

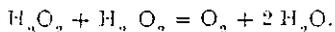
PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA CATALASA EN CRIPTOGAMAS

por

MIGUEL VICENTE MUÑOZ

INTRODUCCIÓN

La catalasa (peróxido de hidrógeno: peróxido de hidrógeno óxido-reductasa, E. C. 1.11.1.6) es un enzima del grupo de las óxido-reductasas que cataliza la reacción



Thénard, descubridor del peróxido de hidrógeno, en 1811 observó que los tejidos animales y vegetales descomponían el H_2O_2 . LOEW (1) denominó catalasa al enzima que catalizaba esta reacción.

MAEHLY (2), en una revisión sobre la catalasa, indica la existencia de dos mil artículos sobre el enzima hasta 1954.

La catalasa existe en todo organismo que tenga cadena de citocromos. Existe en todas las bacterias aeróbicas, excepto en *Acetobacter*. Las bacterias anaerobias no poseen catalasa.

SUMNER & DOUNCE (3) obtuvieron catalasa cristalizada a partir de hígado de buey. Posteriormente se han obtenido catalasas cristalizadas procedentes de otras fuentes: por ejemplo, HERBERT & PINSENT (4) cristalizaron la catalasa de *Micrococcus lysodeikticus*.

Estudios cinéticos del enzima han sido efectuados, entre otros, por BONNICHSSEN, CHANCE & THEORELL (5), y más recientemente por JONES & SUGGETT (6), los cuales han postulado también un mecanismo de reacción (7) y un modelo sobre centro activo del enzima (8).

OGURA & al. (9) han estudiado la relación entre los cambios en el

espectro de absorción del enzima producidos por los inhibidores con el tipo de inhibición.

Experiencias preliminares en nuestro laboratorio nos demostraron la existencia en *Psalliota campestris* de una notable actividad catalásica.

Nuestro trabajo trata principalmente de la purificación del enzima procedente de esta fuente y de la investigación de algunas de sus características cinéticas; asimismo se ha conseguido purificar y cristalizar la catalasa de *M. lysodeikticus* mediante un proceso modificado y mejorado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico.

Micrococcus lysodeikticus, CECT 49, cultivado en medio sólido, conteniendo: agar, 2 g.; extracto de levadura, 1 g.; glucosa, 2 g.; $\text{PO}_4\text{HK}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 1 g.; 1 ml. de solución salina, en 100 ml. de agua destilada. El pH se ajusta a 8,0, antes de añadir el agar, con KOH N. Se esteriliza en autoclave, a 2 atm., cinco minutos.

La solución salina contiene: $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 4 g.; ClNa, 0,2 g.; $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g.; SO_4Mn , 0,16 g., en 100 ml. de agua destilada.

El microorganismo se incuba, durante veinticuatro horas, a 24° C. Inóculos procedentes de este cultivo se siembran en medio líquido, conteniendo: bicarbonato sódico, 8,5 g.; extracto de levadura, 10 g.; solución salina, 10 ml., en un litro de agua. Se ajusta a pH 8,0 con KOH N y se esteriliza en corriente de vapor durante treinta minutos. Una vez frío se le añade una solución de 20 g. de glucosa en 100 ml. de agua destilada, esterilizada a una atmósfera durante quince minutos y fría.

El cultivo se efectúa a temperatura ambiente, con aireación, durante veinticuatro-cuarenta y ocho horas.

Los cuerpos fructíferos del hongo *Psalliota campestris* se obtuvieron comercialmente.

Reactivos y productos.

Todos los reactivos inorgánicos utilizados fueron de E. Merck, AG, excepto los siguientes: Perhidrol 30 % en peso, Foret. Molibdato amónico Gehe & Co., AG.

Acido cítrico de Merck, ácido sórbico de Doesder, acetona de Merck, etil mercaptano de Fluka A. G., tiourea de Rhône-Poulenc y clorhidrato de L-cisteína de Sigma, Ionagar núm. 2 de Oxoid, extracto de levadura de Oxoid, glucosa Merck y lizosíma S. P. A.

Determinación de actividad catalásica.

