

Purificación y determinación de actividad enzimática de la catalasa en *Staphylococcus aureus*

Iván Marín Arguello*, Ian Roustán-Espinoza*

Resumen.- Ampliamente distribuida en células animales, vegetales y microorganismos, la catalasa es una enzima crucial para la vida. Su función catalítica es la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), compuesto altamente tóxico y generado en los procesos metabólicos de la célula. Esta enzima en *Staphylococcus aureus* es una proteína tetramérica presentando grupos hemo y moléculas de NADPH en su estructura. La determinación espectrofotométrica de los parámetros cinéticos (K_m , V_{max} . y otros) en dependencia del pH y temperatura nos podría permitir regular su actividad enzimática. La enzima manifiesta un K_m de 50mM y la presencia de dos aminoácidos (Histidina y Cisteína) en el sitio activo aparentemente son fundamentales en el proceso de catálisis.

Introducción

Características generales

Durante los procesos biológicos se generan especies químicas conocidas como radicales libres, que se caracterizan por ser moléculas o átomos con un electrón desapareado en su orbital más externo. Esta característica los convierte en elementos muy reactivos, ya que su tendencia es aparear este electrón solitario, tratando de conseguir el apareamiento de este electrón de las moléculas que lo rodean. Entre los radicales libres, los derivados del oxígeno (H_2O_2 , OH^\cdot , O_2^\cdot) son de gran interés por el gran número de procesos biológicos degenerativos en los que se ven involucrados. Entre estos podemos mencionar la carcinogénesis, cardiopatía isquémica, procesos inflamatorios, senectud, enfermedades neurodegenerativas e

infertilidad masculina (García, 1993). Paradójicamente las células evolucionadas como los neutrófilos, han sabido incorporar a los radicales libres en sus mecanismos defensivos frente a bacterias o agentes extraños capaces de producir trastornos patológicos.

En las células vegetales, células animales y microorganismos existe un sistema de protección antioxidante formado por enzimas y compuestos de bajo peso molecular, cuya función es mantener el equilibrio entre la producción /eliminación de los radicales libres, que es lo que determina que aparezcan o no enfermedades. Una de las enzimas que interviene en la protección y, en consecuencia, en el mantenimiento del balance oxidante /antioxidante, es la **catalasa**.

La catalasa (peróxido de hidrógeno: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa, EC 1.11.1.6) es una de las

* Investigadores del Centro de Biología Molecular de la-UCA

enzimas más abundantes y ampliamente distribuida en la naturaleza. Su actividad varía en dependencia de la función que realiza su célula hospedera. El objeto de este estudio es la catalasa que obtuvimos de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Esta es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular se encuentra en el rango de 240 kD (kilodaltones). Consta de cuatro subunidades -cada subunidad tiene un peso aproximado de 60 kD- idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada monómero es una / estructura, donde cada una contiene un grupo prostético (región no proteínica de la enzima) de protoporfirina IX o grupo Hemo b. Como se observa en la ilustración 1, se trata de una estructura plana constituida por cuatro anillos pirrólicos y un átomo de Fe^{+3} fijado en el centro por los átomos de nitrógeno de los respectivos anillos pirrólicos.

Además del grupo Hemo b, la catalasa contiene moléculas de nicotinamín

adenín dinucleótido fosfatado en su forma reducida (NADPH), ligada estrechamente a la enzima (Fita, 1985). En cada subunidad peptídica hay una molécula de NADPH, que no participa en la actividad catalítica de la enzima. Mas bien funciona como un reservorio de esta molécula, indispensable en muchos proceso metabólicos elementales (Kirkman, *et al.*, 1984). Parece que la función primordial del NADPH es participar en la estabilización de la estructura terciaria de la cadena proteínica.

Función enzimática

La catalasa como parte del sistema antioxidante está involucrada en la destrucción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado durante el metabolismo de la bacteria, el cual es transformado en agua y oxígeno obedeciendo al mecanismo general de la interacción entre un sustrato (S) y la enzima (E) como se muestra en la siguiente reacción:

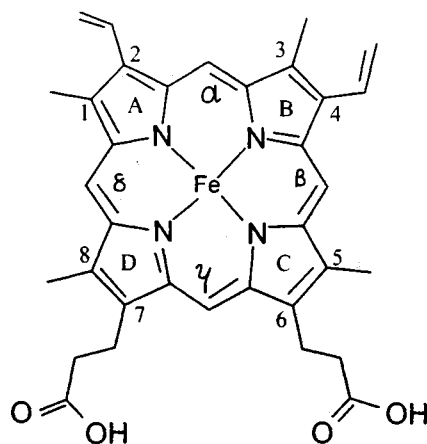


Ilustración 1. Estructura básica del grupo hemo o anillo protoporfirínico IX presente en la enzima catalasa de *Staphylococcus aureus*. El átomo de Fe^{+3} se encuentra ocupando la posición central de la estructura.

