



# Actividad enzimática y patrones electroforéticos de peroxidasa de raíces de *Brassica napus* y *Raphanus sativus* y frutos de *Sechium edule* y *Cucumis sativus*

Enzyme activity and peroxidase electrophoresis patterns of *Brassica napus* and *Raphanus sativus* roots and *Sechium edule* and *Cucumis sativus* fruits

Julio Arellano-Barragán, Steban Ilich-Zerpa, Marco Salazar-Castillo e Icela Rodríguez-Haro

Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad nacional de Trujillo.

## RESUMEN

Se estudiaron los parámetros cinéticos de  $K_M$  y  $V_{max}$ , y se compararon sus patrones electroforéticos de los extractos crudos de peroxidasa (POD) de: *Brassica napus*, “nabo”, *Raphanus sativus* “rabanito”, *Sechium edule* “caigua” y *Cucumis sativus* “pepinillo”. Se encontró que la POD de nabo presenta valores de  $K_M$  y  $V_{max}$  de 12,80 mM y 0,105 para guayacol, y de 2,22 mM y 1,095 para  $H_2O_2$ ; la de rabanito valores de 17,59 mM y 0,575 para guayacol, y de 0,355 mM y 0,301 para  $H_2O_2$ ; la de caigua valores de  $K_M$  y  $V_{max}$  de 6,321 mM y 0,401 para guayacol, y saturación para  $H_2O_2$ ; y la de pepinillo valores de  $K_M$  y  $V_{max}$  de 13,477 mM y 0,395 para guayacol, y de 0,935 mM y 0,325 para  $H_2O_2$ . Al comparar los patrones electroforéticos de éstas POD se observó en los enzimogramas un número de seis bandas entre claras e intensas; las bandas del extracto crudo de POD de nabo y de rabanito presentaron un color más intenso que no dejan observar a otras bandas junto a ellas; también se observó la presencia de isoenzimas de bajo peso molecular. Se puede concluir que los patrones isoenzimáticos y el número de isoenzimas de POD son semejantes en los tuberos (raíces) de nabo y rabanito y en POD de frutos de caigua y pepinillo, pero diferentes entre raíces y frutos y entre las hortalizas estudiadas.

**Palabras clave:** peroxidasa, patrones electroforéticos,  $K_M$ ,  $V_{max}$ , nabo, rabanito, caigua y pepinillo.

## ABSTRACT

The kinetic parameters of  $K_M$  and  $V_{max}$  were studied and their electrophoretic patterns of the raw extracts of peroxidase (POD) of *Brassica napus* "turnip", *Raphanus sativus* "radish" *Sechium edule* "stuffing cucumber" and *Cucumis sativus* "pickle" was compared. It was found that the “turnip” POD presents  $K_M$  and  $V_{max}$  values of 12,80 mM and 0.105 for guaiacol, and of 2,22 mM and 1.095 for  $H_2O_2$ ; the “radish” values were 17,59 and 0.575 for guaiacol and of 0,355 mM and 0,301 for  $H_2O_2$ ; the values for “stuffing cucumber” were  $K_M$  and  $V_{max}$  : 6,321 mM and 0.401 for guaiacol and saturation for  $H_2O_2$  and that of pickle  $K_M$  and  $V_{max}$  values were 13,477 mM and 0.395 for guaiacol and of 0.935 mM and 0,325 for  $H_2O_2$ . When comparing the electrophoretic patterns of these POD, the enzymograms showed a number of six bands between clear and intense; the bands of the raw extract of “turnip” and “radish” POD presented a more intense color that doesn't allow to observe to other bands next to them; also the isoenzymes presence of low molecular weight were observed. In conclusion the isoenzymatic patterns and the number of POD isoenzymes are similar in the tubercle (roots) of “turnip” and “radish” and in POD of “stuffing cucumber” and “pickle” fruits but different between roots and fruits and among the studied vegetables.

