



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Purificación y caracterización de la peroxidasa de las
semillas de cáñamo (*Cannabis sativa* L.)**

Autora: Coral Carretero Panedas

Tutores:

José Miguel Ferreras

Antimo di Maro

A mis profesores, José Miguel y Antimo, a mis compañeros italianos por ayudarme a crear este trabajo

A los míos, por confiar en mí y animarme día tras día

A mi abuela, porque a pesar de creer en la ciencia, se que estás cuidándome desde algún lugar.

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. ABSTRACT	4
3. ABREVIATURAS	5
4. INTRODUCCIÓN	6
4.1. Las peroxidasas	6
4.2. Clasificación de las peroxidasas	6
4.3. Características estructurales de las peroxidasas	11
4.4. Mecanismo de reacción	14
4.5. Papel de las peroxidasas en las plantas superiores	16
4.6. Las peroxidasas como catalizadores en la síntesis orgánica	17
4.6.1. Deshidrogenación oxidativa	18
4.6.2. Halogenación oxidativa	18
4.6.3. Reacciones de transferencia de oxígeno	19
4.7. Aplicaciones industriales de las peroxidasas	19
4.8. <i>Cannabis sativa</i> como una posible fuente de actividad peroxidasa	21
4.8.1. Notas históricas sobre <i>C. sativa</i>	21
4.8.2. Caracteres botánicos y fisiológicos	22
4.8.3. Usos modernos	24
5. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1. Material empleado	27
6.1.1 Aparatos y otros materiales	27
6.1.2 Reactivos	28
6.2. Métodos	29
6.2.1. Purificación de las peroxidasas a partir de semillas de <i>C. sativa</i>	30
6.2.2. Concentración por ultrafiltración	30
6.2.3. Electroforesis en gel de acrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)	32
6.2.4. Determinación de la concentración de proteínas (BCA)	33
6.2.5. Precipitación en etanol frío	33

6.2.6. Ensayo de la actividad de la peroxidasa con ABTS	33
6.2.7. Ensayo de actividad proteasa y anti-proteasa	34
6.2.8. Optimización de las condiciones para la actividad enzimática de la peroxidasa	35
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
7.1. Actividades enzimáticas en las semillas de <i>C. sativa</i>	36
7.2. Purificación de las proteínas básicas de las semillas de <i>C. Sativa</i>	37
7.3. Cromatografía de intercambio catiónico en Source 15S	43
7.4. Caracterización de la actividad de la peroxidasa	47
8. CONCLUSIONES	52
9. BIBLIOGRAFÍA	53

1. RESUMEN

Las peroxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de diversos sustratos por el peróxido de hidrógeno o por un peróxido orgánico. Se han descubierto diversas aplicaciones de las peroxidasas, tanto para la investigación en biotecnología como para las áreas del medioambiente y la salud, o la industria farmacéutica, química y biotecnológica. Debido a sus interesantes aplicaciones, en este trabajo se ha purificado la peroxidasa de las semillas del cáñamo (*Cannabis sativa* L.) por medio de cromatografía de intercambio catiónico en S-Sepharosa, cromatografía de exclusión molecular en Superdex 75, cromatografía de afinidad en Red-Sepharosa y cromatografía de intercambio catiónico en Source 15 S. La peroxidasa del cáñamo mostró un peso molecular de 40 kDa y un pH óptimo de 5, se activó con iones calcio y se inhibió con EDTA y NaCl. Además las semillas del cáñamo presentaron una actividad anti-proteasa alta.

2. ABSTRACT

Peroxidases are a group of enzymes that catalyze the oxidation of several substrates by hydrogen peroxide or an organic peroxide. Peroxidases have applications in biotechnology research, in the environmental and health care sectors, and in the pharmaceutical, chemical and biotechnological industries. Due to its interesting applications, the peroxidase from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds has been purified by cation-exchange chromatography on S-Sepharose, gel filtration on Superdex 75, affinity chromatography on Red-Sepharose and cation-exchange chromatography on Source 15 S. Hemp peroxidase displayed a molecular weight of 40 kDa, and optimum pH of 5, and was activated by calcium ions and inhibited by EDTA and NaCl. In addition, hemp seeds have been shown to possess a high anti-tryptic activity.

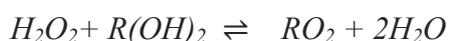
3. ABREVIATURAS

ABTS	Acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6- sulfónico)
APS	Persulfato de amonio
APX	Peroxidasa ascorbato
BCA	Ácido bicinconínico
CcP	Citocromo c peroxidasa
CPO	Cloruro peroxidasa
Da	Dalton
EC	Comisión de Enzimas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
HRP	Peroxidasa del rábano picante
kDa	Kilodalton
LiP	Peroxidasa lignina
LPO	Lactoperoxidasa
MPO	Mieloperoxidasa
Pm	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
TAME	Éster metílico de N- α -p-tosil-L-arginina
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
Tris-HCl	Tris-(hidroximetil)aminometano HCl

4. INTRODUCCIÓN

4.1. Las peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) pertenecen a una gran familia de enzimas presentes en la naturaleza, ampliamente distribuidas en bacterias, hongos, plantas y mamíferos (Dunford, 1976). Son oxidorreductasas que catalizan la oxidación de diversos compuestos orgánicos e inorgánicos, usando como donante de electrones el peróxido de hidrógeno. La amplia distribución de estas enzimas indica su gran importancia en el ámbito biológico. Sin embargo, a pesar de que han sido ampliamente purificadas y caracterizadas, no se sabe con exactitud el papel metabólico que desempeñan debido a la alta cantidad de isoenzimas y reacciones que son capaces de catalizar. La amplia variedad de peroxidasas existentes implica una versatilidad considerable, también en sus aplicaciones prácticas. Las peroxidasas también actúan como antioxidantes, protegiendo a las células, tejidos y órganos de los efectos tóxicos de peróxidos producidos “*in vivo*” por la actividad oxidasa. La reacción general catalizada por una peroxidasa y dependiente del peróxido de hidrógeno se describe por la ecuación:



4.2 Clasificación de las peroxidasas

Las peroxidasas pueden contener en sus sitios activos como cofactor redox un residuo de cisteína (peroxirredoxinas, EC 1.11.1.15) o un residuo de selenocisteína (glutatión peroxidasa, EC1.11.1.9), pero la clase principal de peroxidasas está representado por las hemo-peroxidasas (EC 1.11.1.7). Estas enzimas tienen como grupo prostético el hierro-hemo o el hierro-protoporfirina IX ligado a una histidina proximal, con la excepción de las cloruro-hemoxidasas en las cuales el enlace es con una cisteína. En la Figura 1, se muestra una representación esquemática de las diferentes clases de peroxidasas. El grupo de las Hemo-peroxidasas se divide en dos superfamilias

que distinguen las enzimas de origen animal de las de origen fúngico, bacteriano y vegetal (Passardi et al., 2007).

Los peroxidasas animales se encuentran en la saliva, lágrimas, leche y en el moco cervical; entre ellas están la peroxidasa tiroidea, la mieloperoxidasa y la lactoperoxidasa. La mieloperoxidasa (MPO) es una importante peroxidasa animal presente en mielocitos y leucocitos (Odajima, 1980). Esta enzima parece estar implicada en la formación de oxidantes que tienen un papel decisivo en la defensa contra agentes patógenos y en la detoxificación de toxinas bacterianas (Anderson et al., 1996). Al mismo tiempo, la MPO, en presencia de concentraciones no tóxicas de peróxido de hidrógeno, puede inducir citotoxicidad. De hecho, a la concentración plasmática de iones Cl^- , la mieloperoxidasa es la única enzima humana capaz de convertir el peróxido de hidrógeno en ácido hipocloroso (HClO). El HClO producido es una citotoxina capaz de causar daño oxidativo, como la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), siendo causa de la aterosclerosis. La lactoperoxidasa (LPO) es una glicohemoproteína presente en la leche de diferentes especies de animales y en las secreciones de las glándulas de los mamíferos, tales como la saliva. Al igual que la MPO, también está implicada en los mecanismos de defensa contra patógenos; la LPO de hecho normalmente utiliza peróxido de hidrógeno en combinación con halógenos o pseudohalógenos para generar los correspondientes ácidos hipohalogenados, agentes oxidantes con actividad antibacteriana (Hannuksela et al., 1994).

En cambio, la superfamilia de las peroxidasas vegetales, se puede dividir en tres grupos basándose en sus similitudes.

- Clase I, a esta clase pertenecen las peroxidasas intracelulares localizadas en los orgánulos subcelulares, de los cuales podemos citar la citocromo c peroxidasa (PCC) y ascorbato peroxidasa (APX), enzimas críticas para la eliminación de los peróxidos producidos dentro de las células de las plantas superiores.
- Clase II, a ella pertenecen las enzimas secretadas por hongos tales como la peroxidasa de lignina (LiP) y la manganeso peroxidasa. Estas enzimas son glicoproteínas monoméricas implicadas en la degradación de la lignina.
- Clase III, a ella pertenecen las peroxidasas vegetales de secreción, tales como la peroxidasa del cacahuete, la peroxidasa del rábano picante, la peroxidasa de la

cebada y la peroxidasa del látex (Floris et al., 1984). Tales peroxidases vegetales están involucradas en la regulación del crecimiento y diferenciación celular, en la lignificación de la pared celular, en la oxidación de metabolitos esenciales para algunas reacciones de defensa de los agentes patógenos y en el metabolismo de los alcaloides (Rasmussen et al., 1997).

Las peroxidases de Clase III son codificadas por una familia multigénica, dotada de diferentes funciones fisiológicas, siendo capaces de catalizar la oxidación de diferentes sustratos donadores en presencia de peróxido de hidrógeno (Hiraga, 2001). Desde la aparición de la primera peroxidasa de clase III, probablemente coincidente con la aparición de las plantas hace 450 millones de años, hasta las plantas más evolucionadas de hoy en día, el número de copias del gen se ha incrementado significativamente. Este aumento parece ser debido a la evolución estructural y de la complejidad de las plantas. La estructura del gen de la oxidasa de Clase III está altamente conservado a lo largo de la evolución; pero a pesar de esta conservación, sus puntos isoeléctricos (pI) difieren mucho (formas aniónicas y catiónicas) y hasta la fecha no se han establecido las correlaciones entre el punto isoeléctrico y su función enzimática (Welinder et al., 1992).

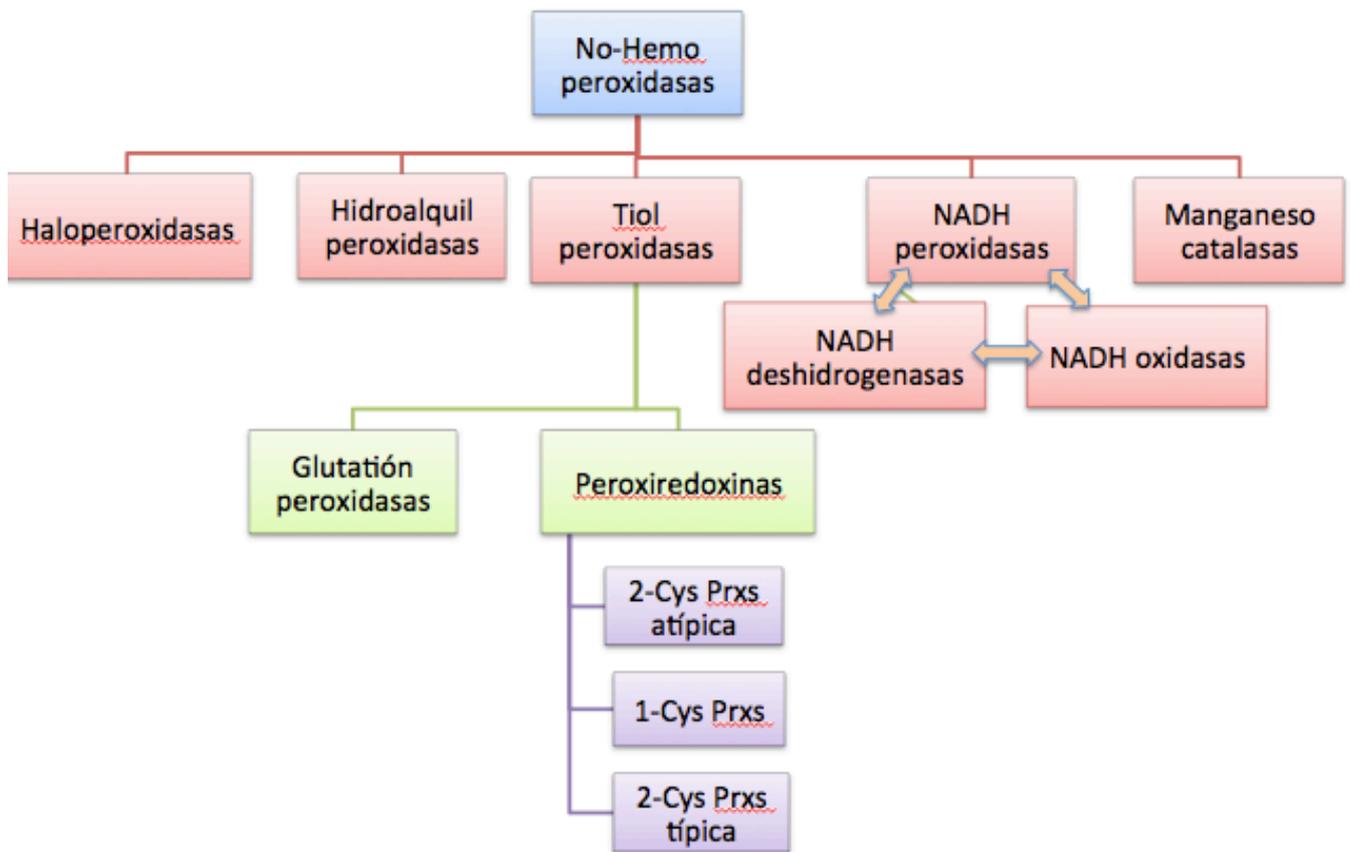


Fig.1.a. *Representación esquemática de la subdivisión de las diversas clases de peroxidasas. Superfamilia de las peroxidasas que como cofactor redox poseen un grupo diferente del grupo hemo.*

