

Extracción y purificación parcial de peroxidasa de rabano (*Raphanus sativus*)

Luis Ojeda, Normig Zoghbi, Nirza Noguera-Machado, Luis Lucero, Greydis Meléndez y Juana Triana
Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad de Carabobo, (BIOMED-UC)
Maracay, Estado Aragua-Venezuela
lojeda2@uc.edu.ve

Abstract— The peroxidases are oxidoreductase enzymes, which are widely distributed in nature in different isoforms (acidic, neutral, and basic). They have high commercial value, due to its diversity of applications in clinic diagnostic. In this study, an alternative methodology was designed to obtain a partially purified peroxidase extract from Rabano (*Raphanus sativus*). The extract specific activity recovered after dialysis and a cation-exchange chromatography was 5 Units/mg, using 250 mM sodium acetate as eluent. Analytical tests showed that the extract has an average enzymatic activity, which could suggest its use in different tests that do not warrant the presence of POD with a high degree of purity

Keywords: Peroxidase, Rabano, *Raphanus sativus*, chromatography, purification

Resumen— Las peroxidasas son enzimas oxidorreductasa, que están ampliamente distribuidas en la naturaleza en diferentes isoformas (ácidas, neutras y básicas). Tienen un alto valor comercial, debido a su diversidad de aplicaciones en el diagnóstico clínico. En este estudio, se diseñó una metodología alternativa para obtener un extracto de peroxidasa parcialmente purificado de Rabano (*Raphanus sativus*). La actividad específica del extracto recuperada después de la diálisis y una cromatografía de intercambio catiónico fue de 5 Unidades/mg, usando acetato de sodio 250 mM como eluyente. Las pruebas analíticas mostraron que el extracto tiene una actividad enzimática promedio, lo que pudiera sugerir su uso en diferentes ensayos que no ameriten la presencia de la POD con un alto grado de pureza

Palabras claves: Peroxidasa, Rabano, *Raphanus sativus*, cromatografía, purificación

I.INTRODUCCIÓN

La peroxidasa (POD) es una enzima oxido reductasa (E.C. 1.11.1.7) , que utiliza como donador el H_2O_2 , existen reportadas más de 30 isoformas, las cuales se clasifican en tres grupos, ácidas, neutras y básicas [1,2]. Catalizan reacciones bisustrato de carácter redox, utilizando un peróxido como oxidante (a lo que deben su nombre) y un segundo sustrato de características reductoras que es oxidado por el peróxido. Al ser una proteína hemica presenta gran afinidad por este sustrato, lo que provoca que se pueda unir al hierro por los dos planos del centro activo (el superior y el inferior), dando lugar a una inhibición por exceso de sustrato ya que cuando ambas posiciones están ocupadas por el peróxido de hidrógeno no es posible la unión del otro sustrato [2]. Esta familia de enzimas están presente tanto en humanos [3], como en vegetales [4,5,6,7]. En la industria alimentaria la presencia de esta enzima es considerada indeseable, en vista de que está asociada con cambios en la apariencia del producto.

La POD presente en el rabano (*Raphanus sativus*) ha sido ampliamente estudiada [1,2] y numerosos estudios demuestran su aplicación en técnicas inmunoquímicas [8] y de diagnóstico clínico [9], debido a su gran estabilidad, facilidad de conjugación con las inmunoglobulinas y sencillez para detectarla por métodos colorimétricos utilizando un gran número de reactivos. En vista de que esta enzima tiene un alto valor comercial, por la diversidad de sus aplicaciones en el área de diagnóstico, en este estudio se propuso proponer una metodología rápida que permitiera obtener un extracto parcialmente purificado con alta actividad peroxidasa a partir del *Raphanus sativus*.

II. MATERIALES Y METODOS

A Aislamiento del extracto de proteínas del rabano (*Raphanus sativus*)

Los rabanos utilizados para el estudio se adquirieron en un mercado local en la ciudad de Maracay (Venezuela) el mismo día de la extracción. El material vegetal se sometió a varios lavados con abundante agua destilada para eliminar cualquier rastro de contaminante, seguido fueron pelados y cortados hasta su procesamiento. Los trozos de rabano se homogenizaron en presencia de buffer fosfato 0,1 M, usando un disruptor (licuadora) hasta lograr obtener una mezcla homogénea.

