

JURADO CALIFICADOR

Dr. FEDERICO GONZALEZ VEINTIMILLA
Presidente

Dr. FELIX CASTILLO VIERA
Secretario

Dr. STEBAN ILICH ZERPA
Miembro

DEDICATORIA

*T*e doy gracias, Yahveh, de todo corazón,
cantaré todas tus maravillas;
quiero alegrarme y exultar en ti,
salmodiar a tu nombre, Altísimo.

*T*odo cuanto hagáis,
hacedlo de corazón, como para el Señor
y no para los hombres.

*E*sta tesis está dedicada a mi familia
Icela y Jorge Alfonso de Jesús,
tesoros que el Señor me ha regalado en la vida
motivos de mi constante superación.

A mis padres Alfonso y Rosa Isabel
con eterno amor e infinita gratitud.

AGRADECIMIENTO

A lo largo de estos años son muchas las personas que de una u otra manera han contribuido con la realización de esta tesis doctoral. Quisiera agradecer a todas ellas el apoyo, comprensión y ayuda que me han brindado.

*A la Universidad Nacional de Trujillo
y en especial al Departamento Académico de
Química Biológica y Fisiología Animal,
en las personas de mi Maestro y amigo Julio Arellano,
Steban Ilich asesor de ésta tesis,
Orlando Pretel Jefe de Departamento y
Carlos Nomberto, que de manera desinteresada
apoyaron siempre la ejecución y culminación de mi Tesis.*

*Seguramente se me olvida gente por nombrar,
solo les pido perdón y que sepan
que les agradezco infinitamente
el haber estado allí conmigo.*

ÍNDICE

Jurado Calificador	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento	iii
Índice.....	iv
Índice de Tablas.....	vi
Índice de Figuras	vii
Resumen	x
Abstract.....	x
I Introducció1	
II Bases Teórico-científico	6
2.1 Base conceptual de enzimas.....	6
2.2 Las Peroxidasas – Características generales.....	7
2.2.1 Ciclo catalítico	8
2.2.2 Clasificación de las Peroxidasas	9
2.2.2.1 Clase I: Peroxidasas de procedencia protistos.....	9
2.2.2.2 Clase II: Peroxidasas Peroxidasas fúngicas.....	10
2.2.2.3 Clase III: Peroxidasas de secreción en plantas.....	10
2.2.3 Características estructurales.....	10
2.2.4 Centro catalítico	12
2.2.5 Sitios de unión a sustratos	13
2.3 Fenol y compuestos fenólicos	14
2.4 El nabo	15
2.5 Aspectos generales sobre inmovilización de enzimas.....	17
2.5.1 Efectos de la inmovilización	18
2.5.1.1 Efectos en la estabilidad	18
a. <i>Una estabilización conformacional de la enzima.</i>	
b. <i>Una protección frente a las proteasas en el medio.</i>	
c. <i>Se evita la agregación intermolecular</i>	
d. <i>Existe una alteración del microentorno de la enzima.</i>	

2.5.1.2	Efectos en la actividad enzimática	20
	a. Efectos difusionales.	
	b. Efectos electrostáticos entre el sustrato y el soporte.	
	c. Impedimentos estéricos o de tamaño de sustrato.	
	d. Efectos en el microentorno.	
2.6	Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas	22
2.7	Justificación e importancia	23
2.8	Objetivos	26
III	Material y Métodos	27
3.1	Material de estudios	27
3.2	Método y Técnica	27
3.2.1	Obtención del extracto crudo de Peroxidasa de nabo.....	27
3.2.2	Medición de la actividad de Peroxidasa	27
3.2.3	Purificación de la Peroxidasa	28
3.2.4	Determinación de la concentración de proteínas	28
3.2.5	Cálculo de la actividad específica	29
3.2.6	Electroforesis en Gel de poliacrilamida	29
3.2.7	Especificidad de sustrato y determinación de constantes cinéticas.....	29
3.2.8	Efecto del pH.....	30
3.2.9	Efecto de la Temperatura.....	30
3.2.10	Estabilidad al calor	30
3.2.11	Inmovilización de la POD	30
3.2.12	Remoción de compuestos fenólicos.....	30
3.2.13	Análisis de datos	31
IV	Resultados	32
V	Discusión	49
VI	Propuesta	58
VII	Conclusiones	62
VIII	Referencias Bibliográficas	63
Anexos	68

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Actividad de la peroxidasa en raíces de algunas plantas tropicales.....	2
Tabla 2	Residuos de los lados distal y proximal del hemo de diferentes peroxidasa de la superfamilia de las peroxidases bacterianas, fúngicas y de plantas.....	12
Tabla 3	Peroxidasa de nabo (<i>Brassica napus L.</i>) relacionada con peso de muestra y concentración de proteínas.....	34
Tabla 4	Producción de acoplamiento y parámetros de rendimiento de inmovilización (EI, ENI y EPPI) de la Peroxidasa (POD) de <i>Brassica napus</i> "nabo" en coronta de maíz, según esquema de inmovilización propuesto por Arellano, 1993.....	47
Tabla 5	Porcentaje de remoción de fenol por la Peroxidasa (POD) de <i>Brassica napus L.</i> "nabo" soluble e inmovilizada en coronta de maíz.....	48
Tabla 6	Estructura, Grupos funcionales y presencia de aminoácidos que pueden intervenir en los diferentes procesos de inmovilización.....	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Hemo tipo b con el hierro ligado a los nitrógenos de los cuatro pirroles (A) Y diferentes estados de coordinación del hierro (B).....	7
Figura 2	Ciclo catalítico de las peroxidasa.....	8
Figura 3	Imagen espectroscópica del modelo esquemático de la CcP de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
Figura 4	Cultivo de <i>Brassica napus</i> L. “nabo” y la raíz tuberosa utilizada en el trabajo para extraer la enzima peroxidasa.....	17
Figura 5	Representación de una enzima inmovilizada.....	18
Figura 6	Enzimograma de Peroxidasa (POD) de nabo en el extracto crudo de enzima: (a) Buffer Tris HCl 0,05M pH 8,3 y PAGE 8%. (b) Buffer acetato 0,05M pH 4,5 y PAGE al 6%.....	35
Figura 7	Fraccionamiento en cromatografía con carboximetil-celulosa con dos gradientes de elución de buffer acetato 0,005M pH 4,4 y buffer acetato 0,25M pH 5,2 con cambio de gradiente de buffer acetato 0,5M pH 5,2.....	36
Figura 8	Efecto de la concentración de la Peroxidasa (POD) de nabo (<i>Brassica napus</i> L.) sobre la actividad enzimática.....	37
Figura 9	Efecto de la concentración de guayacol sobre la actividad de Peroxidasa (POD) de nabo en el extracto enzimático sin purificar.- Representación de Lineweaver-Burk.....	38
Figura 10	Efecto de la concentración de H ₂ O ₂ sobre la actividad de Peroxidasa (POD) de nabo en el extracto enzimático sin purificar.- Representación de Lineweaver-Burk.....	39
Figura 11	Efecto de la temperatura sobre la actividad de la Peroxidasa (POD) de nabo, en el extracto enzimático sin purificar.....	40
Figura 12	Estabilidad térmica de la Peroxidasa (POD) de nabo en el extracto enzimático sin purificar.....	41
Figura 13	Efecto del pH sobre la actividad de la Peroxidasa (POD) de nabo, en el extracto enzimático sin purificar.....	42
Figura14	Efecto del pH sobre la estabilidad de la Peroxidasa (POD) de nabo (<i>Brassica napus</i> L.)	43
Figura 15	<i>Efecto de la concentración de guayacol sobre la actividad de Peroxidasa (POD) de nabo en la fracción eluída sin gradiente.- Representación de Lineweaver-Burk.....</i>	44

Figura 16	Efecto de la concentración de H_2O_2 sobre la actividad de Peroxidasa (POD) de nabo en la fracción eluída sin gradiente.- Representación de Lineweaver-Burk.....	45
Figura 17	Efecto del pH sobre la actividad de la Peroxidasa (POD) de nabo en la fracción eluída sin gradiente.....	46
Figura 18	Mecanismo de reacción en el proceso de inmovilización.....	53
Figura 19	Concentración de acrilamida, los grupos hidroxilos (-OH) libres de las moléculas de glucosa que constituyen la celulosa estarían saturados.....	54
Figura 20	Esquema de un reactor TORUS para un volumen de trabajo de 100 mL.	69

RESUMEN

Este estudio fue realizado con el objeto de determinar la eficacia de la remoción de compuestos fenólicos de un sistema acuoso residual por la peroxidasa de *Brassica napus* L. "nabo" inmovilizada en coronta de *Zea mayz* "maíz". Para ello, la peroxidasa (POD) EC 1.11.1.7 fue extraída del zumo de *B. napus* L. precipitada en frío con alcohol etílico al 70%, y sometida a electroforesis y cromatografía con carboximetil celulosa, con gradiente de elusión de buffer acetato 0,005 M pH 4,4 y buffer acetato 0,25 M pH 5,2 con un cambio de gradiente del mismo buffer de 0,5 M pH 5,2. La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) reveló cuatro bandas enzimáticas, la cromatografía de intercambio iónico reveló un pico con elevada actividad enzimática, en la fracción eluída sin gradiente, y dos pequeños picos con baja actividad enzimática en las fracciones 102-107 y 116-119. El extracto enzimático sin purificar mostró poca estabilidad térmica, y su actividad cae notoriamente a 50°C. La enzima total purificada mostró un K_M de 12,8 mM y velocidad máxima de 0,105 para guayacol y un K_M de 2,22 mM y velocidad máxima de 1,095 para peróxido de hidrógeno. En tanto la fracción cromatográfica eluída sin gradiente, mostró un K_M y Velocidad máxima de 10,52 mM – 0,54 y 5 mM y 0,606 para guayacol y peróxido de hidrógeno respectivamente. El pH óptimo de la enzima total purificada fue de 6 y de 7 para la fracción cromatográfica sin gradiente y además presentan una buena estabilidad a este pH. Respecto al proceso de inmovilización, Se encontró, que la proteína ligada es de aproximadamente 7 mg/g de soporte con una producción de acoplamiento del 79%. El rendimiento de inmovilización de la POD de nabo varía entre un 46,36 y 47,65%, la cantidad de actividad enzimática no inmovilizada estuvo alrededor del 24,35% con una pérdida de la actividad enzimática durante este proceso de inmovilización alrededor del 29%. Respecto a la capacidad de remoción del fenol por las peroxidosas presentes en un extracto crudo de nabo, se encontró que la POD inmovilizada presenta un 74% y la POD soluble un 66,66%, siendo más eficaz la POD inmovilizada en la remoción del fenol.

ABSTRACT

This study was carried out with the objective of determining the effectiveness of the removal of phenolic compounds from a watery residual system by the peroxidase of *Brassica napus* L. "turnip" immobilized in cor of *Zea mays* "corn". For this, the peroxidase (POD) EC 1.11.1.7 was extracted from the juice of *B. napus* L. precipitated in cold with ethyl alcohol to 70% and subjected to electrophoresis and chromatography with carboxymethyl cellulose, with gradient of elution of buffer acetate 5 mM – pH 4,4 and buffer acetate 0,25 M – pH 5,2 with a change of gradient of the same buffer of 50 mM – pH 5,2. The electrophoresis in polyacrylamide gel (PAGE) revealed four enzymatic bands, the chromatography of ionic interchange revealed a peak with high enzymatic activity, in the eluted fraction without gradient, and two small peaks with low enzymatic activity in the fractions 102 – 107 and 116 – 119. The enzymatic extract without purifying showed little thermic stability, and its activity falls notoriously to 50°C. The total purified enzyme showed a K_M of 12,8 mM and maximum velocity of 0,105 for "guayacol" and a K_M of 2,22 mM and maximum velocity of 1,095 for hydrogen peroxide. The eluted chromatographic fraction without gradient, showed a K_M and maximum velocity of 10,52 mM – 0,54 and 5 mM – 0,606 for "guayacol" and hydrogen peroxide. The optimum pH of the total purified enzyme was of 6 and 7 for the chromatographic fraction without gradient and also showed good stability to this pH. With respect to the immobilization process, it was found that the tied protein is of approximately 7 mg/g of support with a production of coupling of 79%. The yield of immobilization of the POD of turnip varies between 46,36 and 47,65% the amount of not immobilized enzymatic activity was around of 24,35%, with a loss of enzymatic activity during this process of immobilization around 29%. With respect to the capacity of removal of phenol by the present peroxidases in a raw extract of turnip, it was showed that the immobilized presents a 74% and the soluble POD a 66,66%, being more effective the immobilized POD in the removal of phenol.

I INTRODUCCIÓN

La peroxidasa (EC 1.11.1.7; Peróxido de hidrógeno oxirreductasa, POD) es una de las enzimas que controlan el crecimiento fisiológico de las plantas, su diferenciación y desarrollo. Es bien conocido que esta enzima participa en la construcción y lignificación de la pared celular, la biosíntesis de etileno a partir del ácido 1- aminociclopropanocarboxílico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la regulación de niveles de auxina, la protección contra el deterioro de tejidos e infección por microorganismos patógenos, la oxidación de ácido indolacético, etc.¹⁻³. Por otro lado, hoy día existe un gran interés por la POD debido a sus múltiples aplicaciones prácticas (industria maderera, industria de alimentos, bioquímica clínica, etc.). Actualmente cerca de un 90% de los *Kits* para análisis inmunoenzimático se preparan a partir de peroxidasa⁴. Además, la POD se ha venido utilizando para preparar electrodos específicos con POD inmovilizada sobre su superficie, que tienen aplicación en análisis ambiental⁵.

La actividad de la peroxidasa varía ampliamente de una especie a otra. Para el fruto de balazos (*Monstera deliciosa*) se ha encontrado que dicha actividad depende del grado de madurez; por el contrario, la actividad de peroxidasa de las hojas de la palma de botella (*Roystonea regia*) se mantiene constante todo el año. Algunas especies presentan alta actividad de peroxidasa como la raíz de batata (*Ipomoea batatas*), las hojas de pasto guinea (*Panicum maximum*), las de dormidera (*Mimosa pigra*), las de higuera (*Ricinus communis L.*) y las de las siguientes palmas: mararai (*Aiphanes cariotifolia*), de botella (*Roystonea regia*), dactilera (*Phoenix dactylifera*) y africana (*Elaeis guineensis*). Además, mediante técnicas de isoelectroenfoque se han hallado peroxidosas aniónicas (pI 3.4 – 5.6) tanto en la raíz de batata como en las palmas analizadas⁶.

Tabla 1 Actividad de la peroxidasa en raíces de algunas plantas tropicales⁶.

No.	FUENTES	ACTIVIDAD DE LA PEROXIDASA, U/g RAÍZ
1	Apio (<i>Apium graveolens</i>)	58.0
2	Arracacha (<i>Arracacia xanthorrhiza</i>)	<1.0
3	Batata (<i>Ipomoea batatas</i>)	1800.0
4	Bore (<i>Colocasia esculenta</i>) [†]	370.0
5	Cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>)	35.0
6	Cubios (<i>Tropaeolum tuberosum</i>)*	81.0
7	Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>)**	11.6
8	Ñame (<i>Dioscorea alata</i>)*	87.0
9	Ollucos (<i>Ullucus tuberosus</i>)*	46.0
10	Papa criolla (<i>Solanum rybinii</i>)*	24.3
11	Rábano rojo (<i>Raphanus sativus</i>)	121.3
12	Rábano silvestre (<i>A Armoracia lapothifolia</i>)	2600.0
13	Yuca (<i>Manihot esculenta</i>)	1.7

*: Túbbero; **: Rizoma

Es de destacar a la peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase o HRP), que tiene actualmente grandes aplicaciones en técnicas inmunoquímicas y de diagnóstico clínico debido a su gran estabilidad, facilidad de conjugación con las inmunoglobulinas y sencillez para detectarla por métodos colorimétricos utilizando un gran número de reactivos.

Es importante mencionar que el extracto crudo de nabo presenta una elevada actividad de peroxidasa (9,60 U/mg) comparativamente con otras fuentes vegetales, por lo cual parece ser una fuente alternativa para la obtención de esta enzima^{7, 8}.

Por otro lado, la actividad industrial desarrollada por el hombre ha provocado que se desechen grandes cantidades de compuestos tóxicos afectando a la flora y fauna de las regiones involucradas. Los compuestos fenólicos están presentes en efluentes de desecho de varias industrias

como la de conversión del carbón, conservación de la madera, farmacéutica, textil, manufactura del papel, cervecera, fabricación de resinas, así como la industria química y del petróleo, entre otros. La mayoría de éstos compuestos son tóxicos y han sido clasificados como contaminantes peligrosos. Debido a esto es importante eliminar estos contaminantes de los efluentes; además, el método no debe provocar la formación de productos secundarios tóxicos, no ser costoso, presentar una gran especificidad por los compuestos fenólicos, fácil de manipular, no peligroso y que además no provoque alteraciones ecológicas⁹.

En la actualidad para eliminar los contaminantes fenólicos efluentes se emplean varios métodos, entre ellos: extracción con solventes, degradación microbiana, adsorción con carbón activado, incineración y radiación con luz ultravioleta¹⁰. Muchos de estos tratamientos presentan más de uno de los inconvenientes anteriormente mencionados, y una alternativa para este problema ha sido el uso de enzimas. Se ha usado las peroxidasa de rábano picante, fríjol de soya y de organismos como *Coprinus macrorhizus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Arthromyces ramosus*, para la remoción de compuestos fenólicos, encontrándose resultados hasta de un 99%. Esto debido a que las peroxidasa son capaces de catalizar la oxidación de compuestos aromáticos en presencia de peróxido de hidrógeno, y los radicales libres fenoxi generados durante la catálisis reaccionan entre si para formar dímeros, trímeros, etc. que dan lugar a largos oligómeros¹¹. Estos oligómeros son menos solubles que sus monómeros precursores y tienden a precipitar. Dados los excelentes resultados obtenidos por las peroxidasa de otras fuentes, se piensa que la peroxidasa de una fuente alternativa como el nabo, puede proporcionar buenos resultados por la relativamente elevada concentración de ésta enzima en el vegetal. y ser una alternativa más viable en nuestro país. La producción agrícola de nabo en Trujillo, ha registrado un importante aumento en los últimos años (Información personal).

Un grupo de investigadores mejicanos de la Universidad Autónoma de Querétaro (Méjico), han conseguido eliminar satisfactoriamente de agua residual sintética conteniendo fenol y compuestos fenólicos como el cresol, bisfenol-A y el 2- clorofenol por polimerización catalizada por la peroxidasa en estado soluble, y también inmovilizada por atrapamiento en alginato de calcio. Obtuvieron resultados interesantes como el 96 - 98%, sin embargo en el segundo ciclo de trabajo los resultados cayeron entre el 50% y el 5%^{8, 10, 12}.

