

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Estudios sobre las peroxidasas presentes
en células de
Saccharomyces cerevisiae

M.ª Dolores Eva Valdivia Martínez

Tesis Doctoral



Biblioteca Universitaria de Granada



01162297

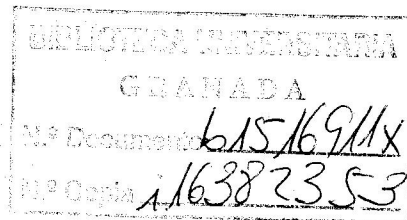
1980

BIBLIOTECA	
FACULTAD DE CIENCIAS	
GRADO	
Estante	10
Tabla	3
Núm.	25



R. 22.790

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA



"ESTUDIOS SOBRE LAS PEROXIDASAS PRESENTES EN
CELULAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE".

M^a Dolores Eva Valdivia Martinez

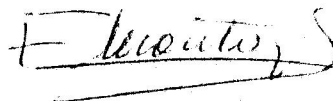
UNIVERSIDAD DE GRANADA

1980

"ESTUDIOS SOBRE LAS PEROXIDASAS PRESENTES EN
CELULAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE"

MEMORIA presentada para aspirar al grado
de Doctor en Ciencias por la Licenciada D^a.
M^a Dolores Eva Valdivia Martinez.

Prof. Dr. D. ENRIQUE MONTOYA GOMEZ
Director de la Tesis



Prof. Dr. D. JOSE M^a ORTEGA RUIZ
Co-director de la Tesis

M^a DOLORES EVA VALDIVIA MARTINEZ
Aspirante al grado de Doctor en Ciencias

Granada, Junio de 1980

Tesis Doctoral dirigida por el Prof. Dr. D. Enrique Montoya Gómez, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Granada y codirigida por el Prof. Dr. D. José M^a - Ortega Ruiz Adjunto de Microbiología de la Universidad de Granada. Fue leída el 15 de Septiembre de 1980, obteniendo la calificación de Sobresaliente "cum laude" ante el Tribunal formado por los profesores Montoya Gómez, Ramos Cormenzana, Sanchez de Medina Contreras, Olivares Pascual y Suarez Ortega.



El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada durante los años 1975 a 1980.

La realización del trabajo experimental ha sido sufragada en parte por una beca de Formación de Personal Investigador durante los años 1975, 1976 y 1977.

Parte de los resultados de esta Tesis han sido presentados en el VI Congreso Nacional de Microbiología (Santiago de Compostela, 1977) y en el XVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica (Murcia 1979).

A Juan

INDICE

	<u>Pag</u>
INTRODUCCION	23
PEROXIDASAS	25
Estructura	27
Cinética de la reacción de las peroxidasas con el agua oxigenada	32
Valoración de las peroxidasas	35
CITOCROMO C PEROXIDASA	41
Estructura	42
Actividad enzimática	47
Interacción entre la citocromo c peroxidasa y el citocromo c.....	49
Biosíntesis de la citocromo c peroxidasa	51
Localización de la citocromo c peroxidasa.....	56
Papel fisiológico de la citocromo c peroxidasa.....	61
OBJETO DEL TRABAJO.....	65
MATERIAL Y METODOS.....	69
1. Microorganismos	71
1.1. Estirpes utilizadas en las experiencias de regulación de la síntesis, localiza- ción e identificación de enzimas con ac- tividad de peroxidasa.....	71

	<u>Pag</u>
1.2. Estirpes utilizadas en las experiencias genéticas.....	72
1.2.1. Estirpes haploides de partida	72
1.2.2. Cigotos obtenidos en cruce entre las estirpes X-3 y R-6.....	72
1.2.3. Descendencia haploide procedente de los tres cigotos obtenidos en cruce entre las estirpes X-3 y R-6.....	72
2. MEDIOS DE CULTIVO.....	74
2.1. Medios de conservación y crecimiento.....	74
2.2. Medio de conjugación (MC).....	75
2.3. Medios de esporulación	75
2.3.1. Medio de preesporulación (MPE).....	75
2.3.2. Medio de esporulación (ME).....	76
2.4. Medios mínimos.....	76
2.4.1. Medios MG.....	77
2.4.2. Medios mínimos suplementados.....	78
2.5. Solución para la inducción de la biosín- tesis de peroxidasa.....	78
3. CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS ESTIR PES DE <u>S. CEREVISIAE</u>	79
3.1. Determinación de la densidad óptica de los cultivos.....	79
3.2. Determinación del peso seco de los cultivos.....	80

	<u>Pag</u>
4. OBTENCION DE HOMOGENEIZADOS CELU LARES DE LEVADURA Y SEPARACION DE FRACCIONES SUBCELULARES DE LOS MIS MOS.....	81
4.1. Métodos mecánicos.....	81
4.1.1. Rotura de las paredes celulares por tra tamiento con ultrasonido.....	81
4.1.2. Rotura de las paredes celulares mediante trituration en un homogeneizador de célu las.....	82
4.2. Método enzimático.....	82
4.2.1. Obtención y lisis de esferoplastos.....	84
5. VALORACION DE LA CATALASA.....	86
6. VALORACION DE LA PEROXIDASA.....	87
7. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA EN LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	90
8. TECNICAS EMPLEADAS EN LA SEPARACION Y FRACCIONAMIENTO DE ENZIMAS CON AC- TIVIDAD DE PEROXIDASA.....	93
8.1. Filtración por geles de Sephadex.....	93
8.1.1. Preparación de los geles.....	93
8.1.2. Montaje y preparación de la columna.....	94
8.1.3. Aplicación y elución de la muestra.....	95
8.1.4. Determinación de la densidad óptica de las fracciones eluidas.....	96

	<u>Pag</u>
8.1.5. Medida de la actividad peroxidásica de las fracciones.....	96
8.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	96
8.2.1. Preparación de los geles.....	97
8.2.2. Desarrollo de la electroforesis.....	98
8.2.3. Revelado en los geles de proteínas con actividad peroxidásica.....	100
8.3. Isoelectroenfoque.....	100
8.3.1. Soluciones de los electrodos.....	102
8.3.2. Solución de anfolinas y gradiente de - sacarosa.....	103
8.3.3. Llenado de la columna.....	104
8.3.4. Condiciones de la operación.....	104
8.3.5. Elución de la columna.....	105
8.3.6. Determinación de la actividad peroxidá- sica de las fracciones.....	105
9. TECNICAS EMPLEADAS EN LAS EXPERIEN CIAS GENETICAS.....	106
9.1. Técnica de cruce entre levaduras haploides y selección de los cigotos prototrofos.....	106
9.1.1. Técnica de cruce.....	106
9.1.2. Aislamiento de los cigotos.....	107
9.2. Esporulación de los cigotos diploides y ob- tención y selección de ascosporas.....	108
9.2.1. Preesporulación.....	108
9.2.2. Esporulación.....	108

	<u>Pag</u>
9.2.3. Rotura de las ascas y aislamiento de las ascosporas.....	109
9.3. Determinación del genotipo de las ascos poras aisladas.....	110
9.3.1. Determinación de la capacidad respira- toria.....	111
9.3.2. Determinación de la distribución de los marcadores nucleares.....	111
9.3.3. Determinación del contenido en peroxidasa.....	112
 EXPERIENCIAS Y RESULTADOS.....	 113
 1. VALORACION DE LA ACTIVIDAD DE PERO XIDASA EN <u>S. CEREVISIAE</u>	 115
1.1. Valoración de la actividad peroxidásica en homogeneizados celulares y en extractos - libres de células obtenidos por tratamiento con ultrasonido.....	115
1.1.1. Aumento de la concentración del sustrato en la mezcla de reacción.....	116
1.1.2. Inactivación de la catalasa y la peroxi- dasa por el 3-amino-1,2,4-triazol (AT).....	118
a.- Adición del AT al medio de cultivo.....	118
b.- Adición del AT a la mezcla de reacción.....	121
c.- Adición del AT al homogeneizado celular.....	122



	<u>Pag</u>
1.1.2.1. Influencia de la concentración relativa de homogeneizado celular y de AT en su acción inactivadora de la catalasa y peroxidasa.....	124
2. CINETICA DE LIBERACION DE PEROXIDASA.....	128
2.1. Cinética de liberación de peroxidasa por tratamiento de suspensiones celulares con ultrasonido	128
2.2. Cinética de liberación de la peroxidasa por ruptura de suspensiones celulares con un - homogeneizador.....	131
3. LOCALIZACION INTRACELULAR DE LA PEROXIDASA.....	134
3.1. Localización intracelular de la peroxidasa en las fracciones subcelulares obtenidas por rotura de las células en un homogeneizador.....	134
3.2. Localización intracelular de la peroxidasa en las fracciones subcelulares obtenidas por rotura de esferoplastos mediante choque osmótico.....	136
4. SEPARACION DE ISOENZIMAS EN PEROXIDASA.....	138
4.1. Filtración por columnas de Sephadex.....	138
4.1.1. Filtración por Sephadex G-100.....	138
4.1.2. Filtración por Sephadex G-150 de extractos solubilizados obtenidos a partir de - distintas fracciones subcelulares.....	142
4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	145

	<u>Pag</u>
4.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida de extractos libres de células.....	146
4.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida de extractos solubilizados obtenidos a par- tir de distintas fracciones subcelulares.....	150
4.3. Isoelectroenfoque.....	152
5. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CUL- TIVO EN LA ACTIVIDAD PEROXIDASICA DE LAS CELULAS.....	152
5.1. Evolución de la actividad peroxidásica durante el ciclo de crecimiento de las levaduras en - medios de cultivo con glucosa al 1% como <u>fuen</u> te de carbono.....	153
5.1.1. Evolución del contenido en peroxidasa en - estirpes normales respiratorias.....	153
5.1.2. Evolución del contenido en peroxidasa en - estirpes deficientes respiratorias.....	156
5.2. Influencia de la concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo sobre el contenido en peroxidasa de las células.....	158
5.3. Evolución de la actividad peroxidásica a lo largo del ciclo de crecimiento de levaduras en medios de cultivo con sustratos no fer- mentables como fuente de carbono.....	159
6. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE LA PEROXIDASA.....	167

