

CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL  
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

FICOBILISOMAS EN *SPIRULINA MAXIMA*

por

M. GUADALUPE PRADO FLORES

Tesis para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en la especialidad de Bioquímica

México, D. F.

1980

C I E A I P N  
B I B L I O T E C A  
D E P T O . D E B I O Q U I M I C A

A mis padres,

a mis hermanos,

a Javier y a Pedro.

*La fenomenología de los procesos vitales expresa su materialidad tanto a nivel de estructura como de las relaciones que establece. Experimentar ese dinamismo es participar de la vida y descubrir una pequeñísima fracción de esa intrínca-da red es asomarse a lo infinito.*

*Agradezco a los que ya habían tenido esta experiencia y me permitieron compartirla: el Dr. Carlos Gómez-Lojero, director de este trabajo, a quien reconozco su academismo y a los asesores del mismo, el Dr. Mario García Hernández y el Dr. Boanerges Rubalcava Esparza, por sus orientaciones y sugerencias en la revisión del mismo.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfonso Carabez Trejo, autor de las fotografías de microscopía electrónica.

Al Dr. David Krogmampor su estímulo y sus observaciones.

A los ingenieros Claudio Santillán y O. Zempoaltécatl de "Sosa Texcoco, S.A." por su disponibilidad a proporcionarnos el material biológico de este estudio.

A la Dra. Esthela Sánchez de Jiménez de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNAM, quien gentilmente nos obsequió una muestra de *Anabaena* sp. A la Dra. Hilda Villegas del Hospital de Ginecoobstetricia núm. 4 del IMSS, por permitirnos usar su equipo de criograbado.

A Luis González, Claudia Lerma y Diego González por sus comentarios y sugerencias.

A Bertha Pérez Gómez, Jorge Zarco Rivera, Agustín Martínez y José Cortés por su valiosa ayuda técnica.

A Carmen Briones, Cristina Díaz y Marina Peral por su amable colaboración en los aspectos administrativos y mecanográficos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, CINVESTAV por el apoyo económico otorgado de agosto de 1976 a marzo de 1979.

INDICE

INTRODUCCION

Descripción y cultivo de <i>Spirulina maxima</i> . . . . .	2
Fotosíntesis . . . . .	5
Fotosíntesis en cianofíceas . . . . .	15
Pigmentos auxiliares . . . . .	17
Objetivo . . . . .	33

METODOS Y MATERIALES

Cultivo de alga <i>S. maxima</i> . . . . .	34
Determinación de clorofila . . . . .	34
Medición de la intensidad luminosa . . . . .	35
Espectro de absorción . . . . .	35
Cambios en la concentración de oxígeno . . . . .	36
Espectro de actividad fotosintética . . . . .	37
Espectros de fluorescencia . . . . .	38
Gradientes de sacarosa . . . . .	41
Aislamiento de ficobilisomas . . . . .	42
Localización del ficobilisoma por microscopía electrónica . . . . .	46
Determinación de fosfatos . . . . .	48
Determinación de conductividad . . . . .	48
Determinación de proteína . . . . .	49
Cromatografía en hidroxilapatita . . . . .	50
Electroforesis en geles de poliacrilamida . . . . .	52

Electroforesis con dodecil sulfato de sodio . . . . .	53
Registros densitométricos de los electroforegramas . . . . .	56
Medición de la densidad óptica en las bandas de los electroforegramas . . . . .	57
Filtración en gel . . . . .	57
Coefficiente de sedimentación de la ficocianina y la aloficocianina . . . . .	

#### MATERIALES

Lista de reactivos . . . . .	58
Medio de Argel . . . . .	62
Equipo empleado . . . . .	63

#### RESULTADOS

Espectro de actividad fotosintética . . . . .	65
Asociación de los pigmentos auxiliares . . . . .	81
Aislamiento del ficobilisoma . . . . .	98
Caracterización de la ficocianina . . . . .	118
Caracterización de la aloficocianina . . . . .	129

#### DISCUSION

Espectro de actividad fotosintética . . . . .	177
Morfología, localización y funcionalidad del fico- bilisoma . . . . .	181
Caracterización de los pigmentos . . . . .	189
Resumen . . . . .	198

BIBLIOGRAFIA . . . . . 201

APENDICE

Condiciones experimentales para la determinación  
del espectro de actividad fotosintética . . . . . 212