Se llevaba a cabo midiendo la cantidad de peróxido residual por el método de ISAACS (10), modificado para fotocolorimetría. A un tubo de colorimetría, conteniendo 0,1 ml. de extracto enzimático, se añadía 1 ml de agua oxigenada 52,4 mM., preparada añadiendo a 0,3 ml. de perhidrol 50 ml. de tampón fosfato 0,075 M, pH 6,9. A los veinte segundos se paraba la reacción por adición de 1 ml. de ácido sulfúrico M. Se anotaba el tiempo transcurrido desde el comienzo de la adición del agua oxigenada hasta el final de la adición del sulfúrico.

A continuación se añadían 1,5 ml. de tampón fosfato 0,075 M de pH 6,9, 1,2 ml. de molibdato amónico al 1,1 % y 1,2 ml. de ácido cítrico al 6 %. El color desarrollado se medía a 360 m μ en un Spectronic 20 de Bausch & Lomb, equipado con tubos de 1 cm. de paso de luz. La cantidad de peróxido residual se calculaba mediante una curva patrón construida con un gradiente de concentración de H₂O₂. Por diferencia con la cantidad de peróxido añadido se calculaba el peróxido descompuesto en el tiempo de reacción.

Las unidades se expresan en μ moles de peróxido descompuesto por el enzima en un minuto.

La cantidad de proteínas se midió por el método de LOWRY & al. (11), según la modificación de EGGSTEIN & KREUTZ (12).

La unidad de actividad específica del enzima se estimó en μ moles de H₂O₂ descompuestos/mg. proteína/minuto.

Cromatografía de adsorción y de cambio iónico.

La cromatografía de adsorción se realizó sobre gel de fosfato cálcico, equilibrado con tampón fosfato 0,001 M de pH 6,9 y preparado según el método de TISELIUS & al. (13).

La DEAE celulosa se preparó según el método de SEUBERT & REMBERGER (14) equilibrada con tampón fosfato 0,001 M de pH 7,7.

RESULTADOS

Cristalización de la catalasa de Micrococcus.

Las células cultivadas, como se indica en material y métodos, se cosecharon por centrifugación y se deshidrataron con acetona fría (20 ml. por gramo de peso seco), conservándose en congelador hasta el momento de su lisis.

Se siguió un método de lisis controlada con lisozima (15). Así se obtiene un lisado libre de restos celulares y compuestos insolubles, con lo que se facilita la purificación posterior.

El lisado se fracciona con sulfato amónico sólido, recogándose casi toda la actividad catalásica entre 50 y 70 % de saturación.

El precipitado obtenido se disolvió con tampón fosfato 0,1 M de pH 7,7 y se volvió a fraccionar con sulfato amónico, recogándose toda la actividad entre 50 y 80 % de saturación.

Este precipitado se disolvió en agua bidestilada hasta lograr una solución saturada de proteína que se dejó en reposo a 4° C, obteniéndose cristales al cabo de tres días. Estos cristales se separaron por centrifugación y se suspendieron en agua bidestilada. Al microscopio presentan forma de octaedros regulares, como los obtenidos por Herbert y Pinsent.

Purificación de la catalasa de Psalliota campestris.

Los extractos crudos se obtuvieron por extracción en tampón fosfato 0,075 M de pH 6,9 mediante batido. Los restos celulares se separaron por centrifugación. A continuación se añadía sulfato amónico hasta alcanzar un 70 % de saturación, recogándose toda la actividad en el precipitado que se separaba por centrifugación y se empleaba en posteriores etapas de purificación.

Al precipitado disuelto en tampón fosfato 0,001 M de pH 6,9 se le añadía gel de fosfato cálcico (3,6 mg. de gel por mg. de proteína), con lo que gran parte de las proteínas contaminantes quedaban en el gel. De esta forma se purificó el enzima 2,3 veces (tabla I).

