

ESTUDIO DE UNA GLUTAMATO DESHIDROGENASA
HALOFILICA

Tesis de Licenciatura

M^a del Carmen Sanchez Jiménez

T-136

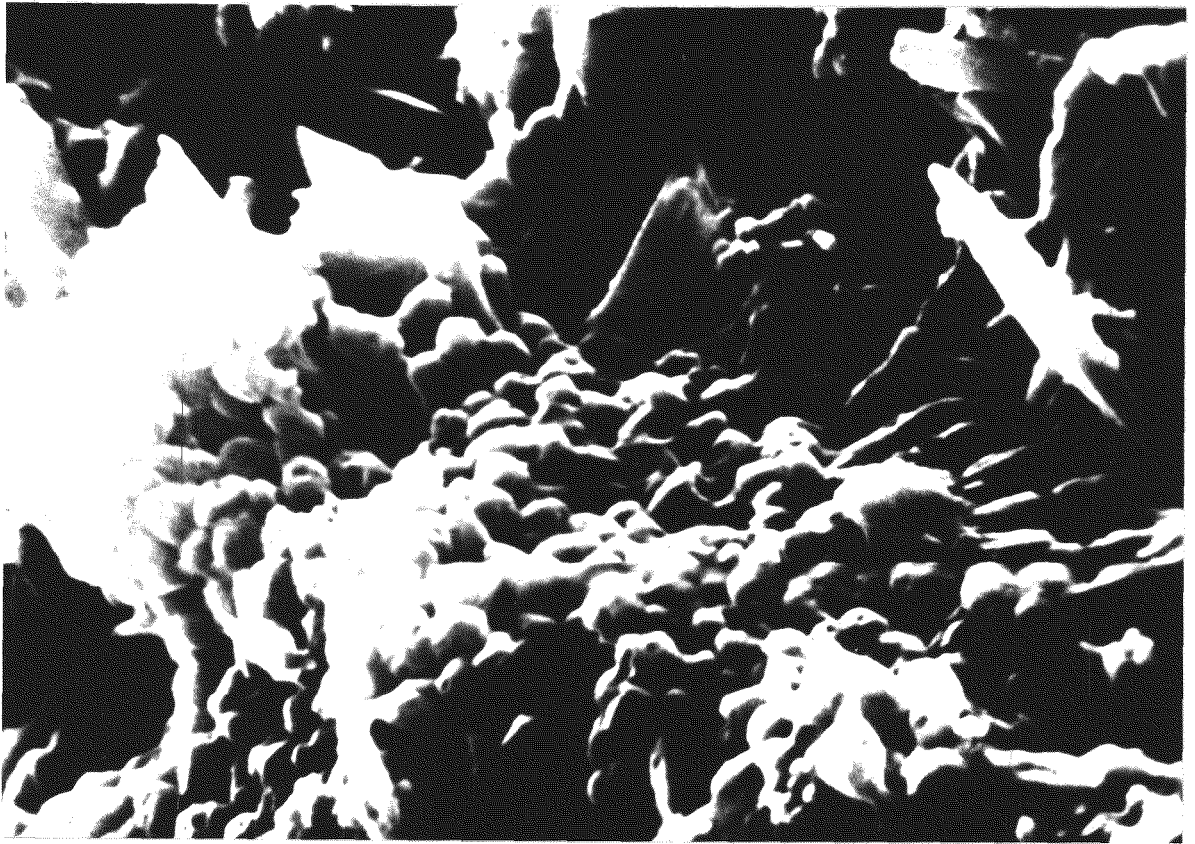
ESTUDIO DE UNA GLUTAMATO DESHIDROGENASA
HALOFILICA

Tesis de Licenciatura

M^a del Carmen Sanchez Jiménez

FOTOGRAFIA 1

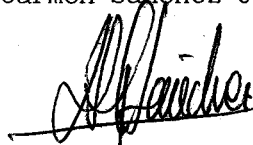
CELULAS DEL ORGANISMO HALOFILO H. mediterranei



" ESTUDIO DE UNA GLUTAMATO DESHIDROGENASA HALOFILICA "

Trabajo realizado para aspirar al
Grado de Licenciada en Farmacia por:

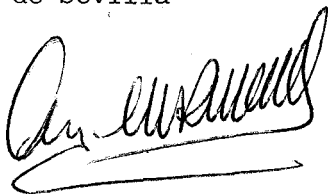
M^a del Carmen Sánchez Jiménez



Sevilla, Octubre 1.986

DIRECTOR

Angel M^a Relimpio Ferrer
Catedrático del Departamento
de Bioquímica de la Facultad
de Farmacia de la Universidad
de Sevilla

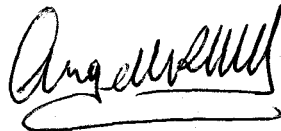


D. ANGEL M^a RELIMPIO FERRER, Catedrático del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA

Que el trabajo de investigación para optar al grado de Licenciada en Farmacia, presentado por M^a del Carmen Sánchez Jiménez, bajo el título "ESTUDIO DE UNA GLUTAMATO DESHIDROGENASA HALOFILICA", ha sido realizado en este Departamento, bajo su dirección, reuniendo este estudio todas las condiciones necesarias para optar a dicho grado.

Sevilla, Octubre 1.986

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Angel M. Relimpio Ferrer', with a horizontal line underneath.

Angel M^a Relimpio Ferrer

Al finalizar la preparación de esta Tesina quiero hacer constar mi gratitud a todas las personas que han hecho posible que llegara a su término.

En primer lugar citar a mis padres y a mi hermana. Ellos han sabido favorecer sin la menor coacción el desarrollo de mis inquietudes.

La ayuda y apoyo que en todo momento me ha brindado Francisco J. G. Muriana, ha sido tan importante, que sin ella no habría sido posible la realización de esta Tesina. Gracias a su ejemplo he aprendido que tras una ayuda no siempre tiene que haber un interés.

Me complace citar a D. Angel M^a Relimpio, por la confianza que depositó en mi desde el principio hasta el final de mi trabajo.

No quiero olvidar a mis compañeros de Departamento M^a Carmen Alvarez-Ossorio y Juan Diego Rodulfo. Se que puedo contar siempre con su amistad.

A los Departamentos de Bioquímica tanto de la Facultad de Químicas como de la Facultad de Biológicas debo agradecer el ofrecimiento de todas sus instalaciones.

Mi gratitud a D. Luis Catalina y a todos los componentes del Departamento de Bioquímica y Fisiología Vegetal del Centro de Edafología (CSIC) por sus aportaciones tanto de tipo material como de amistad.

Por último no debo olvidar a los componentes del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia muy especialmente a Carolina Sousa, no tanto por su ayuda material que considero importante, como por el cariño que sabía iba a encontrar solo con atravesar un pasillo.

A todo lo que amo

I N D I C E

INDICE

I INTRODUCCION	1
II MATERIAL Y METODOS.....	13
1. MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	13
1.1 Organismo.....	13
1.2. Cultivo de células.....	13
1.2.1. Medios de cultivo.....	13
1.2.1.1. Medios líquidos.....	13
1.2.1.2. Medios sólidos.....	14
1.2.2. Obtención de masa celular.....	15
1.2.3. Pureza de los cultivos.....	15
1.2.4. Mantenimiento de las células.....	15
2. ESTUDIOS ENZIMÁTICOS.....	16
2.1. Soluciones amortiguadoras.....	16
2.2. Recogida de células.....	17
2.3. Preparación de extractos acelulares.....	17
2.3.1. Rotura mediante Prensa de French.....	17
2.3.2. Desintegración mediante ultrasonidos.....	18
2.3.3. Rotura mediante abrasión con alúmina.....	19

2.3.4. Lisis osmótica.....	19
2.4. Ensayo de la actividad GDH.....	20
2.4.1. Aminación reductiva.....	20
2.4.1.1. Dependiente de NADPH.....	20
2.4.1.2. Dependiente de NADH.....	21
2.5. Ensayo de la actividad MDH.....	21
2.6. Ensayo de la actividad AAT.....	21
2.7. Ensayo de la actividad MDR.....	22
2.8. Purificación parcial de la GDH.....	22
2.8.1. Precipitación con sulfato amónico.....	22
2.8.2. Cromatografía en columna.....	23
2.8.2.1. Cromatografía hidrofóbica de Sefarosa CL-4B.....	23
3. METODOS ANALITICOS Y TECNICAS EXPERIMENTALES.....	24
3.1. Determinación de proteínas.....	24
3.2. Centrifugaciones.....	25
3.3. Determinaciones espectrofotométricas.....	25
3.4. Dialisis.....	26
3.5. Medidas de pH.....	27
3.6. Determinación de la concentración de sales.....	27
3.7. Técnica para la observación con microscopía electrónica de barrido.....	27

3.8. Electroforesis.....	28
III RESULTADOS	30
1. COMPARACION DE LOS METODOS DE ROTURA EMPLEADOS Y NIVELES ENZIMATICOS EN <u>H. mediterranei</u>	31
1.1. Rotura mediante Prensa de French.....	31
1.2. Desintegración mediante ultrasonidos.....	33
1.3. Rotura mediante abrasión con alúmina.....	33
1.4. Lisis osmótica.....	35
1.5. Tratamiento con shock térmico.....	35
2. PURIFICACION PARCIAL DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA.....	36
2.1. Obtención del extracto crudo.....	37
2.2. Fraccionamiento con sulfato amónico.....	37
2.3. Cromatografía en Sepharose CL-4B.....	40
3. CARACTERIZACION Y PROPIEDADES DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA.....	42
3.1. Estabilidad con respecto al tiempo.....	42
3.2. Sistema donador de electrones.....	42
3.3. pH óptimo.....	44
3.4. Efecto de las concentraciones de sal y pH.....	44
3.5. Efecto de las sales en el pH de las soluciones tampones.....	47

3.6. Temperatura óptima.....	47
3.7. Estabilidad a distintas temperaturas.....	50
3.8. Aplicación de la ecuación de Arrhenius.....	50
3.9. Parámetros cinéticos.....	53
3.9.1. Determinación de la Km para el α -cetoglutarato.....	55
3.9.2. Determinación de la Km para el ión amonio.....	55
3.9.3. Determinación de la Km para el NADPH.....	58
3.10. Inactivación y reactivación por cambios en la concentración de sales.....	58
3.11. Efecto de diferentes aniones y cationes.....	60
3.12. Efecto de la relación NaCl/KCl.....	64
3.13. Especificidad de sustratos.....	67
3.14. Análisis electroforético.....	67
IV. DISCUSION.....	69
A. PURIFICACION.....	70
B. CARACTERIZACION Y PROPIEDADES.....	82
V. CONCLUSIONES.....	93
VI. BIBLIOGRAFIA.....	97

I N T R O D U C C I O N

I INTRODUCCION

Las glutamato deshidrogenasas (GDH) tienen un papel fundamental en el metabolismo de los aminoácidos tanto en los procesos degradativos como en los biosintéticos, si bien la importancia en ambas rutas es muy diferente según el organismo estudiado (4, 8, 9, 17).

Estas enzimas catalizan unas reacciones que ocupan una posición fundamental en el metabolismo, puesto que se encuentran en un posición central en la ruca que lleva al nitrógeno amínico de los aminoácidos al ser incorporado en el nitrógeno ureico, via principal de excreción del nitrógeno en los animales ureotélicos (57). Por otro lado estas reacciones son el primer eslabón que une el metabolismo de los aminoácidos con el de los hidratos de carbono y también proporciona una ruta por la cual el átomo de nitrógeno amónico puede ser incorporado para la biosíntesis de otros compuestos nitrogenados de gran interés biológico, aunque esta ruta es de menor importancia (87).

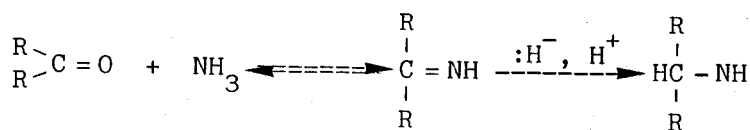
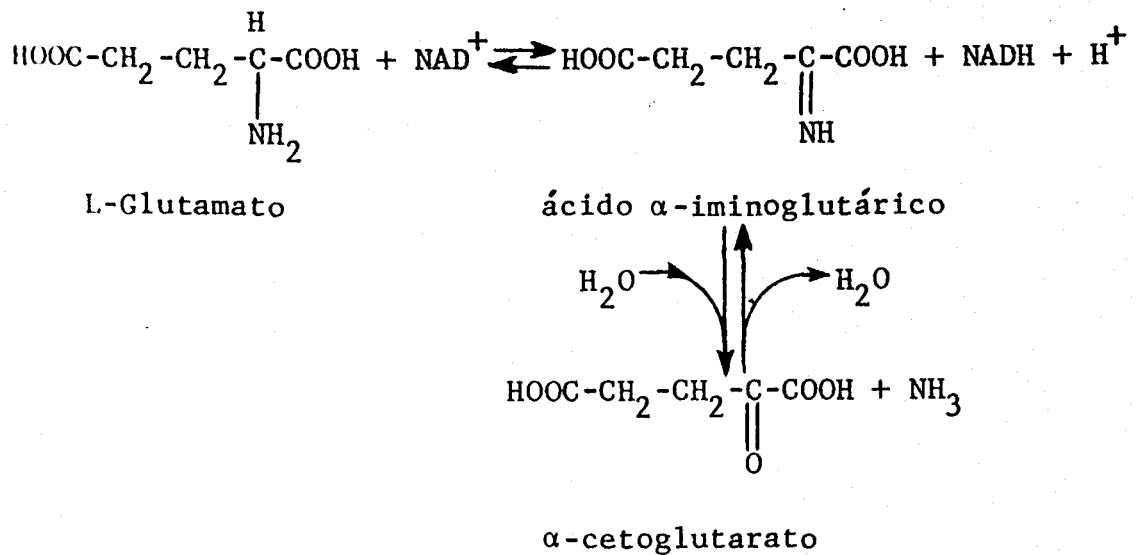
Tres glutamato deshidrogenasas han sido clasificadas y distinguidas en base unicamente a la especificidad del cofactor, ya que desde

el punto de vista químico el proceso catalizado por ella es lógicamente el mismo (58, 59).

La glutamato deshidrogenasa de animales superiores se caracteriza por poder utilizar a los dos tipos de nucleótidos de piridina fisiológicamente activos NADP^+ y NAD^+ como agentes oxidantes. Esta enzima es clasificada como glutamato deshidrogenasa NAD(P) o L-glutamato NAD(P) oxidoreductasa (desaminante) E.C. 1.4.1.3. En estos casos la mayoría de las especies pueden utilizar indistintamente cualquiera de los dos nucleótidos si bien siempre presenta una preferencia por uno de ellos (57, 2, 84, 79).

La glutamato deshidrogenasa de bacterias, tales como la de E. coli o S. typhimurium tienen una glutamato deshidrogenasa solamente dependiente de NADP^+ . Por ello está clasificada como L-glutamato NAD(P) oxidoreductasa (desaminante) E.C. 1.4.1.4. (31, 85, 91). Mientras que otras bacterias como Rhodospirillum rubrum y ciertas especies de Clostridium, contienen una enzima dependiente de NAD^+ (L-glutamato NAD oxidoreductasa (desaminante) E.C. 1.4.1.2. (94). En Levadura, Neurospora crassa y otros tipos de bacteria se presentan dos tipos de enzima distintos una dependiente de NAD^+ y otra dependiente de NADP^+ (80).

Desde el punto de vista general estas enzimas catalizan el mismo proceso como antes hemos citado. La transformación del L-glutamato en α -cetoglutarato y amonio a la vez que el nucleótido de piridina correspondiente queda reducido. Este proceso que es llevado a cabo de una manera reversible, ya que la constante de equilibrio es próxima a uno, transcurre mediante dos reacciones consecutivas de las cuales solo una de ellas es catalizada por la enzima de una forma demostrada, mientras que la otra es un proceso de hidrólisis puramente químico (5).



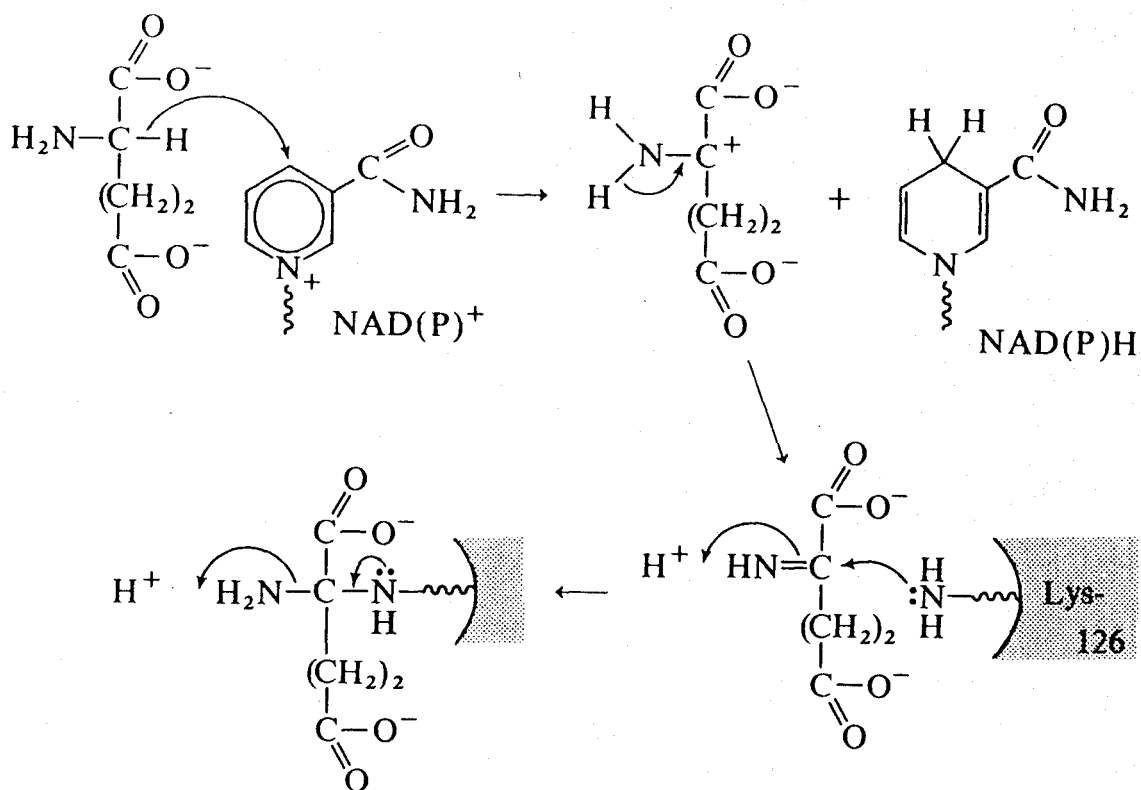
Sentido de aminación reductiva

El mecanismo de la reacción ha sido estudiado especialmente usando la enzima procedente del hígado de buey, la cual localizada en las mitocondrias, se encuentra allí en una alta concentración (36).

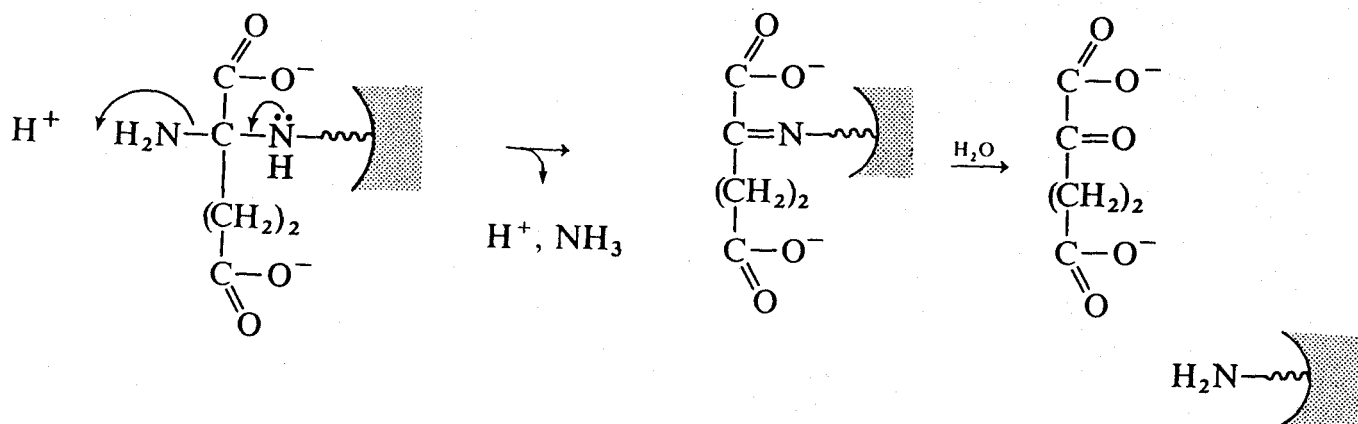
Los estudios realizados con agentes reductores como borohidruro sódico, ponen de manifiesto que como producto intermedio se encuentra una base de Schiff formada por el cetoácido y el grupo amino de un resto de Lisina 127. Los estudios cinéticos han indicado que la reacción procede por un mecanismo secuencial, puesto que cuando los estudios de la velocidad inicial fueron realizados representando los inversos de la velocidad frente a los inversos de la concentración de glutamato con concentraciones fijas del agente oxidante, se obtuvieron resultados de acuerdo con tal mecanismo. Sin embargo cuando se hicieron experimentos de intercambio isotópico se observó que si bien el mecanismo es secuencial, no está totalmente ordenado, ya que en determinadas condiciones de concentración puede existir una unión desordenada (86).

