K.; Monguchi, T. and Suzuki, H. Crystal structure of heterotetrameric sarcosine oxidase from *Corynebacterium* sp U-96. *Biochemistry and Biophysical Research Communications*, 333 (2005) 359-366.
- 145- Kavalnes-Krick, K.; Jorus, M.S. Bacterial sarcosine oxidase comparison of two multisubunit enzymes containing both covalent and noncovalent flavin. *Biochemistry* 25 (1986) 6061-6069.
- 146- Ogashi, S.; Nagano, K.; Emi, S.; Ando, M.; Tsuru, D. Sarcosine oxidase from *Arthibacter ureafaciens*, purification and some properties. *Chemical Pharmacology Bull*, 36 (1988) 1445-1450.
- 147- Meskys, R.; Rudomanskis, R. and Leipuvien, R. Cloning of genes encoding heterotetrameric sarcosine oxidase from *Anthrobacter* sp. *Biotechnology Letters*, 18 (1996) 781-786.
- 148- Motonaka, J.; Takabayashi, H.; Ikeda, S.; Tanaka, N. Preparation and properties of a micro enzyme sensor for creatinine. *Analytical Letters*, 23 (1990) 1981-1991.
- 149- Sakharov, I.Y.; Castillo, L.J.; Areza, J.C.; Galaev, I.Y. Purification and stability of peroxidase of African oil palm *Alaies guineensis*. *Bioseparation*, 9 (2000) 125-132.

- 150- Chance, B.; Mahely, A.C. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2 (1995) 764-775.
- 151- Josephy, P.D.; Eling, T. and Mason, R.P. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. *The Journal of Biological Chemistry*, 257 (1982) 3669-3675.
- 152- Volpe, G.; Compagnone, D.; Draisci, R. and Palleschi, G. 3, 3', 5,5'-tetramethylbenzidine as electrochemical substrate for horseradish peroxidase-based enzyme immunoassay: a comparative study. *Analyst*, 123 (1998) 1303-1307.
- 153- Kireyko, A.V.; Veselova, I.A. and Shekhovtsova, T.N. Mechanisms of peroxidase oxidation of o-dianisidine, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and o-phenylenediamine in the presence of sodium dodecyl sulphate. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 32 (2006) 71-77.
- 154- Frey, A.; Meckelein, B.; Externes, D. and Schmidt, M.A. A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Immunological Methods*, 233 (2000) 47-56.
- 155- Nicell, J.A. and Wright, H. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme Microb Tech* 21, (1997) 302-310.
- 156- Arnao, M.B.; Acosta, M.; del Río, J.A.; Varón, R. and García-Cánovas, F. A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1041 (1990) 43-47.
- 157- Suzuki, M. Purification and some properties of sarcosine oxidase from *Corynebacterium* sp. U-96. *Journal of Biochemistry*, 89 (1981) 599-607.
- 158- [http://www.3sct.com/product\\_info.asp? Id=125](http://www.3sct.com/product_info.asp? Id=125). 3SCT Diagnostic (Beijing 35 Century Technology Corporation) Información sobre productos.
- 159- Polunin, O. Guía de campo de las Flores de Europa, (1982). Omega, Barcelona.
- 160- García, R.M. Atlas clasificatorio de la flora de España peninsular y Balear, (2001). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Mundi-Prensa Eds. 2ª Ed. Vol. I y II, 760-797.
- 161- Vicioso, C.A. Genisteas españolas I y II 1953-56. *Bol. Inst. For. Inv. Exper. Madrid*, 67-72.
- 162- Pascual, H. Leguminosas en la Península Ibérica y Baleares, (1978). En: *Flora Europea*. Publ. Inst. Nac. De Inv. Agrarias. Ministerio de Agricultura. Madrid.
- 163- Greuter, W.; Burdet, H.M. and Long, G. (Eds.) (1989). *Med-checklist 4, Picotyledones (Lauraceae-Rhamnaceae)*. Gêneve, 83-85.



- 164- Martínez Ropero, V. Estudio de factores condicionantes de la distribución de *Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet en España, (1988). Tesis de Licenciatura. Universidad de Salamanca.
- 165- López, D.; Hiner, A.; Tudela, J.; Cánovas, F.G.; López, J.N. Enzymatic removal of phenols from aqueous solution by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. *Enzyme and Mic. Technol.* 33 (2003) 738-742.
- 166- Bassi, A.; Gen, Z.; Gijzen, M. Enzymatic removal of phenols and chlorophenols using soybean seed hulls. *Engineering in Life Sciences* 4 (2) (2004).
- 167- López-Molina, D.; Heering, H.A.; Smutevich, G.; Tudela, J.; Thorneley, R.N.F.; García-Cánovas, F.; Rodríguez-López, J.N. *Journal of inorganic Biochemistry* 94 (2003) 243-254.
- 168- Tatsumi, K.; Wada, S.; Ichikawa, H. Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 51 (1996) 126-130.
- 169- Sakharov, I.Y.; Castillo, L.J.; Areza, J.C.; Galaev, I.Y. Purification and stability of peroxidase of African oil palm *Elaiis guineensis*. *Bioseparation* 9 (2000) 125-132.
- 170- Cummins, P.M.; Dowling, O. and O'Connor, B.F. Ion-exchange Chromatography: Basic Principles and Application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligopeptidase protein chromatography, (2011). En: Walls, D.; Loughran, S.T. (Eds). Humana Press, 215-228
- 171- Lienqueo, M.E.; Salazar, O.; Henriquez, K.; Clado, C.R.C.; Fonseca, L.P.; Cabral, J.M. Prediction of retention time of cutinases tagged with hydrophobic peptides in hydrophobic interaction chromatography, (2007). *Journal of Chromatography A*, 1154, 460-463.
- 172- Queiroz, J.A.; Tomaz, C.T.; Cabral, J.M.S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins (2001). *Journal of Biotechnology*, 87, 143-159.
- 173- O'Farrell, P.A. Hydrophobic Interaction Chromatography Molecular Biotechnology Handbook, (2008). En: Walker, J.M.; Rapley, R. (Eds.). Humana Press, 731-739.
- 174- Kostanski, L.K.; Keller, D.M. and Hamielec, A.E. Size-exclusion chromatography- A review of calibration methodologies, (2004). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 58, 159-186.
- 175- Hagel, L. Gel filtration: size exclusion chromatography. *Protein Purification*, (2011). John Wiley & Sons, Inc. 51-91.

- 176- Cutler, P. Size-Exclusion Chromatography Molecular Biomethods Handbook, 2008. En: Walker, J.M.; Rapley, R. (Eds.). Humana Press, 719-729.
- 177- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding (1976). *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- 178- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 (1970). *Nature* 227, 680-685.
- 179- Castillo León, J.; Alpeeva, I.S.; Chubar, T.A.A.; Galaev, I.Y.; Csoregi, E.; Sakharov, I.Y. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers (2002). *Plant Sci.* 163, 1011-1019.
- 180- Gazaryan, I.G. and Lagrimini, L.M. Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase (1996). *Phytochemistry* 41, 1029-1034.
- 181- Sakharov, I. Yu.; Castillo, L. J.; Areza, J.C. and Galaev, I.Yu. Purification and stability of peroxidase of African oil palm *Elaeis guineensis* (2000). *Bioseparation* 9, 125-132.
- 182- Brouillard, R.; Dangles, O. The flavonoids. *Advances in Research since 1986* (1993). J. B. Harborne. Chapman & Hall, London.
- 183- Deepa, S. and Arumughan, C. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf (2002). *Phytochemistry* 61, 503-511.
- 184- Shanon, L.M.; Kay, E.; Lew, J.Y. Peroxidase isozymes from horseradish roots I. Isolation and physical properties (1966). *J. Biol. Chem.* 241, 2166-2172.
- 185- Dill, K.A. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29 (1990), 7133-7155.
- 186- Kumar, S. and Nussinov, R. Salt bridge stability in monomeric proteins. *Journal of Molecular Biology* 293 (1999) 1241-1255.
- 187- Kawamura, S.; Tanaka, I, and Kimura, M. Contribution of a salt bridge to the thermostability of DNA binding protein HU from *Bacillus stearothermophilus* determined by site directed mutagenesis. *Journal of Biochemistru* 121 (1997) 448-455.
- 188- Marti, D.N. and Bosshard, H.R. Electrostatic interactions in leucine zippers: thermodynamic analysis of the constributions of Glu and His residues and the effect of mutating salt bridges. *Journal of Molecular Biology* 330 (2003) 621-637.
- 189- Pace, C.N. Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. *Journal of Molecular Biology* 226 (1992) 29-35.

- 190- Stickle, D.F.; Presta, L.G.; Dill, K.A. and Rose, G.D. Hydrogen bonding in globular proteins. *Journal of Molecular Biology* 226 (1992) 1143-1159.
- 191- Myers, J.K. and Pace, C.N. Hydrogen bonding stabilizes globular proteins. *Biophysical Journal* 71 (1996) 2033-2039.
- 192- Pace, C.N. Single surface stabilizer. *Nature Structural and Molecular Biology* 7 (2000) 345-346.
- 193- Schell, D.; Tsai, J.; Scholtz, J.M. and Pace, C.N. Hydrogen bonding increases packing density in the protein interior. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 63 (2006) 278-282.
- 194- Pina, D.G.; Shnyrova, A.V.; Gavilanes, F.; Rodríguez, A.; Leal, F.; Roig, M.G.; Sakharov, I.Y.; Zhadan, G.G.; Villar, E. and Shnyrov, V.L. Thermally induced conformational changes in horseradish peroxidase. *European Journal of Biochemistry* 268 (2001), 120-126.
- 195- McEldoon, J.P.; Dordick, J.S. Extraordinary thermal stability of soybean peroxidase. *Biotechnology Progress* 12 (1996) 555-558.
- 196- Amisha Kamal, J.K.; Behere, D.V. Thermal and conformational stability of seed coat soybean peroxidase. *Biochemistry* 41 (2002) 9034-9042.
- 197- Rasmussen, C.B.; Henriksen, A.; Abelskov, A.K.; Jensen, R.B.; Rasmussen, S.K.; Hejgaard, J.; Welinder, K.G. Purification, characterization and stability of barley grain peroxidase BP1, a new type of plant peroxidase. *Physiol. Plant* 100 (1997) 102-110.
- 198- Sakharov, I.Y. Palm tree peroxidases. *Biochemistry* 69 (2003) 823-829.
- 199- Rodríguez, A.; Pina, D.G.; Yélamos, B.; Castillo-León, J.J.; Zhadan, G.G.; Villar, E.; Gavilanes, F.; Roig, M.G.; Sakharov, I.V. and Shnyrov, V.L. Thermal stability of peroxidase from the African oil palm tree *Elais guineensis*. *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 2584-2590.
- 200- Creighton, T.E. *Protein structure: a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press (1981) Capítulo 11. Spectral Methods of characterizing protein conformation and conformational changes 251-284.
- 201- Creighton, T.E. *Protein structure: a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press (1981) Capítulo 13. Measuring the conformational stability of a protein 311-329.
- 202- Burstein, E.A. *Luminescence of Protein Chromophores, vol. 6. Model studies. Science and Technology Results. Biophysics, VINITI, Moscow* (1976).

- 203- Sreerama, N.; Venyaminov, S.Y. and Woody, R.W. Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci.* 8 (1999) 370-380.
- 204- Yang, J.T.; Wu, C.S. and Martínez, H.M. Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol.* 30 (1986) 209-269.
- 205- Kuwajima, K. Circular Dichroism. *Methods Mol. Biol.* 40 (1995) 115-135.
- 206- Manavalan, P.; Johnson, W.C. Jr. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* 167 (1) (1987) 176-185.
- 207- Johnson, W.C. Jr. Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* 7 (1990) 205-214.
- 208- Greenfield, N.J. Methods to estimate the conformational of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.* 235 (1996) 1-10.
- 209- Silva, J.L. Foguel, D. and Royer, C.A. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. *Trends Biochem. Sci.* 26 (2001) 612-618.
- 210- Freire, E., van Osdol, W.W.; Mayorga, O.L. and Sánchez-Ruiz, J.M. Calorimetrically determined dynamics of complex unfolding transitions in proteins. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 19 (1990) 159-188.
- 211- Privalov, P.L. Stability of proteins. Small globular proteins. *Adv. Protein Chem.* 33 (1979) 167-241.
- 212- Mabrey, S. and Sturtevant, J.M. High-sensitivity differential scanning calorimetry in the study of biomembranes and related model systems. *Methods Membr. Biol.* 9 (1978) 237-274.
- 213- Bach, D. and Chapman, D. *Biological Microcalorimetry*. Beezer, A.E. Ed. Academic Press, London (1980) pág. 265.
- 214- Kurganov, B.I.; Lyubarev, A.E.; Sánchez-Ruiz, J.M.; Shnyrov, V.L. Analysis of differential scanning calorimetry data for proteins: Criteria of validity of one-step mechanism of irreversible protein denaturation. *Biophys. Chem.* 69 (1997) 125-135.
- 215- Wetlaufer, D.B. *Adv. Protein Chem.*, 17 (1962), 303.
- 216- Cantor, C. and Timasheff, S.N. In *the proteins*, 3<sup>rd</sup> ed (1982), Neurath, H. (ed.), Academic Press, New York, Vol. V, p. 145.
- 217- Voet, D.; Judith G. and Prat, C.W. *Fundamentals of Biochemistry*. Editorial Médica Panamericana, 2<sup>a</sup> edición (2007) Buenos Aires, Argentina. Capítulo 12: Cinética, inhibición y regulación de las enzimas, pág 369.

- 218- Cleland, W.W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. Nomenclature and rate equations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects*, 67 (1963) 104-137.
- 219- Sreerama, N. and Woody, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of COTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 287 (2000) 252-260.
- 220- Sreerama, N. and Woody, R. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Anal. Biochem.* 287 (2000) 243-251.
- 221- Lumry, R. and Eyring, H. Conformation changes of proteins. *Journal of Physical Chemistry* 58 (1954) 110-120.
- 222- Zamorano, L.S.; Pina, D.G.; Gavilanes, F.; Roig, M.G.; Sakharov, I.Y.; Jadan, A.P.; van Huystee, R.B.; Villar, E.; Shnyrov, V.L. Two-state irreversible thermal denaturation of anionic peanut (*Arachis hypogaea* L.) peroxidase. *Thermochimica Acta* 417 (2004) 67-73.
- 223- Nissum, M.; Schiødt, C.B. and Welinder, K.G. Reactions of soybean peroxidase and hydrogen peroxide pH 2.4-12.0 and veratryl alcohol at pH 2.4. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1545 (1-2) (2001) 339-342.
- 224- Smulevich, G.; Paoli, M.; DeSanctis, G.; Mantini, A.R.; Ascoli, F. and Coletta, M. Spectroscopic evidence for a conformational transition in horseradish peroxidase at very low pH. *Biochemistry* 36(3) (1997) 640-649.
- 225- Zamorano, L.S. Caracterización químico-física de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*), una enzima con elevada estabilidad. Tesis doctoral (2009) Universidad de Salamanca. Facultad de Ciencias Químicas. Dpto. de Química Física. Sakharov, I.Y.; Vesga Blanco, M.K. and Sakharova, I.V. Substrate specificity of African oil palm tree peroxidase. *Biochemistry* 67 (2002) 1043-1047.
- 226- Márquez, O.; Waliszewski, K.N.; Oliart, R.M. and Pardio, V.T. Purification and characterization of cell Wall-bound peroxidase from vanilla bean. *LTW-Food Science and Technology* 41 (8) (2008) 1372-1379.
- 227- Ajila, C.M. and Prasada Rao, U.J.S. Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 60 (1-2) (2009) 36-44.

- 228- Sakharov, I.Y.; Vesga, M.K.; Galaev, I.Y.; Sakharova, O.Y.; Pletjushkina, O.Y. Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties. *Plant Science* 161 (2001) 853-860.
- 229- Zamorano, L.S.; Hidalgo Cuadrado, N.; Pérez Galende, P.; Roig, M.G.; Shnyrov, V.L. Steady-state kinetics of *Roystonea regia* palm tree peroxidase. *Journal of Biophysical Chemistry* 3(1) (2012) 16-28.
- 230- Hosoya, T. Turnip peroxidase I. Purification and physicochemical properties of multiple components in turnip peroxidase. *The Journal of Biochemistry* 47(3) (1960) 369-381.
- 231- Yonetani, T.; Scheler, H. and Ehrenberg, A. Studies on Cytochrome c peroxidase VII. Electron paramagnetic resonance absorptions of the enzyme and complex ES in dissolved and crystalline forms. *The journal of biological chemistry by the American Society of Biological Chemists* 241 (1966) 3240-3243.
- 232- Morales, M.; Ros Barceló, A. A basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell walls of *vitis vinifera*. *Phytochemistry* 45 (1997) 229-232.
- 233- Everett, R.R.; Soedjak, H.S. and Butler, A. Mechanism of dioxygen formation catalysed by vanadium bromoperoxidase. Steady state kinetic analysis and comparison to the mechanism of bromination. *J. Biol. Chem.* 265 (26) (1990) 15671-15679.
- 234- Hidalgo-Cuadrado, N.; Zhadan, G.G.; Roig, M.G.; Shnyrov, V.L. Suicide inactivation of peroxidase from *Chamaerops excelsa* palm tree leaves. *International Journal of Biological Macromolecules* 49 (2011) 1078-1082.
- 235- Zamorano, L. S.; Barrera Vilarmau, S.; Arellano, J.B.; Zhadan, G.G.; Hidalgo Cuadrado, N.; Bursakov, S.A.; Roig, M.G. & Shnyrov, V.L. Thermal stability of peroxidase from *Chamaerops excelsa* palm tree at pH 3.0. *Inter. J. Biol. Macromol.* 44 (2009) 326-332.



Anexos

---





# Use of crude extract of lentil plant (*Lens culinaris* Medikus) in peroxidase-based analyses: fast kinetic determination of hydrogen peroxide and sarcosine in urine

Patricia Pérez Galende · Teresa Manzano Muñoz ·  
Manuel G. Roig · Cándido García de María

Received: 8 June 2012 / Revised: 3 August 2012 / Accepted: 7 August 2012 / Published online: 31 August 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** Peroxidase-catalysed reactions are used in a wide variety of analytical applications, most of them based on the final quantification of hydrogen peroxide. Clinical tests for glucose, cholesterol, creatine, creatinine or uric acid in blood or urine and enzyme-linked immunosorbent assays for pesticides, hepatitis or acquired immune deficiency syndrome are good examples of such applications. The most widely used and commercially available peroxidase for biotechnological processes and analytical applications is horseradish peroxidase followed, although in much lower proportion, by soybean peroxidase. The high commercial interest in peroxidases has led to the search for new sources of these enzymes. This work describes the analytical use of lentil plant peroxidase (LPP), which is a new peroxidase extracted from lentil plants (*Lens culinaris* Medikus); an abundant post-harvest agricultural waste in the area of Castilla y León (Spain). A procedure for the quantification of hydrogen peroxide in urine is first proposed using crude extract of lentil plant instead of the purified enzyme. This procedure is then applied to the determination of sarcosine; a natural

amino acid that has attracted considerable interest in clinical diagnostics since urinary sarcosine was proposed and later questioned as a biomarker for prostate cancer. Under the action of sarcosine oxidase, sarcosine is oxidized by molecular oxygen to give glycine, formaldehyde and hydrogen peroxide that is quantified according to the previously proposed procedure. The limit of detection for both hydrogen peroxide and sarcosine is around  $5 \times 10^{-7}$  M. In the determination of sarcosine, the high selectivity of the overall enzymatic reaction, the simple sample treatment and instrumentation, the high-sample throughput and the use of LPP in the plant extract instead of the purified enzyme provide a rapid and inexpensive procedure with characteristics very suitable for routine analysis in a clinical laboratory.

**Keywords** Lentil plant peroxidase · Plant extract · Hydrogen peroxide · Sarcosine · Urine · Prostate cancer

## Introduction

Peroxidases (EC 1.11.1.x) are a large group of oxidoreductases that catalyze the oxidation of different substances with peroxides, mainly hydrogen peroxide. These peroxidase-catalysed reactions are the basis of a wide variety of analytical applications [1–3]. On the one hand, using only one of such reactions, hydrogen peroxide, organic hydroperoxides and substances reacting with these compounds can be determined through the formation of coloured, fluorescent or luminescent products or by amperometric biosensors where immobilized peroxidase makes the reduction of hydrogen peroxide easier with or without electron transfer mediators. On the other hand, many analytical applications can be

---

P. Pérez Galende · T. Manzano Muñoz  
Centro de Investigación y Desarrollo  
Tecnológico del Agua, University of Salamanca,  
37008 Salamanca, Spain

M. G. Roig  
Dpto. Química Física, University of Salamanca,  
37008 Salamanca, Spain

C. García de María (✉)  
Dpto. Química Analítica, Nutrición y Bromatología,  
University of Salamanca,  
Plaza de la Merced s/n,  
37008 Salamanca, Spain  
e-mail: cgardem@usal.es

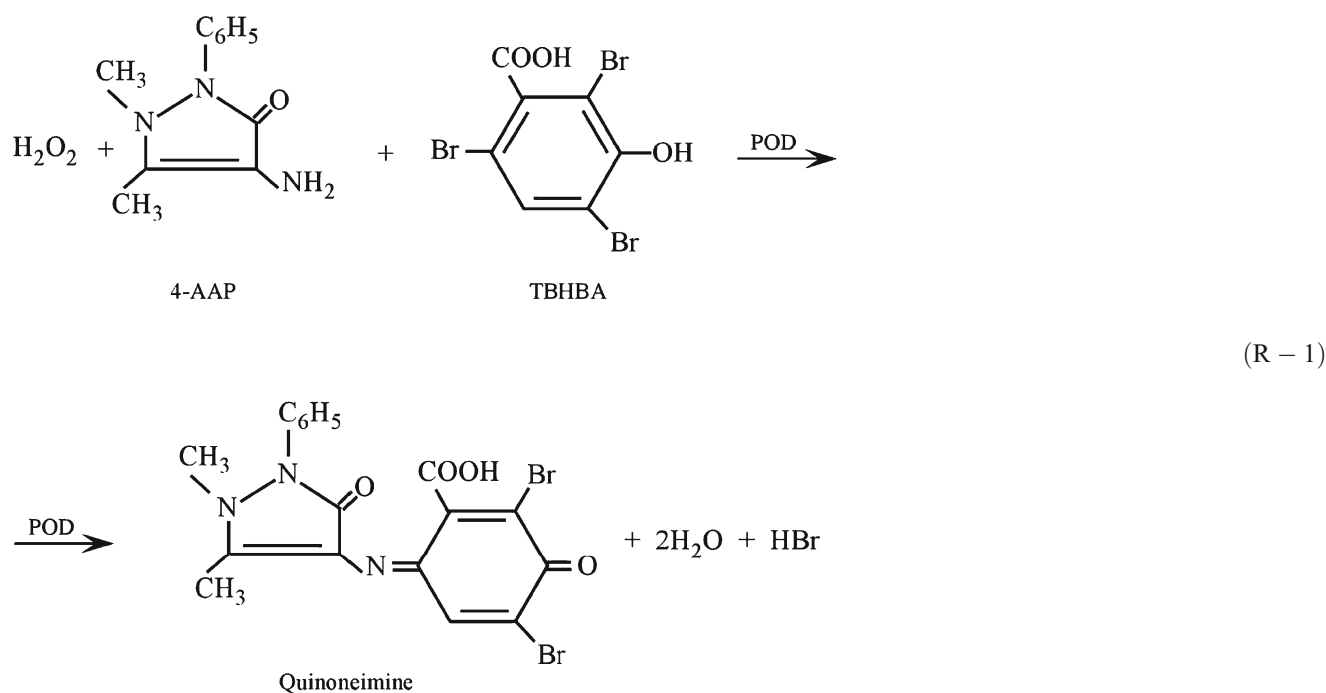
achieved by coupling a peroxidase-catalysed reaction with one or more reactions where hydrogen peroxide is finally produced. Such is the case of coupling with reactions catalysed by some oxidases and their widespread application in biochemical analysis (determination of substrates, enzyme activities, enzyme activators and enzyme inhibitors). In addition, peroxidases are the enzymes most commonly used to label antibodies in enzyme immunoassay (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Tests for pesticides, mycotoxins, cystic fibrosis, hepatitis or AIDS are significant examples of such assays.