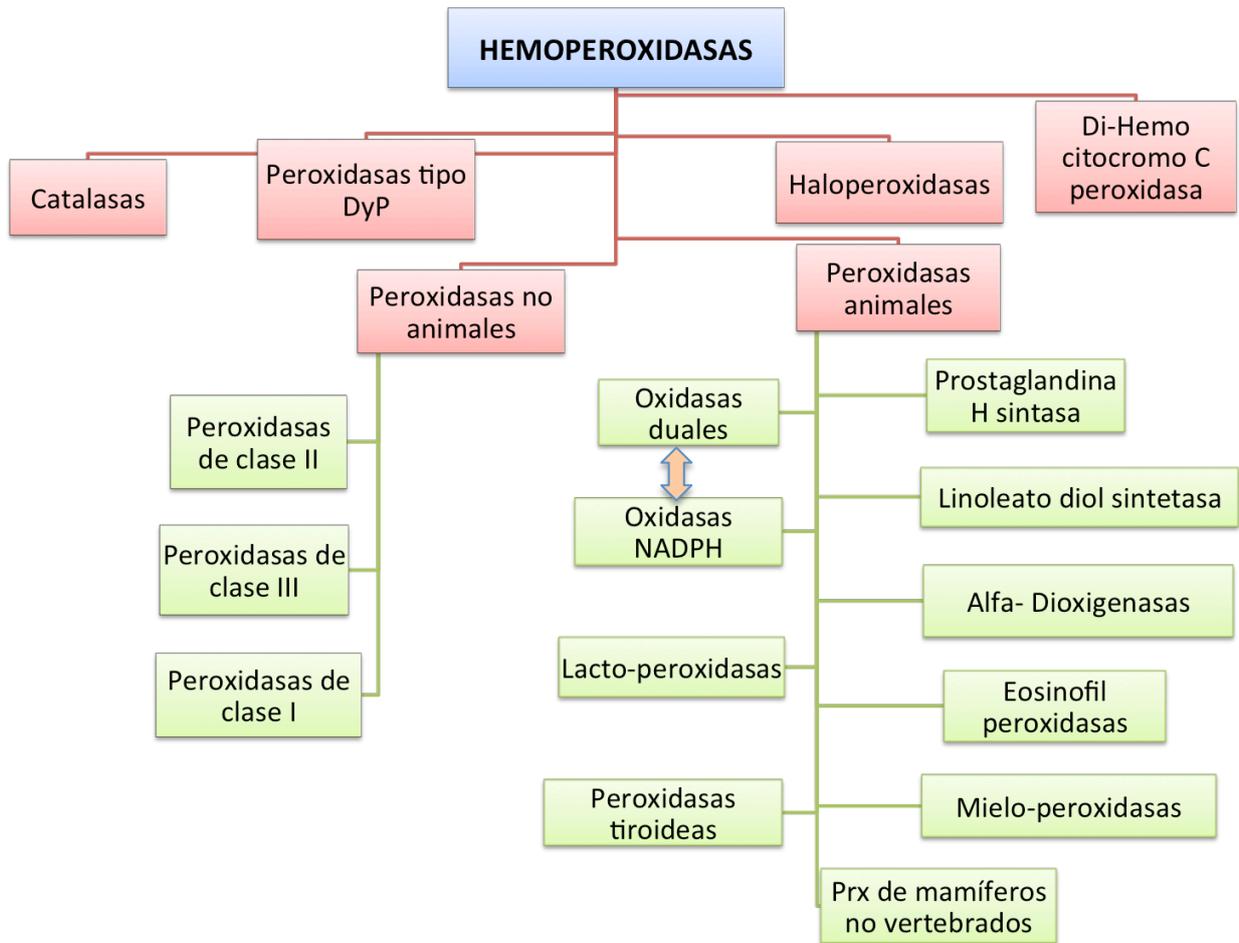


Fig. 1.b. *Representación esquemática de la subdivisión de las diversas clases de peroxidasa. La superfamilia de las hemo-peroxidasa.*

4.3. Características estructurales de la peroxidasa

Las peroxidasas ferroporfirínicas son una de las principales clases de peroxidasa; estas contienen la protoporfirina IX y Fe^{3+} formando el grupo hemo como grupo prostético. El grupo hemo está enlazado con el quinto enlace de coordinación del hierro a la porción proteica a través de una cadena lateral de un aminoácido (Thongsook y Barrett, 2005). El grupo hemo B es un sistema altamente conjugado constituido por cuatro anillos de pirrol enlazados entre sí por puentes metino. Como se puede ver en la figura 2, la protoporfirina IX tiene ocho sustituyentes, dos vinilos, cuatro metilos y dos propionatos, que están desprotonados a pH fisiológico (Kamal y Behere, 2002).

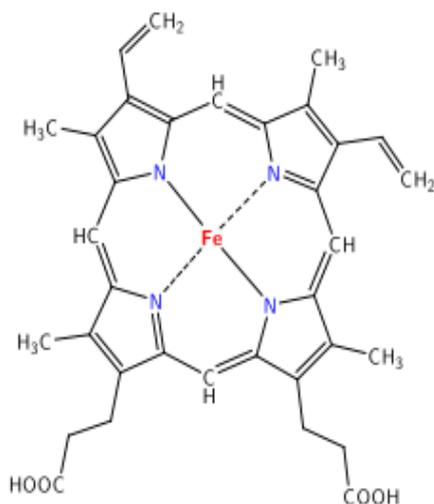


Fig. 2. Estructura del grupo hemo.

El ión hierro (III), colocado en el centro del anillo que coordina los átomos de nitrógeno de los anillos pirrólicos, tiene como quinto ligando un nitrógeno de un residuo de histidina de la cadena proteica (His169, residuo de histidina proximal). Los cuatro átomos de nitrógeno se coordinan al hierro de la misma forma dos a dos. Dos de ellos poseen un par de electrones y forman un enlace covalente dativo con el hierro, mientras que los otros dos están desprotonados, la carga negativa permite la unión al metal central por medio de un enlace covalente. La posición del átomo de hierro en el interior del anillo porfirínico y el número de enlaces que forma depende de

su estructura electrónica. El resultado es un átomo de pentacoordinado colocado dentro de una estructura octaédrica distorsionada. El anillo de porfirina está ligado a la cadena de aminoácidos por medio de enlaces de hidrógeno formados por cada propionato con dos aminoácidos diferentes (Figura 3). Se ha visto que estas interacciones son las mayores responsables de la estabilidad del grupo hemo en el interior de la estructura proteica y de la sensibilidad de la enzima en las distintas condiciones de catálisis. En todas las peroxidasas vegetales, uno de los dos residuos propiónicos interactúa con la cadena lateral de una arginina (Arg31, la numeración se refiere a la secuencia de aminoácidos en la peroxidasa de rábano picante) y con la de una serina (Ser35), el segundo interactúa, en cambio, siempre con la cadena lateral de una serina (Ser73), mientras que su segunda interacción es lo que diferencia a las distintas peroxidasas vegetales. Por ejemplo, en la peroxidasa de rábano picante, el segundo residuo propiónico interactúa con la cadena lateral de una glutamina (Gln176), mientras que, en la peroxidasa de soja, el residuo correspondiente en la secuencia de aminoácidos es una cisteína y el residuo propiónico interactúa con la arginina 175 (Henriksen, 2001).

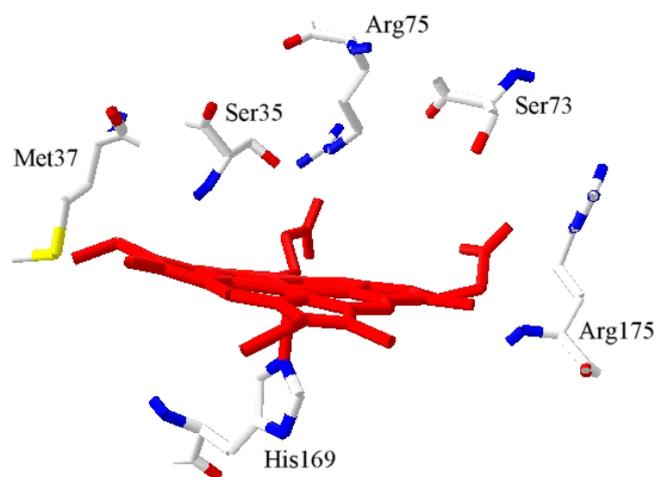


Fig. 3. *Residuos de la peroxidasa de soja que interactúan con el grupo hemo B, uniéndolo a la proteína.*

Hay otros residuos de aminoácidos que juegan un papel importante en la conformación del sitio activo (figura 4). Los más importantes son la histidina distal (His42) y la arginina distal (Arg38) que se encuentran por encima del anillo de porfirina y tienen una influencia significativa sobre el mecanismo de la catálisis enzimática. En la peroxidasa de soja, la presencia de un residuo de isoleucina (Ile74) hace que la fenilalanina (Phe41) e histidina (His42) que se encuentran espacialmente próximos, estén orientados de forma diferente que en la peroxidasa de rábano picante, lo que va a influir en el comportamiento con respecto a los disolventes y al sustrato durante la catálisis (Henriksen, 2001). Otro residuo de aminoácido que desempeña un papel clave en el sitio activo es la asparagina (Asn70) que, formando un enlace de hidrógeno con la histidina distal (His42), mantienen la basicidad adecuada y contribuye a estabilizar la posición de ésta (Kamal y Behere, 2003).

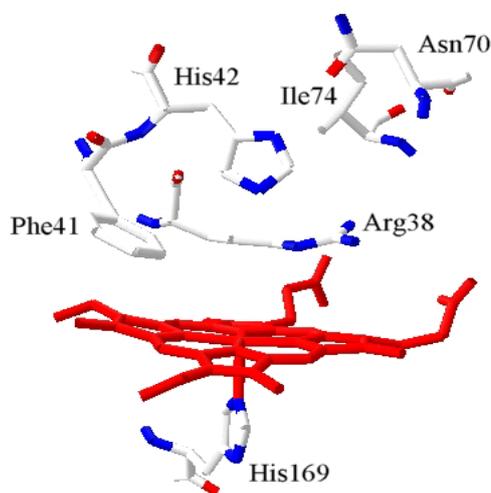


Fig. 4. Residuos que participan en el mecanismo catalítico de la peroxidasa de soja, próximos al grupo hemo B.

Las principales diferencias estructurales entre las peroxidosas se localizan en el lugar de la molécula donde se encuentra el canal de acceso del sustrato, no en la proximidad de este. Comparando las propiedades electrostáticas de las peroxidosas estudiadas, no hay notables diferencias en las características del canal de acceso del sustrato, mientras que si existe cierta diversidad en la disposición de las cadenas laterales de los residuos

presentes en este área, los cuales pueden influir en la actividad específica de estas enzimas. Los residuos de aminoácidos invariables, en todas las peroxidasas de las plantas, son cuatro: Dos histidinas, la proximal y la distal, un residuo de arginina y uno de ácido aspártico. Por último, todas las peroxidasas poseen de uno a nueve sitios de glicosilación. La gran variedad de carbohidratos presentes es la fuente principal de la variabilidad de las peroxidasas de clase III, aunque parece que la porción de los carbohidratos no afecta a la función biológica específica de estas enzimas. La glicosilación que se produce mayormente es la N-glicosilación (Tams y Welinder, 1998). Los hidratos de carbono unidos pueden ser galactosa, arabinosa, xilosa, fucosa, manosa, manosamina y galactosamina.

4.4. Mecanismo de la reacción

El lugar catalítico de la peroxidasa es generalmente un sitio metálico que contiene un hierro (III), unido a un grupo hemo. Las más estudiadas, son las peroxidasas de la clase III, para las que se han definido en detalle los mecanismos de reacción. El mecanismo catalítico de la peroxidasa implica la formación de dos productos intermedios de reacción, llamado compuesto I y compuesto II resumido en la Fig. 5, donde se muestran las variaciones del sitio catalítico en las diferentes etapas de la reacción. El Compuesto I se genera por la oxidación del sitio activo, junto a la reducción del peróxido de hidrógeno en agua. La pérdida de dos electrones debido a la oxidación del hierro produce la formación del grupo oxiferrilo Fe(IV)=O y un radical catiónico sobre el anillo porfirínico (o en un aminoácido cerca de él). Este intermediario es un fuerte oxidante y está listo para una oxidación doble de un sustrato, que se realiza por un mecanismo doble de oxidación monoelectrónica.

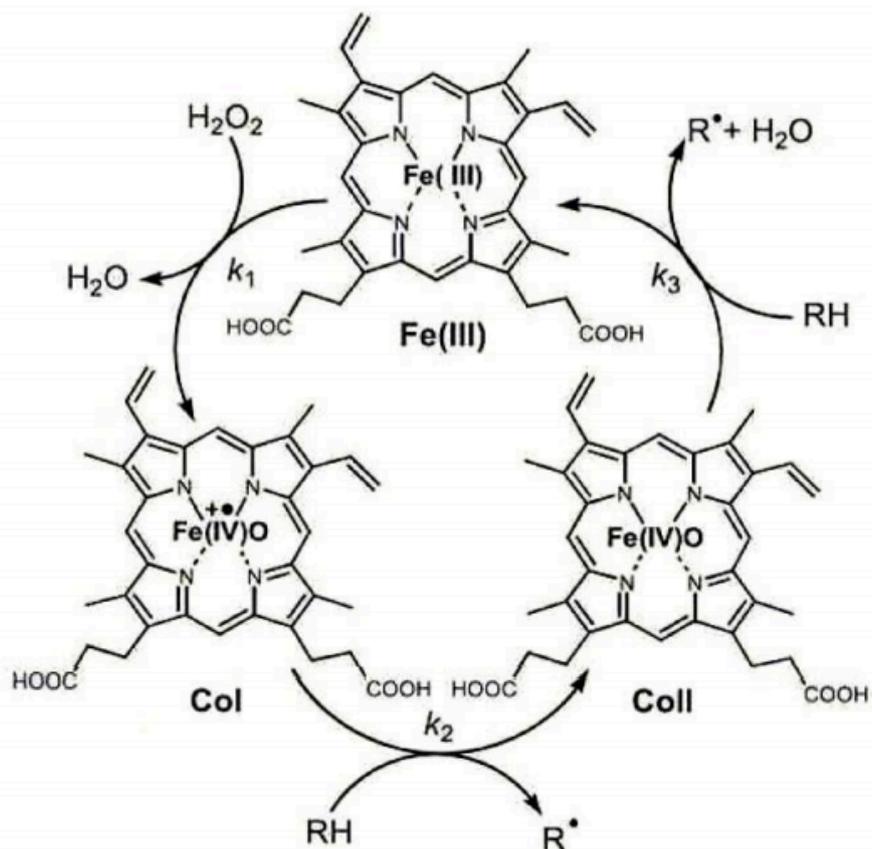


Fig. 5. Esquema del mecanismo de reacción de las peroxidasas.