De estos resultados se ha formulado el siguiente esquema en el cual la formación de una base de Schiff intermedia juega un papel fundamental, ya que en un determinado paso se procede a través de una transaminación, lo que es cinéticamente más favorable que la interacción de un

grupo amino con un grupo ceto para la formación de la citada base. El mecanismo en el sentido degradativo comienza con la fijación de la glutamato a la enzima sufriendo el proceso de oxidación, lo que permite la formación de un imino ácido y un fácil ataque por parte del grupo amino distal del resto Lisina 167 al carbono imínico, dando lugar a un proceso de transaminación y posteriormente a la formación de un base de Schiff entre el resto de Lisina y un cetoácido.



Posteriormente esta base de Schiff sufre un proceso de hidrólisis que permite la formación libre del cetoácido (13).



Esta enzima procedente del hígado de buey ha demostrado ser un hexámero de subunidades idénticas. Cada una de estas subunidades está formada por unos 500 aminoácidos y contiene una determinada cantidad de átomos de Zn, parece ser que un átomo por subunidad, cuya misión es puramente estructural ya que la separación de estos iones por la presencia de quelantes de iones pesados como es la 1,10-0-fenantrolina lleva consigo la disociación de las subunidades y con ello la pérdida de actividad. Esta acción puede ser revertida por la adición de los átomos de Zn (74, 67, 55).

La actividad de esta enzima está regulada por múltiples factores; en un principio parece ser que la presencia de los propios reactivos que intervienen en la reacción pueden dar lugar a un proceso cooperativo negativo, lo que explica algunos de los resultados anómalos que se exhiben en las representaciones de los inversos de las velocidades frente a los inversos de las concentraciones del piridín nucleótido en presencia de cantidades fijas de glutamato (20).

Por otro lado esta actividad glutamato deshidrogenasa puede ser modulada por ADP o GDP que facilitan su actividad al facilitar el estado de agregación de las diferentes subunidades. Así mismo parece que facilitan la unión del cofactor. Estos cofactores así mismo evitan la acción inhibitoria de ciertas hormonas esteroídicas como es la progesterona o el estradiol o bien de otras características como es la tiroxina las cuales actúan facilitando la separación de las diferentes subunidades (56). Por otra parte actúan como inhibidores el ATP y el GTP (19).

Todos estos datos antes citados y la localización de la enzima muy ligada a enzimas como las amino transferasas de distinta especificidad así como a las enzimas que intervienen en el ciclo de la urea, nos indica que aún el equilibrio de la reacción que cataliza es próximo a la unidad, fisiológicamente y debido a los cofactores que lo rodean,

su dirección fisiológica es la degradativa (13).

Un hecho curioso observado en esta enzima es el ser inhibido por el fosfato de piridoxal. En vista del papel tan importante que tiene este cofactor en el proceso de transaminación y en otras reacciones en las cuales están implicados los aminoácidos se intenta especular si el fosfato de piridoxal juega un papel determinante en el camino a seguir por el aminoácido, si es una desaminación oxidativa o una transaminación (13).

Si bien las glutamato deshidrogenasas tienen una misión preferentemente degradativa, no ocurre lo mismo en organismos inferiores. Así en Chlorella sorokiniana se ha encontrado una glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ que es inducible por ión amonio y que se caracteriza por una rápida pérdida de actividad si en el medio el ión amonio es sustituido por nitrato. Estos datos dan una clara muestra de que fisiológicamente esta enzima favorece un proceso puramente anabólico (23).

Entre las GDH mejor estudiadas en microorganismos, está la de Neurospora crassa de la cual se conoce la secuencia de 441 aminoácidos de los 452 que componen su molécula. Desde el punto de vista estructural no

presenta diferencias con las de animales superiores ya que un hexámero de subunidades idénticas con peso molecular de unos 48.800 daltons (7). Dentro de las glutamato deshidrogenasas de microorganismos hay que destacar la de los organismos termófilos (17), los cuales pueden presentar una actividad superior al 90% de la máxima, después de soportar una temperatura de 85°C durante una hora, si el pH se mantiene entre 6,2-7,6; si el pH se hace más ácido, mantienen la misma actividad pero solo si la temperatura no pasa de 75°C, mientras que en el caso de E. coli mantiene hasta el 90% de su actividad durante 5 minutos (91).

Logicamente con enzimas tan parecidas estructuralmente, la purificación de las glutamato deshidrogenasas de las diferentes fuentes, es muy similar. Se han utilizado fraccionamientos en sulfato amónico a diferentes grados de saturación y columnas de exclusión así como de cambio de ión. Si bien estos métodos han dado resultados muy aceptables, ultimamente los métodos de cromatografía de afinidad están simplificando mucho el problema (7, 17, 42). Así la enzima de Neurospora crassa ha sido purificada por este método utilizando una columna de Sephadex que tenía como ligando un residuo de N-carboxi-metil-glutamato (7).

Si bien esta enzima ha sido ampliamente estudiada desde el punto de vista evolutivo, poca atención se había prestado a las enzimas de microorganismos capaces de vivir en ambientes de salinidad extrema. Estos microorganismos presentan en su constitución unas proteínas con una característica no observada anteriormente y es la de un requerimiento absoluto de una alta concentración de sales para su estabilidad (35, 90, 68). Estos microorganismos son seres que viven normalmente en ambientes extremos como son las salinas y lagos salados (48), y pertenecen entre otros a los géneros Halobacterium, Haloferax, Haloarcula (89) y Halococcus (41). La importancia de conocer cuales son las características estructurales que requieren esta alta concentración de sales es lo que nos ha llevado a la purificación de una enzima, tan bien conocida en géneros superiores, para posteriormente poder estudiar en ella, cual es esta diferencia que le hace requerir una alta concentración salina, que en otros casos puede incluso provocar la precipitación proteica.

OBJETIVOS

A pesar de la diversidad de estudios efectuados sobre las glutamato deshidrogenasas de organismos superiores y microorganismos, tan solo hay una referencia fechada en el año 1977 sobre la glutamato deshidrogenasa de halófilas. En ella se hizo una descripción poco detallada

de algunas características de la enzima, pero sin estudios profundos sobre su comportamiento en ambientes extremos como los de su hábitat.

El objetivo de este trabajo de investigación es aportar más datos a los pocos existentes sobre la glutamato deshidrogenasa halofílica, sobre su purificación, propiedades y el comportamiento frente a las sales, características que hacen a las enzimas halofílicas un ejemplo único y muy atractivo en el campo de la Biología Molecular. Todo ello puede ser revelador de los mecanismos de adaptación de estos microorganismos a sus ambientes naturales.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

II MATERIALES Y METODOS

1. Material biológico empleado y condiciones de cultivo.

1.1. Organismo.

En el presente trabajo de investigación se ha empleado una bacteria halofílica extrema, Halobacterium mediterranei ATCC 33500, recientemente descrita (78), capaz de utilizar carbohidratos como fuente de energía. Esta estirpe se caracteriza por tener una pared gruesa, de material electrodenso al microscopio electrónico de transmisión y con un grosor de aproximadamente 25-85 nm, responsable de una gran resistencia a la rotura.

1.2. Cultivo de células.

1.2.1. Medios de cultivo.

Las células se cultivaron en medios de cultivo líquidos y sólidos.

1.2.1.1. Medios líquidos.

Como medio de cultivo líquido se utilizaba una solución compuesta por:

Extracto de levadura (Oxoid).....	0.5 %
Solución concentrada de sales (30 %).....	833.3 ml
Agua destilada.....	166.7 ml

La solución concentrada de sales constaba de:

NaCl.....234 g
MgCl₂ 6H₂O.....39 g
MgSO₄ 7H₂O.....61 g
CaCl₂.....1 g
KCl.....6 g
NaHCO₃.....0.2 g
NaBr.....0.7 g
H₂O csp.....1000 ml

El pH de los medios se ajustaba con NaOH 1N a 7.2 unidades. El medio se esterilizaba en autoclave a 120 °C durante 20 min. Para evitar la precipitación de las sales la esterilización de la solución acuosa-orgánica y la solución concentrada de sales se llevaba a cabo por separado. La medida del crecimiento celular se seguía turbidimétricamente midiendo a 680 nm la absorbancia de los cultivos.

1.2.1.2. Medios sólidos.

Los medios sólidos se preparaban añadiendo 12 g/l de agar (Difco) a los medios líquidos. En el caso de este tipo de medios la medida del crecimiento celular se llevaba a cabo por incubación del microorganismo en placas Petri, a 37 °C durante al menos una semana, después de la cual se contaban las colonias.

1.2.2. Obtención de masa celular.

Para obtener grandes masas de células, se preparaban inóculos de 10 ml en tubos de ensayo, a partir de ellos se obtenían inóculos posteriores en matraces Erlenmeyer de 250 ml y a partir de ellos se cultivaban las células en botellas Pyrex o matraces Erlenmeyer de 2 y 5 l según el caso.

Debido a la necesidad de aerobiosis estricta de estos microorganismos, los cultivos se sometían a agitación constante mediante borboteo con aire húmedo.

1.2.3. Pureza de los cultivos.

La pureza de los cultivos se determinaba rutinariamente mediante la toma de muestras en condiciones estériles y posterior extensión de las mismas sobre el medio sólido descrito. Las placas así inoculadas se incubaban a 37 °C y se observaban periódicamente durante una ó dos semanas, para comprobar la presencia o no de microorganismos contaminantes.

1.2.4. Mantenimiento de las células.

Las células se conservaban tras la siembra en tubos con medio sólido inclinado, a temperatura ambiente, durante períodos de 6 meses. Transcurrido ese tiempo los microorganismos se transferían a nuevos

tubos con medio sólido fresco.

En todos los casos los tubos se cerraban herméticamente con papel Parafilm, y se envolvían en bolsas de plástico para evitar la desecación de los medios.

2. Estudios enzimáticos.

2.1. Soluciones amortiguadoras.

La solución amortiguadora estándar empleada en la determinación de la actividad GDH, contenía: KCl 3.5 M, Tris-HCl 0.01 M, a pH 8.0.

El resto de las actividades enzimáticas (malato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa y menadiona reductasa), así como la actividad GDH tras el ensayo de métodos de rotura, se determinaban empleando como solución amortiguadora la compuesta por: KCl 3.5 M, fosfato 0.01 M, a pH 7.2 (solución amortiguadora BSK).

Otras soluciones amortiguadoras utilizadas en los procedimientos de purificación fueron:

- Solución A: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.73 M, fosfato 0.05 M, pH 6.6.
- Solución B: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.4 M, fosfato 0.05 M, pH 6.6.
- Solución C: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.9 M, fosfato 0.05 M, pH 6.6.

El resto de soluciones amortiguadoras se describen en los correspondientes lugares de mención.

Todas estas soluciones fueron filtradas a través de filtros Sartorius de 0.45 μm de poro.

2.2. Recogida de células.

Después de 4 días de incubación, las células se recogían por centrifugación a 10.000 rpm durante 30 min, a 15 °C, en una centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B, empleando un rotor GSA.

Se lavaban una vez con BSK y se resuspendían finalmente en la misma solución amortiguadora. El rendimiento celular obtenido fue variable dependiendo de la cantidad de medio empleado y el tiempo de incubación, si bien los valores rondaron la media de 20 g de células en peso húmedo por litro de cultivo crecido.

2.3. Preparación de extractos acelulares.

Para la preparación de extractos acelulares de H. mediterranei, se emplearon distintos métodos de rotura: prensa de French, tratamiento con ultrasonidos, abrasión con alúmina, lisis osmótica y shock térmico.

2.3.1. Rotura mediante Prensa de French.

Tras lavar las células, estas se resuspendían en BSK a la temperatura de 4 °C.

La suspensión así obtenida se pasaba por una Prensa de French 40.000 psi Assembly (Aminco Silver Spring, Maryland) en frío. Se hicieron varios ensayos a distintas presiones:

- a) 19.000 psi.
- b) 14.400 psi.
- c) 9.600 psi.
- d) 4.800 psi.

En la suspensión de células rotas se medía directamente la actividad menadiona reductasa (MDR). Posteriormente las células sin romper y los restos celulares se eliminaban por centrifugación a 167.000 x g (centrífuga Beckman L2 65B rotor tipo 50) durante 45 min, a 15 °C.

En los sobrenadantes así obtenidos se ensayaban las actividades GDH, MDH y AAT.

2.3.2. Desintegración mediante ultrasonido.

Las células lavadas se resuspendían en BSK, se enfriaban a 0 °C, y a continuación se sometían a los efectos de las ondas sónicas utilizando un sonicador Branson B-12, a 20 kHz y 90-100 W. Suspensiones del organismo se sonicaron de acuerdo con el siguiente esquema experimental:

- a) Durante un período de 4 min.
- b) Durante un período de 8 min.
- c) Durante 3 períodos de 1 min, pausa de 30 s entre sonicaciones.
- d) Durante 3 períodos de 3 min, pausa de 1 min entre sonicaciones.

La actividad MDR se medía directamente en las suspensiones de células rotas obtenidas. Los homogenados resultantes se centrifugaban a 167.000 x g durante 45 min, a 15 °C, en un rotor tipo 50. Los sobrenadantes se utilizaban como extractos crudos de partida, y en ellos se medían las actividades GDH, MDH y AAT.

2.3.3. Rotura mediante abrasión con alúmina.

La suspensión de microorganismos se colocaba en un mortero, previamente enfriado, junto con alúmina también fría en una proporción de 1:2 partes p/p. Las células se rompían por abrasión en el mortero durante 5 min, a 4 °C.

La pasta rosacea obtenida se resuspendía en solución amortiguadora BSK, y se medía directamente la actividad MDR. Las actividades GDH, MDH y AAT se medían en el sobrenadante obtenido tras la centrifugación a 167.000 x g durante 45 min, a 15 °C, para separar la alúmina y restos celulares.

2.3.4. Lisis osmótica.

La suspensión de microorganismos se diluía con solución amortiguadora de fosfato 0.05 M ("sin sales"), pH 7.2, hasta una concentración 1 M de KCl. Tras la agitación vigorosa a temperatura ambiente durante 30 min, se medía directamente la actividad MDR, y posteriormente la suspensión se centrifugaba a 167.000 x g durante 45 min, a 15 °C. En el sobrenadante se ensayaba las actividades GDH, MDH y AAT.

La reactivación de las actividades enzimáticas se llevaba a cabo por el siguiente procedimiento: los sobrenadantes hiposalinos fueron dializados contra 25 vol de solución amortiguadora de fosfato con KCl 2 M, a pH 7.2, o contra 25 vol de BSK, dos veces durante 10 h cada una. En ambas soluciones dializadas se ensaban las actividades enzimáticas.

2.3.5. Tratamiento con shock térmico (congelación-descongelación).

La suspensión de microorganismos se colocaba en un tubo metálico que estaba envuelto con un material ligero altamente aislante. La congelación se llevaba a cabo por inmersión del tubo en nitrógeno líquido toda la noche.

Tras la descongelación a temperatura ambiente, la actividad MDR se medía directamente sobre el extracto. Después se centrifugaban las células rotas a 167.000 x g durante 1 h, a 15 °C. Tras la centrifugación se obtenía un sobrenadante muy viscoso que se trataba con deoxirribonucleasa (1mg/ml), se agitaba durante 1 h a temperatura ambiente, y se centrifugaba como antes. En el sobrenadante así obtenido se medían las actividades GDH, MDH y AAT.

2.4. Ensayo de la actividad GDH.

2.4.1. Aminación reductiva.

2.4.1.1. Dependiente de NADPH.

El ensayo de la actividad GDH dependiente de NADPH se realizaba espectrofotométricamente a 340 nm, siguiendo la desaparición del NADPH, en una mezcla de reacción que contenía en un volumen de 1 ml: NADPH 0.3 mM, NH_4Cl 100 mM, α -cetoglutarato 5 mM, KCl 2.8 M y Tris-HCl 10 mM, a pH 8. La reacción se iniciaba por la adición del cetoadido.

2.4.1.2. Dependiente de NADH.

La actividad GDH dependiente de NADH se determinaba de la misma forma y en las mismas condiciones que en el caso anterior, sustituyendo en este ensayo el NADPH por NADH a la misma concentración.

2.5. Ensayo de la actividad MDH.

El ensayo de la actividad MDH se realizaba espectrofotométricamente a 340 nm, siguiendo la desaparición del NADH, en una mezcla de reacción que contenía en un volumen final de 1 ml: NADH 0.3 mM, oxalacetato 4 mM, KCl 2.8 M y fosfato 10 mM, a pH 7.2. La reacción se iniciaba por la adición del oxalacetato.

2.6. Ensayo de la actividad AAT.

El ensayo de la actividad AAT se realizaba espectrofotométricamente a 340 nm, siguiendo la desaparición del NADH, en una mezcla de reacción que contenía en un volumen final de 1 ml: aspartato 100 mM, NADH 0.3 mM, 60 U de MDH de corazón de cerdo, α -cetoglutarato 10 mM, KCl

2.8 M y fosfato 10 mM, a pH 7.2. El inicio de la reacción se conseguía por la adición del cetoácido.

2.7. Ensayo de la actividad MDR.

El ensayo de la actividad MDR se realizaba espectrofotométricamente a 340 nm, siguiendo la desaparición del NADH, en una mezcla de reacción que contenía en un volumen final de 1 ml: menadiona 0.4 mM, KCN 2 mM, NADH 0.3 mM, KCl 3 M y fosfato 10 mM, a pH 7.2. En este caso la actividad enzimática se iniciaba por la adición del NADH.

Dada la sensibilidad a la luz que presenta esta enzima, todas las manipulaciones se hicieron en condiciones de semioscuridad.

2.8. Purificación parcial de la GDH.

2.8.1. Precipitación con sulfato amónico.

La precipitación con sulfato amónico se empleaba como paso intermedio de purificación.

Una primera precipitación se conseguía dializando el homogenado, obtenido tras la rotura de las células y centrifugación de las mismas, contra 20 vol de solución amortiguadora A (sulfato amónico 1.73 M y fosfato 0.05 M, a pH 6.6) durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, los dializados se centrifugaban durante 30 min a 167.000 x g, a 15 °C.

Seguidamente, al sobrenadante obtenido se le adicionaba sulfato amónico sólido hasta conseguir una concentración final de 2.4 M. A tal fin se empleaba la siguiente fórmula polinómica:

$$g = \frac{533 \times (S1-S2)}{1 - 0.3 \times S2}$$

g = gramos de sulfato amónico a añadir por litro de extracto.

S1 = concentración de sulfato amónico en tanto por uno del extracto inicial.

S2 = concentración de sulfato amónico en tanto por uno que se quiere alcanzar.

2.8.2. Cromatografía en columna.

2.8.2.1. Cromatografía hidrofóbica de Sefarosa CL-4B.

Se llevaba a cabo para la purificación parcial de la enzima en estudio. Para ello, se utilizaba una columna de vidrio (1.6 x 100 cm) suministrada por LKB Produkter AB (Suecia). El gel empleado fue Sepharose CL-4B, con alta resistencia a las condiciones extremas típicamente desnaturalizantes, suministrado por Pharmacia Fine Chemicals AB (Suecia).

El empaquetamiento y equilibrado de la columna, así como la elución de las muestras y soluciones, se efectuaron con una bomba peristáltica LKB 2132. Las velocidades de flujo utilizadas fueron de 40-50 ml/h para el empaquetamiento, y de 10-25 ml/h para las elu-

ciones. La altura alcanzada por el lecho de gel fue generalmente de 40 cm.

Las fracciones se recogieron automáticamente con un colector LKB Ultrorac 7000. Finalmente, el contenido de proteínas de los eluatos (generalmente de 4.8 ml/tubo) se registraba midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro PYE Unicam.

Todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

3. Métodos analíticos y técnicas experimentales.

3.1. Determinación de proteínas.

La cantidad de proteínas se determinaba generalmente según el método de Lowry et al. (54), que utiliza el reactivo fenólico de Folin-ciocalteau. Se utilizaba sobre todo para la detección de rangos de proteínas entre 10-100 $\mu\text{g/ml}$. Las medidas colorimétricas, tanto de la proteína patron como de los problemas, se hicieron a 640 nm.

Para determinaciones más precisas en muestras con rangos de proteínas entre 8-40 $\mu\text{g/ml}$ se utilizaba el método de Schacterle y Pollack (82), en su modalidad de microensayo. Las medidas de absorbancia para la determinación de proteínas se llevaba a cabo a 650 nm.

En ambos casos se utilizaba como proteína patrón seroalbúmina bovina (0.5 mg/ml).

La medida directa de proteínas se llevaba a cabo mediante medida espectrofotométrica a 280 nm en un espectrofotómetro PYE Unicam.