En columna de DEAE-celulosa se añadían unos 20 mg. de proteína a una columna equilibrada con tampón fosfato 0,001 M de pH 7.7 y se

TABLA I

Purificación de la catalasa de *F. campestris* por adsorción con gel de fosfato cálcico

	Volumen total (ml)	Unidades/ml	Unidades totales	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (unidades/mg)	Recuperación %
Extracto crudo...	20	1810	36200	8,6	210	100
Precipitado 70 % ...	20	1250	25000	5,2	240	69
Sobrenadante gel ...	20	1420	28400	2,9	489	78

elúa con concentraciones crecientes de cloruro sódico. La fracción más purificada correspondía a una molaridad de 0,1 (fig. 1). La purificación alcanzada fue de 13,8 veces (tabla II).

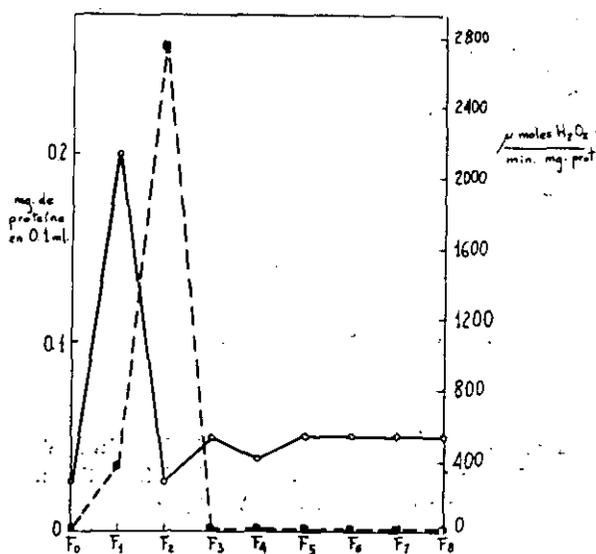


Fig. 1.—Cromatografía en columna de DEAE-celulosa del precipitado por sulfato amónico al 70-% de saturación. En línea de trazos se representa la actividad específica de las fracciones, y en línea llena la concentración de proteínas.

En la figura 2 se muestra el espectro de absorción de esta fracción purificada, que presenta máximos a 350, 505 y 630 mμ.

TABLA II

Purificación de la catalasa de *P. campestris* por cromatografía en DEAE-celulosa

	Volumen total	Unidades/ml	Unidades totales	Proteína (mg/ml)	Recuperación %
Extracto crudo	5	1280	6400	6,4	100
Precipitado 70 %... ..	5	890	4450	3,9	69
Fracción DEAE-celulosa ...	5	880	4150	0,3	64

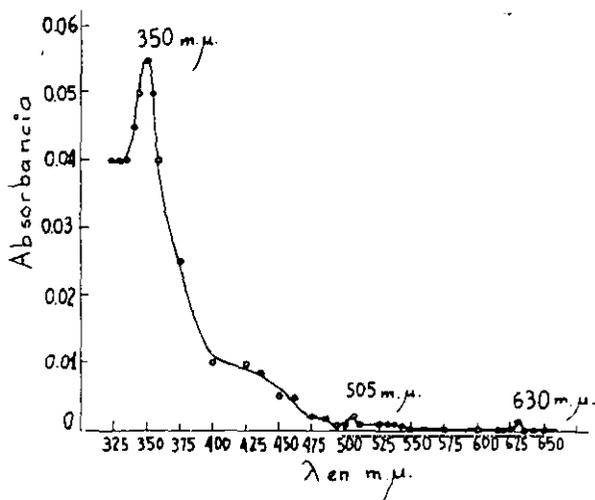


Fig. 2.—Espectro de absorción de la fracción 2 obtenida por cromatografía en DEAE-celulosa. Se encuentran tres máximos: a 350, 505 y 630 $m\mu$.

Estabilidad de la catalasa de *P. campestris*.

Se pudo comprobar que los extractos crudos perdían rápidamente la actividad y la inactivación iba acompañada por un oscurecimiento; esto hizo pensar si los altos niveles de polifenol oxidasa existentes en *Psalliotá campestris* serían responsables de la inactivación. Sin embargo, no es éste el único factor a considerar, pues inhibidores de la polifenol oxi-

dasa, como la tiourea y la cisteína, no mostraban ningún efecto protector de la actividad, a pesar de impedir el oscurecimiento de los extractos. La acetona tampoco protegía la actividad, ni tampoco el etil mercaptano; éste, además, ejercía un ligero efecto inhibitor.