La primera etapa implica la entrada de un sustrato adecuado [R_(H)] a través de los canales hidrofóbicos de la proteína, constituidos por residuos de aminoácidos apolares, hasta una posición colocada lateralmente al lado del grupo hemo produciéndose así su oxidación formándose un radical (R·). El Compuesto I por lo tanto adquiere un electrón del sustrato, que neutraliza el catión radical y origina el compuesto II. El compuesto II sigue siendo un buen oxidante capaz de oxidar una segunda molécula de sustrato volviendo así al compuesto I y cerrando el ciclo de reacción. Los radicales formados a partir del sustrato pueden comenzar las reacciones radicalarias de polimerización, o bien reacciones de acoplamiento o dismutación, dependiendo de su naturaleza química. Parece que todas las peroxidasas vegetales tienen un mecanismo de reacción común en la formación del compuesto I, aunque hay pequeñas variaciones relacionadas con la función catalizadora del residuo de arginina (Henriksen, 2001). Los

principales aspectos de este mecanismo son la catálisis ácido-base por la histidina distal, la estabilización de la carga producida por la arginina distal y la estabilización de los altos estados de oxidación del átomo de hierro del grupo hemo a través de la histidina proximal y de otros residuos de aminoácidos involucrados (Poulos y Kraut, 1980).

4.5. Papel de la peroxidasa en las plantas superiores

En cuanto al papel de la peroxidasa de las plantas, se ha demostrado que estas enzimas están implicadas en diferentes procesos:

- Generación de radicales libres y peróxido de hidrógeno como un mecanismo de defensa contra los ataques de patógenos durante la germinación de semillas (Schopfer, 2001);
- Regulación de la extensión celular durante el crecimiento de la planta con la producción de especies reactivas del oxígeno (radicales libres, ROS) que intervienen en los procesos de relajación de la pared celular (Liskay, 2004);
- Polimerización de la lignina (Marjamaa et al., 2009);
- Aumento de los niveles de O_2 y H_2O_2 durante la senescencia de la planta (Bestwick et al., 1998);
- Participación en la formación de enlaces cruzados entre los polisacáridos de la pared celular (Fry, 1986);
- Degradación del ácido indolacético durante la maduración y senescencia de frutas y verduras (Thongsook y Barrett, 2005).

Debido a sus múltiples funciones, la enzima se encuentra comúnmente en diversas isoformas en las plantas; las isoenzimas purificadas a partir de diversas fuentes vegetales difieren en el peso molecular, estabilidad térmica, pH óptimo, especificidad de sustrato y papel fisiológico (Thongsook y Barrett, 2005); Además, en general se acepta que el patrón enzimático de la peroxidasa cambia durante el desarrollo de la planta.

4.6. Las peroxidasa como catalizadores en síntesis orgánica

Las reacciones catalizadas por la peroxidasa se pueden agrupar en tres categorías principales (Fig. 6):

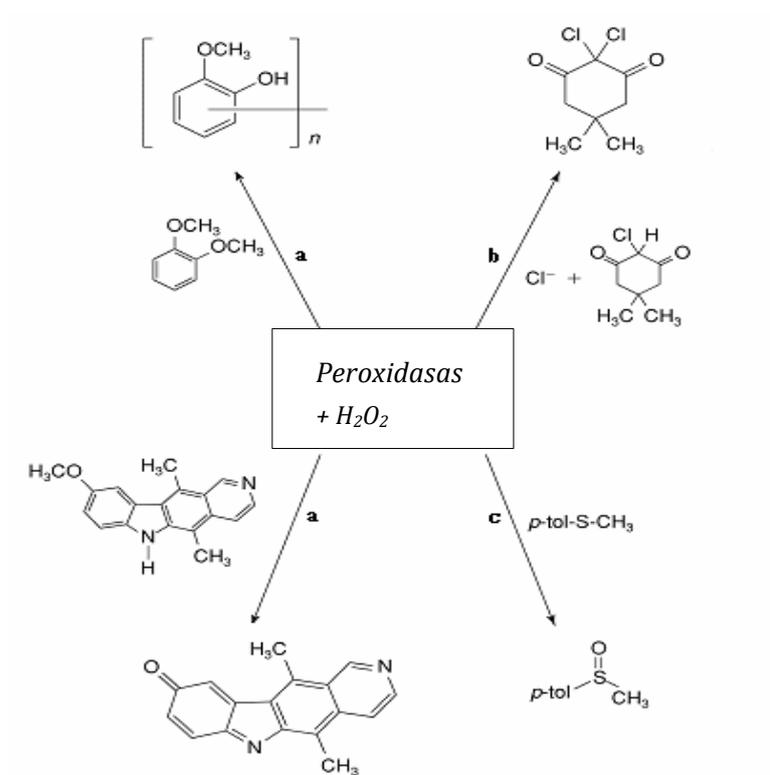
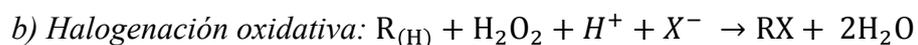
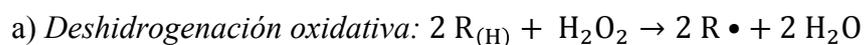
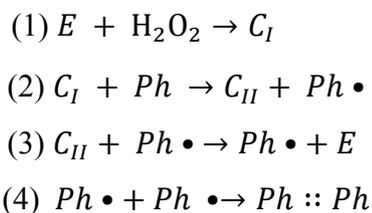


Fig. 6. Representación esquemática de algunas de las reacciones catalizadas por la peroxidasa.

4.6.1. Deshidrogenación oxidativa

La enzima más utilizada para la mayoría de las hidrogenaciones oxidativas es la peroxidasa de rábano picante, ya que tiene la especificidad más amplia para esta reacción orgánica. De la raíz de *Amoracia rusticana*, se han extraído más de treinta isoenzimas diferentes de peroxidasa identificables por sus diferentes puntos isoeléctricos. Entre ellos, la más abundante y activa es una isoenzima catiónica (referida como HRP). El HRP ha mostrado una buena reactividad hacia aminas aromáticas y fenoles. Los productos de las reacciones de oxidación de los fenoles son radicales fenoxilo, que tienden a polimerizar con una reacción por radicales en cadena en la que el grado de propagación depende de las características del fenol. La primera etapa de la reacción conduce a la formación de un dímero, pero la prolongación del tiempo de reacción generalmente resulta en una mezcla compleja de oligómeros. Las ecuaciones 1-4 muestran los pasos implicados en esta reacción:



Donde E es la enzima; C_I indica la formación del compuesto I; C_{II} indica la formación del compuesto II; Ph indica fenol, así como $Ph \bullet$ indica la formación del radical fenoxilo, mientras que $Ph :: Ph$ indica la formación del difenol.

4.6.2. Halogenación oxidativa

Muchas hemo-peroxidadas son capaces de usar peróxido de hidrógeno y haluro para halogenar un átomo de carbono que tiene un enlace C-H bencílico/alílico "activado". Estas halogenaciones enzimáticas son especiales, ya que no muestran las típicas características de las reacciones obtenidas con biocatalizadores, como la reversibilidad, la estrecha gama de sustratos y alta selectividad para los productos. Pueden ser convertidos una amplia gama de alquenos a α, β -halohidrininas por la

cloroperoxidasa (PCO), que también puede catalizar la halogenación de compuestos aromáticos, tales como anilinas y fenoles, y compuestos heterocíclicos (Colonna et al., 1999).

4.6.3. Reacciones de transferencia de oxígeno

La introducción de un átomo de oxígeno en sustratos orgánicos es quizás el proceso más interesante entre las reacciones catalizadas por peroxidasas debido a que los enzimas permiten la oxidación selectiva de moléculas orgánicas en condiciones de reacción suaves y controladas. Los beneficios económicos permiten la posibilidad de utilizar oxidantes respetuosos con el medio ambiente, tales como peróxido de hidrógeno y oxígeno gaseoso. Entre las diversas peroxidasas, las cloroperoxidasas han demostrado las reacciones más estereoselectivas, probablemente debido a la forma particular de acceso al hierro del grupo hemo y al oxígeno del grupo ferrílico, que permite la transferencia de estereoselectividad del átomo de oxígeno. En otras peroxidasas como la lactoperoxidasa y el HRP, la transferencia directa de oxígeno es impedido por el hecho de que los sustratos no pueden llevar el grupo reactivo en la cavidad distal de la enzima. Sin embargo, la conversión de HRP en un catalizador versátil y enantioselectivo es posible mediante el uso de ingeniería molecular.

4.7. Aplicaciones industriales de la peroxidasa

Se pueden obtener numerosas ventajas mediante el uso de estas enzimas en los ciclos productivos tradicionales, de ahí el interés de la industria para invertir en este campo. Con el tiempo, muchos procesos industriales en los que se introdujeron tecnologías enzimáticas generaron diversos beneficios, desde la disminución de los costes de producción hasta un ahorro de energía. La capacidad de las peroxidasas para actuar sobre una amplia variedad de sustratos ha sido explotado en diversos sectores industriales.

En la industria alimentaria, el tratamiento con peroxidasa se utiliza para mejorar el color y la apariencia de los alimentos y las bebidas eliminando los fenoles que causan coloración indeseada.

En la biotecnología, las peroxidasas tienen una posición destacada; de hecho, están involucradas en la eliminación catalítica de fenoles y otros compuestos aromáticos a partir de agua residual de origen vegetal (Cardinali et al., 2007); las peroxidasas son capaces de polimerizar y precipitar el fenol acuoso producido en grandes cantidades en muchos procesos industriales. Entre ellas, la producción de aceite de oliva debido a la acumulación de grandes cantidades de agua contaminada de fenoles con efectos fitotóxicos, conocidas como alpechines (OMW, Olive Mill Wastewater) lo que representa un grave problema ambiental. Numerosos estudios indican que el uso de las peroxidasas vegetales reduce los costes en la eliminación de fenoles en estas aguas residuales. Este método es una alternativa útil para el tratamiento de aguas residuales industriales cuando los métodos convencionales, tales como el tratamiento biológico, carbón activo y oxidación avanzada son ineficaces (Cardinali et al., 2007).

En la industria del papel, se utiliza en la etapa de deslignificación manteniendo íntegra la estructura de la celulosa (Ramesh et al., 1997). También se utiliza como sustitución de las técnicas clásicas de blanqueo químico. Los sistemas de “bioblanqueado” han dado mejores resultados.

En la industria de los detergentes, se emplean con el fin de prevenir el teñido accidental de las prendas durante el lavado, por lo general debido a las aguas que provienen de los tintes de la ropa de color. Estas enzimas, de hecho, son capaces de decolorar tanto la solución acuosa como las manchas presentes sin que ello afecte el cromatismo de tejidos. Esta nueva tecnología enzimática se la conoce como “Dye Transfer Inhibition” (Galante y Formantici, 2003).

El campo comercial más avanzado en la aplicación de la peroxidasa es el diagnóstico analítico; son utilizadas en inmunoensayos para la determinación de la glucosa, ácido úrico, colesterol y otros metabolitos de los fluidos biológicos. Más del 90% de las técnicas de inmunoensayo utilizan anticuerpos conjugados con peroxidasa, siendo la más usada la peroxidasa de rábano picante. Los ensayos colorimétricos realizados con dicho biocatalizador promueven la oxidación de un cromógeno por el peróxido de hidrógeno, que es a su vez producto de una oxidasa específica, tales como la glucosa oxidasa, en el caso del material de diagnóstico para la determinación colorimétrica

glucosa en el plasma o sangre (López-Molina et al., 2002). La peroxidasa de rábano picante ha encontrado también algunas aplicaciones en el campo terapéutico para la terapia génica del cáncer (Tupper et al., 2004). La terapia génica es un método potencial de tratamiento de las neoplasias, que parece tener un mayor grado de selectividad contra las células tumorales en comparación con las terapias convencionales. Uno de los sistemas es el GDEPT (gen-Directed Enzyme Prodrug Therapy), que incluye un proceso en dos etapas: La administración del gen que codifica la enzima, seguido de la administración de un precursor farmacológico no tóxico para el paciente, ya que se convierte en citotoxina por la enzima. Esta técnica tiene una eficacia considerable en el tratamiento selectivo de las células tumorales, ya que se utilizan genes que se expresan en condiciones ambientales y tisulares controladas. La peroxidasa de rábano picante es usada en esta terapia, junto con el paracetamol. Su función es catalizar la oxidación de un electrón del fármaco a un radical cetónico, que inicia una serie de reacciones radicalarias en las que se generan compuestos citotóxicos para la reducción de las células tumorales. La incubación de células cancerosas con esta mezcla ha demostrado una reducción de la capacidad de supervivencia de las líneas celulares resistentes a los tratamientos actuales, incluso en condiciones de anoxia severas, por lo que es adecuada la terapia génica para el tratamiento de áreas hipóxicas del tumor.

4.8. *Cannabis sativa* como posible fuente novedosa de actividad peroxidasa

El objetivo de la búsqueda de la peroxidasa con una mayor estabilidad, diferente especificidad de sustrato y con procedimientos de aislamiento más económicos, conlleva a aumentar las investigaciones encaminadas a encontrar estas enzimas en otras fuentes vegetales, teniendo en cuenta su papel vital en aplicaciones biotecnológicas, el gran uso comercial y el potencial medioambiental.

4.8.1. Notas históricas sobre *C. sativa*

Originaria de Asia central, los primeros indicios de la farmacopea china datan del 2700 A.C.; en el Siglo V A.C. se califican las semillas como alimento exclusivo de

Buda. A continuación, Herodoto lo menciona como el tejido utilizado para la ropa de cama y cortinas. En el siglo I D.C. en China se produce la fabricación del primer libro con papel de cáñamo y en la Edad Media las poblaciones de Europa central y del norte lo utilizaron para textiles y cuerda. El primer ejemplo de obra impresa en papel de cáñamo fue la Biblia por Gutenberg en 1450. En 1492, Cristóbal Colón llega a América en carabelas con velas hechas de lona de cáñamo. En 1776, la Declaración de Independencia de los Estados Unidos fue redactada en papel de cáñamo. En 1938, la prohibición de su comercio y el descubrimiento del nylon supuso una gran reducción de su cultivo y en los años 60 empezó a concebirse sólo como droga de abuso (Müssig, 2010). En 1990, la Comunidad Económica Europea subvenciona el cultivo de cáñamo industrial, seguida por Canadá y Australia.