C I E A I P N  
B I B L I O T E C A  
D E P T O . D E B I O Q U I M I C A

INDICE DE FIGURAS

1. Esquema Z en el proceso fotosintético . . . . .	8
2. Fórmulas de los cromóforos de los pigmentos auxiliares . . . . .	21
3. Esquema del modelo de organización de los ficobilisomas en la membrana fotosintética . . . . .	31
4. Diseño de trabajo en la producción de oxígeno en función de la longitud de onda . . . . .	40
5. Espectro de absorción y primera derivada del alga completa . . . . .	69
6. Trazo del polarógrafo en producción y consumo de O <sub>2</sub> . . . . .	72
7. Espectro de actividad fotosintética del alga <i>Spirulina maxima</i> . . . . .	78
8. Fotomicrografía de <i>Anabaena sp</i> mostrando ficobilisomas . . . . .	84
9. Membranas tilacoidales de <i>Anabaena sp.</i> con ficobilisomas asociados . . . . .	86
10. Membranas tilacoidales de <i>Spirulina maxima</i> con presencia y ausencia de ficobilisomas. . . . .	88
11. Histogramas con la proporción de ficobilisomas de <i>Spirulina maxima</i> y <i>Anabaena sp.</i> . . . . .	92
12. Criograbado de muestras tilacoidales de <i>Spirulina maxima</i> con ficobilisomas y sin ellos. . . . .	95
13. Espectro de absorción y primera derivada del ficobilisoma . . . . .	100

14. Esquema de la obtención del ficobilisoma en el gradiente . . . . .	103
15. Espectro de absorción y fluorescencia del ficobilisoma . . . . .	105
16. Coeficiente de sedimentación del ficobilisoma . . . . .	108
17. Disociación del ficobilisoma por descenso de temperatura . . . . .	116
18. Perfil de elución de la ficocianina en cromatografía de hidroxilapatita. . . . .	121
19. Espectro de absorción y fluorescencia de la ficocianina purificada, . . . . .	124
20. Coeficiente de sedimentación de la ficocianina . . . . .	128
21. Perfil de elución de la aloficocianina en cromatografía de hidroxilapatita, . . . . .	131
22. Espectros de absorción y fluorescencia de la aloficocianina . . . . .	135
23. Comparación de la fluorescencia en ficobilisomas asociados, disociados y pigmentos libres. . . . .	138
24. Coeficiente de sedimentación de la aloficocianina.. . . .	142
25. Patrones de migración de la ficocianina y aloficocianina en poliacrilamida sin SDS y con SDS. . . . .	152
26. Medición del peso molecular de las subunidades de ficocianina y aloficocianina. . . . .	155
27. Separación electroforética de las subunidades $\alpha$ y $\beta$ de la ficocianina y de la aloficocianina.. . . .	158
28. Trazos densitométricos en geles de poliacrilamida de aloficocianina en DSS . . . . .	163

29.	Estequiometría de las subunidades de aloficocianina. . . . .	165
30.	Filtración en gel de ficobilisomas disociados. . . . .	169
1'	Efecto de la cantidad de alga <i>Spirulina maxima</i> sobre producción y consumo de $O_2$ . . . . .	214
2'	Efecto de la temperatura sobre la producción y consumo de $O_2$ . . . . .	217
3'	Efecto del pH sobre la producción y el consumo de $O_2$ . . . . .	220
4'	Concentración de clorofila en función de la canti- dad del alga. . . . .	223
5'	Efecto de la intensidad luminosa sobre la produc- ción y el consumo de $O_2$ . . . . .	226
6'	Efecto de la intensidad luminosa sobre la pro- ducción y el consumo de $O_2$ en alga resuspendida en medio de Argel. . . . .	228
7'	Viabilidad del alga en una muestra incubada a la luz y mantenida a temperatura constante. . . . .	233
8'	Inhibición de producción de $O_2$ por DCMU . . . . .	237
9'	Efecto de inhibición del DCMU en función del tiempo . . . . .	239
10'	Inhibición del consumo de $O_2$ por KCN . . . . .	242
11'	Porcentaje de disminución de producción de $O_2$ por efecto del KCN. . . . .	244