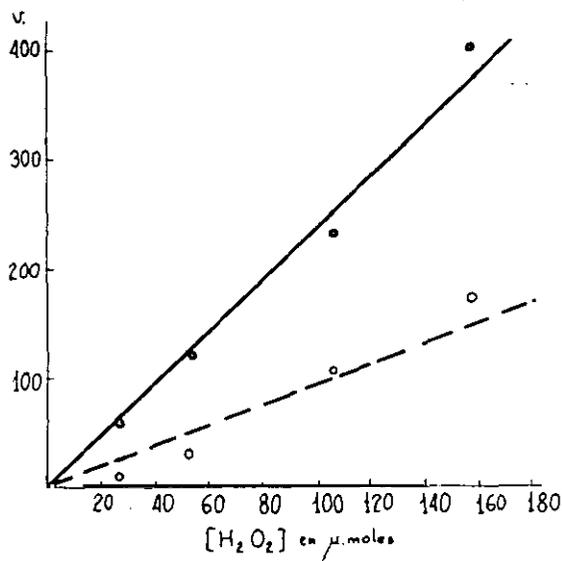


Fig. 3.—Dependencia de la velocidad de reacción respecto a la concentración del sustrato en presencia y ausencia de inhibidor. (●—●), extracto crudo. (○—○), extracto crudo incubado con la concentración de nicotinamida que produce una inhibición del 50 %.

Cinética e inhibición de catalasa de P. campestris.

a) Cinética: Los estudios cinéticos nos llevan a resultados similares a los obtenidos por Theorell; la relación entre concentración de sustrato y velocidad de reacción sigue una línea recta (fig. 3). No parece existir verdadera constante de Michaelis, como se deduce de la representación de Lineweaver & Burk (fig. 4).

b) Inhibición: Tratando de encontrar protectores de la actividad catalásica se utilizó de modo empírico la nicotinamida, encontrándose un efecto inhibitor que se estudió más a fondo. La concentración que

producía el 50 % de inhibición era 0,79 M. La cinética de inhibición se estudió en extractos crudos, a los que se añadió nicotinamida hasta alcanzar el 50 % de inhibición. Los resultados se muestran en las figuras 3 y 4.

Paralelamente se midió el cambio en el espectro de absorción del extracto crudo producido por diversas concentraciones de inhibidor, observándose un aumento de la absorción proporcional a la cantidad de inhibidor añadida.

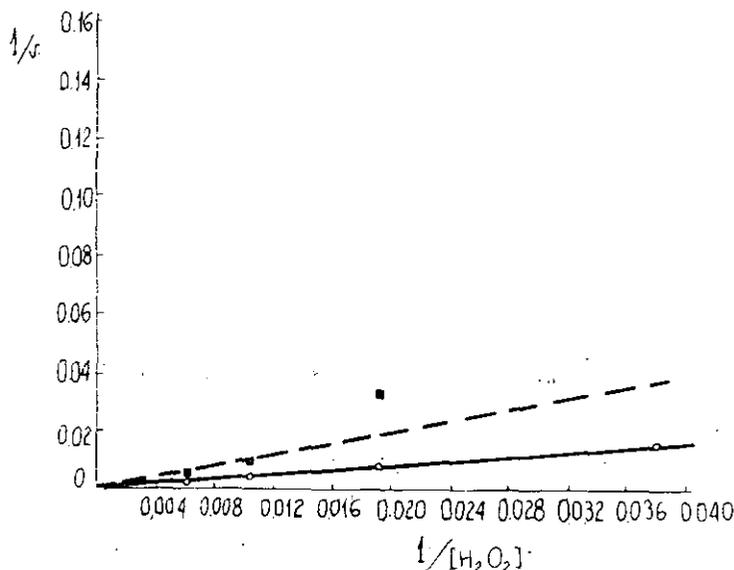


Fig. 4.—Representación según la ecuación de Lineweaver & Burk de los resultados de la figura 3. (○ ——— ○), extracto crudo; (■ - - - ■) extracto con inhibidor.