	<u>Pag</u>
6.1. Represión de la biosíntesis de la peroxidasa por cultivo de las células en condiciones de alta concentración de glucosa e hipoxia.....	167
6.2. Evolución del contenido en peroxidasa de células cultivadas en agitación en presencia de glucosa a alta concentración.....	173
6.3. Inducción de la biosíntesis de la peroxidasa en cultivos reprimidos.....	176
6.3.1. Inducción de la biosíntesis de la peroxidasa en un medio completo.....	176
6.3.2. Inducción de la biosíntesis de la peroxidasa en una solución de sales minerales sin fuente de nitrógeno.....	177
6.3.2.1. Inducción de la biosíntesis de la peroxidasa en una estirpe normal respiratoria.....	177
6.3.2.2. Inducción de la peroxidasa en estirpes deficientes respiratorias.....	182
6.4. Efecto de la cicloheximida sobre la biosíntesis de la peroxidasa.....	184
6.4.1. Efecto de la cicloheximida a distintas concentraciones sobre el crecimiento de <u>S.cerevisiae</u>	185
6.4.2. Efecto de la cicloheximida sobre la inducción de la peroxidasa en células de <u>S.cerevisiae</u>	185

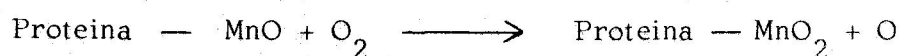
	<u>Pag</u>
6.4.3. Efecto de cicloheximida sobre la inducción de peroxidasa en presencia de protoporfirina y hemina.....	189
7. EXPERIENCIAS GENETICAS.....	192
7.1. Determinación de las condiciones óptimas para determinar el contenido en peroxidasa de las estirpes.....	192
7.2. Obtención de cigotos diploides.....	193
7.3. Esporulación de los cigotos diploides y obtención de las ascosporas.....	199
7.4. Influencia de la adenina en los medios de cultivo sobre la biosíntesis de peroxidasa en las estirpes auxotrofas para esta base.....	202
7.5. Determinación del contenido en peroxidasa en los cigotos y ascosporas aislados del cruce entre las estirpes X-3 y R-6 cultivados en presencia de adenina.....	205
DISCUSION.....	209
CONCLUSIONES.....	223
BIBLIOGRAFIA.....	229

INTRODUCCION

PEROXIDASAS

Los primeros conocimientos sobre las peroxidasas datan del año 1855 cuando Schoenbein (citado por Paul, 1963) observó que los extractos de algunas setas y de tejidos animales eran capaces, cuando se ponían en contacto con el aire, de provocar el desarrollo de un color azul en las soluciones de guayacol semejante al producido por algunos oxidantes químicos; igualmente estos extractos eran capaces de utilizar los peróxidos de hidrógeno para realizar la oxidación del guayacol. Schoenbein supuso que estos extractos eran capaces de activar el oxígeno uniéndose a él y descomponiéndolo en oxígeno atómico con gran poder de oxidación.

Bertrand (1897, citado por Paul, 1963), propuso la teoría de que las oxidasas, nombre con el que se denominaban a todos estos preparados, eran enzimas formados por una proteína unida a una molécula de manganeso que podían activar el oxígeno del aire mediante la siguiente reacción:



La teoría de Bertrand fue posteriormente rechazada por Chodat y Bach (1903, citados por Paul, 1963) los cuales observaron que algunos de sus extractos eran incapaces de activar el oxígeno molecular incluso en presencia de Mn. Por lo tanto ellos supusieron que en los extractos había dos enzimas que daban lugar a una reacción acoplada: una oxigenasa la cual activa el oxígeno molecular a peróxido y una peroxidasa la cual era capaz de utilizar el peróxido de hidrógeno. Finalmente Linossier en 1898 (citados por Paul, 1963) consiguió a partir de leucocitos un preparado de peroxidasas libres de oxidasas y demostró que aquellas eran unas enzimas capaces de reaccionar únicamente con los peróxidos.

Los primeros extractos relativamente purificados de peroxidasas fueron obtenidos por Sumner y Howell (1936, citados por Paul, 1963) a partir de la savia de higuera; un año más tarde Keilin y Mann (1937, citados por Paul, 1963) obtenían la peroxidasa de rábano picante basándose en las experiencias de Bach y Chodat (1903, citados por Paul 1963) los cuales habían -

observado que las raíces de esta planta eran muy ricas en peroxidasa.

En años sucesivos se han identificado y purificado un gran número de peroxidases a partir, tanto de fuentes vegetales y animales como de microorganismos, estudiándose sus características estructurales y de funcionamiento.

Estructura

El comienzo de los estudios sobre la estructura y composición química de estas enzimas data de 1931 cuando Kuhn et al (citado por Paul 1963) observaron que en los preparados enzimáticos había una proporcionalidad entre su actividad peroxidásica y la absorción en la banda Soret, lo que hacía suponer la presencia de grupos porfirínicos en la estructura de estas enzimas: Keilin y Mann estudiaron a partir de peroxidasa de rábano picante el espectro de varios de sus derivados y cristalizaron e identificaron protoheminas a partir de estas preparaciones.

Theorell (1942) cristalizó por primera vez la peroxidasa de rábano picante y en 1943 este mismo autor junto con Åkeson cristalaron la lactoperoxidasa que fue posteriormente cristalizada en estado más puro por Polis y Shmukler en (1953). Siguiendo técnicas semejantes a las utilizadas por estos se han aislado peroxidases de una gran variedad de vegetales; caben destacar la de patata (Kondo y Morita, 1952), haba (Morita, 1954), nababo (Yamazaki et al, 1956), rábano (Morita y Kondo, 1954, Morita



y Kameda, 1957) y germen de trigo (Tagawa et al, 1959 y Tagawa y Shin, 1959).

Las peroxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de compuestos reducidos del tipo AH_2 por los peróxidos y pueden así ser consideradas como una especie de deshidrogenasas.

La especificidad de todas las peroxidasas para con su sustrato es muy alta, solo el peróxido de hidrógeno y algunos peróxidos monosustituídos como los peróxidos de metanol y etanol pueden actuar como sustratos; sin embargo, una gran variedad de sustancias químicas pueden actuar como donadores de hidrógeno en la reacción, de modo que la especificidad de las peroxidasas para con éstos es muy amplia, pudiendo actuar como tales tanto donadores naturales como el ferrocitocromo c reducido y el triptófano, como diversos compuestos orgánicos los cuales pueden ser oxidados en presencia de un sustrato adecuado; sin embargo, algunas peroxidasas como la citocromo c peroxidasa de levaduras y la triptófano pirrolasa de hígado actúan casi únicamente sobre un solo tipo de compuestos oxidables, citocromo c y triptófano, respectivamente, mientras que las peroxidasas de plantas son mucho menos específicas en cuanto a los compuestos oxidables.

Actualmente los enzimas con actividad de peroxidasa más conocidos los podemos clasificar de la forma siguiente:

- a) Peroxidasas que contienen hierro en su molécula.
- b) Peroxidasas flavoproteicas.

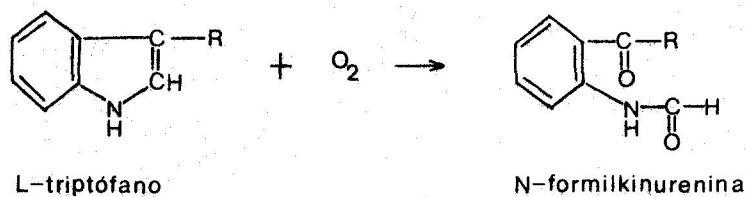
a) Entre las peroxidasas que contienen hierro cabe distinguir las que tienen un grupo protohemo en su molécula y las que poseen grupos hematínicos de color verde o verde peroxidasas.

Las primeras incluyen todas las peroxidasas aisladas de plantas, algunas peroxidasas procedentes de animales, como la triptófano pirrolasa y la yodo peroxidasa y muchas peroxidasas aisladas de microorganismos. Todas ellas se caracterizan por ser inactivadas por la azida sódica y por los cianuros pero a diferencia de las oxidasas no se inactivan por el CO.

Entre las más conocidas se encuentra la peroxidasa de rábano picante que es una hemoproteína de peso molecular 40000 daltons y un PI de 7,2. El porcentaje de hemina es de 1,34 y a la molécula proteínica van unidos varios carbohidratos. Varios autores Theorell (1942), Jermyn y Thomas (1954) Paul (1958) y Tagawa y Shin (1959) han separado distintos componentes con idéntico espectro y actividad enzimática caracterizados como isoenzimas.

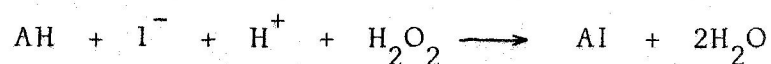
La triptófano pirrolasa, se ha aislado de hígado de mamíferos y de distintas especies de Pseudomonas adaptadas a crecer en triptófano.

Cataliza la oxidación del triptófano en presencia de H_2O_2 a formil kinurenina según la siguiente reacción:



Según Gordon y Rydzziel (1959) la actividad enzimática en el hígado se encuentra en la fracción sedimentable a 11000 xg de un homogeneizado celular; su aparente necesidad de H_2O_2 y su inhibición por la catalasa han hecho pensar que este enzima sea una peroxidasa, aunque otros autores, entre ellos Tanaka y Knox, (1958) la han clasificado como una oxigenasa.

La yodo peroxidasa fue estudiada por primera vez por Serif y Kirkwood (1958) en la saliva de las glándulas submaxilares de rata. Es capaz de catalizar la yodación de la tiro-sina y de otros aceptores de acuerdo con la ecuación siguiente:



De las peroxidasas con hierro en su molécula descritas en microorganismos las más importantes son la citocromo c peroxidasa de levaduras, (Altschul et al, 1940), que fue el primer miembro aislado de este grupo, y la citocromo c peroxidasa de Pseudomonas fluorescens purificada por Lenhoff y Kaplan (1966). Esta última no pudo ser separada del citocromo c, el cual domina completamente en su espectro, ni reacciona con los fenoles ni con el citocromo c de mamíferos lo que hace pensar que esté completamente saturada de citocromo c de Pseudomonas.

Las verdoperoxidasas poseen grupos hematínicos de color verde, y han sido aisladas de animales. La primera que se aisló fue una mieloperoxidasa aislada por Agner (1941) y purificada años después por él mismo (Agner, 1958) a partir de leuco-

citófilos de una infección purulenta; tiene un peso molecular muy elevado, del orden de 149.000, y su punto isoeléctrico - igualmente es muy alto, por encima de pH-10.