Respecto a la inmovilización de enzimas, se ha utilizado una gran variedad de materiales naturales o sintéticos, orgánicos o inorgánicos, como soportes para tal objetivo. Estos materiales difieren en tamaño, forma, densidad y porosidad, y se emplean en diferentes formas, siendo las más utilizadas como esferas. El tamaño de la partícula soporte utilizada constituye un factor crítico y resulta útil determinar el grado en el que las reacciones difusionales internas condicionan la actividad enzimática¹³⁻¹⁶.

Desafortunadamente la mayor parte de los materiales de soporte y los métodos de inmovilización descritos en la literatura científica, no pueden utilizarse en operaciones a gran escala, debido al costo que presentan o a la naturaleza peligrosa de los reactivos utilizados, las inadecuadas propiedades mecánicas de los soportes; o bien, debido a que los métodos son difíciles de extrapolar a gran escala o requieren un personal muy calificado¹⁷.

En la Universidad Nacional de Trujillo (Perú) pionera en la inmovilización de enzimas por enlace covalente se ha logrado “insolubilizar” en el laboratorio de Tecnología enzimática (Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas) varias enzimas con muy buenos rendimientos de inmovilización. Entre las enzimas inmovilizadas están la β -galactosidasa de *Kluyveromyces sp* en cáscara de arroz¹⁸, α -amilasa de *Aspergillus oryzae* en serrín¹⁹, β -galactosidasa comercial (Lactax) en

coronta de maíz²⁰ y en escamas de pescado²¹, α -amilasa de *Aspergillus oryzae* en cáscara de arroz²², la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* en cáscara de arroz²³ y la Polifenol oxidasa (PPO) de *Agaricus bisporus* en celulosa comercial²⁴.

Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosos enzimas, se reconoce que no existe un método universal válido para todos los enzimas en todos los casos. No obstante, gracias a toda la información disponible en la actualidad, se pueden hacer generalizaciones sobre cada método de inmovilización y así, se podrá seleccionar el más adecuado para cada aplicación específica. La elección ha de tener en cuenta las condiciones de la reacción biocatalizada, el tipo de reactor que se vaya a utilizar, el tipo de sustrato que tenga que ser procesado y otros factores.

En general, los métodos de preparación difícil y de mayor coste proporcionan biocatalizadores más estables y duraderos; en cambio aquellos métodos más sencillos como el atrapamiento o la adsorción, donde la unión de la enzima con el soporte es débil, originan derivados inmovilizados que presentan pérdidas de actividad y que deben ser repuestos continuamente.

II BASES TEORICO CIENTIFICAS

2.1 BASE CONCEPTUAL DE ENZIMAS.

Las enzimas son proteínas desarrolladas por las células de los organismos vivos con la función específica de catalizar reacciones químicas *in vivo*. También son capaces de catalizar *in vitro* reacciones en las que pueden intervenir sustratos naturales como artificiales²⁵.

Debido a su estructura proteica, las enzimas son muy sensibles a los cambios que se producen en su entorno. La presencia de disolventes orgánicos, una concentración alta de sales, un pH o una temperatura extremas pueden provocar la desnaturalización de la enzima, es decir, la pérdida de sus estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria. Las enzimas, como biocatalizadores se caracterizan por que aceleran el curso de una reacción, son selectivas, pueden ser objeto de regulación, presentan cofactores, la mayoría de ellas son solubles en agua, se pueden utilizar varias enzimas en combinación y se pueden degradar en condiciones relativamente suaves.

Aproximadamente el 15% de las enzimas conocidas (unas 2,500) están disponibles comercialmente. Sin embargo, solo 40-50% de estas enzimas, en su mayoría hidrolasas, se fabrican a escala industrial a partir de microorganismos, plantas y animales. Las enzimas se emplean en diversos procesos industriales de: alimentos, detergentes, destilerías, medicina y analítica; todo indica que el número de enzimas que se emplearán en el futuro en dichos procesos irá aumentando exponencialmente²⁶.

2.2 LAS PEROXIDASAS - CARACTERÍSTICAS GENERALES.

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son hemoproteínas con actividad catalítica. En su centro activo presentan un grupo hemo tipo b que contiene un ión de hierro, en cuya coordinación participan los cuatro nitrógenos pirrólicos y el nitrógeno ϵ del anillo imidazólico de una histidina proximal (Figura 1). El sexto ligando varía a lo largo del ciclo catalítico.

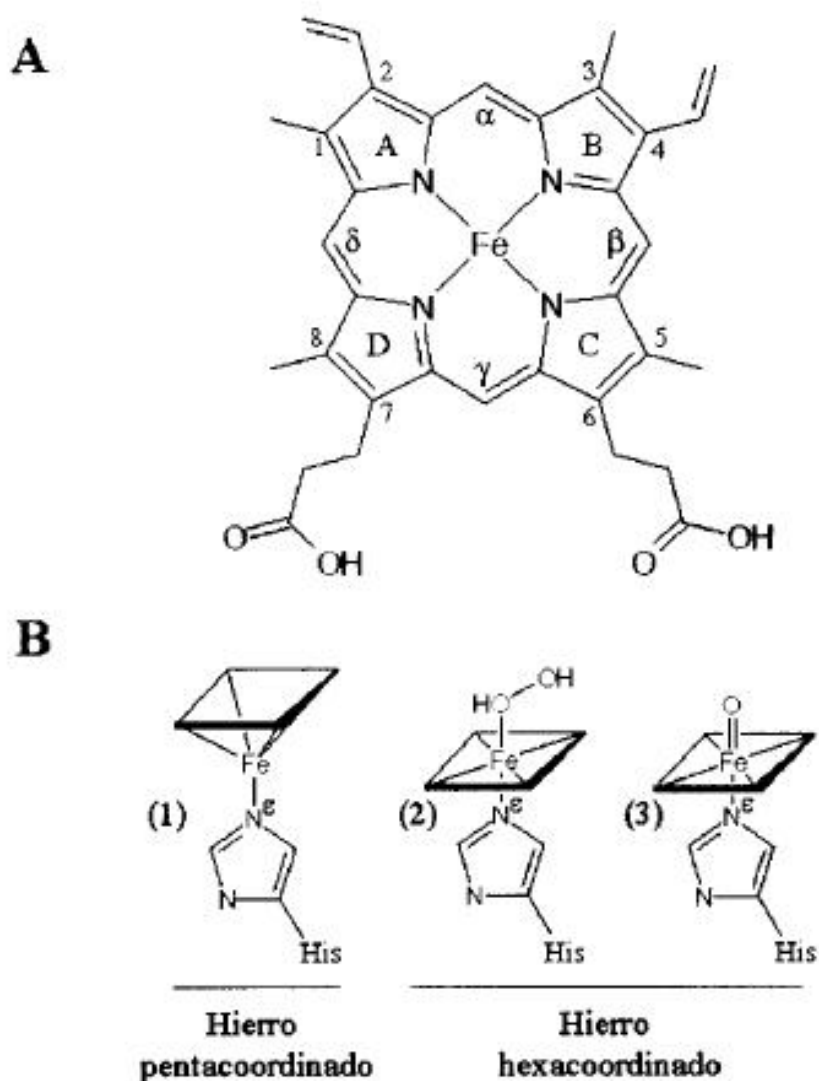


Figura 1. Hemo tipo b con el hierro ligado a los nitrógenos de los cuatro pirroles (A). Diferentes estados de coordinación del hierro (B) en los que como ligandos axiales participan: (1) el $N^{\epsilon}_{\text{His}}$ (Nitrógeno ϵ de la His proximal), (2) el $N^{\epsilon}_{\text{His}}$ y una molécula de H_2O_2 , y (3) el $N^{\epsilon}_{\text{His}}$ y un O^{2-} .

2.2.1 Ciclo catalítico.

Las peroxididasas utilizan hidroperóxidos, incluyendo H_2O_2 , como aceptores de electrones para catalizar un gran número de reacciones oxidativas²⁸. La mayoría siguen el mecanismo de reacción que se describe en la Figura 2.

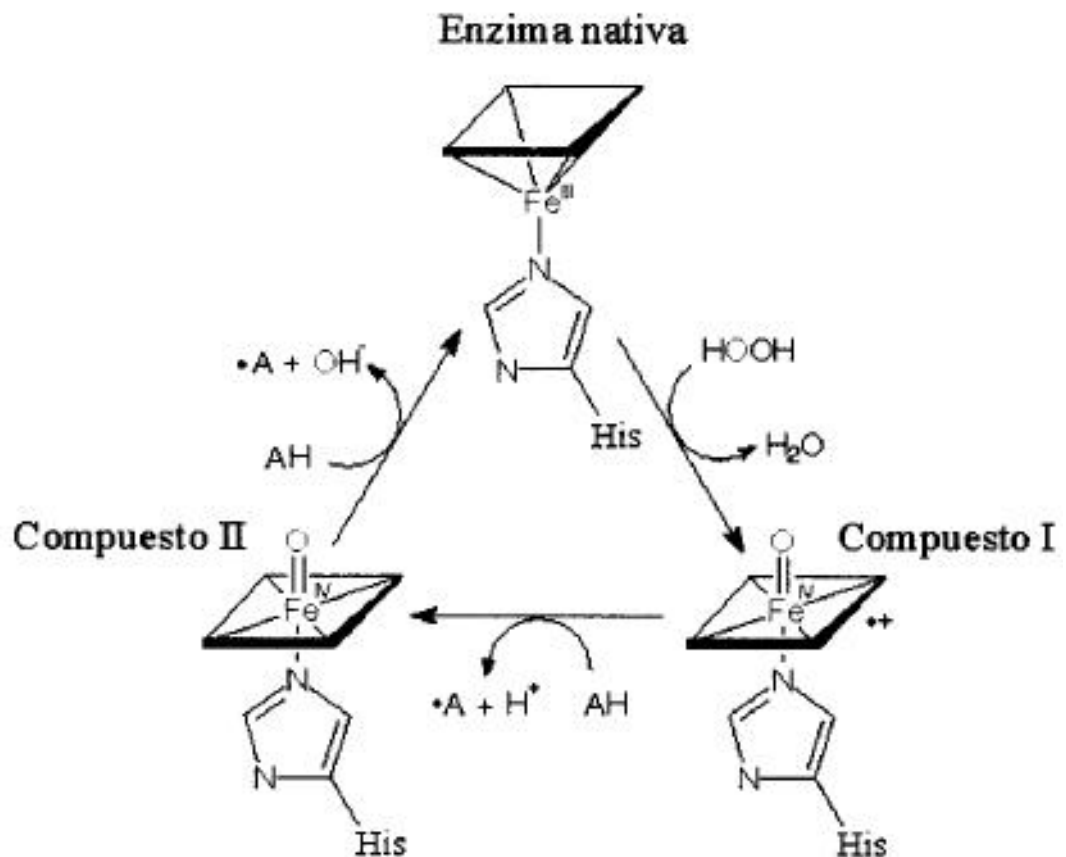


Figura 2 Ciclo catalítico de las peroxididasas^{27, 29}.

La enzima reacciona con un equivalente de H_2O_2 para dar lugar al compuesto I. Esto implica una reacción de óxido reducción de dos electrones, en que el H_2O_2 es reducido a H_2O y la enzima es oxidada. Un equivalente de oxidación reside en el hierro en forma de un intermediario oxoferril ($\text{Fe}^{4+} = \text{O}$) y el otro, en la mayoría de las peroxididasas, reside en la porfirina (en forma de radical cationico π de la porfirina, representado en la Figura 2 como +). En algunos casos, como en la citocromo C peroxidasa (CcP), puede estar centrado en un aminoácido. A continuación, el

compuesto I puede oxidar un sustrato mediante una reacción de transferencia electrónica, en la que se forma el radical del sustrato corresponde ($\cdot A$). La enzima queda como compuesto II con un centro $Fe^{4+} = O$ coordinado con la porfirina que ha recuperado su electrón. Finalmente, el $Fe^{4+} = O$ del compuesto II es reducido a la forma férrica (Fe^{3+}) de la enzima nativa, mediante la sustracción de un electrón de otra molécula de sustrato. En ausencia de sustratos reductores adecuados, un exceso de H_2O_2 reacciona con el compuesto II para formar el compuesto III ($Fe^{3+} O_2^-$), produciéndose la inactivación de la enzima y la pérdida del grupo hemo³⁰.

2.2.2 Clasificación de las Peroxidasas.

Las peroxidasas se encuentran en una gran variedad de organismos, y se pueden clasificar en dos superfamilias en función de sus diferencias estructurales³¹: La superfamilia de las peroxidasas animales³² y la superfamilia de las peroxidasas bacterianas, fúngicas y de plantas, cuyos componentes a pesar de mostrar en algunos casos una identidad de secuencia baja, presentan el mismo plegamiento y están evolutivamente relacionados³³. Esta superfamilia se puede dividir a su vez en tres clases bien diferenciadas:

2.2.2.1 Clase I: Peroxidasas de procedencia protistas.

Incluye peroxidasas intracelulares, entre las que se encuentran la CcP de levaduras, una proteína soluble que participa en la cadena de transporte de electrones mitocondrial como oxidasa terminal, cuando la citocromo C oxidasa respiratoria está inhibida; las peroxidasas-catalasas bacterianas, que muestran los dos tipos de actividades enzimáticas y pueden estar implicadas en la protección de las células frente al estrés oxidativo y la ascorbato peroxidasa (APX), responsable de la eliminación del H_2O_2 en cloroplastos y citosol de plantas superiores.

Estas peroxidasas no contienen en ningún caso puentes disulfuro, carbohidratos, iones calcio estructurales, o una secuencia señal que permita su secreción vía retículo endoplásmico (elementos característicos de las peroxidasas de las clases II y III)

2.2.2.2 Clase II: Peroxidasas fúngicas.

Engloba proteínas de secreción como la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (o peroxidasa dependiente de Mn^{2+} - MnP) producidas por los hongos ligninolíticos³⁴. Las peroxidasas fúngicas maduras tienen en su dominio C-terminal 40 -60 residuos más que los otros miembros de la superfamilia y, salvo alguna excepción como la MnP de *Phanerochaete chrysosporium*, presentan puentes disulfuro conservados. Tienen dos iones de calcio de gran importancia en el mantenimiento de la estructura y están glicosiladas, con un contenido medio en carbohidratos del 5%. Además, en su secuencia no aparece ningún residuo de tirosina.

2.2.2.3 Clase III: Peroxidasas de secreciones en plantas.

Las funciones fisiológicas de estas peroxidasas son muy variadas y específicas del tejido en el que se producen. Pueden participar en la oxidación de compuestos tóxicos, en la biosíntesis de la pared celular, en el catabolismo del ácido 3-indolacético, en la biosíntesis de etileno, etc.³⁵. Estas, al igual que las de la clase II, son glicoproteínas monoméricas con dos iones calcio estructurales y cuatro puentes disulfuro conservados. La mayoría está altamente glicosiladas. La más estudiada es la peroxidasa de rábano (HRP).

2.2.3 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

La primera peroxidasa que se analizó por difracción de rayos-X fue la CcP. Ésta presenta dos dominios bien definidos en una estructura dominada por

10 α -hélices (50% de la molécula), junto con cinco láminas β , cuatro de ellas formando pares antiparalelos. El dominio I (dominio distal): Formado por el extremo N-terminal y las hélices A-D, se encuentra distribuido sobre la hélice B que se localiza sobre el hemo. Un lazo de gran longitud entre las hélices D y E que conecta el dominio I al dominio II. El dominio II (dominio proximal, por debajo del hemo) esta formado las hélices E – I y la mayor parte de la estructura β . La última hélice (J) comienza en el dominio II (por debajo del hemo) y se proyecta en el dominio I. Esta organización en dos dominios estructurales con los extremos N y C- terminal situados en el mismo dominio, es una característica en este tipo de proteínas con dos dominios. Un amplio canal, entre los dominios conecta el lado distal de la cavidad del hemo con la superficie de la proteína, permitiendo el acceso de H_2O_2 al centro activo.

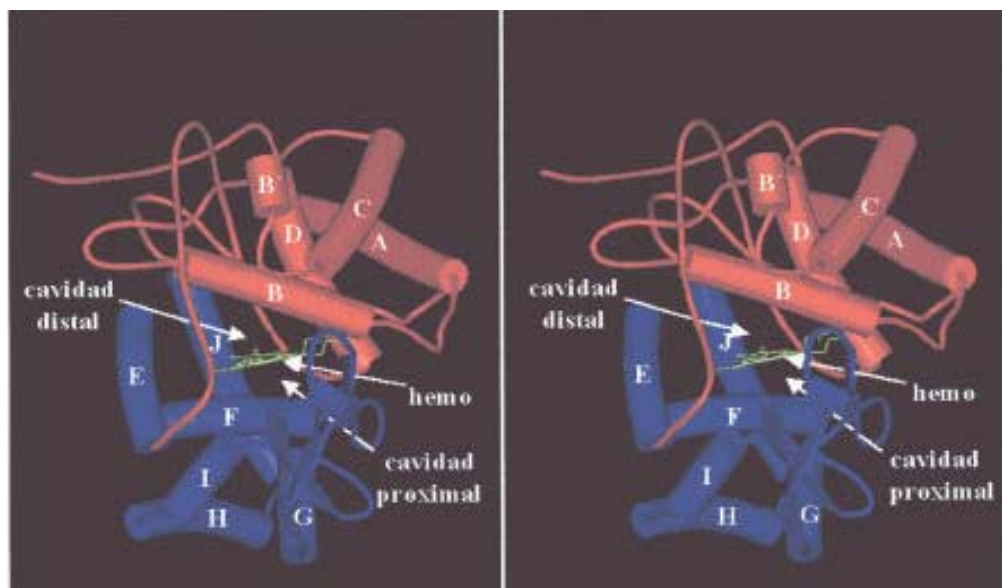


Figura 3 Imagen espectroscópica del modelo esquemático de la CcP de *Saccharomyces cerevisiae*³⁶. Los dominios estructurales de la proteína aparecen representados en rojo (dominio distal) y azul (dominio proximal) a ambos lados del plano del hemo.

Las peroxididasas bacterianas, fúngicas y de plantas presentan una identidad de secuencia inferior al 20%; sin embargo, el plegamiento global y la organización de la estructura secundaria están conservados, incluyendo la organización en dos dominios estructurales.

Las peroxidasas de las clases II y III presentan iones de calcio, esenciales para el mantenimiento de su estructura y los sitios de unión están altamente conservados. El ión calcio en el dominio proximal está fuertemente unido y en el distal lo está débilmente (quizás por su cercanía a la superficie molecular y exposición al solvente). Los iones de calcio se encuentran ligados a residuos pertenecientes a las hélices B y F, contiguos a las histidinas catalíticas. La eliminación del ión calcio, ocasiona una importante disminución de la actividad (HRP) o inactivación total de la enzima (MnP).