**Keywords:** peroxidase, electrophoretic patterns,  $K_M$ ,  $V_{max}$ , turnip, radish, stuffing cucumber and pickle.



## INTRODUCCIÓN

Las peroxidasas de plantas superiores están implicadas en una gran variedad de procesos fisiológicos, a lo largo de todo el ciclo vital de la planta, desde el nacimiento a la senescencia, por ejemplo en el crecimiento, desarrollo y endurecimiento de la pared celular, en la lignificación y suberización, en el catabolismo de auxina y en la defensa frente al estrés oxidativo y el ataque de patógenos. Además de esta funcionalidad dentro de la planta, estas enzimas son utilizadas ampliamente por la industria, en la síntesis de polímeros orgánicos como polianilina (PANI), en la decoloración de tintes sintéticos, en la descontaminación y limpieza de aguas residuales y de suelos, en la síntesis de fármacos orgánicos con alto rendimiento, en electrodos enzimáticos, en kits de diagnóstico e inmunoensayos enzimáticos. En todos estos procesos, la peroxidasa que se utiliza por excelencia es la peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana*), obtenida de sus raíces, además de la peroxidasa de soja (*Glycine max*), que presenta una mayor estabilidad<sup>1</sup>.

El contenido de POD en las diferentes partes de una planta varía de acuerdo a su localización, frecuentemente son mayores en las raíces. Hay también variación dependiendo de la estación del año y crecimiento de planta. A menudo, la actividad de POD es relativamente baja en frutos y jugos de frutos, particularmente cuando el pH de los líquidos de los tejidos es bajo<sup>2</sup>.

La actividad de la POD varía ampliamente de una especie a otra. Para el fruto de balazos (*Monstera deliciosa*) se ha encontrado que dicha actividad depende del grado de madurez; por el contrario, la actividad de POD de las hojas de la palma de botella (*Roystonea regia*) se mantiene constante todo el año. Algunas especies presentan alta actividad de POD como la raíz de batata (*Ipomoea batatas*), las hojas de pasto guinea (*Panicum maximum*), las de dormidera (*Mimosa pigra*), las de higuera (*Ricinus communis L.*) y las de las siguientes palmas: mararai (*Aiphanes carotifolia*), de botella (*Roystonea regia*), dactilera (*Phoenix dactylifera*) y africana (*Elaeis guineensis*). Además, mediante técnicas de isoelectroenfoque se han hallado POD aniónicas (pI 3.4 – 5.6) tanto en la raíz de batata como en las palmas analizadas<sup>3</sup>.

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

Actualmente, se está teniendo mayor atención a las de plantas comestibles, esto es sin duda, en gran parte debido al hecho de que durante el procesamiento de los alimentos, la actividad POD puede persistir en el producto terminado<sup>4</sup>.

Debido a que en el Perú, se cuenta con una rica variedad en vegetación, esto nos permite tener una amplia fuente de productos naturales de los cuales se pueden aislar, purificar y caracterizar, mediante distintas técnicas, a las POD obtenidas de fuentes naturales peruanas poco explotadas industrialmente como el nabo, rabanito, caygua, pepinillo, etc., y probar su posible utilidad en los distintos procesos donde la POD de *Horseradish* es utilizada, para tratar de sustituirla, ya que esta POD es una enzima con alto costo comercial debido a su importación.

*Brassica napus L.* es una hortaliza muy común en nuestro medio y según referencia de otros países<sup>5</sup> contiene una apreciable concentración de POD, lo que nos permitirá considerar la posibilidad de usarla como una fuente potencial de esta enzima. Así, se ha encontrado que el extracto crudo de nabo presenta una elevada actividad de POD (9,60 U/mg) comparativamente con otras fuentes vegetales, por lo cual parece ser una fuente alternativa para la obtención de esta enzima<sup>6,7</sup>.

*Raphanus sativus* (rabanito o rábano común) es una hortaliza, cuya raíz es carnosa, jugosa y de sabor picante que se consume cruda o cocida<sup>5</sup>; presenta 4 fracciones activas de POD (por



cromatografía de exclusión molecular), siendo la cuarta la más importante ya que presenta una actividad total de 22 316,43 U con una actividad específica de 8 389,64 U/mg<sup>8</sup>.

*Sechium edule* (caygua chilena, compacta) es una enredadera se cultiva con fines de consumo como hortaliza (fruto) y es un apoyo económico para las familias al comercializarlo en los mercados regionales<sup>5</sup>. Se ha extraído de este fruto 5 fracciones de POD (cromatografía de intercambio catiónico con régimen de elución de gradiente lineal de concentración a pH 4.5), siendo la fracción 4 (F2P) la más importante ya que presenta una actividad total de 7225,02 U/L y una actividad específica de 5.90 U/mg<sup>9</sup>.

