

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



EXTRACCIÓN DE PEROXIDASAS PROVENIENTES DE *Ulva lactuca* y
Porphyra yezoensis

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA

CARLOS FERNANDO AYALA ROMERO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. ENERO DEL 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

EXTRACCIÓN DE PEROXIDASAS PROVENIENTES DE *Ulva lactuca* y
Porphyra yezoensis

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA

CARLOS FERNANDO AYALA ROMERO

Aprobada por:



Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

Directora de tesis



Dra. Graciela Guerra Rivas

Sinodal



M.Cs. David Cervantes Vázquez

Sinodal

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres Sahara Luz Romero Anaya y Edgar Iván de la Cruz Alatorre quienes siempre me han apoyado en todo, han estado siempre que los he necesitado y sin ellos esto no sería posible.
- A Alfredo Romero y Elizabeth Romero, por el apoyo constante que siempre me han brindado y me ha ayudado a llegar hasta este momento.
- Al laboratorio de Farmacología Marina de la Facultad de Ciencias Marinas que ha sido como mi segundo hogar durante 4 años, en el cual se han formado recuerdos que siempre me acompañaran.
- A las doctoras Claudia Mariana Gómez y Graciela Guerra Rivas, quienes han sido mis mentoras desde que inicie la carrera.
- A David Hiram, Héctor Blancket, Nadia Rubio, Gastón Martínez, Iván Murillo y María Del Carmen, quienes han estado conmigo desde el inicio y hasta el final e hicieron de estos años los mejores de mi vida.
- A Marla Itzel Macias, por ayudarme siempre que no entendía algo y volverse una gran amiga.

Para **Sahara, Edgar, Isabel e Iván** por hacer mi vida mejor....

RESUMEN de la tesis de Carlos Fernando Ayala Romero, presenta como requisito parcial para la obtención del grado de BIOINGENIERO. Ensenada, Baja California, México. Enero del 2014.

EXTRACCIÓN DE PEROXIDASAS PROVENIENTES DE *Ulva lactuca* y *Porphyra yezoensis*

Resumen aprobado por:



Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

Directora de tesis

Las especies reactivas de oxígeno son compuestos derivados de las moléculas de oxígeno, que se forman por reducción química parcial de éste. La presencia de estas especies en los ecosistemas y en los seres vivos puede dar como resultado la generación de radicales libres. Los radicales libres son especies químicas que contienen uno o más electrones desapareados, convirtiéndose de este modo en moléculas altamente reactivas. Los radicales libres atacan ácidos grasos, proteínas y al ADN, generando reacciones en cadena en las cuales el primer radical libre roba un electrón a una molécula generando de esta forma un nuevo radical libre que a su vez robará otro electrón, esto puede generar muerte celular, mutaciones en el ADN, interferencias en la división celular, entre otros problemas. La contaminación ambiental es el principal factor que aumenta la producción de radicales libres en los ecosistemas, encontrándose a las sustancias fenólicas entre unas de las principales contaminantes generadores de radicales libres. La contaminación por sustancias fenólicas tiene su origen en los desechos de las industrias textiles, productoras de plástico, metal, resinas, tintes, la minería, entre otras. Siendo el medio acuático el principal afectado. Debido al fuerte impacto tóxico que pueden llegar a tener los compuestos fenólicos dentro de los organismos es de gran importancia que las aguas residuales sean sometidas a tratamientos que eliminen dichos compuestos antes de que éstas sean depositadas en el medio ambiente. Se ha logrado demostrar que algunas enzimas cuentan con cualidades que las hacen eficientes a la hora de remover estos contaminantes. Sea demostrado que las peroxidasas cuentan con propiedades que las hacen ideales a la hora de llevar a cabo la remoción de compuestos fenólicos, es por esto que se llevó a cabo la extracción, purificación y caracterización de enzimas con actividad de peroxidasa provenientes de las macroalgas *Ulva lactuca* y *Porphyra*. El proceso

de extracción se llevo a cabo por medio de centrifugaciones diferenciales y cromatografías de exclusión molecular. Una vez obtenido las muestras de interés se les aplico un ensayo enzimático para la detección de actividad de peroxidasa, en el cual se oxido alcohol veratrílico a veratrildehido. La presencia de peroxidasas dio positivo en las dos algas. Los resultados obtenidos mostraron una mayor actividad enzimática especifica en la muestra de *Ulva lactuca* (0.18438 nmol/min/ug de proteína) comparada con la muestra de *Porphyra yezoensis* (0.01415 nmol/min/ug de proteína). Se corrieron las muestras a través de una electroforesis de poliacrilamida, en los resultados se puede observar la presencia de dos bandas de proteínas, lo cual podría indicar que la enzima está compuesta por dos sub unidades o que se trata de dos enzimas distintas en las muestras, otros análisis se requieren para confirmar cualquiera de las dos teorías.

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	16
II. ANTECEDENTES	27
III. OBJETIVO GENERAL	37
III.1. Objetivos particulares	37
IV. HIPÓTESIS	37
V. METODOLOGÍA	38
V.1. Colecta de los organismos.....	38
V.2. Preparación de la muestra.....	39
V.3. Homogenado y filtrado de la muestra.....	40
V.4. Separación de fracciones celulares de interés.	42
V.5. Determinación de proteínas	43
V.6. Ensayo enzimático	44
V.7. Cromatografía de intercambio iónico	47
V.8. Electroforesis de las fracciones eluidas de columna de cromatografía de intercambio iónico.....	50
V.9. Análisis estadístico.....	51
VI.1. Concentración de proteínas	53
VI.2. Cromatografía de intercambio iónico	54
VI.3. Actividad enzimática.....	55
VI.4. Electroforesis de las fracciones eluidas de columna CL-4B	58
VII. DISCUSIÓN	63
VIII. CONCLUSIONES	68

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXO 1.....	77
ANEXO 2.....	78
ANEXO 3.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
	Algunas de las especies reactivas de oxígeno más comunes	
1	(Tomada de <i>Paul Held, 2010</i>).....	16
	Acción de la superóxido dismutasa al estar en contacto con el	
2	anión superóxido (Tomada de W. H. Koppenol, 1997).....	18
3	Reacción de Fenton.....	18
4	Mecanismo de la peroxidación lipídica (Tim Vickers, 2007).....	19
	Estructura de algunos compuestos fenólicos más comunes: a)	
5	Fenol, b) Catecol, c) 2-Nitrofenol, d) 4-Metilfenol, e) 4- Aminofenol, f) Butilohidroxitolueno, g) 4-Nonilfenol, h) Bisfenol A (Tomada de Víctor Sotero, 2011).....	20
6	<i>Ulva lactuca</i> , fotografía proporcionada por M. D. Guiry.....	25

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

	<i>Porphyra yezoensis</i> , fotografía proporcionada por M. D. Guiry.....	26
7	Guiry.....	26
8	Composición molecular de la lignina (Tomada de Lignoworks)..	35
9	Ubicación geográfica de la zona de colecta, playa Ejido Eréndira, B.C. (31° 17' 23.99 N, 116° 24' 13.35 W).....	38
10	Muestra de <i>Ulva lactuca</i> congelada antes de ser cortada en trozos pequeños.....	39
11	Muestra preparada para ser homogenizada en homogeneizador automático Poly Tron PT 2100.....	41
12	Sistema de filtración al vacío.....	41

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

13	Pellet de <i>Ulva lactuca</i> después de las centrifugaciones diferenciales.....	42
14	Acción de una peroxidasa en contacto con alcohol veratrílico y peróxido de hidrogeno.....	44
15	Diagrama del ensayo enzimático para la detección de enzimas con actividad de peroxidasa.....	47
16	Columna de cromatografía de intercambio iónico conectada a un colector de fracciones automático.....	49
17	Gráfica de absorbancia de las fracciones de <i>U. lactuca</i> obtenidas a partir de la columna de cromatografía.....	49
18	Metodología para la extracción de peroxidasas algales.....	52
19	Curva de crecimiento del veratrildehído, obtenida a partir del ensayo enzimático con la muestra de <i>U. lactuca</i> , en el eje horizontal se presenta el tiempo de medición (diez minutos) y en el eje vertical se presentan los valores de absorbancia.....	57

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- 20 Curva de crecimiento del veratrildehído, obtenida a partir del ensayo enzimático con la muestra de *P. yezoensis*, en el eje horizontal se presenta el tiempo de medición (diez minutos) y en el eje vertical se presentan los valores de absorbancia..... 57
- 21 Gel de poliacrilamida. En los carriles 2 y 4 se observan las muestras de *P. yezoensis*, en los carriles 3 y 5 se observan las muestras de *U. lactuca*. En el primer carril se observan los marcadores de pesos moleculares Miosina (200,000 Da), β -Galactosidasa (116,250 Da), Fosforilasa b (97,400 Da), Albumina de suero (66,200 Da), Ovoalbúmina (45,000 Da), Anhidrasa carbónica (31,000 Da), Inhibidor de tripsina (21,500 Da), Lisozima (14,400 Da) y Aprotina (6,500 Da)..... 59
- 22 Gráfica de comparación para la electroforesis de poliacrilamida, en el eje horizontal se encuentran la movilidad relativa (Fr) de los marcadores de peso molecular de la muestra estándar en milímetros, en el eje vertical se tienen los pesos moleculares de los marcadores presentes en la muestra

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

	estándar.....	60
23	Curva de calibración para la electroforesis de poliacrilamida, en el eje horizontal se encuentra la movilidad relativa (Mr) de los marcadores de peso molecular de la muestra estándar. En el eje vertical se tiene el logaritmo del peso molecular de los marcadores presentes en la muestra estándar.....	61

LISTA DE TABLAS

Tabla		<i>Página</i>
I.	Soluciones utilizadas para la cuantificación de proteínas en las muestras.....	43
II.	Mezclas utilizadas en el ensayo enzimático del alcohol veratrilico para la determinación de peroxidasa, para la muestra problema se realizaron cinco replicas para cada alga.....	46
III.	Pesos moleculares de las proteínas en la muestra estándar para SDS-PAGE.....	50
IV.	Concentraciones proteicas en las muestras antes de pasar a través de la columna de cromatografía de intercambio iónico, para cada muestra n=5.....	53
V.	Concentraciones proteicas en las muestras después de pasar a través de la columna de cromatografía de intercambio iónico, para cada muestra n=5.....	54

LISTA DE TABLAS (Continuación)

VI.	Valores de absorbancia máxima en las fracciones obtenidas de la columna de Sepharose® CL-4B a partir de las muestras de <i>U. lactuca</i> y <i>P. yezoensis</i> . Se indican las fracciones que presentaron las absorbancias máximas, se utilizaron tres concentraciones de KCl 25mM, 50mM y 100 mM en buffer Tris HCl 20 mM pH 8.5. La lectura se realizó a 280 nm.....	55
VII.	Actividad enzimática presente en las dos muestras de algas, se realizaron diez replicas para cada una de las muestras.....	56
VIII.	Pesos moleculares de las proteínas identificadas en la electroforesis de poliacrilamida, obtenidos a partir de la curva de calibración que se puede observar en la figura 22.....	62

I. INTRODUCCIÓN

El H_2O_2 , el anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y el radical hidroxilo ($\cdot\text{HO}$) forman parte de las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, reactive oxygen species) (Fig. 1); las cuales son compuestos que se derivan de la molécula de oxígeno (O_2) por reducción química parcial, estas especies son o pueden generar radicales libres, los cuales son compuestos que se consideran tóxicos para las células, ya que son altamente inestables y tienden a causar daños macromoleculares. Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados, esto altera la reactividad química de la molécula o átomo, haciéndola más reactiva que su contraparte sin electrones desapareados (Ahsan, *et al.*, 2003).

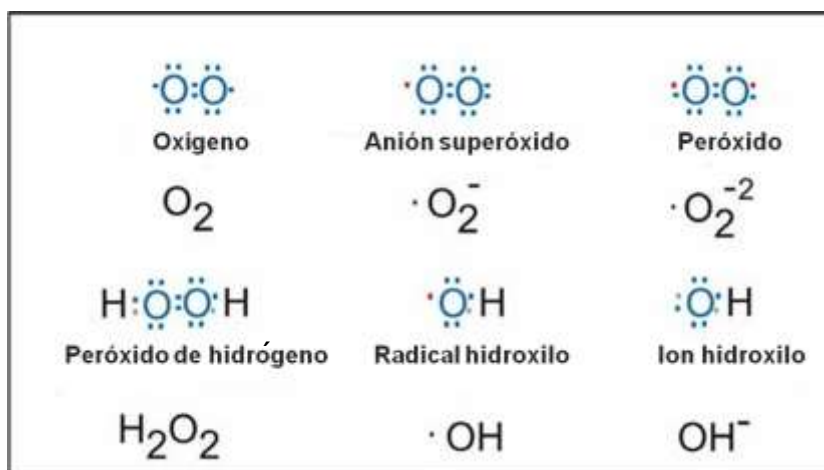


Figura 1. Algunas de las especies reactivas de oxígeno más comunes (Tomada de Held, 2010).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se encuentran presentes en todas las células aerobias en balance con los antioxidantes bioquímicos. En este estado, las ROS no son consideradas tóxicas y actúan como moléculas de señalamiento celular. Sin embargo, su toxicidad se genera cuando este balance se rompe ya sea debido a un exceso de ROS o a una disminución de antioxidantes. Cuando esto sucede la célula entra en un estado conocido como "estrés oxidativo" (Klein y Ackerman, 2003). Se ha demostrado que cuando se presenta este desequilibrio en la célula, las ROS pueden provocar daños a lípidos, proteínas y nucleótidos del ADN; esto puede derivar en el desarrollo de cáncer, muerte celular, diabetes, aterosclerosis y otras enfermedades crónicas (Kannan y Jain, 2000).

La enzima superóxido dismutasa es la encargada de transformar el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) a H_2O_2 (Fig. 2); lo que puede dar como resultado que se lleve a cabo reacciones de Fenton debido a la presencia de H_2O_2 en las células (Giorgio *et al.*, 2007). Esta reacción se genera cuando el H_2O_2 interacciona con metales de transición (comúnmente con hierro o cobre); los iones Fe^{2+} dentro de las células son oxidados por el H_2O_2 dando lugar a la formación de Fe^{3+} , un radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y un anión hidroxilo (Mwebi, 2005) (Fig. 3).

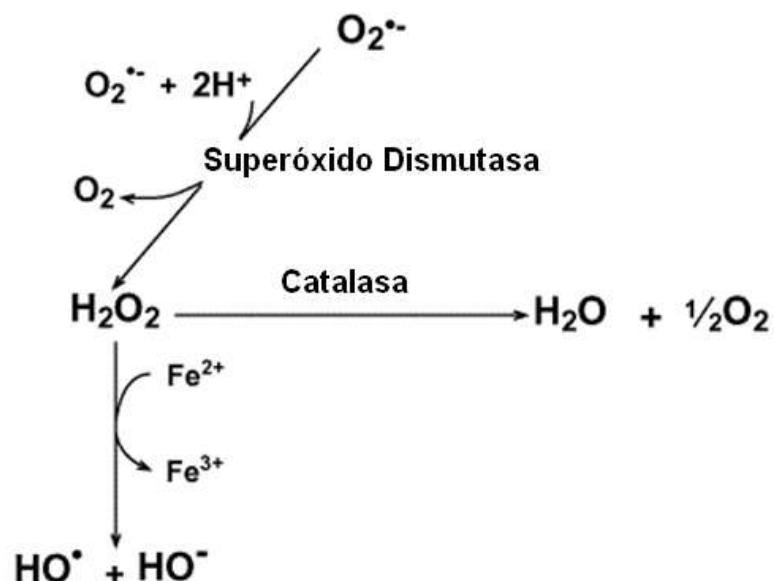


Figura 2. Acción de la superóxido dismutasa al estar en contacto con el anión superóxido (Tomada de Koppenol, 1997).