2.2.4 CENTRO CATALÍTICO.

A partir del análisis estructural de las diferentes peroxidasas cristalizadas, hasta la fecha se han podido identificar una serie de residuos implicados en la ruptura heterolítica del H_2O_2 y, en la estabilización de los diferentes estados de oxidación del hierro a lo largo del ciclo catalítico. Estos residuos (Tabla 2) se encuentran localizados por encima y por debajo del plano que ocupa el grupo hemo, en los denominados respectivamente lados distal y proximal, en referencia a las dos histidinas axiales, una de las cuales actúa como quinto ligando del hierro (Figura 1).

Tabla 2. Residuos de los lados distal y proximal del hemo de diferentes peroxidasas de la superfamilia de las peroxidasas bacterianas, fúngicas y de plantas³³.

Enzima	Lado distal			Lado proximal		
CcP	R48	W51	H52	H175	W191	D235
APX	R38	W41	H42	H163	W179	D208
LiP	R43	F46	H47	H176	F193	D238
MnP	R42	F45	H46	H173	F190	D242
ARP-CIP	R52	F55	H56	H184	L201	D246
PNP	R38	F41	H42	H169	F213	D239
HRP	R38	F41	H42	H170	F221	D247

El H_2O_2 accede al centro activo y se une como sexto ligando hexacoordinado al hierro del hemo. Por tanto, esta posición tiene que estar libre en la enzima nativa, para que se pueda iniciar el ciclo catalítico. En esta tarea parecen estar implicados los residuos hidrofílicos del lado distal, capaces de estabilizar una extensa red de moléculas de H_2O , mediante una red de puentes de hidrógeno que, junto con el fuerte enlace Fe-N ϵ 2 entre el hierro y la histidina proximal, impiden que alguna de estas moléculas interactúe con el hierro.

La reacción con el H_2O_2 funciona en dos pasos. En el primero, el H_2O_2 se une al hierro del hemo, y en el segundo, el enlace O-O del H_2O_2 (Figura 2) se rompe dando lugar al compuesto I y una molécula de H_2O ³⁷. En la formación y estabilización de este compuesto, parecen tener un papel importante la histidina distal y la arginina distal^{37, 38}. La transferencia de un protón del H_2O_2 a la histidina distal (en forma desprotonada), en estado nativo, debido a una extensa red de puentes de hidrógeno facilita la unión del anión peróxido al Fe (III) del hemo. La estabilización mediada por la R48 (un residuo cargado positivamente), estaría provocada por interacciones electrostáticas con la carga negativa del oxígeno distal durante la ruptura heterolítica del enlace O-O del H_2O_2 . Una vez roto este enlace, el extremo guanidina de la arginina se desplazaría hacia el interior de la cavidad distal, formando un puente de hidrógeno con el oxígeno que queda unido al hierro, estabilizando así los compuestos I y II³⁹.

2.2.5 SITIOS DE UNIÓN A SUSTRATOS.

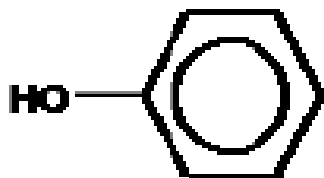
Las peroxidases catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos. Estos van desde metaloproteínas (como el citocromo c) o polímeros de gran tamaño (como la lignina), hasta pequeñas moléculas aromáticas (sustrato de peroxidases de plantas y hongos) o iones inorgánicos (como Mn^{2+} , sustrato de peroxidases producidas por los hongos ligninolíticos).

La especificidad de estas enzimas frente a los diferentes sustratos depende de dos factores:

- Potencial de reducción de las diferentes formas de la enzima (compuestos I y II) con respecto al potencial de reducción de los sustratos: esta propiedad está determinada por la capacidad de la enzima para estabilizar los elevados estados de oxidación del hierro durante el ciclo catalítico, que se debe tanto al fuerte carácter aniónico del quinto ligando del hierro (histidina proximal) como a la naturaleza hidrofílica de los residuos de lado distal del hemo y a las interacciones electrostáticas en el lado interior de la molécula⁴⁰.
- Propiedades estructurales de la proteína, que determinan los sitios de unión a los sustratos: esta especificidad está probablemente modulada por algunos cambios en la superficie de las peroxidasas y por sustituciones en un pequeño número de aminoácidos, sin llegar a provocar un cambio significativo a nivel de la estructura secundaria y del plegamiento global de la proteína⁴¹.

2.3 FENOL Y COMPUESTOS FENOLICOS

El fenol (hidroxidobenceno, fenilalcohol), inicialmente denominado ácido carbólico, fue descubierto por Runge en 1834, en el alquitrán de la hulla.



Funde a 43°C, hierve a 183°C, es muy soluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos. Es caústico y muy venenoso. Causa la muerte por ingestión de tan sólo 1g y puede causar envenenamiento por

absorción a través de la piel. Si se vierte como residuo industrial al medio ambiente y, en especial, al agua, resulta muy tóxico. Es mortal para la fauna acuática a la concentración de 1 ppm. En presencia de cloro (empleado para el tratamiento del agua potable) puede transformarse en clorofenol, de sabor muy desagradable. Sin embargo, el fenol puede ser depurado natural y fácilmente de los ríos por el junco de laguna, vegetal acuático muy común. Es usado en la fabricación de una variedad de productos, inclusive resinas sintéticas, plásticos, reveladores fotográficos, goma, y tintes de las industrias textiles. El fenol es un desinfectante general y también, en soluciones diluidas, es usado como preservante, un antiprurítico o un anestésico local en algunas preparaciones médicas⁴².

La presencia de fenol y sus derivados en agua y aguas de desecho es de gran preocupación mundial a causa de su toxicidad en seres humanos y medio ambiente. Los fenoles son encontrados naturalmente en combustibles fósiles, pero también son producidos por muchas industrias⁴². Si bien no se ha comprobado efectos carcinógenos del fenol en humanos, existen ciertas evidencias, a partir de estudios en animales, que el fenol actúa como una sustancia altamente tóxica. Por otro lado, compuestos fenólicos clorados producen complejos con olor y sabor desagradable; la cloración de fenoles no solo acentúa su olor y sabor, sino también sus efectos tóxicos, y es debido a ello que la Agencia de Protección Ambiental Americana (EPA), recomienda disminuir la cantidad de fenol en aguas residuales hasta una concentración máxima de 1ppm⁴³.

2.4 EL NABO

El nabo ha sido hasta la llegada de la patata desde el Nuevo Mundo una hortaliza de importancia básica en Europa, y de hecho cumplía una función similar en la alimentación, como ingrediente de asados, guisos, purés, o simplemente como guarnición de numerosos platos. Con la popularidad de la patata comenzó a declinar su consumo hasta quedar

casi en el olvido. Hoy en día, aunque se ha recuperado un poco su cultivo, ya no goza del mismo éxito de antaño. En realidad, su carne y sabor suave son un buen complemento culinario, especialmente de las carnes grasas. Por otro lado, presenta un ciclo biológico diferente al de la mayoría de las hortalizas, motivo por el cual se puede aprovechar para su cultivo los espacios de la huerta que dejan otras plantas⁴⁴.

La reproducción del nabo es por semilla, las cuales sólo podemos aprovechar durante tres años, ya que después degeneran y pierden todo su poder germinador. Se siembran directamente en el terreno definitivo cuando empieza a declinar la temporada estival, cuando el calor no les afecte en exceso, generalmente sucede a finales del mes de julio. El calor es pues un contratiempo para el cultivo de esta planta, en aquellas regiones muy cálidas y secas hay que retrasar la siembra, ya que pueden florecer y adquirir una consistencia incomedible en forma de carne muy fibrosa. Dependiendo del clima, por ejemplo en los húmedos, puede sembrarse en primavera y recolectar en verano.

Precisan una tierra ligera, fértil, trabajada y con bastante materia orgánica. Los suelos más adecuados son los neutros, nunca ácidos, incluso pueden ser un poco alcalinos (esto también es válido para todas las hortalizas crucíferas, como las coles y repollos). La siembra se realiza en surcos, esparciendo bien las semillas para que no crezcan muy juntos. Después de nacer se procede a un aclarado, dejando sólo una planta cada 25 cm. aproximadamente. La exposición debe ser soleada, pero como se dijo no aceptan el calor excesivo, para ello hay que regar con frecuencia y en abundancia; nunca deben pasar sed⁴⁵.



Figura 4 Cultivo de *Brassica napus* L. “nabo” y la raíz tuberosa utilizada en el trabajo para extraer la enzima peroxidasa.

2.5 ASPECTOS GENERALES SOBRE LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte⁴⁶.

Como **ventajas** del empleo de enzimas inmovilizadas⁴⁷²³ podemos destacar:

1. El aumento de la estabilidad de la enzima.
2. La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costes del proceso.
3. La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Los diferentes tipos de reactores enzimáticos con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas

pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza.

Los principales **inconvenientes** del proceso de inmovilización⁴⁷ son:

1. La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.
2. La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.
3. Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización.
4. El biocatalizador es más caro que la enzima nativa.

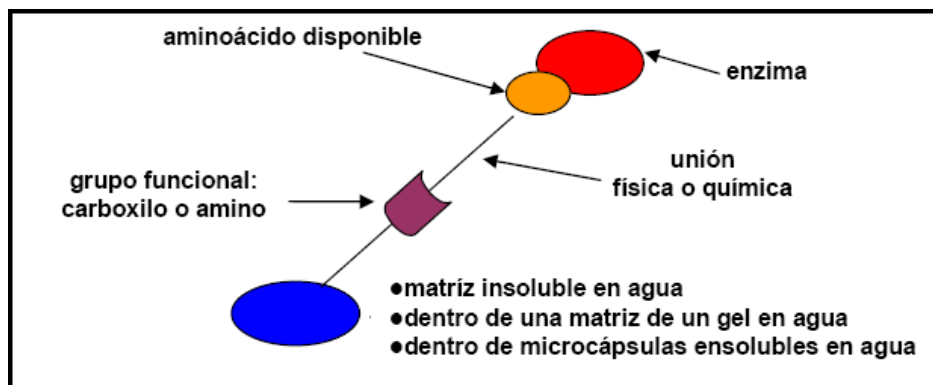


Figura 5 Representación de una enzima inmovilizada.

2.5.1 EFECTOS DE LA INMOVILIZACIÓN

A menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas. En primer lugar se producen cambios en su estabilidad. En segundo lugar, la enzima inmovilizada es un sistema heterogéneo en el cual todos los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.) se encuentran en interfase: en el medio de reacción y en la fase constituida

por el soporte con la enzima. Como consecuencia, la actividad enzimática se ve afectada por efectos de tipo difusional, estérico y del microentorno.

2.5.1.1 Efectos en la estabilidad

Generalmente se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización, que se debe principalmente a las siguientes razones:

a. **Una estabilización conformacional de la enzima**, debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte. La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Este tipo de estabilización se obtiene únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente, como el reticulado o la unión a soportes activados. La inmovilización covalente multipuntual se puede combinar con la adición de reactivos bifuncionales que den mayor rigidez a la estructura de la enzima.

b. **Una protección frente a las proteasas en el medio**. Se ha visto que la unión de proteasas a un soporte elimina su capacidad proteolítica, y evita su autólisis.

c. **Se evita la agregación intermolecular**, al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio.

d. **Existe una alteración del microentorno de la enzima**, debida a la interacción de la enzima con el soporte. Por ejemplo, si una enzima sensible al oxígeno (como las nitrogenasas, hidrogenasas, etc.) se sitúa en la superficie de un soporte cargado, la fuerza iónica efectiva en el microentorno de la enzima será muy alta y, como consecuencia, la concentración de oxígeno disuelto será mucho menor en esa zona que en el medio de reacción. En otros casos el soporte tiene un efecto buffer de

tal manera que mantiene el pH óptimo de la enzima en su microentorno, aunque en la disolución se produzcan cambios importantes de pH. Por otra parte, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas en presencia de disolventes orgánicos, la “hidrofilia” del soporte o su capacidad para retener agua, regula la actividad de la enzima. Cuanto mayor es la hidrofilia del soporte, más agua adsorbe y la enzima poseerá la cantidad necesaria de agua en su microentorno para mantener su conformación activa.

2.5.1.2 Efectos en la actividad enzimática

Tras una inmovilización, la actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse por diversas razones. Si pierde totalmente la actividad enzimática puede ser debido a que:

- la unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido,
- los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo, o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima,
- la inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva,
- las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima.

Si la pérdida de actividad no es total después de la inmovilización, los cambios (disminución o aumento de la actividad enzimática) se deberán principalmente a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del microentorno.

- a. **Efectos difusionales:** Como consecuencia de la inmovilización, la difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima puede estar impedida por resistencias de tipo externo e interno.

- **resistencias difusionales externas:** si el soporte es insoluble en el medio de reacción, el sustrato deberá atravesar la película líquida estacionaria (capa de Nernst o de difusión) que rodea el soporte.

En las proximidades de un soporte no cargado, la concentración de sustrato es menor que en el resto de la disolución, puesto que existe un gradiente de concentración a través de la zona de difusión. Por tanto, los valores de K_m para las enzimas inmovilizadas son siempre aparentes (K_m').

- **resistencias difusionales internas:** debida a que los sustratos tienen que atravesar el interior del gel, microcápsula, fibra o poro del soporte donde se encuentra la enzima inmovilizada.

Existen diversas maneras de minimizar estos efectos difusionales como por ejemplo: disminuir el tamaño del biocatalizador, aumentar la concentración de sustrato, incrementar la agitación o el flujo en el reactor, etc. Con estas medidas se consigue reducir el grosor de la capa de Nernst, y como consecuencia, el valor de K_m' disminuye.

- Efectos electrostáticos entre el sustrato y el soporte,** de tal manera que, si tienen la misma carga existe una repulsión mutua, mientras que si las cargas son opuestas hay atracción. Cuando el sustrato y el soporte tienen cargas opuestas, el valor de K_m' aparente puede verse reducido hasta varias veces por debajo del obtenido en disolución⁴⁸.
- Impedimentos estéricos o de tamaño de sustrato.** En un principio, cualquier enzima puede ser inmovilizada sin que haya una pérdida apreciable de su actividad. Este hecho suele ser válido en el caso de que el sustrato sea de bajo peso molecular, pero si se trata de

sustratos con pesos moleculares elevados, la actividad de la enzima inmovilizada disminuye drásticamente. Por ejemplo, muchas hidrolasas unidas covalentemente a soportes sólidos, a pesar de que son muy activas frente a sustratos pequeños, muestran una actividad muy baja hacia proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos. Este “efecto estérico” se puede evitar mediante una inmovilización covalente, a través de un brazo espaciador enzima-soporte más largo.

- d. **Efectos en el microentorno:** La enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual, especialmente cuando el soporte tiene grupos cargados eléctricamente. El efecto observado suele ser un desplazamiento en el valor del pH óptimo de la catálisis enzimática y, muchas veces, un ensanchamiento en el intervalo de pH en el cual la enzima puede actuar. Por ejemplo, una enzima unida a un soporte cargado negativamente (CM-sephadex) tendrá en su microentorno una concentración mayor de hidrogeniones que en el medio de reacción. Como resultado, la enzima inmovilizada será más activa a un pH más alcalino. La enzima sería más activa a pH más ácidos si estuviera unida a un soporte cargado positivamente (DEAE-sephadex).

2.6 APLICACIONES DE LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS

Las aplicaciones más importantes de las enzimas inmovilizadas se pueden clasificar en: aplicaciones analíticas (biosensores); aplicaciones médicas (tratamientos con enzimas inmovilizadas) y aplicaciones industriales: en la industria química, farmacéutica, alimentaria, purificación de agua y aire, aplicaciones clínicas, inmunodiagnósticos, fotografía y procesos analíticos para la detección de muchos compuestos y de tratamiento de residuos^{25, 4}.

Actualmente, el uso de enzimas inmovilizadas para la descontaminación de aguas residuales con sustancias aromáticas fenólicas está desarrollándose muy rápidamente, como ha sido el caso de la peroxidasa de *Horseradish*, la cual ha demostrado que al estar inmovilizada puede eliminar altos porcentajes de contaminantes de tipo fenólico como fenol, 2-metoxifenol, 2-clorofenol, entre otros importantes⁵⁰⁻⁵³.

Las enzimas inmovilizadas han sido definidas como enzimas que están confinadas o localizadas físicamente, con retención de su actividad catalítica, las cuales pueden ser usadas repetida y continuamente^{25, 54}, o bien, se pueden definir como preparaciones de enzimas en las cuales las moléculas de éstas están confinadas en un soporte (preferiblemente insoluble), o en una fase inmiscible la cual es fácilmente separable de la mezcla de reacción (fase conteniendo el sustrato), para usarlas repetida y continuamente.

2.7 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Los métodos tradicionalmente empleados para la eliminación de compuestos fenólicos presentan varios inconvenientes, y debido a ello actualmente se han realizado estudios enfocados a la utilización de enzimas, principalmente peroxidasas, en el tratamiento de desechos industriales.

La peroxidasa de rábano picante (*A. rusticana* L.), ha sido una de las más estudiadas en este campo y con la que se ha obtenido hasta un 99% de remoción de compuestos fenólicos presentes en agua. Las investigaciones realizadas con otras fuentes de peroxidasa de origen tanto microbiano como vegetal, presentan una buena efectividad en la remoción de fenoles tanto en extractos crudos como usando una preparación de mayor pureza, de la misma fuente; por ello se pretende elevar la capacidad de la peroxidasa de nabo para eliminar dichos

compuestos fenólicos y así proponer una fuente alternativa más económica que la peroxidasa comercial, por su alta disponibilidad y relativamente alta concentración de peroxidasa. Las peroxidasas tanto de nabo como de otros vegetales de alta disponibilidad en el Perú, están siendo estudiadas por un grupo de investigación del Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, mostrando características cinéticas y de estabilidad que posibilitan enormemente su utilización.

Por esta razón creemos que la aplicación de las peroxidasas de nabo en la eliminación de compuestos fenólicos tendrá en el futuro una eficiencia similar, o mejor en la biorremediación de compuestos fenólicos, comparada con las peroxidasas comerciales.

La inmovilización de enzimas permite una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace posible su empleo en la producción industrial de productos químicos, farmacéuticos, alimentos; en el tratamiento de residuos; en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, y otras muchas aplicaciones.

Por otro lado, en un futuro muy próximo la presente tesis, permitirá:

- La obtención de peroxidasas de nabo, con igual o mejor calidad que otras peroxidasas comerciales obtenidas a partir de rábano picante y de cáscara de soja, a fin de sustituirlas gradualmente en un mercado biotecnológico nacional e internacional ya establecido.
- La presentación de tecnologías de proceso aplicables a otras materias primas biológicas propias de nuestra región, para la obtención de peroxidasas y/o de otras enzimas con aplicaciones biotecnológicas.