Respecto a *Cucumis sativus* (pepinillo, pepino de castilla) una especie que tiene frutos comestibles en ensaladas o en encurtidos, es de suma importancia en la alimentación por su riqueza en vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>5</sub>, C y sales minerales como potasio, fósforo, calcio, sodio, cloro, hierro y magnesio<sup>5</sup>. No se encontró información sobre su potencial de POD, por lo que su estudio en este trabajo es de mucha importancia.

Los objetivos del presente trabajo son: (i) elegir cuál de las hortalizas: *B. napus*, *R. sativus*, *S. edule* y *C. sativus* presenta la peroxidasa con mayor actividad, para, a continuación, purificar parcialmente dicha enzima y (ii) caracterizar bioquímicamente la peroxidasa de especies de hortalizas mediante determinación de su patrón electroforético.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Material biológico.** Se seleccionaron las raíces de *Brassica napus* “nabo”, *Raphanus sativus* “rabanito o rábano común” y frutos de *Sechium edule* “caygua chilena” y *Cucumis sativus* “pepinillo”. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Botánica Sistemática de la Universidad Nacional de Trujillo, para su identificación respectiva.

**Extracción de la Peroxidasa.** Las raíces de nabo y rabanito y frutos de caygua china y pepinillo, previamente seleccionados, todas ellas frescas, fueron analizados el mismo día de su recolección, previamente lavadas con agua destilada para remover cualquier suciedad y materiales extraños y fueron conservados en refrigeración. El extracto crudo se obtuvo por extracción directa de 250 g de nabo en un licuador (Oster), se filtró 2 ó 3 veces al vacío con papel whatman de poro decreciente y finalmente se centrifugó por 10 minutos a 3500 rpm. Luego, el sobrenadante obtenido fue diluido con igual volumen de buffer fosfato 20 mM pH 6.0 y se conservó a 0°C.

**Medición de la actividad de peroxidasa<sup>10</sup>.** Se llevó a cabo en espectrofotómetro a temperatura ambiente (25°C) según el siguiente procedimiento<sup>1</sup>. La solución de enzima (50 µL) fue adicionada a 4 mL de buffer fosfato 10 mM de pH 6,0 conteniendo guayacol (20mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4,4 mM) como sustratos. Se midió los cambios de absorbancia debidos a la oxidación de guayacol por la POD por 2 minutos. La determinación se realizó por triplicado. Una Unidad Enzimática (UE) para POD fue definida como el incremento de una unidad de cambio de absorbancia/minuto bajo condiciones estándares.

**Determinación de proteínas<sup>11</sup>** Se realizó según el método de *Bradford* (1976)

**Efecto de la concentración del sustrato: Guayacol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Se utilizaron diferentes concentraciones de los sustratos: guayacol (5-30 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2-30 mM). Se usaron diferentes rangos de concentración. Los valores obtenidos, fueron transformados mediante gráficos de Lineweaver-Burk para obtener los valores correspondientes de K<sub>M</sub> y V<sub>max</sub>

**Análisis electroforético de peroxidasas en gel de -PAGE-SDS<sup>12, 13</sup>.** Se llevó a cabo en geles verticales de poliacrilamida de 1mm de espesor, empleando cubetas “Mini Protean II” de Biorad. Finalizada la electroforesis, el gel fue teñido en una solución compuesta por: azul de Coomassie R-250 0,2%, metanol 40% y ácido acético 10%. Por último fue decolorado con una solución de metanol-ácido acético-agua (30:10:60). Para la determinación del peso molecular mediante 5-PAGE se utilizó patrones de alto (45-200 kDa) y bajo peso molecular (14.4 - 97.4 kDa) de Biorad. La *electroforesis aniónica*<sup>14</sup> se efectuó a 4°C e intensidad constante (2 mA/pocillo) durante 150



minutos. Mientras que la *electroforesis catiónica*<sup>15</sup>, se realizó utilizando como tampón de corrido ácido acético/b-alanina 0,01 M (pH 4,5). La electroforesis se desarrolló a intensidad constante usando 3 mA/pocillo durante aproximadamente 120 minutos. Posteriormente, ambos geles fueron coloreados con una solución compuesta por bencidina 3,8 mM (en solución alcohólica al 50 %) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 21 mM en tampón acetato de sodio/ácido acético 0,5 M (pH 4,6) a temperatura ambiente, hasta aparición de bandas azules. Seguidamente éstos fueron lavados varias veces con agua destilada, vislumbrándose las bandas que se tornarán de color marrón<sup>16, 17</sup>.