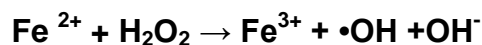


Figura 3. Reacción de Fenton.

Entre las especies reactivas de oxígeno el radical hidroxilo es el más reactivo que existe, puede reaccionar con todas las macromoléculas biológicas, siendo los ácidos grasos poli-insaturados las moléculas más susceptibles de ser atacadas por este radical libre, esto debido a que contienen múltiples enlaces dobles entre los cuales se encuentran grupos metileno (-CH₂-) que poseen hidrógenos muy reactivos, es de estos enlaces de donde los radicales hidroxilo toman átomos de hidrogeno iniciando así una reacción en cadena llamada

peroxidación lipídica , en la cual se generan a su vez nuevos radicales libres (Fig. 4).

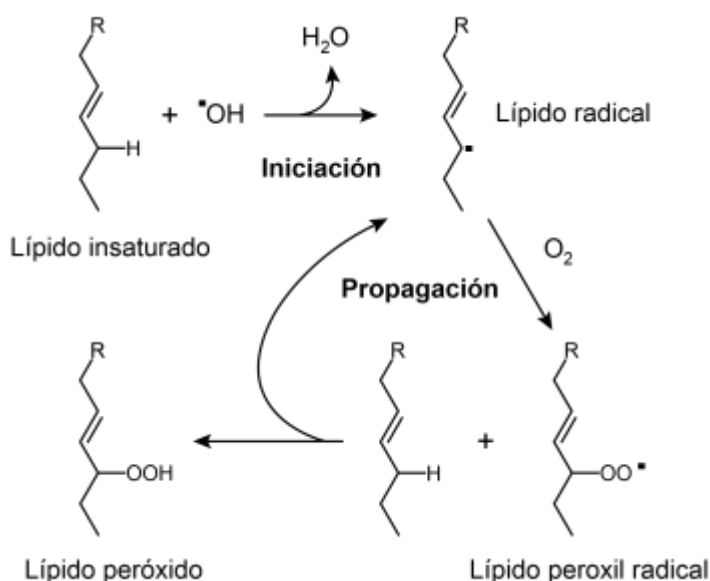


Figura 4. Mecanismo de la peroxidación lipídica (Vickers, 2007).

Las sustancias fenólicas son uno de los principales contaminantes que se pueden encontrar en el medio acuático, provenientes de las aguas negras de una gran cantidad de industrias, entre las que se incluyen las industrias textiles, las productoras de plástico, metal, resinas, tintes, la minería, entre otras (Klibanov, *et al.*, 1980) (Fig. 5). Estas sustancias son uno de los principales contribuidores en la formación de especies libres de oxígeno y radicales libres en la naturaleza. Para determinar el nivel de toxicidad de los fenoles es necesario tomar muchos parámetros en cuenta, pero dos de los que es imprescindible que se hable son el pK_a (constante de disociación) y el $\log P$ (P

siendo el coeficiente de partición octanol-agua), estos dos factores determinan el poder de penetración del fenol en las membranas celulares. Una alta hidrofobicidad (común en los fenoles) y un bajo pK_a dan como resultado un compuesto que tiene altas probabilidades de pasar a través de la membrana celular, aumentando por lo tanto su toxicidad (Michałowicz y Duda, 2006).

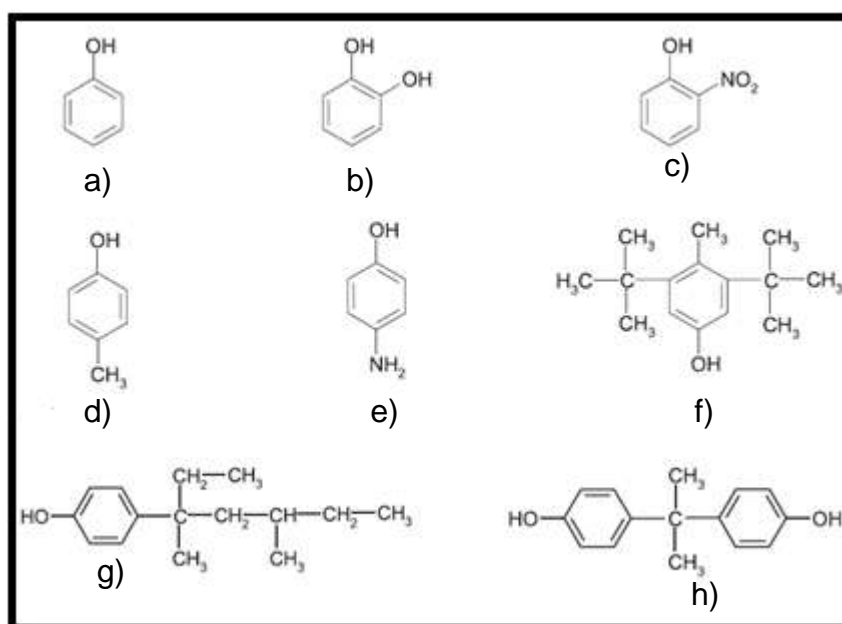


Figura 5. Estructura de algunos compuestos fenólicos comunes: a) Fenol, b) Catecol, c) 2-Nitrofenol, d) 4-Metilfenol, e) 4-Aminofenol, f) Butilhidroxitolueno, g) 4-Nonilfenol, h) Bisfenol A (Tomada de *Sotero, 2011*).

Una vez que el compuesto fenólico está dentro de la célula el factor que determina su toxicidad es la reactividad que tendrá el compuesto con las moléculas celulares, lo que se relaciona con la facilidad que tiene el compuesto de donar electrones libres a partir de un sustrato oxidante, estas reacciones son

llevadas a cabo gracias a enzimas oxidorreductasas como lo son las peroxidases, cuya actividad ocasiona la producción de radicales fenoxi y metabolitos intermediarios, formándose en estas reacciones especies reactivas de oxígeno (Selassie, *et al.*, 1998). Como se mencionó anteriormente, la formación de estos compuestos puede provocar daños en la membrana celular, por ejemplo, la peroxidación lipídica pueden penetrar en los espacios internos de la célula y dañar la membrana del retículo endoplasmático, de la mitocondria y del núcleo (Hayashi, *et al.*, 1999). Otros factores que influyen en la toxicidad de los fenoles son los tipos de sustratos con los que reaccionan, la localización dentro de la célula, la fase de crecimiento en la cual se encuentra la célula y el tipo de célula (tejido). Dentro de los fenoles que se consideran tóxicos están incluidos el fenol, clorofenol, nitrofenol, aminofenol, catecol, clorocatecol, metilfenol y otros compuestos fenólicos (Kahru y Pollumaa, *et al.*, 2000).

Debido al fuerte impacto tóxico que pueden llegar a tener los compuestos fenólicos dentro de los organismos es de gran importancia que las aguas residuales sean sometidas a tratamientos que eliminen dichos compuestos antes de que éstas sean depositadas en el medio ambiente. Se ha logrado demostrar que algunas enzimas cuentan con cualidades que las hacen eficientes a la hora de remover estos contaminantes (Lai y Lin, 2005).

Las enzimas son proteínas que llevan a cabo la catálisis de reacciones químicas en los seres vivos de manera selectiva y eficiente, estos sistemas biológicos tienen un alto poder catalítico y especificidad por su sustrato. Por estas características, las enzimas juegan un papel vital en los procesos

bioquímicos, ya que realizan de forma ordenada todas las reacciones necesarias para llevar a cabo la degradación de moléculas, la obtención de energía de los nutrientes y la formación de macromoléculas a partir de precursores simples. Los altos niveles de coordinación que se presentan en las rutas metabólicas se deben al trabajo realizado por las enzimas, sin la catálisis de las enzimas las reacciones químicas que son necesarias para mantener la vida no podrían ocurrir en un rango de tiempo favorable. (Nelson, 2000). El estudio de las enzimas es de gran importancia debido a la amplia gama de aplicaciones que estas ofrecen. Las enzimas cuentan con un alto poder catalítico el cual normalmente es mucho mayor al de los catalizadores sintéticos o inorgánicos, además de tener un alto nivel de especificidad, funcionan en soluciones acuosas y en condiciones muy suaves de temperatura y pH. Por esta razón hoy en día la tecnología enzimática ocupa un lugar sobresaliente dentro del área de la biotecnología, estando sus principales aplicaciones en el sector alimenticio, en donde son utilizadas como aditivos o en procesos de transformación (Ramírez *et al.*, 1993). El segundo campo de aplicación en el cual se utilizan es en los detergentes, en donde se usan principalmente proteasas y lipasas, con la finalidad de eliminar manchas que contienen proteínas insolubles como mucosidad, hierba, grasas, etc sangre,. (Gallegos, 2005). El resto de las enzimas se utilizan en aplicaciones del área farmacéutica y analítica.

Las peroxidasas son enzimas oxidorreductasas, cuya función principal función es la de llevar a cabo la oxidación de sustratos orgánicos e inorgánicos, como fenoles y aminas aromáticas, utilizando para esto el poder oxidante del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) u otros peróxidos. Estas enzimas contienen un grupo funcional hemo, el cual normalmente se trata de ferriprotoporfirina IX, con cuatro enlaces pirrol nitrógeno a Fe (III); cuentan con un peso molecular aproximado de 30,000 a 615,000 Da (Kongkiattikajorn y Pongdam, 2006). Estas enzimas se encuentran presentes en una gran cantidad de seres vivos, tanto en plantas, animales y hongos como algas y microorganismos (micromicetos, microalgas, bacterias), haciendo de este grupo de enzimas uno de los que cuentan con mayor abundancia en el planeta (Gaspar, *et al.*, 1982). La cantidad de aminoácidos presentes en las peroxidasas varía de forma significativa, las peroxidasas provenientes de plantas contienen aproximadamente 300 aminoácidos, mientras que las provenientes de mamíferos pueden contener de 576-738 aminoácidos (Gaspar, *et al.*, 1982).

Las hemo-peroxidasas provenientes de bacterias, hongos y plantas conforman una superfamilia (Zámocky, *et al.*, 2010) y se dividen en tres diferentes clases. Las que pertenecen a la clase I son las peroxidasas procariotas y eucariotas no glucosiladas sin puentes disulfuro y puentes Ca^{+2} . Entre éstas se incluye la citocromo c peroxidasa y la ascorbato peroxidasa; dentro de la clase II se encuentran las peroxidasas que son secretadas por hongos y la clase III contiene a las peroxidasas que son secretadas por plantas.

En esta clasificación se encuentra una de las peroxidases más estudiadas de todas, la peroxidasa de rábano (Ruiz, 2006). Las peroxidases llevan a cabo importantes funciones en las plantas, juegan un papel primordial en la defensa contra patógenos extracelulares y el estrés, la biosíntesis, la degradación de la lignina, la eliminación intracelular de peróxido de hidrógeno, y la oxidación de los tóxicos reductores. La generación de peroxidases vegetales es inducida por el estrés producido por ataques patógenos, lesiones, calor, frío, sequía y presencia de luz UV (O'Brien, 2000). Las peroxidases son ampliamente utilizadas en la bioquímica clínica, y en los inmunoensayos enzimáticos; también se les han encontrado aplicaciones en el campo de la biorremediación donde se utiliza en tratamientos para limpiar agua de compuestos fenólicos y para remover peróxidos de desechos industriales (Agostini *et al.*, 2002).

Las peroxidases pueden encontrarse en una gran diversidad de organismos, entre estos se encuentran las algas marinas, con las cuales se trabajó en este proyecto. Se seleccionaron como candidatas idóneas las especies *Ulva lactuca* y *Porphyra yezoensis* debido a que se trata de organismos que se pueden obtener fácilmente en la región y su mantenimiento es relativamente sencillo.

Ulva lactuca (Phylum Chlorophyta, clase Ulvophyceae, orden Ulvales, familia Ulvaceae, género *ulva*) es un alga verde conocida comúnmente por el nombre de “lechuga de mar” (Fig. 6). Se distribuye ampliamente por todos los océanos del mundo en las zonas intermareales, su color varía entre el amarillo

limón y el verde oscuro. Tiene un talo laminar, foliáceo y lobulado. Puede llegar a medir hasta un metro de largo y puede llegar a crecer de 20 a 30 centímetros de diámetro pero generalmente se trata de un alga pequeña. Se puede encontrar durante todo el año pero es más abundante durante verano y otoño. El phylum contiene más de 8,200 especies tanto unicelulares como pluricelulares, las cuales se dividen en nueve grupos: Chlorodendrophyceae, Chlorokybophyceae, Chlorophyceae, Mamiellophyceae, Nephroselmidophyceae, Pedinophyceae, Prasinophyceae, Trebouxiophyceae y Ulvophyceae (Pizzolla 2008).



Figura 6. *Ulva lactuca*, fotografía proporcionada por Guiry.

Porphyra yezoensis (Phylum Rhodophyta, subphylum Eurhodophytina, clase Bangiophyceae, subclase Bangiophycidae, orden Bangiales, familia Bangiaceae, género *Porphyra*) es un alga roja que crece en las zonas intermareales de los océanos con aguas frías, su color varía entre el púrpura

oscuro y el marrón rojizo (Fig. 7), crecen incrustadas en las rocas o como epifitas, su crecimiento es estacional y la época en la que se pueden encontrar de forma más sencilla es de febrero a abril. Tiene un talo compuesto por una hoja foliosa de hasta dos células de espesor que puede medir aproximadamente 35 cm de longitud (pudiendo llegar a existir especímenes de más de un metro de largo), las hojas nacen desde un pequeño fijador discoidal. Las células basales tienen rizoides. Se considera que existen alrededor de 150 especies del genero *Porphyra* en el mundo.



Figura 7. *Porphyra yezoensis*, fotografía proporcionada por Guiry.

II. ANTECEDENTES

La presencia de enzimas con propiedades de peroxidasa ha sido identificada en diversas clases de organismos como hongos, plantas, mamíferos, bacterias, levaduras, macro algas y micro algas (O'Brien, 2000).

Se ha demostrado que en presencia del H_2O_2 las peroxidasas actúan sobre el grupo hidroxilo inestabilizando de esta forma la estructura del grupo fenólico, generando de esta forma radicales fenoxilo, los cuales estimulan la polimerización a poli-fenol, un compuesto no es tóxico, que es insoluble en agua por lo que se puede precipitar en medios acuosos (Kim y Kim, 2010). Para eliminar estas sustancias del agua se han utilizado peroxidasas como la peroxidasa de rábano (HRP por sus siglas en inglés, horseradish peroxidase), y la peroxidasa lignínica, entre otras. Se ha observado que la utilización de tratamientos enzimáticos para remover estos compuestos tóxicos trae consigo grandes ventajas, como lo son la alta selectividad de las enzimas, la baja probabilidad que presentan de ser inhibidas por sustancias que podrían ser tóxicas para los organismos vivos, los bajos tiempos de retención y en comparación con los métodos tradicionalmente utilizados los costos eventualmente podrían ser menores (si estas enzimas se produjeran en cantidades industriales) (Tatsumi, *et al.*, 1996).