La mezcla se filtró usando un tapón de gasa, el sobrenadante obtenido fue saturado con $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ hasta alcanzar un 35% de saturación, la muestra se dejó en reposo por 4 h a 4°C , para posteriormente ser centrifugada a 6500 RPM/15 min/ 8°C . El sobrenadante recolectado fue saturado hasta alcanzar una saturación de 90% con sulfato de amonio, se dejó en reposo por 10 h a 4°C y se centrifugó a 6500 RPM/20 min/ 8°C , descartando el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en buffer Tris-HCl 50 mM; pH 8; KCl 100mM, para luego ser centrifugado a 14000 RPM/15 min/ 8°C , descartando el sobrenadante. El pellet se resuspendió en el mismo buffer y fue sometido a una diálisis usando una membrana (corte 14000 KDa), hasta confirmar la ausencia del sulfato. La presencia del $\text{SO}_4^{=}$ se confirmó mediante la precipitación con BaCl_2 .

B Cromatografía de intercambio catiónico con Carboximetil celulosa (CM-52)

El protocolo usado para la purificación fue el propuesto por Shannon *et al.*, [2], modificado.

C Procedimiento

El extracto proteico obtenido después de la diálisis fue diluido en una solución de buffer de Acetato de sodio 5 mM (pH 4,4), en una proporción (1:5). En un beacker se colocó la resina de CM-52 (balanceada con Na(Acetato) 5 mM pH 4,4) y el extracto de proteínas y se mezclaron por 20 min usando un agitador magnético. La mezcla se colocó en una columna de cromatografía y fue sometido a un gradiente de elución (ver tabla 1).

Tabla I. Gradiente del buffer de elución usado para la cromatografía con CM-52

Buffer	Concentración Na(Acetato)	pH
1	5 mM	4,4.
2	50 mM	4,4
3	100 mM	4,4
4	250 mM	4,9

D Determinación de la actividad de la peroxidasa

La actividad de la peroxidasa fue determinada usando el método de Trinder modificado [9], en el que se emplea la reacción acoplada de la Glucosa oxidasa y la POD en presencia de un cromóforo, en este caso se usó el 3,3',5,5'- Tetrametil bencidina (TMB) [10,11,12].

E Determinación del contenido de proteínas y electroforesis SDS-Page

Las proteínas solubles del extracto fueron cuantificadas usando el método de Bradford [13]. Para poder comparar la pureza del aislado obtenido en el estudio con una peroxidasa comercial, se desarrolló una electroforesis desnaturante usando la metodología propuesta por Laemmli [14].

F Determinación de la absorbancia

Para cuantificar el contenido de proteínas durante las diferentes etapas de la purificación se determinó a todas las fracciones generadas durante el proceso, la absorbancia de los aminoácidos aromáticos (280 nm) y el grupo hemo (401 nm) de la POD.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A Obtención del extracto de proteínas

Para conocer si durante el proceso de extracción se estaban recuperando las proteínas de interés se realizó la determinación del factor RZ, que relaciona la absorbancia del grupo hemo con el de los aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas.

Tabla II. Determinación del factor RZ en las diferentes fracciones

Fracción	Vol (ml)	Proteína (mg)	Factor RZ*
Extracto crudo	1850	---	---
Resuspensión del precipitado con (NH ₄) ₂ SO ₄	60	557	0,13
Después de diálisis contra Na(Acetato) 5 mM, pH 4,4	100	486	0,24

* Este factor es el cociente de absorbancia A_{401}/A_{280} e indica el grado de pureza de las proteínas hémicas.

El factor RZ observado confirma una mayor presencia de absorbancia a 401 nm, lo que confirma como se fue concentrando la proteína hémica durante los diferentes pasos de la extracción, las peroxidases ultrapuras muestran factores RZ entre 2 y 3.

B Cromatografía con CM-52

El material recuperado después de la diálisis fue sometido a un paso de cromatografía de intercambio catiónico usando carboximetil-celulosa. Los resultados se indican en la siguiente figura.

En la figura 1 se logra observar el perfil cromatográfico obtenido al lavar la columna con concentraciones crecientes de acetato de sodio. La posición relativa de elución de las isoformas principales de la peroxidasa de *Raphanus sativus* se indica en la fig 1-A, de acuerdo a la concentración de acetato de sodio usada en la solución de lavado y reportes previos de su comportamiento cromatográfico [2], los análisis de actividad Peroxidasa en las fracciones colectadas están de acuerdo con esta predicción (fig 1-B). La mayor actividad específica y total se concentró en el pico de proteínas que eluye de la columna a 250 mM acetato de sodio (pH 4,9). Es decir, las isoformas más básicas de la enzima. En segundo lugar se encuentra el material no unido a la matriz cromatográfica (las formas ácidas). Ambas preparaciones pueden ser usadas para ensayos de acoplamiento con la glucosa oxidasa.