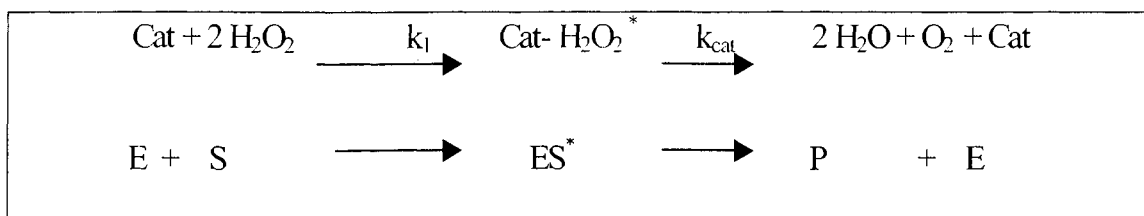


Ilustración 2. Esquema general de la interacción entre la enzima catalasa y su sustrato H_2O_2 . Simbología: * producto intermedio o estado transitorio llamado complejo enzima-sustrato; E-enzima; S-sustrato; P-producto; Cat-catalasa; k_1 -constante de velocidad; k_{cat} constante de velocidad catalítica.

La reacción general señala que una de las moléculas de H_2O_2 funciona como donador de los átomos de hidrógeno y la otra se desempeña como receptor de los mismos. Una característica de esta reacción es que la misma molécula (H_2O_2) actúa como donador y receptor a la vez. En este proceso, el átomo de hierro (Fe) del grupo Hemo desempeña una función crucial en la catálisis actuando como enlace entre la enzima y el H_2O_2 . En la ilustración 3 se muestra el mecanismo de cómo es desdoblado el H_2O_2 convirtiéndolo en agua y oxígeno (Andersson, 1991). En el sitio activo de la enzima además del grupo Hemo nos

encontramos con aminoácidos que son cruciales, como la tirosina (Tyr) que actúa como estructura de soporte del grupo Hemo, brindándole la orientación correcta dentro del sitio activo de la enzima (ver ilustración 3).

El H_2O_2 es una molécula sumamente reactiva y debido a su reducido tamaño puede difundirse fácilmente a través de las membranas y acumularse en determinada topografía celular trastocando irreversiblemente los procesos biológicos fundamentales de la célula, como se detalla en la ilustración 4 (Crystal y Ramón, 1992:16).

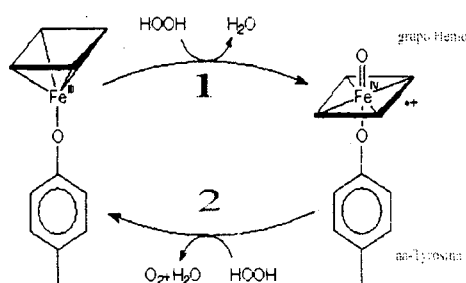


Ilustración 3. Representación del mecanismo de acción de la catalasa en la transformación del H_2O_2 en agua y oxígeno. La reacción 1 muestra la unión de la primera molécula de H_2O_2 y la transformación de esta en agua, quedando un átomo de oxígeno unido al hierro del grupo hemo. El proceso de catálisis concluye cuando la segunda molécula de H_2O_2 es transformada inmediatamente en agua y oxígeno. En el esquema se denota la unión del aminoácido tirosina al grupo hemo.

Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero relativamente poca afinidad por el sustrato. La catalasa también manifiesta otra actividad enzimática denominada actividad peroxidativa, que consiste en la aptitud de esta enzima en tomar como donadores de hidrógeno no solo al peróxido de hidrógeno, sino también a otras moléculas como el metanol, ácido fórmico, fenol, formaldehído y etanol (Nozumo, *et al.*, 1973).

En el presente estudio se determinaron una serie de parámetros cinéticos y ambientales de la Catalasa de *S. aureus* (ver cuadro 1) que permiten determinar las condiciones óptimas para el funcionamiento de la enzima. Lograr medir la velocidad de catálisis manifestándose en el valor de su Constante de Michaelis ($K_m=50$ mM) nos permite determinar la especificidad

de la enzima sobre su sustrato, lo que nos abre la puerta en la búsqueda de fármacos específicos para bloquear o regular la actividad enzimática de la catalasa y, de esta manera, librarnos de la agresividad patógena manifestada por la bacteria en estudio. De este modo, se favorecería la función inmunológica de los leucocitos polimorfonucleares que producen radicales libres para la eliminación de bacterias u otros agentes patógenos. Avances más significativos nos daría la implementación de los métodos de la biotecnología, utilizando a ésta como una herramienta de estudio en los cuales podríamos inducir cambios genéticos en la secuencia del gen de la catalasa del *Staphylococcus aureus*, que se manifestarían en la inactividad parcial o total de mencionada enzima. Y así auxiliar a los antibióticos en el control de enfermedades patógenas.