3.2. Centrifugaciones.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo empleando centrífugas refrigeradas Sorvall modelos RC-2B y RC-5B. Según los volúmenes a centrifugar se empleaban: rotor GSA (grandes volúmenes) y rotor SS-34 (pequeños volúmenes), a 10.000 rpm y 15.000 rpm, respectivamente.

En el caso de centrifugaciones a alta velocidad se empleaba una ultracentrífuga Beckman modelo L2-65B con rotor tipo 50, alcanzándose 40.000 rpm (167.000 x g).

La temperatura en todos los casos fue establecida entre 15 y 20 °C.

3.3. Determinaciones espectrofotométricas.

Las medidas colorimétricas se realizaron en un espectrofotómetro BAUSCH & LOMB Spectronic 70, con lectura digital incorporada Abatrón V.D.E. 812.

Las medidas cinéticas se siguieron en el espectrofotómetro antes mencionado y en un espectrofotómetro BAUSCH & LOMB Spectronic 2000.

Las medidas directas de proteínas se leyeron en el ultravioleta (280 nm) en un espectrofotómetro PYE Unicam SP 1750.

Se utilizaron cubetas de 1 cm de paso de luz y capacidad de 1 ml, siendo de cuarzo para las medidas a 280 nm. El coeficiente de extinción utilizado fue: $6.220 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ para el NAD(P)H. Todas las determinaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

3.4. Diálisis.

Las diálisis se llevaron a cabo en tres tipos diferentes de tripas o sacos de diálisis:

- Sigma 250-7U (grandes volúmenes).
- Sigma 250-9U (pequeños volúmenes).
- Sigma D-9277 (muy pequeños volúmenes).

Con el fin de eliminar sustancias que pudieran obstruir los poros de las tripas, se sometieron los dos primeros tipos (250-7U y 250-9U) a un tratamiento consistente en hervirlas 4 veces alternativamente en soluciones de bicarbonato 0.05 M y de EDTA 0.01 M. El lavado exhaustivo con agua destilada de las tripas con posterioridad a este tratamiento fue indispensable.

En el caso de sacos de diálisis D-9277, para eliminar la glicerina y los compuestos de sulfuro, y así procurar la limpieza total de los poros, se mantenían en agua de 3 a 4 h, a continuación se trataban con una solución de sulfuro de sodio a 80 °C durante 1 min. Luego

se lavaban con agua a 60 °C durante 2 min, y se acidulaban con una solución de ácido sulfúrico. Por último, para eliminar el ácido se lavaban con agua caliente.

3.5. Medidas de pH.

El pH de las disoluciones se determinaba en un pHmetro Crison pH/mV Meter Digit 501, con escala expandida y electrodo combinado de vidrio.

Como patrones se utilizaron soluciones comerciales (Crison y Merck) de pH 7.02 y 4.3.

Cuando solo se requería una medida aproximada, se utilizaban tiras de papel indicador (Merck) con una resolución de ± 0.5 unidades de pH.

3.6. Determinación de la concentración de sales.

La concentración de sales (fundamentalmente sulfato amónico), en las soluciones empleadas en los distintos estudios llevados a cabo, se determinaron con un conductivímetro CDM2d Radiometer. Para lo cual se necesitaron volúmenes mínimos de 20 ml de muestra, que se obtuvieron mediante diluciones sucesivas de las mismas.

3.7. Técnica para la observación con microscopía electrónica de barrido.

Para la observación al microscopio electrónico de barrido (MEB) se ha empleado el procedimiento de Tonosaki et al. (88) con modificaciones:

Una muestra de cultivo celular obtenida por centrifugación se trataba con una solución de glutaraldehído al 2.5 % y sales al 25 %, tamponada con cacodilato sódico 0.05 M, a pH 7.2. Seguidamente, y durante un período aproximado de 2 h, se mantenían las células a fijación a 4 °C. Una vez lavadas con solución amortiguadora de sales y cacodilato sódico, se procedía a una segunda fijación a tetróxido de osmio al 1 % en el mismo tampon durante 30 min. Transcurrido este tiempo se lavaba el exceso de osmio con varios pasos de solución salina al 25 % de 5 min cada uno.

La deshidratación de las células se realizaba con acetona diluida a concentraciones crecientes: acetona 30 %, 15 min; acetona 50 %, 15 min; acetona 70 %, 15 min; acetona 90 %, 15 min; acetona 100 %, 15 min; acetona 100 %, 30 min. Las células deshidratadas se procesaban para su visión en un microscopio ISI SS-40.

Las micrografías se obtuvieron sobre películas Kodak de 2.5 x 3.5 cm, que posteriormente se revelaban en papel fotográfico de la misma marca comercial.

3. 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Las separaciones se realizaron a temperatura ambiente en tubos de 8 x 0.5 cm Φ , con geles de poliacrilamida al 7.5% y pH 8.3, utilizando solución amortiguadora Tris-HCl en los geles, conteniendo TEMED al 0.46% (v/v), y solución amortiguadora Tris-glicina 40 mM a pH 8.3 como electrolito.

Las muestras (10-50 μ g) contenían glicerina al 50% (v/v) y azul de bromofenol al 0.05% (p/v), este último para visualizar el frente electroforético.

El proceso se iniciaba aplicando una corriente continua de intensidad constante a 1.5 mA/tubo durante 30 min y luego de 3 mA/tubo hasta que el colorante marcador alcanzaba el extremo inferior (ánodo).

RESULTADOS

III RESULTADOS

1. Comparación de los métodos de rotura empleados y niveles enzimáticos en *H. mediterranei*.

1.1. Rotura mediante Prensa de French (FP).

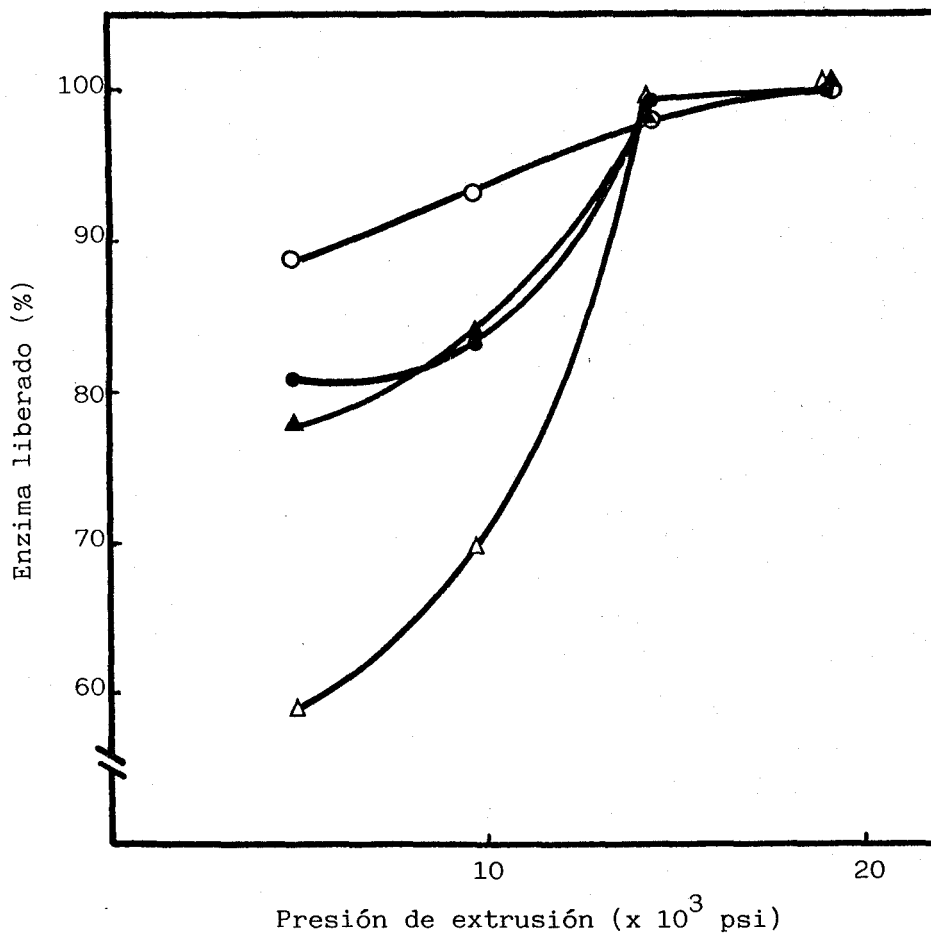
Las células de *H. mediterranei* rotas mediante cambio brusco de presión en presencia de altas concentraciones de sales, fueron fraccionadas en una suspensión de células rotas a la que se le determinó directamente la actividad MDR, y en una fracción citoplasmática obtenida por centrifugación a la que se le ensayó las actividades GDH, MDH y AAT.

Se emplearon diferentes presiones de extrusión, desde 19.200 a 4.800 psi. Las actividades MDR ensayadas en las suspensiones de membranas rotas se incrementaban al aumentar las presiones, al tiempo que aumentaban las actividades GDH, MDH y AAT ensayadas en los sobrenadantes (Figura 1). Las actividades más altas se obtuvieron sometiendo a las células a una presión de 19.200 y 14.400 psi.

Es importante reseñar la más lenta liberación de la enzima MDH respecto al resto de enzimas ensayadas, a las mismas presiones de rotura.

Figura 1.

Liberación de enzimas halofílicas mediante rotura celular con Prensa de French.



El procedimiento es el descrito en Materiales y Métodos.

100 % de actividades, obtenidas a 19.200 psi, fueron 72.5, 316.2, 147.4 y 22.0 mU/mg proteínas, para MDR (O), GDH (●), MDH (Δ) y AAT (\blacktriangle), respectivamente.

Cada punto representa la medida de determinaciones por triplicado.

1.2. Desintegración mediante ultrasonido (UD).

La energía sónica se empleó también para la rotura de células de H. mediterranei. La susceptibilidad a la rotura por ultrasonidos fue probada teniendo en cuenta los tiempos de exposición. Las actividades enzimáticas ensayadas en la suspensión de membranas rotas (MDR) y en los sobrenadantes tras la centrifugación (GDH, MDH y AAT) fueron máximas a 90 W de potencia durante un período de 4 min, a 4 °C (Figura 2). Las actividades enzimáticas llegaron a ser más altas que por el procedimiento de Prensa de French a 9.600 y 4.800 psi.

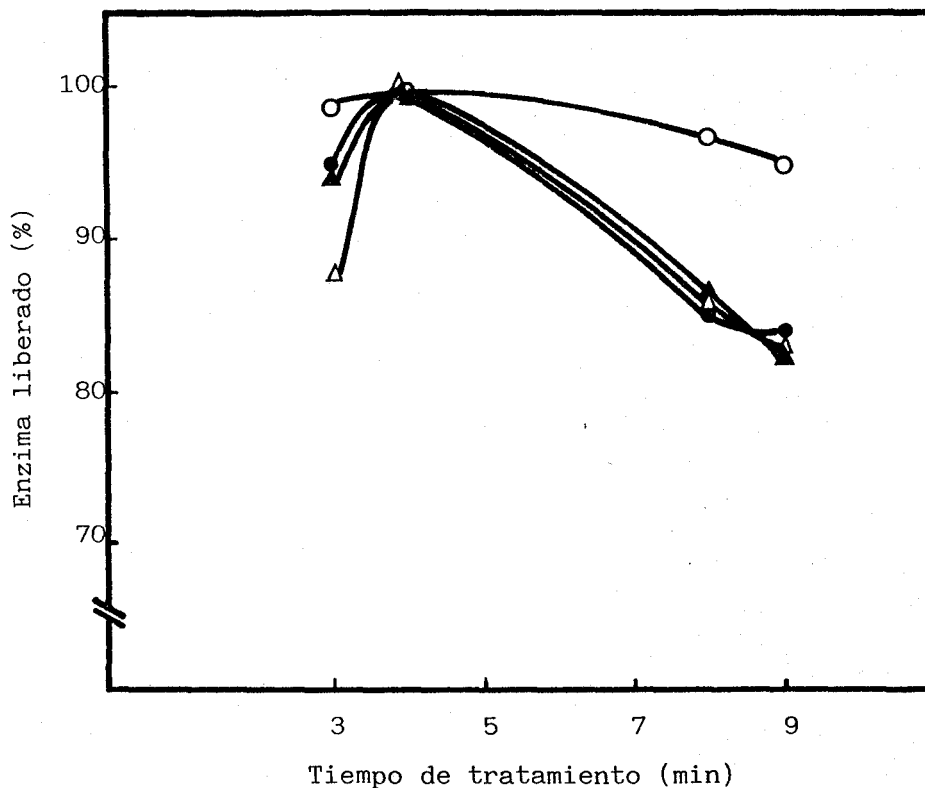
Cuando la rotura se llevó a cabo durante un período de 8 min ó tres períodos de 3 min con pausa, el rendimiento descendió. Fue, en éste sentido, imprescindible el mantenimiento de la temperatura a 0-4 °C para preservar la viabilidad enzimática.

1.3. Rotura mediante abrasión con alúmina (SS).

El efecto de rotura se consiguió por este procedimiento colocando la suspensión celular en un mortero y adicionando un agente con poderes abrasivos como la alúmina. A pesar del proceso vigoroso de abrasión, prolongado a veces durante más de 10 min, y siempre en frío, la actividad enzimática en la crema rosacea de la MDR fue muy baja, así como las actividades GDH, MDH y AAT medidas en el sobrenadante obtenido

Figura 2.

Liberación de enzimas halofílicas mediante rotura celular con ultrasonidos.



El procedimiento es el descrito en Materiales y Métodos.

100 % de actividades, obtenidas mediante sonicación durante un período de 4 min, fueron 68.9, 304.5, 109.2 y 20.2 mU/mg proteínas, para MDR (○), GDH (●), MDH (△) y AAT (▲), respectivamente.

Cada punto representa la medida de determinaciones por triplicado.

tras la centrifugación de la fracción de membrana (Tabla 1).

1.4. Lisis osmótica (OL).

Si una suspensión de microorganismos se sometía a shock osmótico con solución amortiguadora carente de sales, la rotura celular era efectiva. La concentración 1 M de KCl era suficiente para provocar la disgregación de los monómeros constituyentes de la pared celular de H. mediterranei, pero no se inactivaban irreversiblemente las enzimas citoplasmáticas estudiadas en el presente estudio. Este hecho fue comprobado cuando estas preparaciones hiposalinas fueron dializadas contra 2 ó 3.5 M de KCl, y fue observada la recuperación en un 127 a un 150 % de las actividades iniciales de GDH y MDH (Tabla 1). La enzima AAT permaneció inalterable.

1.5. Tratamiento con shock térmico (FT).

Los efectos de la congelación y descongelación de células de H. mediterranei, donde la formación de cristales de hielo intra- y extracelulares pueden dañar la célula, fueron ensayados. Por este procedimiento se observó la formación de distintas fracciones en los pasos de centrifugación y una viscosidad anormal de las mismas. La incubación de estas en presencia de deoxirribonucleasa no modificó

TABLA 1

Actividades GDH, MDH, AAT y MDR despues de la rotura celular mediante diferentes técnicas de rotura.

Tratamiento ^a	Actividad en sobrenadantes (mU/mg prot)			Actividad en células rotas (mU/mg prot)
	GDH	MDH	AAT	MDR
SS	66.5	30.4	8.8	26.8
OL	89.6	26.1	4.7	n.d.
OL ^{2.0 M} ^b	113.9	34.7	4.1	--
OL ^{3.5 M}	133.9	50.3	4.8	--
FT	74.7	38.6	10.1	35.1

^a Símbolos y procedimientos vienen descritos en Materiales y Métodos.

^b Índice superior indica la concentración molar de los sobrenadantes despues de la diálisis.

n.d.= no detectada.

Cada valor representa la medida de determinaciones por duplicado.

el grado de viscosidad detectado.

Las actividades obtenidas por este procedimiento fueron bajas, liberándose, como siempre, una mayor cantidad de GDH en comparación a las actividades MDH y AAT (Tabla 1). Sin embargo, los resultados obtenidos decepcionaron ya que, con el empleo de un material aislante que permitiría la formación de cristales grandes de hielo, solo se rompieron las células más que en el método de abrasión con alúmina.

2. Purificación parcial de la GDH.

2.1. Obtención del extracto crudo.

La GDH de H. mediterranei se purificó parcialmente a partir de un extracto libre de células obtenido mediante sonicación durante 4 min, a 4 °C. El sobrenadante de tonalidad rojiza (debida a los pigmentos liberados de la pared celular) y altamente viscoso (debido a la alta concentración de sales), obtenido después de la centrifugación a 167.000 x g durante 45 min, a 15 °C, fue considerado como el "extracto crudo". En todos los experimentos llevados a cabo se emplearon extractos crudos recientes.

2.2. Fraccionamiento con sulfato amónico.

El fin perseguido en el aislamiento o purificación de enzimas

es eliminar tan completamente como sea posible toda la proteína salvo la que posee la actividad enzimática específica deseada.

Pueden prepararse proteínas puras o fracciones de las mismas modificando cuidadosamente la fuerza iónica de una solución proteica y ajustando el pH de la solución al punto isoeléctrico de las proteínas (63).

En el caso de las enzimas halofílicas, recientemente se ha descrito el empleo de esta técnica mediante la formación de gradientes salinos con sulfato amónico. En nuestros estudios hemos observado que el sulfato amónico puede, bajo gradientes determinados, conseguir la precipitación de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei. Esto es lo que se denomina "fraccionamiento salino secuencial". Una aplicación de este procedimiento consiste en dializar extensivamente el extracto crudo contra una solución amortiguadora de sulfato amónico 1.73 M, centrifugar, y luego adicionar al sobrenadante la cantidad suficiente de sulfato amónico sólido hasta conseguir una concentración final de 2.4 M. En estas condiciones la glutamato deshidrogenasa se mantiene en el sobrenadante. Se obtienen, así, una purificación de dos veces y un rendimiento del 91.4 %, tal como en la Tabla 2 se indica.

TABLA 2.

Purificación parcial de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei.

Fracción	Proteínas totales (mg)	Actividad específica (U/mg prot)	Actividad total (U/mg prot T)	Rdto (%)	Purificación aumentada (veces)
Extracto crudo	340.9	0.229	78.1	100	-
Sobrenadante (NH ₄) ₂ SO ₄ 1.73 M	270.5	0.264	71.4	91.4	1.2
Sobrenadante (NH ₄) ₂ SO ₄ 2.4 M	187.2	0.379	71.0	90.1	2.0
Fracciones Sephacrose CL-4B	6.4	10.932	69.9	89.5	50.0

2.3. Cromatografía en Sepharose CL-4B.

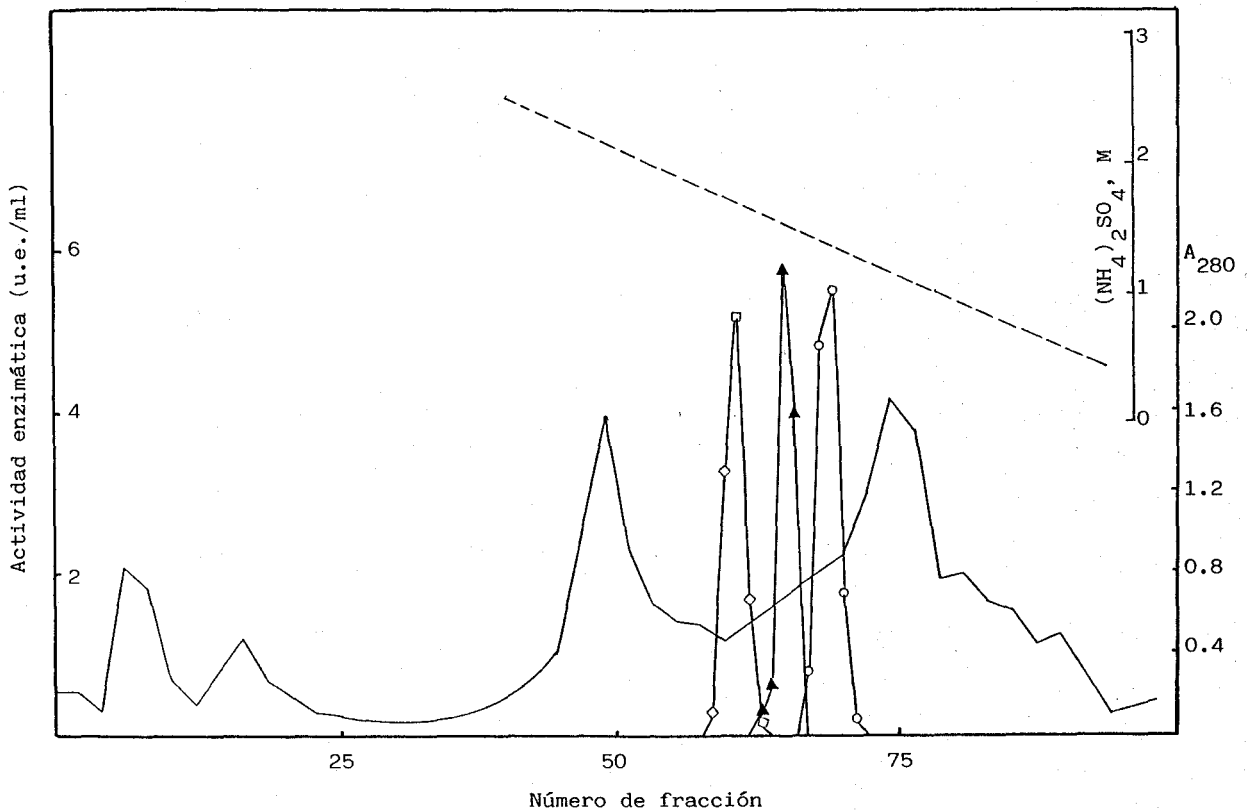
El sobrenadante, obtenido de la centrifugación del extracto llevado a la concentración 2.4 M de sulfato amónico tras 1 h de agitación, se hizo pasar por una columna de Sefarosa CL-4B equilibrada con varios volúmenes de columna de solución amortiguadora de sulfato amónico 2.4 M. Seguidamente se lavó con un volumen de columna de la misma solución amortiguadora, y después se aplicó un gradiente de concentración decreciente de sulfato amónico (2.4-0.9 M) para la elución de la glutamato deshidrogenasa (también se ensayaron las actividades malato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa), como se indica en la Figura 3.