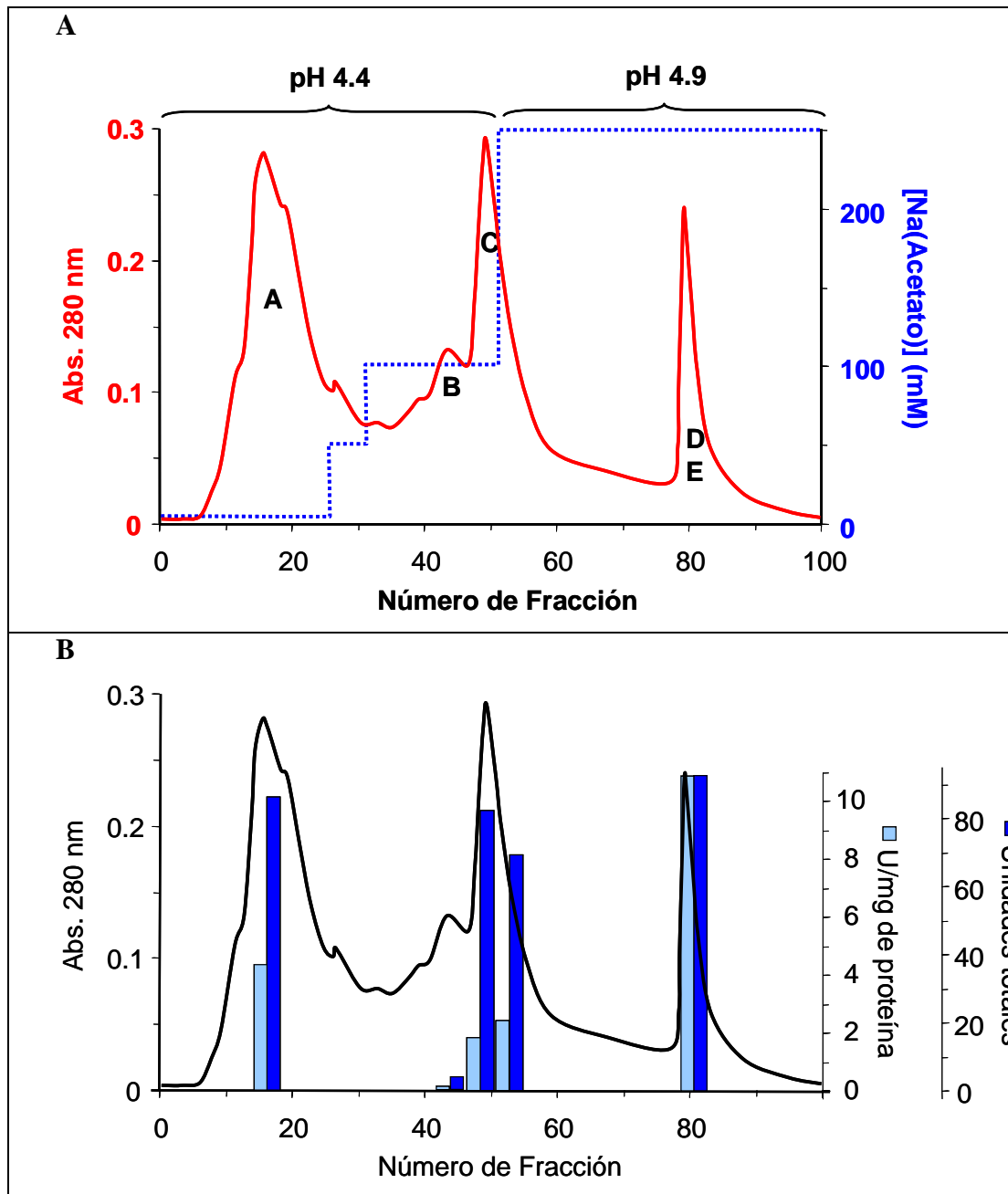


Fig. 1. Cromatografía de intercambio iónico del extracto de *Raphanus sativus* en Carboximetil-Celulosa. A, perfil cromatográfico de una muestra de proteínas dializada, indicando las concentraciones Na (Acetato) usadas para el lavado de la columna (.....). Se indica la posición relativa de las isoformas de Peroxidasa (A, B, C, D, y E), de acuerdo a Shannon et al., [12]. B, Análisis de actividad peroxidasa específica (□) y total (■) en las fracciones eluidas.