## RESULTADOS

Se encontró que la peroxidasa extraída tanto de la raíz como del fruto del rabanito, *R. sativus*, presentó la mayor actividad (POD), 272 U/g y el del pepinillo, *C. sativus*, la menor (Tabla 1), asimismo, que los valores de los  $K_M$  y  $V_{max}$  de las peroxidasas de las hortalizas examinadas fueron variables (Figs. 1-8), y que la enzima del nabo presentó la mayor cantidad de bandas en el corrido PAGE, con y sin SDS (Figs. 9 y 10

Tabla 1. Actividad de Peroxidasa (POD) de raíces o frutas de diferentes fuentes de hortalizas.

Fuentes	Actividad POD U/g (raíz o fruto)
<i>Brassica napus</i> "nabo"	128,00
<i>Raphanus sativus</i> "rabanito"	272,00
<i>Sechium edule</i> "caigua"	27,20
<i>Cucumis sativus</i> "pepinillo"	12,40

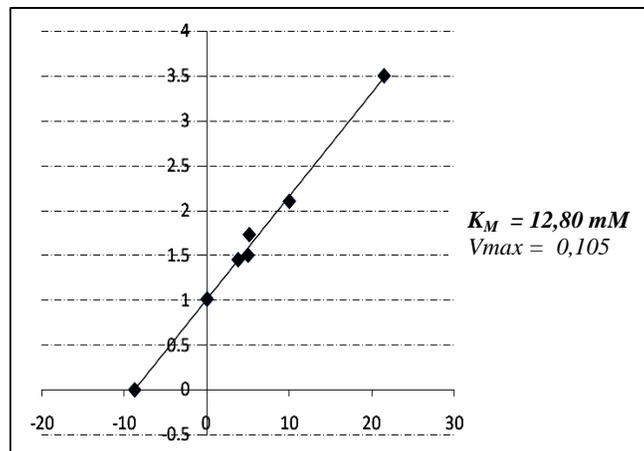




Fig. 1. Efecto de la concentración de guayacol sobre la actividad de Peroxidasa (POD) - extracto crudo de raíz de nabo, *Brassica napus*.

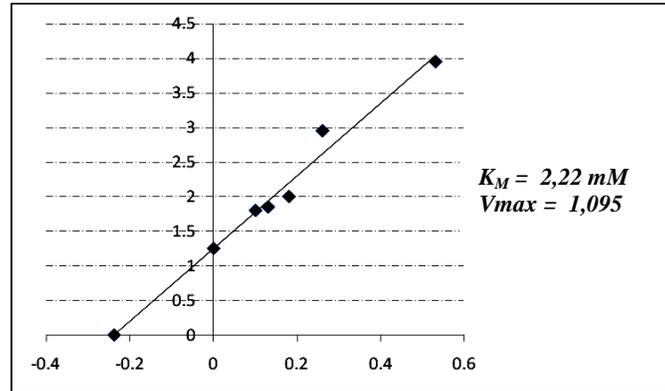


Fig. 2. Efecto de la concentración de  $H_2O_2$  sobre la actividad de Peroxidasa (POD) - extracto crudo de raíz de nabo, *Brassica napus*.

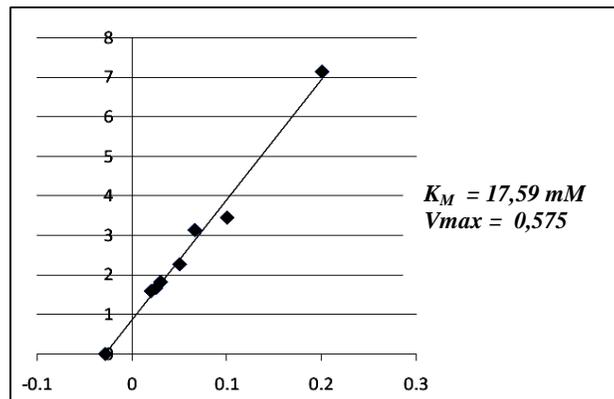


Fig. 3. Efecto de la concentración de guayacol sobre la actividad de Peroxidasa (POD) - extracto crudo de raíz de rabanito, *Raphanus sativus*.

