

PURIFICACIÓN DE PEROXIDASAS VEGETALES: ALGUNAS CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y ESPECIFICIDAD POR SUSTRATOS NATURALES

Miguel Ángel Duarte-Vázquez; Blanca García, Carlos Regalado, Arturo Rojo*. DIPA, PROPAC. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. C. U. Cerro de las Campanas, S/N, CP 76010. Fax (4) 2156867.

*UAM-Iztapalapa. Dpto de Biofísicoquímica. Av. Michoacán y la Purísima. México, 09340, DF.

madv@sunserver.uaq.mx; carlosr@sunserver.uaq.mx

Palabras clave: *Peroxidasas vegetales, características estructurales, especificidad.*

Introducción. La peroxidasa es una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza cuya función principal es oxidar donadores de hidrógeno. Su función fisiológica no se conoce en su totalidad, principalmente por la presencia de múltiples isoformas. Además, se han encontrado notorias diferencias en las propiedades catalíticas y fisicoquímicas entre peroxidasas de diferentes fuentes vegetales. Para asignarle una función biológica y obtener información estructural es indispensable aislar una isoforma en particular y estudiarla.

El objetivo de este trabajo fue aislar las isoformas de peroxidasas más importantes en nabo y brócoli para obtener información a cerca de su peso molecular (PM), contenido de carbohidratos, porcentaje de estructura secundaria y especificidad por diferentes sustratos naturales; información básica indispensable para aclarar la relación entre estructura y función de este enzima.

Metodología. Las peroxidasa soluble de nabo se purificó según (1). La peroxidasa de nabo unida a membrana fue extraída con CaCl_2 0.2 M y purificada usando cromatografía de intercambio aniónico e hidrofóbica. La peroxidasa de brócoli se purificó según (2). La especificidad de la enzima por los sustratos se determinó siguiendo (3). Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en un espectropolarímetro Jasco J-715 y el contenido de estructura secundaria se determinó usando el software K2D (4). El contenido de carbohidratos se determinó de acuerdo con (5). El PM se calculó por electroforesis desnaturante.

Resultados y discusión. El PM y contenido de carbohidratos de una isoperoxidasa soluble de nabo y otra de brócoli fueron muy similares y coinciden con el reportado para peroxidasas vegetales (Cuadro 1); sin embargo el PM para la peroxidasa unida a membrana fue menor y no se detectó la presencia de carbohidratos.

Esta diferencia en PM puede deberse a diferencias en el contenido de carbohidratos y otro tipo de modificaciones

Cuadro 1. Peso Molecular, contenido de carbohidratos y contenido de estructura secundaria de las peroxidasas obtenidas de nabo y brócoli.

Peroxidasa	PM (kDa)	Carbohidratos (%)	α -hélice (%)	β -plegada (%)	Aleatoria (%)
Nabo soluble	36	9	31	10	59
Nabo unida a membrana	20	----	24	38	38
Brócoli	45	16	29	15	55

postraduccionales. El contenido de estructura secundaria de las peroxidasas soluble de nabo y brócoli fue muy similar,

siendo predominantemente α , mientras que aquella unida a membrana presentó considerables diferencias, siendo predominantemente β (Cuadro 1).

Las peroxidasas estudiadas presentaron mayor afinidad por catecol y los ácidos cafeico y ferúlico, donde el máximo valor de reacción fue con ácido cafeico para la peroxidasa soluble de nabo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Actividad e específica (D absorbancia $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$) de las peroxidasas de nabo y brócoli contra diferentes sustratos.

Sustrato	Peroxidasa soluble de nabo	Peroxidasa de nabo unida a membrana	Peroxidasa de brócoli
Ac. cafeico	150.9	129.0	132.5
Ac. cumárico	3.0	2.00	0.60
Ac. ferúlico	45.0	60.0	54.0
Ac. ascórbico	0.08	0.12	0.10
catecol	57.0	10.0	130.0

Conclusiones. La gran afinidad de las peroxidasas estudiadas por sustratos precursores de lignina indica una posible función durante el proceso de lignificación. Las diferencias en PM y contenido de carbohidratos presumen diferencias en modificaciones postraduccionales. Las diferencias en contenido de estructura secundaria pueden ser consecuencia de diferencias en contenido y secuencia de aminoácidos.

Agradecimientos. Financiamiento del CONACYT Ref. 31696-B. Dr. John R. Whitaker por sus observaciones.

Bibliografía.

- Duarte-Vázquez, M.A., García-Almendarez, B.E., Regalado, C. y Whitaker, J.R. (2000). Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var *esculenta* D.C.) peroxidasas. *J. Agric. Food Chem.* 48:1574-1579.
- García-Padilla, S. (2000). Purificación de peroxidasa de brócoli (*Brassica olearacea* var maratón) y estudios de termoestabilidad. Tesis de Licenciatura. UAQ.
- Schmitz, N., Gijzen, M. y van Huystee, R.B. (1997). Characterization of anionic soy bean (*Glycine max*) seed coat peroxidase. *Can. J. Bot.* 75:1336-1341.
- <http://booby.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/k2d.pl>. (2000).
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.