Un problema similar al de los contaminantes fenólicos se puede observar con los colorantes utilizados en la industria textil, fotográfica y en las imprentas. Estos colorantes se fabrican de forma sintética y son generalmente compuestos

complejos de grupos aromáticos; ellos son desechados a través de las aguas industriales, los cuales pueden llegar a causar un alto impacto en el medio ambiente. Estas sustancias pueden presentar propiedades tóxicas y recalcitrantes por lo que su eliminación en las plantas de tratamiento llega a ser deficiente. Actualmente se está trabajando en desarrollar un proceso eficiente en el cual las peroxidasas sean utilizadas para remover las aminas aromáticas de las aguas contaminadas (Agostini *et al.*, 2002). Estos contaminantes al igual que los fenoles son oxidados por el efecto de las peroxidasas generando de esta forma radicales libres, los cuales tienden a agruparse para formar productos poliméricos poco solubles en agua que tienden a precipitarse rápidamente, facilitando de esta forma la extracción de estos contaminantes del medio marino (Karim y Husain, 2009).

Kathleen y Liu (1997) realizaron una investigación en la cual se estudió la posibilidad de utilizar las peroxidasas que produce el alga verde *Selenastrum capricornutum* como biomarcador para detectar la presencia de cobre en el agua, ya que se ha demostrado que las peroxidasas de diversos organismos son altamente sensibles al estrés ambiental. Se detectó la presencia de una ascorbato peroxidasa, se logró cuantificar una actividad enzimática específica máxima de 250 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, la enzima presentó un pH óptimo de 8, a pH de 7.0 o 9.2 la actividad enzimática bajó un 50%. El medio de cultivo de *S. capricornutum* se puso en contacto con diversos metales como cobre, cobalto, níquel y plomo para analizar si la presencia de estos metales incrementaba la actividad enzimática de las peroxidasas, se cuantificó la cantidad

de biomasa y los niveles de peroxidasa que se presentaron en los cultivos con los diferentes metales, se demostró que el cobre y el plomo incrementaban los niveles de peroxidasas, la actividad enzimática específica máxima que se calculó en presencia de cobre fue de 800 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína y en presencia de plomo fue de 400 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Se llegó a la conclusión de que las peroxidasas pueden llegar a ser altamente sensibles a las concentraciones de ciertos metales en el medio y por lo tanto pueden llegar a ser herramientas útiles para la detección de metales en las aguas.

Las glutatión peroxidasas son enzimas antioxidantes que protegen varios organismos del estrés oxidativo catalizando la reducción de hidroperóxidos utilizando para esto el glutatión. Debido al poder antioxidativo y antimutagénico con el que cuentan se ha generado mucho interés en estas enzimas para utilizarla con fines terapéuticos. Distintas investigaciones sin éxito se habían realizado para detectar la presencia de estas enzimas en levaduras y plantas, pero fue Novoselov (2002) quien reportó por primera vez la presencia de este tipo de enzimas en una alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, específicamente se identificó una peroxidasa la cual resultó ser una fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa de 20kDa. Dayer y Fischer (2008) realizaron una investigación sobre las familias de peroxirredoxinas y glutatión peroxidasas presentes en *C. reinhardtii*, en donde se habla de la identificación hasta el momento de siete peroxirredoxinas y cinco glutatión peroxidasas, las cuales comparten similitudes significantes con las encontradas en mamíferos. Esta

información sirve de base para desarrollar sistemas de extracción y purificación de este tipo de peroxidasas a partir de *C. reinhardtii*.

La actividad enzimática de las peroxidasas provenientes de algas rojas también ha sido una fuente de investigación importante. Fortea y Miranda (2010) realizaron la caracterización cinética y un estudio sobre la inactivación termal de una peroxidasa procedente del alga roja *Mastocarpus stellatus*, en estudios que se llevaron a cabo con la finalidad de obtener una peroxidasa viable para su utilización en la industria farmacéutica y alimenticia. Se demostró que el pH óptimo de la enzima era de 5.0, al ponerla en contacto con duadecil sulfato de sodio (SDS) la actividad enzimática de la enzima se vio disminuida a medida que las concentraciones de SDS se incrementaban llegando a la inactividad total con 1mM de SDS, la enzima se vio inhibida en diferentes rangos de pH, la inactividad se debió a los cambios conformacionales ocurridos en la enzima provocados por las interacciones con las moléculas del detergente. Se calcularon los parámetros cinéticos para la enzima peroxidasa a pH de 5.0 utilizando H_2O_2 , el valor de la velocidad de la reacción (V_{max}) obtenido fue de 12 $\mu M/min$ y la constante de Michaelis calculada fue de 0.2 mM). La temperatura óptima para la actividad de la peroxidasa de *M. stellatus* fue de 25 °C, temperaturas mayores a 30 °C causaron un decaimiento progresivo en la actividad enzimática, a los 55 °C se pudo observar una inactividad del 95%. Al término de la investigación se llegó a la conclusión de que se necesitaban realizar más pruebas a esta enzima, ya que los resultados que se obtuvieron muestran que es altamente termolábil. Esta característica podría generar

problemas si se desea utilizarla para trabajar con alimentos, área en la que la termoestabilidad de la enzima es muy importante, y puede llegar a tener efectos negativos en el color y sabor de los alimentos durante su almacenaje.

En 1995 Izumi y Ohshiro estudiaron la producción de una bromo peroxidasa proveniente de la macro alga *Corallina pilulifera*, la bromoperoxidasa se purificó del extracto crudo de *C. pilulifera*. Se encontró una cantidad de proteínas igual al 3% del total del extracto crudo. La enzima encontrada tuvo un peso molecular de 790 kDa y estaba compuesta de doce subunidades cada una con un peso molecular de 64 kDa. Gracias al uso de un microscopio electrónico se determinó que la molécula tenía forma hexagonal, el punto isoelectrico de la enzima fue 3.0, su pH óptimo es a 6.0, se calculó una actividad enzimática específica de 20.6 U/mg proteína antes de pasar por una Columna de diálisis (con buffer citrato/fosfato a pH 3.8 con EDTA 1mM) y 4.8 U/mg proteína después de pasar por la columna de diálisis.

Kongkiattikajorn y Pongdam (2006) extrajeron y caracterizaron una peroxidasa proveniente del alga roja *Gracilaria fisheri*, las algas se recolectaron en Tailandia en la provincia de Songkhla, después de la recolección fueron llevadas al laboratorio donde se almacenaron a -20 °C. Las muestras se homogeneizaron por cinco minutos en Buffer Tris HCl 20 mM a Ph 8.5 en una proporción 1:1, el Homogenado resultante se filtro, los residuos se homogenaron y filtraron nuevamente, la muestra líquida se centrifugo por 30 minutos a 16,000

xg a 4 °C. El extracto dejó agitando toda la noche en una solución compuesta 30% por acetona, después de esto se centrifugó a 14,000xg a 4 °C por 30 minutos. El sobrenadante se saturó con 70% de acetona para después ser centrifugado a 14,000xg por 30 minutos a 4 °C. Después de la centrifugación el pellet se resuspendió en buffer Tris HCl 20 mM pH 8.5 y se realizó una última centrifugación a 14,000xg por 45 minutos a 4 °C, el precipitado se resuspendió en una solución de 60% etanol (V/V) en 20 mM Tris HCl pH 8.5. Esta muestra se corrió en una columna de cromatografía equilibrada con buffer Tris HCl 20 mM pH 8.5, la columna se lavó con una gradiente lineal de 100-500 mM KCl. Las fracciones que presentaron actividad enzimática se corrieron en una segunda columna de cromatografía equilibrada y eluida con las mismas soluciones que la anterior. Se calculó que el peso molecular aproximado de la peroxidasa es de 615 kDa. Un análisis con un espectro UV no mostró la presencia del grupo prostético heme, por lo cual se realizaron pruebas que confirmaron que la peroxidasa era una haloperoxidasa dependiente de vanadio, una bromoperoxidasa. Se calculó una actividad enzimática específica de 315.30 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ y una actividad total de 5,589 mU, la cantidad total de proteínas después de pasar la muestra por las columnas de cromatografía fue de 17.71 mg, se determinó un pH óptimo de 6.0, una temperatura óptima de 55 °C y requiere de un ion metálico para funcionar. La haloperoxidasa resultó ser moderadamente termoestable y se concluyó que se trata de una proteína dependiente de vanadio con actividad de bromación.

Actualmente se están utilizando cada vez más las técnicas de inmovilización enzimática para crear sistemas analíticos que sirvan para la detección de diversas sustancias, aprovechando de esta forma la alta especificidad de la enzima y la sensibilidad y conveniencia de las técnicas electro-analíticas. Se ha demostrado que las peroxidasas pueden llegar a tener importantes aplicaciones en el campo de los biosensores electroquímicos, principalmente para detectar la presencia de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos (Jia, *et al.*, 2002). Ya se han comenzado a desarrollar biosensores que toman como base la acción catalítica de las peroxidasas utilizando como biocatalizador principalmente a la peroxidasa de rábano. Se ha buscado inmovilizar esta enzima en electrodos modificados, utilizando métodos como adsorción, atrapamiento en matrices porosas, cambios conformacionales en la enzima, todo con la finalidad de mejorar su estabilidad y actividad catalítica (Senel y Çevik, 2012). Innovadores métodos de inmovilización se han desarrollado para la fabricación de estos biosensores, combinando distintos materiales para crear un soporte que cumpla con las características necesarias que se necesitan. Uno de los métodos que actualmente se están intentando es la combinación de nanopartículas de oro, nanotubos de dióxido de titanio y tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolium (Wan y Bi, *et al.*, 2008), con la finalidad de aplicar las diferentes propiedades de estos materiales para conformar un sensor más estable y funcional. Se han desarrollado investigaciones para crear biosensores que mantengan de forma estable la enzima sin afectar su estructura, utilizando matrices que mantengan su función

biológica específica. Se ha planteado utilizar polímeros naturales, organismos vivos y diferentes tipos de polisacáridos como el quitosano (Wang, *et al.*, 2005). Con la finalidad de desarrollar un biosensor eficiente que satisfaga las demandas de la industria química, biológica y clínica, entre otras para identificar la presencia de las ROS.

Otra área de aplicación que tienen las peroxidasas es la remoción de la lignina que se produce en la industria papelera. La lignina es un polímero aromático asociado con los polisacáridos que se encuentran en las paredes celulares de las plantas proporcionando resistencia y rigidez; es una molécula muy difícil de degradar (Fig. 8). El peso molecular y la estructura de esta molécula son difíciles de determinar debido a que presenta un alto nivel de polidispersión. Para poder hacer papel es necesario remover la lignina de la madera. En la naturaleza existen diferentes organismos que son capaces de degradar la lignina, entre los más eficientes se encuentran los hongos de podredumbre blanca (Ward, *et al.*, 2004). Los cuales degradan la lignina a dióxido de carbono y agua. Este proceso de degradación se lleva a cabo gracias a peroxidasas y lacasas, las cuales pueden romper enlaces específicos de las moléculas de lignina. Múltiples estudios se han desarrollado para utilizar el poder degradante de los hongos blancos de podredumbre para la eliminación de lignina en la industria del papel (Islam, 2007). Sin embargo se ha podido observar que utilizar organismos completos para degradar celulosa en procesos industriales no es un método eficaz, debido a que las dos enzimas principales

para llevar a cabo la degradación de lignina (lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa) son sintetizadas como metabolitos secundarios en respuesta a la limitación de nutrientes y su producción es limitada (Conesa, *et al.*, 2001). Además, estos organismos también cuentan con enzimas celulolíticas difíciles de regular que degradan las fibras de celulosa la cual es el componente principal del papel. Por último, también se ha podido demostrar que los tiempos de reacción de estos procesos pueden llegar a tardar días en ser completados (Arana y Tellez, *et al.*, 2002).

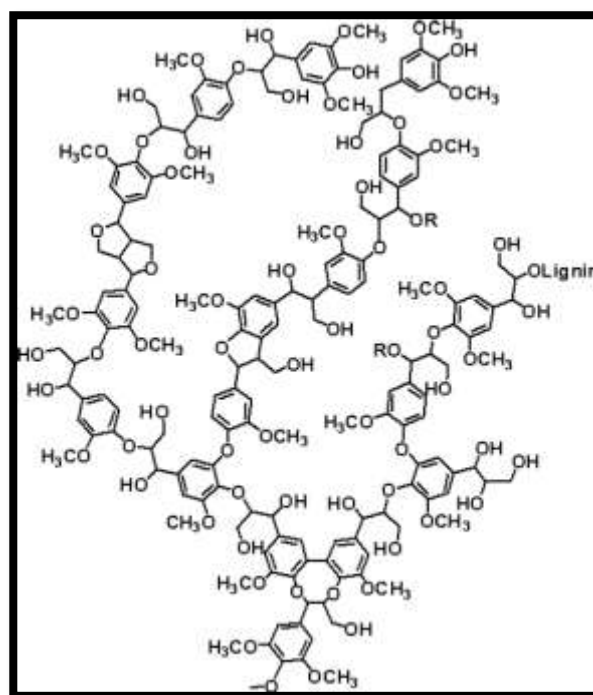


Figura 8. Estructura molecular de la lignina
(Tomada de Lignoworks, 2011).

Se han generado diversos estudios sobre la expresión recombinante de las peroxidasas fúngicas en diferentes organismos, con la finalidad de utilizarlos en la eliminación industrial de la lignina. Hasta ahora se ha estudiado la posibilidad de expresarlas en *Escherichia coli* (Doyle y Smith, 1996), también en células de insecto utilizando el sistema de expresión del baculovirus (Rothschild y Hadar, *et al.*, 1997) y en hongos como el *Aspergillus niger* (Conesa, *et al.*, 2001), gracias a estos sistemas se ha podido demostrar la factibilidad de producir las enzimas de manera recombinante, sin embargo muchos de estos no han logrado obtener un alto rendimiento en lo que respecta a la productividad de dichas enzimas y tiene un alto costo de producción. Con cada nuevo estudio que se hace sobre este tema se está más cerca de perfeccionar la técnica y solo es cuestión de tiempo para obtener resultados que satisfagan la demanda actual.

En el presente trabajo se pretende llevar a cabo la extracción, purificación y caracterización de enzimas con actividad de peroxidasa provenientes de las macroalgas *Ulva lactuca* y *Porphyra yezoensis*, y realizar un análisis comparativo entre las peroxidasas de los dos especímenes.

III. OBJETIVO GENERAL

- ❖ Identificación y extracción de peroxidasas provenientes de *Ulva lactuca* y *Porphyra yezoensis*.

III.1. Objetivos particulares

- Identificar la actividad enzimática de peroxidasa en *Ulva lactuca*.
- Identificar la actividad enzimática de peroxidasa en *Porphyra yezoensis*.
- Purificar parcialmente la peroxidasa de *U. lactuca* y *P. yezoensis*.
- Realizar un análisis comparativo entre ambas peroxidasas.

IV. HIPÓTESIS

- ❖ Las especies de *Ulva lactuca* y *Porphyra yezoensis* cuentan con enzimas con actividad de peroxidasa.

V. METODOLOGÍA

V.1. Colecta de los organismos

La recolección de los especímenes de *Ulva lactuca* y *Porphyra yezoensis*, se realizó en una playa localizada en el Ejido Eréndira en el municipio de Ensenada, B.C., México (Fig. 9).

Los especímenes fueron transportados en hieleras en un ambiente húmedo al laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina de la Facultad de Ciencias Marinas, en donde fueron limpiados con buffer Tris HCl 20mM pH 8.5 frío, y almacenados en un congelador a -20 °C.