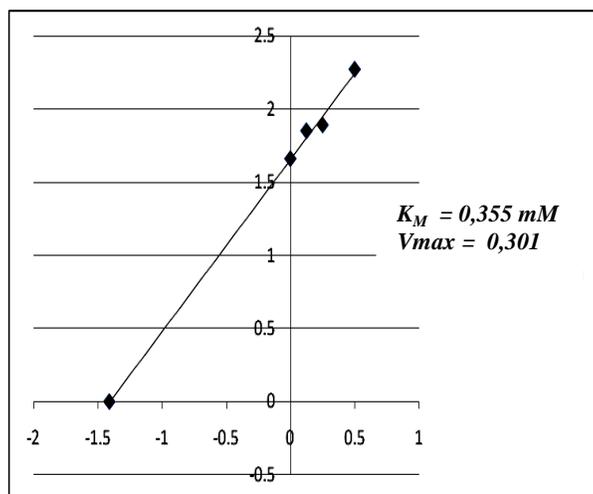


Fig. 4. Efecto de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre la actividad de Peroxidasa (POD) - extracto pre – purificado de rabanito, *Raphanus sativus*.

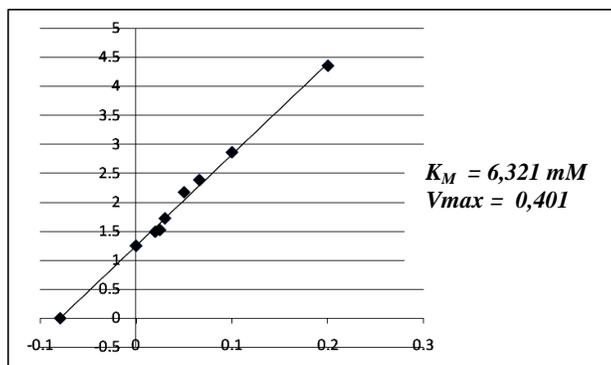


Fig. 5. Efecto de la concentración de guayacol sobre la actividad de Peroxidasa (POD) - extracto crudo de fruto de caigua.

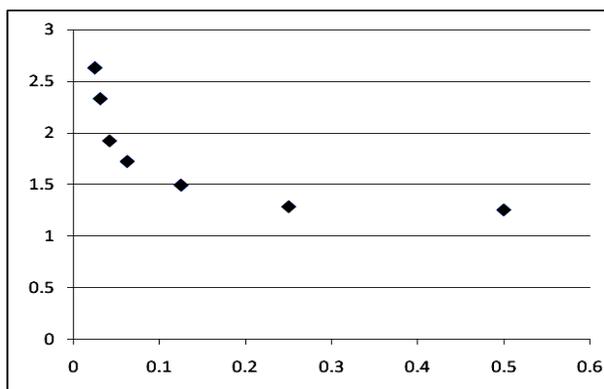




Fig. 6. Efecto de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la actividad de Peroxidasa (POD) - extracto crudo de fruto de caigua.

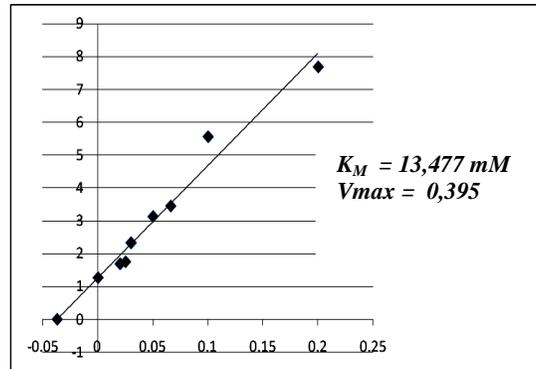


Fig. 7. Efecto de la concentración de guayacol sobre la actividad de Peroxidasa (POD) - extracto crudo de fruto de pepinillo.