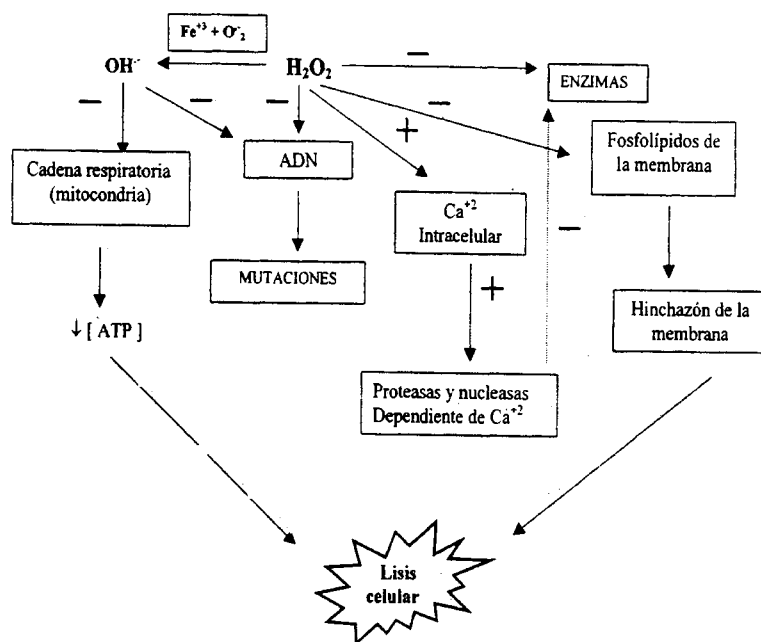


Ilustración 4. Detalle de los posibles efectos fisiológicos que pueden ser desencadenados por la acumulación del H_2O_2 en el interior de la célula. Simbología: + efecto positivo; - efecto negativo o inhibitorio; disminución; ATP adenosintrifosfato; $O_2^{\cdot-}$ radical anión superóxido; OH^{\cdot} radical hidroxilo; [] concentración.

Materiales y métodos

Materiales

La cepa de *Staphylococcus aureus* desarrollada en un medio de cultivo agar-sangre fue caracterizada y suministrada por el departamento de microbiología clínica del Hospital Bautista. Los químicos utilizados corresponden a Tris (Gibco BRL), LB Broth Miller (Fisher), Na_2HPO_4 (Sigma), NaCl (Merck), BSA (Bio-Rad), EDTA (Fisher), PMSF (Boehringer Mannheim), DEAE-Celulosa (Whatman), SDS (Sigma), Acrilamida (Fisher), Bis-acrilamida (Boehringer Mannheim), Persulfato de amonio (Fisher), Peróxido de hidrógeno (Emproquim), membrana para diálisis (Spectrum Medical Industries, Inc.).

Métodos

Extracción de la catalasa. Con la ayuda de una asa microbiológica se tomaron muestras de células de *Staphylococcus aureus* de diferentes colonias del mismo plato Petri. Estas se suspendieron en 60 ml en el medio de cultivo líquido LB Broth Miller (dehydrated) y se dejaron en un mezclador (Lab-line, Environ Shaker) por un período de 16-18 hrs. a 30°C a una velocidad de rotación de 75 rpm. Posteriormente, el medio de cultivo fue centrifugado (HT Centrifuge Beckman) a una velocidad de 3,500 rpm por un período de 15 min. El sedimento obtenido se suspendió en 0.5ml de buffer 50 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM PMSF pH 7.0. Seguidamente se sonicó (GE 70 Ultrasonic processor) la muestra por

períodos de 30seg a una amplitud de 40 con intervalo de enfriamiento de 30 seg a un min., este ciclo se repitió cuatro veces. La muestra obtenida se centrífugo (Centrifuge 5415 C Eppendorf) por 10 min. a 12,000 rpm., obteniendo un volumen total de 0.7ml y una concentración de proteínas en el sobrenadante de un mg/ml, concentración que fue determinada utilizando el método de Bradford. Durante el proceso de extracción la muestra siempre se manejó bajo hielo.

Purificación de la Catalasa. El volumen total del sobrenadante se purificó a través de una columna (10cm de alto X 0.75cm de diámetro) conteniendo DEAE-Celulosa (intercambio aniónico) utilizando como buffer de elusión a 50 mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 7.0 con diferentes concentraciones de NaCl (0.05M, 0.25M, 0.5M, 0.1M 1.5M, 2M) y con un flujo de elusión de un ml/min. De este modo se obtuvo la enzima de interés y el pico de elusión más alto de proteína a una concentración de 1.0M NaCl. El volumen total recogido de esta fracción fue de 0.6ml con una concentración determinada (método de Bradford) de 0.2mg/ml. Lo que dio una reducción en la concentración de proteínas de cinco veces menor en comparación con la concentración inicial obtenida.

Diálisis. Para eliminar el exceso de NaCl de la fracción eluida en la cromatografía de intercambio iónico y que se utilizará para medir la actividad enzimática, se sometió al proceso de diálisis. En este proceso se utilizó una membrana Spectra/Por® N° 1 que, conteniendo la fracción a dializar, se suspendió en un litro del mismo buffer

de elusión que se empleó en la purificación sin NaCl y se dejó por 24hrs bajo refrigeración.