INDICE DE TABLAS

I. Espectro de eficiencia fotosintética de <i>Spíruína</i> <i>maxíma</i> . . . . .	76
II. Estequiometría del ficobilisoma por coeficiente de sedimentación y estequiometría de ficocia- nina:aloficocianina por coeficiente de extinción. . .	174
III. Reproducibilidad de datos en las fracciones de las columnas cromatográficas . . . . .	175
IV. Caracterización los pigmentos ficocianina y aloficocianina . . . . .	176

ABREVIATURAS

C I E A I P N  
B I B L I O T E C A  
D E P T O . D E B I O Q U I M I C A

$h\nu$	cuanto de luz
$PS_I$	fotosistema I
$PS_{II}$	fotosistema II
$E'_O$	potencial de óxido-reducción estándar a pH 7.0 y 25°C
FE	Ficoeritrina
FC	Ficocianina
C-FC	Ficocianina de cianofíceas
AFC	Aloficocianina
PEB	ficoeritrobilina
PCB	ficocianobilina
FBS	ficobilisoma
$\omega$	velocidad angular en radianes/seg
$\Delta t$	diferencial del tiempo
$S_{20,w}$	coeficiente de sedimentación en svedbergs S, con referencia al agua a 20°C
b:a	relación bisacrilamida:acrilamida
F	fluorescencia
"s"	cromóforos sensibilizadores
"f"	cromóforos fluorescentes
$\Delta\lambda$	variación de longitud de onda
cl a	clorofila <u>a</u>
cl b	clorofila <u>b</u>
DCMU	3-(3-4 diclorofenil)-1,1-dimetil urea

## INTRODUCCION

Los procesos de transducción energética son, entre los fenómenos de membrana, tema de acuciosa investigación. En el campo de la fotosíntesis, los recursos conceptuales y metodológicos se orientan a diversos mecanismos enfocando un panorama de múltiple interés.

Las proteínas de membrana situadas con una vectorialidad dada en la bicapa lipídica, realizan funciones específicas que hacen evidente el alto grado de organización tanto a nivel intramolecular como de interacciones con su medio circundante.

Este es el caso de las proteínas que se llaman pigmentos auxiliares, moléculas que captan energía luminosa a diferentes estadios del espectro visible y la transfieren a la clorofila de la membrana. (O'hEocha 1965, Gantt y col. 1976). Tal proceso de orden físico sólo se puede llevar a cabo a la eficiencia que se observa, en una geometría molecular cuyas características de estructura sean estrictas.

Estos pigmentos antena son de diferente naturaleza en diferentes puntos de la escala filogenética; mientras que en las plantas superiores dicha actividad la realiza la clorofila b (Clayton 1970) y en las bacterias fotosintéticas la bacterioclorofila es la responsable de cosechar la luz (B. y Parson 1978), en las algas rojas, verdes azules y criptofi-

tas esta función es llevada a cabo por un grupo de moléculas protéicas llamadas ficobilinas (French y col. 1952).

Para analizar este mecanismo se ha seleccionado un procarionte que conjunta dos series de cualidades interesantes para su estudio: es un sistema relativamente sencillo pues se clasifica como polibacteria o cianobacteria (G. Dumartrait y col. 1976) y a la vez su aparato fotosintético trabaja con los dos fotosistemas secuenciados que se ven en cloroplastos de plantas superiores, por eso el empleo de *Spirulina maxima* permite conocer mecanismos complejos en organismos sencillos, al cual, inclusive, se tiene fácil acceso.

#### Descripción de *Spirulina maxima*

Ha sido clasificada en la División de *Cyanophyta*, clase *Cyanophyciae*, dentro del Orden de *Nostocales* y Familia *Oscillatoriaceae*. El Género de *Spirulina* agrupa a la Especie *maxima* que crece fundamentalmente en una zona lacustre del Valle de México y otra especie *plantensis* localizada predominantemente en el Tchad, Africa.

La microscopía de luz la manifiesta de forma filamentosa, en espiral llamado tricomio, con una cantidad de vueltas dependiente del medio nutriente, oscilando entre 7 y 12 para medios líquidos, con una longitud promedio de 200  $\mu\text{m}$  y un diámetro aproximado de 5-10  $\mu\text{m}$  (Guérin-Dumartrait y col. 1976) La microscopía de alta resolución revela múltiples estructuras que se consideran semejantes a las que presenta *Spirulina plantensis*. (Chantavong 1974).