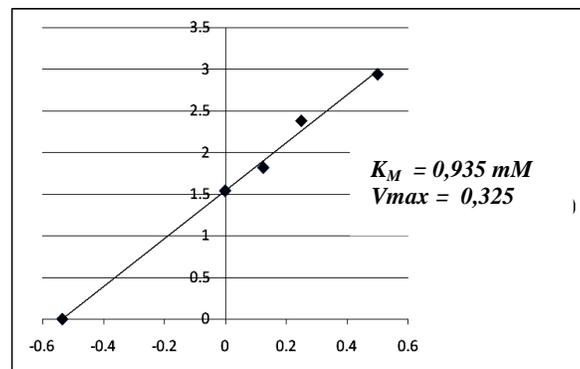


Fig. 8. Efecto de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la actividad de Peroxidasa (POD) - extracto crudo de fruto de pepinillo.

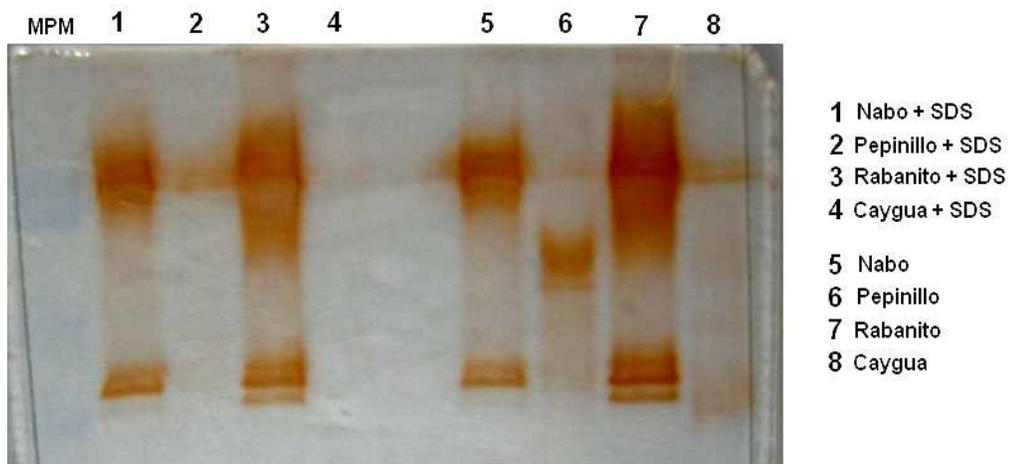




Fig. 9. Patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida con o sin dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), en condiciones reductoras de POD en el extracto crudo de las diferentes fuentes estudiadas, indicando el número y posición de bandas electroforéticas.

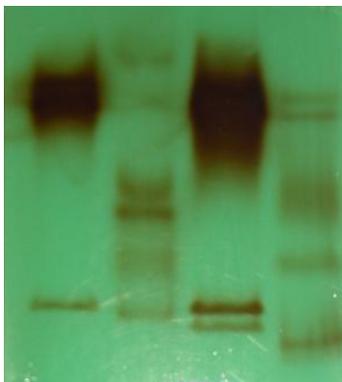


Fig. 10. Patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida con o sin dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), en condiciones reductoras de POD en el extracto crudo de las diferentes fuentes estudiadas, indicando el número y posición de bandas electroforéticas.

## DISCUSIÓN

En el Perú crece una gran variedad de hortalizas y vegetales, cuyo valor biológico y bioquímico aún no ha sido estudiado, en el intento de evaluar fuentes alternativas de peroxidasa a fin de lograr la implementación en nuestro medio de pruebas de tipo enzimático a partir de insumos locales y, dado que el rábano es un hortaliza existente y cultivable cuyo contenido de peroxidasa ya ha sido comprobado. Se logró la pre-purificación de peroxidasa a partir de cuatro fuentes vegetales: *B. napus*, “nabo”, *R. sativus* “rabanito”, *S. edule* “caigua china” y *C. sativus* “pepinillo”.

Cabe destacar que la relación de proteína extraída/actividad de la POD puede variar, si se utiliza acetona dentro del proceso de extracción, debido a que podría ocurrir una reacción entre el reactivo de Bradford y los polifenoles presentes en el material vegetal, esto implica la importancia de realizar tratamientos con acetona a fin de retirar estos compuestos fenólicos que interfieren en la determinación de proteínas<sup>18</sup>.