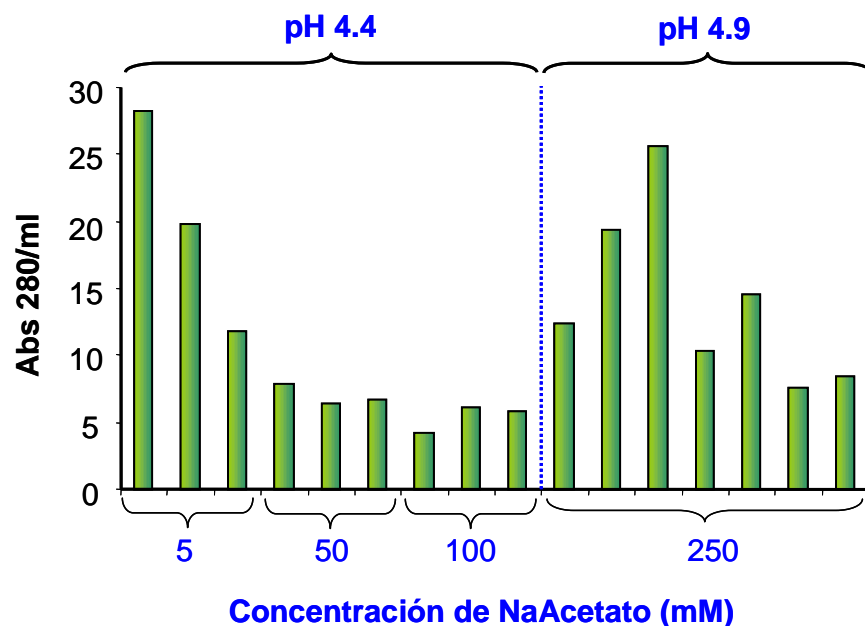


Fig. 2. Fraccionamiento de proteínas en Carboximetil-celulosa en modalidad por carga.

Los resultados presentados en la Tabla 2 indican que la modalidad en carga no resuelve tan eficientemente como la columna las formas básicas de POD. Sin embargo, el procedimiento tiene la ventaja de ser mucho más rápido y se obtienen actividades específicas comparables. Por lo tanto se decidió utilizar esta modalidad para la preparación de la enzima.

Para conocer la pureza de los extractos se determinó la actividad específica de las diferentes fracciones recolectadas durante las eluciones de las proteínas presentes en el extracto. El rendimiento se presenta en la siguiente tabla.

Tabla III. Rendimiento y actividad enzimática de las fracciones eluidas de CM-52 en modalidad de carga.

Fracción [Na(Acetato)]	Volumen	Concentración de Proteínas	Proteínas Totales	Actividad Específica	Actividad Total
	(ml)	(mg/ml)	(mg)	(U*/mg)	(U*)
5 mM (Material retenido)	12	1,2	14,4	3,8	55
50 mM	0,4	0,06	0,024	0,14	0,0034
100 mM	0,4	0,2	0,08	0,13	0,01
250 mM	20	3,1	62,0	5,1	316

* Unidad de actividad enzimática: cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μmol de TMB por minuto

La preparación de POD en la fracción de acetato de sodio 250 mM fue seleccionada para los ensayos de actividad enzimática. La estabilidad del preparado se comprobó mediante ensayos directos usando

soluciones patrón de peróxido de hidrógeno, y también con el sistema acoplado a GOx usando patrones de glucosa. En ambos casos el sustrato cromogénico fue TMB [10].

El análisis de esta fracción de POD por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes reveló la banda característica de la enzima (fig 3). El grado de pureza de la enzima no es tan alto como el del peroxidasa comercial. Sin embargo, los ensayos de actividad enzimática (Tabla 3) indicaron que la calidad del preparado es suficiente para la preparación de un reactivo para determinaciones cuantitativas de glucosa.