De todas las fracciones se tomaron y mezclaron solamente las activas (glutamato deshidrogenasa 50 veces purificada), y fueron empleadas para la mayoría de los estudios de caracterización y otras propiedades de la enzima.

El procedimiento de purificación parcial resumido en la Tabla 2, permite obtener una preparación de glutamato deshidrogenasa (6.4 mg proteínas) con una actividad específica de 10.932 U/mg proteínas, lo que representa un factor de purificación de 50.

Figura 3.

Cromatografía hidrofóbica en Sepharose CL-4B.



El procedimiento experimental es el descrito en Materiales y Métodos.

El lecho de columna (100 x 1.6 cm) tenía una altura de 40 cm. Se emplearon 5 ml de extracto 2.4 M de sulfato amónico. El gradiente de concentración decreciente de sulfato amónico se estableció con 250 ml y 280 ml de soluciones 2.4 y 0.9 M de dicha sal.

Las alícuotas, recogidas mediante un flujo de 20 ml/h, fueron de 5 ml cada una.

- gradiente de concentración decreciente de sulfato amónico.
- medida de absorbancia a 280 nm (proteínas).
- actividad malato deshidrogenasa (MDH).
- actividad glutamato deshidrogenasa (GDH).
- ▲—▲ actividad aspartato aminotransferasa (AAT).

1 u.e. (unidad enzimática) = cantidad de enzima que produce un incremento de DO_{340} de 0.01 por minuto.

3. Caracterización y propiedades de la glutamato deshidrogenasa.

3.1. Estabilidad con respecto al tiempo.

La glutamato deshidrogenasa parcialmente purificada puede mantenerse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin pérdida significativa de su actividad.

La solución enzimática en solución amortiguadora de sulfato amónico 1.43 M, a pH 6.6, es estable a $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 8 semanas. A temperatura ambiente, la vida media de la actividad es de 48 horas aproximadamente.

Una repetida congelación de las preparaciones enzimáticas, así como una prolongada diálisis contra soluciones amortiguadoras de baja fuerza iónica, pueden producir pérdidas significativas de la actividad.

La estabilidad de la enzima no se modifica al cambiar la solución amortiguadora de fosfato antes descrita por otra equivalente de Tris-HCl.

3.2. Sistema donador de electrones.

La Tabla 3 muestra como la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei utiliza piridín nucleótidos reducidos como donadores de electrones. Existe una marcada especificidad de la enzima por el

TABLA 3

Sistema donador de electrones de la glutamato deshidrogenasa de H.mediterranei.

Donador	Concentración (mM)	Actividad ($\Delta DO_{340}/\text{min}$)	Actividad especifica (U/mg prot)
NADPH	6	2.560	15.70
NADH	6	0.004	0.03
FADH ₂	2	0.000	0.00
Acido ascórbico	12	0.000	0.00

Las condiciones de medida de la actividad enzimática fueron las descritas en Materiales y Métodos. Las preparaciones de glutamato deshidrogenasa halofílica contenían 532 μg de proteínas/ml.

NADPH como donador nativo de electrones (la actividad deshidrogenasa con NADH representa menos del 1 % de la conseguida con NADPH).

3.3. pH óptimo.

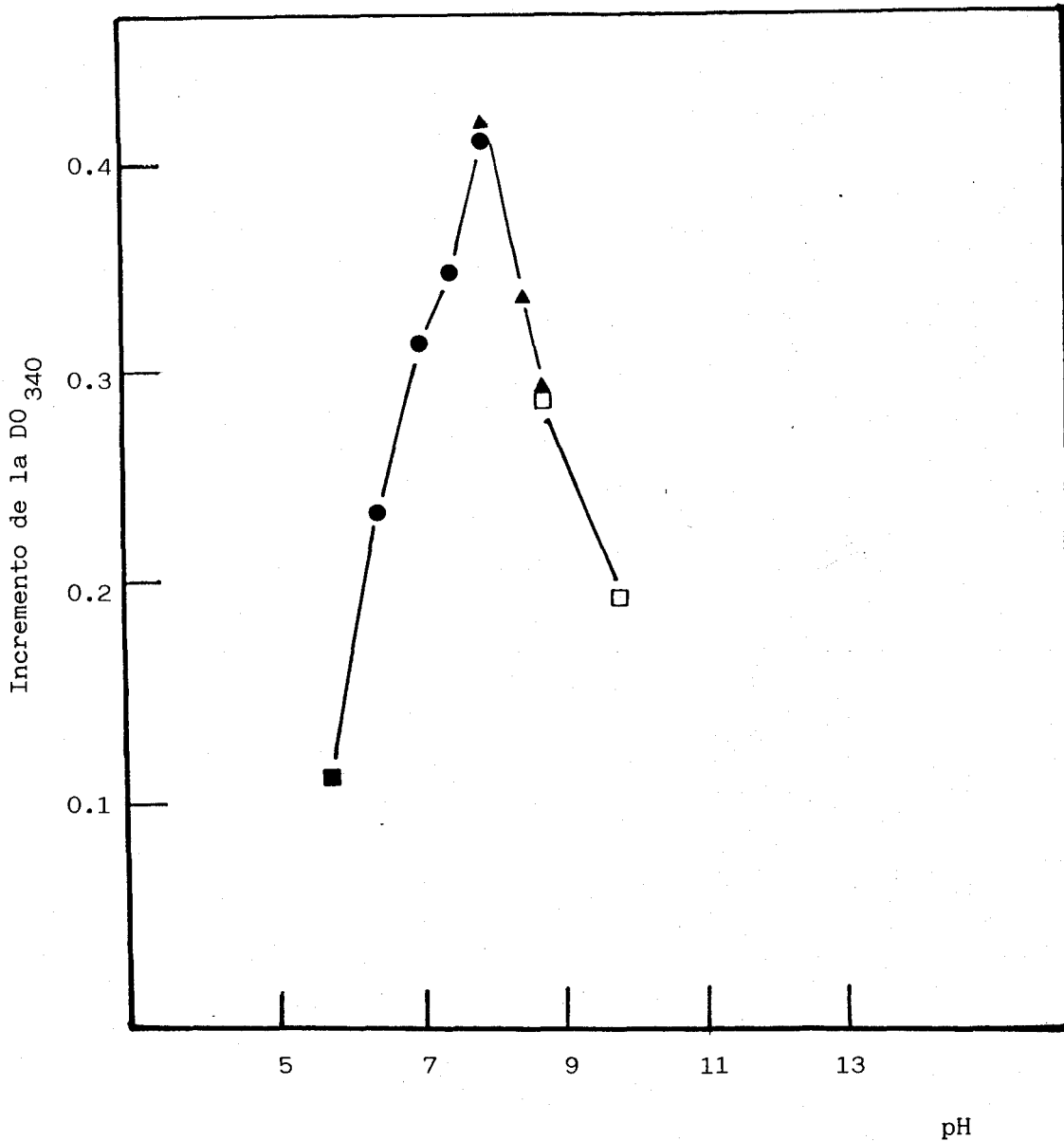
Tal como indica la Figura 4, la máxima actividad glutamato deshidrogenasa se obtuvo a pH 8. A pH más ácido o más alcalino la actividad disminuía ostensiblemente. El empleo de soluciones amortiguadoras compuestas por fosfatos o Tris al pH óptimo indicado fue indiferente para la medida de máxima actividad. En cualquier caso, los efectos observados de inactivación a pH diferente al óptimo, fueron totalmente reversibles.

3.4. Efecto de las concentraciones óptimas de sal y pH.

La concentración de sal al cual las enzimas halofílicas exhiben máxima actividad es diferente según el pH y los tipos de sales. Con el fin de determinar este aspecto de las características cinéticas de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei, se hicieron estudios de actividad tomando 3 valores de pH (5, 7.2 y 10), así como un intervalo de concentraciones entre 0.04-4.3 M y 0.04-3.4 M de NaCl y KCl, respectivamente. Los resultados se expresaron como porcentajes de máxima actividad (Figura 5).

Figura 4.

Estudio del pH óptimo de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei.

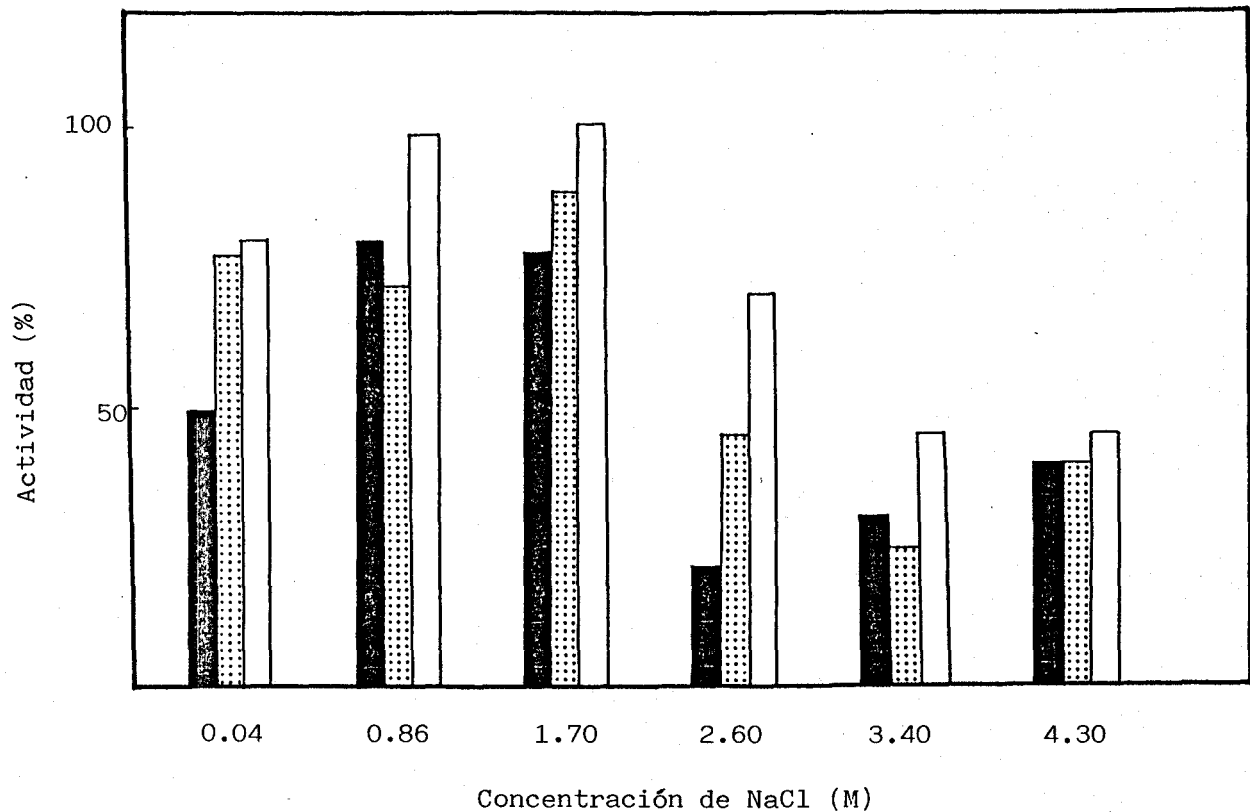


La actividad glutamato deshidrogenasa se ensayó según se indica en Materiales y Métodos, pero sustituyendo en su caso la solución amortiguadora Tris-HCl por los distintos tampones indicados en la Figura (acetato (■), fosfato (●), Tris (▲), y glicina (□)). En todos los casos se empleó una preparación enzimática que contenía 400 μg de proteínas/ml.

Cada punto representa la media resultante de 3 determinaciones.

Figura 5.

Efecto de la concentración de sales y el pH sobre la actividad glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei.



La actividad glutamato deshidrogenasa se ensayó según se describe en Ma teriales y Métodos, excepto la solución amortiguadora que se sustituía por soluciones amortiguadoras de distintos pH (barras negras: pH 5; barras punteadas: pH 7.2; barras blancas: pH 10) y distintas concentraciones de sal de NaCl, tal como se indica en el histograma. En todos los casos se empleó una preparación enzimática que contenía 425 μg de proteínas/ml.

3.5. Efecto de las sales en el pH de las soluciones amortiguadoras.

Debido a la utilización de altas concentraciones de salinas, hemos estudiado el efecto de la adición de sales a las soluciones amortiguadoras, en vista de los cambios drásticos observados en la preparación de las mismas.

En la Tabla 4 se observa que existe un cambio de pH, el cual depende de la especie salina adicionada y la composición de la propia solución amortiguadora empleada.

3.6. Temperatura óptima.

La velocidad de una reacción enzimática aumenta al hacerlo las temperaturas, hasta un punto en el que es inactivado un componente esencial del sistema. Por lo tanto, bajo condiciones específicas puede descubrirse una temperatura "óptima". Al determinar la temperatura óptima se encuentran generalmente curvas de dependencia, algo semejantes a las curvas campaniformes de los pH óptimos.

Las actividades enzimáticas, como indica la Figura 6, aumentan hasta alcanzar un valor máximo a 37 °C, y de nuevo descienden hasta un valor casi nulo a la temperatura de incubación de 80 °C.

El declive de la actividad enzimática normalmente es el reflejo de la inactivación de la enzima o un compuesto más termolábil de la misma.

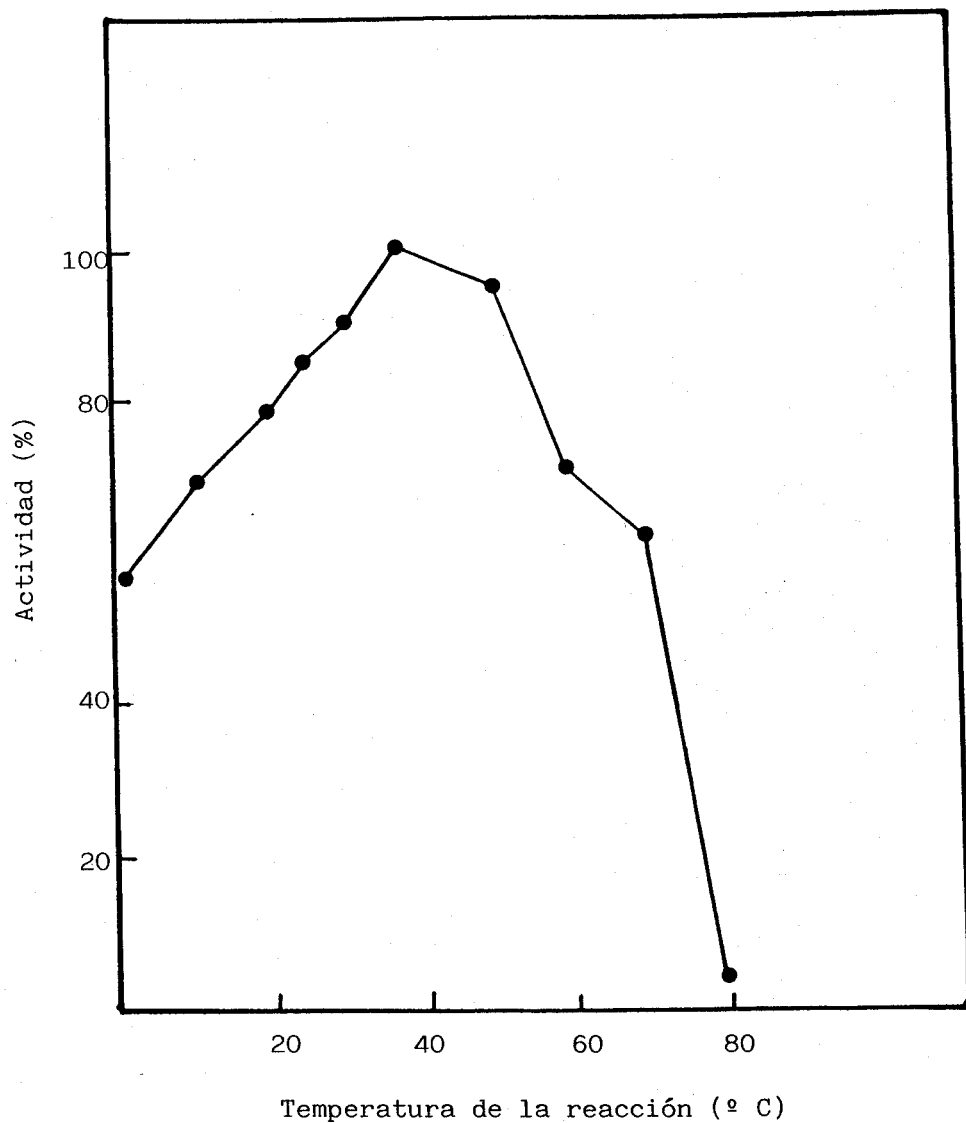
TABLA 4

Efecto de las sales en el pH de las soluciones amortiguadoras.

Solución amortiguadora (0.05 M)	Sal añadida (conc. M)	Cambio de pH observado
Fosfato sódico	NaCl 4.3	- 1.20
Fosfato sódico	NaCl 3.5	- 1.12
Fosfato sódico	KCl 3.5	- 0.45
Tris	NaCl 4.3	+ 0.14
Tris	NaCl 3.5	+ 0.08
Tris	KCl 3.5	+ 0.46

Figura 6.

Temperatura óptima para el ensayo de la actividad de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei.



Las actividades se ensayaron a las distintas temperaturas empleando el procedimiento estándar descrito en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de actividad referida a la temperatura óptima (37 °C). En todos los casos se empleó una preparación enzimática que contenía 400 μg de proteínas/ml.

Cada punto representa la media resultante de 3 determinaciones.

3.7. Estabilidad a distintas temperaturas.

Una molécula enzimática es una estructura frágil y delicada, un aumento de la temperatura por encima de la óptima supone normalmente una disminución de la estabilidad enzimática, lo que se traduce en una pérdida de actividad catalítica.

No solo la temperatura, sino que también la duración del tiempo de incubación son factores decisivos en el proceso de inactivación enzimática. Así, tal como la Figura 7 muestra, a temperaturas superiores de 50 °C se produce una disminución significativa de estabilidad de la glutamato deshidrogenasa halofílica, ocurriendo la inactivación total a partir de los 80 °C. Del mismo modo, el incremento en el tiempo de incubación, incrementando la exposición a las condiciones desnaturalizantes, disminuye la capacidad de estabilización de la enzima en las condiciones de ensayo descritas (Figura 8).

3.8. Aplicación de la Ecuación de Arrhenius.

Arrhenius propuso una relación empírica para describir el efecto de la temperatura sobre la velocidad de una reacción:

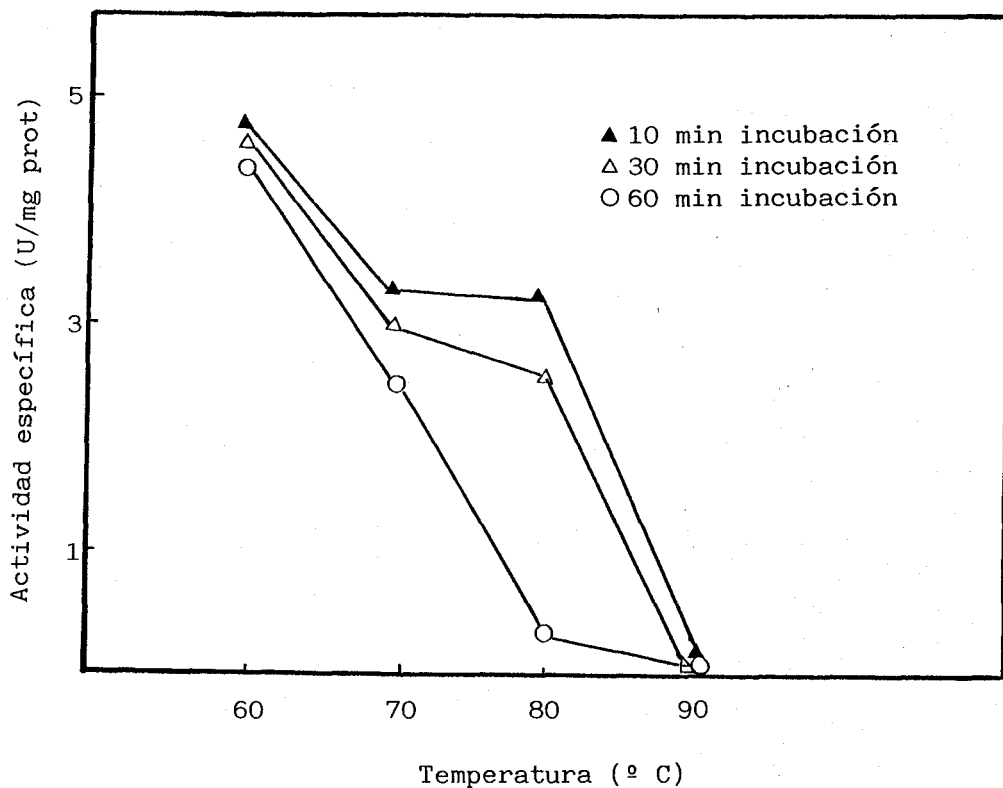
$$\log V_m = \frac{-E_a}{2,303 \times R} \times \frac{1}{T} + \text{constante}$$

donde,

V_m es la velocidad máxima de la reacción.