Con relación a los diferentes valores de  $K_M$  y  $V_{max}$  de los diferentes extractos de la POD pre-purificados de los cuatro vegetales: nabo, rabanito, caigua y pepinillo; los valores de estas constantes varían de acuerdo al sustrato utilizado: en el caso de la POD del nabo para el guayacol el valor del  $K_M$  fue de 12,80 mM y  $V_{max}$  0,105 abs/min/g y para el  $H_2O_2$  fue de 2,22 mM – 1,095 abs/min/g; la POD del rabanito arrojó valores para el guayacol de  $K_M$  17,59 mM y  $V_{max}$  0,575 abs/min/g y para el  $H_2O_2$  fue de 0,355 mM – 0,301 abs/min/g; en el caso de la POD de caigua para el guayacol el valor del  $K_M$  fue de 6,321 mM y  $V_{max}$  0,401 abs/min/g y para el  $H_2O_2$  no hay valores por la saturación presentada; por último la POD de pepinillo arroja valores para el guayacol de  $K_M$  13,477 mM y  $V_{max}$  0,395 abs/min/g y para el  $H_2O_2$  fue de 0,935 mM – 0,325 abs/min/g. Esto se explica por el hecho de que las PODs son enzimas que degradan el  $H_2O_2$  con la presencia de aceptor, en este caso el Guayacol, pero éste a su vez puede servir de sustrato cuando se emplean mayores concentraciones de éste, manteniendo constante y baja la concentración de  $H_2O_2$ .

Se ha encontrado que a valores superiores a 15 mM de  $H_2O_2$  puede ocurrir inhibición en la actividad de la POD, lo mismo ocurre con el incremento de la concentración del guayacol así, existen reportes en los que se muestra que el guayacol puede llegar a inhibir esta enzima. Así, para una iso-POD de arveja se indica que su actividad se inhibe a concentraciones de guayacol superiores a 24 mM y para otras dos iso-POD la inhibición se da a valores mayores a 40 mM. De otro lado, el efecto inhibitorio de  $H_2O_2$  sobre la actividad de POD encontrado en este trabajo ha sido



descrito en otros reportes y puede estar relacionado con el efecto oxidante de este compuesto sobre algunos aminoácidos del sitio activo. Para POD extraída de corteza de pitaya amarilla se reporta inhibición en su actividad por encima de 40 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En un ensayo de purificación de POD de arveja se encontró que las isoenzimas son inactivadas a concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por encima de 24 y 32 mM, dependiendo de la iso-POD<sup>18</sup>.

Respecto a los resultados bioquímicos obtenidos del análisis de los sistemas enzimáticos de peroxidasas, revelaron variaciones en los patrones electroforéticos. En el enzimograma donde se corrió el extracto crudo de POD + SDS, se observa en nabo 4 bandas, en pepinillo 3 bandas, en rabanito 5 bandas en caigua 1 banda. En el enzimograma donde se corrió solamente el extracto crudo de POD, se observa también 4 bandas para nabo, 4 para pepinillo y 5 bandas para rabanito y caigua, respectivamente. Se observa también la presencia de bandas claras y bandas intensas, todas ellas en el rango de peso molecular bajo entre 80,660 y mayor igual a 103,035 Daltons y otras entre 28,829 y 36,545 Daltons (Prestained SDS-PAGE standards, BIO\_RAD).

Las bandas encontradas en el extracto crudo POD de nabo guarda relación con las que se reporta en Enzyme Database – BRENDA un número máximo de 5 isoenzimas, no reportándose isoenzimas para las peroxidasas de las otras fuentes vegetales utilizadas en el presente trabajo. Las bandas que migran a la misma distancia indicarían que presentan homología en estructura y función molecular y una distancia de migración diferente necesariamente correspondería a otra estructura molecular de POD (isoenzimas).

Este trabajo constituye una primera aproximación al estudio de los patrones electroforéticos de diversas fuentes de POD, el que en el futuro, debería complementarse con aspectos moleculares de las isoenzimas.