4.8.2. Caracteres botánicos y fisiológicos

C. sativa es un miembro de la familia Cannabaceae, un pequeño grupo de plantas herbáceas, que pertenece al orden Urticales, clase Magnoliopsida. Es una especie anual con tallo erecto, más o menos ramificado, vigoroso, primeramente lleno y después hueco, con una altura de 1 a 4,5 metros. Las hojas son en su mayoría opuestas, palmeadas, pequeñas y de margen serrado. La raíz principal es robusta con ramificaciones laterales delgadas que se extienden sustancialmente hasta el primer mes de crecimiento. La raíz aumenta rápidamente hasta la floración, posteriormente deja de desarrollarse y se forman entrenudos florales. El cáñamo es una especie principalmente dioica, es decir, caracterizada por plantas femeninas y masculinas. Las flores masculinas se diferencian después de sesenta días desde la germinación y durante un mes; Se reúnen en panículas axilares y constan de un perigonio de cinco partes. Las plantas femeninas tienen un aspecto de mechones compactos originados por el crecimiento de las ramas muy acortadas y ramificadas. El fruto es una nócula ovoide, comúnmente llamada "semilla de cáñamo", con el color de la superficie brillante de color marrón y verde oliva, presentándose a veces cubierta de la envoltura floral. Dependiendo de la variedad, el peso de mil semillas oscila entre 20 y 23 g. El conjunto de fibras textiles, comúnmente conocido como estopa, constituye el producto comercial principal (Berger, 1969).



Fig.7.a. Representación esquemática de la planta *C. sativa*.

El cultivo de *C. sativa* muestra muchos aspectos ambientales positivos (Van der Werf, 2004):

- 1,4 kg de CO₂ ahorrado por cada kg de fibras de cáñamo que se utilizan en lugar de la fibra de vidrio;
- Cerca de cien mil toneladas anuales de CO₂ son ahorradas en Europa gracias a su cultivo;
- Reducción del uso de cloro en la industria del papel en el proceso de blanqueado (eliminación de la lignina residual);
- Capacidad para realizar fitodepuración.

Además, su potencial de producción es muy alta; las fibras de cáñamo, pueden producir incluyendo raíces, tallo y hojas, hasta 15 toneladas de biomasa por hectárea y su cultivo no requiere tratamientos químicos tales como pesticidas o herbicidas (Amthor, 2007). El

cáñamo regenera el suelo por lo que proporciona suelos más fértiles gracias a las propiedades de reducción de malezas con la producción de sustancias alopáticas, contenidas en las hojas. También gracias a su sistema de raíces, que trabajan el suelo en profundidad (hasta 2 metros), generan excelentes condiciones para el siguiente cultivo. El cáñamo ayuda a mitigar el cambio climático (Gorchs et al., 2000). El resultado de un estudio de la Universidad de Edimburgo muestra la capacidad del cáñamo para secuestrar el CO₂ del suelo. (Müssig, 2010). Por el momento, hay tres grupos principales de variedades cultivadas (Berger, 1969):

- Las variedades cultivadas principalmente por su fibra: Estos tienen tallos largos y poca ramificación;
- Las variedades cultivadas para semilla: Por lo general son de baja estatura y de maduración temprana. Las semillas contienen de un 32 a un 35% de aceite;
- Las variedades cultivadas en la India, África del Norte y Oriente Medio para su uso medicinal y narcótico. Son de pequeña estatura, muy ramificadas y tienen pequeñas hojas de color verde oscuro. Las inflorescencias producen un jugo resinoso del cual se obtiene el producto.

4.8.3. Usos modernos

Los usos por los que hoy en día se utiliza la *C. sativa* son muy diversos (Van der Werf, 2004):

- *Las hojas y las flores*: Se utilizan para la producción de té, cerveza, dulces, aceite para perfumes y sustancias aromatizantes para alimentos. También se extraen los cannabinoides para uso farmacéutico que son usados en unas 100 preparaciones medicinales para el tratamiento del glaucoma, vómitos, ataques de asma y de diferentes géneros.
- *Semilla descortezada*: Se utiliza como alimento para animales (rico en proteínas) y humano, como condimento en ensaladas y para la producción de margarinas, tofu, helados y similares, así como un suplemento alimenticio nutracéutico, ya que las semillas son ricas en ácidos grasos omega 3 y omega 6, actuando como suplemento para una dieta saludable y equilibrada. También son

usadas en la producción de cosméticos y geles para la higiene del cuerpo. El aceite procesado químicamente, también se utiliza para la fabricación de detergentes, tintas de impresión, pinturas al óleo y de exteriores de edificios, disolventes, adhesivos y en el combustible biodiesel. La harina obtenida mediante semillas prensadas en frío tiene uso alimentario debido a su característica fundamental: Está libre de gluten.

- *Fibras*: Una vez procesadas las fibras industriales mediante la hilatura en húmedo, se utilizan para la fabricación de telas y prendas de vestir, mientras que las de menor calidad se utilizan para la fabricación de cuerdas, sacos, lonas, alfombras, pasta de papel para billetes y documentos oficiales, papel para cigarrillos, así como para fabricar paneles aislantes e insonorizantes para la construcción de edificios, incluso para crear tapicerías de automóviles.
- *Campo farmacéutico*: Lo más utilizado es el cannabis medicinal, debido a que el cannabis industrial contiene niveles demasiado bajos de THC (tetrahidrocannabinol) para que tenga un efecto significativo.

Debido a errores entre la distinción de las dos especies *C. indica*, droga de consumo y *C. sativa*, usada para crear fibras, en su cultivo se deben utilizar variedades de *C. sativa* permitidas por la Unión Europea, con un contenido de THC en las inflorescencias inferiores al 0,2%. Con el cultivo del cáñamo podrían salvarse cada año millones de árboles gracias la producción de todo tipo de tejidos, combustibles, plásticos, pinturas no contaminantes, papel y sustituyentes de los productos químicos del petróleo (Müssig, 2010).

En conclusión, el aumento de interés por el cáñamo se debe a todas las características descritas anteriormente, la creciente conciencia de los problemas ambientales y la demanda de utilización de los recursos renovables, con miras a la economía sostenible.

5. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Dada la importancia en la industria de las peroxidasas y la necesidad de encontrar nuevas peroxidasas con propiedades diferentes nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

- Determinar si las semillas de cáñamo (*C. sativa*) tienen actividades enzimáticas de interés biotecnológico.
- Aislar la peroxidasa más abundante de las semillas de cáñamo.
- Caracterizar la peroxidasa de las semillas de cáñamo.
- Determinar las condiciones óptimas para la actividad peroxidasa de las semillas del cáñamo.

Las etapas del plan de trabajo fueron las siguientes:

1. Se obtuvo el extracto proteico y se investigó si tenía actividades peroxidasa, polinucleótido: adenosina glicosilasa, proteasa y anti-proteasa. También se realizó un ensayo de la inhibición de la síntesis de proteínas “in vitro”.
2. Dado que se vio que tenía una elevada actividad peroxidasa se aisló y caracterizó esta enzima.
3. Finalmente se determinaron las condiciones óptimas de la actividad enzimática de la peroxidasa.



Fig.7.b. Semillas de la planta *C. sativa* utilizadas en este trabajo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. MATERIAL EMPLEADO

6.1.1. APARATOS Y OTROS MATERIALES

- Tubos de diálisis Spectrapor (corte 6000/8000) producidos por Spectrum, (EE.UU.) y distribuido por Gianni productos SpA (Milán).
- Trituradora Waring para la homogeneización de las semillas, se adquirió de los laboratorios Blender (USA).
- Las celdas de ultrafiltración, 8200, 8010 y 8050 con sus membranas de celulosa regenerada con corte de 10 kDa y los filtros estériles de 0.22 μ M se adquirieron de Amicon, Beverly, MA 01915 (EE.UU.).
- Membrana de ultrafiltración YM-10 de celulosa de Millipore Corporation, Bedford (MA, EE.UU.).
- Espectrofotómetro modelo UV-1601 de Shimadzu Corporation, Kyoto (Japón).
- Centrífuga de mesa para tubos Eppendorf, modelo 5415 C y tubos Eppendorf de sigma, Milán.
- Centrífuga Mod. Avanti TM J-25 y centrífuga de sobremesa Mod.GS-15R, ambas de Beckman CoulterTM (Milán).
- Concentrador al vacío (SpeedVac) de Sarvant Instruments Inc., Holbrook (NY, EE.UU.)
- Medidor de pH (modelo pHM92) y de conductividad (modelo CDM80) ambos de Radiometer Copenhagen, Lyon (Francia).
- El aparato utilizado para la electroforesis (Mini-Protean II) fue producido por Bio-Rad (Milán).
- Sistema de cromatografía de proteínas AKTA (FPLC) equipado con un colector y la columna para la cromatografía de filtración en gel Superdex 75 26/60 Pregrade (rango de depuración de 3.000 a 70.000) se obtuvieron de Amersham Pharmacia Biotech (Milán).
- Kit para la determinación de concentración de proteína BCA se adquirió BioRad (Milán).
- Colector de fracciones Fraction Collector 204 de Gilson (Milán).

6.1.2. REACTIVOS

Los reactivos químicos utilizados durante la realización de este trabajo se especifican en la siguiente tabla:

REACTIVO	ORIGEN
Ácido acético	Merck
Ácido clorhídrico	Merck
Ácido etilendiaminotetraacético	Sigma
Ácido 2,2'-azino-bis(3 etilbenzotiazolín)6-sulfónico (ABTS)	Sigma
Acrilamida	Roche
Agua MilliQ, producida por el aparato Milli-Q SY-A10	Millipore, Vimdrone
Azul de bromofenol	Sigma
Bis-acrilamida	Roche
Cloruro de sodio	Merck
Colorante Azul de Coomassie R-250	Fluka
DMSO	Carlo Erba
Etanol	Merck
Fosfato monosódico	Merck
Hidróxido sódico	Panreac
Marcadores de peso molecular para SDS-PAGE	Sigma
2-Mercaptoetanol	Merck
Peroxidasa de rábano picante	Sigma
Peróxido de hidrógeno	Panreac
Resina de cromatografía de intercambio catiónico SP-Sepharose	Pharmacia Biotech
Resina Red-Sepharose CL-6B	Pharmacia Biotech
Resina Source	Pharmacia Biotech
N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED)	Sigma
Tris base	Roche

6.2. MÉTODOS

6.2.1. Purificación de la peroxidasa a partir de semillas de *C. sativa*.

El protocolo usado para la purificación de proteínas básicas de semillas de *C. sativa* fue verificado por Di Maro et al. (2007).

Las semillas se homogeneizaron en tampón fosfato de sodio 5 mM a pH 7,2, con NaCl 0,14 M (relación 1:5 p:v) con un triturador Waring. Se realizaron 3 ciclos de 1 minuto en intervalos de 5 minutos. El homogeneizado se mantuvo con agitación toda la noche y después se centrifugó a 10.000 rpm con un rotor JA-14 durante 60 minutos a 4°C.

El sobrenadante se filtró con papel Miracloth y después se llevó a pH 4,00 con ácido acético glacial. Posteriormente se llevó a cabo otra centrifugación de la misma forma que la anterior. Después de una filtración adicional con papel Miracloth, se cargó el sobrenadante de esta segunda centrifugación en la columna de intercambio catiónico Fast Flow S-Sepharosa (2,5 x 15 cm) equilibrada con tampón acetato de sodio 10 mM a pH 4.0. Después de hacer pasar la muestra por la columna, se efectuó un primer lavado con el tampón de equilibrado con el fin de eliminar las proteínas que se unen inespecíficamente a la resina (hasta llegar a un valor de absorbancia a 280 nm inferior a 0,03) y un segundo lavado con fosfato de sodio 5 mM a pH 7,2 (hasta un valor de absorbancia a 280 nm inferior a 0,03). Las proteínas unidas a la resina se eluyeron con fosfato de sodio 5 mM a pH 7,2 utilizando NaCl con molaridad creciente (0,1 M; 0,2 M; 1 M) de forma que el pico eluido con NaCl 0,2 M que presentó actividad peroxidasa se concentró utilizando una celda de ultrafiltración Amicon, conectada a una bala de nitrógeno a 2,5 bares de presión y con agitación magnética. Dentro de la celda se insertó una membrana con un corte de 10.000 Da. Posteriormente, la muestra se sometió a cromatografía de exclusión molecular en la columna Superdex™ 75 26/60 (2,6 cm x 60 cm) montada sobre el aparato AKTA purifier (FPLC) y equilibrada con tampón fosfato de sodio 5 mM a pH 7,2. La proteína se eluyó con fosfato de sodio 5 mM con un contenido de NaCl 0,3 M y a una velocidad de flujo de 2,5 mL/min. Se ensayó la actividad peroxidasa de las proteínas contenidas en el pico con el volumen de elución correspondiente a un peso molecular de 40 kDa. Las fracciones con actividad peroxidasa se combinaron (volumen final $V_f=40$ mL) y se dializaron con 2 L de agua destilada, cambiando el agua cada tres horas y posteriormente con Tris-Cl 0,05 M pH 7, dejando esta última diálisis durante toda la noche. Después se realizó una cromatografía

en columna Red-Sepharosa (volumen de columna: 1,7 mL) equilibrada en Tris-Cl 0,05 M a pH 7,00, con un flujo de 0,5 mL/min. Posteriormente, se recogieron las fracciones del pico de interés, se mezclaron y se dializaron con tampón fosfato de sodio 5 mM a pH 7,2. La muestra se centrifugó durante 15 minutos a 14000 rpm a 4°C, se filtró (filtro Millipore 0,22 µm) y seguidamente se desgasificó con el sistema Sartorius. Se cromatografió en columna Source 15S 4,6/100 PE (volumen de columna:1,7 mL) equilibrada en fosfato de sodio 5 mM pH 7,2. La muestra se eluyó con un gradiente de concentración creciente de NaCl (de 0 a 0,25 M) con un flujo de 1 mL/min, usando un sistema cromatográfico Akta purifier y recogándose fracciones de 1 mL con un colector. La monitorización de la elución se realizó siguiendo la absorbancia de la muestra a 280 y 214 nm. Al final de la cromatografía, se realizó un lavado de la columna con NaCl 0,5 M en tampón de fosfato de sodio 5 mM a pH 7,2.

6.2.2. Concentración por ultrafiltración

Cuando fue necesario, la mezcla de las fracciones se concentró mediante una celda de ultrafiltración bajo presión (2,5 bar), conectada a una bala de nitrógeno. En el interior de la cámara se insertó una membrana con un corte de peso molecular de 10.000 Da.