- La presentación de productos naturales, recuperación y revalorización del nabo.
- La mejora continua en servicios de consultoría y de desarrollo de aplicaciones biocatalíticas, sobre peroxidasas de nabo y sobre otras enzimas en estado soluble e inmovilizado.
- Producción de peroxidasas solubles e inmovilizadas a partir del nabo, destinadas a empresas que las utilizan en aplicaciones biotecnológicas, como diagnóstico clínico, mediante análisis enzimático e inmunoenzimático, análisis enzimático de fármacos, elaboración de productos de panadería, blanqueo de papel, decoloración de ropa vaquera, incorporación a detergentes para lavado de tejidos, degradación de contaminantes, síntesis de reactivos químicos, etc.
- Desarrollo de aplicaciones bioanalíticas de peroxidasas, como kits de análisis enzimático o biosensores enzimáticos para análisis clínicos de glucosa, colesterol, triglicéridos y ácido úrico, así como para análisis de fenoles y anilinas utilizados como fármacos y reactivos químicos.
- Desarrollo de aplicaciones biocatalíticas de peroxidasas como biorreactores enzimáticos para la degradación de vertidos industriales, contaminados con fenoles y anilinas perjudiciales para el medio ambiente, o bien para la síntesis estereoespecífica de fenoles y anilinas con utilidad biotecnológica.

2.8 OBJETIVOS

Los objetivos propuestos, fueron:

Eliminar compuestos fenólicos (fenol) presentes en agua, mediante su polimerización catalizada por peroxidasa de nabo (*Brassica napus* L.) inmovilizada en coronta de maíz.

Purificar parcialmente la peroxidasa de nabo (*B. napus* L.).

Evaluar algunos parámetros cinéticos de la peroxidasa de nabo, que contribuirán en la eliminación de compuestos fenólicos en agua.

Determinar la eficacia de la peroxidasa de nabo inmovilizada en la eliminación del fenol de un sistema modelo; compararlos con los obtenidos con la Peroxidasa soluble, y los reportados para otras peroxidases.

Para ello se planteó como problema ¿Cuál es la eficacia de la remoción de compuestos fenólicos de un sistema acuoso residual sintético por la peroxidasa de *Brassica napus* L “nabo” inmovilizada en coronta de *Zea mayz* “maíz”? Esperándose encontrar que la eficacia de la remoción de compuestos fenólicos, de un sistema acuoso residual sintético por la peroxidasa de *Brassica napus* L “nabo” inmovilizada en coronta de *Zea mayz* “maíz”, es mayor con respecto a la peroxidasa soluble y a las reportadas en otros trabajos al respecto.

III MATERIAL Y METODOS

3.1 MATERIAL DE ESTUDIO

- Peroxidasa (POD), la que se obtuvo de *Brassica napus* L. “nabo”
- Agua residual sintética (21,1 mM de fenol)

3.2 METODOS Y TÉCNICAS

3.2.1 Obtención del extracto crudo de peroxidasa de nabo

Para el estudio se seleccionaron raíces de nabo, frescas, y que no presentaron signos de maltrato o períodos largos de almacenamiento. Las muestras fueron analizadas el mismo día de su recolección, previamente lavadas con agua destilada, para remover cualquier suciedad y materiales extraños y conservados en refrigeración.

El extracto crudo se obtuvo por extracción directa de 1 Kg de nabo en un licuestrador (Oster), se filtró 2 ó 3 veces al vacío con papel whatman de poro decreciente y, finalmente se centrifugó por 10 minutos a 3 500 rpm. Luego, el sobrenadante obtenido fue diluido con igual volumen de buffer fosfato 20 mM pH 6 y se conservó a 0°C.

3.2.2 Medición de la actividad de peroxidasa⁵⁵

Se llevó a cabo en espectrofotómetro Spekol - 210 a temperatura ambiente (25°C). La solución de enzima (50 µL) fue adicionada a 4 mL de buffer fosfato 10 mM de pH 7.0 conteniendo guayacol (20mM) y H₂O₂ (4.4 mM) como sustratos. Se midieron los cambios de absorbancia

debidos a la oxidación de guayacol por la peroxidasa por 4 minutos. La determinación se realizó por triplicado.

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

3.2.3 Purificación de la peroxidasa

Se descongeló el centrifugado obtenido anteriormente y fue precipitado con alcohol comercial al 70% previamente enfriado a -20°C. La solución alcohólica obtenida fue colocada en frío toda la noche para su total precipitación. Luego se centrifugó a 4 000 rpm por 10 minutos y el precipitado obtenido fue disuelto en buffer acetato 5 mM - pH 4,4 y dializado en 4 litros del mismo buffer durante toda la noche, manteniéndose las condiciones de frío durante todo el proceso.

El dializado fue transferido a una columna cromatográfica (2,5x39 cm) empacada con carboximetilcelulosa (CM-celulosa) previamente equilibrada con el mismo buffer. Una fracción se eluyó de la columna con 400mL de buffer acetato 5 mM y pH 4,4 y, la fracción absorbida fue eluída con un gradiente lineal consistente de 700 mL (buffer acetato 5 mM - pH 4,4 y buffer acetato 0,25M - pH 5,2). Al término de la elución se cambió con 200 mL de buffer acetato 50 mM - pH 5,2.

3.2.4 Determinación de la Concentración de las Proteínas en la Peroxidasa⁵⁶

Se usó el método colorimétrico de Bradford. El dosaje se realizó por triplicado. Para la curva de calibración se usó como estándar seroalbúmina bovina (BSA).

3.2.5 Cálculo de la Actividad Específica de la Peroxidasa

La Actividad Específica se calculó dividiendo el valor de las unidades de actividad enzimática presentes en 1 mL, entre los mg de proteína existente en 1 mL de la suspensión de peroxidasa.

3.2.6 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE)

Se utilizó electroforesis no desnaturizante en gel de poliacrilamida (PAGE, conteniendo 6% y 8% de acrilamida^{57,58}, sin añadir SDS. Para efecto de los corridos electroforéticos se utilizó un sistema de corrido en columna de 5 mm de diámetro por 70 mm de altura, cada una. La electroforesis se llevó a cabo con un voltaje constante de 90 V en un buffer de pH 8.5 conteniendo 3 g/L Tris base, 14,4 g/L de glicina. Después del proceso electroforético los geles fueron incubados y equilibrados en buffer fosfato (pH de 6,0) de 100 mM por un tiempo de 5 - 10 minutos.

Siempre en incubación se agregó el sustrato para el revelado de las bandas de actividad de peroxidasa. Asimismo, se llevó a cabo el revelado de los proteinogramas correspondientes, utilizando para el efecto el azul de Coomassie R-250.

3.2.7 Especificidad de sustrato y determinación de constantes cinéticas

Se utilizaron diferentes concentraciones de los sustratos: guayacol (5 - 30 mM) y H₂O₂ (2 - 30 mM). Se usaron diferentes rangos de concentración. Los valores obtenidos, fueron transformados mediante gráficos de Lineweaver-Burk para obtener los valores correspondientes de K_M y $V_{máx}$.

3.2.8 Efecto del pH y determinación del pH óptimo

Se realizó el estudio de la determinación del pH óptimo, utilizando un sistema buffer de incubación, para un rango de pH de 3,0 a 10.5.

3.2.9 Efecto de la Temperatura

Se determinó el efecto de la temperatura midiendo la actividad enzimática a 25, 35, 50, 65 y 80°C.

3.2.10 Estabilidad al calor

Se determinó la estabilidad de la actividad de las isoenzimas con respecto al calor. Para ello se colocaron alícuotas del extracto isoenzimático en tubos de ensayo y se incubaron a 25, 35, 50, 65 y 80°C durante 30, 60 y 90 minutos. La actividad residual fue determinada a 25°C y pH 6,8 usando el método espectrofotométrico

3.2.11 INMOVILIZACIÓN DE LA PEROXIDASA

Se inmovilizó la enzima Peroxidasa de nabo, por **enlace covalente**, según el esquema propuesto por Arellano¹⁸ y optimizado por Salazar²⁰.

3.2.12 REMOCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.

Para evaluar la remoción de los compuestos fenólicos, se prepararon 3 mL de una solución buffer de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0 que contuvo 0,5 g de la POD de nabo inmovilizada (peso húmedo), alícuotas de 25 µL el agua residual sintética – contaminante fenólico (20,1 mM de fenol). Se

agregó 300 μL peróxido de hidrógeno en una concentración de 12,3 mM e inmediatamente se colocó en agitación a 25°C durante 20 minutos. Se realizaron registros de espectros de absorción y luego se filtró y se separó la POD inmovilizada y se lavó con una solución de NaCl 2M y buffer fosfato 0,01 M - pH 7,0.

El porcentaje de remoción del fenol se determinó a partir de su espectro de absorción UV (Espectrofotómetro GÉNESIS 10 UV) antes y después del proceso de polimerización a una longitud de onda de 270 nm antes y después de haber filtrado el sobrenadante.

Para evaluar la remoción del fenol por la POD de nabo soluble, se procedió de igual manera que con la POD inmovilizada, utilizando 50 μL de la solución enzimática prepurificada.

3.3 ANÁLISIS DE DATOS.

Los resultados se recolectaron en una base de datos y se estimaron promedios y varianzas de las variables en estudio: actividad enzimática en estado soluble e inmovilizada, rendimiento de inmovilización, concentración de proteínas, remoción de compuestos fenólicos, con el objeto de estimar homogeneidad de los promedios y el Test de Proporciones para estimar homogeneidad de frecuencias⁵⁹.

IV RESULTADOS

En la Tabla 3 se observan los datos obtenidos de la Peroxidasa (POD) de nabo (*Brassica napus* L.) relacionada con el peso de muestra y concentración de proteínas. Así, a partir de 2 g de muestra hay 18,06 mg/100mL de proteínas totales, 155 Unidades totales de POD y una actividad específica de 8,58.

En la Figura 6 se observan los perfiles electroforéticos en Gel de Poliacrilamida del extracto sin purificar de la Peroxidasa (POD). La POD presenta un patrón electroforético de tres bandas cuando es sometida a electroforesis de pH 8,3- Gel PAGE- 8% y presenta cuatro bandas cuando es sometida a pH 4,5 con Gel PAGE-6%

En la Figura 7 se muestra el perfil de elución de la Peroxidasa (POD) en carboximetilcelulosa (CM-celulosa), 5mM - pH 4,4 con un gradiente de elución de 5 mM a 0,25 M y pH de 4,4 a 5,2. La fracción I se eluyó en un volumen de 400 mL sin gradiente de elusión, observándose un pico grande que va desde los 40 hasta los 80 mL. La fracción II se eluyó entre 1 020 y 1 060 mL con un gradiente de elución de 5 mM - pH 4,4 y de 0,25 M - pH 5,2. La fracción III se eluyó entre 1 160 y 1 120 mL con buffer acetato 50 mM - pH 5,2.

En la Figura 8, se observa el efecto de la concentración de proteínas sobre la actividad enzimática de Peroxidasa de *B. napus* “nabo”, donde se muestra una proporcionalidad de la velocidad de reacción a medida que se incrementa la concentración de proteína, desde 1,8 hasta 18 ug.

Las Figuras 9 y 10 muestran el K_M y $V_{m\acute{a}x}$, del extracto enzimático sin purificar, respecto a los sustratos Guayacol y H_2O_2 , observándose variaciones en la $V_{m\acute{a}x}$ y la K_M . Se encontró, un K_M de 12,80 mM y una

V_{\max} de 0,105 para guayacol, y un K_M de 2,22 mM y una V_{\max} de 1,095 para H_2O_2 , respectivamente.

En las Figuras 11 y 12, se aprecia el perfil cinético de la actividad de POD frente a la temperatura y su estabilidad térmica, respectivamente. Obsérvese que la actividad enzimática cae rápidamente, cuando ésta es ensayada a 50°C. Por otro lado, la enzima muestra poca estabilidad térmica, como se demuestra su pérdida de actividad en más de 50% al tratar la enzima a 50° C por 30 minutos.

La Figura 13, muestra el perfil cinético de la actividad de Peroxidasa (POD) de nabo a diferentes valores de pH. La enzima presenta un pH óptimo de 6 y la actividad cae rápidamente a valores de pH alcalinos. En la Figura 14, referente al efecto del pH sobre la estabilidad de la POD, se observa una extrema sensibilidad a valores extremos de pH (3 y 9). La enzima es totalmente inestable después de la primera hora de preincubación en valores de pH alejados de su óptimo.

En las Figuras 15 y 16, se muestra el K_M y V_{\max} de la fracción eluída sin gradiente en una columna de carboximetilcelulosa (CM-celulosa), encontrándose valores de K_M y V_{\max} de 10,52 mM y 0,54 para el sustrato guayacol y de 5,0 mM y 0,606 para H_2O_2 , respectivamente.

En la Figura 17, se muestra el perfil cinético de la POD en la fracción eluída sin gradiente. La enzima presenta un pH óptimo alrededor de 7 y cae rápidamente a valores de pH alcalinos.

En la Tabla 4, se observa la Producción de Acoplamiento (PA) y los parámetros del Rendimiento de Inmovilización (RI) de la POD de nabo, encontrándose 7,33 mg de proteína ligada (PL) / g de soporte de coronta de maíz haciendo una PA del 79,35% y respecto al RI (actividad de POD inmovilizada) se encontró un 46,93%, un 24,33% de actividad de POD no

inmovilizada (ENI) y un 28,72% actividad de POD perdida por el proceso de inmovilización (EPPI).

En la Tabla 5, se muestra el porcentaje de remoción de fenol por la Peroxidasa de *B. napus* L. "nabo" en estado soluble e inmovilizada en coronta de maíz, encontrándose un 66,66% y 74,05% respectivamente.

Tabla 3: Unidades de Peroxidasa y Actividad específica de *Brassica napus* L. "nabo" relacionada con peso de muestra y concentración de proteínas.

Muestra (raíz, g)	Proteínas totales (mg)	Unidades totales enzima	Actividad específica	Unidades de Enzima /g raíz
2	18,06	155	8,58	77,5

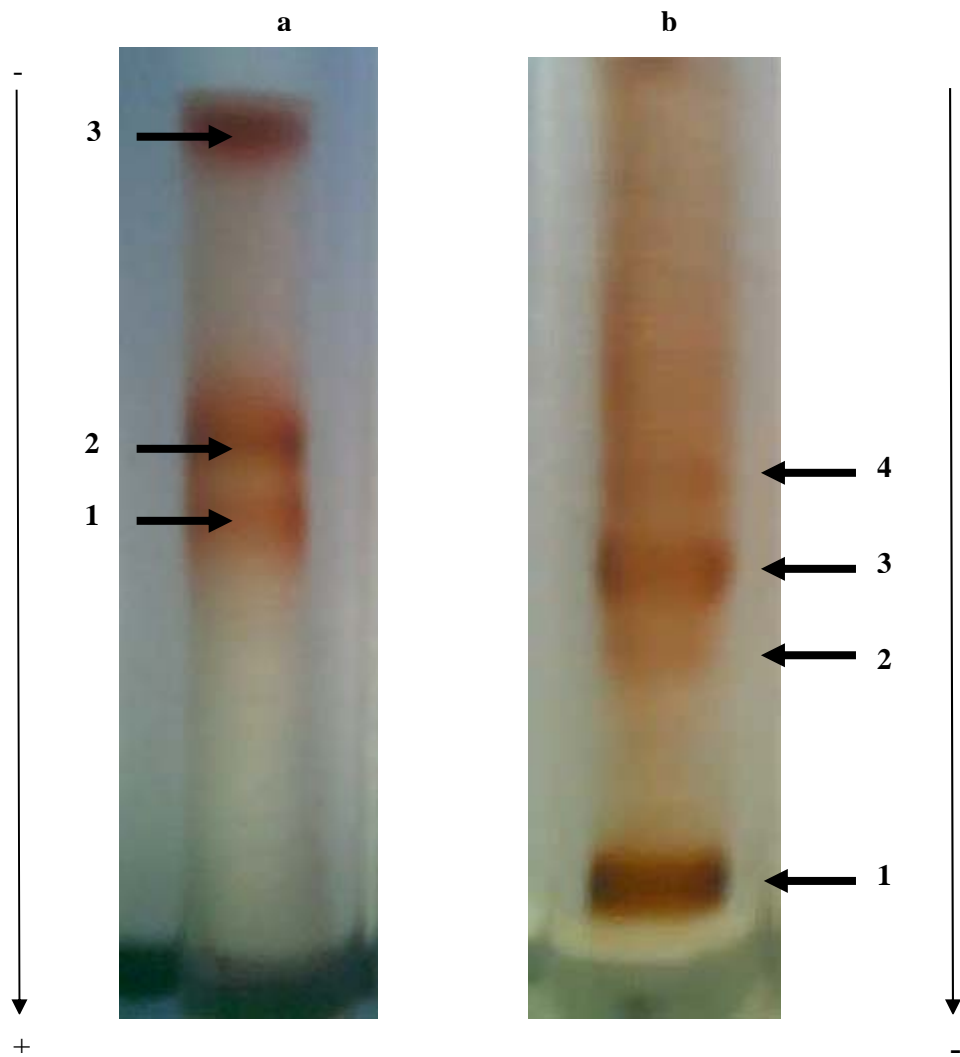


Figura 6. *Enzimograma de Peroxidasa (POD) de nabo en el extracto crudo de enzima: (a) Buffer Tris HCl 0,05M pH 8,3 y PAGE 8%. (b) Buffer acetato 0,05M pH 4,5 y PAGE al 6%.*

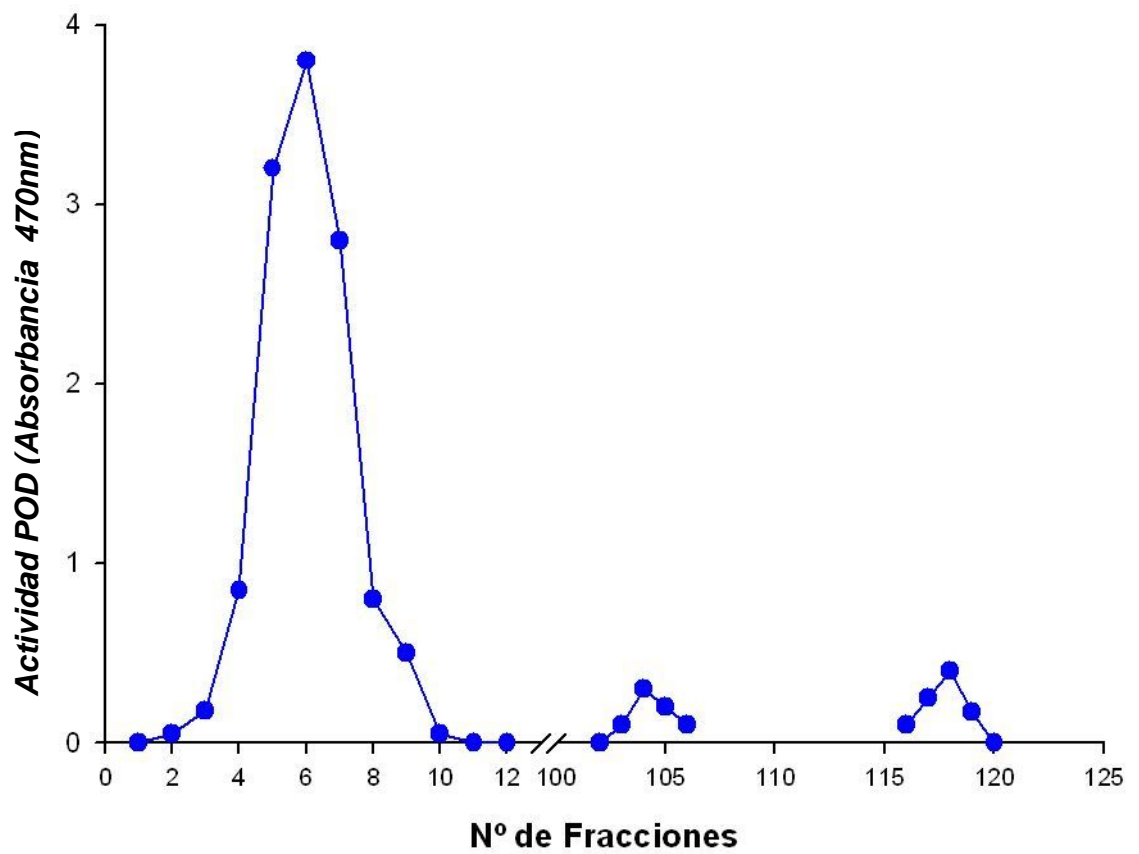


Figura 7. Fraccionamiento en cromatografía con carboximetil-celulosa eluído con buffer acetato 5 mM pH 4,4; un gradiente lineal consistente de buffer acetato 5 mM - pH 4,4 y buffer acetato 0,25M - pH 5,2; y con cambio de gradiente de buffer acetato 50 mM pH 5,2.