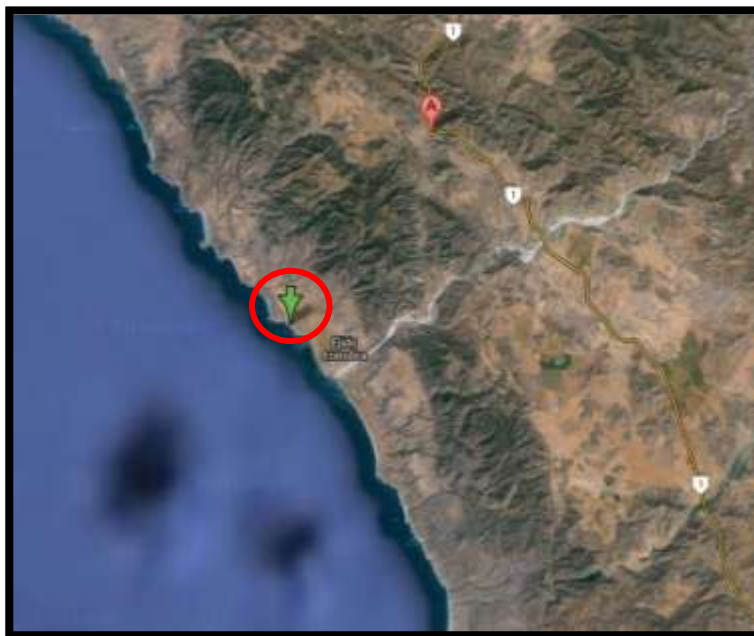


Figura 9. Ubicación geográfica de la zona de colecta, playa Ejido Eréndira, B.C. (31° 17' 23.99 N, 116° 24' 13.35 W).

V.2. Preparación de la muestra

Se utilizaron 31 gramos de alga los cuales se lavaron con Buffer Tris HCl 20mM a pH 8.5 frío (Buffer A), para quitar la suciedad y también para eliminar cualquier otro organismo que pudiera estar entre las algas. Para facilitar el proceso de homogenización la muestra se cortó en trozos pequeños utilizando un bisturí (Fig.10), y se repartió en 6 tubos de ensayo cada uno con 5 g de alga, agregando una proporción de buffer A 1:1 (1mL de Buffer A : 1 g de alga).



Figura 10. Muestra de *Ulva lactuca* congelada antes de ser cortada en trozos pequeños.

V.3. Homogenado y filtrado de la muestra

Las muestras se homogeneizaron con el fin de romper las células del alga y extraer las proteínas celulares, esto se debe hacer causando el menor daño posible a las células, evitando la degradación térmica, alteraciones por oxidación, proteólisis, etc. Se utilizó un homogeneizador automático (Polytron PT 2100) (Fig. 11) y las muestras se mantuvieron en hielo durante todos los procesos. Las muestras se homogeneizaron por 5 minutos consecutivos y después se filtro al vacío (fig. 12) utilizando un filtro Whatman número 4 con poros de 110 mm para filtrar la muestra de manera homogénea. Los restos de alga que quedaron en el filtro se volvieron a resuspender en buffer Tris HCl 20 mM pH 8.5 (utilizando la misma proporción 1:1) y se homogeneizaron nuevamente. Este proceso se repitió hasta que se logró homogeneizar la muestra por completo.



Figura 11. Muestra preparada para ser homogeneizada en homogeneizador automático Polytron PT 2100.



Figura 12. Sistema de filtración al vacío.

V.4. Separación de fracciones celulares de interés.

Después de la lisis celular se realizó centrifugación diferencial. El filtrado obtenido en la sección anterior se centrifugó a 16,000xg a 4°C por 30 minutos. Una vez terminada la centrifugación, se agregó al sobrenadante una cantidad de acetona fría igual al 30% del total de la muestra y se dejó agitando toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo la mezcla se centrifugó a 14,000xg a 4°C por 30 minutos y se le agregaron 40 mL de acetona fría al sobrenadante obtenido, el cual se dejó agitando por dos horas a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 14,000xg a 4°C por 30 minutos, se resuspendió el pellet obtenido en buffer Tris HCl 20mM pH 8.5 (Buffer A) frío y se centrifugó a 14,000xg a 4°C por 45 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 15 mL de EtOH/Buffer A (3 mL de EtOH : 2 mL de Buffer A) y se centrifugó a 14,000xg a 4°C por 20 minutos. El pellet resultante se resuspendió 5 mL en buffer A (Fig. 13).



Figura 13. Pellet de *Ulva lactuca* después de centrifugación diferencial.

V.5. Determinación de proteínas

Para la determinación de la concentración proteica se utilizó el método de Bronsted-Lowry modificado. Las disoluciones del pellet obtenido en el paso anterior fueron hechas en tubos de ensayo, se realizaron las soluciones que se indica en el anexo 1, utilizando como solución estándar albumina de huevo. (Lowry, *et al.*, 1951).

Se realizaron tres réplicas de cada uno de los tubos de ensayo y se determinó la absorbancia a 750 nm, utilizando como blanco la mezcla del tubo 1.

Se determinó la concentración proteica del extracto, se elaboró una interpolación lineal en la gráfica de la albumina bovina, determinando la cantidad de proteína en la fracción (Tabla I).

Tabla I. Soluciones utilizadas para la cuantificación de proteínas en las muestras.

Componentes	Blanco (mL)	Muestra problema (mL)
Agua	1	0.95
Reactivo alcalino	5	5
Muestra	0	.05
Reactivo de Folin	0.5	0.5

V.6. Ensayo enzimático

Para la determinación de la actividad enzimática de la peroxidasa se utilizó el método del alcohol veratrílico, en el cual la peroxidasa cataliza la oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído en presencia de peróxido de hidrogeno. El ensayo se realizó a una temperatura ambiente de 26 grados centígrados, en una solución amortiguadora de Tris HCl 20 de pH 8.5. La actividad enzimática específica se definió en términos de nanomoles de alcohol veratrílico oxidado por minuto por μg de proteína. El coeficiente de extinción que se utilizó para calcular la actividad fue de $9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 310 nm (Patrick, Mtui, *et. al.*, 2010).

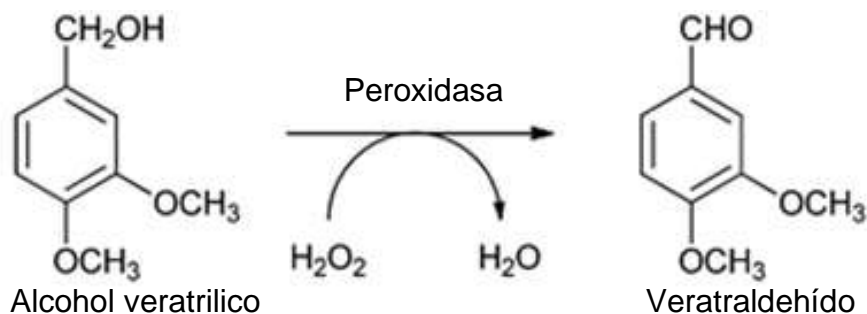


Figura 14. Acción de una peroxidasa en contacto con alcohol veratrílico y peróxido de hidrógeno.

Se prepararon cada una de las soluciones que se muestran en la tabla III. Se midió la absorbancia a 310 nm tanto en el blanco de enzima como a las muestras problema y la muestra puesta a hervir por 10 minutos, esto debido a que a diferencia el alcohol veratrílico el veratraldehído tiene una fuerte

absorbancia a una longitud de onda de 310 nm, pudiendo con esto comprobar de forma indirecta la presencia de enzimas con propiedades de peroxidasa en la muestra.

Para calcular la actividad enzimática se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad total (AT)} = \left(\frac{(\Delta A/\text{Min}) \cdot V_T}{\epsilon b V_M} \right) 100 \quad (1)$$

En donde:

Actividad total (AT)= Cantidad de enzima necesaria para transformar un nmol de alcohol veratrílico por minuto (U/nmol).

$\Delta A/\text{min}$ = Cambio de absorbancia sobre el tiempo de medición.

V_T = Volumen total de la mezcla (en mililitros).

ϵ = Coeficiente de extinción molar del alcohol veratrílico a $\lambda = 310\text{nm}$ ($9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (F Patrick, G Mtui, *et. al.*, 2010).

b = Espesor de la celda en cm.

V_M = Volumen de la muestra (en mililitros).

Para calcular la actividad enzimática específica se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{AEE} = \text{AT/CP} \quad (2)$$

AEE= Actividad enzimática total por cada μg de proteína presente en la muestra.

AT= Actividad enzimática total (U/nmol).

CP= Concentración de proteínas en la muestra ($\mu\text{g/mL}$).

Tabla II. Mezclas utilizadas en el ensayo enzimático del alcohol veratrílico para la determinación de peroxidasa, para la muestra problema se prepararon diez réplicas para cada alga.

Componentes	Blanco (mL)	Blanco para enzima (mL)	Muestra problema (mL)	Enzima hervida (mL)
Buffer Tris HCl 20mM pH 8.5 (Buffer A)	0.7	0.7	0.7	0.7
alcohol veratrílico	0.3	0.3	0.3	0.3
Extracto proteico	0.5	0	0.5	0.5
Peróxido de hidrógeno	0	0.4	0.4	0.4

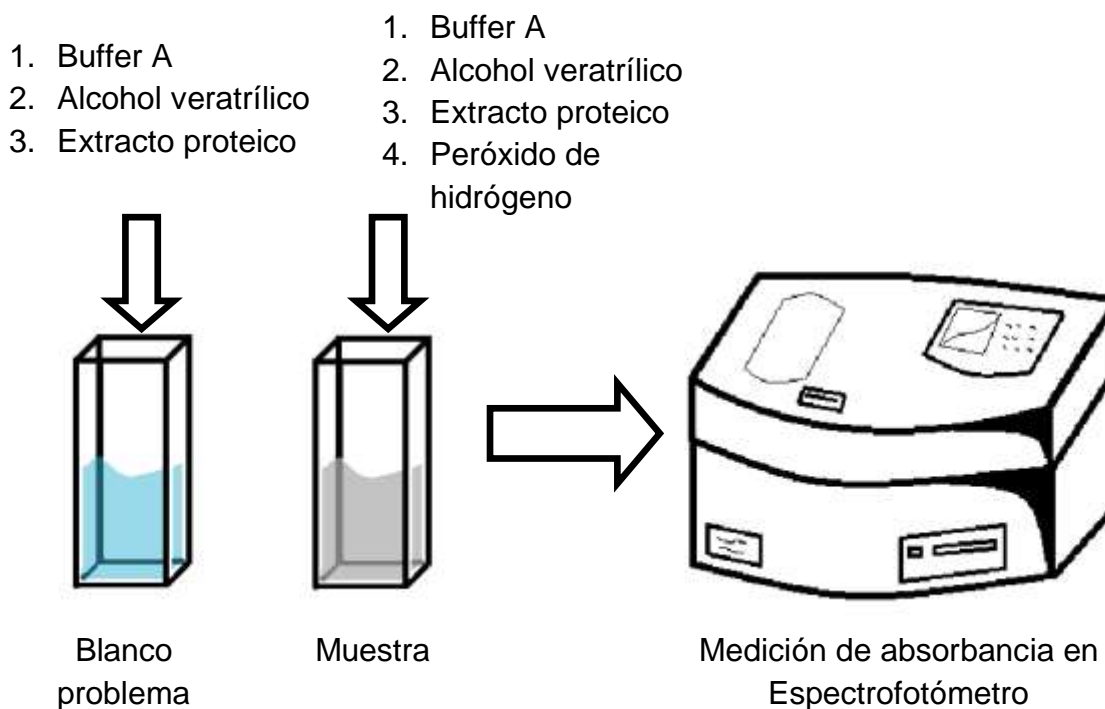


Figura 15. Diagrama del ensayo enzimático para la detección de enzimas con actividad de peroxidasa.

V.7. Cromatografía de intercambio iónico

Se preparó una columna de cromatografía de intercambio iónico utilizando Sepharose® CL-4B, empacada en una columna para cromatografía de 1 cm de diámetro y 11 cm de largo. Se agregó la Sepharose® CL-4B poco a poco, evitando dejar residuos en las paredes y se dejó reposar el tiempo suficiente para que se asentara de forma adecuada. Una vez que estuvo lista la columna se procedió a equilibrarla, lavándola continuamente con buffer Tris HCl 20 mM pH 8.5 midiendo los niveles de pH a la entrada y a la salida de la

columna. Este procedimiento continuó hasta que las dos mediciones de pH coincidieran (pH de 8.5).

Para la determinación del volumen de elución se corrió una solución de azul de dextrano (2 mg/mL), agregando 6 gotas de la misma. El azul dextrano no entra en la matriz del gel y por lo tanto avanza de forma más rápida a través de la columna. Para la cuantificación del volumen de exclusión se dejó fluir la solución buffer hasta que el menisco alcanzó el lecho del gel. En este punto se agregaron las seis gotas de la solución de azul de dextrano, y se abrió un poco la llave para permitir la entrada de la solución de azul de dextrano al gel. Una vez que toda la banda azul hubo entrado al gel se cerró rápidamente la llave y se agregó cuidadosamente más solución buffer para evitar que se secase el gel. Se colocó una probeta de 10 mL a la salida de la columna y se abrió la llave para dejar correr la solución de azul de dextrano. Constantemente se agregó solución buffer para realizar la elución de la banda de azul de dextrano. Se cuantificó el volumen necesario de buffer para retirar las 6 gotas de azul de dextrano de la columna. De cada una de las dos muestras de interés que se tenían (*U. lactuca* y *P. yezoensis*.) se tomó 1 mL y se depositaron en la columna de exclusión. La muestra se eluyó utilizando tres soluciones con diferentes concentraciones de KCl (25mM, 50mM y 100mM) en Buffer Tris HCl 20 mM de pH 8.5. La columna se conectó a un colector de fracciones automático, el cual se programó para recolectar fracciones de 5mL (Fig. 16). A las fracciones se les midió la absorbancia a 280 nm, seleccionando las fracciones que mostraron

absorbancia a esta longitud para aplicarles un ensayo enzimático con el fin de identificar la presencia de actividad de peroxidasa.



Figura 16. Columna de cromatografía de intercambio iónico conectada a un colector de fracciones automático.

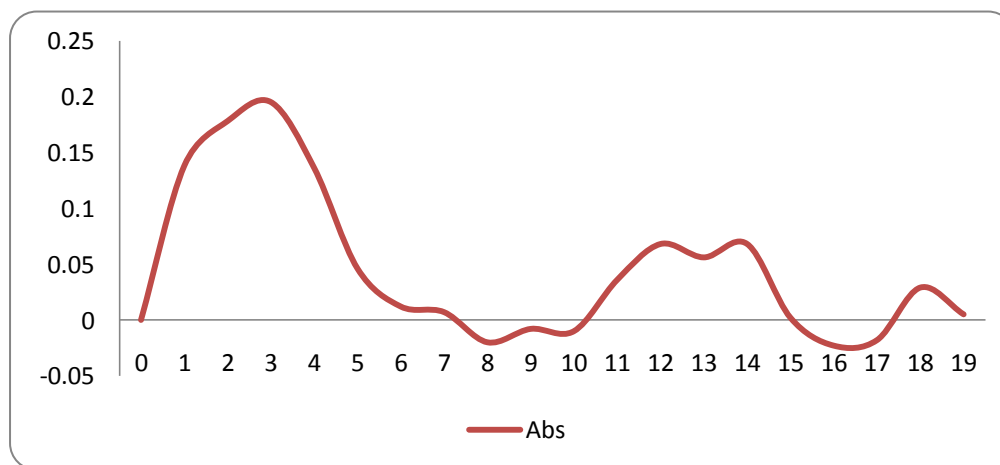


Figura 17. Gráfica de absorbancia de las fracciones de *U. lactuca* obtenidas a partir de la columna de cromatografía de intercambio iónico.

V.8. Electroforesis de las fracciones eluidas de columna de cromatografía de intercambio iónico.

Las muestras obtenidas de la columna de cromatografía de intercambio iónico que mostraron la mejor actividad enzimática tanto de *U. lactuca* como de *P. yezoensis* fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7%. Para cada gel se realizó una curva de calibración (Fig. 23). Los resultados de todas las curvas fue similar, esto debido a que se utilizaron los mismos marcadores moleculares (Tabla III).