En ella se pueden identificar las siguientes estructuras: a) una gruesa pared celular con cuatro capas diferentes: la primera (a partir de la membrana plasmática) transparente, la segunda densa a los electrones formada por mucopéptidos, la tercera transparente y la capa externa, regularmente densa; b) una membrana citoplásmica con la imagen de dos surcos sombreados y una zona clara en medio de unos 100 Å de espesor total; c) un nucleoplasma carente de membrana perinuclear y un tanto disperso; d) una gran proporción de membranas tilacoidales orientadas de diferente manera, a veces periférica, otras radialmente; en dichas estructuras multilamelares es donde se realiza el trabajo fotosintético; e) una apreciable cantidad de vacuolas de gas que permite al alga flotar y captar la luz de la superficie; f) gránulos de polifosfatos lo cual es índice de la actividad metabólica; g) gotas lipídicas; h) corpúsculos protéicos de reserva e i) una vaina que le es común a varias células. Sus membranas tilacoidales, a nivel funcional pueden compararse a los sacos lamelares de los vegetales superiores, son los responsables de la autotroficidad, tienen un espesor de 80-100 Å y están formados de una bicapa lipídica rica en clorofila y proteínas ancladas o adosadas a la empalizada.

La proporción de proteínas alcanza hasta 65% de la masa seca cuando se crece en medios artificiales, los lípidos están en proporción de 5-7%, los carbohidratos entre 12 y 17% y las sustancias minerales alcanzan de 5 al 8%.

Los análisis por electroforesis señalan que son más abundantes las proteínas de algas verde-azules que en algas rojas (Guérin-Dumartrait 1976).

Inclusive, por sus características constitutivas han sido aprovechadas con valor alimenticio; *S. maxima* fue componente de la dieta de los aztecas en épocas precortesianas (Farrar 1966) y *S. platensis* lo es aún hoy día por grupos humanos de Kanem en Africa (Delpeuch 1976).

#### Cultivo de *Spirulina maxima*

El cultivo de *Spirulina maxima* presenta condiciones especiales, un alto contenido de sales entre las que se encuentran los elementos necesarios para estos organismos: N en forma de nitratos, P como fosfatos y S en forma de sulfatos,  $Mg^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $K^+$  y  $Na^+$ . Hay una alta proporción de bicarbonatos y de carbonatos que está muy por encima de las necesidades de aceptor de electrones y un pH alcalino de 10-10.5.

El cultivo natural llevado a escala industrial incorpora fertilizaciones sucesivas y periódicas, así como limpieza y cosecha por arrastre con bombeo.

Vega (1976) describe las condiciones óptimas de crecimiento: temperatura de 35.5°C, un pH de 9.38 en un medio definido de Argel, ciclos de iluminación de 12 horas con luz fluorescente entre  $1.0 \times 10^4$ - $1.1 \times 10^4$  lux y otras 12 horas de oscuridad además de burbujeo de aire estéril. En estas condiciones señala que la constante de velocidad específica

de crecimiento o sea el aumento de la cantidad celular por unidad de tiempo es de 0.422 días<sup>-1</sup> y un tiempo de duplicación de 1.64 días.

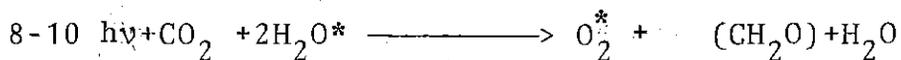
### Fotosíntesis

La fotosíntesis es el fenómeno por el cual las plantas superiores, las algas y las bacterias fotosintéticas transforman energía luminosa en energía de enlace, la cual es almacenada en biomoléculas.

Dicha capacidad celular de proveerse de material que le abastece de nutrientes le confiere autotroficidad y además, es un eslabón alimenticio en favor de los seres heterótrofos.

La fotosíntesis oxigénica que se realiza en la corteza terrestre desde hace unos  $3 \times 10^9$  años (Krogmann 1973), es responsable de la atmósfera de oxígeno y por tanto es una fenomenología clave en la red de procesos vitales sobre el globo. El trabajo fotosintético señala una ruta en la adquisición de energéticos.