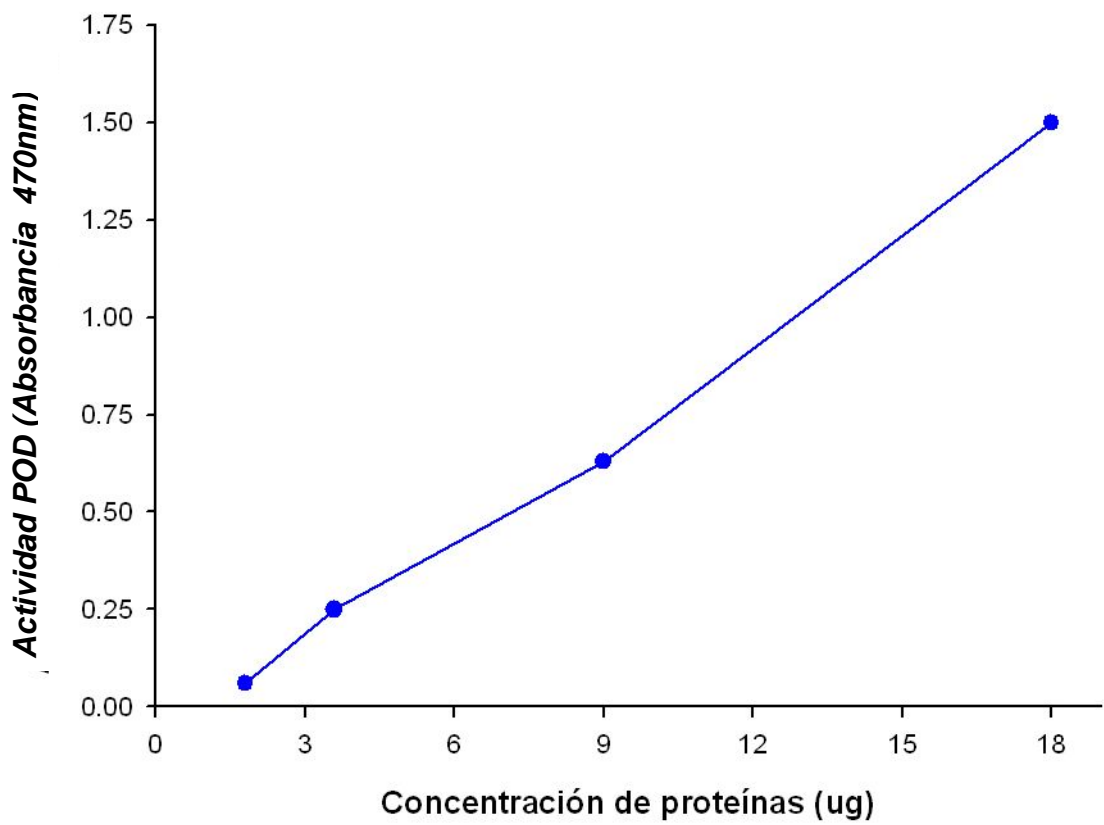


Figura 8. Efecto de la concentración de proteínas sobre la actividad enzimática la Peroxidasa (POD) de *Brassica napus* L. "nabo".

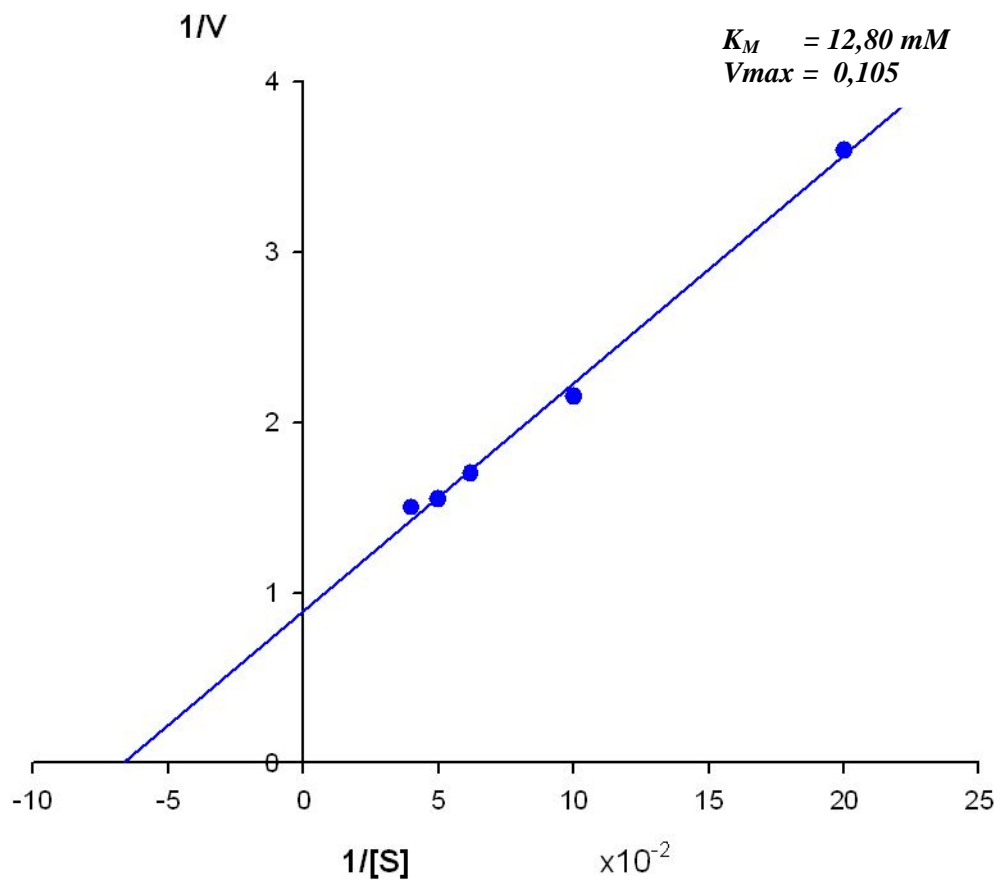


Figura 9. Efecto de la concentración de guayacol sobre la actividad de Peroxidasa (POD) de nabo en el extracto enzimático sin purificar.- Representación de Lineweaver-Burk

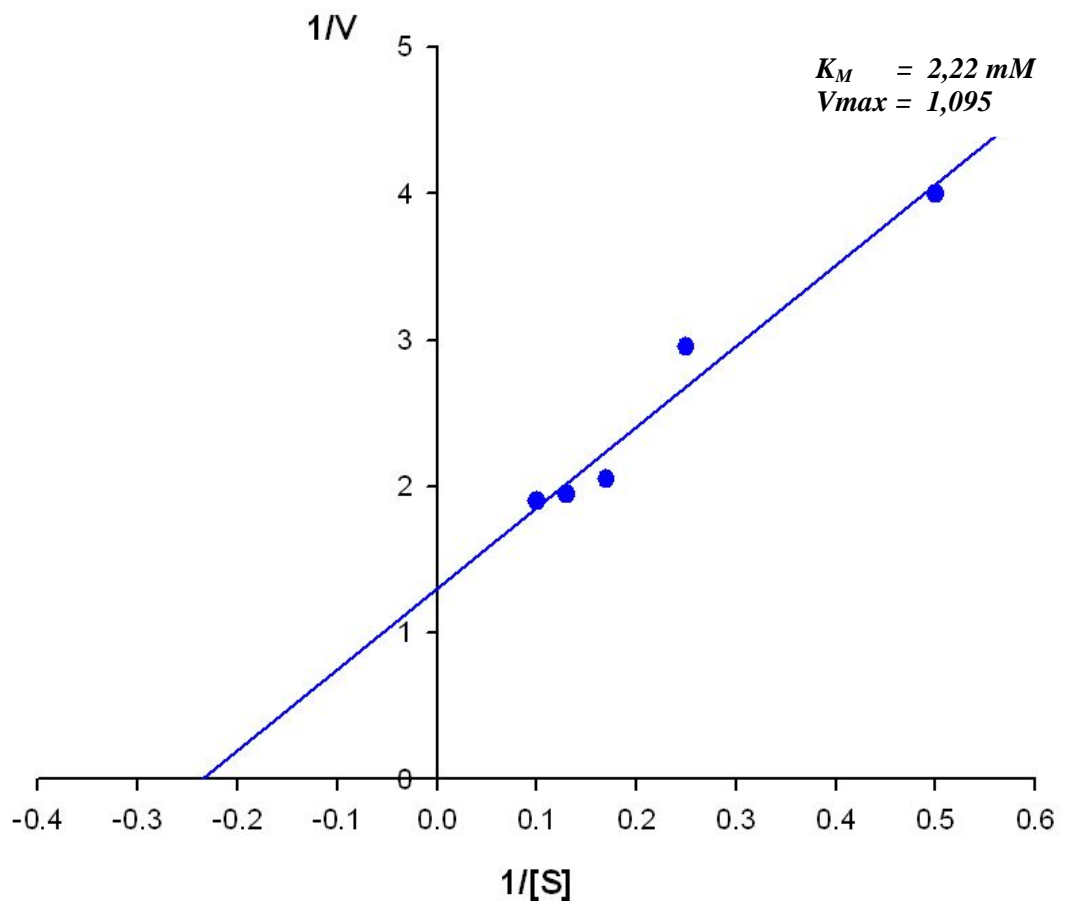


Figura 10. Efecto de la concentración de H_2O_2 sobre la actividad de Peroxidasa (POD) de nabo en el extracto enzimático sin purificar.- Representación de Lineweaver-Burk.

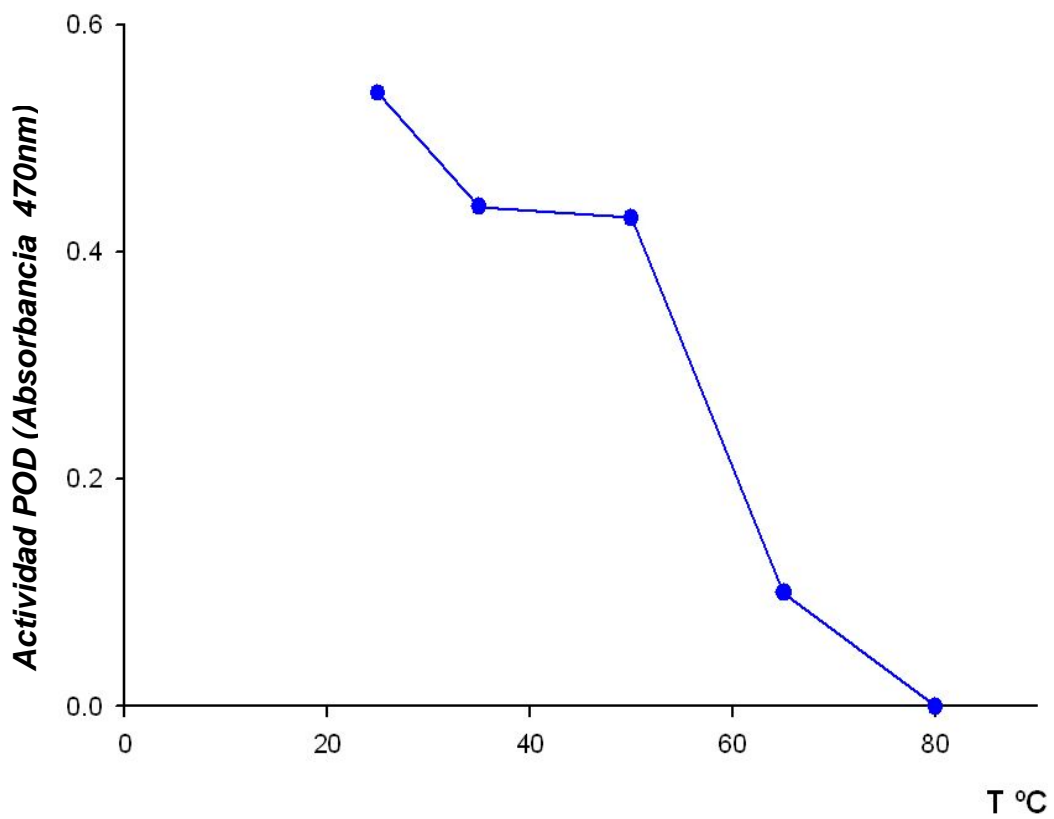


Figura 11. *Efecto de la temperatura sobre la actividad de la Peroxidasa (POD) de nabo, en el extracto enzimático sin purificar.*

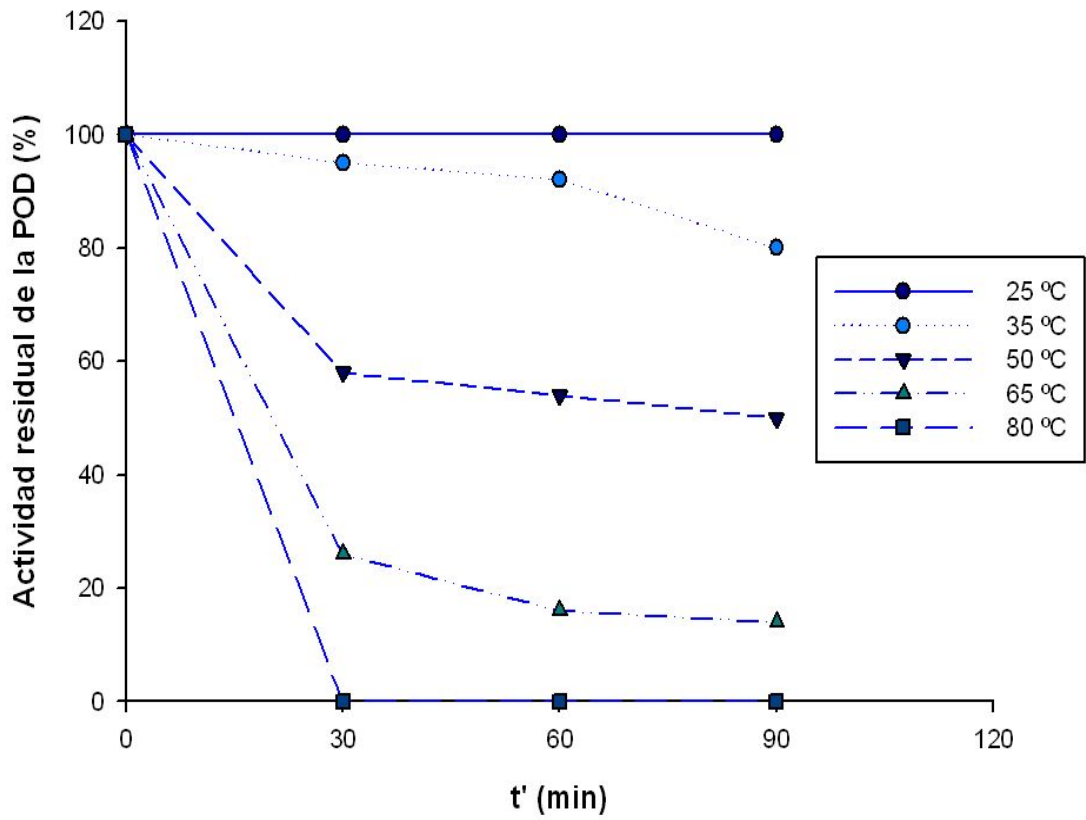


Figura 12. Estabilidad térmica de la Peroxidasa (POD) de nabo en el extracto enzimático sin purificar.

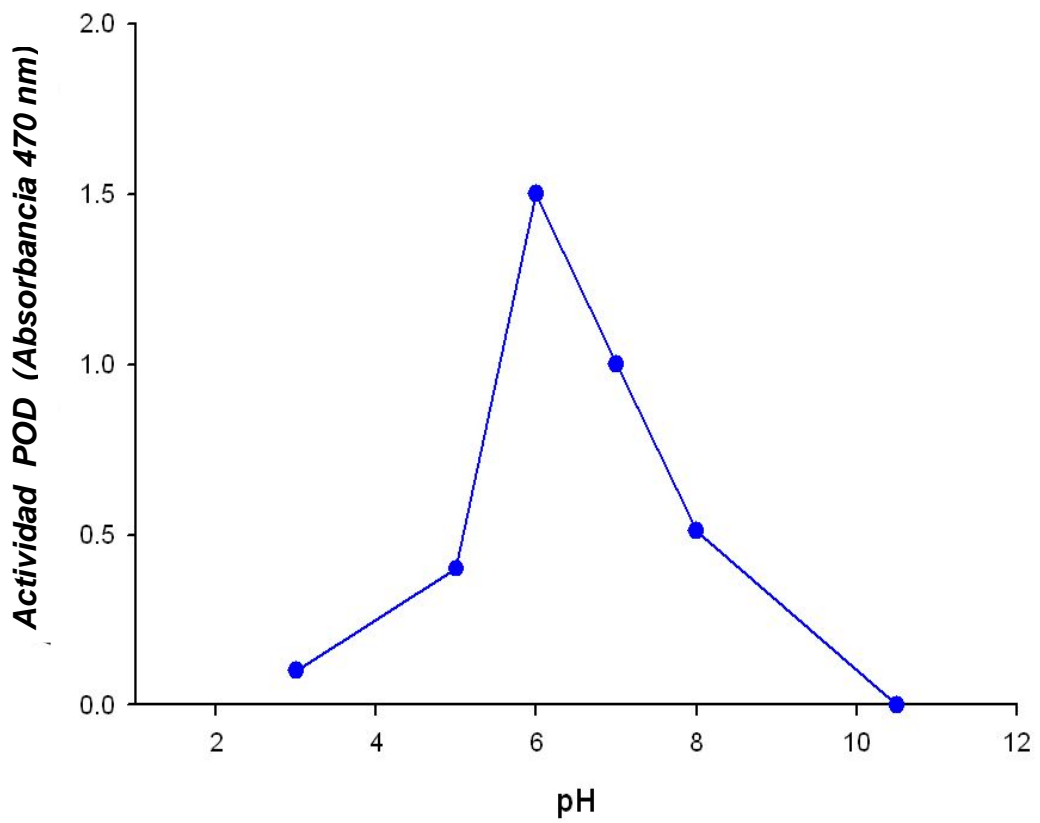


Figura 13. Efecto del pH sobre la actividad de la Peroxidasa (POD) de nabo, en el extracto enzimático sin purificar.