Su contenido en Fe es del 0.074% y no posee carbohidratos unidos a su molécula.

La otra verdoperoxidasa más conocida es la lactoperoxidasa aislada y cristalizada por Theorell y Åkeson (1943); su peso molecular es menor que el de la anterior, del orden de 82 a 93000 según distintos autores, su punto isoeléctrico también es - muy alto del orden de 9.6 ; su contenido en Fe es de 0.07 correspondiendo a un átomo de Fe por molécula.

b) El otro gran grupo de peroxidases corresponde a aquellas cuyo grupo prostético lo constituyen flavinas; entre ellas las más conocidas son la peroxidasa de Streptococcus y la glutatión peroxidasa aislada de eritrocitos. Los estreptococos son microorganismos que carecen de peroxidases clásicas y de catalasa, a pesar de ello estos microorganismos no acumulan peróxido de hidrógeno en su metabolismo. Dolin en 1957 purificó a partir del Streptococcus faecalis un enzima capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno, este enzima resultó ser una peroxidasa cuyo grupo prostético es el FAD y cuyo dador fisiológico de hidrógeno es el NADH_2 , siendo mucho menos sensible a los cambios de pH que las hemoperoxidasas. El mecanismo de la reacción de descomposición del H_2O_2 implica - la formación de un complejo ternario flavoproteína - NADH - HOOH .

La glutatión peroxidasa, fue descrita por Mills en - 1957 en individuos acatalásicos y en los cuales la vida media de

la hemoglobina de sus eritrocitos es igual al de los individuos - normales.

Este enzima no es sensible a la azida sódica ni al cianuro lo que hizo suponer desde el principio que fuera una flavo-proteína.

El compuesto fisiológico que actúa como donador de hidrógeno de este enzima es el glutation -SH (GSH) el cual se oxida a GS-SG.

Todas las peroxidasas de plantas purificadas poseen el grupo hemo como grupo prostético mientras que casi todas las - peroxidasas de animales son verdoperoxidasas variando el grupo prostético de unas a otras.

Esta gran heterogeneidad en la composición, estructura y características físico químicas de las peroxidasas probablemente esté relacionada con su variada función biológica, ya que pueden intervenir no solamente en la descomposición de H_2O_2 producida en las células y cuya acumulación resulta tóxica para las mismas, sino también en otras muchas funciones; habiéndose llegado incluso a sugerir que un enzima con actividad de peroxidasa pudiera tener otros centros activos capaces de desarrollar otras - actividades enzimáticas.

Cinética de la reacción de las peroxidasas con el agua oxigenada

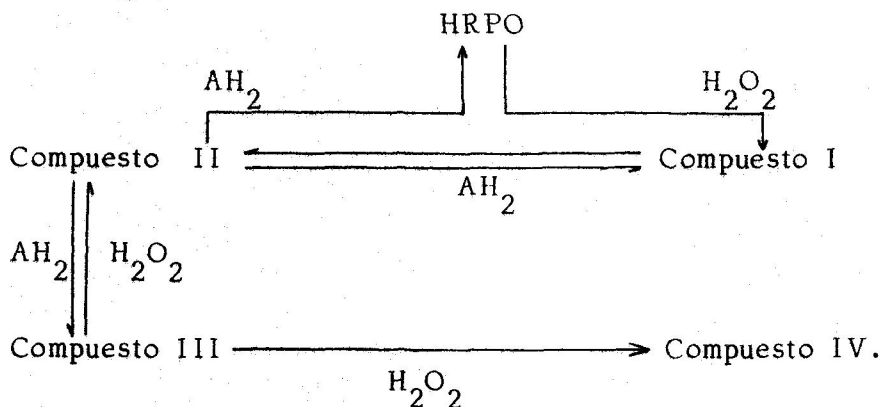
La adición de agua oxigenada a un extracto de peroxidasa de rábano picante (HRPO) da lugar a una interacción entre el enzima y el sustrato que se refleja en los cambios de color ob-

servados en el enzima; así la adición de un ligero exceso de agua oxigenada a la peroxidasa da lugar a un cambio de color de marrón a rojo pálido atribuido a la formación de un compuesto conocido como "compuesto II". Cuando las preparaciones enzimáticas están muy purificadas primeramente aparece un compuesto color verde - oliva conocido como "compuesto I".

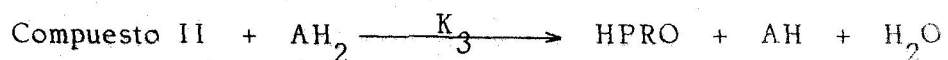
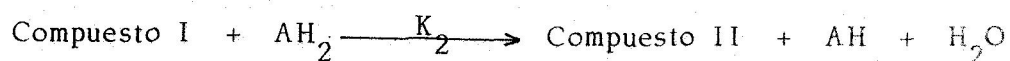
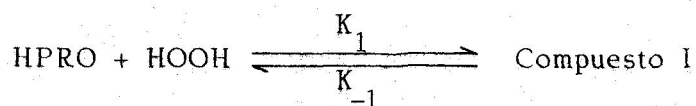
A concentraciones más elevadas de agua oxigenada - aparece un color verde brillante atribuido al compuesto III; finalmente en condiciones en que el compuesto III se mantiene, después de una prolongada exposición al agua oxigenada aparece un color verde atribuido a un compuesto IV. Este representa un cambio - irreversible de la molécula del enzima probablemente por un ataque del agua oxigenada sobre el anillo porfirínico.

Los compuestos, I II y III son reversibles y la peroxidasa puede volver a su estructura primitiva si a la mezcla - se le añade una sustancia oxidable capaz de actuar como donador de electrones (AH_2).

Las relaciones entre estos compuestos pueden ser esquematizadas de la siguiente forma:



Por tanto la reducción de una molécula de agua oxigenada va seguida de dos etapas sucesivas de oxidación cuyas constantes de reacción están definidas en las siguientes ecuaciones:



La velocidad de formación del compuesto I varía con el sustrato utilizado, así K_1 depende del sustrato pero no se afecta por modificaciones en el grupo prostético del enzima.

Los valores de las constantes de segundo orden K_2 y K_3 dependen de la naturaleza del agente reductor (AH_2); con muchos agentes reductores el valor de K_3 es muy pequeño con relación a K_1 y de esta forma la reacción entre el compuesto II y el agente reductor actúa como limitante de todo el sistema; por tanto en las reacciones colorimétricas de valoración es necesario establecer unas condiciones para que estén equilibradas las constantes K_1 y K_3 .

Valoración de las peroxidasas

Como ya hemos dicho, de acuerdo con Chance (1949) la especificidad de todas las peroxidasas para con su sustrato es muy alta; sin embargo su especificidad hacia los donadores de electrones es mucho más amplia. Esto ha hecho que aunque la medida de la actividad de las peroxidasas se pueda hacer midiendo la velocidad de desaparición del sustrato o la velocidad de oxidación del donador de electrones hayan sido estas últimas medidas las más utilizadas en la valoración.

Como donadores de electrones en el sistema peroxidasa-peróxido de hidrógeno, se han descrito una gran cantidad de sustancias tales como mono y polifenoles, aminofenoles, diaminas, leucobases, indofenoles, aminoácidos con grupos reactivos, ácido ascórbico, etc. Todos estos ensayos están basados en un cambio de color del donador al oxidarse.

La formación de productos de oxidación coloreados por parte de oxidasas y peroxidasas fue empleada, durante el siglo XIX para su estudio cualitativo. Los métodos cuantitativos para la valoración de estas enzimas no fueron introducidos hasta el siglo XX cuando se comenzó el aislamiento y purificación de los mismos, ya que hasta entonces ni siquiera se había hecho una clara distinción entre las oxidasas y las peroxidasas; así muchos de los métodos en los que se creía valorar peroxidasas lo que se estimaba en realidad eran oxidasas, e incluso muchas reacciones de oxidación supuestas específicas de éstas, eran dadas también por las

primeras debido a la presencia de trazas de H_2O_2 en el medio.

Actualmente se ha comprobado que casi todas las sustancias que actúan como donadores de electrones en el sistema peroxidasa-peróxido de hidrógeno, son también en mayor o menor grado oxidadas por el oxígeno molecular en presencia de oxidasas, y por lo tanto interfieren en la medida de aquellas.

Hasta hoy se ha prestado muy poca atención a esta interferencia; Bokuchava (1948) sugirió utilizar una atmósfera inerte, pero esto no excluye la posibilidad de producción de O_2 por los tejidos o por los enzimas presentes en los extractos celulares especialmente la catalasa; otra solución propuesta consiste en la utilización de inhibidores específicos de la oxidasa, tales como el monóxido de carbono, o bien la determinación de la concentración de sustrato residual evitando así la interferencia con la oxidasa en cuanto al donador de electrones se refiere; sin embargo, hay que tener en cuenta que muchas oxidasas producen agua oxigenada y que la catalasa si está presente puede producir una destrucción del sustrato no atribuible a la actividad de la peroxidasa; en este caso la actividad de la catalasa puede ser inhibida o el agua oxigenada sustituida por otro sustrato como el metanol-OO-H.

Como inhibidores de la catalasa usados para la valoración de la peroxidasa en homogeneizados celulares se han descrito los siguientes:

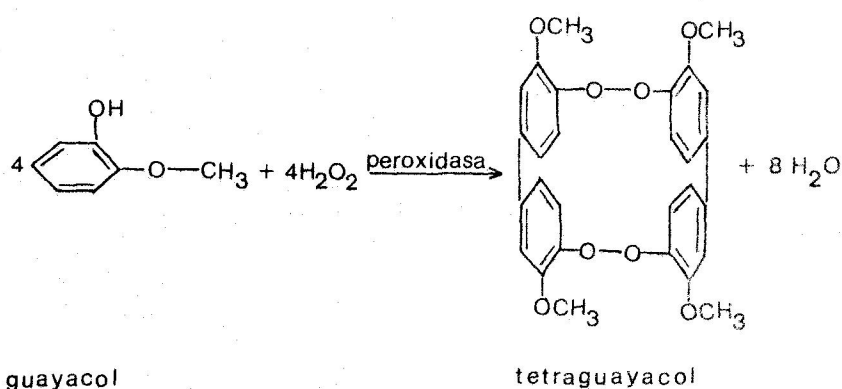
Balls y Hale (1933, citados por Maehly, 1954), Bancroft y Elliott (1934, citados por Maehly, 1954) introdujeron el uso del pirogalol, mientras Morris y Lineweaver (1946) utilizaron el -

guayacol en sus valoraciones; Bokuchava et al (1948) en sus estudios sobre la oxidasa del té utilizaron el pirogalol en presencia de 1 M de NO_3Na consiguiendo una inhibición de la catalasa del 98% al 100% sin afectar la actividad de las peroxidases. Finalmente Margoliash et al (1960) y Margoliash y Novogrodsky (1960), demostraron que el 3-amino-1, 2, 4-triazol produce al ser inyectado en ratones una inactivación irreversible de la catalasa hepática, e igualmente Chance (experimentos no publicados) ha utilizado la azida sódica como inactivador de la catalasa aunque ninguno de ellos ha estudiado el efecto que estas sustancias tienen sobre la peroxidasa, sólo Morita (1954) ha comprobado el efecto inactivador de esta última sobre las peroxidases de haba y rábano.