The peroxidase most widely used in analytical applications is horseradish peroxidase (HRP), which is extracted from the root of this vegetable (*Armoracia rusticana*). HRP is also the commonest peroxidase in other biotechnological applications such as organic synthesis, remediation of wastewater, decolourization of synthetic dyes or paper pulp production. HRP is by far the most commercially available peroxidase, followed by soybean peroxidase. The high commercial

interest of peroxidases has led to the search for new sources of these enzymes. In this line, our research group is currently conducting a project [4] aimed to check the peroxidase activity of some vegetable wastes that are very abundant in the area of Castilla y León (Spain). One of the most active residues found to date is the plant of lentil (*Lens culinaris* Medikus).

The aim of this work is to demonstrate the applicability of the lentil plant peroxidase (LPP) in biotechnological processes, particularly in analytical applications. To this end, we first propose a procedure for the determination of hydrogen peroxide and then we use this procedure to determine sarcosine in urine, as an example of applications based on hydrogen peroxide-producing reactions. Crude extracts of lentil plant containing LPP were used instead of the purified enzyme. The use of plant extracts in enzymatic analysis can provide speedy and inexpensive procedures, but a possible loss of selectivity must also be considered [5, 6].

For the determination of hydrogen peroxide, the following peroxidase-catalysed reaction is used:



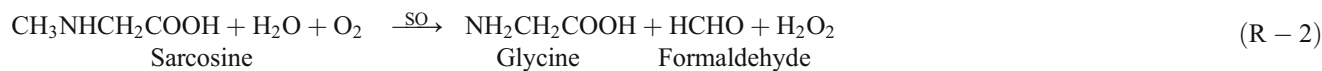
In the presence of a peroxidase and 4-aminoantipyrine (4-AAP) as chromogenic agent, 2,4,6-tribromo-3-hydroxybenzoic acid (TBHBA) is oxidized by hydrogen peroxide to give a red quinoneimine dye. Although the stoichiometry and mechanism of this reaction are not well established (one or two molecules of hydrogen peroxide are involved, depending on the literature consulted) [7–9], the mixture 4-AAP/TBHBA

is a common chromogenic substrate for the detection of hydrogen peroxide with peroxidases [10]. Whatever the stoichiometry, hydrogen peroxide can be quantified through the photometric detection of the quinoneimine at 510 nm.

The determination of sarcosine, a natural amino acid used in the treatment for schizophrenia, has attracted considerable interest in clinical diagnostic since urinary sarcosine was

recently proposed [11], and later rejected [12–14], supported [15] or questioned [16], as a biomarker for prostate cancer. The levels of sarcosine in urine for healthy people and cancer patients are in fact not well known although they seem to move within the  $5 \times 10^{-8}$ – $5 \times 10^{-5}$  M range [12, 15]. Apart from its hypothetical relationship with prostate cancer, sarcosine itself is not a common parameter in clinical trials but its determination is closely linked to that of

creatinine in routine analysis of serum and urine. Serum creatinine is the most commonly used indicator of renal function while urine creatinine is checked during drug tests and it is also used as an indicator of urine water content. For its determination, creatinine is enzymatically converted [17] into sarcosine that is then oxidized in the presence of sarcosine oxidase (SO, EC 1.5.3.1.) to give glycine, formaldehyde and hydrogen peroxide:



The commonest analytical methods for sarcosine (and creatinine) determination are based on the measurement of the hydrogen peroxide formed in this reaction; to this end, coupling with peroxidase-catalysed reactions or biosensors with immobilized sarcosine oxidase [17] are used. In other methods, the formaldehyde formed is measured by photometry or fluorometry [18] after reaction with acetylacetone or similar compounds (Hantzsch reaction). Non-enzymatic methods for sarcosine are scarce. As an amino acid, sarcosine can be determined by liquid chromatography with different types of detection and pre- or post-column derivatization processes. The most recent chromatographic methods include liquid chromatography coupled to mass spectrometry [14, 15] and gas chromatography–mass spectrometry after derivatization and separation by solid-phase microextraction [11, 19]. Two procedures for the spectrophotometric and electrochemical determination of sarcosine after separation by ion-exchange liquid chromatography have recently been described [20]. A supramolecular sensor, based on a functionalized silicon surface, has also recently been proposed for the exclusive recognition of sarcosine in water and urine [21]. The determination of sarcosine proposed here is based on reaction R-2 coupled to reaction R-1 for the detection of hydrogen peroxide.

## Experimental

### Instrumentation and materials

All main experiments were carried out in the 300- $\mu\text{L}$  wells of 96-well microplates. The absorbance of the contents of each well was measured by a Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), equipped with an eight-channel photometer, temperature controller and a 490-nm interference filter. The Windows-based Microplate Manager 5.2.1 (Bio-Rad) software program was used to control the microplate reader and for data acquisition and analysis.

Statistica 6 software (StatSoft, Tulsa, USA) was used for statistical computation. Sample and reagent solutions were added to the wells with a BioPette<sup>®</sup> E 8-channel electronic pipette (Labnet, Edison, NJ, USA). Centrifuges, Sorvall (Fisher Scientific, Madrid) of 20,000 rpm and Selecta (JP Selecta SA, Barcelona) of 8,000 rpm, were used for the production of plant extracts and the treatment of urine samples, respectively. A S20 Seven Easy<sup>®</sup> pH meter with INLAB<sup>®</sup> 422 semi-micro pH electrode and Pt1000 temperature probe (Mettler-Toledo, Madrid) was used for the pH measurements.

### Reagents

The following chemicals were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid): 4-AAP, reagent grade; TBHBA, 97 %; sarcosine (*N*-methylglycine), 98 %, Sigma-ultra grade; SO, EC 1.5.3.1, from *Bacillus* sp., lyophilized powder, 49 U/mg of solid under standard conditions (37 °C, pH 8.3). Guaiacol (2-methoxyphenol), 98 %, PRS grade, and hydrogen peroxide, 30 % w/v, reagent grade, were purchased from Panreac (Barcelona). Polyethylene glycol (PEG), 10,000 Da, synthesis grade, was from Merck (Madrid). All other chemicals were of analytical reagent grade and solutions were prepared with distilled–deionized water. Acetate/borate/phosphate buffer solutions (ABP buffers) were prepared from equimolar amounts of  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; pH was adjusted to the required value. The stock solutions of hydrogen peroxide were periodically titrated with potassium permanganate.

### Enzyme crude extracts

Post-harvest threshed lentil plants (mainly leaves and stems) were collected in sampling bags and stored frozen at  $-80$  °C. Peroxidase was extracted as described before for other plants [22]. The extraction procedure involved the removal of phenolic compounds [23] that

interact with proteins, an interaction that is catalysed by peroxidases [24]. The frozen lentil plants were cut into pieces of 2–3 cm and then ground with a home grinder; 25.0 g of ground plant were immersed in 125 mL of water and left to rest for 24 h at room temperature. The resulting mixture was filtered in a Büchner funnel with vacuum trap and the filtrate was centrifuged at 10,000 rpm for 15 min. With gentle continuous stirring, solid PEG (up to 14 % w/v) and solid ammonium sulphate (up to 10 % w/v) were gradually added and consecutively dissolved in the supernatant. The mixture was transferred to a separating funnel and allowed to stand for 24 h. Two phases were then observed: the upper PEG phase containing absorbed phenolic compounds and the lower aqueous phase with peroxidase. Once separated, the aqueous phase was centrifuged at 10,000 rpm for 15 min giving a clear greenish supernatant that was stored at 4 °C until be used as enzyme reagent.

The peroxidase activity of the extracts was determined spectrophotometrically with guaiacol and hydrogen peroxide as substrates. In a standard spectrophotometer cell, 20  $\mu\text{L}$  of extract were mixed with 2.0 mL of  $2.0 \times 10^{-2}$  M phosphate buffer, pH 6.0, containing  $1.8 \times 10^{-2}$  M guaiacol and  $5.0 \times 10^{-3}$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Absorbance at 470 nm was then monitored for 2 min at 25 °C. From the increase in absorbance, the activity was calculated in units per millilitre of extract, one unit (U) being the amount of enzyme that causes the oxidation of 1  $\mu\text{mol}$  of guaiacol ( $\epsilon_{470} = 5.2 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )/min, under the working conditions.

Freshly prepared extracts showed peroxidase activity close to  $130 \text{ U mL}^{-1}$ . The extracts were very stable since after 15 months of storage at 4 °C, they retained about 86 % of their initial activity.

## Urine samples

Urine samples for standard addition experiments were collected from healthy male volunteers. They were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min and the supernatants were stored refrigerated at 4 °C. Stock solutions of  $\text{H}_2\text{O}_2$ -spiked urine samples were prepared by mixing each supernatant with a small volume of a standard aqueous solution of hydrogen peroxide. Working spiked samples were obtained by suitable dilution of each stock solution with its respective supernatant. Stock and working sarcosine-spiked urine samples were prepared in the same way that the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -spiked samples.

## Experimental procedure

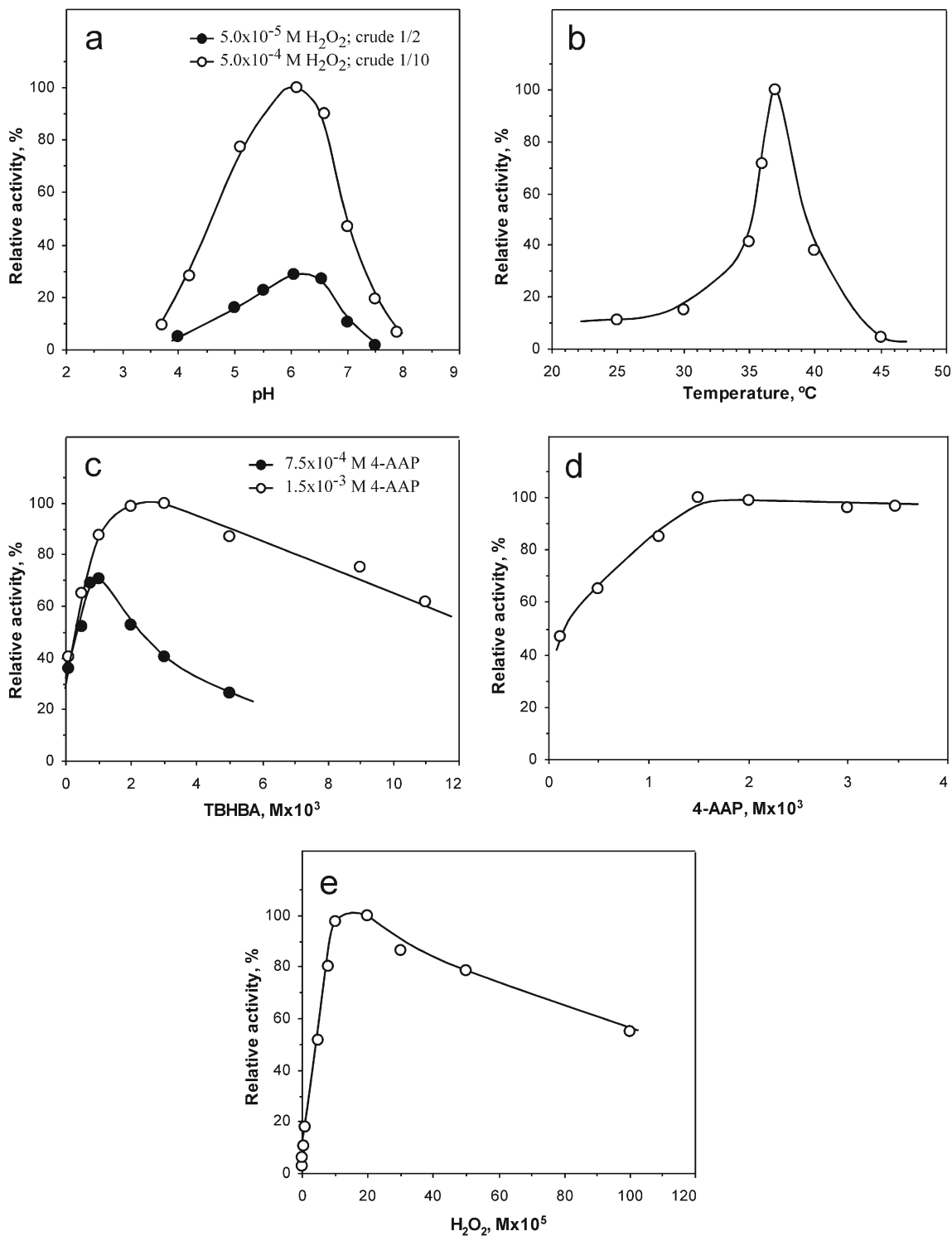
First, the effects of pH, temperature, 4-AAP, TBHBA, LPP and  $\text{H}_2\text{O}_2$  on the rate of reaction R-1 were investigated. From these studies, a procedure for the determination of hydrogen peroxide was proposed and applied to the analysis of spiked urine samples. The experimental protocol is summarized in Table 1. Once the microplate had reached the working temperature, fixed volumes of reagent and sample solutions were added sequentially to the wells (all solutions were previously set at the working temperature in a thermostatic bath). After shaking the microplate for a short time to achieve proper mixing, the absorbance of each well was simultaneously measured for 3 min at intervals of 20 s. Eight replicates of each experiment were simultaneously performed using the eight-well rows of the microplates and an eight-channel micropipette. The absorbance values ( $A$ ) versus time were fitted to a straight line whose slope ( $\Delta A \text{ min}^{-1}$ ) was taken as a measure of the reaction rate and peroxidase activity in each well.

**Table 1** Experimental protocol for hydrogen peroxide and sarcosine

Step	Description	$\text{H}_2\text{O}_2$	Sarcosine
1	Microplate temperature setting		
2	Addition of reagents and standards or samples		
	2-1 ABP buffer ( $\mu\text{L}$ )	200	150
	2-2 TBHBA in ABP buffer ( $\mu\text{L}$ )	25	25
	2-3 4-AAP in ABP buffer ( $\mu\text{L}$ )	10	10
	2-4 $\text{H}_2\text{O}_2$ or sarcosine standard or sample ( $\mu\text{L}$ )	25	25
	2-5 Sarcosine oxidase in ABP buffer ( $\mu\text{L}$ )	–	50
	2-6 LPP reagent solution in ABP buffer ( $\mu\text{L}$ )	10	10
3	Mixing		
	Shaking time: 5 s; shaking strength: middle		
4	Measurement of absorbance (490 nm)		
	3 min at 20 s intervals; reading speed: fast (6 s)		
5	Data treatment		

The effects of pH, sarcosine and SO on the overall reaction resulting from coupling reactions R-1 and R-2 were also considered. From these studies, a procedure for the

determination of sarcosine was proposed and applied to the analysis of spiked urine samples. The protocol was similar to that of previous experiments (Table 1).



**Fig. 1** Effects of pH (a), temperature (b), TBHBA (c), 4-AAP (d) and hydrogen peroxide (e) on the activity of reaction R-1. Working conditions: a TBHBA: 2.0 × 10<sup>-3</sup> M; 4-AAP: 1.5 × 10<sup>-3</sup> M; temperature: 37 °C b pH: 6.0; TBHBA: 2.0 × 10<sup>-3</sup> M; 4-AAP: 1.5 × 10<sup>-3</sup> M; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 5.0 × 10<sup>-5</sup> M; LPP: crude 1/2 (c) pH: 6.0; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 5.0 × 10<sup>-5</sup> M; LPP:

crude 1/2; temperature: 37 °C (d) pH: 6.0; TBHBA: 2.0 × 10<sup>-3</sup> M; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 5.0 × 10<sup>-5</sup> M; LPP: crude 1/2; temperature: 37 °C (e) pH: 6.0; TBHBA: 2.0 × 10<sup>-3</sup> M; 4-AAP: 1.5 × 10<sup>-3</sup> M; LPP: crude 1/2; temperature: 37 °C Other experimental conditions were as indicated in Table 1

**Results**

Effect of variables affecting reaction R-1

To study the effect of pH, all reagents were prepared in  $3.0 \times 10^{-2}$  M ABP buffer, pH ranging from 3 to 8. The concentrations of TBHBA, 4-AAP and  $H_2O_2$  after mixing were  $2.0 \times 10^{-3}$  M,  $1.5 \times 10^{-3}$  M and  $5.0 \times 10^{-5}$  or  $5.0 \times 10^{-4}$  M, respectively. Working enzyme solutions prepared by 1/2 or 1/10 dilution of the LPP crude extract with ABP buffer were used. In all cases, the highest peroxidase activity was observed (Fig. 1a) at pH close to 6, and hence this value was chosen for all subsequent experiments.

The effect of temperature was studied between 25 and 45 °C. Experimental conditions for TBHBA, 4-AAP,  $H_2O_2$  and LPP were as indicated for pH. In all cases, the reaction rate increased with temperature up to about 37 °C and decreased sharply above this temperature (Fig. 1b). As in the case of many other enzymes, the observed effect can be explained in terms of enzyme heat denaturation. All subsequent experiments were performed at 37 °C.

To study the effect of TBHBA, the content of this compound in the working solutions was adjusted so that the resulting concentration in the wells was varied between  $1.0 \times 10^{-4}$  and  $1.1 \times 10^{-2}$  M. Other experimental conditions were:  $1.5 \times 10^{-3}$  or  $7.5 \times 10^{-4}$  M 4-AAP,  $5.0 \times 10^{-5}$  or  $5.0 \times 10^{-4}$  M  $H_2O_2$  and LPP crude extract diluted 1/2 or 1/10. As shown in Fig. 1c, upon increasing the concentration of TBHBA, the rate of reaction R-1 initially increased but thereafter gradually decreased, its maximum value being reached at concentrations close to the concentration of 4-AAP used in each experiment. The observed behaviour can be explained by the occurrence of competitive side reactions leading to dimerization of TBHBA [8].

The effect of 4-AAP was observed with concentrations in the wells ranging from  $1.0 \times 10^{-4}$  to  $3.5 \times 10^{-2}$  M. Other experimental conditions were:  $2.0 \times 10^{-3}$  or  $5.0 \times 10^{-4}$  M TBHBA,  $5.0 \times 10^{-5}$  or  $5.0 \times 10^{-4}$  M  $H_2O_2$  and LPP crude extract diluted 1/2 or 1/10. For a given concentration of TBHBA, the reaction rate

**Table 2** Relative activity of reaction R-1 using pure or diluted LPP crude extract

LPP reagent solution	Relative activity, %
Crude extract	100.0
Crude extract diluted 1/2	60.3
Crude extract diluted 1/5	15.5
Crude extract diluted 1/10	14.5

**Table 3** Experimental conditions for the determination of  $H_2O_2$  and sarcosine

Variable	Experimental range	Proposed value	
		$H_2O_2$	Sarcosine
pH	3–8	6.0	7.1
Temperature (°C)	25–45	37	
TBHBA (M)	$1.0 \times 10^{-4}$ – $1.1 \times 10^{-2}$	$2.0 \times 10^{-3}$	
4-AAP (M)	$1.0 \times 10^{-4}$ – $3.5 \times 10^{-2}$	$1.5 \times 10^{-3}$	
LPP (Crude extract)	Pure–dilution 1/10	Dilution 1/2	
$H_2O_2$ (M)	$1.0 \times 10^{-8}$ – $1.1 \times 10^{-3}$		
SO (U mL <sup>-1</sup> )	0.45–4.5		0.45
Sarcosine (M)	$1.0 \times 10^{-8}$ – $1.0 \times 10^{-3}$		

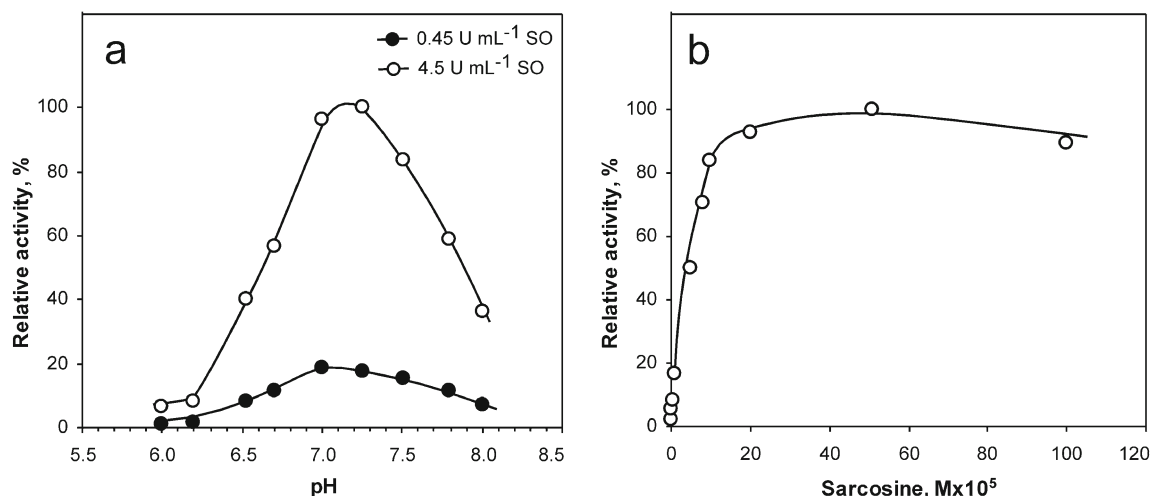
increased on increasing the concentration of 4-AAP, a stable maximum value being attained at concentrations similar to or higher than the concentration of TBHBA used in each experiment. Figure 1d shows the effect for  $2.0 \times 10^{-3}$  M TBHBA.