Figura 7.

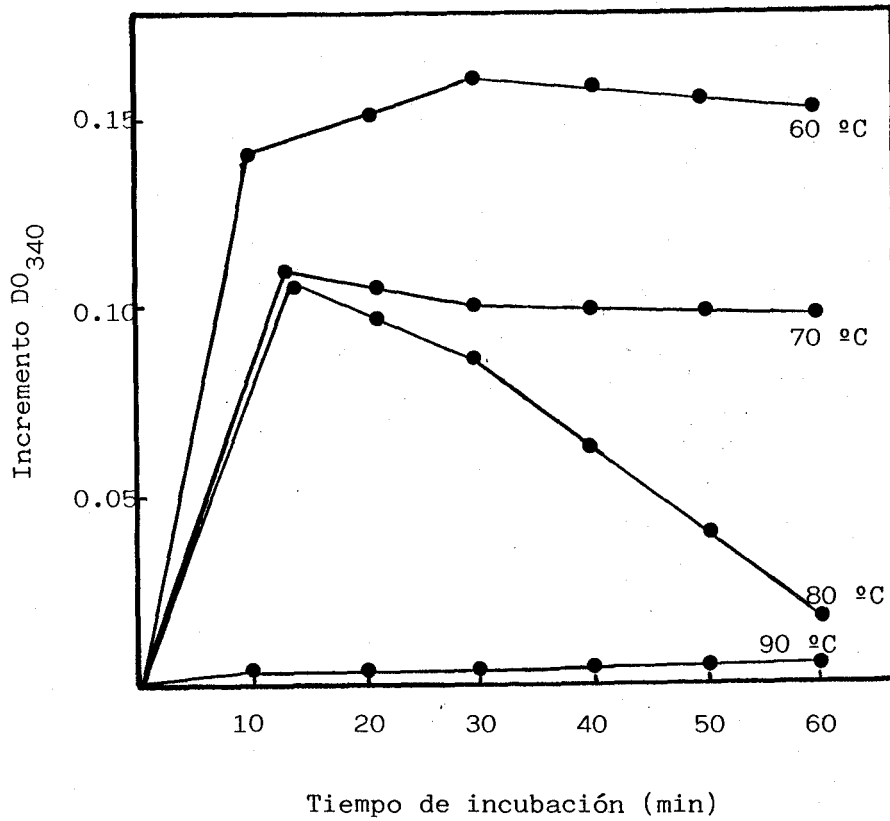
Estabilidad térmica de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei.



Preparaciones enzimáticas (400 μg de proteínas/ml) se sometieron a las temperaturas y tiempos indicados. Posteriormente se enfriaban rápidamente en hielo durante 10 min, y se les determinaba la actividad enzimática según se describe en Materiales y Métodos.

Figura 8.

Efecto del tiempo de incubación en la inactivación térmica de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei.



El procedimiento es el mismo que el de Figura 7.

Ea es la energía de activación del sistema.

R la constante de los gases ($1.98 \text{ cal} \times \text{K}^{-1} \times \text{mol}^{-1}$).

T la temperatura medida en °K.

Entre 0 y 37 °C (temperatura óptima) los valores de velocidad máxima representados según la ecuación de Arrhenius se ajustaron a una recta (Figura 9).

A partir de la pendiente de dicha recta, se obtuvo un valor de 3.282 Kcal/mol para la energía de activación de la reacción catalizada de aminación reductiva de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei.

Utilizando los resultados anteriores y mediante la fórmula:

$$\log Q_{10} = \frac{10 \times E_a}{2,303 \times R \times T_1 \times T_2}$$

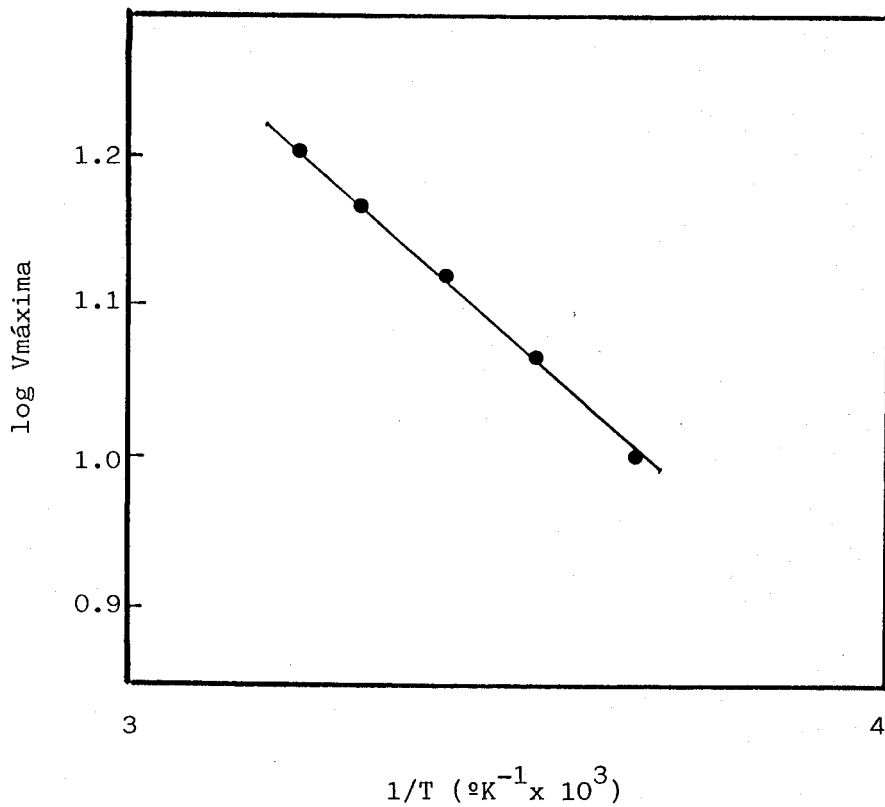
se calculó el valor Q_{10} para el intervalo de temperaturas 20-30 °C (Q_{10} se define como el factor por el cual se incrementa la constante de proporcionalidad al aumentar la temperatura de una reacción 10 °C), resultando un valor de 0.075.

3.9. Parámetros cinéticos.

Se estudió el comportamiento cinético de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei con respecto a sus sustratos y coenzima.

Figura 9.

Representación de la ecuación de Arrhenius.



Preparaciones enzimáticas (420 μg de proteínas/ml) se preincubaron a distintas temperaturas (entre 0 y 37 $^{\circ}C$) durante 10 min. Posteriormente se llevó a cabo la medida de las actividades enzimáticas según Materiales y Métodos.

3.9.1. Determinación de la K_m para el α -cetoglutarato.

En todos los casos de determinación de la K_m , se mantuvieron a concentraciones fijas el resto de componentes de la reacción enzimática, modificando en un amplio rango la concentración del componente considerado como variable. Siempre se empleaban concentraciones saturantes para la enzima.

Considerando en este apartado como variable el α -cetoglutarato, en la Figura 10 se puede observar la relación velocidad/concentración de sustrato, donde a medida que se incrementa la concentración de α -cetoglutarato aumenta también la velocidad de la reacción (siendo lineal a bajas concentraciones), llegando a la concentración de saturación al mantenerse la velocidad constante ($V_{m\acute{a}xima}$).

Mediante la representación de Lineweaver-Burk (relación $1/v$ con respecto $1/S$), de acuerdo con el cálculo de las velocidades iniciales de reacción obtenido según la Figura 10, se obtiene para el α -cetoglutarato una K_m de 4 mM, y una velocidad máxima de $16.7 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ (Figura 11).

3.9.2. Determinación de la K_m para el cloruro amónico.

Del mismo modo que en el caso anterior (3.9.1.), a partir de los resultados obtenidos en la Figura 12 (relación velocidad/concen-

Figura 10.

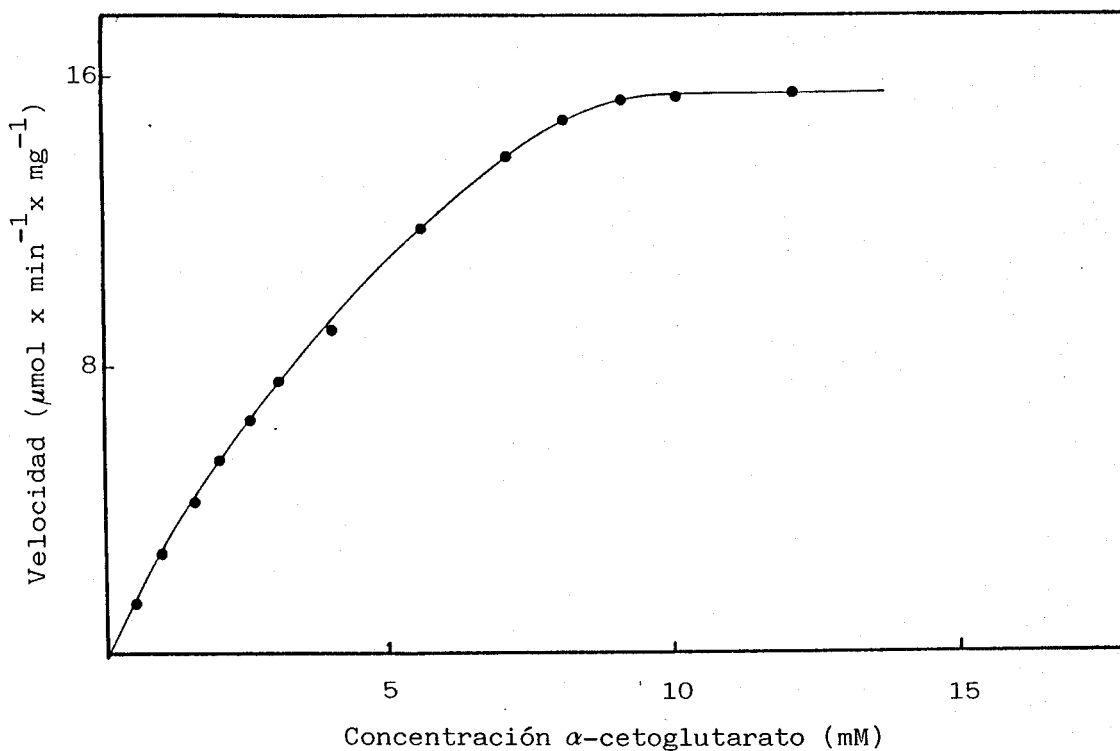
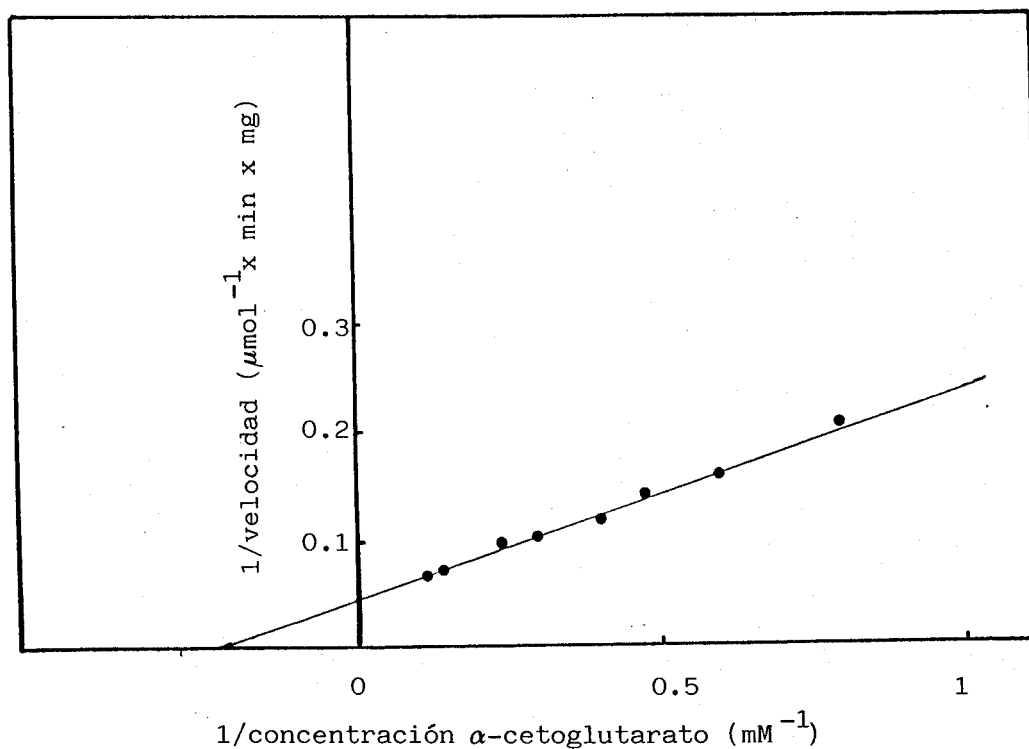


Figura 11.



Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos.

Las concentraciones de cloruro amónico y NADPH fueron 100 mM y 0.3 mM, respectivamente.

Figura 12.

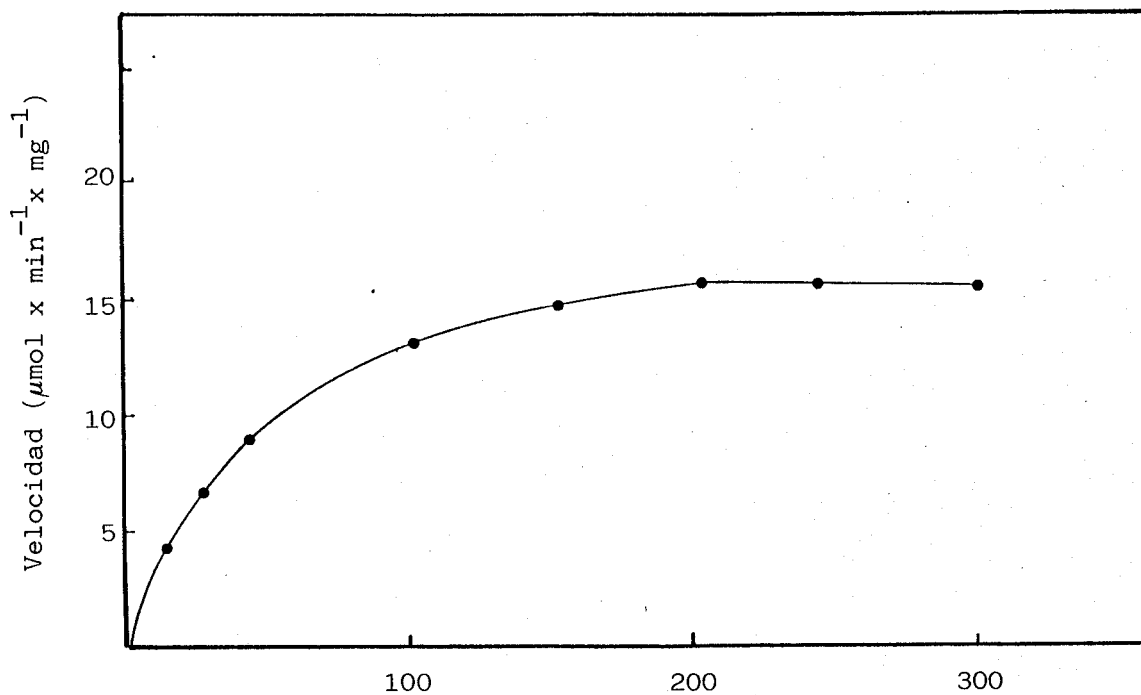
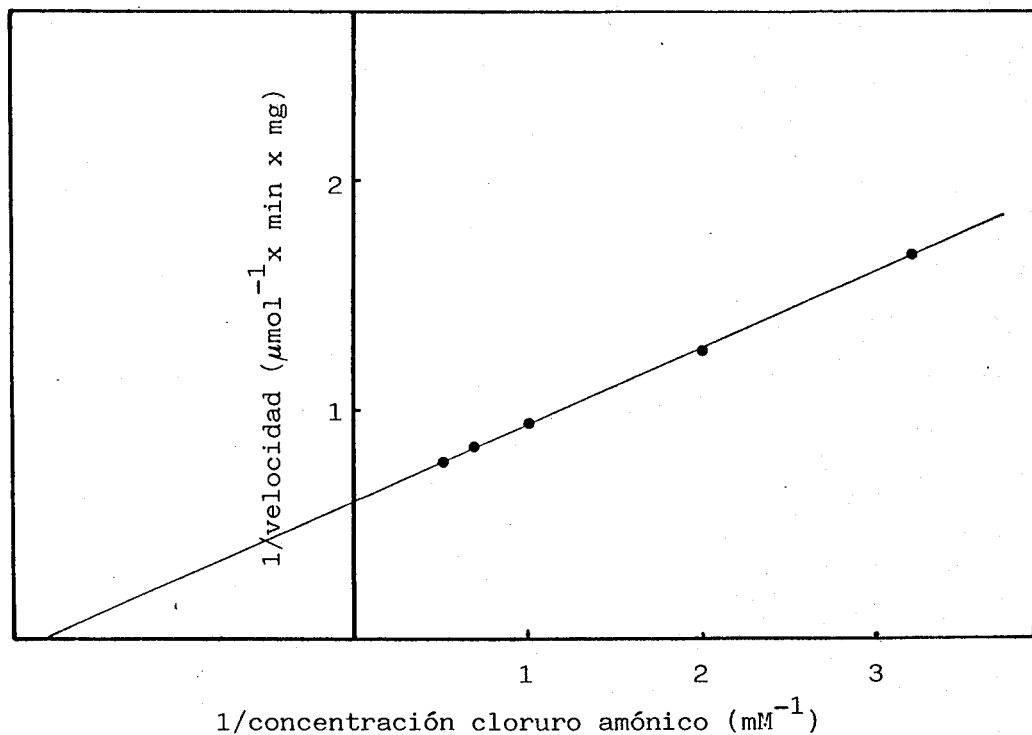


Figura 13. Concentración de cloruro amónico (mM)



Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos.

Las concentraciones de α -cetoglutarato y NADPH fueron 10 mM y 0.3 mM, respectivamente.

tración), la Figura 13 muestra una representación de Lineweaver-Burk, donde la K_m hallada presenta un valor de 55.5 mM y una velocidad máxima de $17 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$.

3.9.3. Determinación de la K_m para el NADPH.

Manteniendo constantes las concentraciones óptimas de reacción de los sustratos de la glutamato deshidrogenasa halofílica, y siguiendo el modelo de protocolo descrito en los apartados 3.9.1. y 3.9.2., se estudió el comportamiento de la enzima en estudio frente a distintas concentraciones de coenzima donador de electrones (Figura 14). De los resultados, y tras la representación de Lineweaver-Burk, se obtuvieron el valor de K_m 0.04 mM y el valor de velocidad máxima $20 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ (Figura 15).

3.10. Inactivación y reactivación por cambios en la concentración de sales.

La enzima activa es completamente inactivada mediante diálisis contra una solución amortiguadora de fosfato sin sales. La inactivación tiene lugar de forma paralela a la disminución en la concentración de sales de la preparación enzimática. El proceso de reactivación de la enzima inactivada se llevó a cabo adicionando a cada una de las soluciones cantidad suficiente de NaCl hasta obtener concentra-

Figura 14.