Tabla III. Pesos moleculares de las proteínas en la muestra estándar para SDS-PAGE.

Proteína	Peso molecular (Daltons)
Miosina	200,000
β-Galactosidasa	116,250
Fosforilasa b	97,400
Albumina de suero	66,200
Ovoalbúmina	45,000
Anhidrasa carbónica	31,000
Inhibidor de tripsina	21,500
Lisozima	14,400
Aprotina	6,5000

V.9. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilks, a los datos que fueron normales se les aplicó la prueba de Bartlett para evaluar la homogeneidad de las varianzas entre las dos algas. Para valorar si existía diferencias significativas entre los grupos se realizó un análisis de varianza unifactorial (ANOVA). En todas las pruebas se utilizó un valor de $\alpha=0.05$.

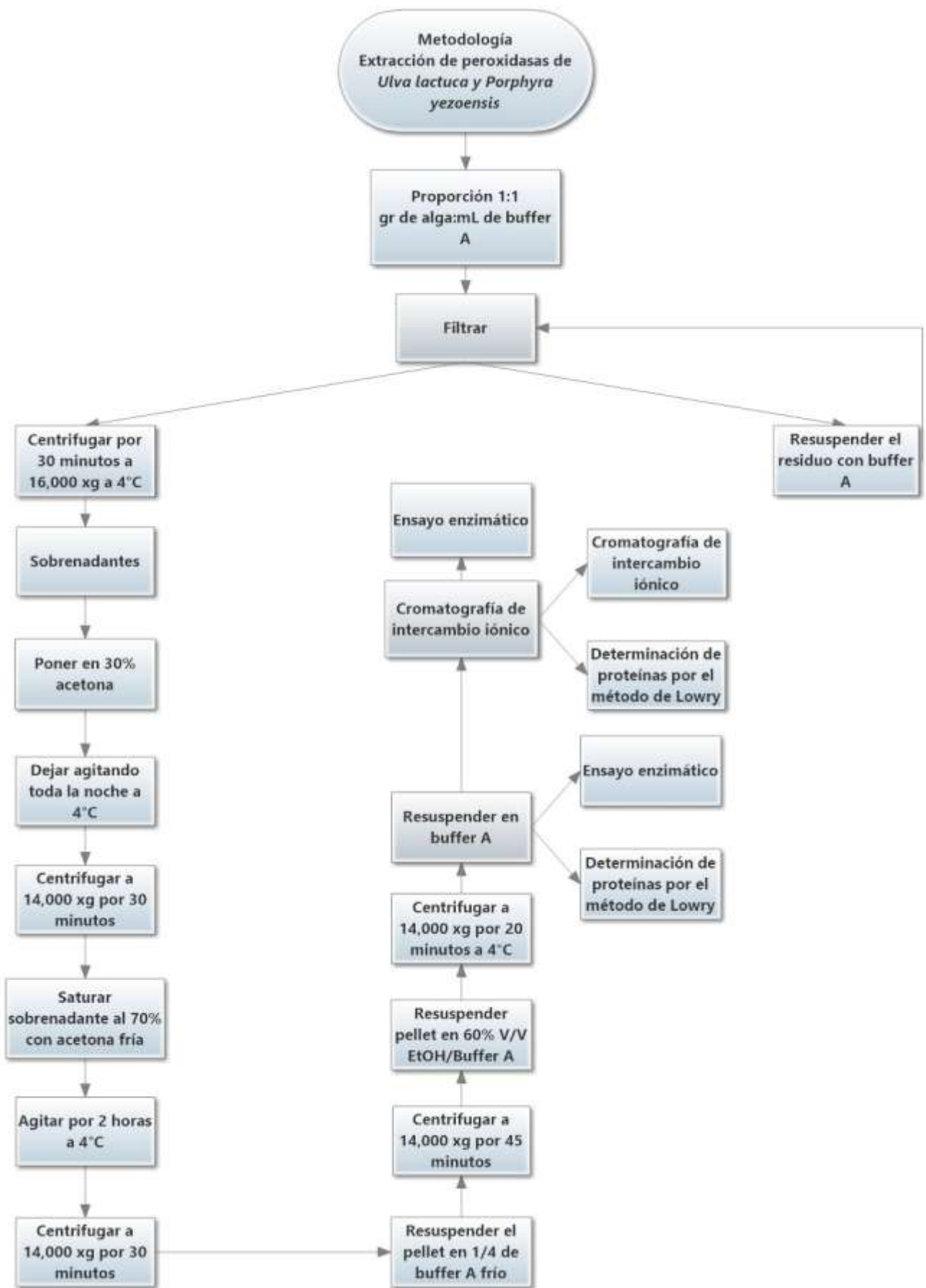


Figura 18. Metodología para la extracción de peroxidases algales.

VI.1. Concentración de proteínas

Los resultados de la lectura de absorbancia de cada uno de los tubos se muestran en la tabla II. Se elaboró una curva de calibración con un coeficiente de correlación de 0.9952.

En la tabla IV se pueden observar las concentraciones de proteínas que tenían las dos muestras de algas antes de pasar a través de la columna de cromatografía de intercambio iónico. Estas mediciones se realizaron justo después de la última centrifugación diferencial (Fig. 18). Se puede observar una diferencia significativa ya que la muestra de *P. yezoensis* demostró tener una concentración más alta.

En la tabla V se presentan las concentraciones de proteínas que se obtuvieron de las dos muestras después de que éstas pasaron por la columna de cromatografía de intercambio iónico. Al igual que en la medición anterior, se puede observar una clara diferencia entre las dos muestras, nuevamente la muestra de *P. yezoensis* cuenta con una mayor concentración de proteínas.

Tabla IV.

Concentración de proteína en las muestras antes de pasar a través de la columna de cromatografía de intercambio iónico. Para cada muestra n=5.

Muestra	Concentración proteica
<i>P. yezoensis</i>	233.23 ± µg/mL
<i>U. lactuca</i>	44.43 ± µg/mL

Tabla V. Concentración de proteína en las muestras después de pasar a través de la columna de cromatografía de intercambio iónico, para cada muestra n=5.

Muestra	Concentración proteica
<i>P. yezoensis</i>	90 µg/mL
<i>U. lactuca</i>	6.66 µg/mL

VI.2. Cromatografía de intercambio iónico

De la columna de cromatografía de intercambio iónico se seleccionaron las fracciones que presentaron la absorbancia máxima de cada muestra a 280nm y con cada uno de los tres diferentes concentraciones (25 mM, 50 mM y 100 mM de KCl en buffer Tris HCl 20 mM pH 8.5) (Tabla V). De la muestra de *P. yezoensis* se seleccionaron diez fracciones, a las cuales se les realizó un ensayo enzimático para la detección de peroxidasas. De estas diez fracciones se seleccionaron las fracciones 3, 4 y 5 eluidas con KCl 25 mM ya que fueron las fracciones que presentaron la actividad deseada. Para la muestra de *U. lactuca* se seleccionaron siete fracciones, a las cuales se les realizó un ensayo enzimática para la detección de peroxidasas, de estas siete fracciones se seleccionaron las fracciones 2 y 3 eluidas con KCl 25 mM ya que fueron las que presentaron la actividad deseada. En las dos muestras las fracciones que se obtuvieron eluidas con KCl al 50 mM y 100 mM presentaron una actividad enzimática muy baja y no se tomaron en cuenta para los análisis posteriores.

Tabla VI. Valores de absorbancia máxima en las fracciones obtenidas de la columna de Sepharose® CL-4B a partir de las muestras de *U. lactuca* y *P. yezoensis*. Se indican las fracciones que presentaron las absorbancias máximas, se utilizaron tres concentraciones de KCl 25mM, 50mM y 100 mM en buffer Tris HCl 20 mM pH 8.5. La lectura se realizó a 280 nm.

Muestra	Solución de elución	Fracciones	Absorbancias máximas ($\lambda=280$ nm)
<i>P. yezoensis</i>	25mM	F3, F4, F5	0.260
<i>P. yezoensis</i>	50mM	F8, F9, F10, F11	0.114
<i>P. yezoensis</i>	100mM	F1, F2, F7	0.028
<i>U. lactuca</i>	25mM	F2, F3	0.195
<i>U. lactuca</i>	50Mm	F12, F13, F14	0.68
<i>U. lactuca</i>	100mM	F3, F8	0.032

VI.3. Actividad enzimática

Tanto en la muestra de *U. lactuca* como en la de *P. yezoensis* se encontró actividad enzimática de peroxidasa, las actividades correspondientes a cada una de las algas se presentan en la tabla VII. De acuerdo a las actividades observadas la muestra de *U. lactuca* cuenta con una actividad enzimática específica más alta que la muestra de *P. yezoensis*.

Tabla VII. Actividad enzimática presente en las dos muestras de algas, se realizaron diez replicas para cada una de las muestras.

Muestra	Actividad enzimática (nmol de alcohol veratrílico oxidados min⁻¹ mL⁻¹)	Actividad enzimática específica (nmol de alcohol veratrílico oxidados min⁻¹ por µg de proteína)
<i>U. lactuca</i>	1.228	0.18438
<i>P. yezoensis</i>	1.274	0.01415

En las figuras 19 Y 20 se presenta la curva de absorbancia del veratraldehído obtenida durante el ensayo enzimático con las muestras de *U. lactuca* y *P. yezoensis*. Se puede observar que en las dos curvas el aumento de veratraldehído comenzó a decaer cerca del minuto cuatro. A partir de este punto el aumento del veratraldehído continúa pero en menor medida.

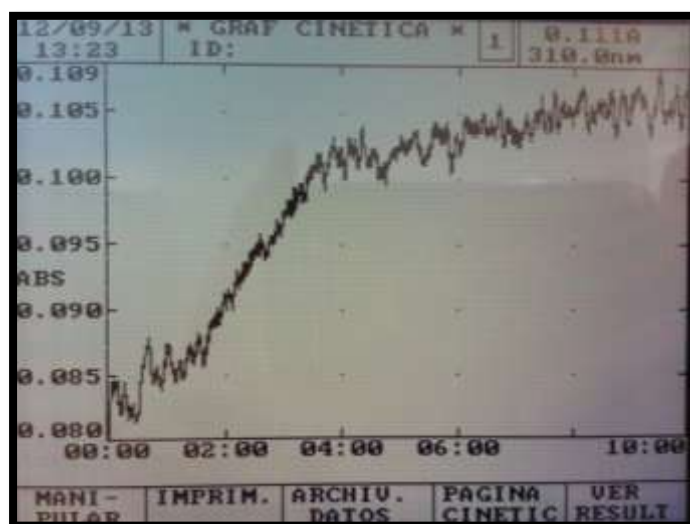


Figura 19. Curva de crecimiento del veratraldehído, obtenida durante el ensayo enzimático con la muestra de *U. lactuca*. En el eje horizontal se presenta el tiempo de medición (diez minutos) y en el eje vertical se presentan los valores de absorbancia.

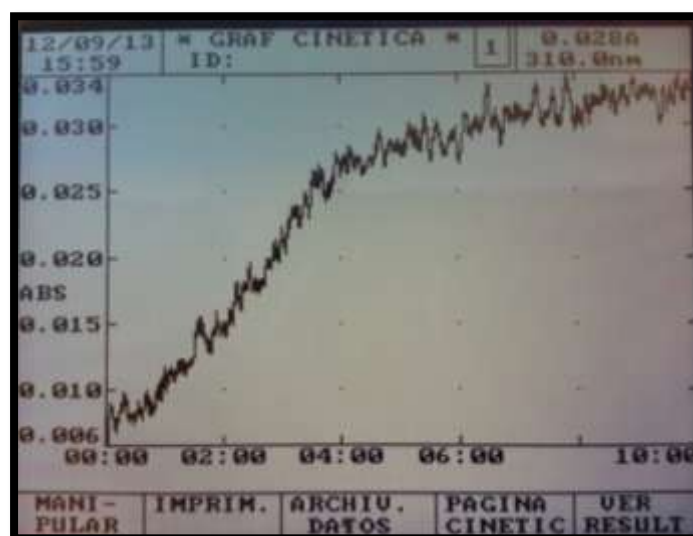


Figura 20. Curva de crecimiento del veratraldehído, obtenida durante el ensayo enzimático con la muestra de *P. yezoensis*. En el eje horizontal se presenta el tiempo de medición (diez minutos) y en el eje vertical se presentan los valores de absorbancia.

VI.4. Electroforesis de las fracciones eluidas de columna CL-4B

En los geles se pudieron identificar al menos dos proteínas en cada carril (Fig. 21), sin embargo también existe la posibilidad de que se trate de una proteína cuaternaria desnaturalizada. En la tabla VI Se presentan los pesos moleculares calculados para las proteínas identificadas en los geles, estos pesos moleculares se calcularon a partir de la curva de calibración que se observa en la figura 23. No existe una diferencia significativa entre los pesos moleculares, las proteínas que se cuentan con una movilidad relativa de 25 cuentan con un peso molecular de 58,694 Daltons, mientras que las proteínas que presentan una movilidad relativa de 47 tienen un peso molecular de 115,133 Daltons. Solamente se identifico una proteína con una movilidad relativa de 52 a la cual se le calculo un peso molecular de 50,361 Daltons, los pesos calculados se pueden observar en la tabla VIII.

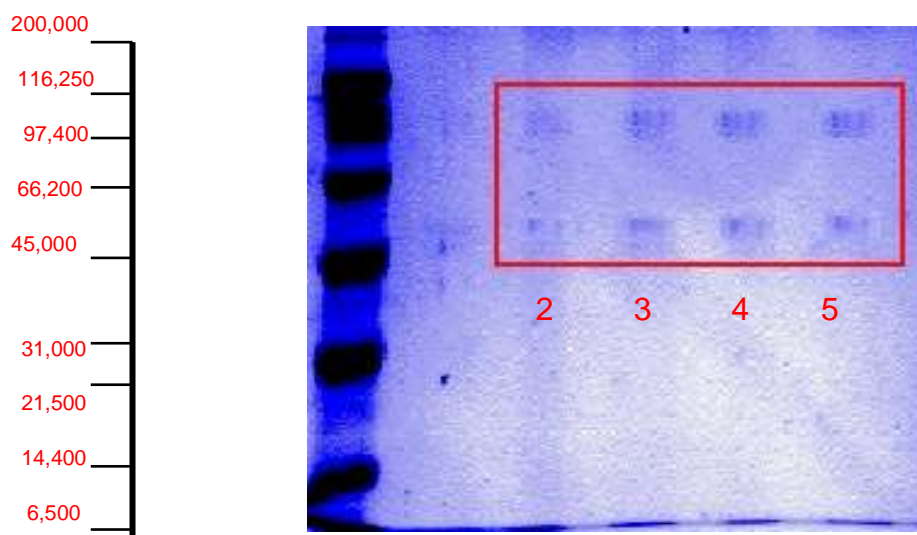


Figura 21. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). En los carriles 2 y 4 se observan las muestras de *P. yezoensis*. En los carriles 3 y 5 se observan las muestras de *U. lactuca*. En el primer carril se observan los marcadores de pesos moleculares miosina (200,000 Da), β -galactosidasa (116,250 Da), fosforilasa b (97,400 Da), albumina de suero (66,200 Da), ovoalbúmina (45,000 Da), anhidrasa carbónica (31,000 Da), inhibidor de tripsina (21,500 Da), lisozima (14,400 Da) y aprotina (6,500 Da).