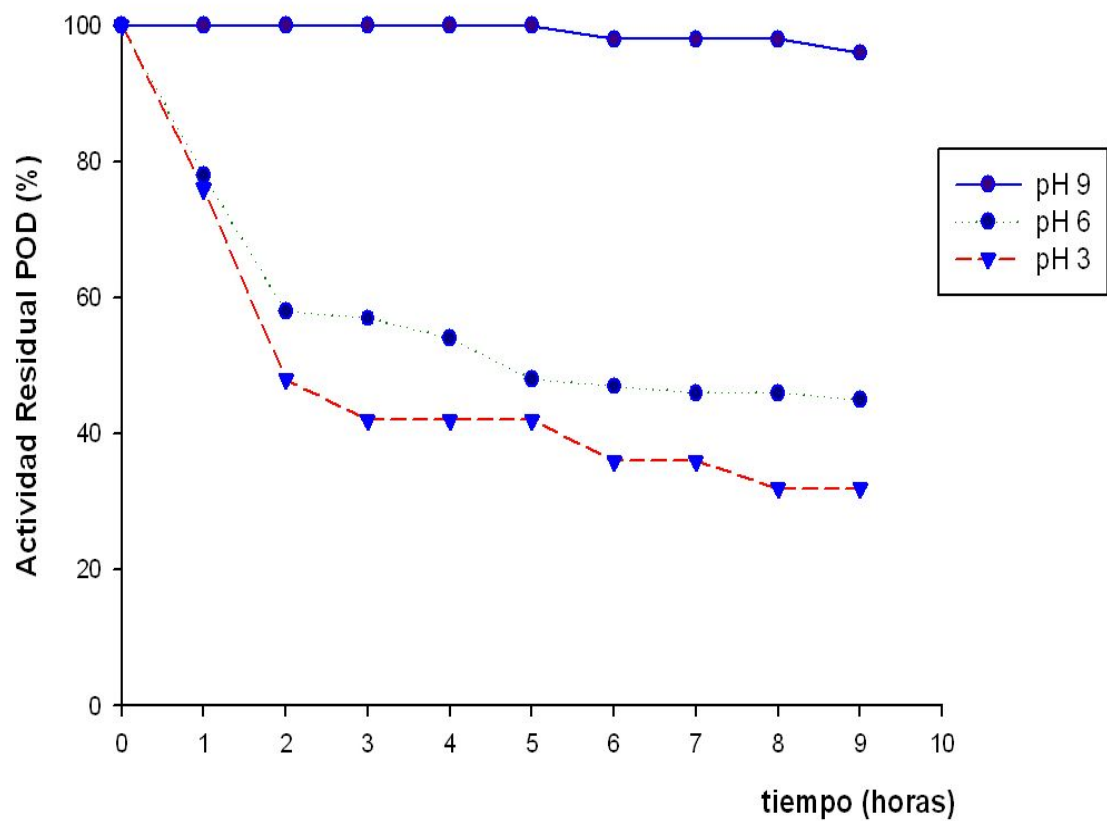


Figura 14. Efecto del pH sobre la estabilidad de la Peroxidasa (POD) de *Brassica napus* L. "nabo".

La enzima fue incubada de 0 a 8 horas a varios pH (3, 6 y 9). Después, ajustando el pH, la actividad residual fue ensayada de acuerdo al método estándar.

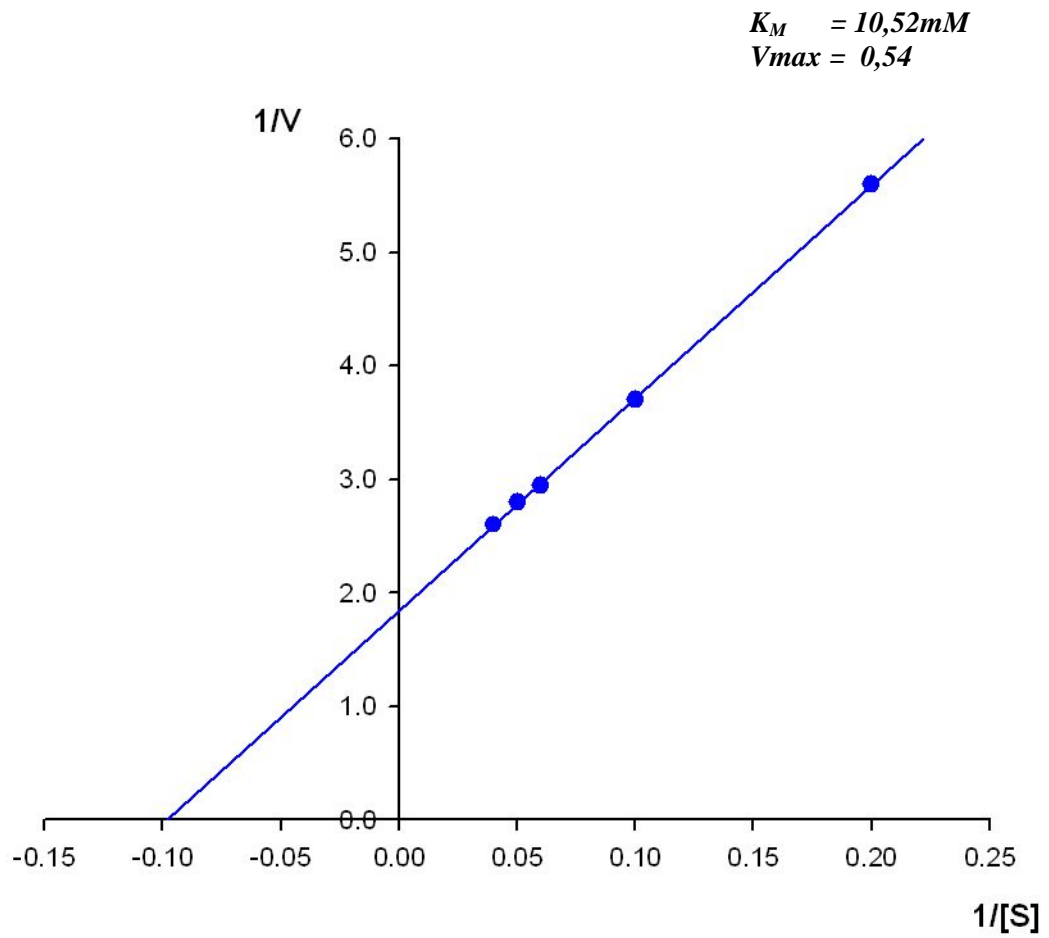


Figura 15. Efecto de la concentración de guayacol sobre la actividad de Peroxidasa (POD) de nabo en la fracción eluída sin gradiente.- Representación de Lineweaver-Burk.

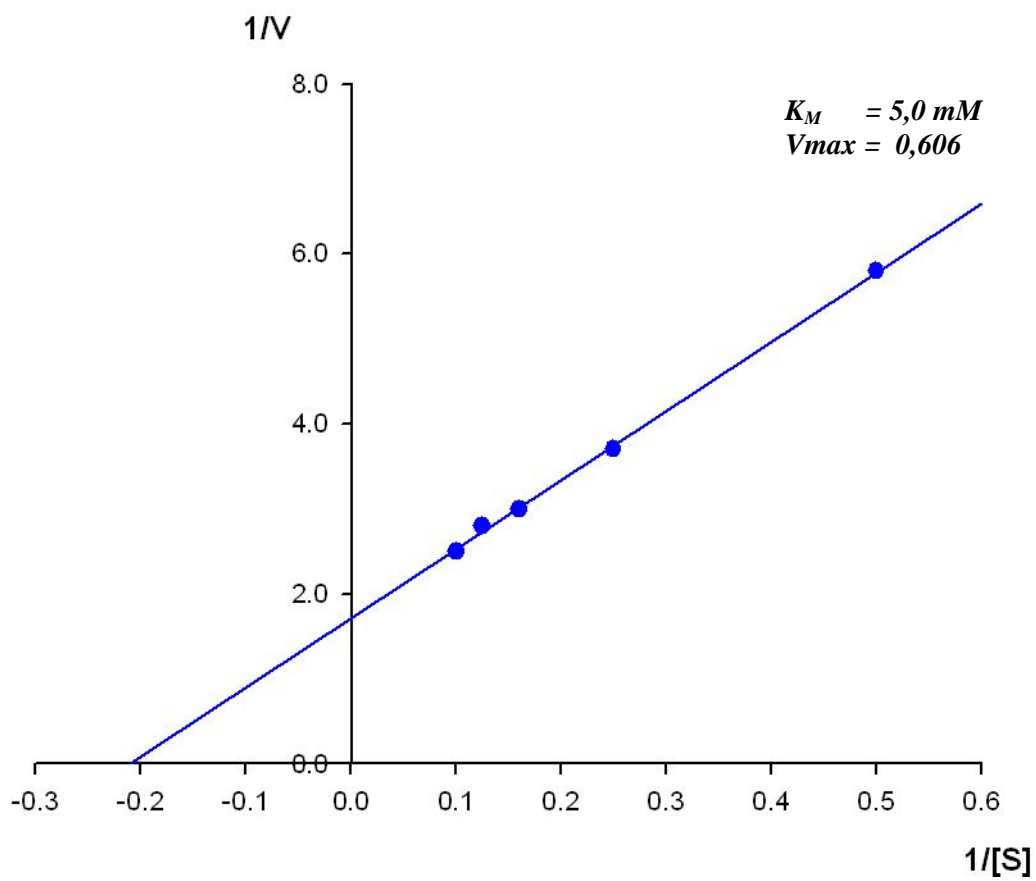


Figura 16. Efecto de la concentración de H_2O_2 sobre la actividad de Peroxidasa (POD) de nabo en la fracción eluída sin gradiente.- Representación de Lineweaver-Burk.

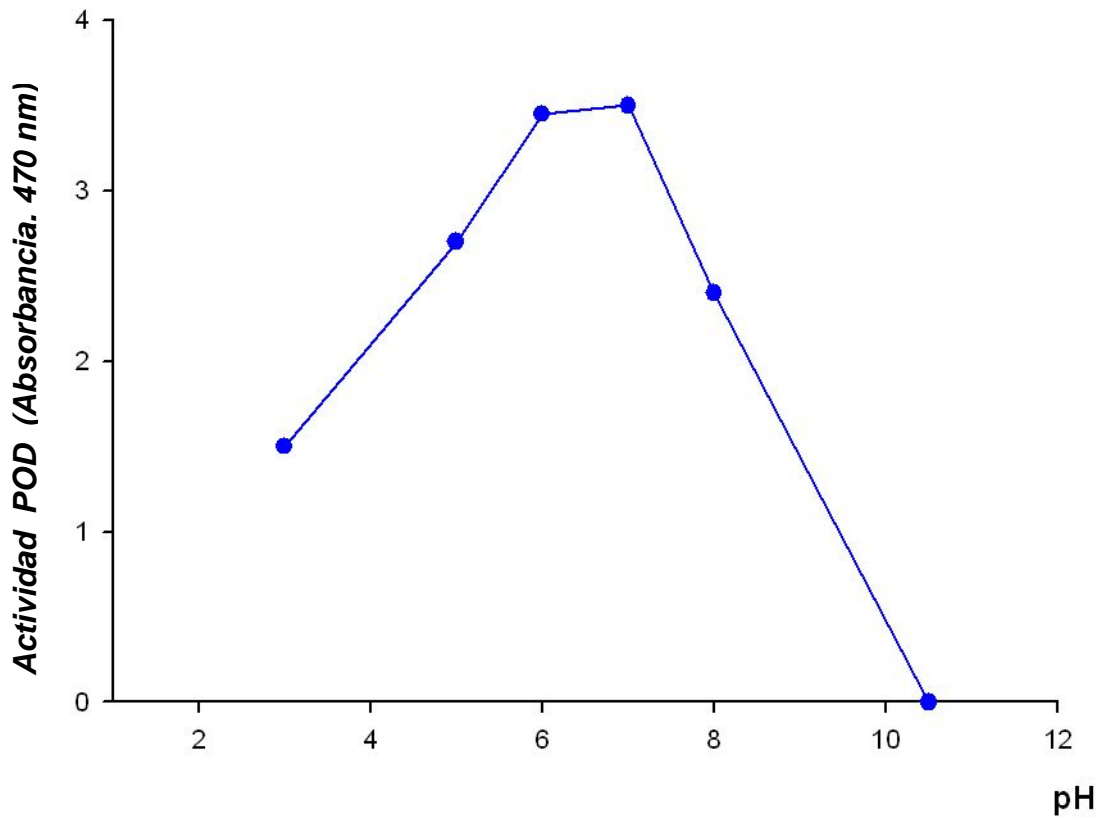


Figura 17. Efecto del pH sobre la actividad de la Peroxidasa (POD) de nabo en la fracción eluída sin gradiente.

Tabla 4. Producción de acoplamiento y parámetros de rendimiento de inmovilización (EI, ENI y EPPI) de la Peroxidasa (POD) de *Brassica napus* “nabo” en coronta de maíz, según esquema de inmovilización propuesto por Arellano, 1993.

PT (mg P/gS)	PL (mg P/gS)	PA (%)	UE antes de inmovilizar	EI		ENI		EPPI	
				UE	(%)	UE	(%)	UE	(%)
9,28	7,40	79,74	1 465,74	698,40	47,65	335,36	22,88	431,95	29,47
9,28	7,27	79,42	1 465,74	685,67	46,78	373,76	25,50	406,30	27,72
9,28	7,32	78,88	1 465,74	679,52	46,36	361,60	24,67	424,62	28,97

PT: Proteína Total puesta a inmovilizar; PL: Proteína ligada; PA: Producción de Acoplamiento; EI: Actividad del enzima inmovilizada; ENI: Actividad del enzima no inmovilizada; EPPI: Actividad de la enzima perdida en el proceso de inmovilización; UE: Unidades de Enzima.

Tabla 5: Porcentaje de remoción de fenol por la Peroxidasa (POD) de *Brassica napus* L. "nabo" soluble e inmovilizada en coronta de maíz.

Contaminante	POD	Absorbancia		% Remoción
Fenol (λ : 270 nm)	Inmovilizada	Inicial: 0,262 (absorbancia al tiempo cero min ó antes de iniciar la reacción)	Final: 0,068 (se filtró después de 15 min de iniciada la reacción)	74,05
	Soluble	Inicial: 0,282 (absorbancia al tiempo cero min ó antes de iniciar la reacción)	Final: 0,094 (se filtró después de 15 min de iniciada la reacción)	66,66

V DISCUSIÓN

La diversidad de hortalizas cultivables y silvestres que crecen en Trujillo-Perú, es muy grande. La mayor parte de éstas especies, en la región, no ha sido estudiada ni biológica ni bioquímicamente. Para evaluar el contenido de Peroxidasa (POD) en hortalizas a fin de encontrar fuentes para la obtención preparativa de esta enzima, se seleccionó la raíz de *Brassica napus* L. (nabo), donde se obtuvo 77,5 Unidades de POD / g de raíz, valores de importancia frente aquellos encontrados en otras fuentes de plantas tropicales⁶. Es indudable que un proceso de purificación más profundo elevaría el contenido de enzima en la muestra, si es que se toma en cuenta que en el proceso de purificación se eliminan contaminantes proteicos no enzimáticos y se eleva la concentración relativa de la POD.

Como puede verse en la Figura 6 y 7 la peroxidasa (POD) de nabo presenta tres isoenzimas a pH 8,3 y cuatro isoenzimas a pH 4,5, es decir, que las isoenzimas de la POD de nabo son aniónicas y catiónicas, presentando cada una de ellas un perfil de desplazamiento característico en el gel de poliacrilamida. Sin embargo, cuando el extracto sin purificar de la POD de nabo es sometido a fraccionamiento en una columna de carboximetilcelulosa (CM-celulosa), en buffer acetato 5 mM-pH 4,4 y con gradiente de elución de buffer acetato 5 mM-pH 4,4 hasta 0,25 M pH 5,2 y con un cambio adicional de buffer acetato 50 mM-pH 5,2, no se pudo obtener el mismo número de fracciones, como aquel de la electroforesis en gel de poliacrilamida. El perfil de elución cromatográfico en carboximetilcelulosa (CM-celulosa) muestra un pico máximo de actividad en las primeras fracciones eluidas (entre 40 y 80 mL, siendo máximo a 60 mL) y 2 picos leves en las últimas fracciones.

Es probable que las fracciones obtenidas en la electroforesis en gel de poliacrilamida, puedan conseguirse realizando un fraccionamiento cromatográfico combinando entre la carboximetilcelulosa (CM-celulosa) y el dimetilaminoetil- celulosa (DEAE-celulosa)⁶⁰.

En relación al K_M y $V_{m\acute{a}x}$ en el extracto sin purificar de la POD de nabo (Figuras 9 y 10), los valores de estas constantes varían según el sustrato empleado; para guayacol fue de 12,80 mM - 0,105 abs/min/g y para el H_2O_2 fue de 2,22 mM – 1,095 abs/min/g, respectivamente. Esto se explica por el hecho de que las PODs son enzimas que degradan el H_2O_2 con la presencia de aceptor, en este caso el Guayacol, pero éste a su vez puede servir de sustrato cuando se emplean mayores concentraciones de éste, manteniendo constante y baja la concentración de H_2O_2 .

La POD de nabo es una enzima termolábil como lo demuestra las Figuras 11 y 12. El perfil de actividad cae dramáticamente cuando la enzima es puesta a reaccionar en un medio con temperatura por encima de 50°C, y las pruebas de estabilidad térmica demuestran que esta enzima puede inactivarse totalmente cuando es sometida a 80°C por 30 minutos. Este comportamiento cinético estaría induciendo a pensar que la POD de nabo no es una glicoproteína.