## CONCLUSIÓN

El extracto crudo de Peroxidasa de raíz de rabanito presenta mayor actividad que las otras fuentes vegetales estudiadas; los extractos crudos de Peroxidasa de raíz de nabo y de fruto de pepinillo presentan valores de  $K_M$  y  $V_{máx}$  muy próximos; en tanto el extracto crudo de Peroxidasa de raíz de rabanito presenta un mayor  $K_M$  y la POD de nabo presenta siete isoenzimas reveladas por electroforesis en PAGE, cuatro fracciones a pH 4,5 y tres fracciones a pH 8,3.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Banci, L. Structural properties of peroxidases, *J. Biotechnol.* **53** (1997) 253-263.
2. Gazaryan, I.G., Chubar, T.A., Ignatenko, O.V., Mareeva, E.A., Orlova, M.A., Kapeliuch, Y.L., Savitsky, P.A., Rojkova, A.M., Tishkov, V.I. Tryptophanless recombinant horseradish peroxidase: stability and catalytic properties. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **262**(1) (1999) 297-301.
3. Tabatabaie M.; Khaleghparast Sh.; Monsef HR. Purification and some partial characterization of peroxidase isoenzyme from *Brassica oleracea capitata L.* *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran.* 2002. **13** (2): 107 – 112.
4. Sakharov IY.; Bautista AG.; Sakharova IV.; Rojas A.; Pletjuschkino YO. Peroxidasa de Plantas Tropicales. *Rev. Colombiana de Química.* 1999. **28** (1): 97 – 106
5. Mostacero J.; Mejía F.; Gamarra O. *Fanerógamas del Perú: Taxonomía, Utilidad y Ecogeografía.* Edit Concytec, Trujillo-Perú. 2009. 1331 pp
6. Duarte-Vázquez, MA. Purificación, caracterización bioquímica y estudios de cristalización de peroxidasa de nabo. PROPAC, UAQ, Querétaro, (Méjico). 2002. 4pp
7. Mejía CL.; Regalado C.; García B. Purificación de peroxidasa de nabo. Facultad de Química, Departamento de Investigación y Postgrado en Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, Mexico. 2004. 5pp



8. Lema C.; Carbajal R.; Pantoja MR.; Sánchez L. Evaluación de la especie *Raphanus sativus* como fuente alternativa para la purificación de peroxidasa y su utilización en pruebas de inmunodiagnóstico. BIOFARBO, 1995. Vol IV, 5 – 13.
9. Villegas MLO. Utilización de la peroxidasa de chayote (*Sechium edule* (jacq.) sw.) en el tratamiento de aguas contaminadas con sustancias orgánicas tóxicas. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Ambientales, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2003. 155pp
10. Civello PM, Martínez GA, Chaves AR, Añon MC. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch): Partial purification and determination of some properties. J Agric Food Chem 1995; 43 (10): 2596-2601.
11. Bradford MM. A rapid and sensitive Method for the quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochem 1976; 72: 248-254.
12. Davis B. Disc electrophoresis - II. Method and application to human serum proteins. Gel Electrophoresis. Ann New York Academy Scien 1964; 121 (2): 405-426.
13. Choi JK, Yoon SH, Hong HY, Choi DK, Yoo GS. A modified Coomassie Blue staining of proteins in polyacrilamide gels with Bismark Brown R. Anal Biochem 1996; 236: 82-84.
14. Sohel Munishwar NGD. Purificación y caracterización de isoenzimas de peroxidasa de nabo raíces indias. J Agric Food Chem 2010; 58 (9): 5545-5552.
15. Tabatabaie M, Khaleghparast SH, Monsef HR. Purification and some partial characterization of peroxidase isoenzyme from *Brassica oleracea capitata* L. J Scien, Islamic Republic of Iran 2002; 13(2): 107-112.
16. Cáceres IG, De La Jara F, Rodríguez D, Cadena MA. Comparación de patrones electroforéticos de proteínas e isoenzimas en tubérculos sanos y con síntomas de punta morada de siete variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.). Rev Mex Fitopatología 2003; 21(2): 102-108.
17. Agostini E, Hernandez-Ruiz J, Arnao MB, Milrad SR, Tigier HA, Acosta M. A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits". Biotech Appl Biochem 2002; 35(1): 1-7.
18. Welinder KG. Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures and relation to cytochrome c peroxidase. Eur J Biochem 1985; 151: 497-504.