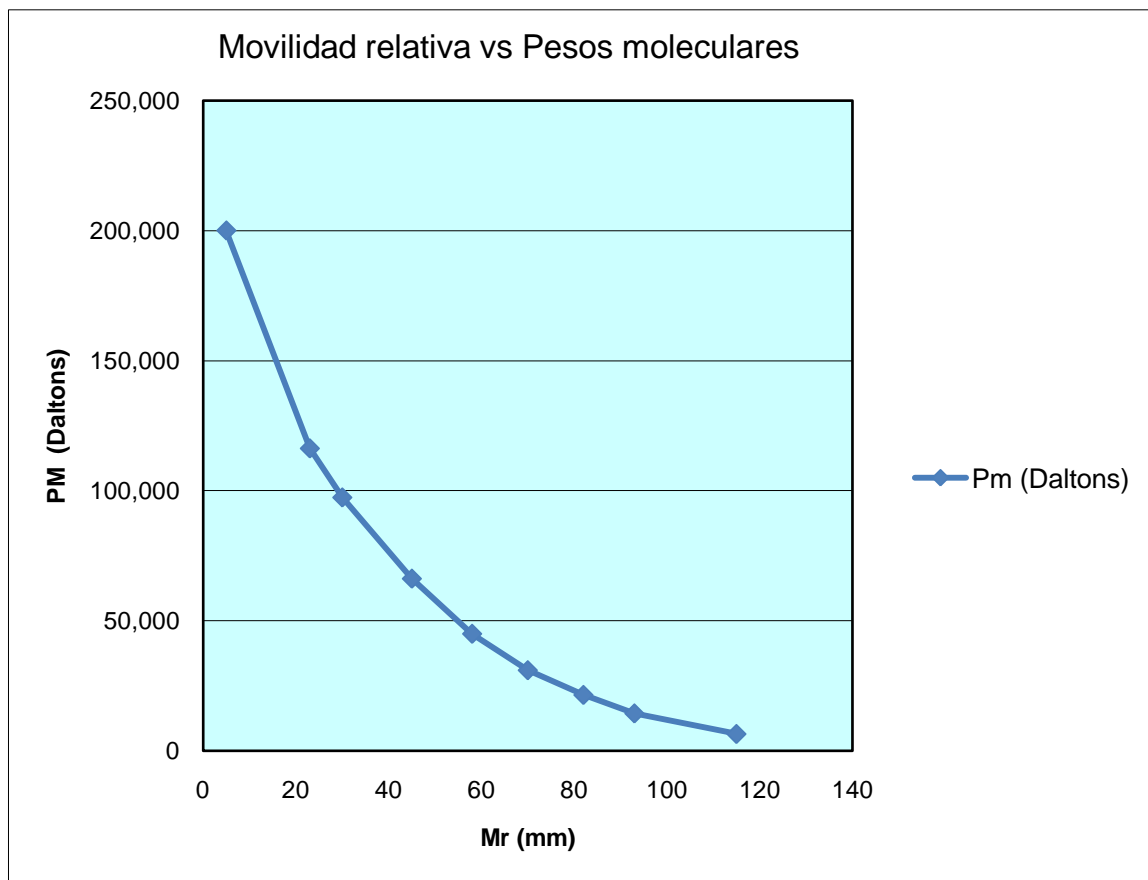


Figura 22. Gráfica de comparación para la electroforesis de poliacrilamida, en el eje horizontal se encuentran la movilidad relativa (Fr) de los marcadores de peso molecular de la muestra estándar en milímetros, en el eje vertical se tienen los pesos moleculares de los marcadores presentes en la muestra estándar.

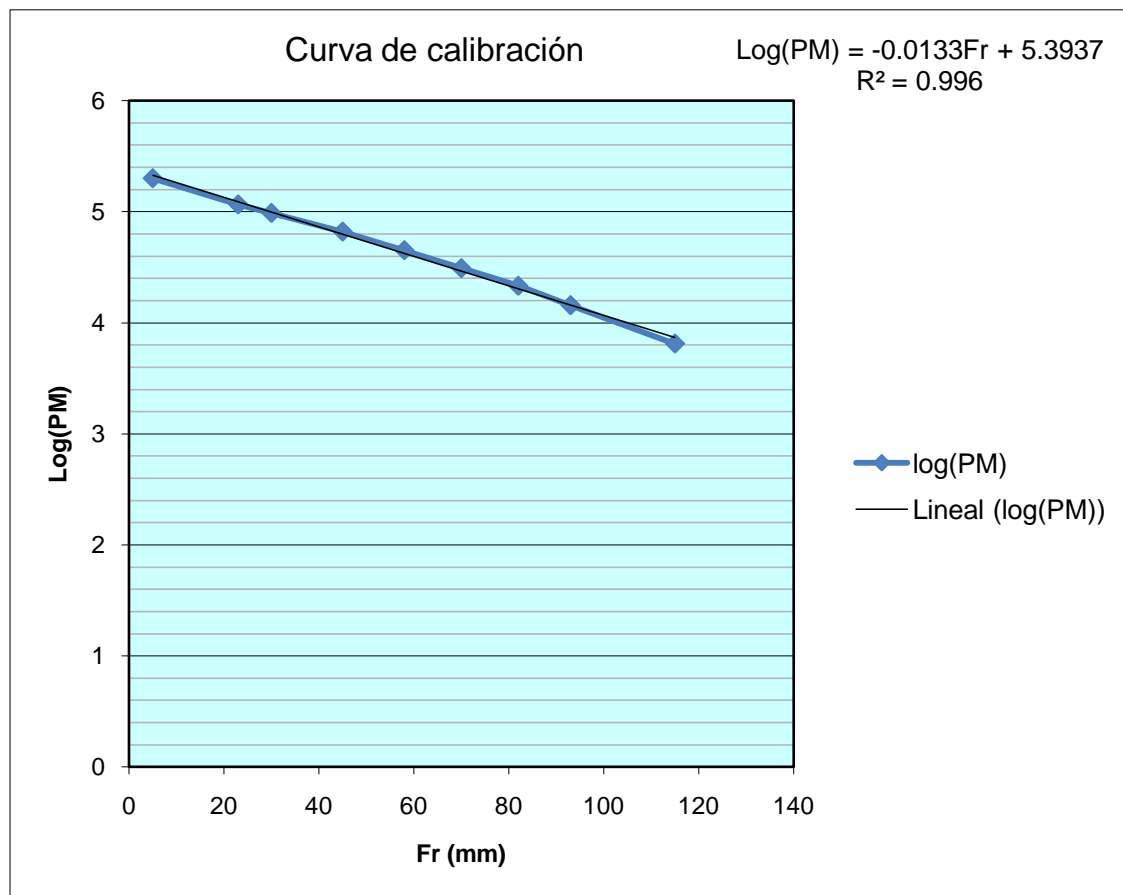


Figura 23. Curva de calibración para la electroforesis de poliacrilamida, en el eje horizontal se encuentra la movilidad relativa (M_r) de los marcadores de peso molecular de la muestra estándar. En el eje vertical se tiene el logaritmo del peso molecular de los marcadores presentes en la muestra estándar.

Tabla VIII. Pesos moleculares de las proteínas identificadas en la electroforesis de poliacrilamida, obtenidos a partir de la curva de calibración de la Figura 22.

Carril	Movilidad relativa (mm)	PM (Daltons)
2	25	126,211.811
2	52	50,361.6557
3	25	115,133.047
3	47	58,694.8504
4	25	115,133.047
4	47	58,694.8504
5	25	115,133.047
5	47	58,694.8504

VII. DISCUSION

La extracción de peroxidasas de dos muestras de algas distintas permite realizar un análisis comparativo entre ambas especies, obteniendo datos cuantitativos relacionados con el poder catalítico de las enzimas extraídas. Estos análisis servirán de base para futuras investigaciones con estas especies.

En los análisis para determinar las concentraciones de proteínas de cada una de las especies algales se puede observar que en la muestra de *P. yezoensis* demostró tener una concentración más alta de proteínas. Esto se observó tanto en la prueba que se realizó antes de pasar la muestra a través de la columna de cromatografía de intercambio iónico como en la que se realizó con las fracciones obtenidas de la columna. La diferencia entre las concentraciones es significativa 233.23 µg/mL para *P. yezoensis* comparada con 44.43 µg/mL para *U. lactuca* (en la prueba realizada antes de pasar a través de la columna de cromatografía) (Tabla IV). Esto indica que en esta etapa la muestra de *P. yezoensis* contenía un 81% más de proteína que *U. lactuca*. En la segunda cuantificación de proteínas, se puede observar nuevamente que la muestra de *P. yezoensis* cuenta con una concentración más alta que *U. lactuca* (prueba realizada después de pasar a través de la columna de intercambio iónico) (Tabla V). En esta ocasión *P. yezoensis* con 90 µg/mL mientras que *U. lactuca* con 6.66 µg/mL, lo que corresponde a una diferencia del 93% entre ambas concentraciones. Las dos muestras fueron sometidas a los mismos procedimientos, en condiciones idénticas de temperatura y pH, por lo que las

diferencias que se presentan entre las concentraciones de proteína se puede deber a que se trata de dos especies de algas distintas, aunque otra causal podría ser que, la muestra de *U. lactuca* puede contar con proteínas más sensibles que se pudieron perder durante algunos de los procesos intermediarios (homogenización, centrifugaciones, filtraciones).

En el análisis de las fracciones obtenidas de la columna de cromatografía de exclusión molecular (Tabla VI) se puede observar que para las dos muestras los niveles de absorbancia máxima se encontraron al utilizar la solución de KCl al 25mM, solución que contenía la menor concentración de sales usada. Anteriormente se habían corrido dos muestras en una columna con concentraciones salinas más elevadas, experimento en el cual la lectura de absorbancia más baja se presentó en la solución de KCl a 100mM. Fue en la elución a 25 mM donde se encontraron las absorbancias máximas a 280 nm. El hecho de que los niveles más altos de absorbancia estén presentándose en la solución con concentración de 25 mM de KCl (el más bajo de todos) nos habla de que nuestra enzima cuenta con una carga positiva, es por esto que se ve desplazada rápidamente por las sales presentes en el primer gradiente. Parecido a lo que se presentó en las pruebas de concentraciones proteicas, las fracciones de *P. yezoensis* contaron con valores de absorbancia mas altos que la fracciones de *U. lactuca* (0.260 para *P. yezoensis* y 0.195 para *U. lactuca*).

En los ensayos enzimáticos realizados se observa que la muestra de *U. lactuca* contó con una actividad enzimática más alta que la muestra de *P.*

yezoensis (Tabla VII), estos resultados contrastan con los obtenidos en las pruebas de concentración de proteínas y las absorbancias de la columna de cromatografía donde la muestra de *P. yezoensis* presentaba valores más elevados que *U. lactuca*. La muestra de *U. lactuca* presentó un 92% más de actividad enzimática específica comparada con la muestra de *P. yezoensis*. Esto indica que en *U. lactuca* se encontró mayor cantidad de unidades de enzima por μg de muestra y que la alta concentración de proteínas que presenta *P. yezoensis* puede deberse a otra especie de proteínas que no son de interés para este trabajo.

La metodología de extracción utilizada para este trabajo fue muy similar a la descrita en los antecedentes utilizada por Kongkiattikajorn y Pongdam (2006), la cual se utilizó con el alga *Gracilaria fisheri*, una macro alga roja. Aunque básicamente la metodología utilizada por estos autores es igual a la utilizada en este trabajo, es importante mencionar que existen algunas diferencias, en la metodología presentada por Kongkiattikajorn y Pongdam utilizan 1 Kg de *G. fisheri* para la homogenización, esto derivó en la obtención de mayor cantidad de muestra para análisis que en este trabajo ya que aquí se utilizaron 30 g de cada una de las algas para la homogeneización. También en el trabajo de Kongkiattikajorn y Pongdam realizaron mas procedimientos que no se utilizaron en este trabajo, en su trabajo la muestra proteica pasó por una segunda columna de cromatografía para obtener un mayor grado de pureza, llevaron a cabo la identificaron del pH optimo en el cual la enzima alcanza su

actividad máxima, realizaron estudios sobre la estabilidad térmica de la enzima, se estudiaron las propiedades cinéticas de la enzima y los posibles inhibidores que podría tener. Por falta de tiempo no se pudieron llevar a cabo estas pruebas en el presente trabajo. Comparando las actividades enzimáticas que se obtuvieron para *G. fisheri* (160.4 mU/mg) con los obtenidos en este trabajo para *U. lactuca* (0.18438 nmol/min/ug de proteína) y *P. yezoensis* (0.01415 nmol/min/ug de proteína) en la misma etapa de la metodología, se puede observar una diferencia significativa, ya que para la peroxidasa proveniente de *G. fisheri* se obtuvo una actividad enzimática específica mucho más alta, esto podría ser debido a que se trata de una enzima diferente proveniente de un organismo diferente, la cual de forma natural cuenta con una actividad enzimática mayor, también podría ser que debido a las ligeras variaciones que se realizaron entre los dos métodos se hayan generado pérdidas en la cantidad de enzima que se obtuvo en este trabajo.

Al comparar las actividades enzimáticas obtenidas en este trabajo se puede observar que estas son significativamente menores a los que se reportan en publicaciones, para *U. lactuca* se obtuvo una actividad enzimática específica de 0.18438 nmol/min/μg de proteína, mientras que Kathleen y Liu (1997) reportaron una actividad específica de 250 μmol/min/mg para el alga verde *Selenastrum capricornutum*, utilizando ascorbato como donador de electrones en lugar del alcohol veratrílico, si bien estos resultados podrían presentar una variación tan alta debido a lo anterior, también se debe de tomar en cuenta que

se trata de especies diferentes de algas y el hecho de que podría estarse tratando de peroxidasas con diferentes características, también es posible que los procedimientos a los que fue expuesta la peroxidasa en este trabajo provocaran la disminución de la actividad enzimática, debido a que no se realizó una caracterización más profunda de la peroxidasa obtenida en este trabajo no se puede llegar a una conclusión clara de por qué estas diferencias son tan significativas. Con respecto a los resultados obtenidos para *P. yezoensis* en este trabajo se reporta una actividad enzimática específica de 0.01415 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, Kongkiattikajorn y Pongdam (2006) reportaron una peroxidasa proveniente del alga roja *Gracilaria fisheri* con una actividad enzimática específica de 315.30 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, para ese trabajo se utilizó 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) de diamonio en lugar del alcohol veratrílico, este cambio pudo haber causado estas diferencias entre las actividades enzimáticas, sin embargo al igual que en el caso anterior no se puede llegar a una conclusión de por qué se presentaron estas diferencias tan grandes.

Los resultados obtenidos de la electroforesis de poliacrilamida revelan la presencia de dos bandas en cada uno de los carriles en donde se corrieron las muestras; esto sugiere la existencia de dos proteínas distintas en las muestras o de una sola proteína cuaternaria con dos subunidades desnaturalizada. De tratarse de dos proteínas distintas, el peso molecular de la primera sería de 58,694 Daltons y el de la segunda de 115,133 Daltons. Por otra parte si se tratara de una sola proteína con dos subunidades, los pesos moleculares

anteriores se sumarían y el peso molecular de la proteína sería de 173,827 Daltons. En la bibliografía se menciona que los pesos moleculares de las peroxidasas normalmente se encuentran entre los 30,000 Da y los 160,000 Da (Thomas Gaspar, *et al.*, 1982). Tomando esto en cuenta se consideraría como la opción más viable el que se tratara de dos proteínas distintas, aunque también existe la posibilidad de que se trate de una peroxidasa que tenga un peso molecular más alto que el de las peroxidasas conocidas actualmente. Para determinar si se trata de una proteína o de dos se propone correr la muestra a través de una columna de cromatografía de exclusión molecular, en la cual se correrían las muestras antes de ser sometidas a procesos desnaturizantes, esto con el fin de obtener en las fracciones la proteína en su forma cuaternaria no desnaturizada.