Determinación de la actividad catalítica de la catalasa. En una cubeta espectrofotométrica de cuarzo conteniendo 1ml de buffer 50mM Na_2HPO_4 , 0.1mM EDTA pH 7.0 se añadieron 30 μl (6g) de homogenizado de catalasa, estableciéndose de esta manera el tiempo cero de la reacción. La medición se realizó con la ayuda de un espectrofotómetro DU-6 Beckman. Iniciando la reacción añadiendo diferentes concentraciones de H_2O_2 el cual refleja su valor máximo en el espectro de absorción a los 240nm (Chance, 1949). Manifestándose la actividad catalítica de la enzima en la disminución del valor de absorción en el espectro ultravioleta (240 nm) en relación al tiempo (cada 10 seg). De esta manera se registró la actividad enzimática en base a la disminución del sustrato y no en función del producto formado, agua y oxígeno, que no absorben la luz ultravioleta en los 240 nm. Se observó que a los 2 ó 3 minutos de haber iniciado la reacción el surgimiento de burbujas de oxígeno como resultado de la descomposición del H_2O_2 las cuales se adhieren a las paredes de la cubeta de cuarzo. Estas burbujas no interfieren en la medición, ya que lo que interesa registrar es la actividad de la catalasa en el primer minuto de la reacción. Esta misma medición se realizó a diferentes concentraciones de sustrato (H_2O_2), pH y temperaturas, establecidas con la ayuda de un termo ciclador refrigerado (RCB 300 Refrigerated Circulating Bath).

Determinación del peso molecular de la catalasa. Para ello se efectuó la corrida de una electroforesis de SDS-poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes que es un método bajo en costos, fácilmente reproducible y rápido en la cuantificación y caracterización proteínica. Esta aplicación básicamente nos permite separar a las proteínas en base a su peso molecular utilizando como instrumento para la determinación un Bio-Rad Mini-Protean II. La electroforesis se corrió por 45 min. a una corriente de 100 mA al inicio y de 60 mA al final, con una concentración del gel de separación del 15% y del 5% del gel condensante (Bollag et al., 1996). Para la determinación del peso molecular de la catalasa en la corrida electroforética se utilizó un marcador (Bio-rad) conteniendo bandas proteínicas con diferentes pesos moleculares.

Resultados y discusión

Una vez purificada la catalasa obtenida de *Staphylococcus aureus*, se procedió a medir su actividad enzimática para verificar el éxito del proceso de purificación y poder caracterizar cinéticamente su actividad determinando parámetros fundamentales como K_m (constante de Michaelis), V_{max} (velocidad máxima) y k_{cat}/K_m que nos proporcionan descripciones excelentes de las propiedades generales de las enzimas, evaluar su eficiencia como catalizadores y las condiciones (pH y temperatura) para una actividad máxima u óptima. Para ello inicialmente se mide su actividad a diferentes concentraciones de sustrato, conservando en cada medición la misma

concentración de enzima (6g). Los valores de la actividad se resgistran cada 10 segundos hasta alcanzar el minuto. Como puede observarse en la ilustración 3, hay una relación directamente proporcional entre el aumento del valor de la absorción del H₂O₂ (240nm) y la concentración de este mismo, y a medida que transcurre el tiempo de reacción, disminuye el valor de absorción del H₂O₂, lo que

evidencia la descomposición de éste en agua y oxígeno.

Una de las ventajas que presenta la catalasa es que su actividad enzimática se puede medir en homogenizados que no requieren procesos rigurosos de purificación y excesivamente purificados. En el cuadro 1 se reflejan los parámetros cinéticos obtenidos para la catalasa.