The effect of changing the concentration of peroxidase was studied in experiments where the LPP crude extract was used pure or diluted in different proportions. The results are compared in Table 2. The peroxidase activity increased upon increasing the proportion of extract, although differences between dilutions above 1/5 were very small. Moreover, when using the pure

**Table 4** Concentrations of  $H_2O_2$  added and found in urine samples

Sample	$H_2O_2$ in sample, M	
	Added	Found <sup>a</sup>
HP-1	0	$<5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.04 \pm 0.08) \times 10^{-5}$
	$5.10 \times 10^{-4}$	$(5.1 \pm 0.1) \times 10^{-4}$
HP-2	0	$<5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.05 \pm 0.08) \times 10^{-5}$
	$5.10 \times 10^{-4}$	$(5.2 \pm 0.1) \times 10^{-4}$
HP-3	0	$<5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(0.94 \pm 0.08) \times 10^{-5}$
	$5.10 \times 10^{-4}$	$(5.0 \pm 0.1) \times 10^{-4}$
HP-4	0	$<5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.07 \pm 0.08) \times 10^{-5}$
	$5.10 \times 10^{-4}$	$(5.1 \pm 0.1) \times 10^{-4}$
HP-5	0	$<5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.05 \pm 0.08) \times 10^{-5}$
	$5.10 \times 10^{-4}$	$(5.0 \pm 0.1) \times 10^{-4}$
HP-6	0	$<5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.08 \pm 0.08) \times 10^{-5}$
	$5.10 \times 10^{-4}$	$(5.2 \pm 0.1) \times 10^{-4}$

<sup>a</sup> Mean of eight determinations with 95 % confidence limits



**Fig. 2** Effects of pH (a) and sarcosine (b) on the activity of the overall reaction. Working conditions: **a** TBHBA:  $2.0 \times 10^{-3}$  M; 4-AAP:  $1.5 \times 10^{-3}$  M; LPP: crude 1/2; sarcosine:  $4.0 \times 10^{-5}$  M; temperature: 37 °C **b**

pH: 7.1; TBHBA:  $2.0 \times 10^{-3}$  M; 4-AAP:  $1.5 \times 10^{-3}$  M; LPP: crude 1/2; SO:  $0.45 \text{ U mL}^{-1}$ ; temperature: 37 °C. Other experimental conditions were as indicated in Table 1

extract, changes in absorbance were very fast and intense ( $\Delta A > 1$ ), this leading to a loss of reproducibility. A working enzyme solution prepared by 1/2 dilution of the LPP crude extract provided a good balance between precision and sensitivity.

To study the effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , its content in the wells was varied between  $1.0 \times 10^{-8}$  and  $1.1 \times 10^{-3}$  M, with the rest of experimental conditions fixed at the proposed values shown in Table 3. As shown in Fig. 1e, the peroxidase activity increased upon increasing the content of  $\text{H}_2\text{O}_2$  up to concentrations about  $1 \times 10^{-4}$  M. For higher concentrations, the activity decreased gradually, what can be explained in terms of substrate inhibition, an effect that has often been observed in peroxidases [8, 25].

#### Determination of hydrogen peroxide

Under the working conditions proposed in Tables 1 and 3, and following the experimental procedure described above,  $\text{H}_2\text{O}_2$  was detected in the wells at concentrations  $\geq 5 \times 10^{-8}$  M (this was the minimum concentration that gave a slope value higher than  $S_B + 3\sigma_B$ ,  $S_B$  and  $\sigma_B$  being the mean value and the standard deviation of the blank slope, respectively). The relationship between concentration and slope was linear in the  $1.0 \times 10^{-7}$  to  $1.0 \times 10^{-4}$  M range ( $\Delta A \text{ min}^{-1} = (2.20 \pm 0.08) \times 10^3 [\text{H}_2\text{O}_2] + (1.0 \pm 0.5) \times 10^{-2}$ ;  $n=7$ ;  $R^2=0.999$ ). The measured slope for  $4.0 \times 10^{-6}$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$  showed a SRD ( $n=8$ ) of 3.9%. Since the dilution factor was close to 270/25, the limit for detecting  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the sample solutions was  $5.4 \times 10^{-7}$  M, with a linear quantification range of  $1.1 \times 10^{-6}$  to  $1.1 \times 10^{-3}$  M. The maximum achievable

sample throughput was very high since up to 96 samples could be analysed in little more than 3 min.

The procedure was applied to the determination of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in urine. To this end,  $\text{H}_2\text{O}_2$ -spiked urine samples were prepared as described above and were analysed directly. The results (Table 4) show that the concentrations found were in all cases consistent with the standard additions made. The proposed procedure is

**Table 5** Concentrations of sarcosine added and found in urine samples

Sample	Sarcosine in sample, M	
	Added	Found <sup>a</sup>
S-1	0	$< 5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.00 \pm 0.06) \times 10^{-5}$
	$1.00 \times 10^{-4}$	$(1.07 \pm 0.08) \times 10^{-4}$
S-2	0	$< 5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.00 \pm 0.06) \times 10^{-5}$
	$1.00 \times 10^{-4}$	$(1.02 \pm 0.08) \times 10^{-4}$
S-3	0	$< 5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.00 \pm 0.06) \times 10^{-5}$
	$1.00 \times 10^{-4}$	$(0.98 \pm 0.08) \times 10^{-4}$
S-4	0	$< 5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.00 \pm 0.06) \times 10^{-5}$
	$1.00 \times 10^{-4}$	$(0.95 \pm 0.08) \times 10^{-4}$
S-5	0	$< 5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.01 \pm 0.06) \times 10^{-5}$
	$1.00 \times 10^{-4}$	$(1.03 \pm 0.08) \times 10^{-4}$
S-6	0	$< 5.4 \times 10^{-7}$
	$1.00 \times 10^{-5}$	$(1.05 \pm 0.06) \times 10^{-5}$
	$1.00 \times 10^{-4}$	$(0.99 \pm 0.08) \times 10^{-4}$

<sup>a</sup> Mean of 8 determinations with 95 % confidence limits

therefore suitable for the determination of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in urine. A feature to highlight is that no reaction was observed in the non-spiked urine samples. The absence of an observable interaction between the matrixes of samples and extract enabled direct use of the lentil extract, without the need to separate and purify the enzyme.

#### Effect of pH, SO and sarcosine on the overall reaction

The optimum pH for the overall reaction was expected to be intermediate between those of maximum activity of LPP and SO. The study of pH was therefore restricted to the 6.0 to 8.3 range. For this study, fixed concentrations of sarcosine ( $4.0 \times 10^{-5}$  M) and SO (0.45 or 4.5  $\text{U mL}^{-1}$ ) were added to the wells; other experimental conditions were set to the values proposed for the determination of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Table 3). For each of the concentrations of SO tested, the overall reaction showed maximum activity at pH close to 7.1 (Fig. 2a), and hence this value was chosen for all subsequent experiments. As expected, more SO provided higher activity; a concentration of 0.45  $\text{U mL}^{-1}$  was chosen as a compromise between sensitivity and SO consumption (SO was, by far, the most expensive reagent used). Higher contents of SO could be used when the sensitivity is priority.

Keeping the rest of experimental conditions as indicated above, the concentration of sarcosine was varied between  $1.0 \times 10^{-8}$  and  $1.1 \times 10^{-3}$  M. As shown in Fig. 2b, the overall activity increased with the content of sarcosine and reached a maximum constant value for concentrations higher than  $1.5 \times 10^{-4}$  M.

#### Determination of sarcosine

Under the working conditions proposed in Tables 1 and 3, and following the experimental procedure described above, sarcosine was detected in the wells at concentrations  $\geq 5 \times 10^{-8}$  M. The relationship between concentration and slope was not linear but, within the range of  $1.0 \times 10^{-7}$  to  $1.5 \times 10^{-4}$  M it fitted a second-order polynomial ( $\Delta A \text{ min}^{-1} = (-6.1 \pm 4.6) \times 10^6 [\text{Sar}]^2 + (2.3 \pm 0.4) \times 10^3 [\text{Sar}] + (8.5 \pm 5.9) \times 10^{-3}$ ;  $n=8$ ;  $R^2=0.999$ ). The slope measured for  $5.0 \times 10^{-6}$  M sarcosine showed a SRD ( $n=8$ ) of 4.2 %. With a dilution factor of 270/25, the limit for detecting sarcosine in the sample solutions was  $5.4 \times 10^{-7}$  M, and the quantification range was from  $1.1 \times 10^{-6}$  to  $1.6 \times 10^{-3}$  M.

The procedure was applied to the determination of sarcosine in urine. Sarcosine-spiked urine samples were prepared as described above and were analysed directly. The results (Table 5) show that the concentrations found were in all cases consistent with the standard additions made. This indicates that the proposed procedure is suitable for the determination of sarcosine in urine.

## Conclusions

The results in the present work demonstrate the usefulness of LPP in analytical applications based on the detection of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in general, and in the determination of sarcosine in urine in particular. The high selectivity of the overall reaction, the simple sample treatment and instrumentation, the high-sample throughput, and the use of LPP plant extract instead of the purified enzyme provide a rapid and inexpensive procedure with characteristics very suitable for routine analysis in a clinical laboratory. This procedure can be used as a complement or an advantageous alternative to the chromatographic methods for the determination of sarcosine and could help to confirm or to reject the role of sarcosine as a biomarker for prostate cancer, since it seems that in this matter the last word has not been said yet.

**Acknowledgements** This work was supported by Consejería de Educación (Ref.: SA129A07) and Instituto Tecnológico Agrario (Ref.: ITACYL/SA-06-00-0) de la Junta de Castilla y León (Spain).

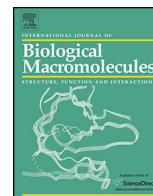
## References

1. Ngo TT (2010) Peroxidase in chemical and biochemical analysis. *Anal Lett* 43:1572–1587
2. Hamid M, Khalil-ur-Rehman (2009) Potential applications of peroxidases. *Food Chem* 115:1177–1186
3. Regalado C, García-Almendárez BE, Duarte-Vázquez MA (2004) Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem Rev* 3:243–256
4. Screening, extraction and purification of peroxidases from green agricultural wastes: characterization and evaluation of some of their biotechnological applications. Project supported by Junta de Castilla y León (Spain) (Refs.: (SA129A07)/ITACYL SA-06-00-0)
5. Fatibello-Filho O, Vieira IC (2002) Uso analítico de tecidos e de extractos brutos vegetais como fonte enzimática. *Quim Nova* 25:455–464
6. Fatibello-Filho O, Lupetti KO, Leite OD, Vieira IC (2007) Electrochemical biosensors based on vegetable tissues and crude extracts for environmental, food and pharmaceutical analysis. *Compr Anal Chem* 49:357–377
7. Moshides JS (1988) Enzymic determination of the free cholesterol fraction of high-density lipoprotein in plasma with use of 2,4,6-tribromo-3-hydroxybenzoic acid. *Clin Chem* 34:1799–1804
8. Nicell JA, Wright H (1997) A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme Microb Tech* 21:302–310
9. Carvalho RH, Lemos F, Lemos MA, Vojinović V, Fonseca LP, Cabral JM (2006) Kinetic modelling of phenol co-oxidation using horseradish peroxidase. *Bioprocess Biosyst Eng* 29:99–108
10. TCI Product Literature (2011) Chromogenic peroxidase substrates, including hydrogen peroxide detection. <http://www.tcieurope.eu/useful-info/product-lit/L3015E.pdf>
11. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM (2009) Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 457:910–915
12. Jentzmik F, Stephan C, Miller K, Schrader M, Erbersdobler A, Kristiansen G, Lein M, Jung K (2010) Sarcosine in urine after digital rectal examination fails as a marker in prostate cancer



- detection and identification of aggressive tumours. *Eur Urol* 58:12–18
13. Schalken JA (2010) Is urinary sarcosine useful to identify patients with significant prostate cancer? The trials and tribulations of biomarkers development. *Eur Urol* 58:19–21
  14. Struys EA, Heijboer AC, Van Moorselaar J, Jackobs C, Blankenstein MA (2010) Serum sarcosine is not a marker for prostate cancer. *Ann Clin Biochem* 47:282–282
  15. Jiang Y, Cheng X, Wang C, Ma Y (2010) Quantitative determination of sarcosine and related compounds in urinary samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 82:9022–0027
  16. Issaq HJ, Veenstra TD (2011) Is sarcosine a biomarker for prostate cancer? *J Sep Sci* 34:3619–3621
  17. Lad U, Khokhar S, Kale GM (2008) Electrochemical creatinine biosensors. *Anal Chem* 80:7910–7917
  18. Li Q, Sritharathikhun P, Motomizu S, Motomizu S (2007) Development of novel reagent for Hantzsch reaction for the determination of formaldehyde by spectrophotometry and fluorometry. *Anal Sci* 23:413–417
  19. Cavaliere B, Macchione B, Monteleone M, Naccarato A, Sindona G, Tagarelli A (2011) Sarcosine as a marker in prostate cancer progression: a rapid and simple method for its quantification in human urine by solid-phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 400:2903–2912
  20. Cernei N, Zitka O, Ryvolova M, Adam V, Masarik M, Hubalek J, Kizek R (2012) Spectrometric and electrochemical analysis of sarcosine as a potential prostate carcinoma marker. *Int J Electrochem Sci* 7:4286–4301
  21. Biavardi E, Tudisco C, Maffei F, Motta A, Massera C, Condorelli GG, Dalcanale E (2012) Exclusive recognition of sarcosine in water and urine by a cavitand-functionalized silicon surface. *P Natl Acad Sci USA*. doi:10.1073/pnas.1112264109
  22. Sakharov IY, Castillo LJ, Areza JC, Galaev IY (2000) Purification and stability of peroxidase of african oil palm *Elaeis guineensis*. *Bioseparation* 9:125–132
  23. García-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutierrez A (2010) Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules* 15:8813–8826
  24. Pierpoint WS (1996) The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds. *Methods Mol Biol* 59:69–80
  25. Arnao MB, Acosta M, del Río JA, Varón R, García-Cánovas F (1990) A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1041:43–47





## Purification and structural stability of white Spanish broom (*Cytisus multiflorus*) peroxidase



Patricia Perez Galende<sup>a</sup>, Nazaret Hidalgo Cuadrado<sup>b</sup>, Juan B. Arellano<sup>c</sup>,  
Francisco Gavilanes<sup>d</sup>, Eduard Ya Kostetsky<sup>e</sup>, Galina G. Zhadan<sup>a</sup>, Enrique Villar<sup>f</sup>,  
Manuel G. Roig<sup>a,g,\*</sup>, John F. Kennedy<sup>h</sup>, Valery L. Shnyrov<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Water Research and Development Centre (CIDTA), Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Estudios Biofuncionales, Departamento de Química-Física II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (IRNASA-CSIC), 37008 Salamanca, Spain

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>e</sup> Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology, Far Eastern Federal University, 690600 Vladivostok, Russia

<sup>f</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

<sup>g</sup> Departamento de Química Física, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

<sup>h</sup> Chembiotech Laboratorios, Kyrewood House, Tenbury Wells, Worcestershire WR15 8SG, UK

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 August 2014

Received in revised form

12 September 2014

Accepted 13 September 2014

Available online 22 September 2014

#### Keywords:

*Cytisus multiflorus*

Peroxidase

Protein stability

Circular dichroism

Intrinsic fluorescence

### ABSTRACT

New plant peroxidase has been isolated to homogeneity from the white Spanish broom *Cytisus multiflorus*. The enzyme purification steps included homogenization,  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  precipitation, extraction of broom colored compounds and consecutive chromatography on Phenyl-Sepharose, HiTrap<sup>TM</sup> SP HP and Superdex-75 and 200. The novel peroxidase was characterized as having a molecular weight of  $50 \pm 3$  kDa. Steady-state tryptophan fluorescence and far-UV circular dichroism (CD) studies, together with enzymatic assays, were carried out to monitor the structural stability of *C. multiflorus* peroxidase (CMP) at pH 7.0. Thus changes in far-UV CD corresponded to changes in the overall secondary structure of enzyme, while changes in intrinsic tryptophan fluorescence emission corresponded to changes in the tertiary structure of the enzyme. It is shown that the process of CMP denaturation can be interpreted with sufficient accuracy in terms of the simple kinetic scheme,  $\text{N} \xrightarrow{k} \text{D}$ , where  $k$  is a first-order kinetic constant that changes with temperature following the Arrhenius equation; N is the native state, and D is the denatured state. On the basis of this model, the parameters of the Arrhenius equation were calculated.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Peroxidases (EC 1.11.1.7; donor: hydrogen peroxide oxidoreductase) are enzymes whose main function is to catalyze the conversion of hydrogen peroxide to water in the oxidation of a large number of substrates. However, such enzymes participate in many other reactions of biological significance, such as cell wall formation, lignification, suberization, auxin catabolism, defense, stress, developmentally related processes, protection of tissues

from pathogenic microorganisms, etc. [1]. Several peroxidases have been isolated, sequenced and characterized. They have essentially been classified in three classes on the basis of their amino acid sequence homology and metal ion-binding capabilities (class I, intracellular prokaryotic peroxidases; class II, extracellular fungal peroxidases; and class III, plant secretory peroxidases, in which CMP is included).

Over time, peroxidases have attracted industrial attention. They now enjoy widespread use as catalysts for phenolic resin synthesis [2,3]; as indicators for food processing and diagnostic reagents [4,5]; as additives for bioremediation, especially for the removal of phenols, aromatic amines, and dyes from polluted water [6,7], as well as for production of conducting polymers [8]. The development of these biotechnological processes necessarily involves the characterization of the stability of peroxidases and their ability to be used under non-physiological conditions. As with many enzymes, poor thermal and environmental stabilities limit the large-scale use

**Abbreviations:** CMP, *Cytisus multiflorus* peroxidase; CD, circular dichroism; PEG, polyethyleneglycol; RMSD, root-mean-square deviation.

\* Corresponding author at: Water Research and Development Centre (CIDTA), Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain. Tel.: +34 923 294 670; fax: +34 923 294744.

E-mail address: [mgr@usal.es](mailto:mgr@usal.es) (M.G. Roig).

of catalysis by peroxidases. This is particularly true in bioremediation and polyelectrolyte synthesis. Accordingly, the identification of highly stable and active peroxidases should be the first step in the development of a catalyst with broad commercial and environmental appeal. Another important factor is the availability and cost of raw materials for purification of the enzyme. To solve this problem, we used as a source of peroxidase the universally available broom – *Cytisus multiflorum*. In the present work, the results of the purification and study of structural stability of *C. multiflorum* peroxidase by using different independent methods such as circular dichroism and intrinsic fluorescence are presented.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Analytical or extra-pure grade polyethylene glycol (PEG), guaiacol (2-methoxyphenol), ammonium sulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sodium phosphate and sodium chloride were purchased from Sigma Chemical Co. and were used without further purification. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was from Panreac Quimica S.L.U. (Barcelona, Spain). Superdex-75, 200 and HiTrap<sup>TM</sup> SP HP columns, and Phenyl-Sepharose CL-4B were from GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden). Toyopearl DEAE-650M was purchased from the Tosoh Corporation (Tokyo, Japan). Cellulose membrane tubing for dialysis (avg. flat width 3.0 in.) was purchased from Sigma Chemical Co.; slide-A-lyzer dialysis cassettes (extra-strength, 3–12 mL capacity, 10,000 MWCO) were from Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL), and centrifuge filter devices (Amicon Ultra Cellulose 10,000 MWCO, 15 mL capacity) were from Millipore Corp. (Billerica, MA). All other reagents were of the highest purity available. The water used for preparing the solutions was double distilled and then subjected to a de-ionization process.

### 2.2. Enzyme production

CMP was purified as described earlier [9–11] but with essential modifications. The white Spanish broom (*Cytisus multiflorus*) was then collected on the Almendra swamp (Salamanca, Spain). Stems (2000 g) were milled and homogenized in 10 L of 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, with 0.25 M NaCl for 8 h at room temperature. The excess material was removed by vacuum filtration and centrifugation (10,000 × g, 277 K for 40 min). Pigments were extracted by phase separation over 8 h at room temperature after the addition to the supernatant of solid PEG 10,000 to 17% (w/v) and sodium ammonium sulfate to 12% (w/v). Two phases were formed over time: an upper polymer phase (dark brown in color), which contained pigments, phenols, polyphenols, oxidized phenols and PEG, and a lower aqueous phase (yellow in color) containing peroxidase. Each phase consisted of 50% of the initial volume. These phases were separated and the phase containing peroxidase activity was centrifuged. The clear supernatant containing peroxidase activity was titrated with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to a conductivity value of 230 mS cm<sup>-1</sup> and was applied on a Phenyl-Sepharose column (1.5 cm × 35 cm) equilibrated with 100 mM phosphate buffer, pH 7.0, with 1.7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> which has the same conductivity as the sample. The enzyme was eluted with 100 mM phosphate buffer, pH 7.0, with 0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at a flow rate 1 mL min<sup>-1</sup>. The fractions showing peroxidase activity were dialyzed against 5 mM sodium acetate-acetic acid buffer, pH 5.0, for 48 h, with constant stirring at 277 K. These fractions were membrane concentrated (Millipore Centricon, 30,000 NMWL) and applied onto a TSK-Gel DEAE-5PW column (1 cm × 30 cm) equilibrated with 5 mM sodium acetate-acetic acid buffer, pH 5.0. Elution was carried down with a 5% NaCl in the same buffer at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. The fractions with peroxidase

activity were collected and dialyzed against 5 mM sodium acetate-acetic acid buffer, pH 5.0, overnight. After dialysis the fractions were membrane concentrated (Millipore Centricon, 30,000 NMWL) and applied on a HiTrap SP<sup>TM</sup> HP 5 mL column (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) equilibrated with 5 mM sodium acetate-acetic acid buffer, pH 5.0. Elution was carried out by 25% solution of 5 mM sodium acetate-acetic acid buffer with 1 M NaCl, pH 5.0, at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. 0.5 mL fractions were collected and those contained peroxidase were again dialyzed against 5 mM sodium acetate-acetic acid buffer, pH 5.0, overnight; membrane concentrated (Millipore Centricon, 30,000 NMWL) and applied onto Superdex-200 equilibrated with 5 mM sodium acetate-acetic acid buffer, pH 5.0. Elution was carried out by the same buffer at a flow rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup>. Fractions containing peroxidase were collected after the last step of purification, concentrated and stored at –20 °C.