VIII. CONCLUSIONES

- ❖ Se logró identificar la presencia de enzimas con actividad de peroxidasa en la especie algal *Ulva lactuca*, la cual cuenta con una actividad específica 0.18438 nmol/min/mg.

- ❖ Se logró identificar la presencia de enzimas con actividad de peroxidasa en la especie algal *Porphyra yezoensis*, la cual cuenta con una actividad específica de 0.01415 nmol/min/mg.

- ❖ Si se tratara de dos enzimas distintas presentes en la muestra, el posible peso molecular de la enzima con actividad de peroxidasa oscila entre los 58,694 Daltons y los 115,133 Daltons.

- ❖ Si se tratara de una enzima con conformación cuaternaria con dos subunidades, el peso molecular de la enzima con actividad de peroxidasa oscila entre los 173,827 Daltons.

- La muestra de *Ulva lactuca* presentó una mayor actividad enzimática específica comparada con la muestra de *Porphyra yezoensis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agostini Elizabeth, Hernandez-Ruiz Josefa, Arnao Marino B., Milrad Silvia R., Tigier Horacio A. y Acosta Manuel, (2002). *A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (Brassica napus) hairy-root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits*. Biotechnol. Appl. Biochem. 35: 1-7 p.
2. Ahsan H., Ali A. y Ali R., (2003). *Oxygen free radicals and systemic autoimmunity*. Clin. Exp. Immunol. 13: 398-404 p.
3. Conesa Ana, Punt Peter J., Cess A.M.J.J. y Hondel Van Den, (2001). *Fungal peroxidases: molecular aspects and applications*. Journal of Biotechnology 93: 143-158 p.
4. D'Autreaux Benoit y Toledano Michael B., (2007). *ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., Volumen 8, 813-824 p.
5. Doyle Wendy A. y Smith Andrew T., (1996). *Expression of lignin peroxidase H8 in Escherichia coli: folding and activation of the recombinant enzyme with Ca²⁺ and haem*. Biochem. J. 315: 15-19 p.
6. Duarte-Vázquez, M. A., García-Almendárez, B., Regalado, C., & Whitaker, J. R. (2000). *Purification and partial characterization of three turnip peroxidases*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48:1574–1579 p.

7. Fortea M.I., López-Miranda S., Serrano-Martínez A., Hernández-Sánchez P., Zafrilla M.P., Martínez-Cachá A., Núñez-Delicado E.. (2011). *Kinetic characterisation and thermal inactivation study of red alga (*Mastocarpus stellatus*) peroxidasa*. Food Chem. 127: 1091-1096 p.
8. Gaspar T, Penel C, Thorpe T y Greppin H, (1982). *Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra**. J. Exp. Bot. 53: 303-311 p.
9. Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., y Pelicci, P.G., (2007). *Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?*. Nat. Rev. Mo. Cell. Biol. 8: 722-728 p.
10. Han S. Kim y Hyo Jun Kim, (2010). *Removal of phenol using horseradish peroxidase immobilized in the nano-scale porous structural material*. International Conference on Biology, Environment and Chemistry 1: 105-108 p.
11. Hayashi M., Nakamura Y., Higashi K., Kato H., Kishida F. y Kaneko H., (1999). *A Quantitative Structure Activity Relationship Study of the Skin Irritation Potential of Phenols*. Toxicology in Vitro 13: 915-922 p.
12. Jianbo Jia, Bingquan Wang, Aiguo Wu, Guangjin Cheng, Zhuang Li, y Shaojun Dong, (2002). *A Method to Construct a Third-Generation Horseradish Peroxidase Biosensor: Self-Assembling Gold Nanoparticles to Three-Dimensional Sol-Gel Network*. Anal. Chem. 74: 2217-2223 p.

13. Jirasak Kongkiattikajorn y Sayampong Pongdam, (2006). *Vanadium Haloperoxidase from the Red Alga Gracilaria fisheri*. Science Asia 32: 25-30 p.
14. Jun Wan, Jianli Bi, Ping Du y Shusheng Zhang, (2008). *Biosensor based on the biocatalysis of microperoxidase-11 in nanocomposite material of multiwalled carbon nanotubes/room temperature ionic liquid for amperometric determination of hydrogen peroxide*. Anal. Biochem. 386: 256-261 p.
15. Kenji Tatsumi, Shinji Wada, y Hiroyasu Ichikawa, (1996). *Removal of Chlorophenols from Wastewater by Immobilized Horseradish Peroxidase*. Biotech. and Bioeng. 51: 126-130 p.
16. Klein Jeffrey A. y Ackerman Susan L., (2003). *Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration*. J. Clin. Invest. 111: 785-793 p.
17. Klibanov AM, Alberti BN, Morris ED y Felshin LM., (1980). *Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste waters*. J. App. Biochem., 2: 414-421 p.
18. Krishnaswamy Kannan y Sushil K. Jain, (2000). *Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions*. J. of Carcin. Vol 5, No14, 1-8 p.
19. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. y Randall R. J., (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. 193: 265-275 p.

20. Martínez Gallegos Juan Francisco, (2005). *Utilización de α -Amilasas en la formulación de detergentes industriales*. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento de Ingeniería Química.
21. Mehmet Senel y Emre Çevik, (2012). *A novel amperometric hydrogen peroxide biosensor based on pyrrole-PAMAM dendrimer modified gold electrode*. Curr. App. Phy. Vol. 12, No 4, 1158-1165 p.
22. Michałowicz J. y Duda W., (2006). *Phenols – Sources and Toxicity*. Polish. J. of Environ. Stud. Vol. 16, No. 3: 347-362 p.
23. Nazrul Islam, Rezaul Karim y Raimo O. Malinen, (2007). *Beneficial Effects of Fungal Treatment before Pulping and Bleaching of Acacia mangium and Eucalyptus camaldulensis*. Turk. J. Agric. For. 32: 331-338 p.
24. Nelson David L., (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3ra edición, W. H. Freeman & Company.
25. Nixon Ogendi Mwebi, (2005). *Fenton & fenton-like reactions: the nature of oxidizing intermediates involved* Department of Chemistry and Biochemistry.
26. Novoselov SV, Rao M, Onoshko NV, Zhi H, Kryukov GV, Xiang Y, Weeks DP, Hatfield DL, Gladyshev VN. (2002). *Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, Chlamydomonas reinhardtii*. EMBO J. 21: 3681-93 p.
27. O'Brien Peter J., (2000), *Peroxidases*. Chem. Biol. Interact. 129: 113-139 p.

28. Paolo Pizzolla, (2008). *Ulva lactuca*. *Sea lettuce*. *Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme*. Plymouth: *Marine Biological Association of the United Kingdom*. Chemistry & Biochemistry Theses and Dissertations, Department of Chemistry and Biochemistry.
29. Pollumaa Kahru L., Reiman R., Ratsep A., Liiders M. y Maloveryan A, (2000). *The Toxicity and Biodegradability of Eight Main Phenolic Compounds Characteristic to the Oil-Shale Industry Wastewaters: A Test Battery Approach*. *Environmental Toxicology*, Volumen 15, Número 5, 432-442 p.
30. Quintero Ramírez Rodolfo, García Garibay Mariano y López-Munguía Canal Agustín (1993). *Biotecnología alimentaria*. Editorial Limusa, 636 p.
31. Re´gine Dayer, Fischer Beat B., Eggen Rik I. L. y Lemaire Ste´phane D., (2008). *The Peroxiredoxin and Glutathione Peroxidase Families in Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 179: 41-57 p.
32. Rothschild Nathan, Hadar Yitzhak, y Dosoretz Carlos G., (1997). *Lignin Peroxidase Isozymes from Phanerochaete chrysosporium can be enzymatically dephosphorylated*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 857-861 p.
33. Ruiz Javier Gonzalo, (2006). *Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria*. Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Química.

34. Sauser Kathleen R., Liu J.K. y Wong Tit-Yee, (1997). *Identification of a copper-sensitive ascorbate peroxidase in the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum**. *BioMetals* 10: 163-168 p.
35. Selassie Cynthia D., DeSoyza Tushini V., Rosario Melissa y Hua Gao, Corwin Hansch, (1998). *Phenol toxicity in leukemia cells: a radical process?*. *Chemico-Biological Interactions* 113: 175-190 p.
36. Wang Huai-Sheng, Pan Qian-Xiu y Wang Gui-Xiang, (2005). *A Biosensor Based on Immobilization of Horseradish Peroxidase in Chitosan Matrix Cross-linked with Glyoxal for Amperometric Determination of Hydrogen Peroxide*. *Sensors* 5: 266-276 p.
37. Ward Gary, Hadar Yitzhak y Dosoretz Carlos G., (2004). *The Biodegradation of Lignocellulose by White Rot Fungi*. *Bioenerg. Res.* 10: 67-75 p.
38. Yi-Chen Lai y Sung-Chyr Lin, (2005). *Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-chlorophenol from aqueous solution*. *Process Biochem.* 40: 1167-1174 p.
39. Zámocky Marcel, Furtmüller Paul G. y Obinger Christian, (2010). *Evolution of structure and function of Class I peroxidases*. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 500: 45-47 p.
40. Zoheb Karim y Qayyum Husain, (2009). *Redox-mediated oxidation and removal of aromatic amines from polluted water by partially purified bitter*

gourd (Momordica charantia) peroxidase. Intern. Biodet. & Biodegra. 63:
587-593 p.

ANEXO 1**Método de Lowry para la determinación de proteínas.**

Tubo	STD	AGUA	Reactivo alcalino	FOLIN
	(mL)	(mL)	(mL)	(mL)
1	0	1	5	0.5
2	0.05	0.95	5	0.5
3	0.1	0.9	5	0.5
4	0.2	0.8	5	0.5
5	0.3	0.7	5	0.5
6	0.4	0.6	5	0.5
7	0.5	0.5	5	0.5
8	0.6	0.4	5	0.5
9	0.8	0.2	5	0.5
10	1	0	5	0.5

ANEXO 2

Estadísticos para las muestras de *U. lactuca* y *P. yezoensis*

		Actividad enzimática de <i>U.</i> <i>lactuca</i>	Actividad enzimática de <i>P.</i> <i>yezoensis</i>
N	Válidos	10	10
	Perdidos	0	0
	Media	0.0027200	0.0028230
	Error típico de la media	0.00013808	0.00017447
	Mediana	0.0027000	0.0029500
	Moda	0.00260	0.00210 ^a
	Desviación típica	0.00043665	0.00055173
	Varianza	1.90667x10 ⁻⁷	3.04401x10 ⁻⁷
	Asimetría	-0.279	-0.033
	Error típico de asimetría	0.687	0.687
	Curtosis	-1.061	-1.243
	Error típico de curtosis	1.334	1.334
	Rango	0.00130	0.00160
	Mínimo	0.00200	0.00210
	Máximo	0.00330	0.00370
	Suma	0.02720	0.02823
a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.			

Tabla de frecuencias para la actividad enzimática de *U. lactuca*

	$\Delta A/\text{Min}$	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	.00200	1	10.0	10.0	10.0
	.00220	1	10.0	10.0	20.0
	.00240	1	10.0	10.0	30.0
	.00260	2	20.0	20.0	50.0
	.00280	1	10.0	10.0	60.0
	.00300	1	10.0	10.0	70.0
	.00310	1	10.0	10.0	80.0
	.00320	1	10.0	10.0	90.0
	.00330	1	10.0	10.0	100.0
Total	10	100.0	100.0		

Tabla de frecuencias para la actividad enzimática de *P. yezoensis*

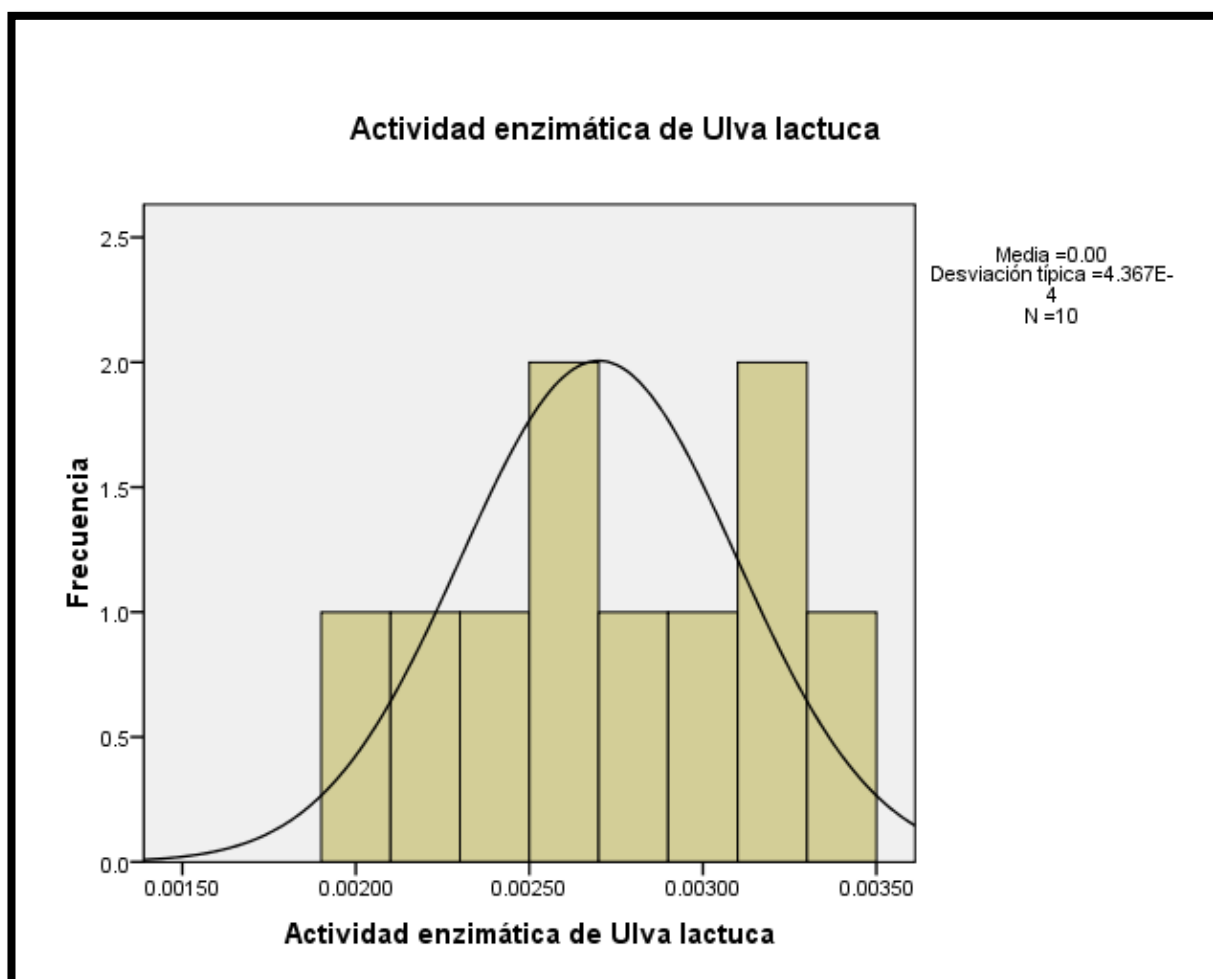
	$\Delta A/\text{Min}$	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	.00210	2	20.0	20.0	20.0
	.00230	1	10.0	10.0	30.0
	.00250	1	10.0	10.0	40.0
	.00280	1	10.0	10.0	50.0
	.00310	2	20.0	20.0	70.0
	.00323	1	10.0	10.0	80.0
	.00330	1	10.0	10.0	90.0
	.00370	1	10.0	10.0	100.0
	Total	10	100.0	100.0	