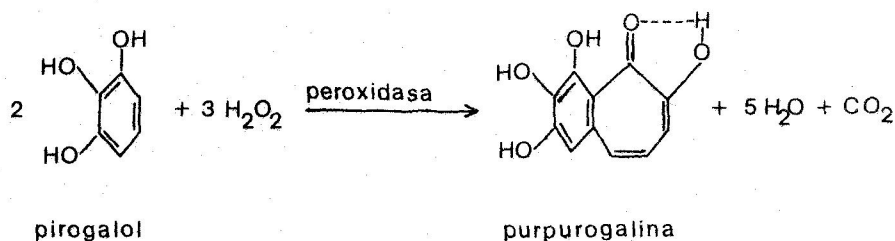
En cuanto a la utilización para la valoración de la peroxidasa de otros sustratos distintos del agua oxigenada, Chance (1949) demostró que aunque los peróxidos de hidrógeno monometilados pueden actuar como sustratos de la catalasa y de la peroxidasa, no pueden actuar como donadores de electrones frente a la catalasa lo cual permitió a Smith (1954) medir la peroxidasa de extractos de levadura en presencia de catalasa utilizando metanol $-\text{O}-\text{O}-\text{H}$ como sustrato.

Entre los donadores de electrones más frecuentemente utilizados para la valoración de las peroxidases mediante las medidas espectrofotométricas de aparición de color en los productos oxidados, caben destacar en primer lugar el guayacol. Esta sustancia fue usada por primera vez por Lepinois (1899, citado por Maehly, 1954) habiéndose hecho desde entonces muchas modificacio-

nes al método inicial que en esencia consiste en la oxidación del catecol monometilester a tetra guayacol por el agua oxigenada en presencia de peroxidasa. Esta oxidación da lugar a la aparición de un color rojo ladrillo que comienza a desaparecer pocos minutos - despues de su formación.



Otro donador de electrones ampliamente utilizado en la valoración de las peroxidasa es el pirogalol. La oxidación de este compuesto por el agua oxigenada en presencia de peroxidasa da lugar a la purpurogalina, sustancia de color naranja para la que Barltrop y Nicholson (1948) propusieron la siguiente fórmula:



A partir de 2 moles de pirogalol se forma un mol de purpurogalina y se desprende un mol de CO_2 ; la medida de cualquiera de los dos productos puede servir como base para un ensayo cuantitativo de la actividad en peroxidasa.

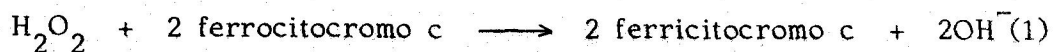
La determinación colorimétrica de la purpuro galina fue introducida por Willstätter y Stoll en 1917 (citados por Maehly, 1954) en un publicación clásica en la cual definieron una unidad de actividad de peroxidasa, el Pz (Purpurogallinzahl), como el número de miligramos de purpurogalina formada por la acción de 1 mg de peroxidasa durante 5 minutos a 20°C , en un medio con 5 g de pirogalol y 50 mg de agua oxigenada, en 2 litros de agua. Igualmente estos mismos autores introdujeron la unidad de peroxidasa Pe (Peroxydasseinheit) que es el número de gramos de purpurogalina producidos por el peso total de una preparación enzimática bajo las condiciones antes mencionadas.

Posteriormente se comprobó que el Pz de una misma preparación enzimática muestra amplias variaciones dependiendo de las condiciones experimentales tales como el pH, concentración de agua oxigenada, y del volumen y concentración del tampón. Así Chance (1949, 1953) demostró que la purpurogalina se forma a una velocidad alta incluso después de que el compuesto II haya desaparecido. El valor de K_3 calculado para la cinética de desaparición del compuesto II es considerablemente mayor que el obtenido para la velocidad de aparición de la purpurogalina. Por tanto es evidente que la determinación del número de purpurogalina no refleja la actividad en peroxidasa de una muestra sino una mezcla

más compleja de reacciones. A pesar de ello la actividad en peroxidasa de una muestra ha sido tradicionalmente expresada en unidades Pz aunque debido a la poca reproducibilidad, este método ha sido desplazado por el del guayacol u otros más fácilmente reproducibles como es la valoración con o-dianisidina como donador de electrones (Bjorksten, 1968 y Heimann y Wisser, 1968). Para propósitos especiales se han utilizado otros donadores tales como la leucobase del verde malaquita, Czyhlarz y Furth (1907, citados por Maehly, 1954); el ácido ascórbico, Chance (1949), Nelson y Dawson (1946), y Purr (1950); la mesidina Chapman y Saunders (1941); citocromo c Altschul et al (1940), Chance, (1951) y George (1953); la bencidina Madelung (1911, citado por Maehly, 1954); la fenoltaleina, dehidrovainillina, el ácido paraminobenzoico, la dihidrofenilalanina etc.

CITOCROMO C PEROXIDASA

La citocromo c peroxidasa de levaduras, o ferrocitocromo c peróxido de hidrógeno óxido reductasa (E. C. 1. 11. 1. 5.), cataliza la reacción del ferrocitocromo c a ferricitocromo c en presencia de peróxido de hidrógeno según la siguiente reacción:



Este enzima fue descrito por primera vez por Altschul et al (1940). Estos investigadores lo identificaron primero - como una citocromo c oxidasa soluble de levaduras, pero dos años más tarde obtuvieron una preparación purificada del mismo y comprobaron que reaccionaba estequiométricamente con el agua oxigenada, dando un complejo de color con un espectro de absorción semejante al del compuesto II de la peroxidasa de rábano picante (Abrams et al 1942). Esta preparación era muy inestable y se inactivaba durante la diálisis y el almacenamiento a la vez que estaba contaminada con hematina enzimáticamente inactiva.

Desde entonces, muchos investigadores se han dedicado al estudio de este enzima así como a la purificación del mismo. Entre los pioneros en este campo cabe destacar a Chance - (1949, 1951, 1952), George (1953) y Nicholls (1965), los cuales llegaron a la conclusión de que este enzima es semejante a las demás peroxidases que poseen grupo hemo en su molécula diferenciándose únicamente en cuanto a su especificidad por el donador

de electrones. En 1965 Yonetani y Ray (1965) describieron un nuevo método cromatográfico para su purificación y obtuvieron una preparación altamente purificada de la citocromo c peroxidasa; al año siguiente el propio Yonetani et al (1966) consiguió cristalizar este enzima mediante diálisis isoelectrica. Independientemente Ellfolk en 1967, obtuvo tambien una preparación cristalizada de la citocromo c peroxidasa. Estas preparaciones cristalizadas del enzima han permitido estudiar sus características moleculares y sus propiedades funcionales.

Estructura

La citocromo c peroxidasa tiene un peso molecular que según Ellfolk (1967) en base a su constante de sedimentación 3.55 S, constante de difusión 9.44 F y volumen específico 0.733 ml/g, es de 34.100 daltons.

Este enzima tiene como grupo prostético una protoporfirina IX férrica la cual no está unida covalentemente al apoenzima, sino que, de acuerdo con Leonard y Yonetani (1974), esta unión se realiza por medio de fuerzas hidrofóbicas en dos etapas sucesivas en las que el átomo de hierro y las cadenas laterales de ácido propiónico son esenciales (Asakura et al 1974).

El apoenzima es una proteína ácida cuyo punto isoelectrico para el único enzima descrito es de 5.0 a 5.2 y está constituida por 272 aminoácidos.

Al contrario de otras peroxidases vegetales, la ci

citocromo c peroxidasa carece de hidratos de carbono unidos a su molécula.

Yonetani (1967) consiguió disociar de forma reversible al holoenzima en protohemo y apoenzima, el cual posteriormente unió con otras porfirinas y metaloporfirinas para formar holoenzimas sintéticos que contiene grupos prostéticos distintos del natural.

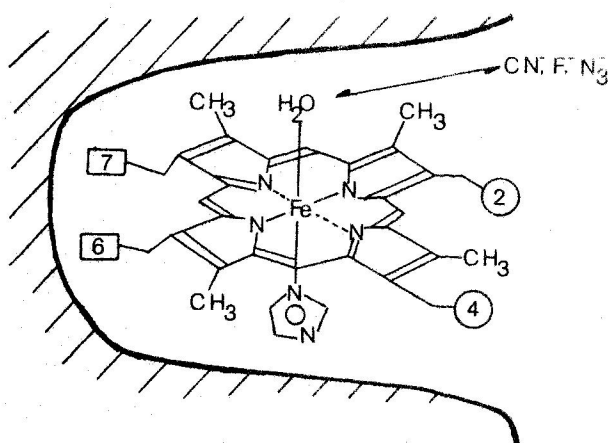
Así, cuando Yonetani y Asakura (1968, 1969) sustituyeron el hierro del grupo hemo por manganeso obtuvieron una citocromo c peroxidasa artificial activa; sin embargo, cuando esta misma sustitución se hizo sobre la mioglobina o la hemoglobina se obtuvieron proteínas artificiales incapaces de transportar oxígeno (Yonetani y Asakura, 1969, Yonetani et al 1970, Waterman y Yonetani, 1970). Por el contrario, según Hoffman y Petering (1970) y Yonetani y Yamamoto (1974), la sustitución de hierro por cobalto produce mioglobinas y hemoglobinas activas capaces de transportar oxígeno, y citocromo c peroxidases artificiales inactivas (Yonetani et al, 1974). Estas observaciones indican que la naturaleza química de la apoproteína y el modo de su interacción con el grupo prostético controlan las características físicas y químicas de éste en la holohemoproteína.