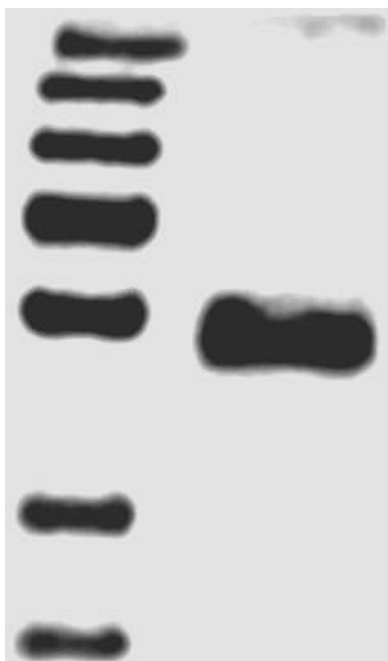
The purity and molecular mass of the CMP was determined by gel filtration, using a Superdex-200 10/30 HR column (Pharmacia) connected to an ÄKTA-purifier system (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) and also by SDS-PAGE, as described by Fairbanks et al. [12], on a Bio-Rad minigel device, using a flat block with 15% polyacrylamide concentration. Electrophoretic conditions and Coomassie brilliant blue R-250 staining were as recommended by the suppliers. Protein concentration was determined by the Bradford assay [13]. The RZ (ratio of A<sub>403</sub>/A<sub>280</sub>) for the CMP samples used in this work was 2.9.

Peroxidase activity toward guaiacol was measured spectrophotometrically at 25 °C. An aliquot of enzyme solution was added to a 1-cm optical path spectral cuvette containing 18.1 mM guaiacol and 4.9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, in a final volume of 2 mL. The rate of change in absorbance due to substrate oxidation was monitored at 470 nm. Peroxidase activities were calculated using a molar absorption coefficient of 5200 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 470 nm for the guaiacol oxidation product [14].

### 2.3. Circular dichroism

The far-UV CD spectra (190–250 nm) of CMP were recorded on a Jasco-715 spectropolarimeter (JASCO Inc., Easton, MD), using a spectral band-pass of 2 nm and a cell path length of 1 mm. Protein concentrations of 0.05 mg/ml were used in these measurements. Four spectra were scanned for each sample at a scan rate of 50 nm min<sup>-1</sup> and were then averaged. All spectra were background-corrected, smoothed, and converted to mean residue ellipticity [Θ] = 10 M<sub>res</sub> Θ<sub>obs</sub> l<sup>-1</sup> p<sup>-1</sup>, where M<sub>res</sub> = 116 is the mean residue molar mass typical for peroxidase of class III; Θ<sub>obs</sub> is the ellipticity (degrees) measured at wavelength, λ; l is the optical path-length of the cell (dm), and p is the protein concentration (mg/ml). Quantitative estimations of the secondary structure contents were made using the CDPro software package comprising three programs: SELCON3, CDSSTR, and CONTIN [15,16]. The experimental data in 190–250 nm range were treated by all the three programs, using different reference protein sets. The root-mean-squared deviation (RMSD) between experimental data and theoretical ones, produced by the programs with SDP42 reference set, was more than two-times less than with other and only the results obtained with the SDP42 reference proteins were accepted. On the other hand, the RMSD between experimental and theoretical points when using SELCON3 (0.5 for intact and 0.4 for denatured CMP) and CONTIN (0.2 for intact and 0.15 for denatured CMP) programs was markedly high in comparison with the CDSSTR program (0.1 for intact and 0.07 for denatured CMP). Therefore the final secondary structures content reported represent the values produced by CDSSTR program upon the use of the SDP42 reference set.

Temperature scans were performed with a constant heating rate of 0.5 K min<sup>-1</sup> using a Neslab RT-11 programmable water bath



**Fig. 1.** SDS-PAGE of CMP (right column) at 0.05 mg/ml. Left column contains molecular-weight markers from a dual color calibration kit from Fermentas UK Ltd, Cambridge, UK—from top to bottom: 250 kDa, 130 kDa, 95, 72, 55, 36 and 28 kDa.

(Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA), and were followed by continuous measurements of ellipticity at 222 nm.

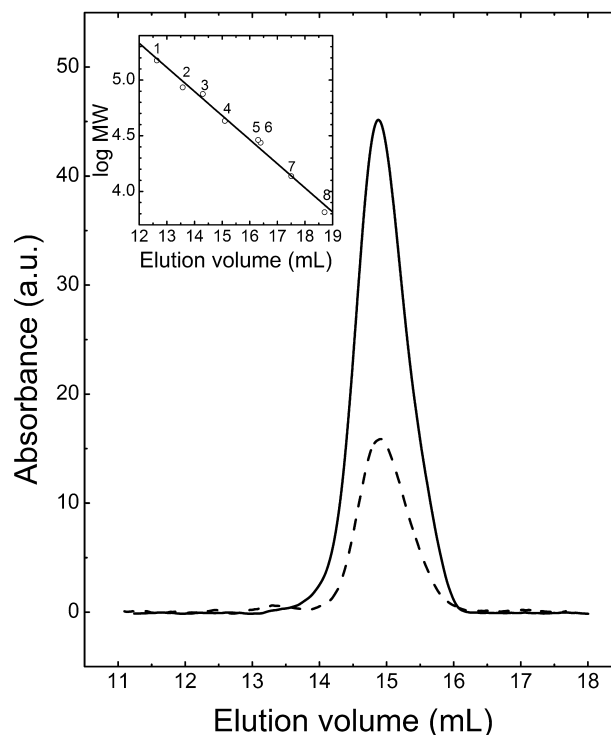
#### 2.4. Intrinsic fluorescence

Steady-state fluorescence measurements were performed on a Perkin Elmer LS50B spectrofluorimeter. Excitation was performed at 295 nm (with excitation and emission slit widths of 3 nm). The fluorescence measurements of CMP were carried out on protein solutions with an optical density of less than 0.2 at 280 nm to avoid the inner filter effect. All emission spectra were corrected for instrumental spectral sensitivity. The position of the middle of a chord, drawn at the 80% level of maximum intensity, was taken as the position of the emission maximum ( $\lambda_{\max}$ ). Fluorescence spectra were analyzed on the basis of the model of discrete states of tryptophan (see, for details, [17]). Measurements of pH-dependent changes in protein fluorescence were performed by downward or upward titration of the protein solution from an initial pH of 7.0, adjusting by means of a polyethylene rod moistened with either 0.1 M HCl or 0.1 M NaOH. The temperature dependence of the fluorescence spectral characteristics was investigated using thermostatically controlled water circulating in a hollow brass cell-holder. Temperature in the sample cell was monitored with a thermocouple immersed in the cell under observation. The heating rate was 1 K min<sup>-1</sup> and spectra were collected at the desired temperatures over the entire temperature range.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Enzyme purification

CMP was purified to homogeneity from white broom *C. multiflorus* stems. The purification steps and their efficiencies are summarized in Table 1. Purified peroxidase migrated in SDS-PAGE as a single band corresponding to a molecular weight of  $49 \pm 2$  kDa (Fig. 1).



**Fig. 2.** High-performance gel filtration of CMP on Superdex 200 HR 10/30 at a flow rate of 0.4 mL min<sup>-1</sup>. The solid line is the absorbance at 403 nm and the dashed line is that at 280 nm. The inset shows calibration line for the standard proteins from LMW Calibration Kit (GE Healthcare) on Superdex 200 10/30 HR column: (1) dimer of conalbumin (150 kDa), (2) dimer of ovalbumin (86 kDa), (3) conalbumin (75 kDa), (4) ovalbumin (43 kDa), (5) carbonic anhydrase (29 kDa), (6) dimer of ribonuclease A (27.4 kDa), (7) ribonuclease A (13.7 kDa) and (8) aprotinin (6.5 kDa).

The retention time of the elution of the protein from the size-exclusion column indicates that enzyme is monomeric in solution with an approximate molecular weight of  $51 \pm 3$  kDa (Fig. 2).

#### 3.2. pH dependence

It is known that both the structural stability and the enzymatic activity of peroxidases strongly depend on the pH of the solution [18–20]. However, although plant peroxidases have been studied for many years, information about their pH-dependent behavior is still very limited. To choose the most suitable pH conditions for stability studies, here we measured the pH dependence of the enzymatic activity and tryptophan fluorescence of CMP (Fig. 3).

As can be seen, CMP is a stable within pH-range from 3 to 11.5. Thus, one of the most useful parameters of the protein fluorescence spectrum – its maximum position ( $\lambda_{\max}$ ), which reflects the degree of accessibility of the chromophores to solvent molecules [31] – remains constant (variation within limits of  $\pm 0.3$  nm) for a pH-range from about 2.2 to 11.0. This implies that the accessibility of the CMP tryptophan side chains to water molecules remains essentially invariant in this pH range. At the same time, the fluorescence intensity did not change within a pH range from about 4 to 11, indicating the absence of changes in the fluorescence quenching properties of the tryptophan environment in this pH-range. Thus, the pH range from 4.0 up to 11.0, characterized by the absence of evident pH-dependent fluorescence changes, seems to be the correct pH range of choice for the physico-chemical characterization of CMP. Acidification of the protein solution to a pH of less than 2.2 caused ca. 8 nm red shift in the fluorescence spectrum, followed by a blue shift after pH 1.8, brought about by protein aggregation and a marked increase in fluorescence intensity ratio at the wavelengths 350 and 320 nm. These changes seem to reflect an acidic

**Table 1**  
Purification steps of CMP.

Procedure	Volume (mL)	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U mg <sup>-1</sup> )	Purification factor	Yield (%)
Homogenate	16,000	12,056	185,384	15.38	1	100
PEG + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9000	947	116,106	122.6	7.9	62.6
Phenyl-Sepharose	100	105	108,021	1028.7	66.9	58.26
HiTrap SP HP	50.9	19	80,210	4221.6	274.5	43.27
Superdex 75	10	3.9	70,050	17,961.5	1167.8	37.8

denaturation of CMP. Increasing the pH to more than 11.0 resulted in a considerable (ca. 13 nm) red shift of the fluorescence spectrum, reflecting an increase in the polarity of the tryptophan side chain environment followed by a blue shift after pH 13.0, probably related to an aggregation that would preserve the complete hydration of tryptophan, and an insignificant increase in  $R = I_{350}/I_{320}$  (only after pH 11.0).

### 3.3. CD experiments

CD is one of the most sensitive physical techniques for determining structures and monitoring the structural changes occurring in biomacromolecules [21], affording a direct interpretation of the changes in protein secondary structure. Fig. 4 shows the far-UV CD spectra of intact (open circles) and thermally denatured (closed circles) CMP at pH 7.0. The results of the estimation of the secondary structure contents using the CDPro software package [15,16] are shown in Table 1. It is clear that CMP is quite different from other haem peroxidases from plants for which, despite the low level of sequence homology (often less than 20%) the overall folding and the organization of the secondary structure is conserved [22]. The structure of haem peroxidases from plants is formed by 10–11

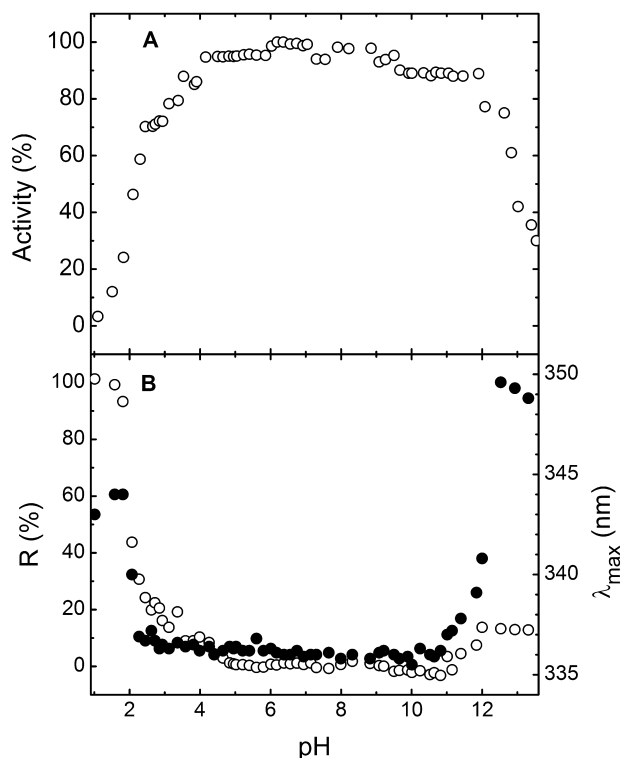
$\alpha$ -helices (ca. 40%) linked by loops and turns, while  $\beta$ -strands are essentially absent or are only a minor component [23]. By contrast, intact CMP contains a considerable amount of  $\beta$ -strands (ca. 30%).

Upon heating CMP to the denaturation temperature, the shape of the spectrum changed, pointing to an increase in the unordered structure and in the quantity of  $\beta$ -strands at the expense of the  $\alpha$ -helical structure (see Table 2). The increase in the quantity of  $\beta$ -strands indicates that denatured form of the enzyme undergoes some aggregation, most probably of intramolecular character, because we detected an increase in turbidity during the denaturation process.

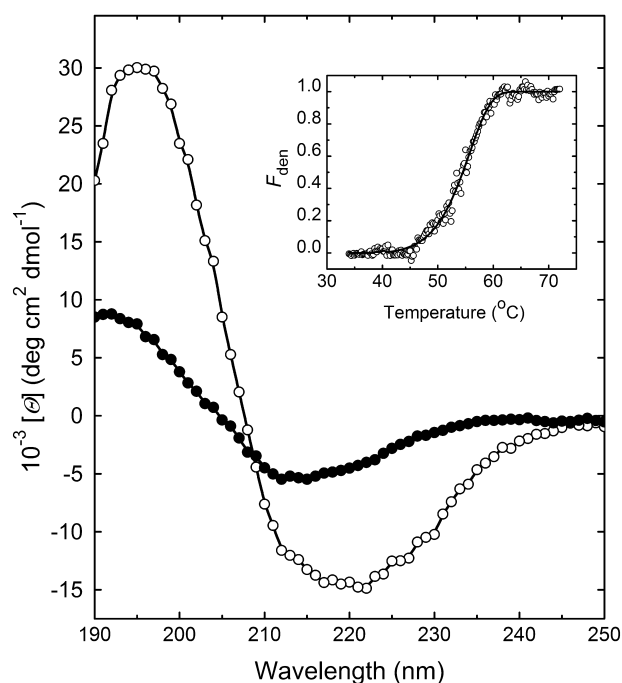
The thermal denaturation of CMP was monitored by following the changes in molar ellipticity at 222 nm since at this wavelength the changes in ellipticity are significant upon enzyme denaturation. With increasing temperature (Fig. 4, insert), an irreversible cooperative transition from native to denatured state occurred. Analysis of this transition was accomplished on the basis of a simple two-state kinetic model:



which is a limiting case of the Lamry-Eyring model [24]. This model considers only two significantly populated macroscopic states, the



**Fig. 3.** pH-dependence of enzymatic activity (A) and fluorescence parameters of CMP (B) at 20 °C. Measurements were performed in 10 mM universal buffer (CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-NaOH) with a protein concentration of ca. 5  $\mu$ M. The excitation wavelength was 295 nm. Open circles in (B) represent relative change in the fluorescence intensity ratio at the wavelengths 350 and 320 nm ( $R = I_{350}/I_{320}$ ), and closed circles correspond to the position of the maximum of the fluorescence spectrum  $\lambda_{\max}$ .



**Fig. 4.** Far-UV CD spectra of intact (open circles) at 20 °C and thermally denatured (closed circles) at 75 °C CMP in 10 mM HEPES, pH 7.0. Inset: fractional degree of denaturation of CMP as function of temperature monitored by the changes of ellipticity at 222 nm upon heating with a constant scan rate 0.5 K min<sup>-1</sup>. Solid line is the result of fitting the experimental data to the two-state irreversible denaturation model using Eq. (1). Fraction of denatured CMP,  $F_d$  was calculated from the spectral parameters used to follow denaturation ( $y$ ) prior to the minimization procedure, according to the expression:  $F_d = (y - y_n)/(y_d - y_n)$ , where  $y_n = a_1 + a_2x$  and  $y_d = b_1 + b_2x$  represents the mean values of the  $y$  characteristic, obtained by linear regressions of the pre- and post-transitional baselines;  $x$  is the variable parameter (temperature in this case).

**Table 2**  
Secondary structure elements (%) determined from analysis of the CD spectra for intact and denatured CMP at pH 7.

Protein	$\alpha$ -Helix			$\beta$ -Strand			$\beta$ -Turn	Unordered
	Regular	Distorted	Total	Regular	Distorted	Total		
Intact	22	13	35	15	14	29	16	20
Denatured	2	3	5	29	15	44	22	29

initial or native state (N) and the final or denatured state (D), transition between them is determined by a first order rate constant ( $k$ ) strongly temperature dependent, as given by the Arrhenius equation:

$$k = \exp \left\{ \frac{E_A}{R} \left( \frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) \right\} \quad (2)$$

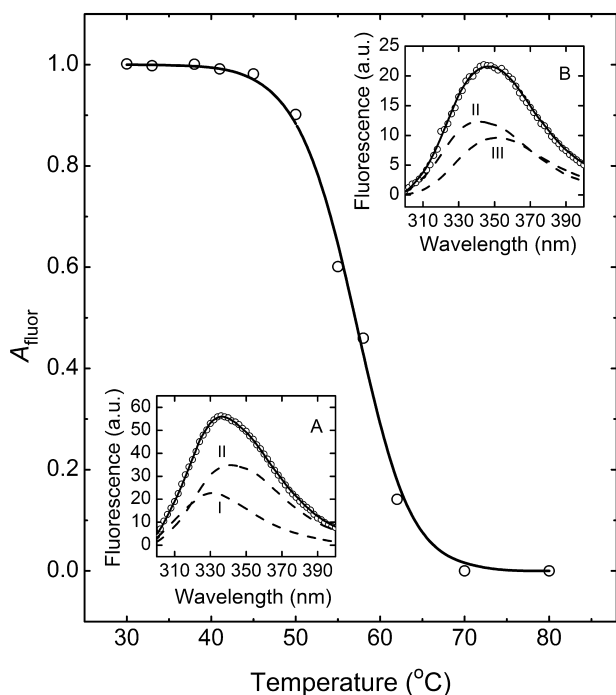
where  $E_A$  is the energy of activation,  $R$  is the gas constant, and  $T^*$  is the temperature at which the rate constant equals  $1 \text{ min}^{-1}$ . In this case, the denatured fraction ( $F_d$ ) was analyzed by using a non-linear least squares fitting to equation:

$$F_d = 1 - \exp \left\{ -\frac{1}{\nu} \int_{T_0}^T \exp \left[ \frac{E_A}{R} \left( \frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) \right] dT \right\} \quad (3)$$

where  $\nu = dT/dt$  is a scan rate value [25]. This fitting (solid line in Fig. 4, insert) afforded the  $T^*$  parameter and the activation energy for CMP. These results were  $337.0 \pm 0.8 \text{ K}$  and  $58.7 \pm 1.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ , respectively.

### 3.4. Fluorescence experiments

Environmental changes in aromatic side chains resulting from conformational changes in the tertiary structure of proteins were measured by intrinsic fluorescence spectroscopy. Fig. 5 depicts



**Fig. 5.** Thermal denaturation profile of CMP (symbols) in 10 mM HEPES, pH 7.0, monitored by measuring the normalized area under fluorescence spectrum upon heating with a constant scan rate ca.  $1 \text{ K min}^{-1}$ . Solid line is the result of fitting the experimental data to two-state irreversible denaturation model using Eq. (3). The insets show the fitting of the experimental tryptophan fluorescence spectra of intact (A) and thermally-denatured (B) CMP (symbols) by theoretical spectra (solid lines), which are the sums of the spectral components I, II and III (dashed lines) [17]. For other details, see legend to Fig. 4.

the denaturation process for CMP, monitored by the temperature dependence of normalized fluorescence intensity. On increasing temperature, an irreversible cooperative transition to the denatured state occurred (symbols), which was analyzed by non-linear least squares fitting to the Eq. (3). This fitting (solid line) afforded values of  $T^* = 336.9 \pm 1.1 \text{ K}$  and  $E_A = 60.8 \pm 1.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ , which are in good agreement with the values obtained from CD experiments (see above). Thus, two independent methodological experimental approaches used in this work support the idea that the thermal denaturation of CMP can be interpreted in terms of the simple irreversible two-state kinetic model and that only two states, native and denatured are populated in its denaturation process.

At the same time, the inserts in Fig. 5 shows the fluorescence spectra of intact (symbols in insert A) and thermally denatured (symbols in insert B) CMP at pH 7.0, excited at 295 nm. Analysis of the emission spectrum of intact CMP in terms of the model of the discrete states of tryptophan residues in enzyme [17] revealed that the tryptophan residues of form I (internal indole chromophore forming a 2:1 exciplex with some neighboring polar protein groups) and form II (indole chromophore at the enzyme surface in contact with bound water molecules) provided the contribution to the emission. Complete heat denaturation of CMP resulted in the disappearance of component II. In this case, component I and III (external tryptophan residue in contact with free water molecules) contributed strongly to the total emission spectrum that together with data obtained by CD is very considerable argument in favor that CMP in denatured state is not completely unfolded.

Finally, we note that the kinetic mechanism of the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -assisted CMP-catalyzed oxidation of reducing substrate – guaiacol was investigated using initial rate measurements, in which the concentration of both substrates –  $\text{H}_2\text{O}_2$  and guaiacol – were varied systematically and results were analyzed assuming steady state conditions. The initial rates as a function of hydrogen peroxide or guaiacol concentration were fitted to the Michaelis–Menten rate equation by an iterative process [26]. Thus obtained values of the constants  $K_m (\text{H}_2\text{O}_2) = 3.9 \text{ mM}$  and  $K_m (\text{guaiacol}) = 7.5 \text{ mM}$  at pH 6 and  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , do not differ from those of the majority of plant peroxidases [27–33], that along with satisfactory structural stability (see for comparison [33]) makes CMP a promising enzyme for biotechnological applications.