6.2.3. Electroforesis en gel de acrilamida en presencia de SDS

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS se realizó de acuerdo al protocolo de Laemmli y Favre (1973). Como patrones del peso molecular se utilizaron los marcadores Dalton Mark VII-L (Sigma). Se empleó un gel separador del 12 % y un gel compactador del 6%. Las cantidades de reactivos para formar dichos geles están indicados a continuación:

	<u>Gel separador (12%) 5 mL</u>	<u>Gel compactador (6%) 3 mL</u>
	(μ L)	(μ L)
Agua Milli Q	1645	1585
Acrilamida 29,2%/ bis-acrilamida 0,8%	2000	600
Tris-HCl 1,5M pH=8,8	1250	-
Tris-HCl 0,5 M pH=6,8	-	750
SDS 10%	50	30
TEMED	5	5
Persulfato de amonio 10 %	50	50

El gel separador se polimerizó entre dos placas de vidrio, usando espaciadores de 0,75 mm. Por encima de la solución se añadió una pequeña cantidad de alcohol isopropílico para evitar el contacto con el O₂ del aire y conseguir una superficie plana del gel. Después de la polimerización del gel separador se eliminó completamente el alcohol isopropílico, se secó con papel de filtro el espacio entre las placas de vidrio y se procedió a la polimerización del gel compactador del 6% (3 mL). Antes de la polimerización se introdujo en la parte superior el “peine”, que formó en el gel compactador los pocillos en los que se cargaron las muestras.

Las muestras proteicas se desnaturalizaron incubándolas durante 3 minutos en 20 μ L de tampón de muestra, solución que contiene de azul de bromofenol 0,02% (p:v), glicerol 10% (v:v), SDS 2% (p:v) y Tris-Cl 0,125 M, pH 6,8. El tampón de cámara para la electroforesis de las proteínas estaba compuesto de Tris 3% (p:v), glicina 14,4% (p:v), SDS 0,5% (p:v), pH 8,3. En nuestro caso la electroforesis se realizó en condiciones reductoras añadiendo a la solución β -mercaptoetanol 5 % y se llevó a cabo a un voltaje constante (150 V) durante 70 minutos. Una vez realizada la electroforesis, la tinción del gel se llevó a cabo de dos formas distintas:

Tinción con Azul de Coomassie: Una vez retirado el gel de las placas de vidrio se sumergió durante 30 min en la solución de tinción compuesta de: Azul de Coomassie (R-250) 0,1%, isopropanol 25 % y ácido acético 10%. Se destiñó con una solución de ácido acético 10% - metanol 30% hasta la visualización de las bandas.

Coloración con nitrato de plata: Para pequeñas cantidades de proteína (menos de 1 µg) se llevó a cabo la tinción con nitrato de plata según el protocolo de Merrill et al. (1981) que comprende las siguientes etapas:

- Después de la migración electroforética el gel se sumergió durante 20 min en una solución de ácido acético 10% - etanol 30%, eliminando así el SDS.
- Se equilibró el gel durante 20 min en la solución A compuesta de: glutaraldehído 25% (5 mL); tiosulfato de sodio (1,0 g); acetato sódico trihidratado (54,4 g); se enrasó con agua destilada hasta llegar a un litro. Se ajustó a pH 6,5 con ácido acético y se conservó en un frasco oscuro a 4 °C.
- El gel se lavó a fondo con agua durante al menos 30 minutos para eliminar el glutaraldehído.
- El gel se sumergió durante 20 minutos y sin luz en la solución B, la cual contenía: AgNO₃ (1,0 g); formaldehído (250 µL); agua destilada enrasando a un litro, se almacena en la oscuridad a temperatura ambiente.
- Evitando el contacto con la luz, el gel se enjuaga una vez con agua destilada y posteriormente con la solución C, que se compuso de: Na₂CO₃ anhidro (3 g); formaldehído (40 µL); agua hasta los 100 mL. La solución se preparó antes de su uso ya que se degrada fácilmente. Se añadió la solución C hasta la visualización de las bandas.
- La reacción se detuvo por inmersión del gel en ácido acético 7%.

6.2.4. Determinación de la concentración de proteínas (BCA)

La concentración de proteínas se determinó usando el ensayo de BCA (ácido bicinconínico). Como proteína patrón se utilizó la albúmina de suero bovino (BSA) en concentraciones de 1,25; 2,5; 3,75 y 5,0 µg/ensayo. La intensidad del color violeta de la proteína patrón y la muestra se leyeron a 562 nm. Se construyó un gráfico en el que el eje de abscisas representaba los µg de BSA y el eje de ordenadas la absorbancia a 562 nm. Se obtuvo una recta a partir de la cual fue posible calcular la concentración de la muestra de interés.

6.2.5. Precipitación con etanol frío

La eliminación de las sales en las muestras se llevó a cabo por precipitación con etanol frío (99%), se añadió una concentración final al 90% de etanol. Las muestras se mantuvieron a -80 ° C durante 15 horas y posteriormente se centrifugaron a 14.000 rpm durante 30 minutos, a 4°C. El precipitado se volvió a suspender en el tampón de muestra para analizarlo por SDS-PAGE.

6.2.6. Ensayo de la actividad peroxidasa con ABTS

La actividad peroxidasa se evaluó por espectrofotometría utilizando como donador de hidrógeno el ABTS. Esta sustancia cromógena en presencia de agentes oxidantes tales como peróxido de hidrógeno, se puede convertir en su radical monocatiónico que presenta un color verde oscuro. La reacción de oxidación del ABTS puede medirse a 414 nm; se evaluó la variación de absorbancia registrada por minuto (durante al menos 2 minutos), comprobando su linealidad. Para este ensayo se prepararon los siguientes reactivos: ABTS 1 mM y H₂O₂ 5 mM. Como tampón se utilizó fosfato de sodio 5 mM a pH 6 y la cantidad apropiada de muestra para monitorizar la actividad peroxidasa.

En tales condiciones, la actividad peroxidasa se mide en unidades enzimáticas. Una unidad enzimática se define como los micromoles (µmoles) de sustrato producidos en un minuto. Se calculó de la siguiente manera:

$$Unidad\ enzimática = \frac{[(\Delta A_{414}/min_{test}) \cdot (1500\ \mu L) \cdot (df)]}{[(36,8) \cdot (volumen\ de\ enzima\ utilizada\ \mu L)]}$$

Dónde: 1500 µL = volumen total de la muestra

df = factor de dilución

36,8 = coeficiente de extinción milimolar del ABTS.

6.2.7. Ensayo de la actividad proteasa y anti-proteasa

La evaluación de la actividad de la tripsina se llevó a cabo siguiendo el método de Hummel (1959). Este ensayo se basa en la determinación de la actividad de la enzima esterasa; consiste en determinar el aumento de la absorción a 247 nm ($\Delta_{\text{ABS}} \cdot \text{min}^{-1}$), que se produce en la muestra (volumen final de 1 mL), después de la reacción de hidrólisis del sustrato sintético TAME. La mezcla de reacción se compone de TAME 10 mM en tampón Tris- HCl 0,46 M, CaCl₂ 11,5 mM, pH 8,1. A esta mezcla, pre-incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos, se añade una alícuota de la muestra de la que se desea medir la actividad proteasa. La reacción se muestra a continuación:



En las condiciones descritas, el aumento de absorción a 247 nm es función lineal del tiempo durante al menos los primeros cinco minutos de incubación. Para nuestro ajuste, una unidad de tripsina (1 U.T) corresponde a una cantidad de enzima que, en las condiciones descritas para el ensayo, produce un aumento de absorbancia de 0,05 en un minuto.

La actividad inhibidora de tripsina se determinó pre-incubando una unidad de tripsina pancreática bovina con distintas cantidades de extracto en un tampón Tris-HCl 0,46 M, CaCl₂ 11,5 mM pH 8,1, durante cinco minutos a temperatura ambiente. La actividad enzimática se determina después de la adición del sustrato (TAME). Para nuestra convención una unidad inhibidora de tripsina (1 U.I.T) es aquella cantidad de inhibidor que, bajo las condiciones de ensayo, inhibe la actividad de la enzima en un 30%.

Se ensayaron cantidades crecientes de la muestra con el fin de obtener una curva de inhibición (es decir, la cantidad de inhibidor requerida para inhibir la enzima del 0 a 100%).

Por último, se calcula:

$$\text{Actividad enzimática residual} = \frac{\Delta A_{247}/\text{min} (\text{enzima} + \text{inhibidor}) \cdot 100}{\Delta \text{Abs} / \text{min} (\text{sólo enzima})}$$

$$\text{Actividad inhibidora} = 100\% - \text{actividad de la enzima residual}$$

Para el cálculo de la IC_{50} , se utilizó el programa Prism (versión 5 para Windows), producido por Graph Pad Software Inc. (La Jolla, CA 92037 EE.UU.). En particular, se ha utilizado la utilidad de "Dose-response data".

6.2.8. Optimización de las condiciones para la actividad enzimática (diferentes valores de pH y concentraciones de NaCl en presencia de EDTA, con adición de iones divalentes)

La influencia del pH sobre la actividad enzimática se determina por la realización del ensayo descrito anteriormente y el uso de soluciones tampón con una gama de valores de pH de 3,0 a 10,0. Los tampones utilizados fueron (concentración 10 mM): Citrato de sodio (pH 3,0); acetato de sodio (pH 4,0 y pH 5,0); fosfato de sodio (pH 6,0 y 7,0); Tris-HCl (pH 8,0 a 9,0) y bicarbonato/carbonato de sodio (pH 10,0). Las concentraciones en la cubeta fueron las siguientes: ABTS 1 mM; H_2O_2 5 mM; buffer 10 mM, siendo el volumen final de 1 mL.

El efecto sobre la actividad de los cationes divalentes se determina en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} (0,1; 2,5; 5; 10; 25 y 50 mM). La actividad también fue determinada variando la concentración (0,5; 1; 5; 10 mM) de EDTA, el agente quelante capaz de unirse a iones divalentes tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} .

Por último, se determinó la fuerza iónica óptima para la actividad enzimática, añadiendo a la solución estudiada diferentes concentraciones de NaCl (10; 25; 50; 100; 200 y 300 mM).

Cada experimento se llevó a cabo por triplicado.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Actividades enzimáticas en las semillas de *C. sativa*

Para investigar la presencia de proteínas en las semillas de *C. sativa* con actividades enzimáticas de posible interés biotecnológico, se homogeneizó un gramo de semillas con una trituradora Waring en fosfato de sodio 5 mM conteniendo NaCl 0,14 M, pH 7,2, a 4°C.

Después de la centrifugación, el extracto proteico filtrado con papel Miracloth[®], fue sometido a diversos ensayos enzimáticos para comprobar posibles actividades biológicas de interés. En particular, los ensayos fueron:

- Ensayo para la actividad peroxidasa;
- Ensayo para la actividad polinucleótido: adenosina glicosilasa
- Ensayo de inhibición de la síntesis de proteínas “in vitro”
- Ensayo para la actividad proteasa
- Ensayo de la actividad anti-proteasa (presencia de inhibidores de proteasas).

Los resultados mostraron que el extracto de proteína tiene actividad anti-proteasa y actividad peroxidasa (utilizando como sustrato el ABTS), sin encontrarse las otras actividades ensayadas. Para el ensayo de la actividad anti-proteasa, se han utilizado concentraciones crecientes del extracto proteico con el fin de obtener una curva de inhibición, necesaria para el cálculo IC₅₀ (concentración que inhibe un 50% la actividad enzimática). El experimento realizado permitió obtener un valor de IC₅₀ de 4.309 µg/mL.

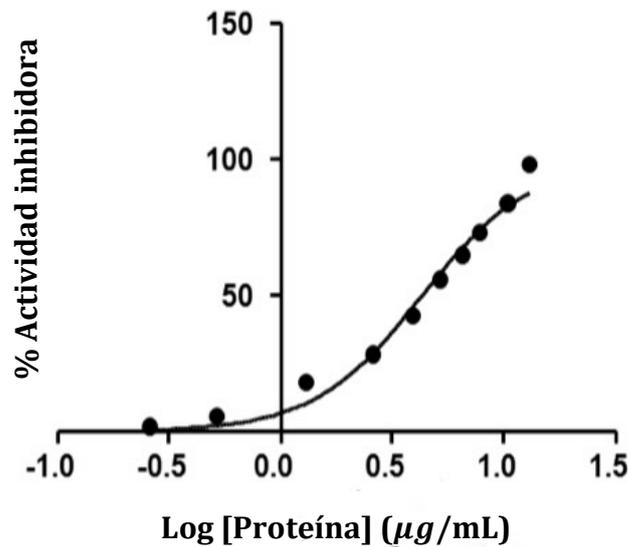


Fig. 3.1. *Actividad anti-proteasa del extracto de semillas de C. sativa. La actividad anti-proteasa se determinó como la inhibición de la actividad de la proteasa tal y como se indica en el apartado 6.2.7.*

Debido a la utilidad biotecnológica de las peroxidasa se decidió aislar y caracterizar la actividad de la peroxidasa presente en el extracto a través de un procedimiento de purificación de proteínas básicas, como se había descrito anteriormente para la peroxidasa de semillas de *Asparagus acutifolius* (Guida et al. 2014), dado que muchas peroxidasa de semillas tienen un punto isoeléctrico básico ($pI > 7,0$).

7.2. Purificación de proteínas básicas a partir de semillas de *C. sativa*

Con el procedimiento descrito en el apartado 6.2.1 se obtuvieron proteínas básicas por medio de cromatografía de intercambio de catiónico en S-Sepharosa. En la figura 3.2 se representa el perfil cromatográfico, que muestra los picos obtenidos con la elución a concentraciones crecientes de NaCl (0,1; 0,2; 1 M).