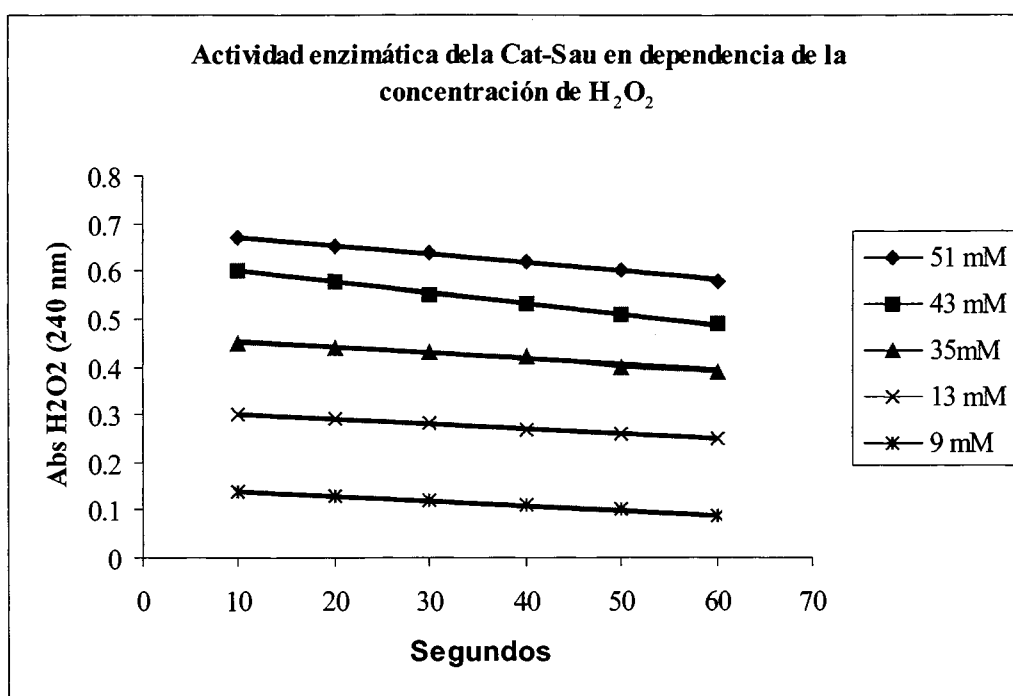


Ilustración 5. Representación del valor de absorción del H₂O₂ a los 240 nm en dependencia de su concentración (mM). Se observa la variación lineal de la absorción en función del tiempo debido a la actividad enzimática de la catalasa.

Cuadro 1
PARÁMETROS CINÉTICOS OBTENIDOS

Organismo	Enzima	Km	Vmax.	k _{cat} /Km	T	pH
<i>Staphylococcus aureus</i>	Catalasa	50 mM H ₂ O ₂	20 mmol/min	2X10 ⁸ M/s	25 °C	7.0

Retomando la ilustración 2, la formación y la disociación de los complejos ES es una reacción muy rápida porque sólo se forman y se rompen enlaces no covalentes. El sustrato es alterado químicamente únicamente cuando el complejo ES se descompone en su producto, siendo este último el aspecto determinante en la velocidad de la enzima y en su valor de K_m . La interpretación práctica del K_m obtenido tiene diversos significados:

- 1) Representa la concentración de H_2O_2 que ha consumido la catalasa para alcanzar la mitad de su velocidad máxima. En otras palabras, la catalasa necesita consumir 50mM de H_2O_2 para poder alcanzar la mitad de su velocidad máxima. Corresponde a la mitad de la enzima total del sistema que se encuentra bajo la forma ES (ver ilustración 2).
- 2) Es una medida de la afinidad de la enzima por su sustrato. Mientras menor sea el valor de K_m , más firmemente se fija el sustrato a la enzima. En nuestro estudio, el valor de 50mM determinado para la catalasa nos marca una considerable afinidad de esta por el H_2O_2 . El estudio en otras bacterias se ha establecido que el valor para el K_m oscila entre 20-40mM (Terzenbach y Blaut, 1998) (Lehninger, 1993).
- 3) El valor de K_m para la catalasa nos permite obtener una estimación de

la concentración del H_2O_2 dentro de la célula. Muchos problemas fisiológicos que pueden derivar en enfermedades, se originan por la acumulación excesiva o por la ausencia total de determinado sustrato causado por el ineficiente trabajo de una o varias enzimas, por lo que el valor de K_m proporciona patrones reconocibles para el estudio de la inhibición o estimulación enzimática. Por lo tanto, pequeños cambios en la concentración de sustrato por encima o por debajo del valor de K_m fisiológico dan lugar a cambios porcentuales considerables de la velocidad de reacción, lo que nos permite regular vías metabólicas a través de pequeños cambios en la concentración de algunos de los sustratos implicados en las mismas.

Para determinar los valores de K_m y de V_{max} se pueden utilizar diferentes procedimientos (Lehninger, 1987). Ambos valores se obtienen por el registro de las velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sustrato y única concentración de enzima. Los valores se determinaron mediante transformaciones gráficas de la ecuación de Michaelis-Menten (Horton *et al.*, 1995:5-12) para tener líneas rectas. La transformación gráfica que se utilizó para determinar los valores cinéticos de la catalasa es la de Lineweaver-Burk o de recíprocos dobles. En la ilustración 6 se muestra la representación gráfica para la determinación de K_m y de V_{max} .