### Acknowledgements

This work was partially supported by Projects SA-06-00-0 ITACYL-Universidad de Salamanca, SA 129A07, and SA052A10-2 funded by the Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León and the Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (Spain).

### References

- [1] C. Penel, T. Gaspar, H. Greppin, *Plant Peroxidases 1980–90. Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects*, University of Geneva, Switzerland, 1992.
- [2] J.S. Dordick, M.A. Marletta, A.M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1987) 31–36.
- [3] J.A. Akkara, K.J. Senecal, D.L. Kaplan, *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* 29 (1991) 1561–1574.
- [4] Q.R. Thompson, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1119–1121.
- [5] Z. Weng, M. Hendrickx, G. Maesmans, P. Tobback, *J. Food Sci.* 56 (1991) 567–570.

- [6] D. Arseguel, M. Baboulène, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 61 (1994) 331–335.
- [7] P.R. Adler, R. Arora, A. El Ghaouth, D.M. Glenn, J.M. Solar, *J. Environ. Qual.* 23 (1994) 1113–1117.
- [8] A.V. Caramyshev, E.G. Evtushenko, V.F. Ivanov, A. Ros Barceló, M.G. Roig, V.L. Shnyrov, R.B. van Huystee, I.N. Kurochkin, A.K. Vorobiev, I.Y. Sakharov, *Biomacromolecules* 6 (2005) 1360–1366.
- [9] L.S. Zamorano, S.B. Vilarmau, J.B. Arellano, G.G. Zhadan, N. Hidalgo-Cuadrado, S.A. Bursakov, M.G. Roig, V.L. Shnyrov, *Int. J. Biol. Macromol.* 44 (2009) 326–332.
- [10] N. Hidalgo-Cuadrado, G.G. Zhadan, M.G. Roig, V.L. Shnyrov, *Int. J. Biol. Macromol.* 49 (2011) 1078–1082.
- [11] N. Hidalgo-Cuadrado, P. Perez-Galende, T. Manzano, C.G. De Maria, V.L. Shnyrov, M.G. Roig, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 4765–4772.
- [12] G. Fairbanks, T. Steck, D.F.N. Wallach, *Biochemistry* 10 (1971) 2606–2617.
- [13] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [14] A. Lindgren, T. Ruzgas, L. Gorton, E. Csöregi, G.B. Ardila, I.Y. Sakharov, I.G. Gazaryan, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 491–497.
- [15] N. Sreerama, S.Y. Venyaminov, R.W. Woody, *Anal. Biochem.* 287 (2000) 243–251.
- [16] N. Sreerama, R.W. Woody, *Anal. Biochem.* 287 (2000) 252–260.
- [17] E.A. Permyakov, *Luminescent Spectroscopy of Proteins*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.
- [18] J.W. Tams, K.G. Welinder, *Biochemistry* 35 (1996) 7573–7579.
- [19] D.G. Pina, A.V. Shnyrova, F. Gavilanes, A. Rodriguez, F. Leal, M.G. Roig, I.Y. Sakharov, G.G. Zhadan, E. Villar, V.L. Shnyrov, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 120–126.
- [20] L.S. Zamorano, D.G. Pina, J.B. Arellano, S.A. Bursakov, A.P. Zhadan, J.J. Calvete, L. Sanz, P.R. Nielsen, E. Villar, O. Gavel, M.G. Roig, L. Watanabe, I. Polikarpov, V.L. Shnyrov, *Biochimie* 90 (2008) 1737–1749.
- [21] S.Yu. Venyaminov, J.T. Yang, in: G.D. Fasman (Ed.), *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press, New York, 1996, pp. 69–107.
- [22] K.G. Welinder, M. Gajhede, in: H. Greppin, S.K. Rasmussen, K.G. Welinder, C. Penel (Eds.), *Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology*, University of Copenhagen and University of Geneva, Geneva, Switzerland, 1993, pp. 35–42.
- [23] L. Banci, *J. Biotechnol.* 53 (1997) 253–263.
- [24] R. Lumry, E. Eyring, *J. Phys. Chem.* 58 (1954) 110–120.
- [25] B.I. Kurganov, A.E. Lyubarev, J.M. Sanchez-Ruiz, V.L. Shnyrov, *Biophys. Chem.* 69 (1997) 125–135.
- [26] W.W. Cleland, *Methods Enzymol.* 63 (1979) 103–138.
- [27] V. Sciancalepore, V. Longone, F.S. Alvit, *Am. J. Enol. Vitic.* 36 (1985) 105–110.
- [28] M.Y. Lee, S.S. Kim, *Phytochemistry* 35 (1994) 287–290.
- [29] S. Medjeldi Marzouki, F. Limam, M. Issam Smaali, R. Ulber, M. Néjib Marzouki, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 127 (2005) 201–213.
- [30] N. Hidalgo Cuadrado, J.B. Arellano, J.J. Calvete, L. Sanz, G.G. Zhadan, I. Polikarpov, S. Bursakov, M.G. Roig, V.L. Shnyrov, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 74 (2012) 103–108.
- [31] L. Sanchez Zamorano, N. Hidalgo Cuadrado, P. Perez Galende, M.G. Roig, V.L. Shnyrov, *J. Biophys. Chem.* 3 (2012) 16–28.
- [32] R. Mall, G. Naik, U. Mina, S.K. Misrha, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 43 (2013) 137–151.
- [33] L. Sanchez Zamorano, M.G. Roig, E. Villar, V.L. Shnyrov, *Curr. Top. Biochem. Res.* 9 (2007) 1–26.





## Kinetics of Spanish broom peroxidase obeys a Ping-Pong Bi–Bi mechanism with competitive inhibition by substrates



Patricia Pérez Galende<sup>a</sup>, Nazaret Hidalgo Cuadrado<sup>b</sup>, Eduard Ya. Kostetsky<sup>c</sup>, Manuel G. Roig<sup>a,d,\*</sup>, Enrique Villar<sup>e</sup>, Valery L. Shnyrov<sup>e</sup>, John F. Kennedy<sup>f,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Agua (CIDTA), Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Estudios Biofuncionales, Departamento de Química-Física II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology, Far Eastern Federal University, 690600 Vladivostok, Russia

<sup>d</sup> Departamento de Química Física, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

<sup>e</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

<sup>f</sup> Chembiotech Laboratories, Kyrewood House, Tenbury Wells, Worcestershire WR15 8SG, UK

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 June 2015

Received in revised form

22 September 2015

Accepted 23 September 2015

Available online 28 September 2015

#### Keywords:

Heme peroxidase

Ping-Pong Bi–Bi Mechanism

Microscopic constants

### ABSTRACT

In plants, adverse conditions often induce an increase in reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  is reduced to water, and thus becomes detoxified by enzymes such as *Cytisus multiflorus* peroxidase (CMP). Here, the steady-state kinetics of the  $H_2O_2$ -supported oxidation of different organic substrates by CMP was investigated. Analysis of the initial rates vs.  $H_2O_2$  and reducing substrate concentrations proved to be consistent with a substrate-inhibited Ping-Pong Bi–Bi reaction mechanism. The phenomenological approach expresses the peroxidase Ping-Pong mechanism in the form of the Michaelis–Menten equation and affords an interpretation of the effects in terms of the kinetic parameters  $K_m^{H_2O_2}$ ,  $K_m^{AH_2}$ ,  $k_{cat}$ ,  $K_{SI}^{H_2O_2}$ ,  $K_{SI}^{AH_2}$  and of the microscopic rate constants,  $k_1$  and  $k_3$ , of the shared three-step catalytic cycle of peroxidases.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Plants are aerobic organisms and hence use oxygen as a terminal electron acceptor. Class III plant peroxidases (EC 1.11.1.7; donor: hydrogen peroxide oxidoreductases) can generate, in a controlled manner, highly reactive oxygen species (ROS) such as  $H_2O_2$  and hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ), which can act as active molecules during the oxidative burst, hypersensitivity responses or cell elongation. Class III peroxidases can also contribute to maintaining low levels of hydrogen peroxide [1].

The primary function of these enzymes is often seen primarily in terms of causing the conversion of toxic  $H_2O_2$  to  $H_2O$ , but this should not be allowed to obscure their broader participation in other reactions, such as cell wall formation, lignification, the

protection of tissues from pathogenic microorganisms, suberization or auxin catabolism.

Peroxidases are metalloproteins with a molecular weight ranging from 30,000 to 150,000 Da, containing a heme center (Ferroporphyrin IX); they are accordingly known as heme peroxidases [2]. Heme peroxidases are enzymes that catalyze the oxidation of a variety of substrates, including phenols, aromatic amines, thioanisoles, halide and thiocyanate ions, by means of  $H_2O_2$  reduction. Selectivity regarding the reducing substrates depends on the type of peroxidase.

A variety of methods exist for the determination of peroxidase activity, including those based on colorimetric, fluorimetric, chemiluminescent and electrochemical detection. Among these, colorimetric detection is the method most commonly used because it is simple and economical. Colorimetric quantification is based on the formation of visible light-absorbing products as a result of the peroxidase-catalyzed reaction between a “reporter molecule” and  $H_2O_2$ . The reporter molecule is the hydrogen/electron donating (reducing) substrate which, after its oxidation, absorbs light in the visible region [3].

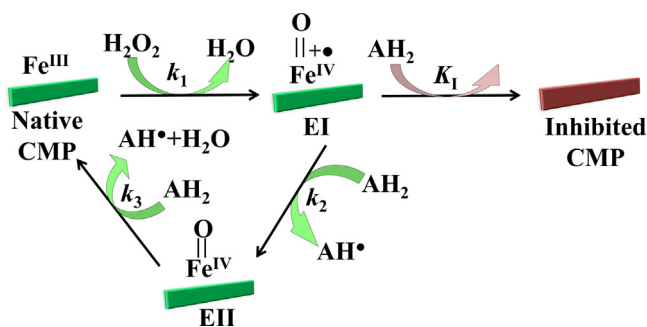
The shared three-step catalytic cycle of peroxidases, involving different intermediate enzyme forms, is known as the Poulos–Kraut mechanism [4–6]. Catalysis is initiated by the binding of  $H_2O_2$  to

**Abbreviations:** CMP, *Cytisus multiflorus* peroxidase;  $k_1$ ,  $k_3$ , microscopic constants;  $K_m^{H_2O_2}$ ,  $K_m^{AH_2}$ , inhibition constants.

\* Corresponding author at: Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Agua (CIDTA), Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [mgr@usal.es](mailto:mgr@usal.es) (M.G. Roig), [jfk@chembiotech.co.uk](mailto:jfk@chembiotech.co.uk) (J.F. Kennedy).



**Fig. 1.** Mechanistic model of the reaction of CMP. The structural and kinetic data are consistent with an ordered Bi–Bi reaction mechanism and consequent formation of two intermediate compounds, EI ( $[(P^{*+})Fe^{IV}=O]$ ) and EII ( $[(P)Fe^{IV}=O]$ ). P (green colour tab) corresponds to protoporphyrin IX inside the protein matrix. EI and EII refer to Compound I and Compound II redox intermediates. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

the high-spin ferric heme iron of resting peroxidase [7,8], followed by heterolytic cleavage of the peroxide oxygen–oxygen bond under the influence of highly conserved histidine and arginine residues in the active site [9]. A unique feature of these enzymes is their ability to cleave O–O bonds of putative iron (III)-porphyrin intermediates heterolytically, forming high-valent oxo-iron (IV)-porphyrin-based  $\pi$ -cation radical intermediates, EI, via the establishment of a sixth-coordination bond between hydrogen peroxide and the heme iron. A water molecule is generated as the co-product of the reaction. Completion of the catalytic cycle most often consists of two successive single-electron transfers from separate reducing substrate molecules to the enzyme. The first reduction, of the porphyrin  $\pi$ -cation radical in EI, yields a second enzyme intermediate, EII (oxo-iron (IV)-porphyrin), which retains the iron in the oxy-ferryl state [10]. Reduction of EII to recover the ferric enzyme is often rate-limiting under steady-state conditions (Fig. 1). Free radicals released from the catalytic cycle quite often recombine or react with parent molecules, giving rise to oligomers and polymers [11].

As biomimetic models for heme-containing enzymes [7,8], the reactions of iron (III) porphyrin complexes with several oxidants, such as peroxyacids and hydroperoxides, have been extensively studied with a view to elucidating the mechanisms of O–O bond activation and oxygen atom transfer reactions. The O–O bond of peroxyacids is cleaved heterolytically by the iron porphyrin complexes, resulting in the formation of high-valent iron (IV)-oxo porphyrin cation radical intermediates  $[(P^{*+})Fe^{IV}=O]$ , and the hydroperoxide O–O bond cleavage is homolytic and/or heterolytic in aqueous and aprotic solvents, resulting in the formation of a ferryl-oxo complex [12].

The peroxidase cycle is generally considered irreversible. However, there is no doubt that adsorption complexes between the enzyme and its substrates exist physically [6]. The microscopic constants governing the equilibrium between aromatic compounds and peroxidase have been determined. Even though the presence of the co-substrates (donor or  $H_2O_2$ ) in the enzyme modulates the affinity for the other, the mechanism may proceed via random binding. This finding, as well as some special kinetic features [13], supports the notion that there is no need for the peroxide to bind to the enzyme prior to donor adsorption. Hydrogen peroxide, the oxidant of peroxidases and catalases, is also an inactivating agent of these metalloproteins. With a large excess of  $H_2O_2$  and in the absence of exogenous electron donors, heme peroxidases are irreversibly inhibited after some time [14].

The catalytic properties of peroxidases, including the oxidation of high- and low-redox-potential substrates, have made them attractive for biotechnological processes. Despite the existence of

an extensive body of literature addressing the properties of peroxidases, the data available for establishing the catalytic mechanisms and functions of these enzymes are insufficient. There is little information about the ability of this enzyme to degrade complex and difficult-to-oxidize substrates. The information about the effectors influencing peroxidase activity is also limited. The biotechnological use of the catalytic potential of peroxidases should be built on broad-scale studies addressing substrate specificity and the effectors influencing their activities. Enzymatic biocatalysis plays a very important role in the development of many chemical industries, e.g., energy, food or fine chemistry [15].

Peroxidases are widely used in clinical biochemistry and enzyme immunoassays [16]. Some novel applications of peroxidases include the treatment of waste water containing phenolic compounds, the synthesis of various aromatic chemicals, and the removal of peroxide from industrial wastes [17].

In this work, the kinetic mechanism of the  $H_2O_2$ -supported oxidation of different organic substrates by means of a novel peroxidase from *Cytisus multiflorus* (CMP) has been investigated. Among the broad variety of organic and inorganic substrates of peroxidases, here six organic substrates were studied: the chromogenic substrates guaiacol (2-methoxyphenol) and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)), often used as reference substrates, and *o*-dianisidine (3,3'-dimethoxybenzidine), *o*-phenylenediamine (benzene-1,2-diamine), ferulic acid ((*E*)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-prop-2-enoic acid) and catechol (benzene-1,2-diol). The latter three substrates are suitable for use in ELISA procedures that employ peroxidase conjugates.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Analytical grade polyethyleneglycol (PEG), guaiacol (2-methoxyphenol), ammonium sulfate, sodium phosphate and sodium chloride were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA) and were used without further purification.  $H_2O_2$  was from Panreac Quimica S.L.U. (Barcelona, Spain). Superdex-200, HiTrap™ SP HP columns and Phenyl-Sepharose CL-4B were from GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden). A TSK-Gel DEAE-5PW column was purchased from the Tosoh Corporation (Tokyo, Japan). Cellulose membrane tubing for dialysis (avg. flat width 3.0 in.) was purchased from Sigma Chemical Co.; slide-A-lyzer dialysis cassettes (extra-strength, 3–12 mL capacity, 10,000 MWCO) were from Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL; USA), and centrifuge filter devices (Amicon Ultra Cellulose 10,000 MWCO, 15 mL capacity) were from Millipore Corp. (Billerica, MA, USA). All other reagents were of the highest purity available. The water used for preparing the solutions was double-distilled and then subjected to a de-ionization process.

### 2.2. Enzyme production

The white Spanish broom (*Cytisus multiflorus*) was collected from an area below (at approx 200 m distance) the Almendra dam (Salamanca, Spain). Stems (2000 g) were milled and homogenized in 10 L of 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, with 0.25 M NaCl for 8 h at room temperature. The excess material was removed by vacuum filtration and centrifugation ( $10,000 \times g$ , 277 K for 40 min). Pigments were extracted by phase separation over 8 h at room temperature after the addition to the supernatant of solid PEG 10,000 at 17% (w/v) and sodium ammonium sulfate at 12% (w/v). Over time, two phases were formed: an upper polymer phase (dark brown), which contained pigments, phenols, polyphenols, oxidized phenols and PEG and a lower aqueous phase (yellow) containing peroxidase.

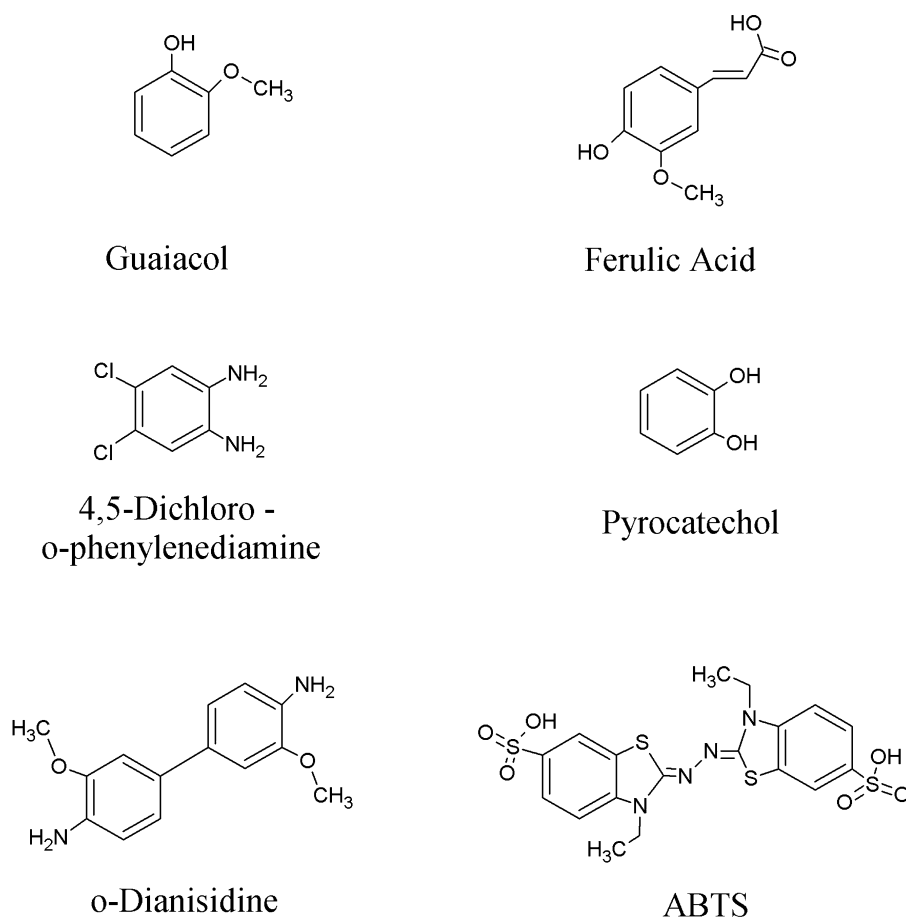


Fig. 2. Chemical structures of the reducing substrates (AH<sub>2</sub>) studied.

These phases were separated and the phase containing peroxidase activity was centrifuged. The clear supernatant containing peroxidase activity was titrated with ammonium sulfate to a conductivity value of  $230 \text{ mS cm}^{-1}$  and was applied on a Phenyl-Sepharose column ( $1.5 \text{ cm} \times 35 \text{ cm}$ ) equilibrated with  $100 \text{ mM}$  phosphate buffer, pH 7.0, with  $1.7 \text{ M}$  ammonium sulfate, which has the same conductivity as the sample. The enzyme was eluted with  $100 \text{ mM}$  phosphate buffer, pH 7.0, with  $0.2 \text{ M}$  ammonium sulfate at a flow rate  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . The fractions showing peroxidase activity were dialyzed against  $5 \text{ mM}$  acetic acid/acetate buffer, pH 5, for 7 h with constant stirring at  $277 \text{ K}$ . These fractions were membrane-concentrated (Millipore Centricon,  $30,000 \text{ NMWL}$ ) to  $15 \text{ mL}$  and applied on a TSK-Gel DEAE-5PW column ( $1 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$ ) equilibrated with  $5 \text{ mM}$  acetic acid/acetate buffer, pH 5.5. The fraction with peroxidase activity was not retained to the column. It was collected and dialyzed against  $5 \text{ mM}$  acetic acid/acetate buffer, pH 5.5, overnight with constant stirring at  $277 \text{ K}$ . After dialysis, the fractions were membrane-concentrated (Millipore Centricon,  $30,000 \text{ NMWL}$ ) and applied on a HiTrap™ SP HP  $1 \text{ mL}$  column (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) equilibrated with  $5 \text{ mM}$  acetic acid/acetate buffer, pH 5.5. Elution was carried out with a  $25\%$  solution of  $5 \text{ mM}$  acetic acid/acetate with  $1 \text{ M NaCl}$ , pH 5.5, at a flow rate of  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Fractions with peroxidase activity were collected and dialyzed again against  $5 \text{ mM}$  acetic acid/acetate buffer, pH 5.5, overnight with constant stirring at  $277 \text{ K}$ , membrane-concentrated (Millipore Centricon,  $30,000 \text{ NMWL}$ ) and applied on a Superdex-200 column equilibrated with  $5 \text{ mM}$  acetic acid/acetate buffer, pH 5.5. Elution was carried out with  $150 \text{ mM NaCl}$  in the same buffer at

a flow rate of  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$ . The purity of the CMP was determined by high-performance gel filtration and SDS-PAGE [18].