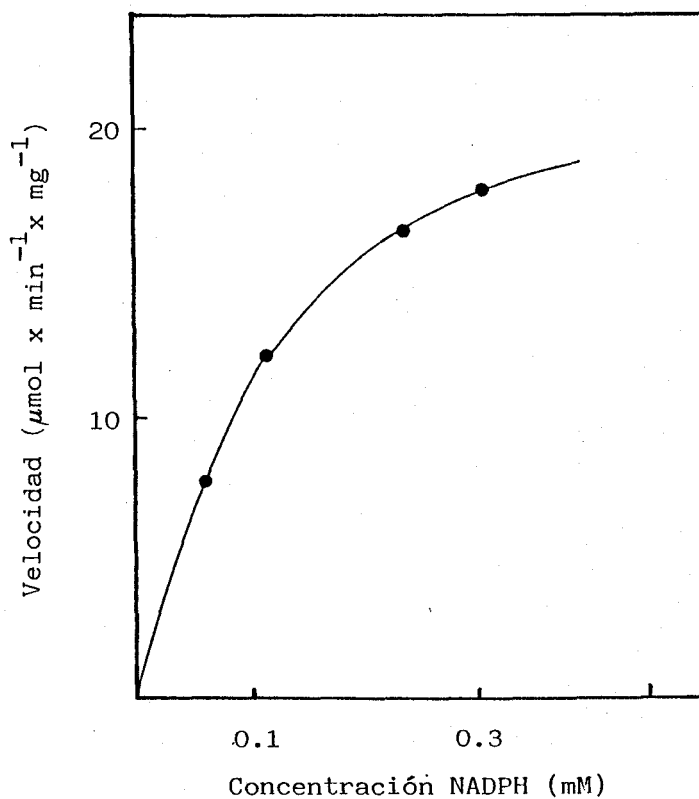
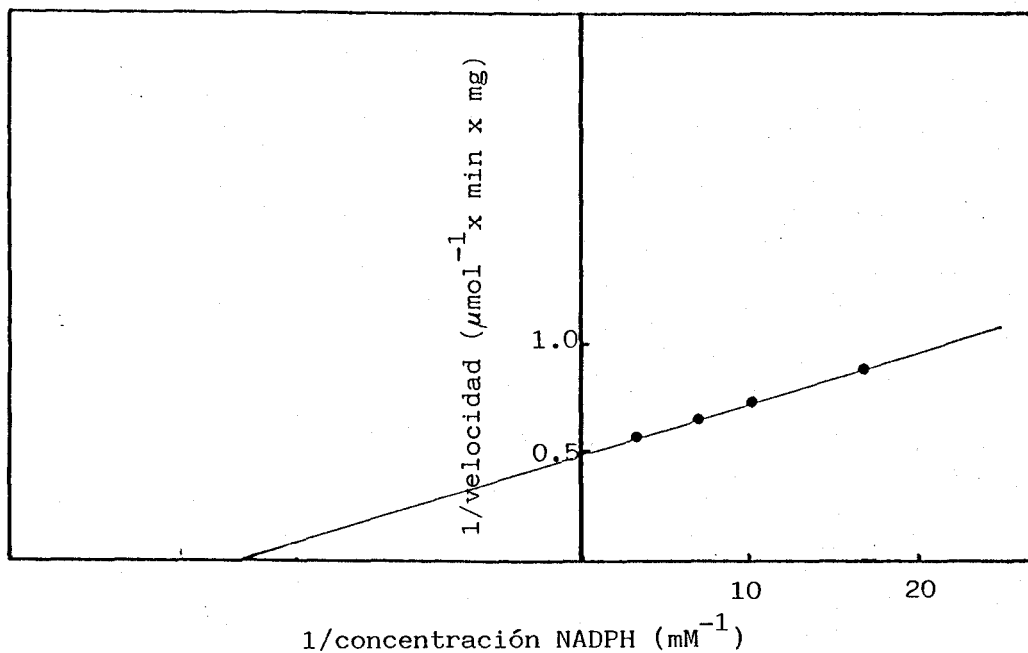


Figura 15.



Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos.

Las concentraciones de α -cetoglutarato y cloruro amónico, fueron 10 mM y 200 mM, respectivamente.

ciones finales 4.3 M. El pH óptimo de reactivación fue de 7.2, y la temperatura entre 25-30 °C.

La reactivación se puede considerar satisfactoria a partir de preparaciones enzimáticas con una concentración final de sales 1 M, donde el porcentaje de reactivación llega a ser 80.95 % (Tablas 5 y 6). Este hecho es de gran importancia en el momento de la preparación de electroforesis en gel de poliacrilamida, cuando dicha técnica es posible llevarse a cabo a 1 M de NaCl ó KCl y luego reactivar la enzima en el mismo gel para su detección "in situ". Por el contrario, en el caso de las preparaciones enzimáticas llevadas hasta una concentración final de 0 M de sales, solo se consigue una reactivación del 8.43 %.

La Figura 16 representa gráficamente el proceso de inactivación y reactivación enzimática por la eliminación y adición de sales.

3.11. Efecto de diferentes aniones y cationes.

Las enzimas halofílicas se sabe que son activas en presencia de altas concentraciones de NaCl, KCl y otras sales. Para determinar el efecto de estas sales sobre la actividad glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei, los ensayos para la aminación reductiva del ceto-

TABLA 5

Inactivación por la eliminación de sales de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei.

Concentración molar NaCl	Actividad específica (U/mg prot)	Actividad específica (%)	Inactivación (%)
4.3	9.88	100.00	0
3.0	6.82	69.03	30.97
2.0	6.12	61.94	38.06
1.0	3.76	38.06	61.94
0.5	3.06	30.97	69.03
0	0.47	4.75	95.25

Las condiciones de medida de la actividad enzimática fueron las descritas en Materiales y Métodos. Las preparaciones de glutamato deshidrogenasa halofílica contenían 400 μ g de proteínas/ml.

TABLA 6

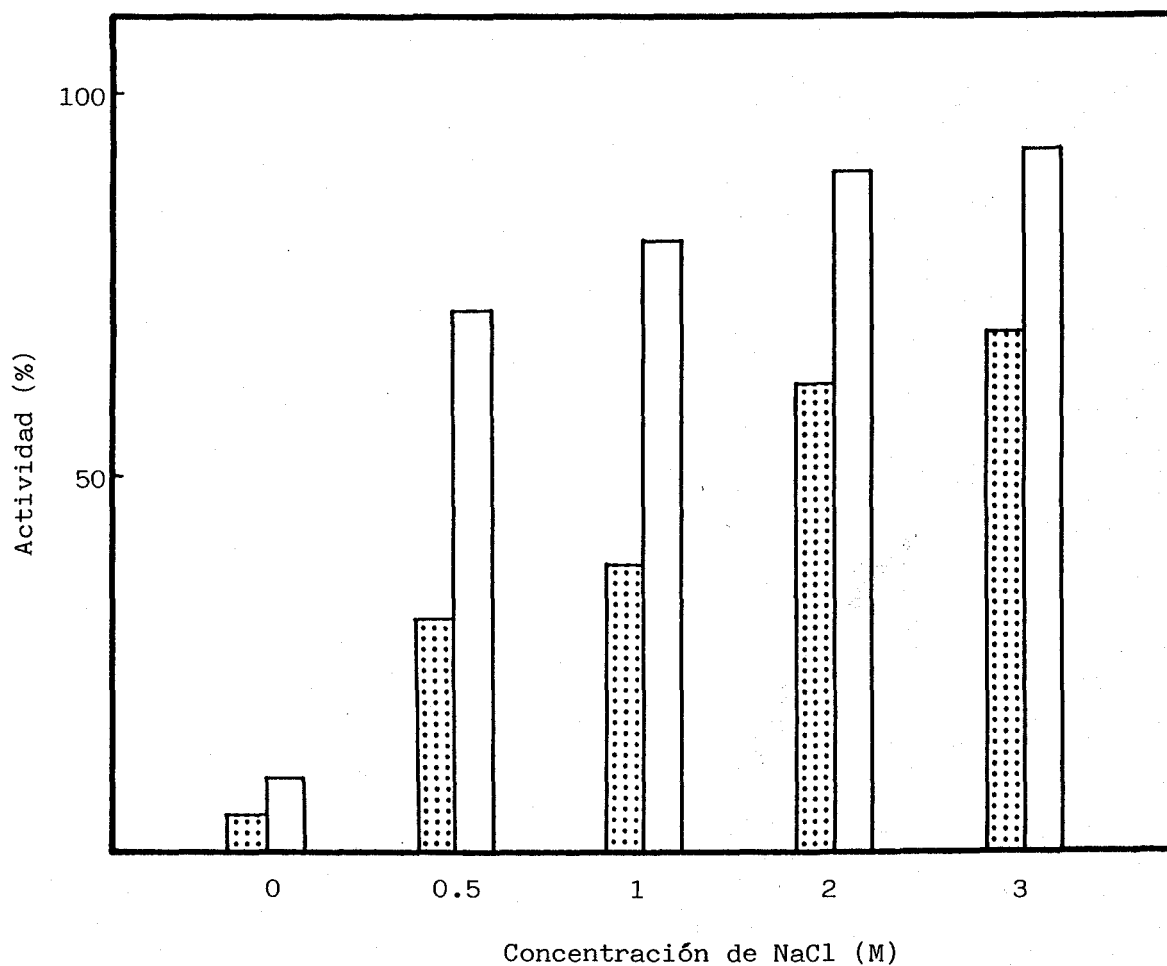
Reactivación por la adición de sales de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei.

Concentración molar NaCl	Actividad específica (U/mg prot)	Actividad específica reactivada (U/mg prot)	Reactivación (%)	Inactivación residual (%)
4.3	9.88	9.88	100.00	0
3.0	6.82	9.17	92.80	7.2
2.0	6.12	8.94	90.48	9.5
1.0	3.76	7.99	80.87	19.1
0.5	3.06	7.06	71.44	28.6
0	0.47	0.94	9.51	90.5

Las condiciones de medida de la actividad enzimática fueron las descritas en Materiales y Métodos. Las preparaciones de glutamato deshidrogenasa halofílica contenían 400 μg de proteínas/ml.

Figura 16.

Inactivación y reactivación por cambios en la concentración de sales de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei.



Preparaciones enzimáticas ($425 \mu\text{g}$ de proteínas/ml) fueron dializadas contra soluciones amortiguadoras conteniendo diferentes concentraciones de sal de NaCl, tal como se indica en el histograma. Posteriormente se les añadía a las preparaciones dializadas una cantidad suficiente de NaCl sólido hasta alcanzar la concentración final de 4.3 M. La actividad glutamato deshidrogenasa se medía en las distintas preparaciones después de cada paso de inactivación (barras punteadas) y reactivación (barras blancas).

glutarato se llevaron a cabo en la presencia de las siguientes sales:

NaCl (0.5, 1, 2, 3 y 4 M), KCl (0.5, 1, 2 y 3.5 M), K_2SO_4 (0.25, 0.5 y 1 M), Na_2SO_4 (0.25, 0.5, 1 y 1.5 M), KNO_3 (1, 2, 3 y 3.5 M) y $NaNO_3$ (1, 2, 3 y 3.5 M).

En la Figura 17 se expresa el comportamiento de la glutamato deshidrogenasa halofílica frente a las distintas concentraciones de sales indicadas.

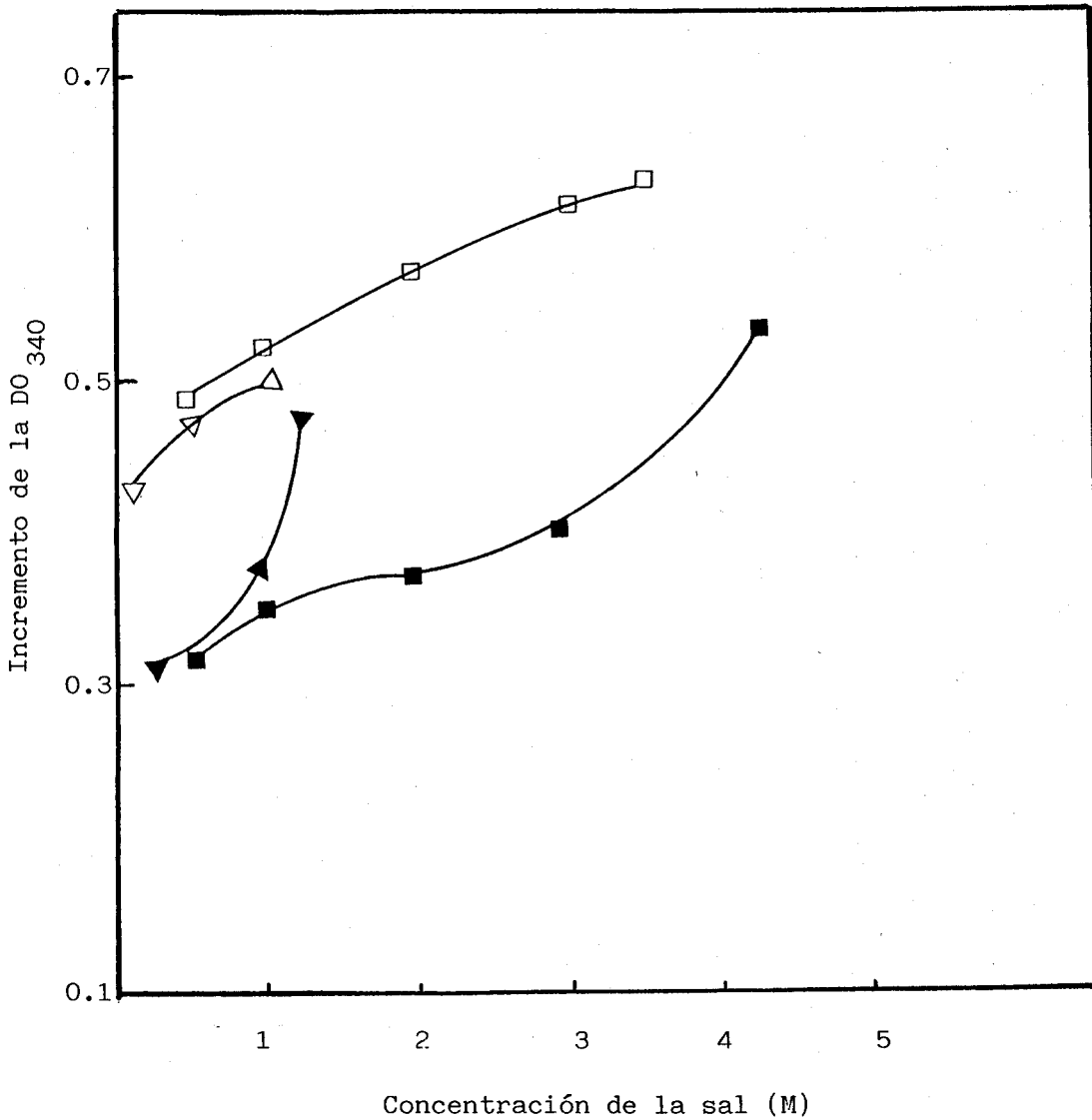
3.12. Efecto de la relación NaCl/KCl.

Uno de los estudios realizados para la optimización de las condiciones de extracción y medida de la glutamato deshidrogenasa halofílica, ha sido determinar el efecto de la concentración de NaCl y KCl sobre la actividad enzimática en el momento de la rotura de la pared celular. Los resultados invitan a la elección de la concentración de sal adecuada para la extracción y estabilización de la enzima.

El procedimiento consistía en romper una cantidad determinada de células húmedas bien lavadas, que se resuspendían en solución amortiguadora de fosfato 0.05 M con NaCl o KCl a distintas concentraciones, a pH 7.2. Tras la rotura y centrifugación, los sobrenadantes se emplearon para determinar la actividad glutamato deshidrogenasa contenida en los mismos, tal como la Tabla 7 indica.

Figura 17.

Efecto de diferentes aniones y cationes sobre la actividad glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei.



Preparaciones enzimáticas (425 μg de proteínas/ml) fueron ensayadas tal como se describe en Materiales y Métodos, excepto que la solución amortiguadora fue sustituida en su caso por otra de concentración de sales diferente (NaCl (■), KCl (□), Na_2SO_4 (▲), K_2SO_4 (△)). Con las sales de NaNO_3 y KNO_3 no presentaban actividad.

TABLA 7

Efecto de la relación NaCl/KCl sobre la actividad glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei.

Relación NaCl/KCl	4/0	3/1	2/2	1/3	0/4
% actividad glutamato deshidrogenasa	^a 84	74	72	78	100
	^b 84	65	62	67	100

^a Actividad glutamato deshidrogenasa medida en presencia de NaCl 4 M.

^b Actividad glutamato deshidrogenasa medida en presencia de la mezcla de sales respectiva.

La relación de sales es con respecto a concentraciones molares.

100 % actividad correspondió a 50.4 mU/mg proteínas.

3.13. Especificidad en el sustrato.

En condiciones fisiológicas, las enzimas se encuentran reguladas por muchos factores, entre los cuales cabe destacar la presencia de otros sustratos que son susceptibles de sufrir catálisis. Otros son capaces de inactivar reversible o irreversiblemente a la enzima (como el propio sustrato). En este sentido, en la Tabla 8 se indica el comportamiento de distintos sustratos de analogía estructural al α -cetoglutarato, sustrato de elección en el sentido de aminación reductiva por las glutamato deshidrogenasas.

3.14. Análisis electroforético.

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 % y pH 8.3, de todas las fracciones obtenidas en los pasos de purificación de la glutamato deshidrogenasa halofílica (Fotografía 2). Puede observarse que el gel A (extracto crudo) presenta un número de bandas de proteínas muy alto, mientras que los geles B (fracción de Sepharose CL-4B dializada contra 1 M de KCl) y C (fracción de Sepharose CL-4B sin dializar) presentaron 4 bandas bien definidas, sin afectar la diálisis el comportamiento electroforético de las enzimas. Este aspecto muy interesante para futuras detecciones "in situ" de la actividad enzimática.

TABLA 8

Especificidad del sustrato de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei.

Sustrato	Actividad (%)
α -cetoglutarato	100
p-hidroxifenilpirúvico	60
Oxaloacetato	20
Pirúvico	0
Glioxílico	0

Las condiciones de medida de actividad enzimática fueron las descritas en Materiales y Metodos.

Las concentraciones de los sustratos en todos los casos fueron 50 mM concentración final en cubeta.

100 % actividad correspondió a 63.1 mU/mg proteínas.

FOTOGRAFIA 2

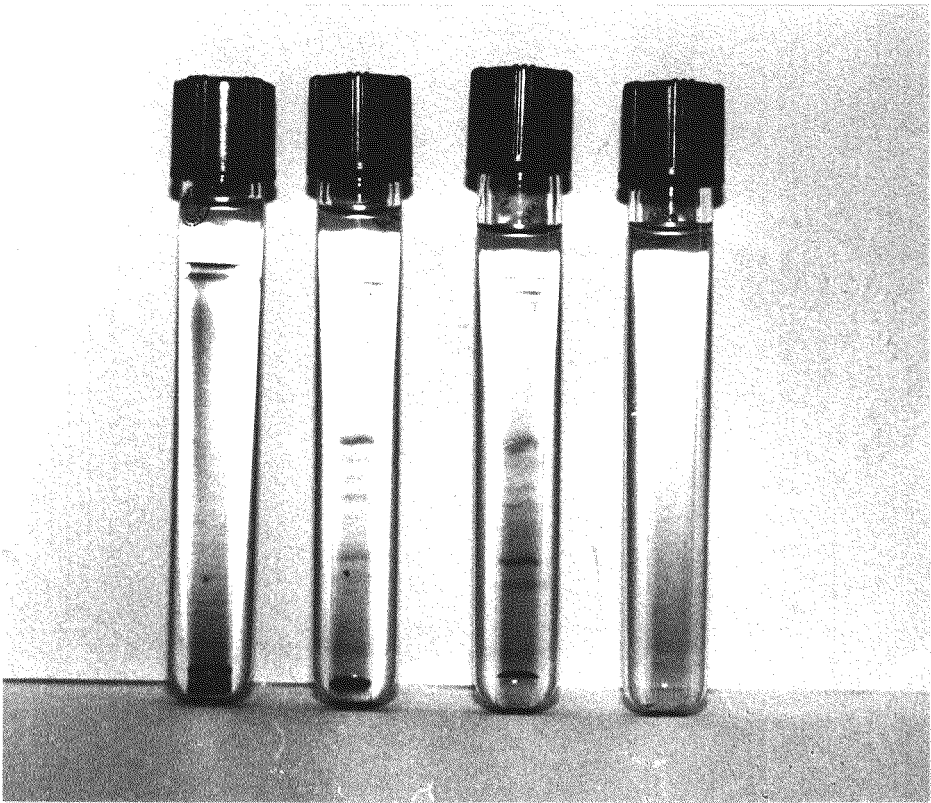
El procedimiento experimental es el descrito en
Materiales y Métodos.

Tubo A (separación de extracto crudo): tubo izquierdo.

Tubo B (separación de fracción de Sepharosa CL-4B):
tubo central izquierdo.

Tubo C (separación de fracción de Sepharosa CL-4B diali-
zada contra 1 M KCl): tubo central-derecho.

Tubo D (control): tubo derecho



D I S C U S I O N

IV DISCUSION

A. PURIFICACION

Los resultados anteriormente descritos han aportado datos acerca de alguna de las propiedades fundamentales de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei habiendose purificado y caracterizado parcialmente dicha enzima.

El organismo utilizado en este trabajo, H. mediterranei, se puede cultivar en medios líquidos con una composición salina definida (78) utilizando como fuente de carbono extracto de levadura. El rendimiento obtenido en estos medios de cultivo líquidos es 15-17 g de peso húmedo celular por litro, lo que es un resultado muy satisfactorio si se compara con el obtenido con otras especies, como es el caso de H. marismortui que fue de 8 a 10 g (3, 22) y de H. salinarium que fue de 9 g (29) en la misma cantidad de cultivo en un tiempo similar de crecimiento. Hay autores como Holmes y col. (28) que defienden la hipótesis de que un gran volumen de inóculo en fase logarítmica de crecimiento aumenta el rendimiento de un cultivo ya que uno pequeño da lugar a largos periodos de iniciación y baja producción celular.