DISCUSIÓN

El procedimiento de lisis descrito por HERBERT (16) causa no sólo la ruptura de la pared celular de *M. lysodeikticus*, sino también la del protoplasto, con lo cual pasan al lisado componentes subcelulares que necesitan ser eliminados por separación con disolventes orgánicos. Nuestro procedimiento elimina este paso y el consecuente peligro de desnaturalización siguiendo un método de lisis controlada descrito por STREINER & BEERS (15).

La rápida inactivación de los extractos crudos de *P. campestris*, de igual magnitud que la de las fracciones parcialmente purificadas, parece concordar con la estructura polimérica propuesta para la catalasa (8) y su desdoblamiento en protómeros inactivos.

La cinética de la catalasa de *P. campestris* no difiere de la procedente de otras fuentes, según se deduce de nuestros estudios comparados con trabajos en que se utilizó la misma técnica para catalasa de otras fuentes (5). Sin embargo, estudios recientes (6), realizados en tiempos de reacción muy reducidos, demuestran la existencia de una cinética de Michaelis para la reacción inicial.

De los resultados obtenidos para la cinética de inhibición no podemos concluir de qué tipo de inhibición se trata. Los resultados apuntan hacia una inhibición de tipo competitivo. Las variaciones en el espectro de absorción sugieren la combinación reversible de la nicotinamida con el grupo hemo, según los trabajos de OGURA & al. (9).

RESUMEN

Se ha cristalizado la catalasa de *Micrococcus lysodeikticus* por un procedimiento sencillo, empleando lisis controlada.

La catalasa de *Psalliota campestris* ha sido purificada 13,8 veces por cromatografía en DEAE-celulosa, y 2,3 veces por adsorción en gel de fosfato cálcico.

Se ha comprobado la poca estabilidad en solución de la catalasa de *P. campestris* y se ha estudiado el efecto de varios compuestos sobre los extractos crudos.

La inhibición de la catalasa por nicotinamida ha sido estudiada por procedimientos cinéticos y espectros de absorción que sugieren una combinación reversible del inhibidor con el grupo hemo.

Cátedra de Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias
Universidad de Madrid

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Loew, O. — 1901 — Rep. U. S. Dep. Agric. N., 68: 47.
- (2) Maehly, A. C. — 1954 — Methods of Biochemical Analysis — (D. Gilck Ed.), Interscience. New York, vol. 1, p. 357.
- (3) Sumner, J. B. & Dounce, A. L. — 1937 — J. Biol. Chem., 121: 417.

- (4) Herbert, D. & Pinsent, J. — 1948 — *Biochem. J.*, 43: 193.
- (5) Bonnichsen, R. K., Chance, B. & Theorell, H. — 1947 — *Act. Chem. Scand.*, 1: 685.
- (6) Jones, P. & Sugget, A. — 1968 — *Biochem. J.*, 110: 617.
- (7) Jones, P. & Sugget, A. — 1968 — *Biochem. J.*, 110: 621.
- (8) Jones, P. & Sugget, A. — 1968 — *Biochem. J.*, 108: 833.
- (9) Ogura, Y., Tonomura, Y., Hino S. & Tamiya, H. — 1950 — *J. Biochem.*, 37: 153.
- (10) Peizer, L. R. & Widelock, D. — 1955 — *The Am. Rev. of Tuberc. and pulm. diseases*, 71: 305.
- (11) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. — 1951 — *J. Biol. Chem.*, 193: 265.
- (12) Eggstein, M. & Kreutz, F. H. — 1955 — *Klin. Wochschr.*, 33: 879.
- (13) Tiselius, A., Hjertén, S. & Levin, Ö. — 1956 — *Arch. Biochem. and Biophys.*, 65: 132.
- (14) Seubert, W. & Remberger, V. — 1961 — *Biochem. Z.*, 334: 401.
- (15) Steiner, R. F. & Beers, R. F. — 1961 — *Polynucleotides* — Elsevier P. C. Amsterdam.
- (16) Herbert, D. — 1954 — *Methods in Enzymology* — (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. Ed.) Academic Press, New York, vol. 2, p. 784.