### 2.3. Enzyme activity

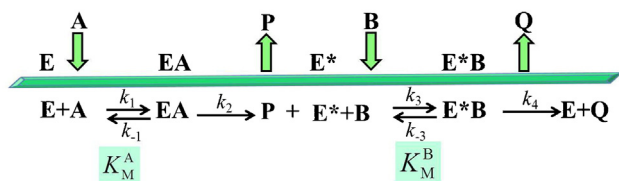
Peroxidase activity [18–23] towards guaiacol was measured spectrophotometrically at  $25^\circ\text{C}$ . An aliquot of enzyme solution was added to a  $1\text{-cm}$  optical path-length spectral cuvette containing  $18 \text{ mM}$  guaiacol and  $4.9 \text{ mM H}_2\text{O}_2$  in  $20 \text{ mM}$  sodium phosphate buffer, pH 6.0, in a final volume of  $2 \text{ mL}$ . The rate of change in absorbance due to substrate oxidation was monitored at  $470 \text{ nm}$ . Peroxidase activities were calculated using a molar absorption coefficient of  $5200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at  $470 \text{ nm}$  for the guaiacol oxidation product.

### 2.4. Steady-state experiments

The initial rates of appearance of the oxidation products of the different substrates studied (guaiacol, ABTS, o-dianisidine, o-phenylenediamine, ferulic acid and catechol, Fig. 2) in the presence of hydrogen peroxide were measured by electronic absorption spectroscopy at the characteristic wavelengths of such products [19,20].

The reactions were carried out at  $25^\circ\text{C}$  in  $20 \text{ mM}$  sodium phosphate buffer, pH 7.0, except for ABTS, for which pH was 3.0 ( $20 \text{ mM}$  sodium citrate buffer). Measurements were performed with variable concentrations of the reducing substrate at a fixed  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration and *vice versa*.

### Ping-Pong Bi-Bi



**Fig. 3.** Ping-Pong Bi-Bi mechanism. Cleland's nomenclature with green arrows (top) and the bottom part (in black) represents the mechanism without the ternary complex. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

The initial reaction rates were obtained from the kinetic runs and were fitted vs. substrate concentration [19,20,24].

#### 2.5. Substrate inhibition experiments

In a Ping-Pong mechanism, in the reaction it is common to observe a competitive substrate inhibition mechanism by both substrates [25]. Here, a Michaelis–Menten hyperbola was verified at fixed inhibitory concentrations, and the  $1/v$  vs.  $1/[AH_2]$  or  $1/[H_2O_2]$  plots were linear with the same intercept and different slopes that increased when the substrate concentration decreased. It is possible to calculate the corresponding inhibition constants by representing  $K$  vs. the different inhibitory concentrations.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Steady-state kinetic parameters of CMP-catalyzed oxidation reactions obeying a Ping-Pong Bi-Bi mechanism

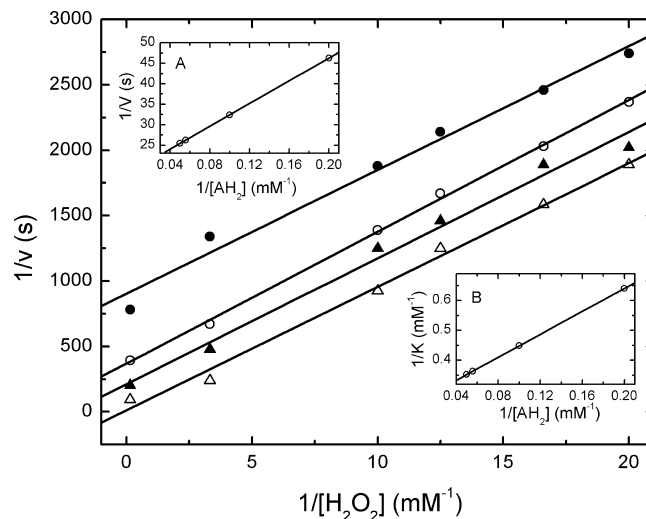
In a two-substrate enzyme system, two general mechanisms are possible for substrate-enzyme interactions – sequential or “Ping-Pong”. In a sequential mechanism, both substrates are combined with the enzyme to form a ternary complex before catalysis takes place. The substrates can combine with the enzyme in a random fashion (Random Bi-Bi) or in an obligatory order (Ordered Bi-Bi) to form the ternary complex. The products formed from the reaction can therefore be released in an ordered or random fashion. In a Ping-Pong mechanism, a ternary complex of substrates and enzyme is not formed, Fig. 3. The first substrate in a Ping-Pong Bi-Bi mechanism combines with the enzyme to form a substituted enzyme intermediate, with the concomitant release of the first product. The second substrate then interacts with the substituted enzyme intermediate to form the second product and regenerate the native enzyme.

Ping-Pong and sequential mechanisms can be differentiated by a steady-state kinetic analysis of the reaction using the procedures described by Cleland [25].

The kinetic mechanism of the  $H_2O_2$ -assisted CMP-catalyzed oxidation of the  $AH_2$  reducing substrates was investigated using initial rate measurements, in which the concentrations of both substrates –  $H_2O_2$  and  $AH_2$  – were varied systematically and the results were analyzed assuming steady-state conditions. The initial rates,  $v$ , as a function of the hydrogen peroxide or  $AH_2$  concentration, were fitted to the Michaelis–Menten rate equation by an iterative process.

The rate equation for an enzyme-catalyzed Ping-Pong reaction with two substrates,  $H_2O_2$  and  $AH_2$ , in the absence of products and at non-inhibitory substrate concentrations, is given by

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



**Fig. 4.** Primary double-reciprocal plot of the initial rate of guaiacol oxidation as a function of the hydrogen peroxide concentration at fixed guaiacol concentrations (5 mM ( $\Delta$ ), 10 mM ( $\blacktriangle$ ), 18 mM ( $\circ$ ), 20 mM ( $\bullet$ )). The inserts show the secondary plots of  $1/v$  vs.  $1/[\text{guaiacol}]$  (A) and of  $1/K$  vs.  $1/[\text{guaiacol}]$  (B). See text for other experimental conditions.

which can be written in the form of a rectangular hyperbola for fixed values  $[AH_2]$ :

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

where the  $V$  and  $K$  parameters are as follows:

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + (K_m^{AH_2}/[AH_2])} \quad (3)$$

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

At pH 7.0, double-reciprocal plots of the initial steady-state rates of guaiacol oxidation vs. the hydrogen peroxide concentration (0.05–8 mM) at fixed reducing guaiacol substrate concentrations afforded a set of approximately parallel lines, as shown in Fig. 4. Similar graphic behaviour of the double-reciprocal plots of the data was observed upon studying the effect of guaiacol concentrations on the initial rates of the oxidation reaction at different fixed  $H_2O_2$  concentrations (data not shown). Similar trends towards parallel lines in double-reciprocal plots were also observed at pH 7.0 for *o*-dianisidine, *o*-phenylenediamine, ferulic acid, catechol, and at pH 3.0 for ABTS. The trends towards such linear parallel plots obtained point to a Ping-Pong mechanism involving two independent enzyme forms (*i.e.*, enzyme forms separated by an irreversible step). Thus, upon representing the intercept ( $1/V$ ) of the above lines and the inverse of the  $K$  parameter vs. the reciprocal of the fixed substrate concentration, linear relationships are obtained (inserts in Fig. 4 for the case of guaiacol). The values of  $K_m^{H_2O_2}$ ,  $K_m^{AH_2}$ ,  $V_{\max}$  and  $k_{\text{cat}} = (V_{\max}/[E_0])$ , shown in Table 1, were calculated from the slopes and intercepts of the corresponding linear fittings of data according to the following equations:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m^{AH_2}}{V_{\max}} \frac{1}{[AH_2]} \quad (5)$$

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{K_m^{H_2O_2}} + \frac{K_m^{AH_2}}{K_m^{H_2O_2}} \frac{1}{[AH_2]} \quad (6)$$

The highest turnover number,  $k_{\text{cat}}$ , of CMP were found for the substrates guaiacol and ferulic acid, followed by ABTS, catechol, *o*-dianisidine, and *o*-phenylenediamine. The highest affinity of the

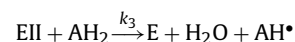
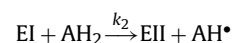
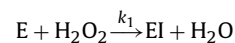
**Table 1**Kinetic parameters obtained for the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidation of different substrates by CMP. See text for experimental conditions. [E<sub>0</sub>]/10<sup>8</sup> M = 5.0.

Substrate	$K_m^{H_2O_2}$ × 10 <sup>3</sup> M	$K_m^{AH_2}$ × 10 <sup>3</sup> M	$V_{max}$ × 10 <sup>5</sup> M s <sup>-1</sup>	$k_{cat}$ × 10 <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m^{H_2O_2}$ × 10 <sup>-5</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m^{AH_2}$ × 10 <sup>-5</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
Guaiacol	3.7 ± 0.4	7.4 ± 0.3	5.3 ± 0.2	11 ± 1	2.8 ± 0.4	1.4 ± 0.1
ABTS	2.5 ± 0.5	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.2	9.1 ± 0.5	3.6 ± 0.3	11 ± 4
Ferulic acid	2.1 ± 0.2	0.42 ± 0.09	5.3 ± 0.2	12.6 ± 0.4	5.9 ± 0.7	26 ± 7
o-Dianisidine	0.71 ± 0.07	0.53 ± 0.02	0.83 ± 0.02	1.67 ± 0.01	2.4 ± 0.9	3.16 ± 0.07
o-Phenylenediamine	4.1 ± 0.2	3.2 ± 0.3	0.61 ± 0.04	1.23 ± 0.07	0.28 ± 0.08	0.38 ± 0.06
Catechol	3.86 ± 0.03	1.03 ± 0.06	20 ± 2	4.10 ± 0.03	1.06 ± 0.02	3.98 ± 0.01

enzyme (1/ $K_m^{H_2O_2}$ ) was for o-dianisidine, followed by ferulic acid, ABTS, guaiacol, catechol and o-phenylenediamine. However, the highest specificity constant or catalytic efficacy of the enzyme ( $k_{cat}/K_m^{H_2O_2}$ ) was seen for ferulic acid, followed by ABTS, guaiacol, o-dianisidine, catechol and o-phenylenediamine. Similar substrates were studied for other peroxidases, such as African oil palm tree (AOPTP) [26], royal palm tree (RPTP) [19] and *Chamaerops excelsa* palm tree (CEP) [20] peroxidases.

### 3.2. Ping-Pong Bi-Bi microscopic rate constants for CMP

Peroxidases catalyze the oxidation of AH<sub>2</sub> organic substrates, using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (or other peroxides) as an electron acceptor, in a three step catalytic cycle (Fig. 1) involving different intermediate enzyme forms:



The monoelectronic oxidation of the native state E gives rise to an intermediate state termed EI. EI is responsible for the oxidation of the electron-donor substrate (AH<sub>2</sub>), accepting one proton and one electron, and generating its free radical (AH<sup>•</sup>) and another enzyme state, designated EII. Finally, EII is reduced by a second molecule of substrate, giving rise to a second free radical (AH<sup>•</sup>). The microscopic constant  $k_1$  (the constant of EI formation) indicates the reactivity of the enzyme towards hydrogen peroxide and  $k_3$  (the constant of EII reduction) represents the reactivity of the enzyme towards the reducing substrate.

To calculate the microscopic constants ( $k_1$  and  $k_3$ ) for the oxidation of the substrates by CMP, the rates of oxidation of the substrates were fitted for each concentration of AH<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, assuming the steady-state approach and considering that  $k_2 > k_3$ .

For non-inhibitory concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the initial rates of substrate oxidation by peroxidases, following the three-step catalytic cycle, can be fitted to the equation:

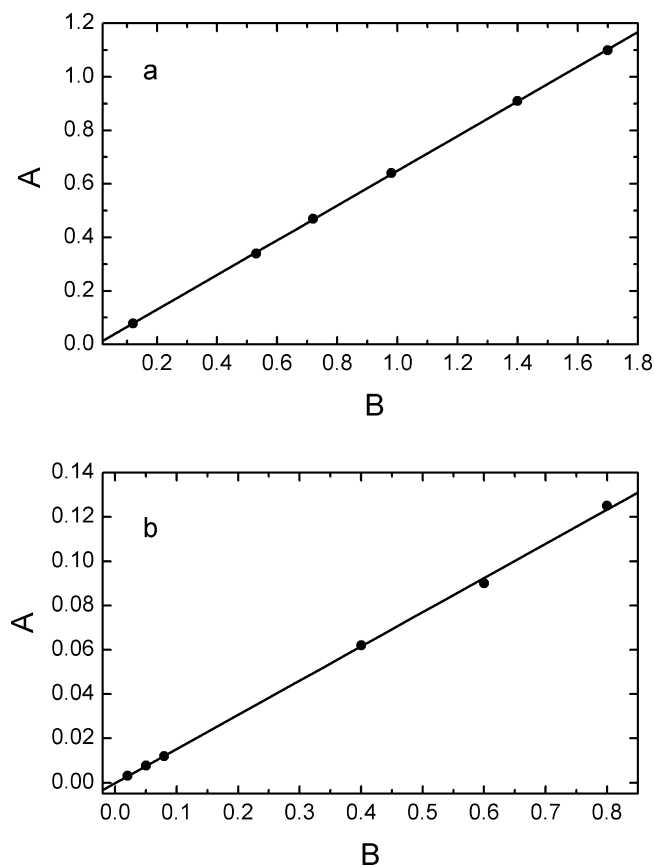
$$v = \frac{A[H_2O_2]}{B + [H_2O_2]} \quad (7)$$

where  $A = 2[E]k_3[AH_2]$  and  $B = (k_3/k_1)[AH_2]$ . From the slope of the linear extrapolation of the experimental data shown in plots A vs. B (see Fig. 5a) it is possible to calculate the value of  $k_1$  (formation constant of EI) for peroxidase-mediated guaiacol oxidation. The value obtained, as well as those obtained in the same manner for ferulic acid, ABTS, catechol, o-dianisidine and o-phenylenediamine, is shown in Table 2.

Similarly, the dependence of  $v$  vs. [AH<sub>2</sub>] may be written as:

$$v = \frac{A[AH_2]}{B + [AH_2]} \quad (8)$$

where  $A = 2[E]k_1[H_2O_2]$  and  $B = (k_1/k_3)[H_2O_2]$ . From the slope of the linear extrapolation of the experimental data shown in plots A vs.



**Fig. 5.** (a) Secondary plot of parameters A (nmol s<sup>-1</sup>) vs. B (mM) obtained by varying the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations for six guaiacol concentrations (3, 5, 8, 10, 12, 18 mM). (b) Secondary plot of parameters A (nmol s<sup>-1</sup>) vs. B (mM) obtained by varying guaiacol concentrations for six H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4 mM). See text for other experimental conditions.

B (see Fig. 5b) it is possible to calculate the value of  $k_3$  (formation constant of EII) (see Table 2).

The catalytic efficacy for the utilization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> would be given by:

$$\frac{k_{cat}}{K_m^{H_2O_2}} = \frac{2k_3[AH_2]}{(k_3/k_1)[AH_2]} = 2k_1 \quad (9)$$

**Table 2**Microscopic constants  $k_1$  and  $k_3$  for the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidation of substrates by the CMP. See text for experimental conditions.

Substrate	$k_1$ μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	$k_3$ μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
Guaiacol	0.54 ± 0.04	0.13 ± 0.07
ABTS	0.25 ± 0.05	0.26 ± 0.01
Ferulic acid	0.35 ± 0.09	1.4 ± 0.2
o-Dianisidine	0.96 ± 0.01	0.52 ± 0.03
o-Phenylenediamine	0.15 ± 0.05	0.49 ± 0.09
Catechol	0.4 ± 0.1	0.19 ± 0.09

while the catalytic efficacy for the utilization of the substrates  $AH_2$  would be given by:

$$\frac{k_{cat}}{K_m^{AH_2}} = \frac{2k_1[H_2O_2]}{(k_1/k_3)[H_2O_2]} = 2k_3 \quad (10)$$

In other words, the reactivity of the enzyme with hydrogen peroxide is determined by the value of the constant  $k_1$ , whereas its reactivity with the reducing substrate is determined by the constant  $k_3$ . From Table 2, it can be seen that ferulic acid exhibits the highest constant for the reactivity of CMP with  $AH_2$  with respect to the rest of the reducing substrate. However, *o*-dianisidine exhibits the highest reactivity of CMP with  $H_2O_2$ .

Similar studies addressing kinetic parameters and microscopic rate constants carried out with African [26], Royal [19] and CEP [20,23] palm tree peroxidases have revealed that these enzymes exhibit greater reactivity towards ferulic acid and ABTS, followed by the aromatic amines *o*-dianisidine, *o*-phenylenediamine and, finally, by phenolic substrates with one or two hydroxyl groups in their chemical structures. In contrast, both soybean and peanut peroxidases are more reactive towards guaiacol than towards amines [26–28]. Both horseradish and tobacco peroxidases have been reported to be equally reactive towards guaiacol and *o*-dianisidine and about 10–15 times less reactive towards *o*-phenylenediamine [19].

Substrate specificity studies of peroxidases are usually performed with only one substrate present, besides  $H_2O_2$ , in the reaction mixture at a given time; *i.e.*, without any alternative substrates able to undergo the same reaction. This is because the presence of competing substrates tends to complicate the analysis without providing much more information than would be obtained by studying the substrates separately. However, this implies an

important difference between experimental practice and the physiological conditions under which enzymes usually exist. In this sense, most enzymes are not wholly specific for a single substrate and must often select between several that are available simultaneously. Therefore, to be physiologically meaningful enzyme specificity must be defined in terms of how well the enzyme can discriminate between different substrates present in the same reaction mixture. This does not mean that it cannot be determined from the kinetic parameters of the enzyme for separate substrates, but it does mean that these parameters need to be interpreted correctly and not on a casual basis [29].

### 3.3. Competitive substrate inhibition mechanism of CMP

In order to further verify the kinetic mechanism of the substrate oxidation reactions catalyzed by CMP, inhibition studies were carried out. One of the characteristic features of Ping-Pong reaction mechanisms is the occurrence of competitive substrate inhibition by both substrates [25]. In Ping-Pong reaction mechanisms, since the three forms of the enzyme – E, EI and EII – are so similar, it is reasonable to expect that  $AH_2$  would have some affinity for E as well as EI and EII and, if the active sites in EI and EII are not too full for the adsorption of  $H_2O_2$ , the  $H_2O_2$  would be expected to show some affinity for EI and EII [25], Fig. 1. In peroxidases, the formation of a non-productive or dead-end complex between  $AH_2$  and E and the reaction of high concentrations of  $H_2O_2$  with EI, affording  $H_2O_2$  and  $O_2$ , have been found [30].

The occurrence of competitive substrate inhibition by both substrates in the reaction mechanism means that in the

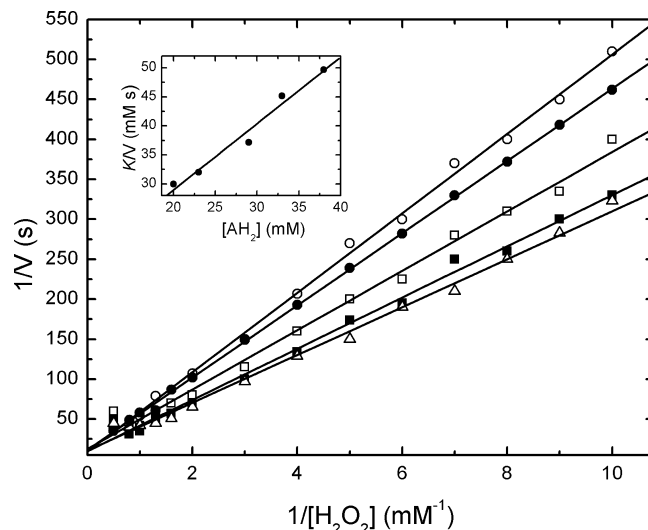


Fig. 6. Primary double-reciprocal plot of the initial rate of guaiacol oxidation as a function of the hydrogen peroxide concentration at fixed guaiacol inhibitory concentrations (20 mM ( $\Delta$ ), 23 mM ( $\blacksquare$ ), 29 mM ( $\square$ ), 33 mM ( $\bullet$ ), 38 mM ( $\circ$ )). The insert shows the secondary plot of  $K/V$  vs. the guaiacol concentration. See text for other experimental conditions.

denominator of rate Eq. (1), the  $K_m^{H_2O_2}[AH_2]$  term can be multiplied by  $(1 + [AH_2]/K_{IS}^{AH_2})$  and the  $K_m^{AH_2}[H_2O_2]$  term by  $(1 + [H_2O_2]/K_{IS}^{H_2O_2})$ , where  $K_{IS}^{AH_2}$  and  $K_{IS}^{H_2O_2}$  are the dissociation constants of  $AH_2$  from  $E \cdot AH_2$  and of  $H_2O_2$  from the  $EI \cdot H_2O_2$  and/or  $EII \cdot H_2O_2$  complexes, respectively. The double competitive substrate inhibition would be exhibited when  $AH_2$  and  $H_2O_2$  are varied. Thus, the corresponding rate equation would be:

$$v = \frac{V[H_2O_2][AH_2]}{K_m^{H_2O_2}[AH_2](1 + [AH_2]/K_{IS}^{AH_2}) + K_m^{AH_2}[H_2O_2](1 + [H_2O_2]/K_{IS}^{H_2O_2}) + [H_2O_2][AH_2]} \quad (11)$$

At fixed inhibitory values of the  $AH_2$  concentration, the  $v$  vs.  $[H_2O_2]$  data were fitted to the following rate equation of competitive inhibition:

$$v = \frac{V_{max}[H_2O_2]}{K_m^{H_2O_2}(1 + ([AH_2]/K_{IS}^{AH_2})) + [H_2O_2]} \quad (12)$$

The reciprocal plots of  $1/v$  vs.  $1/[H_2O_2]$  at fixed  $[AH_2]$  should be linear and should intersect on the y axis. This graphical behaviour can be seen at fixed guaiacol inhibitory concentrations in Fig. 6. For the other substrates studied, a similar degree of substrate competitive inhibition was found (data not shown).