En el presente trabajo se ha podido observar que al menos esta especie presenta un comportamiento que no es exactamente el mismo, ya que con pequeños volúmenes se han obtenido repetidas veces buenos crecimientos.

Una vez recogidas las células y obtenidos los extractos celulares se procede a la purificación parcial de la proteína objeto de nuestro estudio.

La elección de un método de rotura para la liberación y extracción de la enzima es el primer problema que debemos acometer. Hay muchas técnicas disponibles, pero no todas son aptas para el trabajo con microorganismos a gran escala. Son numerosas las restricciones inherentes a la propia técnica, al instrumental y también al tiempo requerido, factores de gran importancia en los procesos de aislamiento de grandes cultivos celulares. Variados son los métodos efectivos de rotura descritos, como por ejemplo la sonicación, enfriamiento-calentamiento, abrasión, etc.; sin embargo el grado de extracción de estas y otras técnicas en muchos casos no es práctico y en otros el resultado es inadecuado (14).

Según nuestra experiencia es muy importante tener en cuenta estos hechos, sobre todo por las características peculiares de la pared celular de las halobacterias, y muy particularmente de H. mediterranei (49, 62). Los 25-85 nm de grosor de la pared celular de H. mediterranei (78), unido por un lado a la circunstancia de que los enzimas halofílicos son sensibles a medios con fuerza iónica baja y por otro que el uso de los métodos de rotura convencionales, descritos en los procesos de purificación de enzimas halófilas (16, 17, 38), sin tener en cuenta las bajas temperaturas (61), hacen que la posible inactivación de las enzimas tenga una enorme influencia sobre los objetivos fundamentales de la elección de un método óptimo de rotura, que es la liberación de la proteína en estudio con un alto rendimiento de su actividad enzimática.

Tal como se ha expresado en los resultados, las técnicas de rotura han sido vigorosas, empleándose una gran variedad de instrumentos y métodos. Según tales resultados, sin duda la técnica de rotura mediante Prensa de French fue la mejor (comparación de resultados entre Figura 1, Figura 2 y Tabla 1). A la presión de extrusión de 19.200 psi la actividad específica glutamato deshidrogenasa fue 316,2 mU/mg proteínas, cantidad superior a las encontradas previamente en H. marismortui (50) y en H. salinarium (1).

Se ha podido observar que la actividad menadiona reductasa, enzima utilizada como actividad control para la rotura de células, fue de 72,5 mU/mg proteínas y es así mismo la más alta encontrada entre los distintos métodos, siendo un dato esclarecedor de una vasta rotura celular, ya que esta enzima se encuentra unida a la membrana y solo es accesible desde el interior de la célula (25).

Por otra parte, las actividades específicas de málico deshidrogenasa y aspartato-aminotransferasa, 147,4 y 22,0 mU/mg proteínas, respectivamente, fueron también las más altas encontradas, si bien hay que hacer notar que esta última se encuentra parcialmente inhibida en extractos crudos, inhibición que desaparece al calentar las muestras a 50°C durante 10 minutos. Este hecho puede explicar las actividades tan bajas anteriormente descritas.

La desintegración por ultrasonidos, particularmente durante 4 minutos a 0-4°C y 90-100 W de potencia, fue también un método de elección para la obtención de extractos acelulares. Y esta idea proviene de los resultados descritos en la Figura 2, donde se puede observar que la actividad específica obtenida para la glutamato deshidrogenasa fue 304,5 mU/mg proteínas, muy próxima a la mencionada anteriormente. Lógicamente, las actividades málico deshidrogenasa, aspartato-aminotransfe-

rasa y menadiona reductasa fueron también algo menores.

El resto de los métodos quedan todos muy lejos de nuestras expectativas, sobre todo cuando distintos autores los han utilizado como procedimientos aceptables en el primer paso de purificación de diferentes enzimas halofílicas. Así, Leicht et al. (50) emplearon el shock osmótico para romper células de H. marismortuii, Gradin et al. (22) emplearon la técnica de rotura mediante enfriamiento-calentamiento con nitrógeno líquido con células de H. halobium, y De Medicis et al. (61) que emplearon alúmina levigada para romper células de H. cutirubrum.

Sin embargo, tal como la Tabla 1 indica, las actividades obtenidas son muy bajas en comparación con los dos primeros métodos de elección. Siendo importante reseñar la inactivación irreversible de la enzima control "menadiona reductasa" en el procedimiento de shock osmótico cuando la concentración de sales se bajó hasta 1 M de cloruro potásico.

Sin duda, la disyuntiva que aquí aparece, es la elección del método óptimo para la rotura de células de H. mediterranei, entre la Prensa de French y la sonicación. Hay muchos factores que inclinan la decisión hacia el método de rotura mediante gradual extrusión de las células.

Y no solo porque se demuestra una liberación mayor de enzimas citoplasmáticas, sino también porque la temperatura de las muestras es fácilmente controlada (la temperatura del efluente de la válvula de salida alcanza entre 5-10°C, que se enfría rápidamente manteniendo el tubo colector en hielo), una mínima cantidad de inactivación enzimática ocurre durante el proceso, y la extensión de la rotura no está influenciada por la densidad de la suspensión celular (aunque se prefieren suspensiones concentradas) (29). Por otro lado en el caso de rotura celular por sonicación se pueden alcanzar altas temperaturas que inactivarían las enzimas por lo que esta se ha de controlar sumergiendo en hielo el contenedor con la suspensión celular. Se ha observado que la eficiencia de la rotura disminuye considerablemente en suspensiones muy densas por lo que estas han de ser diluidas convenientemente, y los fenómenos de cavitación promueven los fenómenos de oxidación de algunas enzimas por lo que es aconsejable añadir un reductor (39). Sin embargo la técnica es barata, rápida y fácil, por lo que el método de elección para la obtención de extractos crudos de H. mediterranei fue el de rotura mediante desintegración con ultrasonidos.

Empleando esta técnica, los extractos acelulares fueron sistemáticamente obtenidos para la purificación parcial de la glutamato deshidrogenasa. En este sentido, la principal dificultad que se presenta a la

hora de la purificación de un enzima en bacterias halófilas es la inestabilidad de estas proteínas a bajas concentraciones salinas (38). Las técnicas más comunes de purificación se desarrollan bajo condiciones que causan la pérdida de la estructura terciaria y por ello de la actividad de estas. Algunas enzimas halofílicas como la ornitina carbamoil transferasa de H. salinarium (16), pueden ser protegidas de la inactivación en soluciones de baja fuerza iónica por adición de sustrato. Otras enzimas halofílicas como la malato deshidrogenasa de H. salinarium (29) e isocitrato deshidrogenasa de H. cutirubrum (32) fueron purificadas bajo condiciones de hiposalinidad. Pero en tales condiciones, la reactivación enzimática tras la exposición a altas concentraciones salinas no es un proceso simple, puesto que se refleja un cambio conformacional de la molécula (33), e incluso un comportamiento electroforético anómalo (32).

Por estos motivos se llevó a cabo la purificación parcial de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei en condiciones próximas a las fisiológicas, manteniendo la fuerza iónica del medio lo suficientemente alta para la estabilidad enzimática durante el procedimiento.

El primer paso de la purificación ha sido el fraccionamiento con sulfato amónico en dos etapas, siguiendo el principio de precipitación

fraccionada o salting out de proteínas (51).

La primera de las dos etapas se basa en el hecho de la buena estabilidad que se consigue para las enzimas halofílicas en soluciones amortiguadoras conteniendo sulfato amónico (18). El mismo sulfato amónico fue al menos tan efectivo como el cloruro sódico o el cloruro potásico en la estabilización de la glutamato deshidrogenasa cuando se empleó a una fuerza iónica similar, y por lo tanto a una concentración de 2 a 3 veces menor (66). Bajo las condiciones de diálisis del extracto crudo contra una solución amortiguadora 1,73 M de sulfato amónico, se consiguió purificar 1,2 veces la glutamato deshidrogenasa, siendo el rendimiento de esta etapa del 91,4%.

Siguiendo con la segunda etapa del fraccionamiento con sulfato amónico, con la intención de eliminar una mayor cantidad de pigmentos y proteínas contaminantes, la concentración de dicha sal en el extracto dializado contra 1,73 M, se subió hasta 2,4 M mediante la adición de sulfato amónico sólido. Basándose esta metodología en los resultados aportados por Mevarech et al. (64), los cuales indicaban una curva de solubilidad para el sulfato amónico donde la glutamato deshidrogenasa no precipitaba mientras no se superaba la concentración de 2,8 M de sal. Bajo estas condiciones se consiguió purificar dos veces la enzima, siendo el rendimien-

to de esta etapa del 90,1%.

El conjunto de ambas etapas fue similar a las encontradas para la enzima malato deshidrogenasa de H. marismortuii (65), la piruvato quinasa y la isocitrato deshidrogenasa de H. cutirrubrum (61, 32), aunque los porcentajes de recuperación fueron inferiores a nuestros resultados. Por otra parte, la precipitación con solventes orgánicos fue desechada tras observar los resultados tan exiguos de otros autores (29).

Una separación mayor de la glutamato deshidrogenasa fue llevada a cabo mediante la adsorción a un soporte sólido de Sefarosa CL-4B y posterior elución (Fig. 3). En este sentido Mc Parland (60) observó que la fosfatasa alcalina de H. salinarium fue particularmente adsorbida a un gel de Sephadex G-50 en soluciones concentradas de sulfato amónico, método que fue posteriormente adaptado para separar la fosfatasa alcalina y fosfodiesterasa de H. cutirubrum sobre geles de agarosa (18). Más recientemente Mevarech et al. (63, 64) fueron capaces de purificar deshidrogenasas de una halobacteria extrema mediante adsorción a columnas de Sefarosa 4B en presencia de sulfato amónico 2.6 M seguida de una elución con un gradiente de concentración decreciente del mismo sulfato amónico.

La enzima discutida en el presente trabajo de investigación fue completamente adsorbida a Sefarosa CL-4B (más resistente a las condiciones de ensayo que la Sefarosa 4B (72)) en 2,4 M de sulfato amónico, y pudo ser eluida empleando un gradiente de concentración decreciente 2,4-0,9 M de sulfato amónico. La fracción de máxima actividad eluyó cuando se alcanzó la concentración de 1,43 M de sulfato amónico (Fig. 3). Bajo estas condiciones se consiguió purificar 50 veces la enzima, siendo el rendimiento del 89,5%, muy alto cuando se compara con el obtenido con la Sefarosa en la purificación de otras enzimas halofílicas (18, 34, 38, 61, 63, 64).

Es característico de estas columnas de Sefarosa el hecho de que pueden ser usadas de forma repetitiva tras volver a equilibrarlas con solución 2,4 M de sulfato amónico. Además admiten flujos altos para el desarrollo de los gradientes sin compresión de los geles. Este procedimiento puede ser aplicado a soluciones de proteínas muy diluidas, ya que a 2,4 M de sulfato amónico casi todas las proteínas halofílicas son retenidas en Sefarosa. Esta propiedad también puede ser usada para una rápida concentración de proteínas halofílicas incluso en soluciones que contengan tanto 1,6 M de cloruro sódico como 2,4 M de sulfato amónico (64). Otra ventaja de este método se basa en el hecho de que durante la adsorción y

elución las proteínas remanentes en solución y efectos adversos tales como pérdida de actividad irreversible, que pueden ser causadas por precipitación, son eliminadas (63).

Puesto que los geles de Sefarosa no están cargados y además las proteínas se adsorben en sulfato amónico 2,4 M, está claro que ninguna fuerza electrostática está involucrada en la unión de las proteínas al gel.

Además este método requiere la intervención de altas concentraciones de aniones tales como el sulfato que dan lugar a uniones fuertes entre la Sefarosa y las proteínas halofílicas no ocurriendo así en el caso de aniones como el cloruro que da lugar solo a uniones de una fuerza media (63). Las interacciones que se producen en la adsorción de enzimas halofílicas en Sefarosa son por tanto muy probablemente de naturaleza hidrofóbica pura, pues además como es bien sabido este tipo de interacción está favorecido por altas concentraciones de aniones capaces de intervenir en la formación de estructuras, como es el caso del sulfato amónico (92).

Algunos autores (15, 77) han utilizado Sefarosa sustituida con

aminoácidos y aminas aromáticas pudiendo así reducir las concentraciones de aniones (sulfato o fosfato) usados en el fraccionamiento proteico. Presumiblemente la Sefarosa no sustituida es suficientemente no polar con respecto a la retención de proteínas halofílicas a 2,4 M de sulfato amónico.

Como dato importante hay que señalar que ninguna proteína excepto las halofílicas han podido ser retenidas en Sefarosa no sustituida bajo estas condiciones. Además, es interesante hacer notar que de forma similar al RNA transferente, las proteínas halofílicas están en general negativamente cargadas (49) debido a un exceso de grupos ácidos en porcentajes tan altos como 17-18 mol% (75).

B. CARACTERIZACION Y PROPIEDADES

Con la enzima glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei purificada 50 veces se estudiaron distintos aspectos relacionados con su caracterización y propiedades.

Aunque siempre, para todos los ensayos se emplearon preparaciones enzimáticas recientes, se estudió la viabilidad de la glutamato deshidrogenasa con respecto al tiempo, determinando la vida media de la enzima en condiciones de baja concentración de sal de sulfato amónico (1,43 M) pero de fuerza iónica $4,44 \text{ mol.Kg}^{-1}$, similar a la que se alcanzaría con una solución de cloruro sódico a una concentración 4,3 M. En estas condiciones la enzima se mantuvo casi sin pérdida de actividad durante 8 semanas a 4 o -20°C . Estos resultados están de acuerdo con las conclusiones de Fitt y Baddoo (18) quienes indicaron la buena estabilidad que se consigue para las enzimas alcalino fosfatasa y fosfodiesterasa de H. cutirubrum en soluciones amortiguadoras conteniendo sulfato amónico a alta o baja concentración, excepto la malato deshidrogenasa de H. marismortuii, la cual necesita además la presencia de NADH^+ para su estabilización (3).

Debido a las diferencias observadas en el comportamiento cinético

y la respuesta a distintas concentraciones de sales de algunas enzimas halofílicas, como la treonina desaminasa y malato deshidrogenasa de H. cutirubrum (29, 51) frente al pH, hemos observado que la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei presenta un comportamiento similar a estas. Según la Figura 4, se puede observar que el pH óptimo en el sentido reductivo al cual presenta máxima actividad la glutamato deshidrogenasa se encuentra entre 7,5-8, a la concentración 3,87 M de cloruro sódico. Sin embargo según la Figura 5 a pH francamente alcalino (pH 10) la glutamato deshidrogenasa se muestra como una enzima moderadamente halofílica, es decir no requiere tan alta concentración de sales para su actividad máxima.

El efecto del pH puede ser entendido como un efecto de unión de iones (ion binding) (46), es decir neutraliza un efecto que se produce debido a las repulsiones electrostáticas internas de residuos cargados. En la presencia de altas concentraciones de sales el efecto de repulsión electrostática de cargas queda disminuido (46), y la actividad depende en menor cuantía del pH (según la Figura 5, a la concentración 4,3 M de cloruro sódico o cloruro potásico, la actividad enzimática es prácticamente la misma a pH 5 o 7.2 o 10). Sin embargo a bajas concentraciones salinas las repulsiones electrostáticas internas de residuos cargados aumentan, quedando la atmósfera iónica del microambiente del centro activo a expen-

sas del pH del medio. En este aspecto desempeñan un papel crucial los grupos adyacentes al centro activo ya que, como se ha discutido, la unión a los mismos de cationes, tales como Na^+ o K^+ , puede afectar el pK de dichos grupos y por lo tanto modificar el pH óptimo para la glutamato deshidrogenasa halofílica.

La alta actividad encontrada a la concentración 1,7 M de cloruro sódico o cloruro potásico, fundamentalmente a pH alcalino, en presencia de sustratos y coenzima puede interpretarse como un efecto protector en tales condiciones de baja fuerza iónica (6, 10). Las interacciones ión-ión son menores y la capacidad protectora y estimulante de la actividad son mayores, por lo que difícilmente se reflejan estos efectos a alta fuerza iónica. Presumiblemente la vida media de la enzima sea mucho menor a baja salinidad (resultados en estudio y no incluidos en el presente trabajo de investigación). Es por ello que en condiciones fisiológicas los microorganismos halófilos prefieran medios altamente salinos.

Con respecto al comportamiento de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei frente a la temperatura, la Figura 6 muestra la temperatura óptima para la reacción de aminación reductiva del α -cetoglutarato. El valor de 37°C para la actividad óptima coincide con la temperatura

óptima de crecimiento del microorganismo. A 50°C la enzima mantiene el 95% de su capacidad, por lo que claramente, al igual que la alanina deshidrogenasa de H. salinarium (38), presenta la glutamato deshidrogenasa en estudio un alto carácter termofílico.

Existen otras enzimas halofílicas, como la fosfatasa de H. cutirubrum que tienen una temperatura óptima de ensayo entre 55 y 65°C (26), y por el contrario la piruvato quinasa también de la misma halobacteria, que no es estable a 50°C (61). En realidad, la respuesta diferente a la temperatura depende del microambiente tan distinto para cada una de las enzimas en su hábitat.

Los estudios de estabilidad térmica se realizaron en presencia de cloruro sódico 4,3 M. Así las Figuras 7 y 8, muestran como la glutamato deshidrogenasa no pierde actividad tras su incubación a 60°C durante una hora, y como a 80°C durante 10 minutos todavía es capaz de mantener las dos terceras partes de la misma. Estos hechos corroboran la termofilia de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei, común a otras enzimas halofílicas.

Profundizando en el efecto de la temperatura sobre la velocidad

de la reacción de aminación reductiva que cataliza la glutamato deshidrogenasa halofílica, se calculó la energía aparente de activación del sistema haciendo una representación esquemática de la ecuación integrada de Arrhenius. Las temperaturas empleadas estuvieron comprendidas entre 0 y 37°C. Tal como se muestra en la Figura 9 de la pendiente de esta representación ($-E_a/2,303 R$) se obtiene un valor para la Energía de activación de 3,3 Kcal/mol (13,8 KJ/mol) el cual es muy inferior a las encontradas para la glutamato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa de H. marismortui de 65 y 33 Kcal/mol o 271,7 y 137,94 KJ/mol respectivamente (50, 73). Lo cual es indicativo del escaso incremento de energía calorífica que requiere la reacción en presencia de glutamato deshidrogenasa.

Por otra parte también se estudiaron los parámetros cinéticos de los sustratos y coenzima en el sentido de la aminación reductiva, por el método de Lineweaver-Burk (52) a partir de las velocidades iniciales de reacción. Tal como las Figuras 11, 13 y 15 indican, los valores para la K_m fueron de 4 mM, 55,5 mM y 0,04 mM para el α -cetoglutarato, NH_4Cl y NADPH, respectivamente en presencia de 3,3 M de cloruro potásico. Estos resultados son ligeramente superiores a los encontrados por Leicht et al.(50) en la glutamato deshidrogenasa de H. marismortui y Smith et al. (87) en otras glutamato deshidrogenasas de diferentes orígenes.

No obstante, estos valores pueden ser ligeramente modificados cuando esta enzima esté totalmente purificada, por lo tanto con la seguridad de que no existen metabolitos que puedan interferir en las determinaciones. También los estudios fueron realizados en mezclas de reacción con fuerza iónica inferior a la utilizada en nuestros ensayos.

Como coenzima se empleó el NADPH ya que la actividad con NADH fue menor del 1% (Tabla 3). Existen precedentes de dos isoenzimas de glutamato deshidrogenasa en una misma especie bacteriana, una dependiente de NAD^+ y otra de NADP^+ (42). La glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ es capaz de funcionar en ambas direcciones (aminación del α -cetoglutarato a glutamato y deaminación del glutamato a α -ceto glutarato), mientras que la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ funciona únicamente en la dirección del glutamato (asimilación de amoníaco).

En nuestro caso solo un tipo de glutamato deshidrogenasa ha sido observada, siendo dependiente de NADPH como anteriormente se ha citado. Nuestros resultados coinciden por tanto con los encontrados en la glutamato deshidrogenasa de H. marismortui (50), donde también se observa una preferencia para el coenzima NADPH coincidiendo con la interpretación de especificidad dual de esta enzima por Kimura et al. (40).

La acción de las sales sobre los enzimas halofílicos, tratando de comprender su viabilidad a altas concentraciones salinas, ha sido tratada por diversos autores desde distintos puntos de vista. En este trabajo de investigación hemos estudiado el efecto de la concentración de cloruro sódico sobre la actividad glutamato deshidrogenasa como se indica en la Figura 16 y Tablas 5 y 6. En ellas se puede observar que la enzima activa es inactivada mediante diálisis contra una solución amortiguadora libre de sales (en ausencia de sustratos y coenzima). La inactivación se produce paralelamente al descenso de la concentración de sales, siendo completamente inactivada solo a 0 M. Por otra parte, una parcial reactivación del enzima ocurre si se incrementa la fuerza iónica de las soluciones por adición de la sal correspondiente. Esta reactivación es más efectiva conforme la dilución haya sido menos intensa.