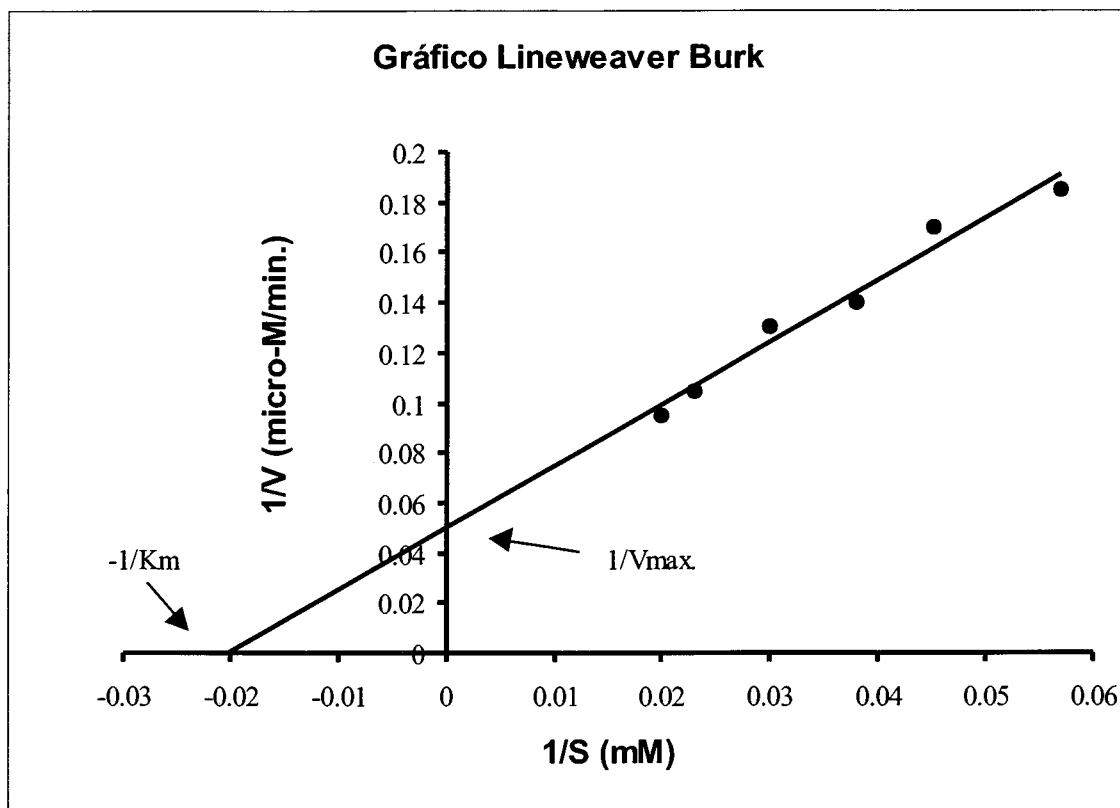


Ilustración 6. Gráfico Lineweaver-Burk o doble recíproco utilizado para la determinación del K_m del H_2O_2 para la catalasa de *Staphylococcus aureus*. El punto de intersección en el eje X corresponde al valor de $-1/K_m$, equivalente a 50mM, y el punto de intersección en el eje Y representa a $1/V_{max}$.

Por otro lado en el cuadro 1 se muestra el valor de k_{cat}/K_m -con frecuencia se denomina *constante de especificidad*-, que representa una constante de velocidad que gobierna la reacción de una enzima con su sustrato en soluciones diluidas no saturadas. Su valor da una medida de la eficiencia catalítica y la especificidad de la catalasa, e indica la frecuencia con la que la molécula de H_2O_2 colisiona con la catalasa en una solución acuosa, la cual posteriormente es transformada en su producto (agua y oxígeno). En este contexto, el perfeccionamiento catalítico y la eficiencia de la catalasa es muy alta, si se toma en cuenta que la catalasa es de un tamaño mucho mayor

que el sustrato y que éste debe de alcanzar la posición correcta dentro del centro activo de la enzima para ser degradado en su producto. Debido al valor tan alto de esta constante, la catalasa no presenta saturación por el sustrato, ya que la velocidad de descomposición del complejo ES para formar producto no es una limitante en la reacción. Por el contrario, para esta enzima, la formación del complejo ES es la etapa que determina la velocidad.

Incidencia del pH sobre la actividad enzimática

La mayoría de las enzimas poseen un pH característico al cual su actividad es

máxima; por encima o por debajo de ese pH la actividad disminuye. El K_m no es un valor fijo, sino que puede variar en dependencia del pH del medio. Por ello se midió la actividad de la catalasa sometida a diferentes pH para registrar el comportamiento del K_m en función del pH y establecer su pH óptimo, que no es necesariamente idéntico al pH de su entorno intracelular normal. El estudio de la actividad de la catalasa en función del pH puede constituir un factor en el control intracelular de la actividad enzimática. Ya se ha mencionado e interpretado el valor del K_m de la catalasa para su sustrato obtenido a pH 7, que se considera el pH óptimo, por el valor de K_m obtenido en este punto (ver cuadro 1). A partir del mismo extracto purificado y con la misma concentración de proteína se midió el K_m para el H_2O_2 de la catalasa a los pH de 5, 6, 8 y 9. Fue imposible medir la actividad de la enzima a valores de pH más allá de 5 y de 9 que sugiere que a pH extremos, la enzima

sufre el proceso de desnaturalización irreversible. A pH 6 y 8 el valor de K_m correspondió a 1M. Si se compara con el valor registrado a pH 7, se observa un incremento del K_m en 20 veces. Esto permite sugerir que los residuos de aminoácidos ionizables que conforman el sitio activo de la catalasa sufren modificaciones iónicas ejercidas por el pH, lo que disminuye la afinidad de la enzima hacia su sustrato, aumentando considerablemente el valor del K_m . Otro efecto posible sujeto a estudios posteriores es que el pH indujo cambios en la conformación terciaria de la proteína que dificultó la formación del complejo ES o retardó la descomposición de este en su producto nativo, agua más oxígeno. A los valores de pH 6 y 9 resultó imposible medir el K_m respectivo, aunque si se registró actividad enzimática. El perfil de velocidad de la enzima en función del pH se puede representar en una curva sencilla en forma de campana a como se muestra en la ilustración 7.