En relación al efecto del pH sobre la actividad de la POD, la Figura 13 demuestra su perfil de actividad a diferentes valores de pH. En este caso la enzima presenta una máxima actividad a valores entre pH 6 y 7, es decir, que sus centros catalíticos muestran un estado de mayor ionización a estos valores de pH. En relación a la estabilidad al pH, la POD exhibe su máxima actividad a pH 6 (Figura 14), disminuyendo por encima o por debajo de este pH, lo que permite afirmar que sus centros activos se encontrarían totalmente ionizados. Esto se confirmaría cuando se somete a la enzima a condiciones de pH extremos entre 0 a 8 horas de pre-incubación. En esta Figura se puede observar que la actividad enzimática

de la POD disminuye hasta en un 50% cuando es sometida a la acción de pHs extremos (9 y 3) después de una hora de exposición, manteniéndose este % de actividad casi constante durante 8 horas de pre-incubación en estos pH. Esto se explicaría por una interacción entre los protones y los hidroxilos de los medios de pre-incubación con los grupos ionizados del centro activo de la POD. Se puede observar que a valores de pH extremos, la enzima ha adoptado una nueva configuración estereoisomérica, trayendo como consecuencia la reducción de su actividad enzimática establecida en un 50% de la actividad total.

Las Figuras 15 y 16 muestran los valores de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ de la fracción de POD de nabo eluída de una columna cromatográfica de carboximetilcelulosa (CM-celulosa) eluida sin gradiente, con buffer acetato 5 mM - pH 4,4. Aquí el K_M es de 10.52 mM y K_M 5,0 mM para la POD con Guayacol y H_2O_2 , respectivamente. Por otro lado, el perfil de pH (Figura 17) muestra que esta fracción enzimática tiene un pH óptimo de 7.

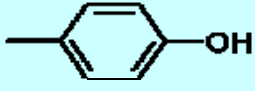
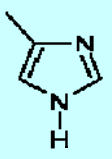
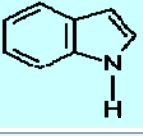
Si se compara el K_M de la POD en el extracto enzimático, sin purificar (Figura 9 y 10) con la fracción eluída de una columna carboximetil - celulosa (CM-celulosa) (Fracción I - Figura 15 y 16), podemos observar que estos son totalmente diferentes, tanto si se usa guayacol o H_2O_2 como sustratos, lo mismo se produce cuando se comparan los valores de pH en estas fracciones enzimáticas. Esto lleva a la conclusión de que la fracción eluída en la columna cromatográfica, es una isoenzima diferente a la enzima en la fracción sin purificar. No se pudo llevar a cabo el estudio cinético de las fracciones II y III debido a que presentaban escasa actividad enzimática.

Para el desarrollo del presente trabajo de Tesis Doctoral, se ha utilizado un soporte de naturaleza celulósica proveniente del desecho agroindustrial^{18, 20}, en los que se utilizaron soportes celulósicos como cáscara de arroz y coronta de maíz, respectivamente; estos soportes tienen la ventaja de estar ampliamente disponibles, ser de bajo costo, de

fácil tratamiento y sobre todo permiten la inmovilización de enzimas. Estos soportes celulósicos, en un medio alcalino a 70°C experimentan una reacción con el acrilamida (proceso denominado de CIANOETILACION), originando así un complejo celulosa – acrilamida, capaz de reaccionar con uno de los grupos aldehído del reactivo multifuncional glutaraldehido (que presenta 2 grupos funcionales aldehído, uno a cada extremo de la molécula), quedando el otro grupo aldehído libre para reaccionar con los grupos amino libres de la enzima, logrando con ello su inmovilización¹⁸.

Los grupos funcionales en las proteínas que participan en el proceso de inmovilización se detallan en la Tabla 6, siendo los grupos AMINOS los que intervienen en el proceso utilizado en la presente Tesis.

Tabla 6 Estructura, Grupos funcionales y presencia de aminoácidos que pueden intervenir en los diferentes procesos de inmovilización⁶¹.

Estructura química	Grupos Funcionales	Presencia en aminoácidos
NH_2	AMINO	AMINOÁCIDOS ALCALINOS
SH	sulfidrilo	cisteína
COOH	Carboxilo	aminoácidos ácidos
	Fenólico	tirosina
-NH-C(=NH)-NH_2	Guanidina	arginina
	Imidazolico	histidina
-S-S-	Disulfuro	cistina
	Indol	triptofano
-S-CH ₃	Tioeter	metionina
-CH ₂ OH	Metil	serina, treonina

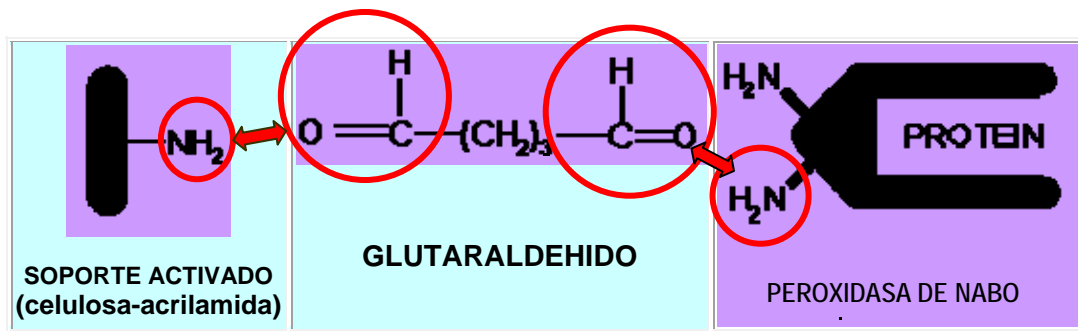


Figura 18 Mecanismo de reacción en el proceso de inmovilización^{18, 20}.

La Tabla 4 muestra la producción de acoplamiento (PA) y el rendimiento de inmovilización (RI) expresado en porcentaje de actividad de la enzima inmovilizada (EI), en el proceso de inmovilización de la PEROXIDASA (POD) en coronta de maíz, habiéndose encontrado valores de proteína ligada (PL) y PA son iguales; esto permite afirmar que se liga un promedio de 7,0 mg de proteínas por gramo de soporte, dando lugar a una PA de aproximadamente 79,50%. Por otro lado, el RI es de aproximadamente 47%. Los valores del porcentaje de actividad de la enzima no inmovilizada (ENI) es de aproximadamente 24%, en tanto que todos los valores del porcentaje de la actividad pérdida de la enzima durante el proceso de inmovilización (EPPI) son también estadísticamente iguales, aproximadamente 28%.

Es importante destacar, que a pesar de ligarse igual cantidad de proteína (aproximadamente 7,0 mg/g soporte), es variable el RI, esto probablemente ocurra debido a que, a la concentración de acrilamida, los grupos hidroxilos (-OH) libres de las moléculas de glucosa que constituyen la celulosa estarían saturados, produciendo un microambiente de moléculas enzimáticas que podrían interaccionar entre sí, aumentando de esta manera la tensión de la proteína ligada y una disminución de la difusión del sustrato en el sistema inmovilizado, y con ello la disminución de su capacidad catalítica²⁰:

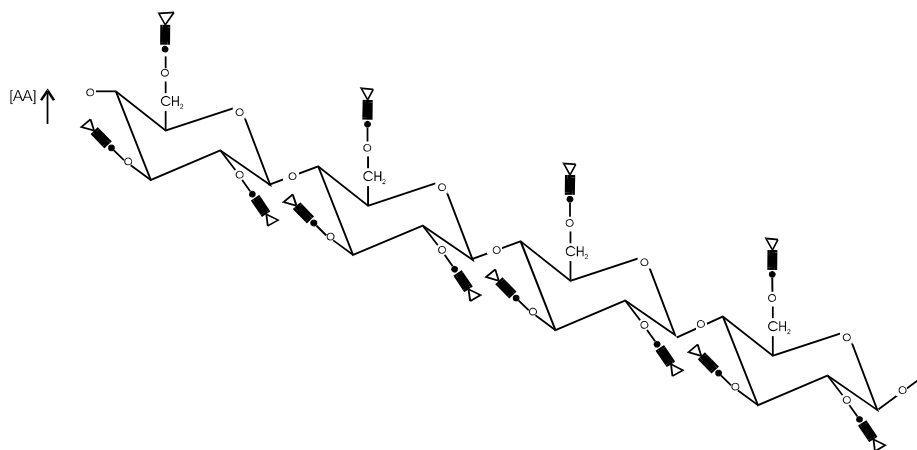
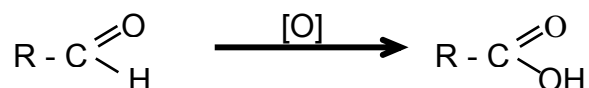


Figura 19 Concentración de acrilamida, los grupos hidroxilos (-OH) libres de las moléculas de glucosa que constituyen la celulosa estarían saturados.

También podría deberse principalmente a dos factores:

Primero, a que los aldehídos son rápidamente oxidados para producir ácidos carboxílicos, ya que tienen un protón que puede ser extraído con facilidad durante la oxidación:



Es posible que los aldehídos se oxidan a través de 1,1-dioles o hidratos intermedios, formados por una adición nucleofílica reversible del agua al grupo carbonilo que luego reacciona como un alcohol primario o secundario normal y se oxida para formar el compuesto carboxílico.

Segundo, a que los aldehídos pueden reaccionar con los -OH libres de la glucosa (celulosa) que no reaccionaron con el acrilamida; formando ACETALES. Esta reacción es favorecida por el pH ácido del buffer de trabajo, donde el oxígeno del carbonilo (nucleófilo) se protona, y el compuesto protonado que resulta es mucho más reactivo, de modo que la adición del -OH ocurre con rapidez⁶². Por otro lado, es conveniente que el glutaraldehído de no oxidarse o no reaccionar con los -OH formando

acetales, se encuentre en exceso respecto al complejo CM.A - NH₂ con la finalidad de asegurar la activación en un 100%.

La pureza de la enzima también influye sobre el rendimiento de inmovilización, ya que si está contaminada, entonces no sólo se inmoviliza la enzima en estudio, sino también otras proteínas contaminantes, y si está pura es más afectada su actividad por el stress que ocasiona el proceso; por ello el grado de pureza puede afectar positiva o negativamente el rendimiento de inmovilización¹⁴. La POD de nabo, utilizada en el proceso de inmovilización, fue parcialmente purificada, presentando otras proteínas contaminantes del proceso, lo que podría explicar en parte la pérdida de actividad enzimática, debido a que también se inmovilizaron las proteínas contaminantes.

Este procedimiento de inmovilización está basado en la reacción química del complejo celulosa-acrilamida activado con glutaraldehído, con grupos aminados de las proteínas (enzimas). Por tanto, es importante que el medio en el que se encuentran el soporte activado y la enzima que se va a inmovilizar, no contenga ningún componente que posea grupos aminos libres, que podrían reaccionar con el agente inmovilizante (el glutaraldehído). Debido a esto, en el procedimiento utilizado se realiza un intenso lavado con el buffer de trabajo para eliminar algún contaminante, pero es probable que el agua destilada con que se prepara el buffer contenga aminos, específicamente en el caso del agua que se ha guardado en recipientes de plástico que liberan dichas moléculas y que además no son eliminadas por una destilación. Esto, probablemente ha influido en cierto grado en la disminución de la actividad de la enzima inmovilizada, no por algún efecto de desnaturalización o inactivación del enzima, sino más bien por competencia de las aminos del agua destilada por el soporte activado.

El estudio del RI, establece que para evaluar sistemas de inmovilización en general, se toman como aceptables a valores superiores al 40%. Por lo regular los valores de RI para enzimas unidas por enlaces covalentes (como el utilizado en este procedimiento), son menores que los obtenidos por otros métodos de inmovilización, sin embargo, el RI obtenido en la inmovilización de la POD de nabo en coronta de maíz, está sobre el 40%, muy por encima de lo obtenidos con quitina (22%)¹⁴.

El análisis de los valores de inmovilización de la POD, cuando se evalúa la PA de la enzima al soporte, explican que sólo se tiene en cuenta el porcentaje de proteína ligada en relación a la proteína total utilizada, no importando si está activa o inactiva dicha proteína; esto permite obtener porcentajes altos de proteína ligada al soporte. El problema es mayor cuando se trabaja con un extracto enzimático prepurificado, ya que también existen proteínas contaminantes que probablemente se ligan o unan al soporte. Por ello, cuando se inmovilizan enzimas, se recomienda expresar los resultados utilizando el RI¹⁴. Para futuros trabajos sobre enzimas inmovilizadas se propone establecer una relación entre RI y PA, a fin de seguir optimizando el proceso y aportar nuevos instrumentos para evaluar el proceso de inmovilización de enzimas, que se está llevando a cabo como una línea de investigación en el Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

Un punto a destacar de esta investigación, es que el empleo de la peroxidasa no sólo se limitaría a cuestiones ambientales, ya que la alta calidad y pureza con la que se puede obtener esta enzima la convierte en candidata para utilizarla también en cuestiones clínicas. Cabe resaltar que se ha obtenido una peroxidasa a bajo costo, con el fin de utilizarla para la remoción de contaminantes del agua de tipo fenólico, y con ello contribuir con una alternativa viable y barata para tratar las aguas residuales de dicho sector. Aún no se ha logrado cumplir tales propósitos en un 100%,

sin embargo, se ha obtenido una enzima similar en características a la peroxidasa patrón de Horseradish, la cual de acuerdo con reportes científicos internacionales es ampliamente utilizada por su versatilidad en diferentes procesos⁶³⁻⁶⁵.

La eficacia en la eliminación de fenol presente en un agua residual sintética, por medio de la Peroxidasa se obtuvo una eficacia del 74% en la forma inmovilizada y aproximadamente un 67% en la forma soluble, lo que demuestra una buena capacidad para eliminar dicho aromático en estudio.

La actividad enzimática de la peroxidasa de nabo inmovilizada en el soporte celulósico, ha sido perfectamente verificada; sin embargo, se tendrá que determinar bajo qué condiciones se deberá almacenar la peroxidasa inmovilizada para que no pierda su actividad enzimática a través del tiempo.

Es importante continuar el estudio de la peroxidasa de nabo inmovilizada en su aplicación con otros compuestos fenólicos tóxicos como el pentaclorofenol y aminas aromáticas, entre otros contaminantes tan peligrosos para nuestro medio ambiente.

También será importante lograr la purificación total de la peroxidasa de nabo (*Brassica napus L.*) y su almacenamiento sin pérdida de actividad enzimática, ya que esta enzima abre un amplio campo para su aplicación en la industria química, de los alimentos y en la medicina.

Finalmente, establecer una metodología optimizada mediante el uso de la peroxidasa de nabo inmovilizada para tratar aguas contaminadas a nivel industrial, haría que este producto peruano tan poco utilizado sea una alternativa para su explotación con esta finalidad en nuestro país.

VI PROPUESTA

Como ya se ha visto, son muchos los elementos que deterioran el medio natural, y muchas las actividades del hombre que tienen consecuencias negativas en los recursos naturales de la Tierra. Entonces, cada vez es mayor el número de alarmas que alertan de los riesgos, no existe ningún medio que no esté afectado, o con grandes posibilidades de afectarse, y no existe ninguna solución que garantice la plena resolución de los peligros.

El vertido de sustancias tóxicas se hace cada año más incalculable, los organismos nacionales e internacionales publican cifras aproximadas, que siempre se refieren a millones de toneladas. Esta llegada de miles de compuestos químicos, creados en laboratorios y utilizados por las industrias, altera el funcionamiento de los ecosistemas y atenta contra la salud de sus habitantes.

Son cada vez mayores las conexiones entre contaminación y salud, ya nadie duda, que no se puede soslayar el hecho de que un ambiente contaminado provoca numerosas enfermedades, desde las relacionadas con la piel o el aparato respiratorio (alergias, dermatitis, asma), a procesos mucho más graves de tipo degenerativo. Como consecuencia de esta situación, la comunidad científica y los poderes públicos deben establecer estrategias para luchar contra la contaminación y su repercusión en nuestra calidad de vida.

Para lograr estas metas, tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁶⁶ como la Agencia Europea del Medio Ambiente⁶⁷, han establecido programas a escala mundial que propugnan un ambiente más sano. En ellas se analizan los distintos componentes del medio natural, y su relación con la deposición de residuos peligrosos.

Entre estos medios está la atmósfera, el agua, tanto superficial como subterránea, y el suelo.

Por ello, este trabajo pretende dar una visión general de las soluciones que se están estudiando, para la recuperación de ambientes contaminados, concretamente la utilización de técnicas biorremediadoras, es decir, tratamiento de un ambiente determinado mediante procesos biológicos.

Así, los hallazgos de la presente investigación, sobre la “Eficacia de la remoción de compuestos fenólicos de un sistema acuoso residual sintético, por la Peroxidasa de *Brassica napus* L. “nabo” inmovilizada en coronta de *Zea mays* “maíz”, demuestra marcadamente que esta enzima SI es capaz de eliminar el fenol de residuos líquidos. Si bien es cierto los resultados obtenidos son a nivel de laboratorio, es posible realizar un escalamiento a nivel de planta de remoción de compuestos fenólicos; en tal sentido sería del caso establecer como prioridad alguna Ordenanza de Sedalib, Municipal, Regional o Nacional a fin de que se empiece a analizar esta propuesta, toda vez que va a solucionar un problema de contaminación del agua.

Sin duda, una de las aportaciones que deja la obtención de la peroxidasa de nabo es en beneficio del medio ambiente, en virtud de que puede ser utilizada en procesos para purificar las aguas residuales, especialmente aquellas de la industria textil, pues se sabe que la mayor parte de las empresas del ramo arrojan tales residuos a los afluentes sin previo tratamiento y no existe una Norma oficial, que exprese las especificaciones correspondientes para tratar las aguas contaminadas con colorantes textiles. Como se sabe la industria textil no purifica ni trata sus aguas residuales porque no existe la metodología especializada para hacerlo, o la que existe es muy cara.

De ahí el interés por desarrollar un método barato y eficiente, para la remoción de compuestos fenólicos del agua residual industrial y doméstica utilizando la Peroxidasa de nabo. Una aportación más del presente trabajo, está relacionada con aspectos económicos y de producción del cultivo de nabo, que consistiría en impulsar la producción de este vegetal en diversas regiones del Perú y contribuir a la mejora económica de aquellos campesinos dedicados a su siembra.

Se plantea desarrollar el **Diseño de un reactor para la remoción de contaminantes fenólicos, utilizando la peroxidasa de nabo en solución e inmovilizada.**

Objetivo:

- Diseño de un reactor para la remoción de fenol disuelto en agua utilizando la peroxidasa de nabo en solución e inmovilizada en coronta de maíz, para el tratamiento de aguas residuales de la industria.