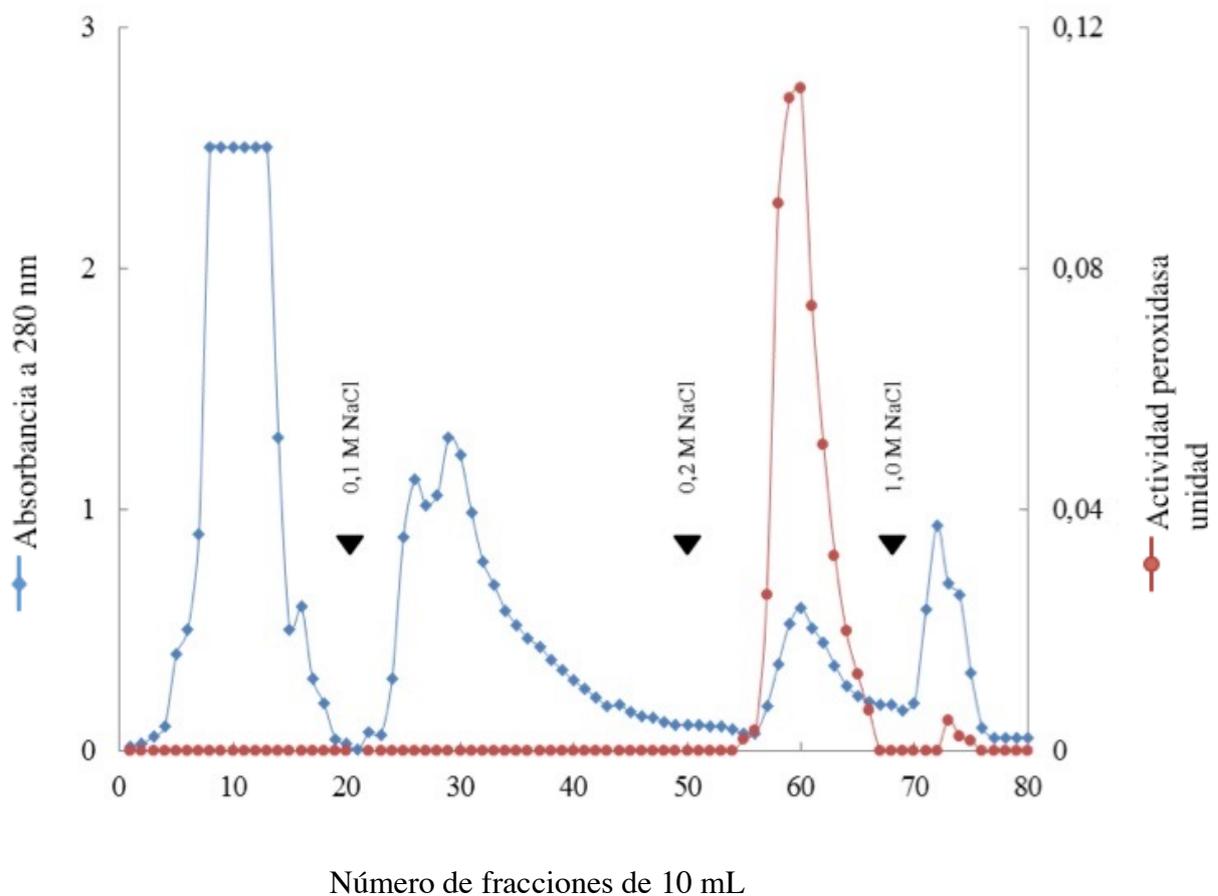


Fig.3.2. Cromatografía del extracto proteico de las semillas de cáñamo en *S-sepharosa*. La cromatografía de intercambio catiónico se llevó a cabo como está indicado en el apartado 6.2.1. Los datos del gráfico en azul representan la absorbancia a 280 nm, mientras que los datos en rojo representan la actividad peroxidasa frente al número de fracciones de 10 mL. Las cabezas de flecha indican la adición de concentraciones crecientes de NaCl.

La actividad peroxidasa detectada en el homogeneizado estaba presente únicamente en el pico eluido con una concentración de NaCl 0,2 M. Las fracciones 57-66 se juntaron, se concentraron por ultrafiltración y se sometieron a una cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 75TM 26/60.

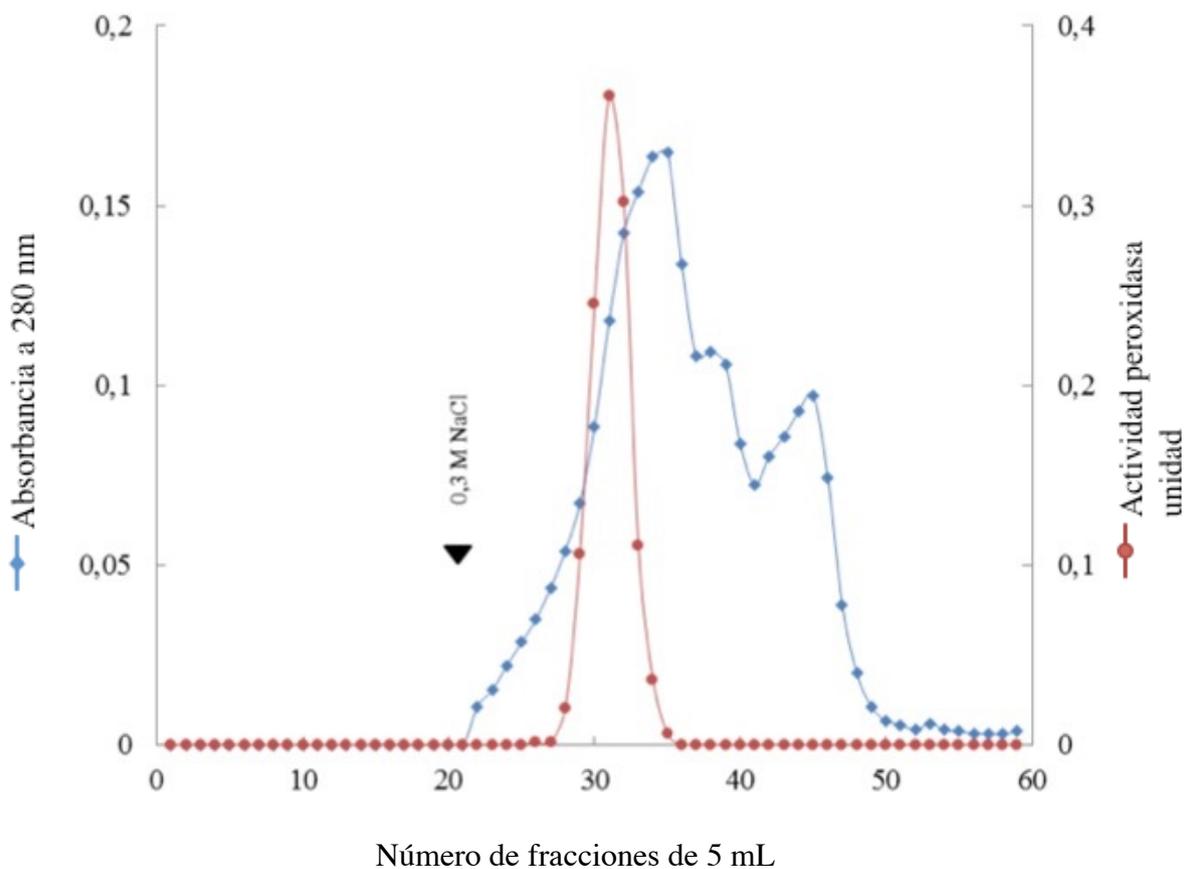


Fig.3.3. Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones 57-66 en una columna Superdex 75TM 26/60. Como se muestra en la figura, la actividad peroxidasa sólo estaba presente en las fracciones 28-34. La proteína se eluyó con NaCl 0,3 M como está indicado en el apartado 6.2.1. La línea de datos en azul representa la absorbancia a 280 nm mientras que la línea de datos en rojo representa la actividad peroxidasa en unidades arbitrarias, frente al número de fracciones de 5 mL.

Estas fracciones se analizaron posteriormente por SDS-PAGE determinar el contenido de proteínas (Figura 3.4). Como se puede ver en la figura 3.4 entre las bandas aparecen varias de aproximadamente 40 kDa, siendo de posible interés debido a que, según varias publicaciones, muchas peroxidasas tienen un peso molecular de aproximadamente 40 kDa (Guida et al. 2014)

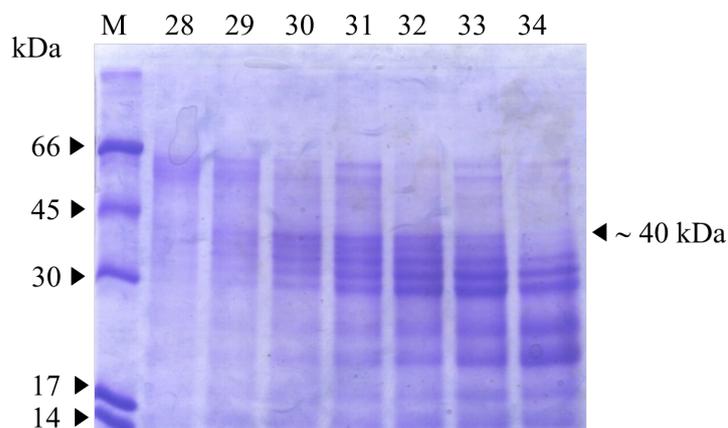


Fig. 3.4. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones 28 - 34 de la cromatografía en la columna Superdex 75TM 26/60. Las fracciones se obtuvieron por cromatografía de exclusión molecular y se trataron en presencia de un agente reductor (2-mercaptoetanol) como se indica en la fig. 3.3. En el pocillo M se colocaron los patrones, se cargó en cada uno 5 μ g de proteína aproximadamente. El gel se tiñó con Azul de Coomassie como se indica en el apartado 6.2.3.

Las fracciones cromatográficas se agruparon, se dializaron como se indicó en la sección 6.2.1 y se sometieron a cromatografía de afinidad Red-Sepharosa CL-6B, equilibrada con Tris-HCl 0,05 M, pH 7,0. Se cargaron en la columna aproximadamente 40 mL de la muestra. La columna se lavó con el tampón de equilibrado hasta que la absorbancia a 280 nm se hizo nula. Las proteínas unidas a la columna se eluyeron con un tampón de Tris-HCl 0,05 M, pH 7,0 conteniendo NaCl 1M. En las fracciones recogidas se estudió la actividad peroxidasa. En la figura 3.5, se muestra el perfil cromatográfico donde se observa la presencia de un pico proteico que tiene actividad peroxidasa, entre las fracciones 13-14.

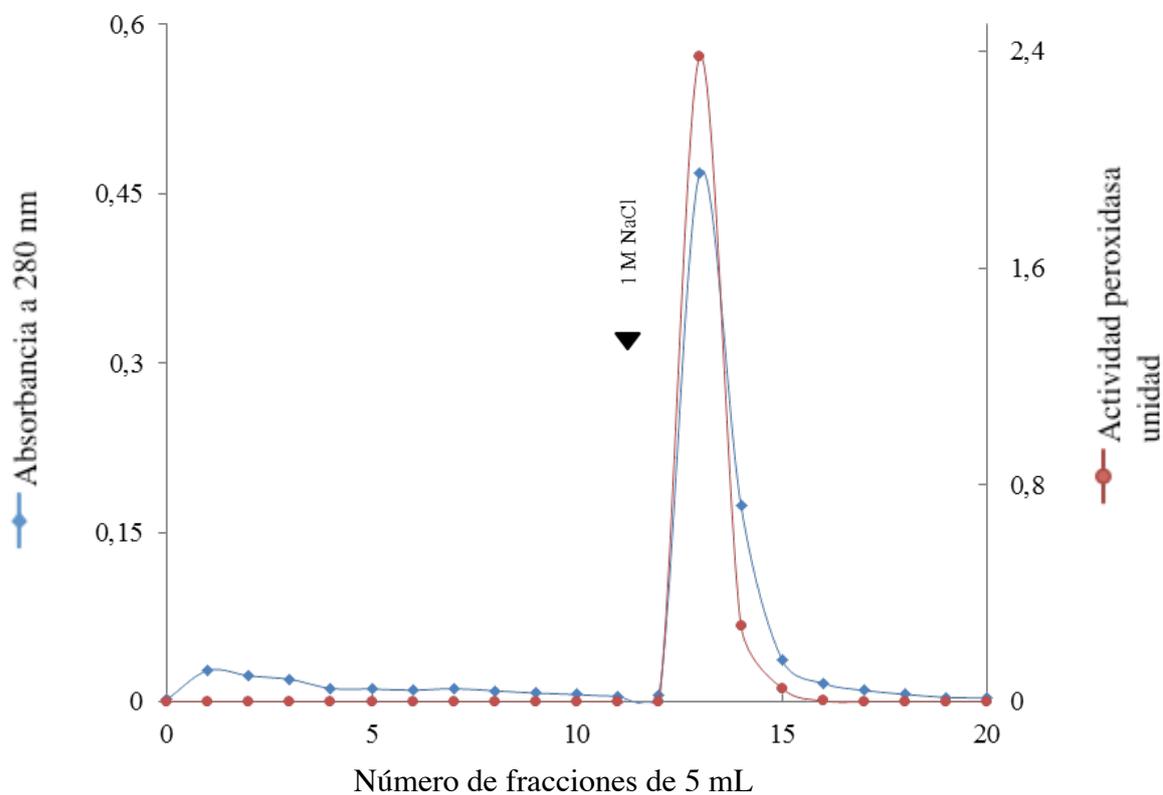


Fig. 3.5. Cromatografía de afinidad en Red-Sepharosa. Las fracciones 28-34 obtenidas por cromatografía de exclusión molecular (Fig. 3.3) se sometieron a cromatografía de afinidad, presentando actividad peroxidasa en las fracciones 13-14 utilizándose como eluyente NaCl 1 M tal y como está descrito en el apartado 6.2.1. La línea de datos en azul representa la absorbancia a 280 nm mientras que la línea de datos en rojo representa la actividad peroxidasa en unidades arbitrarias, frente al número de fracciones de 5 mL.

Se precipitó la proteína en alícuotas de 50 μ L de las fracciones 13 y 14 mediante la adición de 9 volúmenes de etanol 100%, dejándolas precipitar durante toda la noche. Se centrifugaron 30 minutos a 14.000 rpm. El sedimento se secó durante 30 minutos en un concentrador al vacío (SpeedVac), se resuspendió en 20 μ L de tampón de muestra y se analizaron por SDS-PAGE, en presencia de un reductor (2-mercaptoetanol). El análisis mostró la presencia de bandas heterogéneas y entre ellas una a un peso molecular de aproximadamente 40 kDa.