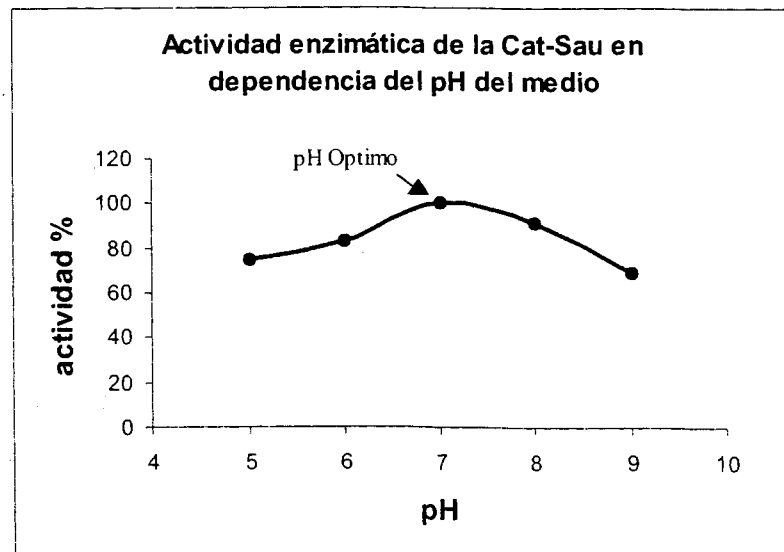


Ilustración 7. Porcentaje de la actividad enzimática de la catalasa en función del pH del medio. La cual es reflejada en una curva en forma de campana, siendo el punto máximo de actividad correspondiente al pH óptimo.

A partir de los valores obtenidos sobre la actividad de la catalasa a diferentes pH se puede construir el gráfico que permita determinar los aminoácidos que desempeñan un papel fundamental en proceso de catálisis en la catalasa, basado en el valor de los pK obtenidos (pK, es el valor del pH en el cual la concentración de la forma protonizada u desprotonizada de un grupo funcional se encuentran en equilibrio). La ilustración 8 muestra la manera de determinar los pK de dos aminoácidos cruciales para la catálisis.

El valor del pK igual a 6.5 corresponde al grupo imidazol del aminoácido histidina (His) lo cual se corresponde con datos obtenidos para la catalasa de otras bacterias (Brill y Sandberg, 1968). Para el valor del pK igual a 7.7 se considera que puede corresponder al grupo sulfhidrilo del aminoácido Cisteína (Cys) (Deisseroth, *et al.*, 1970), aunque éste normalmente manifiesta tener un pK de 8.3, se entiende que los aminoácidos vecinos tridimensionalmente, que también conforman el sitio activo de la catalasa, influyen sobre el pK de la cisteína disminuyendo su valor.

Actividad enzimática en dependencia de la temperatura

Al igual que el pH, el efecto de la temperatura sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas es también

complejo. En el estudio se midió la actividad de la catalasa a tres temperaturas diferentes, como se muestra en la ilustración 9, observando que la actividad catalítica de la enzima tiene un perfil sigmoideo sencillo en forma de campana. Si se compara la actividad a los 16° C y 25° C, se registró un incremento en la actividad en un 20% a los 25° C. En este punto es probable que el incremento de la temperatura incida en el aumento de las probabilidades de encuentro o de choque entre las moléculas de reactivos (enzima y sustrato), lo que aumenta la velocidad de reacción. Por otro lado, si se compara la actividad catalítica a los 25° C y 35° C, se registra un 10% en la disminución en la reacción enzimática, porque el incremento de la temperatura supone un aumento en la velocidad de desnaturalización, induciendo desplegamientos o afloramientos de aminoácidos con residuos hidrofóbicos sobre la superficie de la catalasa, que es una proteína globular (Lozano, *et al.*, 1996).

Es probable que la decadencia de la actividad enzimática a los 35° C sea producto del efecto térmico de la temperatura sobre la estructura proteínica terciaria o por la rápida descomposición del H₂O₂, debido a que el enlace entre los átomos de oxígeno es poco estable a ésta temperatura, lo que causa inestabilidad en la molécula (Nekrasov, 1988).