En el caso de la citocromo c peroxidasa, ¿Cómo se realiza esta interacción? Las observaciones de Yonetani y Asakura (1968), Asakura y Yonetani (1969) y Asakura et al (1969), revelan que la modificación química de las cadenas laterales del grupo vinilo situadas en posiciones 2 y 4 del anillo tetrapirrólico -



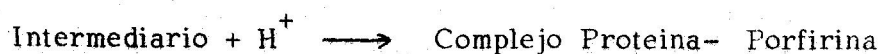
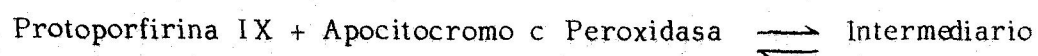
no afectan a la afinidad de éste por el apoenzima ni a la actividad enzimática del holoenzima; por el contrario la modificación de las cadenas laterales de ácido propiónico situadas en posiciones 6 y 7 producen una gran reducción tanto en la actividad enzimática, como en la afinidad por el apoenzima.

Sin embargo, en la hemoglobina y la mioglobina - Rossi-Fanelli et al (1964) y Sugita y Yonegama (1971), pusieron - de manifiesto que la modificación de las cadenas laterales de ácido propiónico del grupo protohemo en posición 6 y 7 no tiene efecto apreciable sobre la afinidad por el oxígeno de estas 2 hemoproteínas, mientras que la modificación de las cadenas en posición 2 y 4 sí influyen. Puesto que según Kendrew (1962) y Perutz (1965), las 2 cadenas de ácido propiónico en posición 6 y 7 del protohemo estarían dispuestas hacia el exterior en las moléculas de mioglobina y hemoglobina, puede esperarse que el grupo hemo de la citocromo c peroxidasa esté embebido en dirección opuesta, es decir que las cadenas laterales en posición 2 y 4 están expuestas al exterior mientras que las cadenas de ácido propiónico en posición 6 y 7 se orienten hacia el interior de la molécula en la citocromo c peroxidasa, según el siguiente esquema:



Este esquema ha sido propuesto por Yonetani (1976), ahora bien, Poulas et al (1978) postulan que las cadenas de ácido propiónico en posición 6 y 7 están orientadas hacia la superficie de la molécula en igual forma que en otras moléculas hemoproteínicas.

La reacción entre la protoporfirina IX y la apocitocromo c peroxidasa se realiza según Asakura et al (1974) en dos etapas que pueden ser descritas en la siguiente forma:



La primera reacción es muy rápida y supone la unión de la porfirina con el apocitocromo c, la segunda es más lenta y va asociada a un cambio conformacional de la proteína.

El átomo de hierro es esencial no sólo para acelerar esta segunda reacción sino también para estabilizar la nueva forma de la proteína.

El átomo de hierro del grupo hemo está unido a los 4 átomos de nitrógeno del anillo tetrapirrólico. El quinto ligando a que está unido el átomo de hierro es según Yonetani et al (1972), un átomo de nitrógeno probablemente de una histidina, y la sexta posición de coordinación está ocupada normalmente por una molécula de agua y a ella se pueden unir el sustrato y sus análogos así como inhibidores del enzima tales como fluoruros,

cianuros y la azida sódica. (Schombaum y Chance 1976, Yoneta-
ni 1976).

La composición en aminoácidos del apoenzima ha -
sido determinada por Ellfolk (1967) y es la siguiente:

Asp₄₂, tre₁₄, ser₁₄, glu₂₇, pro₁₅, gli₂₃, ala₁₆, val₁₂, met₆,
ileu₈, leu₂₃, tir₁₂, fen₁₆, lis₂₁, his₅, arg₉, cis, tri₆,
-(CONH₂)₂₉.

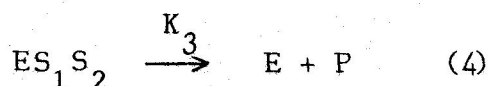
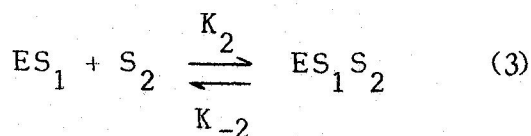
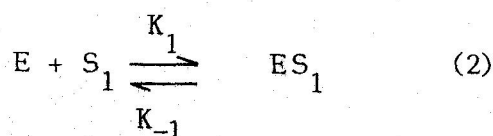
La diferencia entre (ácido aspártico, + ácido glu-
támico-amidas) y (lisina + histidina + arginina) que son respecti-
vamente (42 + 27 - 29) y (21 + 5 + 9) da una diferencia de 5 gru-
pos ácidos de más, lo que justifica el punto isoelectrico ácido -
de la apoproteína.

Esta composición en aminoácidos revela ciertas di-
ferencias respecto a la composición de las peroxidasas de plan-
tas, tales como la peroxidasa de rábano picante, la de rábano -
japonés o la de piña. Las peroxidasas de plantas muestran un -
caracter común en su composición con otras proteínas vegetales,
como es su bajo contenido en lisina; por el contrario el conteni-
do en lisina de la citocromo c peroxidasa de levaduras es más -
bien alto; igualmente el contenido de ésta en tirosina y triptófano
es relativamente alto en comparación con las peroxidasas de plan-
tas lo cual explica la baja relación existente entre las absorcio-
nes a 407 y 280 nm encontrada para la citocromo c peroxidasa
cristalizada. Así, mientras el valor dado para la relación -
 A_{407}/A_{280} en la citocromo c peroxidasa cristalizada oscila entre
0.7 y 1.2, en la peroxidasa de rábano picante los valores son de

3.04, 2.92 y 3.31, y para la peroxidasa de rábano japonés son de 3.28 y 3.35 según los distintos autores.

Actividad enzimática

La reacción de la citocromo c peroxidasa sigue el mecanismo general de los enzimas con 2 sustratos, con los que reacciona en un orden obligado según las siguientes ecuaciones:



En las que E es el enzima, S_1 es el peróxido de hidrógeno, S_2 es el ferrocitocromo c y P es el ferricitocromo c. Puesto que S_1 posee dos equivalentes de oxidación y S_2 un equivalente de reducción, la estequiometría de la reacción es la expuesta en la ecuación (1) de la página 41. La formación del complejo enzima-peróxido de hidrógeno (ES_1) es prácticamente irreversible, de forma que la constante de disociación K_{-1} es insignificante con relación a K_1 , siendo esta última mayor que la correspondiente a la peroxidasa de rábano picante y según Chance (1949)

del orden de 10^7 a $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$. Así pues la formación del complejo ES_1 es muy rápida no habiéndose detectado intermedios. En ausencia de reductores o del citocromo c, el compuesto ES_1 es muy estable siendo su velocidad de descomposición espontánea del orden de 10^{-5} seg^{-1} . Esto se debe a que en la formación del compuesto ES_1 se ha roto la unión O-O del agua oxigenada lo que hace irreversible la reacción.

Por otra parte la constante de asociación del complejo ES_1 con el ferrocitocromo c es del orden de $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ lo que representa una de las velocidades de interacción más rápida existente entre dos proteínas.

La citocromo c peroxidasa, como se mencionó anteriormente, es inhibida por una serie de reactivos que se unen al grupo ferrihemo, tales como fluoruros, cianuros o azida sódica; por el contrario no es inhibida por el monóxido de carbono lo que indica que la formación de la forma ferrosa del enzima no está implicada en su acción catalítica.

La actividad de la citocromo c oxidasa puede ser diferenciada de la acción de la citocromo c peroxidasa utilizando monóxido de carbono que inhibe selectivamente la acción de la primera. Como donadores específicos de electrones de la reacción se ha utilizado ferrocitocromo c de corazón de caballo o ferrocitocromo c de levaduras; otros donadores de electrones como el ácido ascórbico, el guayacol o el pirogalol son oxidados, según Chance (1951), más lentamente que el citocromo c. Finalmente según Yonetani y Ray (1965) los ferrocitocromos b, b_5 y c_1 de

mamíferos así como la mayoría de los ferrocitocromos c de bacterias no son oxidados por este enzima.

Interacción entre la citocromo c peroxidasa y el citocromo c

El conocimiento de la forma de interacción entre la citocromo c peroxidasa y el citocromo c es de gran interés no sólo para conocer el mecanismo de la reacción catalizada por la citocromo c peroxidasa sino también porque puede ayudar a aclarar el mecanismo general del transporte electrónico en los sistemas biológicos, tales como mitocondrias o microsomas, puesto que una cuestión no aclarada todavía es si es necesario el contacto directo entre los dos grupos prostéticos para el proceso de transferencia de electrones en las reacciones biológicas.

Beetlestone (1960) ha estudiado la cinética de la reacción entre el ferrocitocromo c y la citocromo c peroxidasa $-H_2O_2$. Esta reacción es de primer orden y la constante de la velocidad de reacción es independiente de la relación inicial de ferri y ferrocitocromo c. La velocidad de reacción es inversamente proporcional al citocromo c total y es más baja cuanto más alta es la fuerza iónica; de acuerdo con este último efecto, Beetlestone concluyó que los sitios reactivos del citocromo c y de la peroxidasa poseen carga de signo opuesto, ocupando cada uno un área aproximada de 5Å^2 cuadrados. Puesto que el punto isoeléctrico del citocromo c de mamíferos es 10,05, puede deducirse que el sitio activo de la peroxidasa está cargado negativamente debido

probablemente a la presencia de grupos carboxilos libres de la proteína o de los dos carboxilos del grupo hemo.

Yonetani y Ray (1966) han propuesto la formación de un complejo reversible tipo Michaelis-Menten entre el enzima y el citocromo c (Ecuación 3); la interacción entre ambas proteínas podría deberse fundamentalmente a atracciones de tipo electrostático ya que la citocromo c peroxidasa y el citocromo c son respectivamente proteínas ácidas y básicas. Este supuesto se confirmó más tarde por el hecho de que varias policonaciones que se unen reversible o irreversiblemente a la citocromo c peroxidasa inhiben la actividad enzimática al competir con el ferrocitocromo c (Yonetani y Ray, 1966, Mochan y Nicholls, 1971).