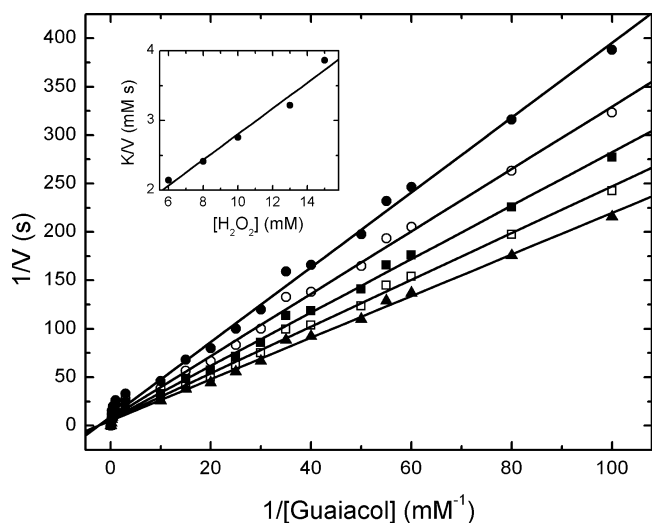
For the competitive inhibition, the  $V$  and  $K$  of Eq. (2) are defined by Eq. (3) ( $V$ ) and by:

$$K = \frac{K_m^{H_2O_2}(1 + ([AH_2]/K_{IS}^{AH_2}))}{1 + (K_m^{AH_2}/[AH_2])} \quad (13)$$

Therefore, the plots of  $K/V$  vs.  $[AH_2]$  should be linear (see inset in Fig. 6) because:

$$\frac{K}{V} = \frac{K_m^{H_2O_2}}{V_{max}} + \frac{K_m^{H_2O_2}[AH_2]}{K_{IS}^{AH_2}V_{max}} \quad (14)$$

Alternatively, at fixed inhibitory values of the  $H_2O_2$  concentration, the  $v$  vs.  $[AH_2]$  data analysis provided a series of equations similar to Eqs. (12)–(14). Accordingly, the corresponding plots of  $1/v$  vs.  $1/[AH_2]$  at fixed  $[H_2O_2]$  are also linear and intersect on the y axis, and the plots of  $K/V$  vs.  $[H_2O_2]$  should also be linear. This graphic behaviour was obtained for guaiacol at fixed  $[H_2O_2]$  (see Fig. 7) and also for the rest of the substrates studied (data not shown).



**Fig. 7.** Primary double-reciprocal plot of the initial rate of guaiacol oxidation as a function of the guaiacol concentration at fixed hydrogen peroxide inhibitory concentrations (6 mM (▲), 8 mM (□), 10 mM (■), 13 mM (○), 15 mM (●)). The insert shows the secondary plot of  $K/V$  vs. the  $H_2O_2$  concentration. See text for other experimental conditions.

**Table 3**  
Competitive substrate inhibition parameters.

Substrate	$K_i^{H_2O_2}$ mM	$K_i^{AH_2}$ mM
Guaiacol	$5.3 \pm 0.5$	$7.6 \pm 0.7$
ABTS	$1.1 \pm 0.4$	$0.005 \pm 0.002$
Ferulic acid	$1.9 \pm 0.1$	$7.6 \pm 1.0$
o-Dianisidine	$0.86 \pm 0.08$	$0.06 \pm 0.02$
o-Phenylenediamine	$0.80 \pm 0.04$	$0.0021 \pm 0.0003$
Catechol	$2.7 \pm 0.4$	$1.9 \pm 0.6$

The shape of the graphs drawn with the experimental points again suggested that the same kinetic mechanism was operating; *i.e.*, the Ping-Pong Bi-Bi mechanism with competition between the substrates and inhibition by guaiacol. Curve-fitting with the theoretical kinetics function provided the corresponding values for the kinetic constants.

Consequently, competitive substrate inhibition was observed in the  $H_2O_2$ -assisted CMP-catalyzed oxidation reactions for both substrates, as expected for a Ping-Pong reaction mechanism. The corresponding inhibition constants obtained –  $K_{SI}^{H_2O_2}$  and  $K_{SI}^{AH_2}$  – for the substrates studied are shown in Table 3.

Thus, the combined initial rate and substrate inhibition results exclude an ordered or random sequential reaction mechanism, and are only consistent with the Ping-Pong Bi-Bi mechanism. Following the notation of Cleland [6,25] as the minimal kinetic model for  $H_2O_2$ -assisted CMP-catalyzed substrate oxidation reactions Ping-Pong reaction kinetics has also been observed for several other peroxidase-catalyzed oxidations mediated by EI. The results of initial rate studies of the hydrogen peroxide-supported oxidation of guaiacol by turnip peroxidase [31,32] and of the oxidation of ferrocyanide catalyzed by horseradish peroxidase [33,34] and yeast cytochrome *c* peroxidase [35] are consistent with a Ping-Pong mechanism. The initial rate kinetic studies of the oxidation of ferrocyanide by *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c* peroxidase yielded intersecting plots, which were initially interpreted as indicating a sequential reaction mechanism [36]. However, subsequent studies demonstrated that the intersecting plots arose from the formation of an inactive hydrogen peroxide–enzyme complex, and the

mechanism of the reaction was reinterpreted to be of the modified Ping-Pong type [37,38]. Recently, it has been found that royal palm tree peroxidase also exhibits a Ping-Pong Bi-Bi mechanism for the  $H_2O_2$ -assisted catalyzed oxidation reactions of o-dianisidine, o-phenylenediamine, ferulic acid, guaiacol and catechol [19].

## Acknowledgments

This work was partially supported by project SA052A10-2 – Universidad de Salamanca, funded by the Conserjería de Educación de la Junta de Castilla y León (Spain).

## References

- [1] W.G. van Doorn, S. Ketsa, *Postharvest Biol. Technol.* 95 (2014) 64–69.
- [2] H.B. Dunford, *Heme Peroxidases*, John Wiley, 1999.
- [3] S. Jiang, M.H. Penner, *Anal. Biochem.* 476 (2015) 20–25.
- [4] P.L. Thomas, *Curr. Opin. Biotechnol.* 4 (1993) 484–489.
- [5] T.L. Poulos, J. Kraut, in: N.O.K. Robinson (Ed.), *From Cytochromes to Cytochromes*, Academic Press, 1982, pp. 193–201.
- [6] T.L. Poulos, *Arch. Biochem. Biophys.* 500 (2010) 3–12.
- [7] Y. Watanabe, *JBC J. Biol. Inorg. Chem.* 6 (2001) 846–856.
- [8] R.A. Sheldon, *Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations*, Taylor & Francis, 1994.
- [9] J.N. Rodríguez-López, D.J. Lowe, J. Hernández-Ruiz, A.N.P. Hiner, F. García-Cánovas, R.N.F. Thorneley, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 11838–11847.
- [10] H.B. Dunford, *Peroxidases and Catalases: Biochemistry, Biophysics, Biotechnology and Physiology*, Wiley, 2010.
- [11] G. Ward, Y. Hadar, I. Bilkis, L. Konstantinovsky, C.G. Dosoretz, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 18734–18741.
- [12] W. Nam, H.J. Han, S. Oh, Y.J. Lee, M. Choi, S. Han, C. Kim, S.K. Woo, W. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 8677–8684.
- [13] R.E. Childs, R.W.G. Bardsley, *Biochem. J.* 145 (1975) 93–103.
- [14] J. Vlasits, C. Jakopitsch, M. Bernroither, M. Zamocky, P.G. Furtmüller, C. Obinger, *Arch. Biochem. Biophys.* 500 (2010) 74–81.
- [15] N. Pozdnyakova, O. Makarov, M. Chernyshova, O. Turkovskaya, A. Jarosz-Wilkolazka, *Enzyme Microb. Technol.* 52 (2013) 44–53.
- [16] P. Pérez Galende, T. Manzano Muñoz, M.G. Roig, D.M. García, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2377–2385.
- [17] N. Hidalgo Cuadrado, G. Mangiameli, T. Manzano, G. Zhadan, J. Kennedy, V. Shnyrov, M. Roig, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16 (2011) 821–829.
- [18] P. Perez Galende, N. Hidalgo Cuadrado, J.B. Arellano, F. Gavilanes, E.Y. Kostetsky, G.G. Zhadan, E. Villar, M.G. Roig, J.F. Kennedy, V.L. Shnyrov, *Int. J. Biol. Macromol.* 72 (2015) 718–723.
- [19] L.S. Zamorano, N. Hidalgo Cuadrado, P. Galende, M.G. Roig, V.L. Shnyrov, *J. Biophys. Chem.* 3 (2012) 16–28.
- [20] N. Hidalgo Cuadrado, J.B. Arellano, J.J. Calvete, L. Sanz, G.G. Zhadan, I. Polikarpov, S. Bursakov, M.G. Roig, V.L. Shnyrov, *J. Mol. Catal. B* 74 (2012) 103–108.
- [21] N. Hidalgo Cuadrado, G.G. Zhadan, M.G. Roig, V.L. Shnyrov, *Int. J. Biol. Macromol.* 49 (2011) 1078–1082.
- [22] L.S. Zamorano, S.B. Vilarmau, J.B. Arellano, G.G. Zhadan, N.H. Cuadrado, S.A. Bursakov, M.G. Roig, V.L. Shnyrov, *Int. J. Biol. Macromol.* 44 (2009) 326–332.
- [23] A. Bernardes, L.C. Textor, J.C. Santos, N.H. Cuadrado, E.Y. Kostetsky, M.G. Roig, V.N. Bavro, J.R.C. Muniz, V.L. Shnyrov, I. Polikarpov, *Biochimie* 111 (2015) 58–69.
- [24] M. Morales, A. Ros Barceló, *Phytochemistry* 45 (1997) 229–232.
- [25] W.W. Cleland, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Spec. Sect. Enzymol. Subj.* 67 (1963) 188–196.
- [26] I.Y. Sakharov, I.V. Sakharova, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Proteins Proteom.* 1598 (2002) 108–114.
- [27] C.B. Rasmussen, M. Bakovic, K.G. Welinder, H.B. Dunford, *FEBS Lett.* 321 (1993) 102–105.
- [28] T.M. Hamilton, A. Dobie-Galuska, S.M. Wietstock, *J. Chem. Educ.* 76 (1999) 642.
- [29] A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Butterworths, 1979.
- [30] A.N.P. Hiner, L. Sidrach, S. Chazarra, R. Varón, J. Tudela, F. García-Cánovas, J.N. Rodríguez-López, *Biochimie* 86 (2004) 667–676.
- [31] I. Yamazaki, H. Souzu, *Arch. Biochem. Biophys.* 86 (1960) 294–301.
- [32] S.M. Reza, Z.A. Reza, *Clin. Biochem.* 44 (2011) S198.
- [33] M. Santimone, *Biochimie* 57 (1975) 265–270.
- [34] M. Santimone, *Biochimie* 57 (1975) 91–96.
- [35] J.K. Yandell, T. Yonetani, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Protein Struct. Mol. Enzymol.* 748 (1983) 263–270.
- [36] N. Ellfolk, M. Rönnberg, R. Aasa, L. Andréasson, T. Vänngård, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Protein Struct. Mol. Enzymol.* 784 (1984) 62–67.
- [37] M. Rönnberg, T. Araiso, N. Ellfolk, H.B. Dunford, *Arch. Biochem. Biophys.* 207 (1981) 197–204.
- [38] M. Rönnberg, N. Kalkinen, N. Ellfolk, *FEBS Lett.* 250 (1989) 175–178.







## Mechanism-based suicide inactivation of white Spanish broom (*Cytisus multiflorus*) peroxidase by excess hydrogen peroxide

Patricia Pérez Galende<sup>a</sup>, Nazaret Hidalgo Cuadrado<sup>b,\*</sup>, Eduard Ya Kostetsky<sup>c</sup>, Manuel G. Roig<sup>a,d,\*\*</sup>, John F. Kennedy<sup>e</sup>, Valery L. Shnyrov<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Agua (CIDTA), Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Estudios Biofuncionales, Departamento de Química-Física II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology, Far Eastern Federal University, 690600 Vladivostok, Russia

<sup>d</sup> Departamento de Química Física, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

<sup>e</sup> Chembiotech Laboratories, Kyrewood House, Tenbury Wells, Worshestershire WR15 8SG, UK

<sup>f</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 February 2015

Received in revised form

16 September 2015

Accepted 18 September 2015

Available online 25 September 2015

#### Keywords:

*Cytisus multiflorus* peroxidase

Hydrogen peroxide

Haem peroxidase

Suicide substrate

Mechanism-based inactivation

Suicide inactivation

### ABSTRACT

Suicide inactivation is a common mechanism observed for haem peroxidases, in which the enzyme is inactivated as a result of self-oxidation mediated by intermediate highly oxidizing enzyme forms during the catalytic cycle. The time-dependence and the inactivation mechanism of *Cytisus multiflorus* peroxidase (CMP) by hydrogen peroxide were studied kinetically with four co-substrates (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), ferulic acid, guaiacol and *o*-dianisidine). Catalytic activity decreased following the sequence ABTS > guaiacol > ferulic acid > *o*-dianisidine. Once the intermediate complex (compound III-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) had been formed, competition was established between the catalytic pathway and the suicide inactivation pathway. One mole of CMP afforded around 3790 turnovers of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for ABTS before its complete inactivation. These results suggest that CMP follows a suicide mechanism, the enzyme not being protected in this case. The mechanism of suicide inactivation is discussed with a view to establishing a broad knowledge base for future rational protein engineering.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Plants are aerobic organisms and thus utilize oxygen as a terminal electron acceptor. Class III plant peroxidases can generate, in a controlled manner, highly reactive oxygen species (ROS), such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroxyl radical (\*OH), which may act as active molecules during the oxidative burst, hypersensitive responses or cell elongation. Alternatively, these ROS can act as a part of signal transduction pathways during several physiological processes [1]. Oxygen reduction initially produces superoxide and/or

hydroperoxide radicals, whose oxidizing powers are potentially dangerous. Superoxide can inactivate metabolic enzymes containing Fe-S clusters and hydroperoxide is mainly found in acidic cellular environments. The production of superoxide and hydroperoxide is followed by that of hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide can inactivate enzymes by oxidizing their thiol groups. The destructive properties of superoxide and hydrogen peroxide are further increased when they interact in the presence of metal ions to form the highly reactive hydroxyl radical.

Class III peroxidases can also contribute to maintaining low levels of hydrogen peroxide. These enzymes are metalloproteins and contain a haem centre (Fe porphyrin IX), which defines them as haem peroxidases. Haem peroxidases are enzymes that catalyze the oxidation of a variety of substrates, including phenols, aromatic amines, thioanisoles and halide and thiocyanate ions, by means of the reduction of hydrogen peroxide. Regarding reducing substrates, selectivity depends on the type of peroxidase. The rate and efficiency of peroxidase-catalyzed reaction are affected by progressive inactivation of the enzyme by the substrate, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. All haem proteins, including peroxidases, are inactivated in the presence of catalytic concentrations of hydrogen peroxide. The architectural

**Abbreviations:** CMP, *Cytisus multiflorus* peroxidase; ROS, reactive oxygen species; S<sub>0</sub>, suicide substrate; E<sub>0</sub>, enzyme under study; P<sub>∞</sub>, concentration of product obtained at the end of the reaction; k<sub>obs</sub>, observed inactivation rate constant; k<sub>inac</sub><sup>app</sup>, apparent inactivation rate constant; K<sub>i</sub><sup>app</sup>, apparent enzyme/inhibitor-complex dissociation constant; r, turnover number; k<sub>cat</sub><sup>app</sup>, catalytic rate constant.

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author at: Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Agua (CIDTA), Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain.

E-mail addresses: [nazahidalgo@gmail.com](mailto:nazahidalgo@gmail.com) (N.H. Cuadrado), [mgr@usal.es](mailto:mgr@usal.es) (M.G. Roig).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.033>

0141-8130/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

sequestration of the prosthetic haem group protects it from externally generated reactive species (radicals), but not from reactive species generated during the course of its oxidative metabolism of certain compounds. Such species may modify the haem and/or protein moiety, or even cause the haem to modify the protein irreversibly within the active site, in a process termed mechanism-based inactivation or “suicide inactivation” [2].

The mechanism of function of haem peroxidases is a catalytic network that acts via the establishment of a sixth coordination bond between hydrogen peroxide and the haem iron and yields compound I (oxo-iron (IV) porphyrin-based  $\pi$ -cation radical). From this oxidizing intermediate, another two are formed: compound II (oxo-iron (IV) porphyrin), which has a sufficiently high redox potential to oxidize the nearby haem group, and compound III (peroxoiron (III) porphyrin), which is a non-catalytic intermediate and has also been related to the self-inactivation of haem peroxidases and haem-proteins, generating disruption of the haem group and/or promoting the formation of protein-based free radicals [3,4].

The  $H_2O_2$ -mediated inactivation of peroxidases is a mechanism-based process: once they have been activated by  $H_2O_2$ , highly oxidizing intermediates are generated, two and one electron above the resting state, which must be reduced in order to return to the ground state of the enzyme.

The molecular mechanism underlying the  $H_2O_2$ -mediated inactivation of peroxidases is extraordinarily complex due to the multitude of reactions that can occur subsequently to the reaction of the haem iron with the hydroperoxide. Despite the peculiarities of different haem-proteins, a common inactivation mechanism comprising several stages has been proposed [4]. The reaction occurs in three distinct steps [5,6]. First, the native ferric enzyme reacts with the oxidizing substrate,  $H_2O_2$  or another hydroperoxide, ROOH, to yield compound III. For some time now, this latter phenomenon has been the object of our research: we have focused on it as an example of mechanism-based enzyme suicide inactivation.

Peroxidases are important in biotechnological applications used in industrial, analytical and biomedical processes such as the treatment of wastewaters containing phenolic compounds [7], as catalysts for organic synthesis [8], and in chemiluminescence and immuno-bioassays [9–11]. Suicide inactivation of peroxidases limits the potential use of these enzymes in industrial scale processes.

In the present work, the time-dependence and inactivation mechanism of CMP [12] by hydrogen peroxide were studied kinetically with different co-substrates.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Analytical grade polyethyleneglycol (PEG), guaiacol (2-methoxyphenol), ammonium sulphate, sodium phosphate and sodium chloride were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and were used without further purification.  $H_2O_2$  was from Panreac Quimica S.L.U. (Barcelona, Spain). Superdex-75, 200 and HiTrap<sup>TM</sup> SP HP columns and Phenyl-Sepharose CL-4B were from GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden). Toyopearl DEAE-650M was purchased from the Tosoh Corporation (Tokyo, Japan). Cellulose membrane tubing for dialysis (avg. flat width 3.0 in.) was purchased from Sigma Chemical Co.; Slide-A-Lyzer dialysis cassettes (extra-strength, 3–12 mL capacity, 10,000 MWCO) were from Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA), and centrifuge filter devices (Amicon Ultra Cellulose, 10,000 MWCO, 15 mL capacity) were from Millipore Corp. (Billerica, MA, USA). All other reagents were of the highest purity available. The water used for preparing the solutions

was double-distilled and then subjected to a de-ionisation process.

### 2.2. Enzyme production

White Spanish broom (*Cytisus multiflorus*), an endemic and very abundant plant found on the Iberian Peninsula, was collected in the area of the Almendra dam (Salamanca, Spain). Stems (2000 g) were milled and homogenized in 10 L of 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 with 0.25 M NaCl for 8 h at room temperature. The excess material was removed by vacuum filtration and centrifugation ( $10,000 \times g$ , 277 K for 40 min). Pigments were extracted by phase separation along 8 h at 277 K after the addition of solid PEG 10,000 at 17% (w/v) and sodium ammonium sulphate at 12% (w/v) to the supernatant. Over time, two phases were formed: an upper polymer phase (dark brown), which contained pigments, phenols, polyphenols, oxidized phenols and PEG, and a lower aqueous phase (yellow), containing peroxidase. These phases were separated and the phase containing peroxidase activity was centrifuged. The clear supernatant containing peroxidase activity was titrated with ammonium sulphate to a conductivity value of  $232 \text{ mS cm}^{-1}$  and was applied on a Phenyl-Sepharose column ( $1.5 \text{ cm} \times 35 \text{ cm}$ ) equilibrated with 100 mM phosphate buffer, pH 7.0, with 1.7 M ammonium sulphate, which has the same conductivity as the sample. The enzyme was eluted with 100 mM phosphate buffer, pH 7.0, plus 0.2 M ammonium sulphate at a flow rate  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . The fractions showing peroxidase activity were dialyzed against 5 mM sodium acetate–acetic acid buffer, pH 5, for 7 h, with constant stirring at 277 K. These fractions were membrane-concentrated (Millipore Centricon, 30,000 NMWL) to 15 mL and applied on a TSK-Gel DEAE-5PW column ( $1 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$ ) equilibrated with 5 mM sodium acetate–acetic acid buffer, pH 5. The fraction with peroxidase activity was not retained in the column. It was collected and dialyzed against 5 mM sodium acetate–acetic acid buffer, pH 5, overnight. After dialysis, the fractions were membrane-concentrated (Millipore Centricon, 30,000 NMWL) and applied on a HiTrap<sup>TM</sup> SP HP 1 mL column (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) equilibrated with 5 mM sodium acetate–acetic acid buffer, pH 5. Elution was carried out with a 25% solution of 5 mM acetate–acetic with 1 M NaCl, pH 5, at a flow rate of  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Fractions with peroxidase activity were collected and dialyzed again against 5 mM sodium acetate–acetic acid buffer, pH 5, overnight; they were then membrane-concentrated (Millipore Centricon, 30,000 NMWL) and applied on a Superdex-200 column equilibrated with 5 mM phosphate buffer, pH 5. Elution was carried out with 150 mM NaCl in the same buffer at a flow rate of  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$ . The purity of the CMP was determined by high-performance gel filtration and SDS-PAGE [12].

### 2.3. Enzymatic activity of CMP

Peroxidase activity towards guaiacol was measured spectrophotometrically at 25 °C. An aliquot of enzyme solution was added to a 1-cm optical path-length spectral cuvette containing 18 mM guaiacol and 4.9 mM  $H_2O_2$  in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, in a final volume of 2 mL. The rate of absorbance change due to substrate oxidation was monitored at 470 nm. Peroxidase activities were calculated using a molar absorption coefficient of  $5200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 470 nm for the guaiacol oxidation product [12,13].

### 2.4. Suicide substrate studies for CMP inactivation kinetics

The inactivation studies for CMP were carried at 25 °C in 10 mM incubations of universal buffer, pH 7.0, for each substrate except ABTS, whose pH was 3.0. The amount of CMP enzyme was 130 nM for each of these experiments. The reason for studying the

**Table 1**  
Experimental parameters used in the inactivation study for the different substrates.

	pH	Range [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (mM)	λ (nm)	[S] (mM)
ABTS	3.0	0–2.6	414	0.8
Guaiacol	7.0	0–13	470	18
Ferulic acid	7.0	0–13	318	1.5
<i>o</i> -Dianisidine	7.0	0–13	420	3.0

inactivation at these pH values was that other plant peroxidases have been characterized at these pH values, such that comparisons can be made. The reactions were performed under the same conditions as in a previous work [14]. Residual activity was defined as the ratio  $A_t/A_0$ , where  $A_t$  is the total activity of the aliquot of CMP incubated with different concentrations of hydrogen peroxide, and  $A_0$  is the activity of the enzyme without incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The parameters of the substrates used in the inactivation assays are shown in Table 1. The residual peroxidase activity of all the substrates was assayed after 24 h.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Partition ratio for the inactivation of CMP by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

The addition of excess substrates would preclude suicide inactivation by competing with hydrogen peroxide for compound II. Once formed, compound III could follow the decomposition pathway. One mechanism proposed for this inactivation suggests the coexistence of two competitive routes for compound III: one catalytic and the other for obtaining the inactive enzyme.