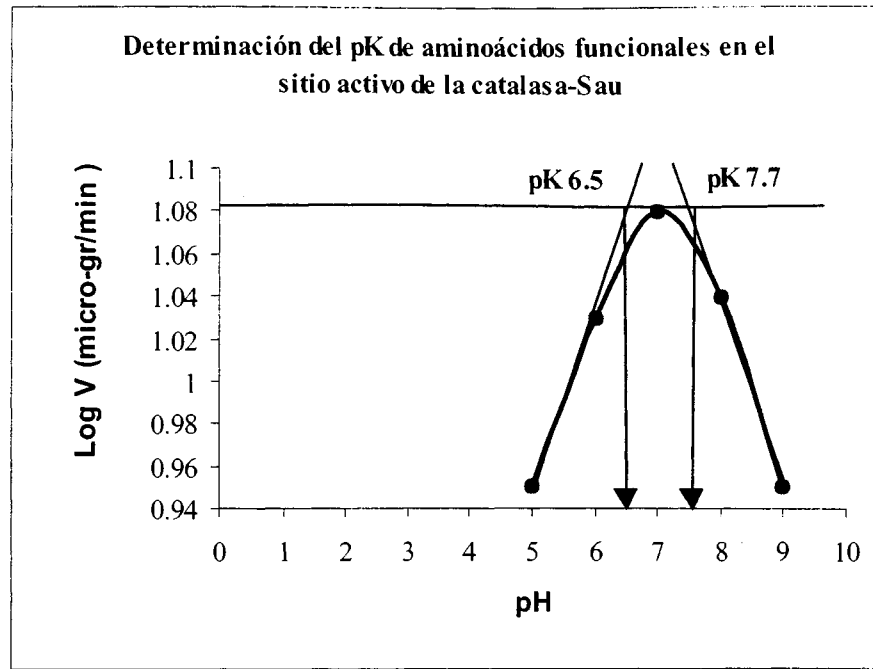


Ilustración 8. En los puntos de intersección se muestran los valores de pK para dos aminoácidos esenciales en el proceso de catálisis de la catalasa.

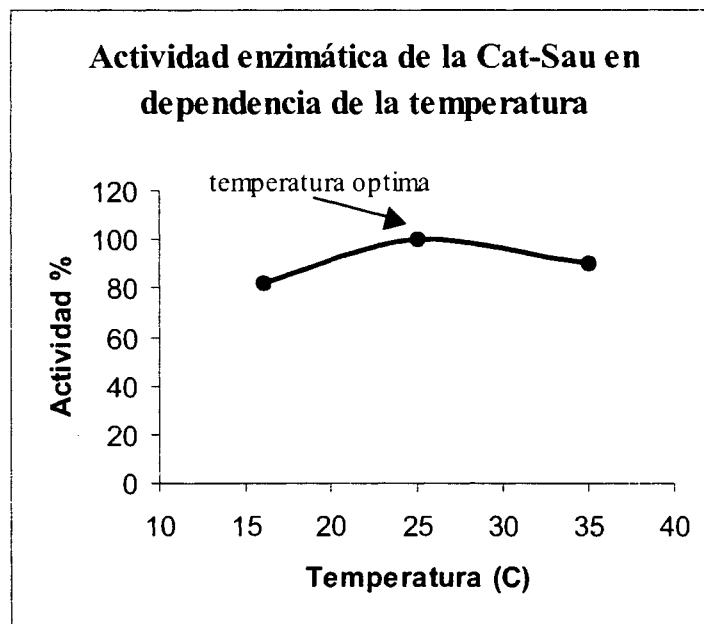


Ilustración 9. Representación de la actividad catalítica de la catalasa en función de la temperatura. El punto donde se observa la mayor actividad enzimática es considerado como la temperatura óptima.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación contó con el apoyo de la Fundación *New England Biolabs* y la Organización Mundial de la Salud (grant T16/181/404, ID-9703).

El Centro de Biología Molecular de la UCA es financiado por la *Pew Charitable Trusts* (grant PO114SC).

Bibliografía

- ANDERSSON, L.A. y DAWSON, L., (1991). "Exafs spectroscopy of the heme-containing oxygenases and peroxidases".USA. *Structure and Bonding* N64.
- BOLLAG, D., ROZYCKI, M., y EDELSTEIN, S. (1996). *Protein Methods*. USA. Wiley-Liss, Inc. 2^ª Ed.
- BRILL, A.S. y SANDBERG, H.E. (1968). *Biophys. J.* 8,669.
- CHANCE, B., (1949). *J. Biol. Chem.*, 179, 1299. USA.
- DESISSEROTH, A., y DOUNCE, A. (1970). "Catalase: Physical and Chemical Properties, Mechanism of Catalysis, and Physiological Role". *Physiological Reviews*, Vol. 50, N3. USA.
- LEHNINGER, A., NELSON, D., y COX, M. (1993). *Principles of Biochemistry*. USA. Worth Publishers, 2 ed.
- LEHNINGER, A. (1987). *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. Barcelona. Ediciones Omega, S.A.