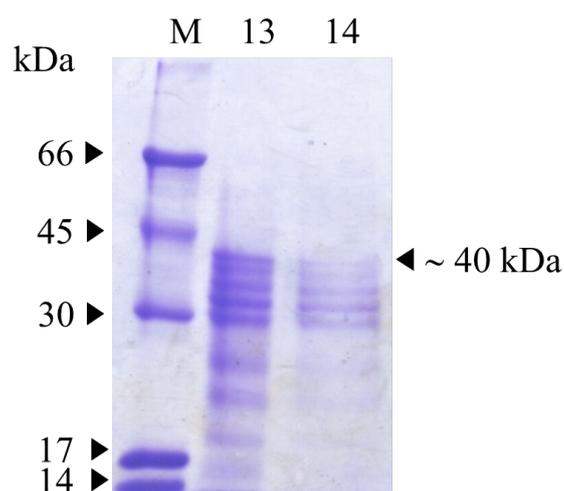


Fig. 3.6. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones de la cromatografía en Red-Sepharosa. Las fracciones 13 y 14 de la cromatografía de afinidad Red Sepharose se analizaron en presencia de un reductor (2-mercaptoetanol). Como podemos ver la proteína de interés se encuentra a un peso molecular de aproximadamente 40 kDa. En el pocillo M se colocaron los patrones. El gel se tiñó con Azul de Coomassie como se indica en el apartado 6.2.3.

7.3. Cromatografía de intercambio catiónico en Source 15S

Las fracciones de interés 13 y 14 obtenidas de la cromatografía en Red-Sepharosa de 2 mL de volumen cada una se unieron y se dializaron con fosfato de sodio 5 mM, pH 7,2, se realizaron 3 cambios del tampón de diálisis cada tres horas y posteriormente se sometieron a cromatografía de intercambio catiónico en Source 15S, equilibrada con el mismo tampón que fue utilizado en la diálisis (tampón A). Se lavó con el tampón de equilibrado y posteriormente se eluyó usando un gradiente lineal, aumentándose la fuerza iónica con NaCl en el tampón B (fosfato de sodio 5 mM, pH 7,2 con NaCl 0,5 M). Durante el primer lavado con el tampón de equilibrado no se observó ninguna elución de la proteína, mientras que con el gradiente de NaCl si eluyó el pico proteico de interés, tal y como se muestra en la figura 3.7.

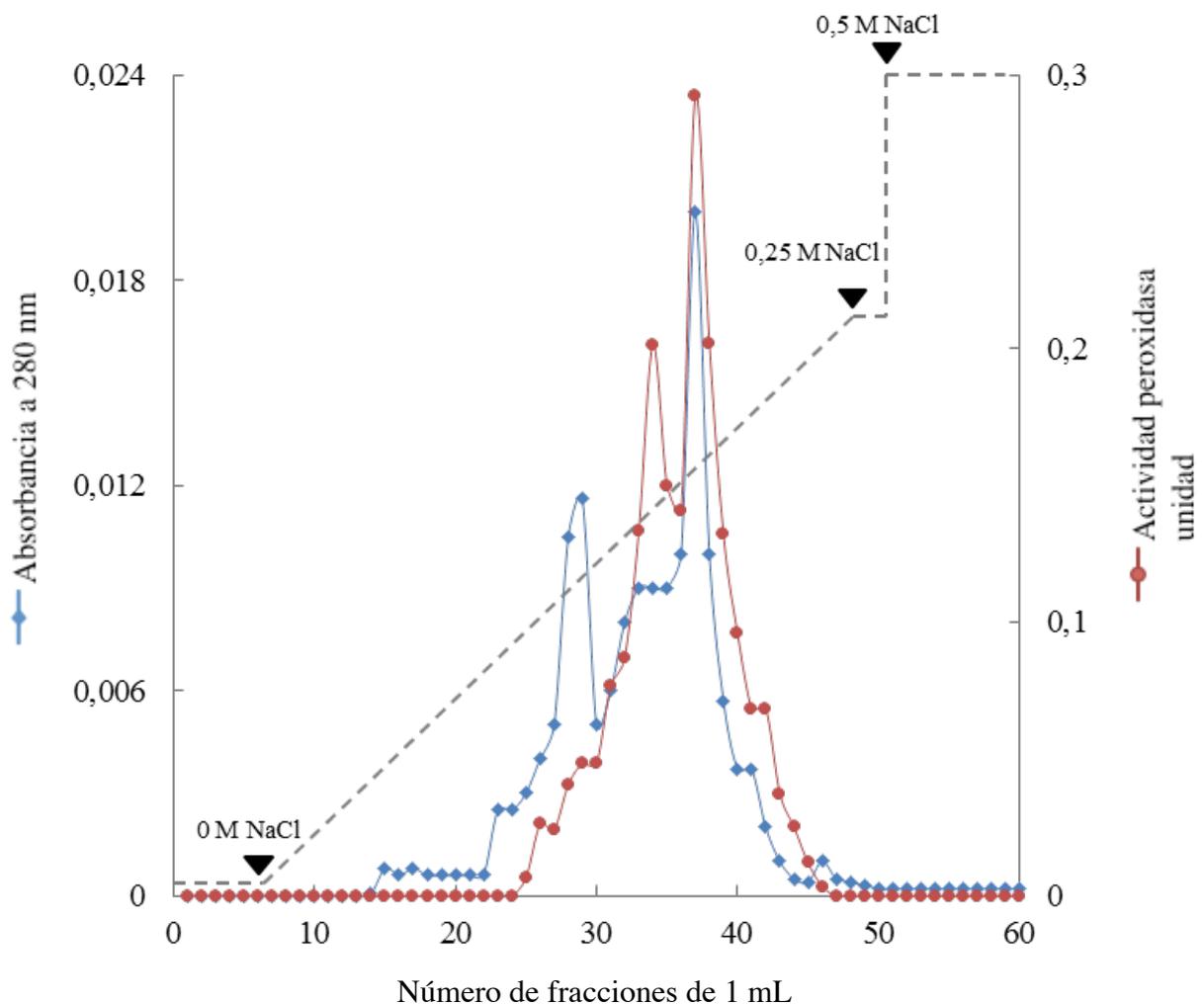


Fig. 3.7. Cromatografía de intercambio catiónico en la columna Source 15S de las fracciones 13 y 14, previamente unidas y dializadas. la fracción proteica eluyó una vez que se inició el gradiente de concentraciones de NaCl. La proteína de interés eluyó a una concentración de NaCl 0,2M aproximadamente, entre las fracciones 20-41 de la cromatografía como está indicado en el apartado 6.2.1. La línea de datos en azul representa la absorbancia a 280 nm mientras que la línea de datos en rojo representa la actividad peroxidasa en unidades arbitrarias, frente al número de fracciones de 1 mL.

Se analizaron alícuotas de 75 μ L de las fracciones eluidas con actividad peroxidasa (fracciones 29-32-33-34-35-37-39-40-41) por SDS-PAGE. En la Figura 3.8, se muestra el resultado obtenido, en el que se puede ver la presencia de la banda de interés a 40 kDa.

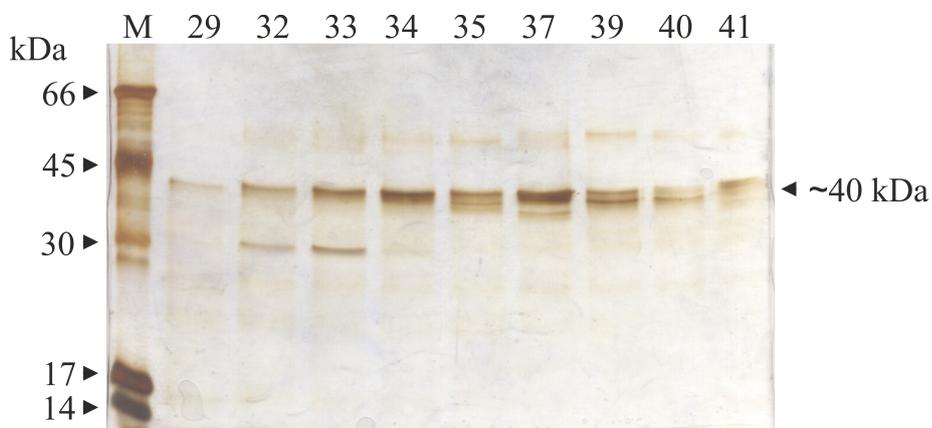


Fig.3.8. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones 29-32-33-34-35-37-39-40-41 de la cromatografía en columna Source 15S, en presencia del reductor 2-mercaptoetanol. En el pocillo M se encuentran los patrones y en el resto se colocaron las fracciones 29-41. Podemos visualizar la presencia de la banda de interés a un peso molecular de 40 kDa aproximadamente. El gel fue teñido con nitrato de plata como se indica en el apartado 6.2.3.

Posteriormente se realizó otro análisis por SDS-PAGE de las fracciones 37-38, las cuales presentaban actividad peroxidasa, con el reductor 2-mercaptoetanol y sin él.

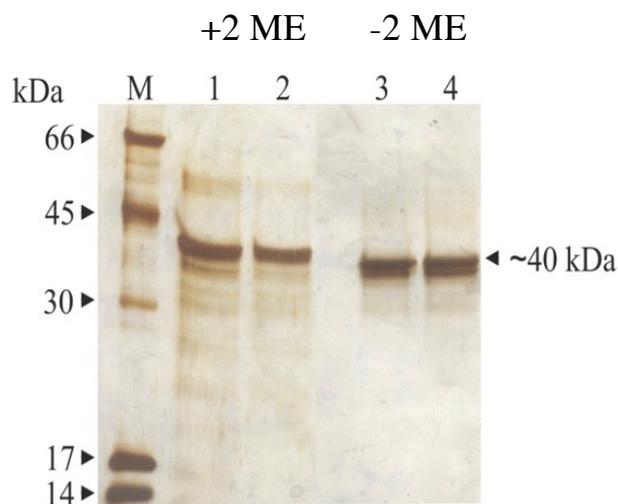


Fig.3.9. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones 37 y 38 de la cromatografía en columna Source 15 S. En el pocillo M se colocaron los patrones, en el 1 y 3 la fracción 37 y en el 2 y 4 la fracción 38. Se realizó en presencia de 2-mercaptoetanol (+2ME) y en ausencia de él (-2ME). Se observó en este último caso una banda proteica con una velocidad de migración menor. Esto indicó la presencia de puentes disulfuro en la proteína. La tinción se realizó con nitrato de plata tal y como se indica en el apartado 6.2.3.

7.4. Caracterización de la actividad enzimática de la peroxidasa de las semillas de cáñamo.

Para caracterizar la actividad enzimática de la peroxidasa, se evaluaron los efectos sobre ella del pH, de los cationes divalentes, la presencia de EDTA y la adición de diferentes concentraciones de NaCl .

Se sabe que el pH afecta a la protonación y desprotonación de los residuos de aminoácidos presentes en el sitio activo. La actividad en función del pH se muestra en la Fig. 3.10. Como puede verse, la enzima es activa en un intervalo de pH entre 2,5 y 7, con una actividad óptima a pH 5.

Se han realizado numerosos estudios sobre la influencia de cationes divalentes tales como calcio y magnesio en la actividad enzimática. La presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} influyen también en la actividad peroxidasa (Fig. 3.11.) Considerando la actividad relativa del 100% con una concentración de $\text{Ca}^{2+} = 0$ vemos como aumenta la actividad al añadir concentraciones crecientes de Ca^{2+} con un óptimo de actividad a una concentración de $\text{Ca}^{2+} = 5$ mM. Un aumento mayor de la concentración de Ca^{2+} no afecta a la actividad. En lo referido a los iones Mg^{2+} , no afecta a la actividad enzimática de la peroxidasa como el calcio.

La peroxidasa contiene generalmente dos sitios de unión para el calcio. Se caracteriza, por lo tanto, por la presencia de calcio endógeno. El calcio exógeno puede ocupar un sitio distal en algunas peroxidases, lo que permite obtener la máxima eficiencia catalítica, como se ha observado para la peroxidasa extraída del látex de *Euphorbia characias* (Floris et al., 1984). Esto demuestra el papel fundamental de los iones Ca^{2+} en conferir estabilidad estructural al sitio activo y alrededor del grupo hemo.

La dependencia de la actividad enzimática de las peroxidases por iones divalentes se confirmó con otro ensayo en presencia de concentraciones crecientes de EDTA (Fig.3.12). Se observó que la presencia del quelante causó una disminución gradual de la actividad enzimática. En particular, la adición de EDTA 2,5 mM disminuyó la actividad al 50%.

Por último, usando concentraciones crecientes de NaCl, se evaluó el efecto de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática de la peroxidasa aislada en este trabajo, mostrando un aumento constante a bajas concentraciones de NaCl y una disminución gradual al aumentar la concentración salina a partir de NaCl 50 mM (Fig.3.13).

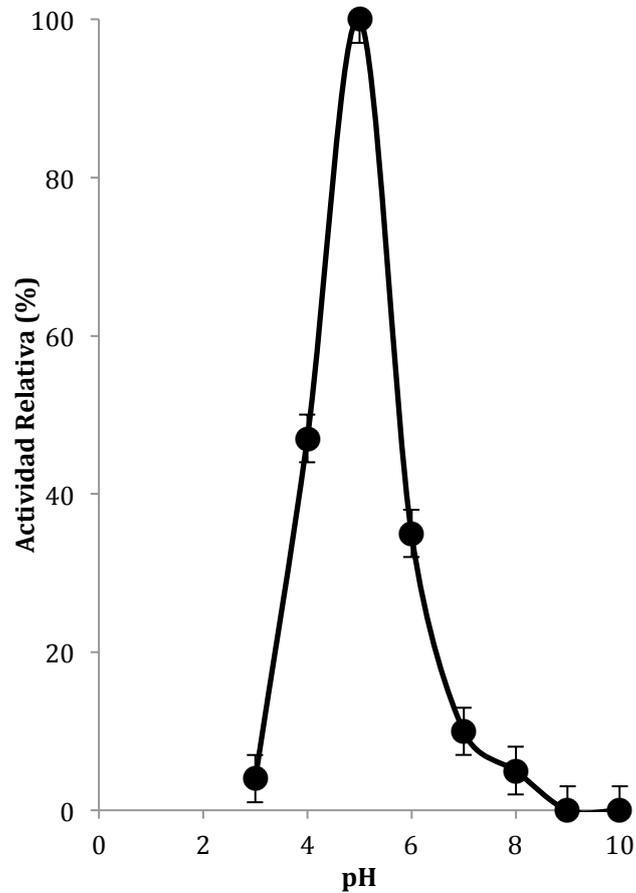


Fig.3.10. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la peroxidasa de las semillas de cáñamo. Se determinó la actividad enzimática de la peroxidasa a distintos pH tal y como se indica en el apartado 6.2.8. Las barras indican las desviaciones estándar de 3 experimentos realizados por triplicado.