This mechanism was studied kinetically bearing in mind the following [15]:

- $[S_0] \gg [E_0]$  and  $[P_\infty] \ll [S_0]$ . This implies that the rate of the reaction catalyzed by the first enzyme, at any reaction time,  $v_t$ , must be independent of changes in the substrate concentration.
- The partition ratio  $r = k_{\text{cat}}^{\text{app}}/k_{\text{inact}}^{\text{app}} \gg 1$ . This case implies the attainment of an instantaneous steady-state restricted to the catalytic route and that the final accumulation of product will depend on an overall transient phase, including previous processes.
- The kinetics of coupling enzymes may develop under first-order conditions with the use of appropriate enzyme concentrations.

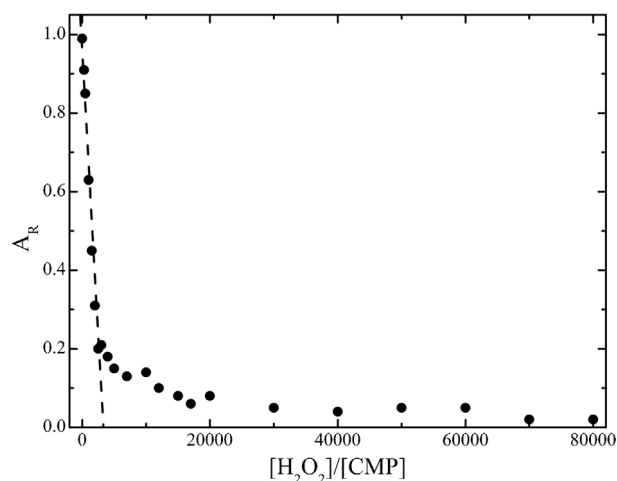
It was found that the representation of residual peroxidase activity vs.  $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{CMP}]$  was not always linear (Fig. 1). In this case,  $A_R$  vs.  $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{CMP}]$  showed a linear trend up to 20% of the residual peroxidase activity. This value is in agreement with other monomeric peroxidases, such as horseradish peroxidase [16].

The turnover number  $r$  suggests the amount of inhibitor (hydrogen peroxide) that will be necessary for 100% inactivation of the enzyme. To calculate the turnover number, the following equation was used:

$$A_R = \frac{A_t}{A_0} = 1 - \frac{1}{1+r} \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]}{[\text{CMP}]}$$

where  $A_R$  is the residual activity,  $A_t$  and  $A_0$  are the activities at time ( $t$ ) (end of the reaction) and zero, respectively,  $r$  is the partitioning ratio (number of catalytic cycles given by enzymes before their inactivation), and  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  and  $[\text{CMP}]$  are the initial concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and enzyme.

Fig. 1 shows the plots of the percent residual activity against the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/CMP ratio for the guaiacol substrate, which are representative of the results obtained for different substrates. Taking into account the consumption of two moles of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in each catalytic cycle (one mole for the formation of compound III and another for



**Fig. 1.** Sensitivity to inactivation of CMP at different molar ratios of  $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{CMP}]$ . CMP was incubated at 25 °C with molar excesses of hydrogen peroxide in universal buffer (10 mM, pH 7.0 or 3.0). When the reaction was complete (24 h incubation), the percentages of peroxidase residual activity were measured with guaiacol as co-substrate.

inactivation or catalysis), the  $r$  values calculated from these plots are given in Table 2. The inactivation of each of the enzymes by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a range of different concentrations was also followed over time (the results for guaiacol that were representative of those obtained for each substrate are shown in Fig. 2).

On comparing CMP with palm tree peroxidases [14,17], it can be observed that there is a similar number of molecules for inactivation that is higher than those obtained for most peroxidases studied, such as horseradish peroxidase (HRP) [18] or ascorbate peroxidase (APX) [16]. This high number of the partition ratio indicates that CMP exhibits good performance against inactivation by hydrogen peroxide, and hence it can be proposed as a potential candidate for a large number of biotechnological applications.

#### 3.2. Kinetics of inactivation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

The inactivation of CMP by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a range of different concentrations was also followed over time (as an example, the results for guaiacol are shown in Fig. 2).

The natural logarithm plot of the percent residual activities ( $\ln A_R$ ) against time afforded straight lines (Fig. 3), with slopes equivalent to the observed inactivation rate constant ( $k_{\text{obs}}$ ).

$$\ln \frac{[A_t]}{[A_0]} = -k_{\text{obs}}t$$

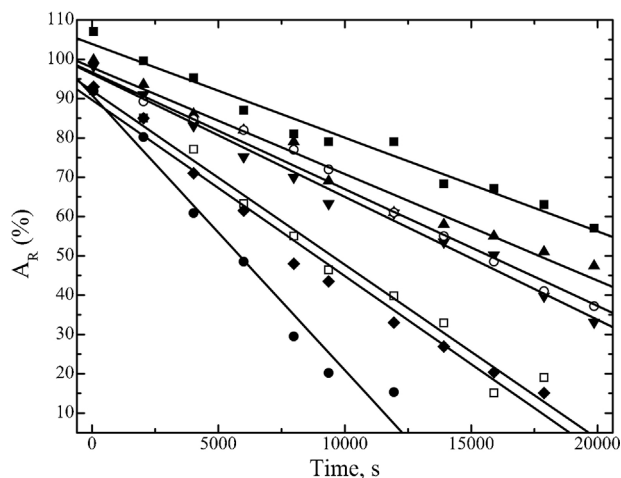
The saturation kinetics of CMP inactivation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is shown in Fig. 4, where it is possible to observe the hyperbolic curves fitted to the plot of  $k_{\text{obs}}$  against  $[\text{H}_2\text{O}_2]$ . CMP inactivation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with different substrates exhibited single-phase kinetics, similar to those shown by *Chamaerops excelsa* peroxidase (CEP) [14] but different to the biphasic behaviour shown by royal palm tree peroxidase (RPTP) [17] or HRP [16,19,20]. Clear evidence that the inactivation process involved saturation kinetics was the observed hyperbolic nature of the plots of  $k_{\text{obs}}$  against the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration. From these data, the observed first-order inactivation rate constants ( $k_{\text{obs}}$ ) can be calculated using the equation:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}}^{\text{app}} [\text{H}_2\text{O}_2]}{K_1^{\text{app}} + [\text{H}_2\text{O}_2]}$$

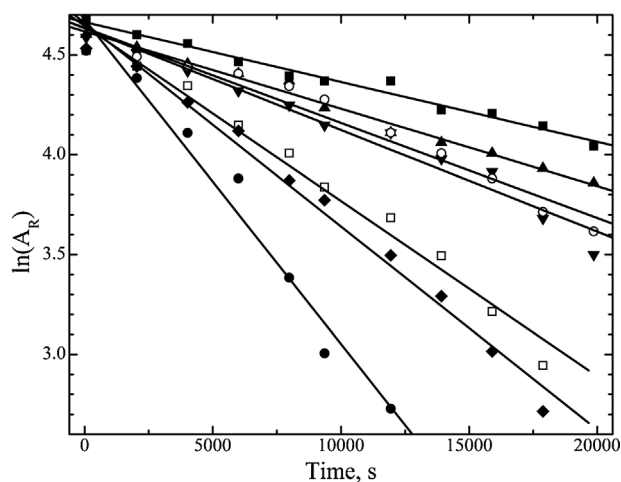
where the  $k_{\text{obs}}$  (the first-order inactivation rate constant) [14] values are obtained from the component in a fitting of the data by a

**Table 2**  
Apparent kinetic constants calculated for the inactivation of CMP variants by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; *r*, turnover number;  $k_{\text{inac}}^{\text{app}}$ , inactivation constant;  $K_1^{\text{app}}$ , dissociation constant of the [compound III–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] complex;  $1/K_1^{\text{app}}$ , affinity constant of CMP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;  $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ , catalytic rate constant;  $k_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_1^{\text{app}}$ , efficiency of catalysis;  $k_{\text{inac}}^{\text{app}}/K_1^{\text{app}}$ , efficiency of inactivation.

	<i>r</i>	$k_{\text{inac}}^{\text{app}}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_1^{\text{app}}$ (mM)	$1/K_1^{\text{app}}$ (M <sup>-1</sup> )	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_1^{\text{app}}$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$k_{\text{inac}}^{\text{app}}/K_1^{\text{app}}$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
ABTS	3790	$1.54 \times 10^{-4}$	36	$6.51 \times 10^{-3}$	$58 \times 10^{-2}$	$3.78 \times 10^{-3}$	$10 \times 10^{-7}$
Ferulic acid	1610	$1.48 \times 10^{-4}$	34	$6.77 \times 10^{-3}$	$24 \times 10^{-2}$	$1.62 \times 10^{-3}$	$10 \times 10^{-7}$
Guaiacol	3000	$1.11 \times 10^{-4}$	18	$9.02 \times 10^{-3}$	$33 \times 10^{-2}$	$2.98 \times 10^{-3}$	$10 \times 10^{-7}$
<i>o</i> -Dianisidine	980	$1.40 \times 10^{-4}$	51	$7.17 \times 10^{-3}$	$14 \times 10^{-2}$	$1.00 \times 10^{-3}$	$10 \times 10^{-7}$



**Fig. 2.** Time-dependence and inactivation kinetics of CMP by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. CMP (130 nM) was incubated at 25 °C, pH 7.0, with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations of (■) 14 mM, (▲) 10 mM, (▼) 15 mM, (○) 50 mM, (□) 100 mM, (◆) 150 mM, (●) 300 mM. Residual peroxidase activity was measured with guaiacol as co-substrate.

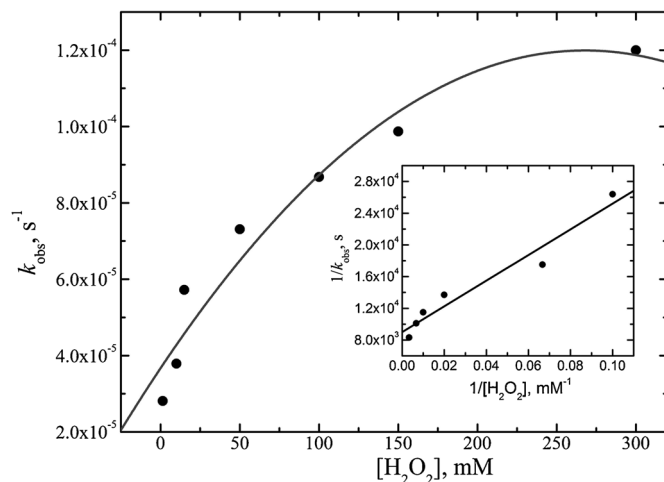


**Fig. 3.** Least-squares linearized plots of the percentage of remaining activity vs. time data for selected concentrations: [CMP] = 130 nM at 25 °C, pH 7.0. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]: (■) 14 mM, (▲) 10 mM, (▼) 15 mM, (○) 50 mM, (□) 100 mM, (◆) 150 mM, (●) 300 mM. Residual peroxidase activity was measured with guaiacol as co-substrate.

linear regression model;  $k_{\text{inac}}^{\text{app}}$  is the inhibitor-binding constant, and  $K_1^{\text{app}}$  is the inhibition-binding constant.

Double-reciprocal plots of rate vs. inhibitor concentration curves are often used as tools to examine the formation of complexes between inhibitors and enzymes. The apparent kinetic constants calculated for the different forms of the enzyme CMP are shown in Table 2.

In the absence of reducing substrates and at high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, CMP is inactivated in a time- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration-dependent process, exhibiting suicide substrate mechanism-based



**Fig. 4.** Kinetic curve of inactivation. Direct and double reciprocal plot (insert) of  $k_{\text{obs}}$  (first-order inactivation rate constant) against the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration.

inactivation kinetics. According to other authors [16,17,19,21], similar behaviour has been observed in studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated inactivation under identical experimental conditions of temperature, pH and enzyme and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations.

The proposed inactivation mechanism for CMP (Fig. 5, Table 2) involves the cooperation of two pathways: one reversible and other irreversible, which may or may not act independently of each other. Its individual contribution to the overall inactivation mechanism appears to depend on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration. A second molecule of hydrogen peroxide would be required for enzyme inactivation, not for inactivation itself but for the formation of compound III. Once compound III has been formed, a fraction of that population would be converted into a non-active species. Given the vicinity of the peroxy radical of compound III bound to the porphyrin ring, it is reasonable to suspect that, once formed, this reactive species would potentially reach the tetrapyrrole structure and oxidize the porphyrin moiety. This speculation is supported by the existence of an inactive species, different from but related to compound III, characterized by haem bleaching, which was observed after the treatment.

As in previous studies [14,17], in this work the existence of a partitioning between the two pathways for compound III is proposed. Our model, based on studies at high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, envisages a further partitioning between these two inactivation pathways and suggests the existence of a catalytic reaction in which H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is consumed with relatively little harm to the enzyme (Fig. 5). This kinetic model does offer a reasonable approximation suitable for comparative purposes, as required here. Double-reciprocal plots of the inhibition rate against inhibitor concentration have often been used to examine the formation of complexes between enzymes and inhibitors. We used linear least-squares fits to the data (Fig. 3) to determine the relationship between the different enzymes and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. For each enzyme variant, we obtained the apparent values of the inactivation rate constant ( $k_{\text{inac}}^{\text{app}}$ ) and the dissociation

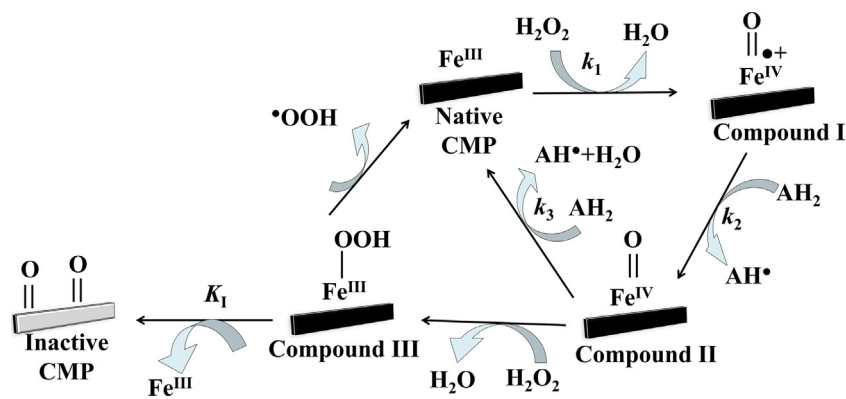


Fig. 5. Proposed pathway for the suicide inactivation mechanism of CMP.

constant ( $K_1^{\text{app}}$ ) of the enzyme/inhibitor-complex, together with the turnover numbers  $r$  above, and the values of the catalytic constant ( $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ ), using the following relationship:

$$r = \frac{k_{\text{cat}}^{\text{app}}}{k_{\text{inact}}^{\text{app}}}$$

The results obtained for the apparent catalytic constant are given in Table 2, where it can be seen that the highest values correspond to ABTS, followed by guaiacol, ferulic acid and *o*-dianisidine.

The accessibility of the substrate towards the reducing binding site in the haem pocket and its affinity for the product are important for enzyme activity, as was observed with ABTS.

The dissociation and affinity constants for CMP are lower than other class III peroxidases studied previously [22], which suggests that this enzyme could be considered a good candidate for future use in different biotechnological applications.

#### 4. Conclusion

The inactivation kinetic mechanism of CMP in the oxidation of different substrates (ABTS, ferulic acid, guaiacol and *o*-dianisidine) by hydrogen peroxide shows suicide substrate inactivation behaviour similar to most classical peroxidases [14,16,17,19,23–25].

The kinetic model used in these experiments yielded satisfactory parameters for inactivation kinetics mediated by  $\text{H}_2\text{O}_2$ , revealing the capacity of the enzyme to act on the different substrates studied at different pHs. Two electrons are required for peroxide reduction: one comes from Fe(III) while the other comes from porphyrin, producing a porphyrin  $\pi$ -radical cation. One-electron reduction of compound (I) gives compound (II), in which the Fe(IV)=O species remains intact and porphyrin is reduced.

For the substrate ABTS at pH 3.0, a value at which most enzymes are not able to function, CMP performs a turnover of molecules up to 3790 and exhibits an apparent catalytic rate constant of  $0.58 \text{ s}^{-1}$ . For the other substrates, ferulic acid, guaiacol and *o*-dianisidine, at pH 7.0, turnover numbers only reached 1610, 3000, 980, with apparent catalytic constants of  $0.24 \text{ s}^{-1}$ ,  $0.33 \text{ s}^{-1}$ ,  $0.14 \text{ s}^{-1}$ , respectively. These values indicate that CMP exhibits good performance against inactivation by hydrogen peroxide and that it could be used in a broad range of applications.

#### Acknowledgments

This work was partially supported by projects SA-06-00-0 ITACYL-Universidad de Salamanca and SA 129A07 and

SA052A10-2, funded by the Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León and the Conserjería de Educación de la Junta de Castilla y León (Spain), respectively.

#### References

- [1] C. Mathé, A. Barre, C. Jourda, C. Dunand, Arch. Biochem. Biophys. 500 (2010) 58–65.
- [2] K. He, L.M. Bornheim, A.M. Falick, D. Maltby, H. Yin, M.A. Correia, Biochemistry 37 (1998) 17448–17457.
- [3] A. Vidal-Limón, S. Águila, M. Ayala, C.V. Batista, R. Vazquez-Duhalt, J. Inorg. Biochem. 122 (2013) 18–26.
- [4] B. Valderrama, M. Ayala, R. Vazquez-Duhalt, Chem. Biol. 9 (2002) 555–565.
- [5] H.B. Dunford, Peroxidases and Catalases: Biochemistry, Biophysics, Biotechnology and Physiology, Wiley, 2010.
- [6] H.B. Dunford, Heme Peroxidases, John Wiley, 1999.
- [7] N. Hidalgo Cuadrado, G. Mangiameli, T. Manzano, G. Zhadan, J. Kennedy, V.L. Shnyrov, M.G. Roig, Biotechnol. Bioprocess Eng. 16 (2011) 821–829.
- [8] J.A. Akkara, K.J. Senecal, D.L. Kaplan, J. Polym. Sci. A Polym. Chem. 29 (1991) 1561–1574.
- [9] J.E. Butler, Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay, Taylor & Francis, 1991.
- [10] D.M. Kemeny, S.J. Challacombe, ELISA and Other Solid Phase Immunoassays: Theoretical and Practical Aspects, Wiley, 1988.
- [11] P. Pérez Galende, T. Manzano Muñoz, M.G. Roig, D.M. García, Anal. Bioanal. Chem. 404 (2012) 2377–2385.
- [12] P. Pérez Galende, N. Hidalgo Cuadrado, J.B. Arellano, F. Gavilanes, E.Y. Kostetsky, G.G. Zhadan, E. Villar, M.G. Roig, J.F. Kennedy, V.L. Shnyrov, Int. J. Biol. Macromol. 72 (2015) 718–723.
- [13] L.S. Zamorano, S.B. Vilarmau, J.B. Arellano, G.G. Zhadan, N.H. Cuadrado, S.A. Bursakov, M.G. Roig, V.L. Shnyrov, Int. J. Biol. Macromol. 44 (2009) 326–332.
- [14] N. Hidalgo Cuadrado, G.G. Zhadan, M.G. Roig, V.L. Shnyrov, Int. J. Biol. Macromol. 49 (2011) 1078–1082.
- [15] J. Escribano, J. Tudela, F. García-Carmona, F. García-Canovas, Biochem. J. 262 (1989) 597–603.
- [16] A.N. Hiner, J.N. Rodríguez-López, M.B. Arnao, E.L. Raven, F. García-Cánovas, M. Acosta, Biochem. J. 348 (2000) 321–328.
- [17] L.S. Zamorano, N. Hidalgo Cuadrado, P. Galende, M.G. Roig, V.L. Shnyrov, J. Biophys. Chem. 3 (2012) 16–28.
- [18] A.N.P. Hiner, J. Hernández-Ruiz, F. García-Cánovas, A.T. Smith, M.B. Arnao, M. Acosta, Eur. J. Biochem. 234 (1995) 506–512.
- [19] M.B. Arnao, M. Acosta, J.A. del Rio, R. Varón, F. García-Cánovas, Biochim. Biophys. Acta (BBA) Protein Struct. Mol. Enzymol. 1041 (1990) 43–47.
- [20] I.Y. Sakharov, I.V. Sakharova, Biochim. Biophys. Acta (BBA) Proteins Proteomics 1598 (2002) 108–114.
- [21] N. Hidalgo Cuadrado, J.B. Arellano, J.J. Calvete, L. Sanz, G.G. Zhadan, I. Polikarpov, S. Bursakov, M.G. Roig, V.L. Shnyrov, J. Mol. Catal. B 74 (2012) 103–108.
- [22] N. Hidalgo Cuadrado, J.B. Arellano, J.J. Calvete, L. Sanz, G.G. Zhadan, L.C. Textor, I. polikarpov, S. Bursakov, M.G. Roig, V.L. Shnyrov, Curr. Top. Biochem. Res. 13 (2011) 67–79.
- [23] J.N. Rodríguez-López, D.J. Lowe, J. Hernández-Ruiz, A.N.P. Hiner, F. García-Cánovas, R.N.F. Thorneley, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 11838–11847.
- [24] S.J. Kim, J.C. Joo, H.S. Kim, I. Kwon, B.K. Song, Y.J. Yoo, Y.H. Kim, Development of the radical-stable *Coprinus cinereus* peroxidase (CiP) by blocking the radical attack, J. Biotechnol. 189 (2014) 78–85.
- [25] R. Varón, F. García-Cánovas, M. García-Moreno, E. Valero, M. Molina-Alarcón, M.J. García-Meseguer, J.A. Vidal De Labra, C. Garrido Del Solo, J. Theor. Biol. 218 (2002) 355–374.