Posteriormente Mochan (1970) y Nicholls y Mochan (1971) demostraron que el citocromo c y la citocromo c peroxidasa forman un complejo reversible que puede ser detectado por cromatografía en columnas y utilizando un citocromo c modificado químicamente pudieron demostrar que las fuerzas electrostáticas juegan un papel preponderante en la formación de este complejo.

Sin embargo Kang *et al* (1977) han descrito dos lugares de unión del citocromo sobre la peroxidasa lo que se refleja en una cinética bifásica de oxidación del sustrato. Uno de estos lugares tiene alta afinidad por el sustrato y corresponde probablemente al radical libre, y otro tiene baja afinidad y corresponde al hierro (IV) del hemo.

De los resultados obtenidos mediante resonancia magnética nuclear y fluorescencia por Gupta y Yonetani (1973) y

Leonard y Yonetani (1974), se deduce que la citocromo c peroxidasa interacciona con el ferrocitocromo c en un área adyacente al radical metilo en posición 8 del grupo porfirínico de éste. Con esta orientación, el contacto directo entre los dos grupos prostéticos es impedido por la cadena polipeptídica del citocromo c y en consecuencia el grupo hemo de éste está a considerable distancia, superior a 25 \AA , del grupo hemo del enzima, lo que excluye una transferencia de electrones a través de un contacto directo de los grupos prostéticos. Por lo tanto, la posibilidad de que la transferencia de electrones se realice a través de la cadena polipeptídica debe ser seriamente considerada.

Biosíntesis de la citocromo c peroxidasa

La citocromo c peroxidasa se encuentra fundamentalmente en las células de levadura crecidas en aerobiosis.

Chantrenne en (1955) y Avers (1967) demostraron que la biosíntesis de este enzima en cultivos de levadura que habían crecido en anaerobiosis se podía inducir mediante la aireación de los mismos.

Igualmente Chantrenne (1955) observó que en las razas normales de levadura, este enzima se encuentra en parte unido a partículas subcelulares que sedimentan a 10000 xg y en parte en forma soluble en el citoplasma; por el contrario en las partículas subcelulares aisladas de mutantes deficientes respiratorios no pudo demostrar la presencia de este enzima incluso cuando

estos fueron aireados varias horas. A pesar de ello la aireación de estos mutantes también inducía, aunque en menor cantidad la biosíntesis del enzima, que se localizaba de forma soluble en el citoplasma.

Estos resultados llevaron a Chantrenne a proponer la existencia en levaduras de dos tipos de peroxidasa: una a la que llamó peroxidasa de la benzidina, se encontraría asociada a las partículas sedimentables no siendo sintetizada por los mutantes "petite", la otra llamada peroxidasa de citocromo se encontraría disuelta en los extractos celulares y es sintetizada por los mutantes "petite" y por las levaduras normales. Ambos tipos de peroxidasa son inducibles por el oxígeno del aire.

En las células de levadura crecidas en condiciones de anaerobiosis Chantrenne (1955) y Sels (1958) observaron que carecían totalmente de actividad enzimática. Sin embargo Lindenmayer y Smith (1964) no encontraron diferencias apreciables en la actividad de la citocromo c peroxidasa de células de S.cerevisiae, crecidas en aerobiosis o anaerobiosis.

Finalmente Avers (1967) observó que en los cultivos anaerobios la actividad enzimática disminuía de 4 a 6 veces tanto en las razas normales como en las "petites" pero que nunca llegaba a hacerse totalmente nula.

Estas aparentes contradicciones pueden ser debidas a que, como han demostrado Avers (1967), Sels y Cocriamont (1968) y Rogers y Stewar (1973b), la citocromo c peroxidasa tiene un umbral para el oxígeno, durante la inducción aerobia de cultivos

anaerobios, mucho más bajo que el de otros enzimas de la cadena transportadora de electrones y por tanto su inducción se produce incluso en presencia de muy bajas concentraciones de oxígeno.

Hoy está fuera de dudas que la citocromo c peroxidasa y otros enzimas respiratorios hemoproteicos son inducibles en las levaduras por el oxígeno. Ahora bien en cuanto a la biosíntesis de estos enzimas, algunos se sintetizan de "novo" a partir de aminoácidos durante la fase de adaptación al oxígeno, mientras que otros como el isocitocromo c, se activan según Sels *et al* (1965), Fukuhara y Sels (1966) y Fukuhara (1966) durante la fase de inducción a partir de precursores macromoleculares a los cuales se les une el grupo hemo o un precursor del grupo hemo. Este último tipo de inducción llamado por Sels y Cocriamont (1968) inducción por conversión, se puede aplicar también a enzimas como la citocromo c peroxidasa y a la catalasa de un mutante aislado por Berte y Sels (1979). Según estos autores los apoenzimas se sintetizarían incluso en condiciones de anaerobiosis siendo por lo tanto constitutivos y a ellos se uniría el grupo hemo para formar el holoenzima en condiciones inductoras.

En el caso concreto de la citocromo c peroxidasa Sels y Concriamont (1968) han demostrado la unión directa en extractos libres de células, entre la apocitocromo c peroxidasa, existente en levaduras cultivadas en anaerobiosis, y el grupo hemo, para originar citocromo c peroxidasa activa. La eficacia de esta unión se aumenta considerablemente si a la mezcla se le añade citocromo c de corazón de caballo. Estos mismos autores encon-



traron que aunque el holoenzima obtenido era relativamente estable, en algunas experiencias aparecía un alto grado de inactivación del mismo; esta inactivación se impidió cuando se utilizaron preparaciones purificadas por DEAE celulosa en las cuales se separó el apocitocromo c de uno o varios agentes degradantes probablemente de naturaleza proteolítica. El papel de estos agentes en la inactivación de la citocromo c peroxidasa "in vivo" no ha sido por ahora investigado.

Como demostración de que la biosíntesis de la citocromo c peroxidasa en cultivos anaerobios de levadura inducidos por aireación no requiere de la síntesis de proteínas citoplasmáticas, Sels y Cocriamont (1968) han realizado esta inducción en presencia de cicloheximida, lo que parece demostrar que el holoenzima se forma por la simple unión entre la apoproteína previamente sintetizada y el grupo hemo.

A pesar de que durante muchos años se ha trabajado para demostrar que la formación adaptativa de los enzimas hemoproteínicos en células eucariotas puede ser consecuencia de la adición del grupo hemo a apoproteínas, solamente en estos últimos años se ha puesto de manifiesto de una forma indiscutible mediante técnicas inmunológicas, que las células de S.cerevisiae - crecidas en anaerobiosis sintetizan polipéptidos (apoproteínas) electroforética e inmunologicamente indistinguibles de los holoenzimas correspondientes obtenidos a partir de células crecidas en aerobiosis; así Djavadi-Ohanian et al (1978) han demostrado la presencia de una apoenzima que se corresponde con la citocromo c peroxidasa de los cultivos en aerobiosis.

Hasta ahora no se ha aclarado como el oxígeno dispara la formación de la citocromo c peroxidasa activa en células crecidas en anaerobiosis. Slonimski et al (1963) propusieron la hipótesis de que el primer suceso en la adaptación de las células al oxígeno sería la transformación del apoisocitocromo c, que actuaría como represor, en su forma activa de isocitocromo c; esto podría explicar las experiencias de Sels y Cocriamont (1968) en el sentido de que la citocromo c que parece ser el sustrato natural de la citocromo c peroxidasa, tendría "in vivo" una función reguladora en la conversión de ésta de apoenzima a holoenzima - bajo condiciones de aerobiosis. Su mecanismo de acción podría ser de varias formas:

- a) El citocromo c se une en algún lugar de la apocitocromo c peroxidasa originando una apoproteína libremente accesible al hemo.
- b) El mecanismo de recombinación se desbloquea únicamente cuando el citocromo c ha modificado la configuración espacial de la apoproteína nativa.

Otra explicación quizás más verosímil podría ser según Falk et al (1953) y Hsu y Miller (1970) que el oxígeno es necesario para la síntesis, o intervenga en la conversión, del coproporfirinógeno III en protoporfirina X; este modelo sin embargo no explica según Yoshida et al (1974) porque las células de levadura crecidas en anaerobiosis contienen citocromo b cuyo grupo prostético muy probablemente sea la protoporfirina IX; sin embargo Poulson y Polglase (1974), han demostrado que las células

de levadura crecidas en anaerobiosis son capaces de sintetizar -
pequeñas cantidades de protohemo. Aunque la eficacia de esta vía
anaerobia es muy inferior a la aerobia sería suficiente para expli-
car los bajos niveles de citocromo b_5 , las trazas de citocromo c
peroxidasa y de otras hemoproteínas, presentes en las células.
Esta incapacidad de sintetizar enzimas hemoproteínicos activos como
consecuencia de una ausencia de síntesis del grupo hemo estaría -
de acuerdo con la observación de Charalampous (1974) de que las
levaduras crecidas en anaerobiosis excretan al medio de cultivo
coproporfirina III, el precursor inmediato del protoporfirinogeno IX.

Otra forma por la que se podría regular la bio-
síntesis de la citocromo c peroxidasa sería según Charalampous -
(1974), que la combinación del grupo hemo con la apocitocromo c
peroxidasa fuera inhibida por la presencia de varios intermediarios
de la síntesis del grupo hemo, las cuales se acumularían en el cre-
cimiento anaerobio de las levaduras.

Localización de la citocromo c peroxidasa

La citocromo c peroxidasa muestra una elevada
actividad catalítica y una especificidad selectiva hacia el ferroci-
tocromo c como donador de electrones en presencia de agua oxí-
genada, esto hace pensar que la citocromo c peroxidasa sea un -
enzima funcionalmente unido al sistema respiratorio de las levadu-
ras y que juegue un papel tan importante como la citocromo c oxi-
dasa en el metabolismo del oxígeno de estos microorganismos.

Las primeras investigaciones sobre la localización intracelular de este enzima, hechas por Chantrenne (1955) y Lindemayer y Smith (1964), llevaron a la conclusión de que al menos parte de él no tenía una localización mitocondrial, sino que se encontraba soluble en el citoplasma.