La hipótesis de los estados conformacionales es la que prevalece para explicar el efecto de las sales sobre las propiedades de actividad y estabilidad de las enzimas halofílicas (51, 71). Se aplican dos mecanismos básicos: según el primero de ellos las sales pueden proteger las cargas iónicas del enzima mediante la aportación de iones de carga contraria, por lo tanto reduciendo la repulsión electrostática y permitiendo la formación de puentes de hidrógeno (43, 44).

Esta hipótesis se basa en la consideración de que las enzimas halofílicas poseen una gran abundancia de aminoácidos acídicos (44, 65, 3). Así la inactivación tendría lugar debido a la repulsión electrostática interna de residuos cargados, creandose una atmósfera iónica en torno al microambiente del centro activo.

El segundo mecanismo propuesto se basa en la capacidad de salting-out de ciertas sales como el cloruro sódico (47). En la presencia de altas concentraciones de cloruro sódico, las cadenas no polares de aminoácidos de la enzima son salted-out de la solución y son dirigidas hacia el interior de la estructura donde pueden formar uniones hidrofóbicas estables (45, 46,47). Otras sales como el NaNO_3 y especialmente el NaClO_4 , que siguen al NaCl en las series liotrópicas (24), no producen este fenómeno e incluso ejercen el efecto contrario y ello explica la incapacidad de estas sales para mantener la máxima actividad enzimática (22, 51).

Estos dos mecanismos no solo no se excluyen mutuamente sino que probablemente se complementan. En el caso de la glutamato deshidrogenasa de H. mediterranei, el primer mecanismo puede actuar según la respuesta a la concentración de sales en medios con diferentes pH (Figura 5) ya

discutida. Por otra parte los resultados que se presentan en este estudio sobre la acción de varias sales sobre la glutamato deshidrogenasa, sugieren la presencia de uniones hidrofóbicas para mantener la actividad y estabilidad enzimática.

Si bien el cloruro sódico y aquellas sales que disminuyen la solubilidad de los compuestos orgánicos en agua, encuentran la estabilidad de los enlaces hidrofóbicos, existen otros agentes que ejercen el efecto contrario (24). El orden de este efecto es el siguiente: $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{SO}_4^- < \text{NO}_3^- < \text{ClO}_4^- < \text{SCN}^-$ (en el orden liotrópico).

Así tal como la Figura 17 muestra, bajas concentraciones de Na_2SO_4 y K_2SO_4 son suficientes para mantener la actividad de la glutamato deshidrogenasa; sin embargo, la máxima actividad se alcanza solo en presencia de altas concentraciones (4 M) de cloruro sódico y cloruro potásico. Si se efectúa el ensayo con nitrato sódico o nitrato potásico, la actividad es nula a cualquier concentración. Sobre la base de estos resultados parece que fuerzas hidrofóbicas están implicadas en la actividad enzimática. Teniendo en cuenta también que temperaturas bajas favorecen la formación y mantenimiento de interacciones hidrofóbicas (22), esto concuerda con la estabilidad de la glutamato deshidrogenasa a 4 o -20°C

pero no a temperatura ambiente, lo que refuerza la existencia de este mecanismo.

Como se puede observar en la Figura 17, la glutamato deshidrogenasa muestra una actividad mayor en presencia de cloruro sódico que de cloruro potásico. Esta particularidad puede ocurrir porque como previamente se ha descrito, la concentración intracelular de sales en halobacterias es de 4,6 M de iones K^+ y 1,4 M de iones Na^+ (11). Por tanto en condiciones fisiológicas, las enzimas halofílicas se encuentran en un medio rico en iones potasio. No obstante, se prefirió hacer otros ensayos que justificaran esta posibilidad, para lo cual se prepararon suspensiones celulares en soluciones amortiguadoras con distintas proporciones de NaCl/KCl y las mismas se sometieron a sonicación, posterior centrifugación y determinación de la actividad glutamato deshidrogenasa en los sobrenadantes. Tal como la Tabla 7 indica, la actividad aumentaba en el sentido del predominio de una de las sales, alcanzándose la máxima actividad en presencia de KCl 4 M. Hechos que ratifican la estimulación sobre la actividad de los iones potasio tal como se ha descrito con otras enzimas halofílicas (22, 34, 53, 61, 71, 93).

El estudio de la especificidad de la enzima nos indica que como otras glutamato deshidrogenasas, si bien tiene una especificidad prefe-

rencial por el α -ceto glutarato, puede actuar sobre otros cetoácidos. entre los cetoácidos seleccionados es de interés observar que mientras no ejerce ninguna acción sobre cetoácidos tan fisiológicos como el oxalacetato o el piruvato conserva un 60% de su actividad sobre el p-hidroxifenil-piruvato.

Este resultado puede explicarse bajo la hipótesis de que la unión del glutamato o del α -ceto glutarato a la enzima se hace por dos puntos, lógicamente por los grupos carboxílicos y que estos puntos están a una distancia que coincide con la longitud del sustrato fisiológico. Cuando a la enzima se le suministra un cetoácido de menor longitud la unión es solo factible por uno de los grupos y por ello no se ajusta al lugar del centro activo que fija al coenzima. En el caso de p-hidroxifenil-piruvato si bien solo tiene un grupo carboxilico, el extremo opuesto contiene un grupo polar, o bien el propio anillo aromático que puede dar lugar a interacciones que lo fije, pero además y esto es lo que posiblemente permite la actividad, tiene una longitud que le permite extenderse sobre el centro activo e interaccionar con el lugar donde se encuentra el coenzima. Lógicamente esta hipótesis debe ser demostrada estudiando los puntos de unión del centro activo de la enzima, lo que sobrepasa los objetivos de esta Tesina, pero que lógicamente será uno de los objetivos de una posterior Tesis Doctoral.

CONCLUSIONES

V CONCLUSIONES

- 1.- Se ha realizado un estudio exhaustivo de las condiciones de ruptura del microorganismo halófilo H. mediterranei, observándose que el método de sonicación durante 4 minutos a 90-100 W en frío es el más idóneo según las condiciones de trabajo desarrolladas.
- 2.- Se ha estudiado el pH óptimo de la catálisis de la glutamato deshidrogenasa halofílica en el sentido de la aminación reductiva, obteniéndose el valor de pH 8. Así mismo la influencia de la concentración de hidrogeniones en la estabilidad de la enzima en estado de hiposalinidad, observándose que ambos factores modifican su comportamiento halofílico.
- 3.- Se ha estudiado la temperatura óptima de la actividad glutamato deshidrogenasa halofílica, obteniéndose el valor de 37°C. Así mismo la termoestabilidad enzimática, observándose que no hay pérdida de actividad tras la incubación a 60°C durante 1 hora, pero pérdida casi total a 80°C.

- 4.- Se ha calculado la energía de activación de la catálisis de la glutamato deshidrogenasa halofílica en el sentido de la aminación reductiva, habiéndose encontrado el valor de 3.3 Kcal/mol (13,8 KJ/mol) por lo tanto esta enzima se muestra como un catalizador más efectivo que las glutamato deshidrogenasas de otras especies.
- 5.- El estudio de los sustratos fisiológicos ha puesto de manifiesto que la glutamato deshidrogenasa halofílica es específicamente dependiente del NADPH, con una K_m 0.04, y paralelamente una K_m de 4 mM para el α -ceto glutarato y de 55 mM para el ión amonio.
- 6.- Se ha estudiado la estabilidad de la glutamato deshidrogenasa halofílica en diferentes condiciones de salinidad y la reversibilidad de los procesos de inactivación por hiposalinidad. En este sentido, la enzima presenta un 71% de reactivación cuando la concentración de sales había descendido a 0.5 M, mientras que la inactivación es irreversible al descender la concentración de sales a 0 M.

- 7.- Se ha estudiado la influencia que distintos iones pueden tener sobre la estructura de la glutamato deshidrogenasa halofílica. Así, se ha observado que en similares condiciones de fuerza iónica la actividad enzimática se mantiene, excepto con sales que labilizan la estabilidad de enlaces hidrofóbicos.
- 8.- Del estudio con diferentes pseudosustratos se deduce que una determinada longitud de la cadena puede ser condición importante para la actividad glutamato deshidrogenasa halofílica, ya que las moléculas homólogas inferiores como el oxalacetato no actúan como buenos sustratos y sin embargo otras como el p-hidroxifenil pirúvico muestran una actividad del 60%.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- AITKEN, D. M. y BROWN, A. D. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* 177, 351-354.
- 2.- AROLA, U., PALOU, A., REMESAR, X., HERRERA, E. Y ALEMANY, M. (1978). *Rev. Esp. Fisiol.* 34, 345-350.
- 3.- BAYLEY, S. T. (1966). *J. Mol. Biol.* 15, 420-427.
- 4.- BELLION, E. y TAN, F. (1984). *J. Bacteriol.* 157, 435-439.
- 5.- BAHAVAN, N. V. (1983). En *Bioquímica* pp. 479-482, Interamericana, Mexico D.C.
- 6.- BLAUER, S. T. (1966). *J. Mol. Biol.* 15, 420-427.
- 7.- BLUMENTHAL, K. M. y SMITH, E. L. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 6560-6563.
- 8.- BOTTOUN, B. y SATEF, Y. (1983). *Physiol. Plant.* 59, 438-444.
- 9.- CAMMAERTS, D. y JACOBS, M. (1985). *Planta* 163, 517-526.

- 10.- CHAPLIN, A. E., HUGGINS, A. K. y MUNDAY, K. A. (1965). *Comp. Biochem. Physiol.* 76, 49-55.
- 11.- CHRISTIAN, J. H. B. y WALTHO, J. A. (1962). *Biochim. Biophys. Acta* 65, 506-510.
- 12.- COHEN, P. P. y BROWN, G. W. (1961). "Ammonia Metabolism and Urea Biosynthesis" en Florkin, M. y Masin, H. S. (eds.). *Comparative Biochemistry* vol. 11, pp. 161-294. Academic Press. Inc. Nueva York.
- 13.- CUNNINGHAM, E. B. (1978). En *Biochemistry: Mechanisms of Metabolism*, pp. 615-619, Mc Graw Hill Company, Nueva York.
- 14.- DARBYSHIRE, J. (1981). En *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, vol.5, pp. 147-186. Wiseman, A. y Horwood, E. (eds.).
- 15.- DOELLGART, G. J. y FISHMAN, W. H. (1974). *Biochem. J.* 141, 103-110.
- 16.- DUNDAS, E. D. (1970). *J. Biochem.* 16, 393-398.

- 17.- EPSTEIN, I. y GROSSOWICZ, N. (1975). J. Bacteriol. 122, 1257-1264.
- 18.- FITT, P. S. y BADDOO, P. (1979). Biochem. J. 181, 347-353.
- 19.- FRIEDEN, C. (1963). J. Biol. Chem. 238, 3286-3299.
- 20.- FRIEDEN, C. (1968). En The Role of Nucleotides for the Function and Conformation of Enzymes (Kalcker, H. M., Klenow, H., Munch, P. A., Ottesan, M. y Thayleu, J. M., eds.) pp.194-295, Munksgaard, Copenhagen.
- 21.- GOCHNANER, M. B. y KUSHNER, D. J. (1971). Can. J. Microbiol. 17, 17-20.
- 22.- GRADIN, C. H., HEDERSTED, L. y BALTSCHIEFFSKY, H. (1985). Arch. Biochem. Biophys. 239, 200-205.
- 23.- GRONOSTAJSKI, R. M., YENUNG, A. T. y SCHMIDT, R. R. (1978). J. Bacteriol. 134, 621-628.
- 24.- HAFETY, Y. y HANSTEIN, W. G. (1969). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 1129-1133.

- 25.- HELGERSON, S. L., REGUARDT, C. y STOECKENIUS, W. (1983). *Biochem.* 22, 5746-5753.
- 26.- HIGA, A. I. y CAZZULA, J. J. (1975). *Experientia* 29, 1081-1083.
- 27.- HIGA, A. I. y CAZZULA, J. J. (1975). *Biochem. J.* 147, 264-267.
- 28.- HOLMES, P. K., DUNDAS, E. D. y HALVORSON, H. O. (1967). *J. Bacteriol.* 90, 1159-1161.
- 29.- HOLMES, P. K. y HALVORSON, H. O. (1965). *J. Bacteriol.* 90, 316-319.
- 30.- HOLMES, W. M., HURD, R. E., REID, B. R., RIMERMAN, R. A. y HATFIELD, G. W. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1078-1081.
- 31.- HOOPER, A. B., HANSEN, J. y BELL, R. (1967). *J. Biol. Chem.* 242, 288-296.
- 32.- HUBBARD, S. J. y MILLER, B. A. (1969). *J. Bacteriol.* 99, 161-164.
- 33.- HUBBARD, S. J. y MILLER, B. A. (1972). *Arch. Biochem. Biophys.* 148, 318-319.

- 34.- IZOTORA, L. S., STROUGIN, A. J., CHEKULAEVA, L. N., STERKIN, V. E.
OSTOSLAVSKAYA, V. I., LYVSBLINSKAYA, L. A., TIMOKINA, E. A. y
STEPANOV, V. M. (1983). J. Bacteriol. 155, 826-830.
- 35.- JAVOR, B., REQUARDT, C. y STOECKENIUS, W. (1982). J. Bacteriol. 151,
1532-1542.
- 36.- JOSEPHS, R. (1971). J. Mol. Biol. 55, 147-153.
- 37.- KAME, J. F., WAKIN, J. y FISHER, R. S. (1981). J. Bacteriol. 148,
1002-1005.
- 38.- KERADJOPOULOS, D. y HOLLDORF, A. W. (1979). Biochim. Biophys. Acta
570, 1-10.
- 39.- KIM, E. K. y FITT, P. S. (1977). Biochem. J. 161, 313-317.
- 40.- KIMURA, K., MIYAKAWA, A., Iwai, T. y SASAKAWA, T. (1977). J. Biochem.
81, 467-476.
- 41.- KOCUR, M. y HODKISS, W. (1973). Int. J. Syst. Bacteriol. 23, 151-156.

- 42.- KUMAR, S. y NICHOLAS, D. J. D. (1984). *J. Gen. Microbiol.* 130, 967-973.
- 43.- KUSHNER, D. J. y BAYLEY, S. T. (1963). *Can. J. Microbiol.* 9, 53-57.
- 44.- KUSHNER, D. J. y ONISHI, H. (1966). *J. Bacteriol.* 91, 653-656.
- 45.- LANYI, J. K. (1969). *J. Biol. Chem.* 244, 4168-4173.
- 46.- LANYI, J. K. (1974). *Bacteriol. Rev.* 38, 272-290.
- 47.- LANYI, J. K. y STEVENSON, J. (1970). *J. Biol. Chem.* 245, 4074-4081.
- 48.- LARSEN, H. (1962). Halophilism. En *The Bacteria*, vol.4: *The Physiology of Growth*, (Gunsalus, J. C. y Stanier, R. J., eds.), Academic Press, London.
- 49.- LARSEN, H. (1967). En *Advances of Microbiological Physiology*, (Rose, A. H. y Wilkinson, J. F., eds.), Academic Press, Nueva York.
- 50.- LEICHT, W., WERBER, M. M. y EISENBERG, H. (1978). *Biochem.* 17, 4004-4006.

- 51.- LIEBERMAN, M. M. y LANYI, J. K. (1972). *Biochem.* 11, 211-216.
- 52.- LINEWEAVER, H. y BURK, D. (1934). *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658-666.
- 53.- LOUIS, B. G. y FITT, P. S. (1971). *Biochem. J.* 121, 621-627.
- 54.- FARR, A. L. y RANDALL, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 55.- MARKAN, K., SCHENEIDER, J. y SUND, H. (1971). *Eur. J. Biochem.* 24, 393-400.
- 56.- MARKAN, K., SCHENEIDER, J. y SUND, H. (1972). *FEBS Lett.* 24, 32-36.
- 57.- Mc CARTHY, A. D. y TIPTON, K. F. (1985). *Biochem. J.* 230, 95-99.
- 58.- Mc KENZIE, E. A., COPELAND, L. y LEES, E. M. (1981). *Archiv. Biochem. Biophys.* 212, 298-305.
- 59.- Mc KENZIE, E. A. y LEES, E. M. (1981). *Archiv. Biochem. Biophys.* 212, 290-297.
- 60.- Mc PARLAND, R. H. (1969). Ph. D. Thesis, Oregon, State University.

- 61.- MEDICIS, E., LALIBERTE, J. F. y VASS MARENGO, J. (1982). Biochim.
Biophys. Acta 708, 57-61.
- 62.- MESCHER, M. F., STRONINGER, J. L. y WATSON, S. W. (1974). J. Bacte-
riol. 120, 945-954.
- 63.- MEVARECH, M., LEICHT, W. y WERBER, M. M. (1976). Biochem. 15, 2383-2386.
- 64.- MEVARECH, M., LIENBERG, H. y NEWMAN, E. (1977). Biochem. 16, 378-380.
- 65.- MEVARECH, M. y NEWMAN, E. (1977). Biochem. 16, 3786-3792.
- 66.- MITCHELL, P., YEN, H. C. y MATHEMEIER, P. F. (1985). Appl. Environ.
Microbiol. 55, 325-336.
- 67.- MOON, K., PISZKIEWICZ, D. y SMITH, E. L. (1972). Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 69, 1380-1383.
- 68.- MULLAKHAUBAHAI, M. K. y LARSEN, H. (1975). Arch. Microbiol. 55, 325-336.
- 69.- NEWMAN, P., MARKAN, K. y SUND, H. (1976). Eur. J. Biochem. 65, 465-472.

- 70.- PEARCE, J. M., HILDEBRANT, V. A. y LEE, T. (1977). J. Bacteriol.
130, 27-30.
- 71.- PETERKIN, P. I. y FITT, P. S. (1971). Biochem. J. 121, 613-620.
- 72.- PHARMACIA FINE CHEMICALS (1981). En Gel Filtration Theory and Prac-
tice, pp. 20-23, Sweden, Rahms, Lund.
- 73.- PUNDAK, S. y EISENBERG, H. (1981). Eur. J. Biochem. 118, 463-466.
- 74.- REISLER, E., PONYET, J. y EISENBERG, H. (1970) Biochem. 9, 3095-3105.
- 75.- REISTAD, R. (1970). Arch. Microbiol. 71, 353-356.
- 76.- REJ, R. y VANDERLINDE, R. E. (1981). Clin. Chem. 27, 213-219.
- 77.- RIMERMAN, R. A. y HATFIELD, G. W. (1973) Science 182, 1268-1271.
- 78.- RODRIGUEZ-VALERA, F., RUIZ BERRAQUERO, F. y RAMOS COMENZARA, A.
(1980). J. Gen Microbiol. 119, 535-538.

- 79.- SARADAMBAL, K. V., BEDNAR, R. A. y COLMAN, R. F. (1981). J. Biol. Chem. 256, 11866-11872.
- 80.- SAUWAL, B. D. y LATA, M. (1961). Can. J. Microbiol. 7, 319-328.
- 81.- SCAWEN, M. D. y MELLINE, J. (1985). En Handbook of Enzyme Biotechnology, pp. 15-53, Ellis Horwood, London.
- 82.- SCHACTERLE, R. y POLLACK, L. (1972). Anal. Biochem. 51, 654-655.
- 83.- SCHANAITMAN, C. A. (1978). En Methos in Microbiology, pp. 52-61, Academic Press, New York.
- 84.- SCHOOLWERTH, A. C., NAZAR, B. L. y LANONE, K. F. (1978). J. Biol. Chem. 253, 6177-6183.
- 85.- SHIIO, I. y OZAKI, H. (1970). J. Biochem. (Tokyo) 68, 633-647.
- 86.- SILVERSTERIN, E. y SULEBELE, G. (1973). Biochem. 12, 2164-2172.
- 87.- SMITH, E. C., AVESTEN, B. M., BLUMENTHAL, K. M. y NYC, J. F. (1975). Enzymes, 3rd Ed. 11, 293-300.

- 88.- TONOSAKI, A., TOKUNAYA, F., EASHIOCA, H., KATAOKA, M. y HISATOMI, O.
(1984). Biomed. Res. 5, 1-8.
- 89.- TORREBLANCA, M., RODRIGUEZ-VALERA, F., JUEZ, G., VENTOSA, A., KAMEMURA, M. y KATES, M. (1986). Appl. Microbiol. 8, 89-99.
- 90.- TORSVIK, T. y DUNDAS, I. (1982). En Methods in Enzymology (Packer, L., ed.) vol.88, pp. 360-368, Academic Press, New York.
- 91.- VARRICHIO, F. (1969). Biochim. Biophys. Acta 177, 560-564.
- 92.- VON HIPPEL, P. H. y SCHLEICH, T. (1969). En Estructure and Estability of Macromolecules, (Timasheff, S. N. y Fasman, G. D., eds) pp. 417-427, Marcel Dekker, New York.
- 93.- WERBER, M. M. y MEVARECH, M. (1978). Arch. Biochem. Biophys. 186, 60-65.
- 94.- WINNACKER, E. L. y BARKER, H. A. (1970). Biochim. Biophys. Acta 212, 225-242.
- 95.- ZUBER, H. (1976). En Enzymes and Proteins from Thermophilic Organisms, Bir Kauser Verlag, Basel.