La reacción global de este proceso puede simplificarse de este modo:



La energía necesaria para realizarse este proceso proviene de la luz (8-10 cuantos). La energía acumulada ( $\Delta H$ ) es de 112 Kcal/mol. La energía libre es de 120 Kcal/mol y las

8 Kcal/mol de diferencia se atribuyen al término entrópico.

$$\Delta F = \Delta H - T\Delta S; + 120 = 112 - (-8).$$

Se realizan dos reacciones paralelas: la oxidación de un sustrato  $H_2A$  ( $H_2O$  en algas y plantas superiores) y la reducción de  $CO_2$  para lo cual se necesitan 4 equivalentes oxidantes y 4 equivalentes reductores.

El paso fundamental de la mecánica de la fotosíntesis es la reacción sensibilizada por la clorofila en un estado de fotoexcitación que forma entidades reducida y oxidada separadas para conducir las dos vías metabólicas.

La representación de este proceso se hace con el esquema Z que Hill y Bendall introdujeron y al cual se han ido agregando los resultados posteriores. (Govindjee 1975) lo esquematisó según la figura 1 en la cual se señalan varios aspectos:

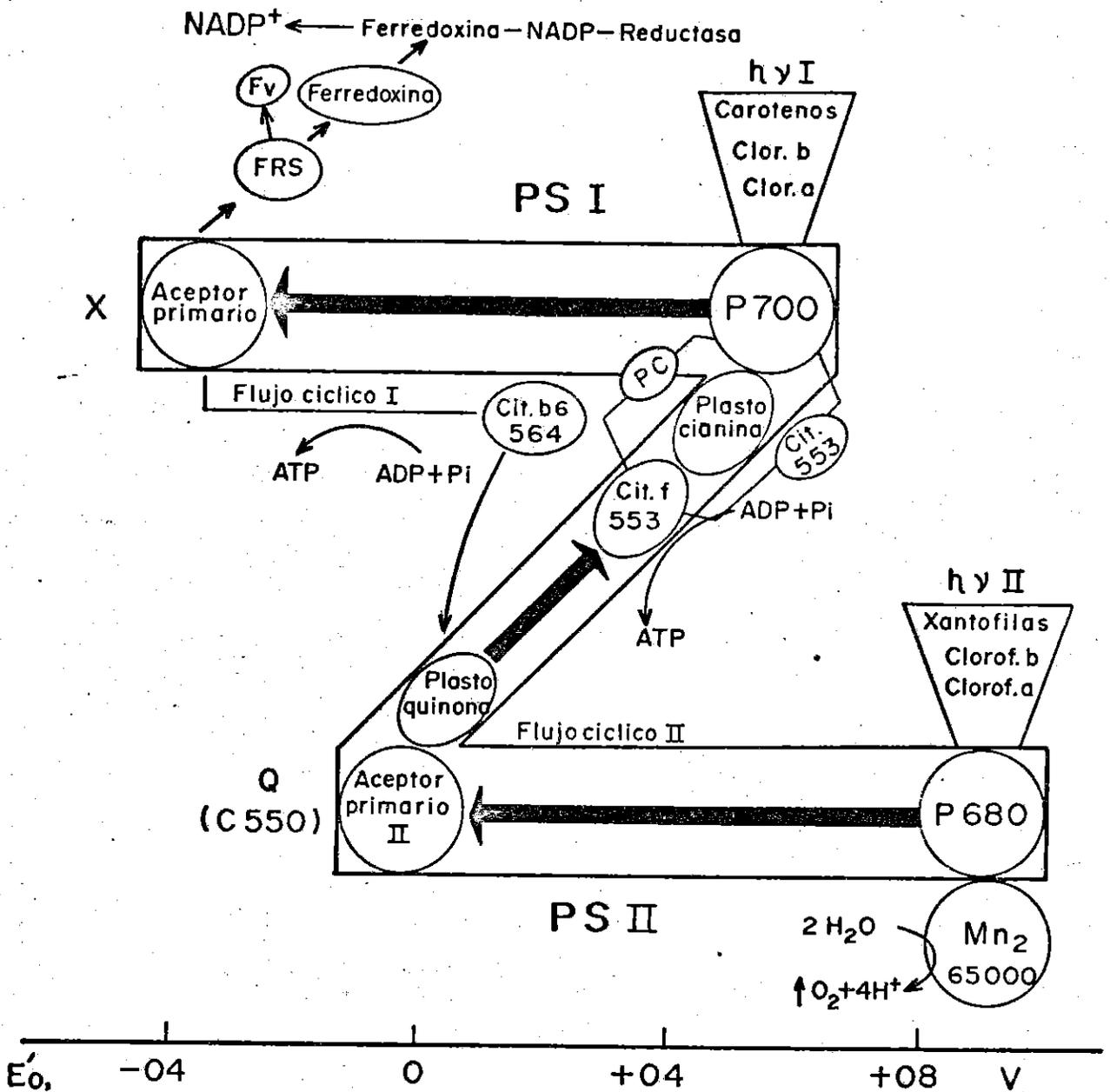
A). Dos centros de reacción: clorofila a del  $P_{700}$  (PS I) y clorofila a del  $P_{680}$  (PS II) conectados en serie y excitados por luz, liberando electrones que se transportan contra un gradiente  $E'_0$  el cual indica la energía del electrón como potencial óxido-reductor. Al PS II se conecta la formación de un oxidante fuerte y al PS I la del reductor fuerte. La energía de excitación se absorbe y se conduce por un complejo de moléculas antena hasta una molécula de clorofila localizada en un medio especializado.