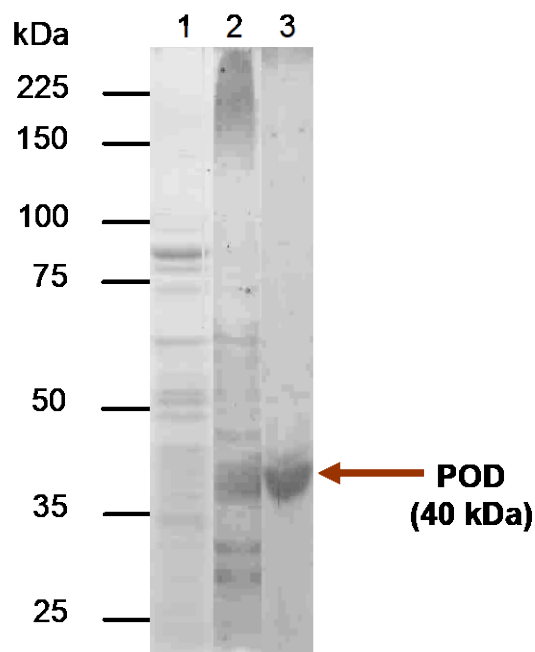


Fig. 3. Análisis de la preparación de Peroxidasa por electroforesis en condiciones desnaturizantes. Se analizaron la fracción de POD parcialmente purificada en CM-52 (carril 2) y Peroxidasa comercial (carril 3).

IV. CONCLUSIÓN

Se desarrolló una metodología de extracción que permitió obtener un extracto parcialmente purificado con una alta actividad de la enzima POD. Aun cuando no se logró alcanzar el nivel de pureza de la peroxidasa comercial, los ensayos de actividad mostraron que el extracto posee una alta actividad enzimática, lo que pudiera sugerir su uso en diferentes ensayos que no ameriten la presencia de la POD con un alto grado de pureza.

REFERENCIAS

- [1] S. Aibara , H. Yamashita, E. Mori , M. Kato and Y. Morita. 1982. Isolation and characterization of five neutral isoenzymes of horseradish peroxidase. *J. Biochem.* 92, 531-539.
- [2] L. Shannon, E. Kay and J. Lew. 1966. Peroxidase Isozymes from horseradish roots. *J. Biol Chem.* 241(9): 2166-2172.
- [3] M. Salathe, M. Holderby, R. Forteza, W. M. Abraham, A. Wanner, and G. E. Conner. 1997. Isolation and characterization of a peroxidase from the airway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17:97–105.
- [4] I. Sakharov , G. Ardila, I. Sakharova , A. Rojas y Y. Pletjuschkina. 1999. Peroxidasa de plantas tropicales. *Rev Colomb Quím.* 28(1): 97-106.
- [5] P. Valderrama y E. Clemente. 2004. Isolation and thermostability of peroxidase isoenzymes from apple cultivars Gala and Fuji. *Food Chem.* 87 601–606.
- [6] S. McInnis, D. Emery, R. Porter, R. Desikan, J. Hancock and S.J. Hiscock. 2006. The role of stigma peroxidases in flowering plants insights from further characterization of a stigma-specific peroxidases (SSP) from *Senecio squalidus* (Asteraceae). *J. Exp.Bot.* 8, 1835-1846.
- [7] R. Mendoza y A. Herrera. 2012. Cinética de inactivación de la enzima peroxidasa, color y textura en papa criolla (*Solanum tuberosum* Grupo phureja) sometida a tres condiciones de escaldado. *Información Tecnológica.* 23(4):73-82.
- [8] J. Merlin, R. Villaescusa, A. Guerreiro, J. González, R. González y A. Arce. 1999. Preparación de un conjugado anti IgG de ratón-peroxidasa en cabra. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 15(2):132-6.
- [9] Trinder P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol.* 22:158-61.
- [10] N. Zoghbi, L. Ojeda, N. Noguera, A. Yépez, H. Camargo y F. Triana-Alonso. 2008. Extracción y purificación de glucosa oxidasa para fines diagnósticos producida en medios a base de fertilizantes y azúcar industrial. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 28(1).
- [11] L. Ojeda, N. Noguera, J. Triana y F. Triana-Alonso. 2011. Evaluación del potencial como aditivo en alimentos de un extracto de glucosa oxidasa y catalasa producido a partir de *Aspergillus niger* en un medio a base de fertilizantes y azúcar industrial. *Bio Tecnología.* 15(2):48-58
- [12] N. Noguera, L. Ojeda, I. Velásquez, N. Ramírez y A. Yépez. 2013. Efecto de tres condiciones de pasteurización sobre la actividad enzimática y antimicrobiana de un extracto de glucosa oxidasa. *Bio Tecnología.* 17(2):31-40.
- [13] Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72, 248–254.
- [14] L. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-5.