Alcance:

- Degradación de compuestos fenólicos presentes en aguas residuales, utilizando peroxidasa obtenida de nabo.
- Aumentar el valor agregado al cultivo de nabo.

Infraestructura requerida:

- Equipo para aislamiento de enzimas; equipo para inmovilizar enzimas; reactor de capacidad de 10 litros.

Beneficios esperados:

- Evitar que aguas contaminadas con fenoles y derivados, sean vertidas a los afluentes sin el tratamiento adecuado.
- Comercializar Peroxidasa de nabo.

Metas:

- Diseñar un reactor de 10 litros de capacidad.
- Lograr remociones de fenol del 98% en agua con concentraciones de 200 mg/L del contaminante.
- Publicar los resultados de la investigación, por lo menos, en dos eventos científicos por año.

El reactor TORUS⁶⁸ (ver anexo), sería el utilizado para la remoción de compuestos fenólicos, ya que se ha demostrado que la peroxidasa de horseradish en este reactor presenta buena capacidad de polimerización y por lo tanto, buena remoción de fenoles. Sin embargo, se tendría que realizar un escalamiento a 10 L, por que solo se ha trabajado con un volumen de trabajo a nivel de laboratorio equivalente a 100 mL.

Este reactor, estaría ubicado en laboratorio de Tecnología enzimática del Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo; y se plantea comprometer a la Empresa SEDALIB S.A. –Trujillo y Municipalidad Provincial de Trujillo a fin de realizar un trabajo interinstitucional y multidisciplinario.

Hasta este momento se ha demostrado que la peroxidasa obtenida de nabo e inmovilizada en coronta de maíz, tiene un gran potencial para ser aplicada en la remoción de compuestos de tipo fenólico, como contaminantes en las aguas residuales industriales. Se abre probablemente, un gran campo de aplicación para otros contaminantes importantes, como las aminas aromáticas y para aquellos procesos donde es utilizada la peroxidasa patrón *Horseradish*. De esta manera, se pretende, proponer un método alternativo para la descontaminación de aguas residuales, que contengan sustancias fenólicas tóxicas, lo que ofrece nuevas alternativas para la reutilización del agua.

VII CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados hallados en esta experiencia en las condiciones trabajadas, se concluye:

La POD de nabo presenta siete isoenzimas reveladas por electroforesis en PAGE, cuatro fracciones a pH 4,5 y tres fracciones a pH 8,3

El extracto de Peroxidasa sin purificar presenta muestra valores de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ de 12,80 mM y 0,105 para guayacol, y de 2,22 mM y 1,095 para H_2O_2 , en tanto la fracción eluída sin gradiente, presenta valores de 10,52 mM y 0,54 para guayacol y de 5,0 mM y 0,606 para H_2O_2 , respectivamente.

Los extractos de Peroxidasa sin purificar y de la fracción eluída sin gradiente, mostraron poca estabilidad térmica y disminución notoria de su actividad enzimática a 50°C.

Los extractos de Peroxidasa sin purificar y de la fracción eluída sin gradiente, mostraron semejante perfil de pH, siendo el óptimo entre 6 y 7, perdiendo su actividad y estabilidad a pH extremos.

El procedimiento de inmovilización de la peroxidasa de nabo permitió una producción de acoplamiento del 79% , un rendimiento de inmovilización de 47% y la actividad enzimática que se pierde durante este proceso de inmovilización es aproximadamente del 28%.

La remoción de fenol es más eficaz por la peroxidasa de nabo inmovilizada (74%) respecto a la peroxidasa soluble (66,6%).

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 Krylov, S.N.; Dunford, H.B. Reaction of horseradish peroxidase with indole-3-acetic acid. *Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology*, Univ. Agricultura, Viena y Univ. Geneva: Geneva-Vienna. 1996. 59.
- 2 Farrell R.L.; Murtagh, K. E.; Tien, M.; Mozuch, M. D.; Kirk, T. K. Physical and enzymatic properties of lignin-peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* 1989. 11, 322.
- 3 Wakamatsu, K.; U. Takahama. 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isoenzymes in carrot callus. *Physiol. Plants.* 1993. 88, 167.
- 4 Tijssen, P. *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*, Elsevier: Amsterdam. 1985.
- 5 Munteanu, F. D.; Lindgren, A.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Csoregi, E.; Ciucu, A.; van Huystee, R. B.; Gazaryan, I. G.; Lagrimini, L. M. Bioelectrochemical monitoring of phenols and aromatic amines in flow injection using novel plant peroxidases. *Anal. Chem.* 1998. 70, 2596.
- 6 Sakharov I.Y.; Bautista G.; Sakharova I.V.; Rojas A.; Pletjuschkina O.Y. Peroxidasa de plantas tropicales. *Rev. Colombiana de Química. Bogotá (Colombia).* 2001. 28, 1.
- 7 Mejía, C.L.; Regalado C.; García B. Purificación de peroxidasa de nabo. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 2003. 51.
- 8 Duarte - Vázquez, M.A. Purificación, caracterización bioquímica y estudios de cristalización de peroxidasa de nabo. PROPAC, UAQ, Querétaro, (Méjico). 2002.
- 9 Regalado C.; García-Almendárez B.E.; Duarte-Vázquez M.A. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem. Rev.* 2004. 3(1-2): 243-256.
- 10 Ortega, M.; Duarte-Vázquez M.A.; García B.E.; Regalado C. Eliminación de Compuestos fenólicos mediante su polimerización catalizada por peroxidasa de nabo (*Brassica napus* L. Var. purple top white globe). UAQ. Querétaro, (Méjico). 2003.
- 11 Regalado, C.; Quintanilla F.; García B.E. Immobilization of turnip peroxidase for phenolic compounds removal from a model aqueous system by oxidative polymerization. IFT Annual Meeting. Las Vegas, NV, USA. 2004. July 12-16, 250.
- 12 Mota JD.; Quintanilla F.; Regalado C. Inmovilización de peroxidasa de nabo para remoción de compuestos fenólicos de un sistema acuoso modelo por polimerización oxidativa. PROPAC. UAQ. Querétaro (Méjico). 2004.
- 13 Scragg, A. *Biología para ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos.* Edit. LIMUSA S.A. México (México). 1996.
- 14 Illanes, A. *Biología de enzimas.* Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso (Chile). 1994.

- 15 Ilich, S. Estabilización e Inmovilización de la Pululanasa (EC. .2.1.41) de *Klebsiella pneumoniae* por modificación química. Trabajo de habilitación para promoción docente a la Categoría de Prof. asociado. Universidad Nacional de Trujillo (Perú). 1990.
- 16 López, A.; Quintero R. Tecnología Enzimática. Aplicaciones en alimentos y medicina. Coordinación de la investigación Científica-Programa Universitario. Universidad Nacional Autónoma de México (México). 1987.
- 17 Roing, M.; F. Bello y J. Cachaza 1990. Biocatalizadores Inmovilizados (II). Efecto de la inmovilización sobre la actividad enzimática. Rev. Industria Farmaceutica. Julio-Agosto 1990. Salamanca (España) 29-40.
- 18 Arellano, J. Inmovilización de β -galactosidasa (E.C.3.2.23) de *Kluyveromyces sp* en cáscara de arroz. Tesis para optar el grado de Maestro en Microbiología. Universidad Nacional de Trujillo (Perú). 1993.
- 19 Arellano, J.; Salazar M. Inmovilización del alfa-amilasa en serrín. REBIOL 15 (1-2): 1-7. Trujillo (Perú). 1996.
- 20 Salazar, M. Optimización de la concentración de la β -galactosidasa y reactantes durante su inmovilización en coronta de maíz. Tesis para obtener el Grado de Maestro en Ciencias, mención Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo, (Perú). 1998.
- 21 Arellano, J.; Salazar M.; Llenque L.; Espinoza S. Inmovilización de la β -galactosidasa de *Aspergillus niger* en escamas de pescado. I Congreso Peruano de Biotecnología y Bioingeniería. Trujillo (Perú). 1998.
- 22 Olivares, M.; Arellano J.; Salazar M. 1996. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* inmovilizada en cáscara de arroz. REBIOL. 1996. 16 (1 y 2): 5 – 9.
- 23 Llenque, L.; J. Arellano; R. Segura y M. Salazar. Determinación de las condiciones cinéticas óptimas de la invertasa inmovilizada en cáscara de arroz. I Congreso Peruano de Biotecnología y Bioingeniería. Trujillo, (Perú). 1998.
- 24 Ruiz W.B. Inmovilización covalente de la enzima polifenol oxidasa de *Agaricus bisporus* comercial utilizando como soporte celulosa activada con acrilamida y Glutaraldehído. Tesis para obtener el Grado de Maestro en Ciencias, mención Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo, (Perú). 2000.
- 25 Arroyo M. Inmovilización de enzimas, fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 1988. 39:2; 23-39..
- 26 Godfrey, T.; West S. Industrial Enzymology. Mac Millan Press. Ltda. London, England. 1996
- 27 Dawson, J.H. Probing structure-funtion relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science*.1988. 240, 433 – 439.
- 28 Li H.Y.; Poulos T.L. Structural variation in heme enzymes: A comparative analysis of peroxidase on P450 crystal structure. 1994. 2, 461-464.
- 29 Valderrama B.; Ayala M.; Vázquez-Duhalt R. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry and Biology*. 2002. 9:555–565.

- 30 Wariishi, H.; Gold M.H. Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.* 1990. 265, 2070 – 2077.
- 31 Welinder, K.G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1992. 2, 388 – 393.
- 32 Kimura, S.; Ikeda-Saito M. Human myeloperoxidase and thyroid peroxidase, two enzymes with separate and distinct physiological functions, are evolutionarily related members of the same gene family- proteins. 1988. 3, 113 – 120.
- 33 Welinder, K.G.; Gajjhede M. 1993. Structure and evolution of peroxidases. University of Copenhagen and University of Geneva, Geneva. 1993. 35 – 42.
- 34 Hatakka, A. Lignin modifying enzymes from selected white-rot fungi-production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol.* 1994. 161, 221 – 227.
- 35 Campa A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. *Peroxidases in chemistry and biology*, CRC Press, Boca de Raton, USA. 1991. 25-50.
- 36 Finzel, B.C.; Poulos, T.L.; Kraut, J. Crystal structure of yeast cytochrome C peroxidase. *Biol. Chem.* 1984. 259, 13027-13036.
- 37 Vitello, L.B.; Erman J.E.; Millar M.A.; Wang J.; Krant J. Effect of arginine-48 replacement on the reaction between cytochrome c peroxidase and hydrogen peroxide. *Biochemistry.* 1993. 32, 9807 – 9818.
- 38 Erman J.E.; Vitello L.B.; Millar M.A.; Shaw A.; Brown K.A.; Krant J. Histidina 52 is a critical residue for rapid formation of cytochrome c peroxidase compound I. *Biochemistry.* 1993. 32, 9798 – 9806.
- 39 Edwards S.L.; Xuong N.H.; Hamlin R.C.; Krant J. Crystal structure of cytochrome C peroxidase compound I. *Biochemistry.* 1987. 26, 1503 – 1511.
- 40 Banci, L. Structure properties of peroxidase. *J. Biotechnology.* 1997. 53, 253 – 263.
- 41 Poulos, T.L.; WR. Patterson y M. Sundaramoorthy. 1995. The crystal structure of ascorbate and manganese peroxidase: The role non-haem metal in the catalytic mechanism. *Biochem. Soc. Trans.* 1995. 23, 228 – 232.
- 42 Fang, H.; Chen, O. *Water Research*, 1997, 31, 2229-2242.
- 43 Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (**IPCS**). FENOL ICSC: 0070. Fichas Internacionales de Seguridad Química. 1992.
- 44 Cerna L. Determinación del período crítico de competencia de las malezas con el cultivo de nabo (*brassica napus* L.) en la costa liberteña. *Rev. Antenor Orrego*, Trujillo. 2003. 14(21); 15-28.
- 45 Mostacero J.; Mejia F.; Gamarra O. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú, Trujillo. 2002.
- 46 Taylor, R.F. *Protein Immobilization: fundamentals and applications*, Marcel Dekker, New York, USA. 1991.
- 47 Martinek, K.; Mozhaev V. Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry. *Adv. Enzymol.* 1987. 57: 179-249.

- 48 Hornby, W.E.; M.D. Lilley y EM. Crook. Some changes in the reactivity of enzymes resulting from their chemical attachment to water-insoluble derivatives of cellulose. *Biochem. J.* 1998. 107: 669-674.
- 49 Shewale J. G. and Naik S. R. Immobilized enzymes-applications. *Journal of Scientific Industrial Research.* 1991. 50. 947-958.
- 50 Maloney S. W.; Manem J.; Mallevalle J.; Fiessinger F. The potential use of enzymes for removal of aromatic compounds from water. *Wat. Sci. Tech.* 1984. 17, 273-278.
- 51 Al/Kassim L.; Taylor K.E.J. Enzimatic removal of selected aromatic contaminants from wastewater by a fungal peroxidase from *Coprinus macrorhizus* in batch reactors. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1994. 61, 179-182.
- 52 Klibanov A. M., Tsu-Man T. M. and Scott K. P. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal conversion waste waters. *Science.* 1983. 221. 259-61.
- 53 Arseguel D., Baboulene M. Removal of phenol from coupling of talc and peroxidase. Application for depollution of waste water containing phenolic compounds. *J. Chem. Biotechnol.* 1994. 61. 331-335.
- 54 Zaborsky O. R. Immobilized enzymes. CRC Press, Cleveland. 1973.
- 55 Civello P.M.; Martínez G.A.; Chaves A.R.; Añon M.C. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch): Partial purification and determination of some properties. *J. Agric. Food Chem.* 1995. 43, 2596.
- 56 Bradford, M.M. A rapid and sensitive Method for the quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Bioch.* 1976. 72, 248-254.
57. Davis, B. Disc electrophoresis - II. Method and application to human serum proteins. *Gel Electrophoresis. Annals of the New York Academy of Sciences.* 1964. 121 (2): 405-426.
58. Choi J.K., Yoon S.H., Hong H.Y., Choi D.K.; Yoo G.S. A modified Coomassie Blue staining of proteins in polyacrilamide gels with Bismark Brown R. *Anal. Biochem.* 1996. 236: 82-84.
59. Steel, R.; Torrie J. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2da. Ed. Edit. Mc GRAW-HILL. Latinoamericana, S.A. Bogotá (Colombia). 1985.
60. Shannon L.M.; Kay E.; Lew J.Y. Peroxidases isoenzymes from Horseradish Roots. Isolation and physical properties. *J. Biol. Chem.* 1966. 241, 2166-2172.
61. Bungay H.R. Basic Biochemical Engineering. BiLine Associate. 1989.
62. McMurry J. Química Orgánica. 5ª ed. Editorial Thomson International. México. 2000.
63. Duarte-Vázquez, M.A.; Ortega-Tovar M.A.; García-Almendárez B.E.; Regalado C. Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L. var purple top white globe) peroxidase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2003. 78(1): 42-47.

64. Zhang T.; Zhao Q.; Huang H.; Li Q.; Zhang Y.; Qi M. Kinetic study on the removal of toxic phenol and chlorophenol from waste water by horseradish peroxidase. *Chemosphere*, 1988. 37 (8): 1571-1577.
65. Stanisavljević M.; Nedić L. Removal of phenol from industrial wastewaters by horseradish (*Cochlearia armoracia* L) peroxidase facta universitatis Series: Working and Living Environmental Protection. 2004. 2, (4): 345 – 349.
66. World Health Organisation Regional Office for Europe: Targets for Health for All. Summary of the updated edition. Copenhagen. WHO. 1991.
67. Agencia Europea de Medio Ambiente: *Señales ambientales 2000*. Informe de la Agencia Europea de Medio Ambiente basado en indicadores. Ed. Secretaría General Técnica. Ministerio de Medioambiente. 2001. 109 pp.
68. Pramparo L.M. Study of a Torus for the enzymatic elimination of phenol. Dissertation submitted to obtain the degree Doctor in Chemical Engineering from Universitat Rovira i Virgili. Tarragona, Spain. 2008. 195 pp.

ANEXO

Reactor torus⁶⁸

Este, es un reactor utilizado para eliminar fenol, a nivel de laboratorio y utiliza un volumen de trabajo de 100 mL, por lo que será necesario realizar un escalamiento para un volumen total de trabajo equivalente a 10 L.

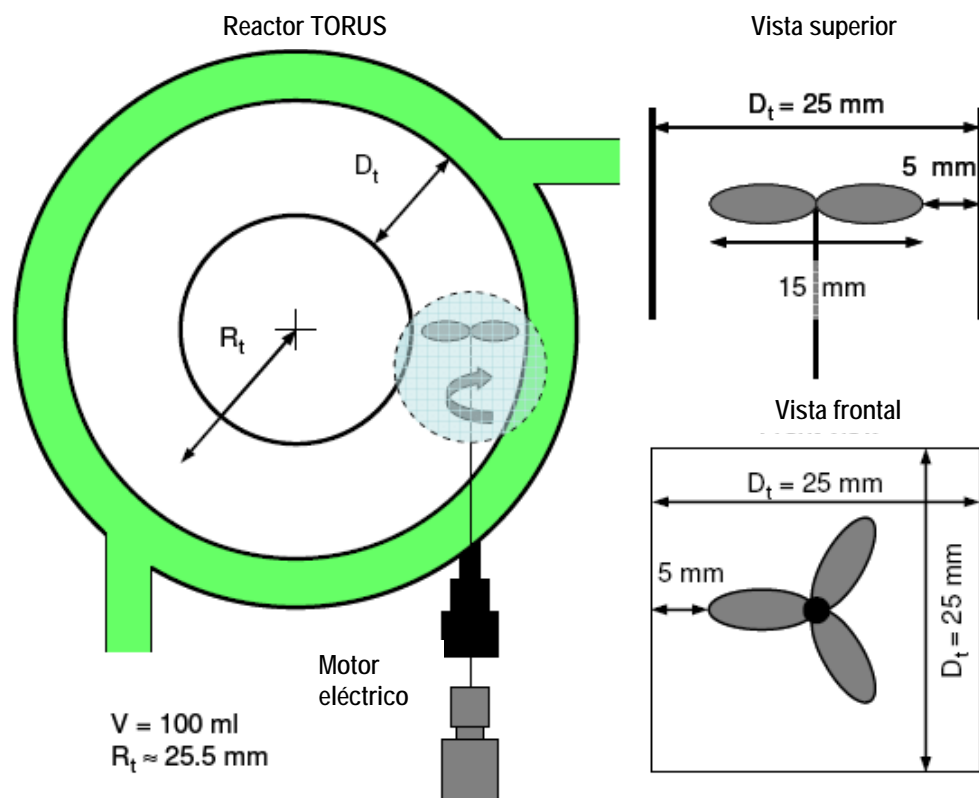


Figura 20. Esquema de un reactor TORUS para un volumen de trabajo de 100 mL.