Cuando se utilizaron métodos más suaves para el aislamiento de mitocondrias, como el utilizado por Yonetani y Ohnishi (1966) partiendo de esferoplastos de S. carlsbergensis - obtenidos con helicasa y crecidos en aerobiosis, se comprobó que este enzima tiene una localización exclusivamente mitocondrial sin embargo ellos no pudieron demostrar la localización exclusivamente mitocondrial de la citocromo c peroxidasa en S.cerevisiae atribuyéndolo a la imposibilidad de obtener mitocondrias intactas de esta especie por su mayor fragilidad; tampoco pudieron detectar la presencia de este enzima en mitocondrias intactas obtenidas de diversos tejidos de animales y plantas superiores lo que hace suponer que este enzima tiene una localización mitocondrial exclusivamente en levaduras.

Dadas las características fisiológicas particulares de las levaduras capaces de crecer en aerobiosis y en anaerobiosis, y la existencia de mutantes "petite" con citocromo c peroxidasa pero carentes de una cadena transportadora de electrones funcional, hace difícil el establecer la localización intracelular de este enzima ya que los investigadores todavía no están de acuerdo en cuanto si las levaduras crecidas en anaerobiosis poseen o no mitocondrias; así mientras Tustanoff y Bartley (1964a) y (1964b),

Wallace y Linnane (1964) y Lukins et al (1966) opinan que las levaduras en anaerobiosis carecen de mitocondrias y que durante la aireación las mitocondrias aparecen "de novo" como consecuencia de la transformación de vesículas membranosas situadas en el citoplasma, otros han intentado demostrar mediante observaciones de ultraestructura y experiencias bioquímicas la presencia de promitocondrias (Schatz 1965) o mitocondrias totalmente formadas (Morpurgo et al 1964) en levaduras crecidas en anaerobiosis.

Avers (1967) mediante técnicas citoquímicas y separación de distintas fracciones celulares por centrifugación diferencial ha demostrado que en las razas silvestres crecidas en aerobiosis casi toda la citocromo c peroxidasa se encuentra localizada en las membranas mitocondriales y sólo una pequeña cantidad puede estar unida a vesículas membranosas situadas cerca de la membrana plasmática pero no formando parte de ella; por el contrario en las razas silvestres crecidas en anaerobiosis y en los mutantes "petite" la mayor parte de la actividad enzimática está localizada sobre estructuras membranosas del citoplasma y sólo una pequeña parte sobre membranas mitocondriales.

Otra dificultad a la hora de determinar la localización de la citocromo c peroxidasa en el interior de las levaduras radica en el hecho ya observado por Yonetani y Ohnishi (1966) de la fácil liberación de este enzima del interior de las mitocondrias purificadas, especialmente en S. cerevisiae, por tanto los enzimas hemoproteínicos inducibles por el oxígeno en levaduras pueden ser clasificados de acuerdo con su integración estructural

en las mitocondrias en dos tipos:

a) Enzimas implicados en el transporte de electrones y firmemente unidos a las estructuras mitocondriales y cuya biosíntesis es inhibida por los agentes que impiden la biogénesis de las mitocondrias, el cloranfenicol por ejemplo (Huang et al 1955); su síntesis requiere la integridad de toda la información genética contenida en el ADN mitocondrial (Mounolou 1967 y Fukuhara 1967).

b) En el segundo grupo se incluyen el citocromo c y a la citocromo c peroxidasa, las cuales son fácilmente liberadas tras la rotura de las mitocondrias, y la catalasa la cual está descrita como un enzima que se encuentra en la célula en forma particulada y en forma soluble en el citoplasma (Ortega et al, observaciones no publicadas).

Esta facilidad de solubilización de la citocromo c peroxidasa puede ser debida a su localización en el interior de las mitocondrias. Erecinska et al (1973) han estudiado la distribución de una serie de enzimas en el interior de las mitocondrias de S.cerevisiae. Partiendo de la suposición de que algunos enzimas como la malato deshidrogenasa está localizada en el interior de la matriz de las mitocondrias y otros como la succinato citocromo c reductasa están fuertemente unidos a la membrana interior de las mitocondrias, la simple rotura de éstas por presión osmótica liberará al medio porcentajes distintos de actividad de cada uno de estos enzimas. Por este procedimiento comprobaron que se libera mayor porcentaje de citocromo c peroxidasa que de malato deshidrogenasa y practicamente nada de succinato citocromo c reductasa;

se puede afirmar por tanto que la citocromo c peroxidasa encuentra una tendencia mayor que la malato deshidrogenasa a salir de las mitocondrias lo que ha llevado a estos autores a proponer que al menos parte de la citocromo c peroxidasa de S.cerevisiae se encuentra situada entre las membranas interna y externa que rodean a las mitocondrias.

Sin embargo, las observaciones realizadas por Williams y Stewart (1976) en células de S. cerevisiae crecidas en un quimiostato con bajas concentraciones de glucosa, demuestran que la citocromo c peroxidasa en las razas silvestres está localizada en su mayor parte en el espacio intracristal de las mitocondrias aunque alguna actividad pueda también estar asociada con el espacio periférico intermembranoso; en los mutantes "petites" ésta actividad enzimática está localizada en unas estructuras aparentemente membranosas cuya forma varía desde vesículas muy largas y probablemente discontinuas semejantes a las observadas por Avers (1967), a formas que parecen ser promitocondrias, con una membrana interna y otra externa semejantes a las observadas por Kellerman et al (1971).

La localización intramitocondrial de la citocromo c peroxidasa no está aún bien establecida aunque una localización en el espacio intracristal estaría de acuerdo con el hecho de que al menos en animales el citocromo c, que parece ser su sustrato natural, puede estar ubicado en este mismo espacio, lo que - facilitaría la reacción del enzima con su donador de electrones; ahora bien Yonetani y Ray (1966) y Gibson y Greenwood (1963) han

comprobado que la velocidad aparente de oxidación del citocromo c por la citocromo c peroxidasa es más lenta que por la citocromo c oxidasa lo que sugiere que o bien el citocromo c está en las mitocondrias preferentemente orientado hacia la oxidasa o que el equilibrio de distribución de éste en forma reducida entre la oxidasa y la peroxidasa, está favorecido hacia la citocromo c oxidasa.

Papel fisiológico de la citocromo c peroxidasa

El sistema respiratorio de los organismos y concretamente la deshidrogenación del $FADH_2$ a FAD en las mitocondrias, produce agua oxigenada a una velocidad constante, que depende según Chance (1971) del estado metabólico de las mismas. Este agua oxigenada es altamente tóxica para los sistemas biológicos por lo que estos han desarrollado varios enzimas capaces de destruirla, tales como la catalasa y posiblemente también la citocromo c peroxidasa.

El verdadero papel fisiológico de la citocromo c peroxidasa en levaduras no ha sido definitivamente establecido pero como hemos dicho anteriormente podría formar parte del sistema encargado de eliminar el agua oxigenada producida en las mitocondrias acoplando esta descomposición con la oxidación del citocromo c hacia el cual muestra una elevada actividad molecular; de esta forma el sistema formado por este enzima y el peróxido de hidrógeno podría servir como un camino alternativo del flujo de

electrones en las mitocondrias evitando el paso por la citocromo c oxidasa.

La demostración de este papel fisiológico para la citocromo c peroxidasa ha sido abordado por las más sofisticadas técnicas experimentales.

Los primeros estudios espectroscópicos realizados por Beetlestone (1960) en la peroxidasa de levaduras demostraron que la citocromo c peroxidasa era capaz de utilizar rápidamente los peróxidos a la vez que se producía una simultánea oxidación intracelular del ferrocitocromo c. La reacción se podía estimular por la adición de glucosa y se inhibía por la Antimicina A. Esta rápida utilización de los peróxidos posiblemente sea causada por una reacción intracelular entre el complejo citocromo c peroxidasa - H_2O_2 con el ferrocitocromo c, acoplada con la vía metabólica usual de utilización de la glucosa.

Erecinska et al (1973) han comprobado que la cantidad de agua oxigenada que difunde desde mitocondrias purificadas de levadura al medio de incubación es insignificante en relación con la velocidad de segregación de agua oxigenada observada en las mitocondrias de animales; esto podría indicar que la citocromo c peroxidasa de levaduras es capaz de destruir el agua oxigenada formada en el interior de las mismas antes de que difunda fuera de estos orgánulos y efectivamente "in vitro" han comprobado que en un sistema formado por mitocondrias intactas, alrededor del 90% del citocromo c puede ser oxidado por la citocromo c peroxidasa, lo que significa que en la mitocondria todo a la ma-

yor parte del citocromo c es asequible al enzima; además, en condiciones anaerobias y en presencia de etil peróxido de hidrógeno el ^{32}P es incorporado en el ATP para originar ATP marcado. Si esto sucediera así "in vivo" la célula obtendría una doble ventaja ya que la destrucción de una sustancia tóxica, producida durante la respiración como es el H_2O_2 , se acoplaría con la cadena transportadora de electrones a nivel del citocromo c lo cual permitiría la formación de dos de las tres moléculas de ATP que se forman en ésta.

OBJETO DEL TRABAJO

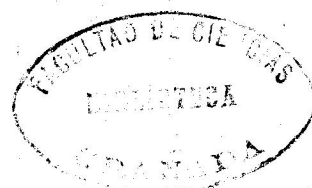
De acuerdo con lo expuesto en las páginas anteriores, puede concluirse que tanto la estructura de la peroxidasa de S.cerevisiae (citocromo c peroxidasa) como la cinética de la reacción mediatizada por ella han sido objeto de numerosos estudios y en consecuencia puede considerarse que se conocen bastante bien.

No ocurre así, sin embargo, con el papel fisiológico que desempeña en esta levadura, su localización intracelular en la misma, la coexistencia o no de isoenzimas, y sobre todo los procesos relacionados con su biosíntesis y la regulación de la misma.

Es por ello que el trabajo expuesto en esta Memoria tiene por objeto contribuir al esclarecimiento de algunos extremos relacionados con los puntos citados.

Con este fin y tras una serie de experiencias previas encaminadas a poner a punto un método óptimo para la valoración de peroxidasa en homogeneizados y fracciones subcelulares de S.cerevisiae, se ha estudiado su cinética de liberación y solubilización, su localización intracelular y la posible existencia de isoenzimas con dicha actividad.

De otra parte se ha estudiado también la influencia de diversos factores ambientales sobre la regulación de la biosíntesis de este enzima, tanto en estirpes normales como en mutan-



tes "petite" citoplasmáticas y, finalmente, aunque de forma parcial, los fundamentos genéticos de la citada regulación.