Pruebas de normalidad para las muestras de *U. lactuca* y *P. yezoensis*

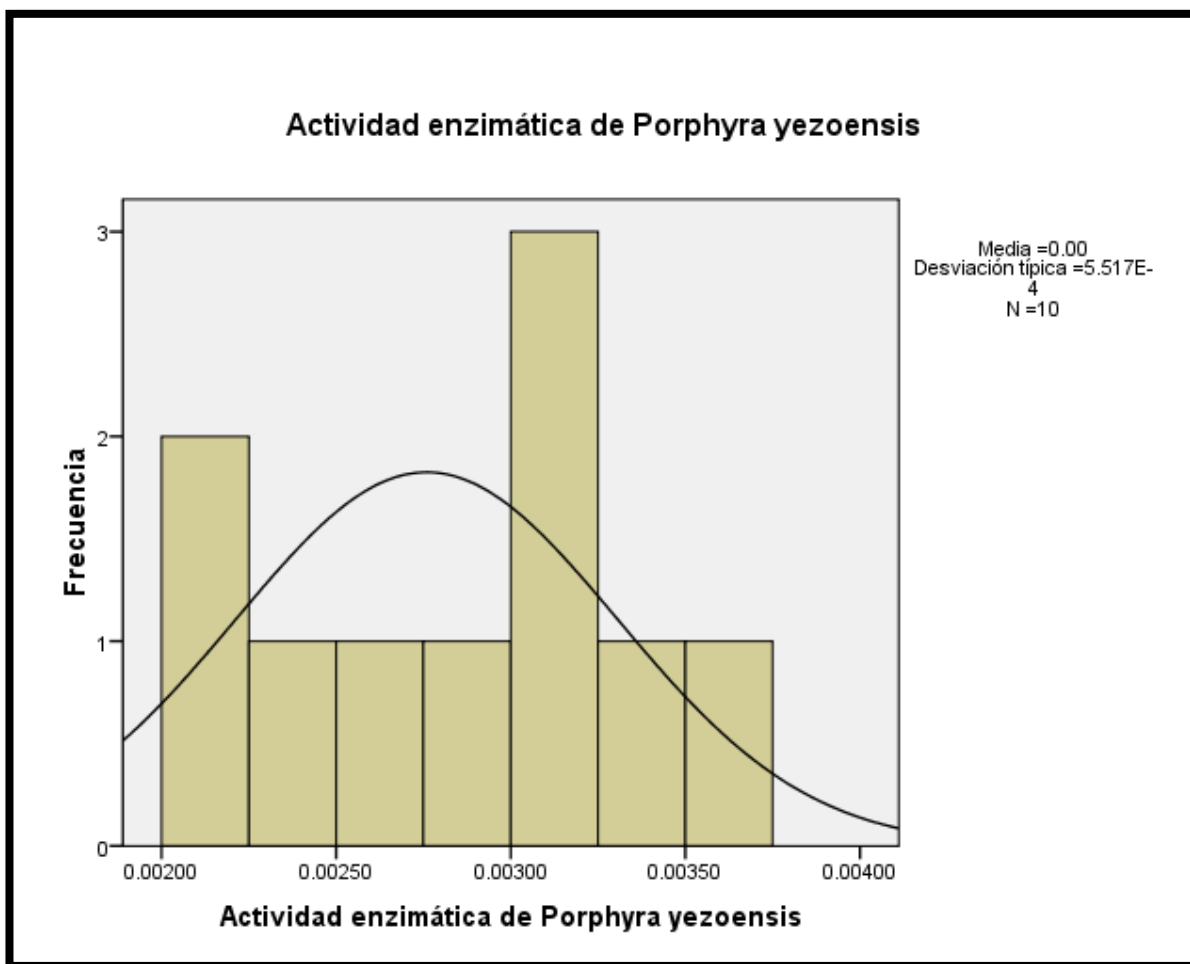
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Grados de libertad	Significancia	Estadístico	Grados de libertad	Significancia
Actividad enzimática de <i>U. lactuca</i>	0.139	10	0.200	0.958	10	0.760
Actividad enzimática de <i>P. yezoensis</i>	0.192	10	0.200	0.932	10	0.466

Resultados de la prueba ANOVA

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significancia
Inter-grupos	.000	1	.000	.214	.649
Intra-grupos	.000	18	.000		
Total	.000	19			



Histograma con curva de normalidad de la actividad enzimática de *U. lactuca*.



Histograma con curva de normalidad de la actividad enzimática de *P. yezoensis*.

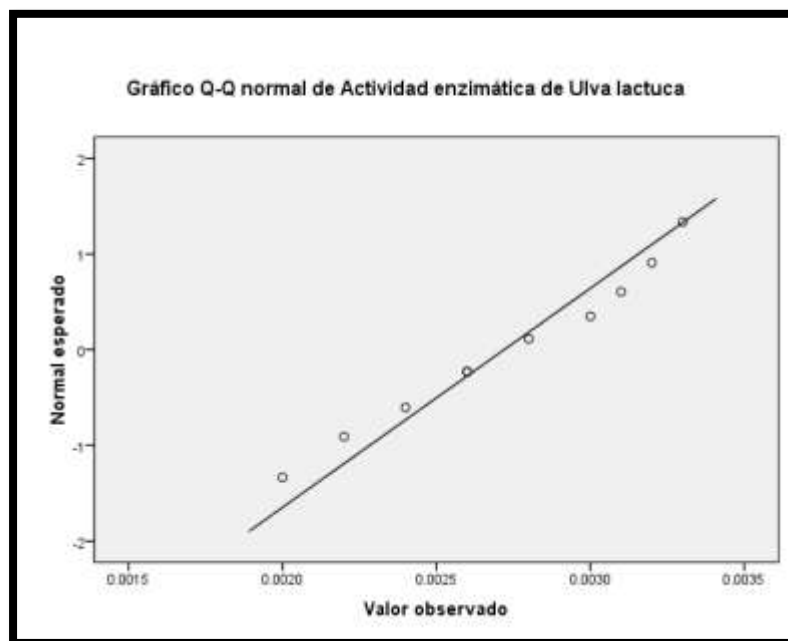


Gráfico Q-Q normal de actividad enzimática de *U. lactuca*

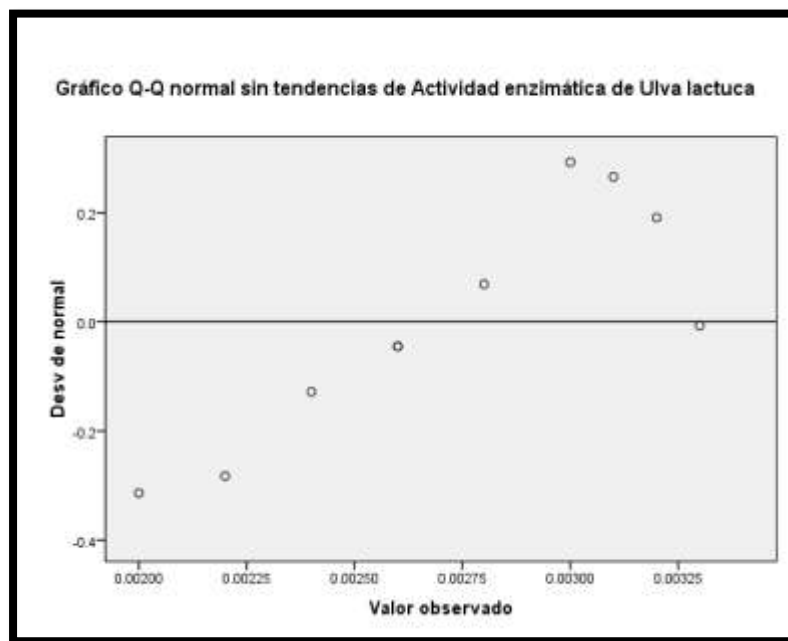


Gráfico Q-Q normal sin tendencias de actividad enzimática de *U. lactuca*

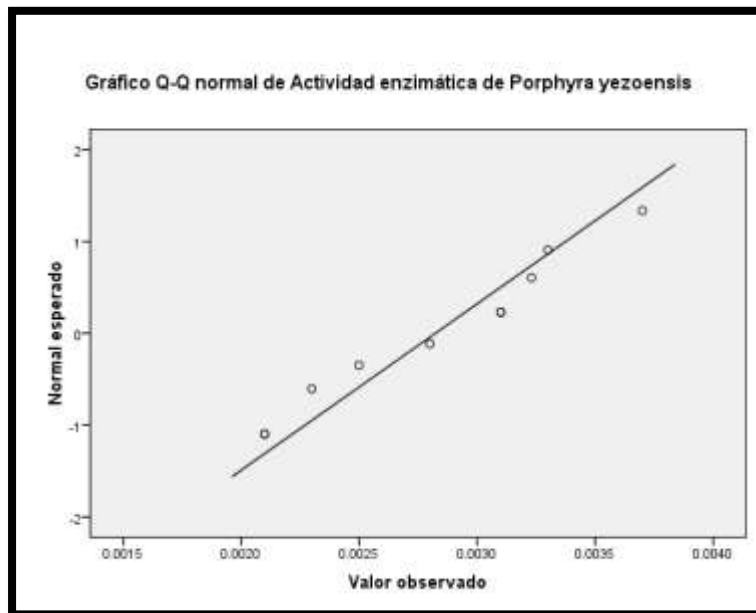


Gráfico Q-Q normal de actividad enzimática de *P- yezoensis*.

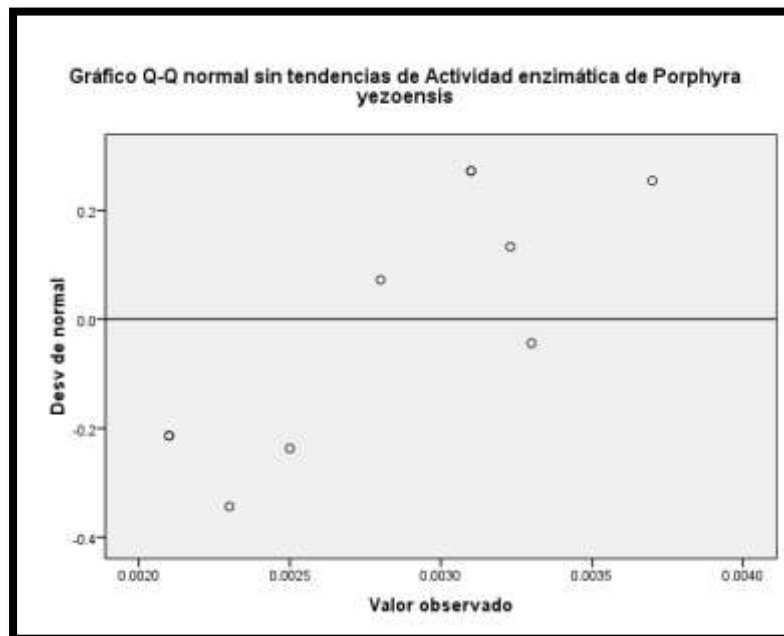
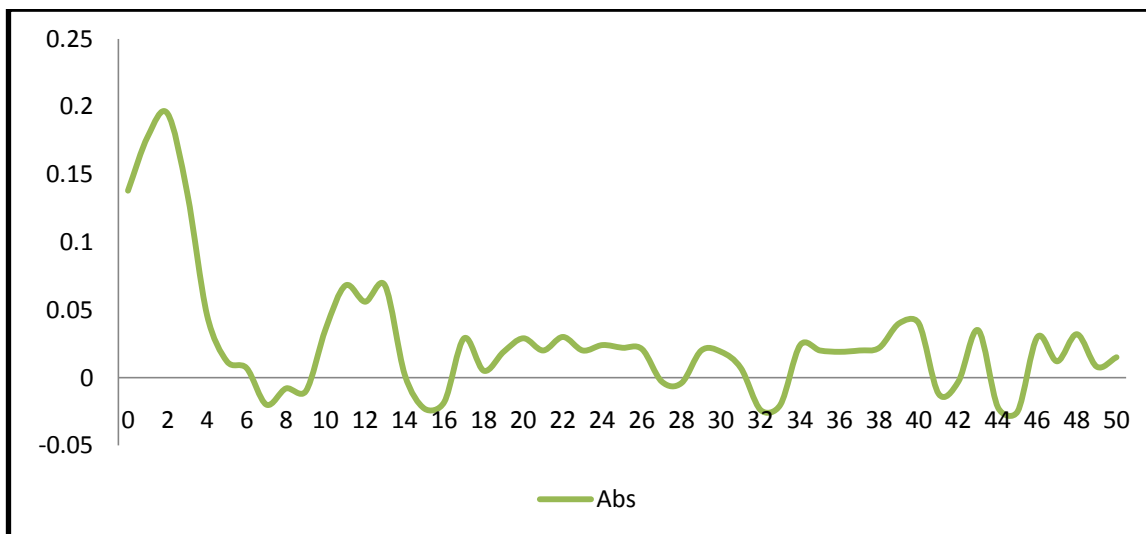
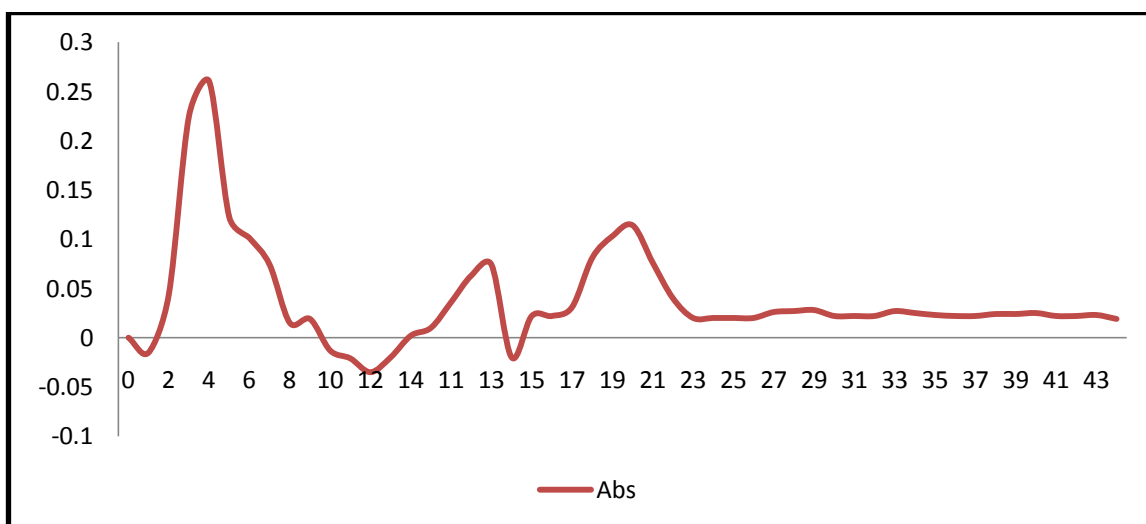


Gráfico Q-Q normal sin tendencias de actividad enzimática de *P- yezoensis*.

ANEXO 3



Absorbancias de las fracciones de *U. lactuca* leídas a 280 nm obtenidas de la columna de intercambio iónico, con los diferentes gradientes de concentración, fracciones 0-17 factor de dilución 25 mM, fracciones 16-33 factor de dilución 50 mM, fracciones 34-50 factor de dilución 100 mM.



Absorbancias de las fracciones de *P. yezoensis* leídas a 280 nm obtenidas de la columna de intercambio iónico, con los diferentes gradientes de concentración, fracciones 0-15 factor de dilución 25 mM, fracciones 16-30 factor de dilución 50 mM, fracciones 30-43 factor de dilución 100 mM.