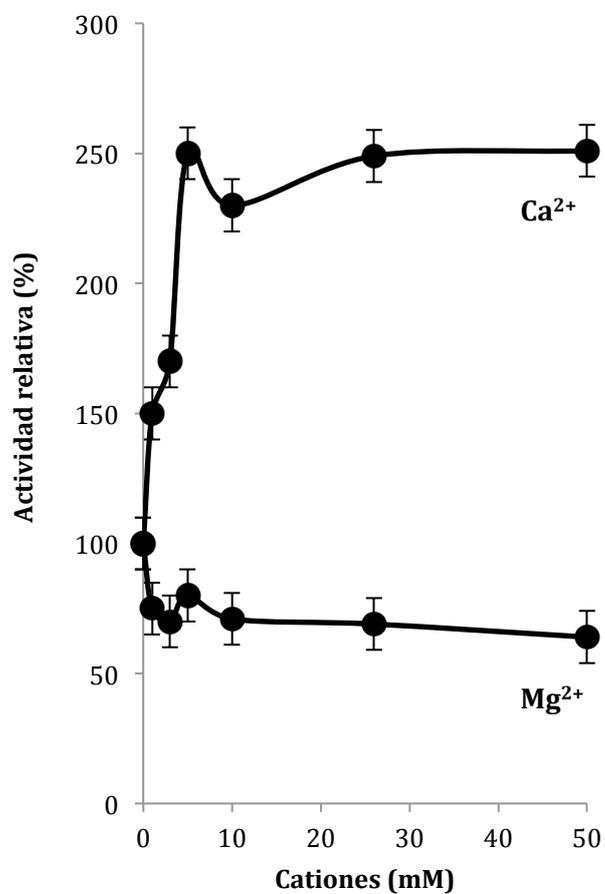


Fig.3.11. Efecto de la adición de cationes divalentes sobre la actividad enzimática de la peroxidasa de las semillas de cáñamo. Se determinó la actividad peroxidasa con distintas concentraciones de Ca²⁺ y Mg²⁺ tal y como se indica en el apartado 6.2.8. Las barras indican las desviaciones estándar de 3 experimentos realizados por triplicado.

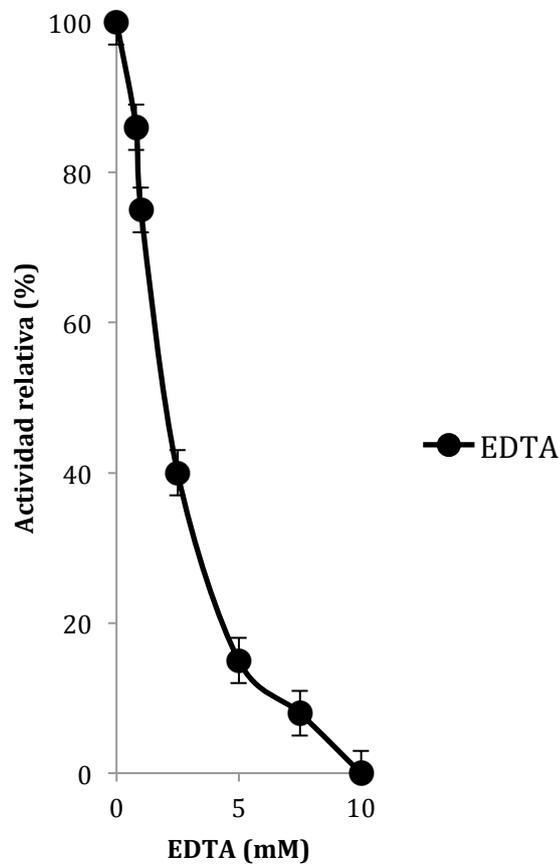


Fig.3.12. Efecto de la adición EDTA sobre la actividad enzimática de la peroxidasa de las semillas de cáñamo. Se determinó la actividad peroxidasa en presencia de EDTA tal y como se indica en el apartado 6.2.8. Las barras indican las desviaciones estándar de 3 experimentos realizados por triplicado.

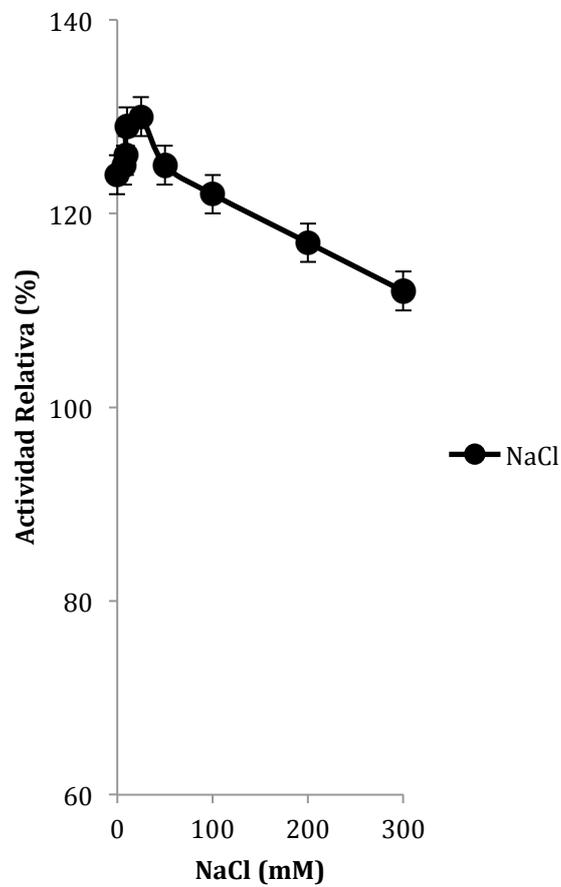


Fig.3.13. Efecto de NaCl sobre la actividad enzimática de la peroxidasa de las semillas de cáñamo. Se determinó la actividad peroxidasa con distintas concentraciones de NaCl tal y como se indica en el apartado 6.2.8. Las barras indican las desviaciones estándar de 3 experimentos realizados por triplicado.

8. CONCLUSIONES

1. Las semillas de *C. sativa* tienen actividad anti-proteasa y peroxidasa, mientras que no presentan actividad polinucleótido: adenosina glicosilasa, proteasa, ni inhibe la síntesis de proteínas “in vitro”.
2. Se ha purificado la peroxidasa de las semillas de *C. sativa* mediante cromatografía de intercambio catiónico en S-Sepharosa, cromatografía de exclusión molecular en Superdex 75, cromatografía de afinidad en Red-Sepharosa y cromatografía de intercambio catiónico en Source 15S.
3. La peroxidasa de *C. sativa* está formada por una cadena polipeptídica de 40 kDa.
4. El pH óptimo de la actividad enzimática de la peroxidasa de las semillas de cáñamo es 5.
5. La peroxidasa de las semillas de cáñamo se activan con Ca^{2+} y se inhibe con EDTA y concentraciones altas de NaCl. El magnesio no produce ningún efecto.

9. BIBLIOGRAFÍA

Amthor, J. (2007). Improving photosynthesis and yield potential. En P. Ranalli, *Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses* (pp. 27-58). Dordrecht: Springer.

Anderson, M., Hazen, S., Hsu, F., & Heinecke, J. (1997). Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 99(3), 424-432. <http://dx.doi.org/10.1172/jci119176>

Berger, J. (1969). *The world's major fibre crops: their cultivation and manuring* (6th ed., pp. 216-222). Zürich: Centre d'étude de l'azote.

Bestwick, C., Brown, I., & Mansfield, J. (1998). Localized Changes in Peroxidase Activity Accompany Hydrogen Peroxide Generation during the Development of a Nonhost Hypersensitive Reaction in Lettuce. *Plant Physiology*, 118(3), 1067-1078. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.118.3.1067>

Cardinali, A., Sergio, L., Di Venere, D., Linsalata, V., Fortunato, D., Conti, A., & Lattanzio, V. (2007). Purification and characterization of a cationic peroxidase from artichoke leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(7), 1417-1423. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2882>

Colonna, S., Gaggero, N., Richelmi, C., & Pasta, P. (1999). Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. *Trends in Biotechnology*, 17(4), 163-168. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7799\(98\)01288-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7799(98)01288-8)

Di Maro, A., Chambery, A., Daniele, A., Casoria, P., & Parente, A. (2007). Isolation and characterization of heterotepalins, type 1 ribosome-inactivating proteins from *Phytolacca heterotepala* leaves. *Phytochemistry*, 68(6), 767-776. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.12.002>

Dunford, H. (1976). On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coordination Chemistry Reviews*, 19(3), 187-251. [http://dx.doi.org/10.1016/s0010-8545\(00\)80316-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0010-8545(00)80316-1)

Floris, G., Medda, R., & Rinaldi, A. (1984). Peroxidase from *Euphorbia characias* latex: purification and properties. *Phytochemistry*, 23(5), 953-956. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)82590-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(00)82590-x)

Fry, S. (1986). Cross-Linking of Matrix Polymers in the Growing Cell Walls of Angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology*, 37(1), 165-186. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.37.060186.001121>

Galante, Y., & Formantici, C. (2003). Enzyme Applications in Detergency and in Manufacturing Industries. *Current Organic Chemistry*, 7(13), 1399-1422. <http://dx.doi.org/10.2174/1385272033486468>

Gorchs, G., Llovers, J., & Comas, J. (2000). Effect of hemp (*Cannabis sativa* L.) in a crop rotation hemp-wheat in the humid cool areas of North-eastern of Spain. In *proceeding of the Conference: Crop development for the cool and wet regions of Europe (COST Action 814)*, Pordenone, Italy (pp. 581-589).

Guida, V., Cantarella, M., Chambery, A., Mezzacapo, M., Parente, A., & Landi, N. et al. (2014). Purification and Characterization of Novel Cationic Peroxidases from *Asparagus acutifolius* L. with Biotechnological Applications. *Molecular Biotechnology*, 56(8), 738-746.

<http://dx.doi.org/10.1007/s12033-014-9752-2>

Hannuksela, S., Tenovuo, J., Roger, V., Lenander-Lumikari, M., & Elstrand, J. (1994). Fluoride Inhibits the Antimicrobial Peroxidase Systems in Human Whole Saliva. *Caries Research*, 28(6), 429-434.

<http://dx.doi.org/10.1159/000262016>

Henriksen, A. (2001). Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein Science*, 10(1), 108-115.

<http://dx.doi.org/10.1110/ps.37301>

Hiraga, S. (2001). A Large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5), 462-468.

<http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pce061>

Hummel, B. (1959). A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Biochemistry and Cell Biology*, 37(12), 1393-1399.

<http://dx.doi.org/10.1139/o59-157>

Kamal, J., & Behere, D. (2002). Thermal and Conformational Stability of Seed Coat Soybean Peroxidase. *Biochemistry*, 41(29), 9034-9042.

<http://dx.doi.org/10.1021/bi025621e>

Kamal, J., & Behere, D. (2003). Activity, stability and conformational flexibility of seed coat soybean peroxidase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 94(3), 236-242.

[http://dx.doi.org/10.1016/s0162-0134\(03\)00004-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0162-0134(03)00004-7)

Laemmli, U., & Favre, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. *Journal of Molecular Biology*, 80(4), 575-599.

[http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(73\)90198-8](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(73)90198-8)

Liszakay, A. (2004). Production of Reactive Oxygen Intermediates ($O_2^{\cdot-}$ -, H_2O_2 , and $\cdot OH$) by Maize Roots and Their Role in Wall Loosening and Elongation Growth. *Plant Physiology*, 136(2), 3114-3123.

<http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.044784>

López-Molina, D., Heering, H., Smulevich, G., Tudela, J., Thorneley, R., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. (2003). Purification and characterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cynara scolymus* L. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 94(3), 243-254.

[http://dx.doi.org/10.1016/s0162-0134\(02\)00650-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0162-0134(02)00650-5)

Marjamaa, K., Kukkola, E., & Fagerstedt, K. (2009). The role of xylem class III peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 367-376.

<http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ern278>

Merril, C., Goldman, D., Sedman, S., & Ebert, M. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, 211(4489), 1437-1438.

<http://dx.doi.org/10.1126/science.6162199>

Müssig, J. (2010). *Industrial applications of natural fibres*. Chichester: John Wiley.

Odajima, T. (1980). Myeloperoxidase of the Leukocyte of Normal Blood Nature of the Prosthetic Group of Myeloperoxidase1. *The Journal of Biochemistry*, 87(2), 379-391. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132758>

Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., & Teixeira, F. et al. (2007). PeroxiBase: The peroxidase database. *Phytochemistry*, 68(12), 1605-1611. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.04.005>

Poulos, T., & Kraut, J. (1980). The Stereochemistry of Peroxidase Catalysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(17), 8199-8205. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/255/17/8199.full.pdf>

Ramesh, K., Singh, A., & Eriksson, K. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In K. Eriksson, *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* (pp. 45-125). Berlín: Springer.

Rasmussen, C., Henriksen, A., Ahelskov, A., Jensen, R., Rasmussen, S., Hejgaard, J., & Welinder, K. (1997). Purification, characterization and stability of barley grain peroxidase BP 1, a new type of plant peroxidase. *Physiologia Plantarum*, 100(1), 102-110. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1000110.x>

Schopfer, P. (2001). Release of Reactive Oxygen Intermediates (Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, and Hydroxyl Radicals) and Peroxidase in Germinating Radish Seeds Controlled by Light, Gibberellin, and Abscisic Acid. *Plant Physiology*, 125(4), 1591-1602.

<http://dx.doi.org/10.1104/pp.125.4.1591>

Tams, J., & Welinder, K. (1998). Glycosylation and thermodynamic versus kinetic stability of horseradish peroxidase. *FEBS Letters*, *421*(3), 234-236.

[http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)01573-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01573-1)

Thongsook, T., & Barrett, D. (2005). Purification and Partial Characterization of Broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) Peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(8), 3206-3214.

<http://dx.doi.org/10.1021/jf048162s>

Tupper, J., Tozer, G., & Dachs, G. (2004). Use of horseradish peroxidase for gene-directed enzyme prodrug therapy with paracetamol. *British Journal of Cancer*, *90*(9), 1858–1862.

<http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6601780>

Welinder, K., Mauro, J., & Nørskov-Lauritsen, L. (1992). Structure of plant and fungal peroxidases. *Biochemical Society Transactions*, *20*(2), 337-340.

<http://dx.doi.org/10.1042/bst0200337>

Van der Werf, H. (2004). Life Cycle Analysis of field production of fibre hemp, the effect of production practices on environmental impacts. *Euphytica*, *140*(1-2), 13-23.

<http://dx.doi.org/10.1007/s10681-004-4750-2>