MATERIAL Y METODOS

1. MICROORGANISMOS.

Las experiencias de esta tesis doctoral se han llevado a cabo con estirpes de Saccharomyces cerevisiae cuyas características se exponen a continuación.

1.1. Estirpes utilizadas en las experiencias de regulación de la síntesis, localización e identificación de enzimas con actividad de peroxidasa.

K-2: homotática, prototrofa, $[\underline{\text{rho}}^+]$. Aislada a partir de mosto de vino (Extremera, 1978).

K-2-1: homotática, prototrofa, $[\underline{\text{rho}}^-]$. Mutante espontánea de la estirpe K-2 (Extremera, 1978).

2 +: diploide, prototrofa, $[\underline{\text{rho}}^+]$. Obtenida por cruces entre una estirpe $[\underline{\text{rho}}^+]$ y otra $[\underline{\text{rho}}^-]$ con marcadores complementarios.

Xp-9: haploide, $\underline{\alpha}$, $\underline{\text{his}}_3$, $\underline{\text{tri}}_1$, $[\underline{\text{rho}}^-]$. Mutante espontánea de la estirpe X-3, aislada en nuestro laboratorio.

Bx-11: haploide, $\underline{\alpha}$, $\underline{\text{tri}}_1$, $\underline{\text{his}}_3$, $[\underline{\text{rho}}^-]$. Mutante obtenida a partir de la estirpe X-3 por tratamiento con bromuro de etidio según la técnica de Slonimski et al, (1968).

1.2. Estirpes utilizadas en las experiencias genéticas

1.2.1. Estirpes haploides de partida

X-3: α , \underline{tri}_1 , \underline{his}_3 , $[\underline{rho}^+]$. Seleccionada en nuestro laboratorio en razón de su estabilidad para el marcador \underline{his}_3 (González, 1974)

F1.27: \underline{a} , \underline{ade}_1 , \underline{lis}_2 , $[\underline{rho}^+]$. (González, 1974).

R-6: \underline{a} , \underline{ade}_1 , \underline{lis}_2 , $[\underline{rho}^+]$. Mutante acatalásica y aeroxidásica obtenida en nuestro laboratorio por tratamiento de la estirpe F1.27 con radiación ultravioleta (González y Montoya, 1977).

1.2.2. Cigotos obtenidos en cruce entre las estirpes X-3 y R-6

16-5, 2g y 3p: prototofos y $[\underline{rho}^+]$. Obtenidos en el transcurso de este trabajo.

1.2.3. Descendencia haploide procedente de los tres cigotos obtenidos en cruce entre las estirpes X-3 y R-6

Descendencia procedente del cigoto 16-5:

1-1: \underline{ade}_1 , \underline{tri}_1 .

1-2: \underline{lis}_2 , \underline{his}_3 .

1-3: \underline{ade}_1 , \underline{lis}_2 , \underline{tri}_1 .

1-4: \underline{his}_3 .

2-1: $\underline{ade}_1, \underline{lis}_2, \underline{tri}_1, \underline{his}_3$.

2-2: Prototrofa.

2-3: $\underline{ade}_1, \underline{lis}_2, \underline{tri}_1$.

2-4: \underline{his}_3 .

Descendencia a procedente del cigoto 2g:

4-1: $\underline{ade}_1, \underline{lis}_2, \underline{tri}_1$.

4-2: $\underline{ade}_1, \underline{tri}_1$.

4-3: $\underline{lis}_2, \underline{his}_3$.

4-4: \underline{his}_3 .

5-1: $\underline{lis}_2, \underline{ade}_1$.

5-2: \underline{tri}_1 .

5-3: $\underline{ade}_1, \underline{his}_3$.

5-4: $\underline{lis}_2, \underline{tri}_1, \underline{his}_3$.

Descendencia a procedente del cigoto 3p:

7-1: $\underline{lis}_2, \underline{tri}_1, \underline{his}_3$.

7-2: $\underline{ade}_1, \underline{lis}_2$.

7-3: $\underline{ade}_1, \underline{his}_3$.

7-4: \underline{tri}_1 .

8-1: $\underline{ade}_1, \underline{lis}_2, \underline{his}_3$.

8-2: \underline{tri}_1 .

8-3: $\underline{ade}_1, \underline{his}_3$.

8-4: $\underline{lis}_2, \underline{tri}_1$.

Todas estas estirpes poseen el fenotipo $[\underline{rho}^+]$ y han sido obtenidas en el transcurso de este trabajo.

2. MEDIOS DE CULTIVO

A continuación se detallan los medios empleados en el desarrollo de las experiencias. Estos han sido preparados y esterilizados de acuerdo con las técnicas usuales en Microbiología.

2.1. Medios de conservación y crecimiento

Medio NG: empleado para cultivo y conservación de levaduras, ha sido descrito por Lindegren et al (1958).

Presenta la siguiente composición:

Sulfato magnésico	1 g
Fosfato monopotásico	2 g
Sulfato amónico	3 g
Peptona	3'6 g
Extracto de levadura	4 g
Glucosa	10 g
Agua destilada	1000 ml
pH final	4.5

Para utilizarlo en forma sólida se añadieron 20 g de agar por litro.

Medio NL: igual al anterior, pero con lactato sódico a concentración de 20 g/l como única fuente de carbono.

2.2. Medio de conjugación (MC)

Se ha empleado una modificación del medio de Fowell (1969) con la siguiente composición:

Glucosa	50 g
Extracto de levadura	10 g
Peptona	5 g
Agua destilada	1000 ml

2.3. Medios de esporulación

Para inducir la esporulación de estirpes diploides se han utilizado dos medios, uno de preesporulación y otro de esporulación.

2.3 .1. Medio de preesporulación (MPE)

Empleado para la obtención de cultivos de alta densidad celular y óptimas condiciones fisiológicas. Es una modificación del descrito por Fowell (1969), con la siguiente composición:

Glucosa	5 g
Extracto de levadura	1 g
Agar	2.5 g
Agua destilada	1000 ml

2.3.2. Medio de esporulación (ME)

Se utiliza para favorecer la formación de ascas. Se ha empleado el medio de Rousseau y Halvorson (1969), cuya composición es :

Glucosa	0.1 g
Extracto de levadura	0.25 g
Acetato potásico	2 g
Agua destilada	100 ml

Una vez esterilizado el medio se deja enfriar hasta una temperatura ligeramente inferior a 45 °C, entonces se le añade tetraciclina en solución esterilizada por filtración hasta una concentración final de 20 µg/ml, con el fin de evitar contaminaciones bacterianas.

2.4. Medios mínimos

Los medios mínimos sólidos se caracterizan por estar constituidos sólo por un sustrato inerte (agar), una fuente de carbono y una solución base conteniendo las vitaminas y sales minerales necesarias para el crecimiento de las levaduras. En estos medios sólo pueden crecer las estirpes prototrofas, por lo que se han empleado para la selección de cigotos de dicho tipo y para la comprobación del genotipo de las estirpes auxótrofas, mediante la adición en cada caso de los nutrientes adecuados (aminoácidos, -

base púrica o pirimidínica) de acuerdo con la técnica descrita en el apartado 2.4.2 de este mismo capítulo.

Se ha utilizado el medio de Wickerham (1946) de la casa Difco (Bacto Yeast Nitrogen Base) que es una solución de vitaminas y sales minerales. Se prepara disolviendo 13.4 g en 100 ml de agua destilada, con lo que se obtiene una solución 20 veces concentrada que se esteriliza por filtración y se conserva en nevera a 4°.

2.4.1. Medio MG

La composición es la siguiente:

Glucosa	2 g
Agar purificado	2.5 g
Solución madre de vitaminas y sales minerales	5 ml
Agua destilada	95 ml

Para preparar el medio se suspende el agar purificado en agua destilada, se añade la glucosa y se esteriliza en autoclave. Posteriormente se deja enfriar hasta 60° y se le añade el 5% de la solución de medio mínimo 20 veces concentrada. El medio se agita suavemente para homogeneizarlo y a continuación se reparte en cajas de Petri.

2.4.2. Medios mínimos suplementados

El medio MG puede ser suplementado con aminoácidos, bases púricas o pirimidínicas, permitiendo así el crecimiento de estirpes auxótrofas para dichos requerimientos.

Los correspondientes compuestos se disuelven en agua destilada a concentración de 2mg/ml y se esterilizan por filtración. Para suplementar al medio mínimo deben encontrarse 100 veces diluidos, o sea a una concentración final de 20µg/ml. La incorporación al medio se lleva a cabo a la vez que se añade la solución madre de vitaminas y sales minerales.

2.5. Solución para la inducción de la biosíntesis de peroxidasa

El medio de inducción fue el utilizado por Palomeque et al (1979) para la inducción de catalasa.

Su composición es la siguiente:

Sulfato magnésico	1 g
Fosfato monopotásico	2 g
Cloruro sódico	6 g
Agua destilada	1000 ml

Esta solución de sales minerales va adicionada de una fuente de carbono fermentable como la glucosa al 0.5% o no-fermentable como etanol o lactato sódico al 1%.

3. CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS ESTIRPES DE S.CEREVISIAE

Se han empleado dos procedimientos para seguir la evolución del crecimiento de las estirpes de levadura utilizadas.

3.1. Determinación de la densidad óptica de los cultivos

A fin de conocer la dinámica del crecimiento de las estirpes empleadas en este trabajo, con objeto de establecer las condiciones del cultivo en las que era conveniente valorar el contenido en peroxidasa de las células, se obtuvieron las curvas de crecimiento de las mismas en medio líquido NG.

La técnica empleada es la que se describe a continuación.

Para obtener una curva patrón, es necesario normalizar el inóculo de partida de forma que la inoculación inicial sea siempre igual en cada caso. Para ello se partió de cultivos en medio sólido NG de las estirpes a ensayar, con los que se inocularon tubos con 5 ml de medio NG líquido, que se incubaron en agitación durante 24 horas a 28°, tiempo en el que se ha alcanzado ya la fase de crecimiento estacionario.

A partir de estos cultivos, se tomaron muestras de 0.5 ml con las que se inocularon matraces Erlenmeyer de 100cc - conteniendo 10 ml de medio NG que se incubaron a 28° en agitación.