La energía correspondiente a la transición de 660 nm no es suficiente para dissociar enlaces, sólo altera la distribución de electrones  $\uparrow$  en el anillo de la clorofila y permite la

Figura 1. Las flechas horizontales representan las reacciones de luz. El flujo de electrones desde la fotólisis del agua hasta el NADP se llama flujo no cíclico y del aceptor primario del  $PS_I$  a la plastoquinona o plastocianina se llama flujo cíclico I.

Se han incluido también:

- a) Para cianofíceas la alternativa del citocromo  $C_{553}$  o plastoquinona como donadores del  $PS_I$  (Krogmam 1979).
- b) La alternativa que FRS ceda sus electrones a flavodoxina.
- c) La proteína involucrada en la fotólisis del agua con dos átomos de manganeso y PM de 65 000 (Spector 1980).

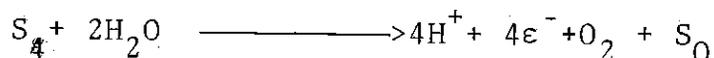


Esquema Z para el flujo de electrones en la fotosíntesis

transferencia de un electrón (Sauer 1975). La excitación de esos centros de reacción por la luz, se traduce como un aumento de energía libre de los sistemas lo cual va a permitir las etapas sucesivas con la correspondiente disminución de energía libre, condición termodinámica para que se efectúe el proceso.

La ley de Einstein señala que cada fotón conduce un electrón por lo tanto se emplean 8 cuantos para oxidar agua formando una molécula de oxígeno y reducir una molécula de  $\text{CO}_2$ .

La separación de cargas efectuada en la clorofila a del PS II por efecto de los fotones tunelizados en el evento físico de la migración energética por medio de los pigmentos accesorios, genera una entidad negativa y otra positiva. La primera migra al aceptor del PS II, el componente Q (se ha postulado que es una plastoquinona en un ambiente especializado) y el equivalente positivo se acumula hasta tener cuatro cargas (Joliot 1975) para lograr por el sistema enzimático que contiene 2 átomos de manganeso y peso molecular de 65000 (Spector, 1980), la fotólisis del agua y generar electrones, protones y oxígeno.



B) La unión entre estos dos sistemas está constituida por una cadena de acarreadores de electrones que están orientados en una topología estricta, unos hacia el interior de la membrana, otros hacia el exterior, lo cual conduce los elec-

trones con una vectorialidad dada, donde un componente de este transporte es perpendicular a la membrana (Witt 1975). Así, ésta queda cargada generándose un campo eléctrico a través de la misma. Douce (1977) señala que esta bicapa lipídica de baja constante dieléctrica es rica en lípidos no cargados del tipo de los galactolípidos, situación que favorece la transferencia de electrones.

Para cianofíceas, Krogmam (1979) ha descrito la alternativa entre plastocianina y citocromo C553, así como la vía que puede seguirse desde la FRS a una flavoproteína, la flavodoxina.

Hasta aquí la energía luminosa se ha convertido en energía eléctrica.

C) El paso de los electrones en varias vueltas a través de los transportadores en la membrana intacta, está asociado a una translocación de protones  $H^+$ , de manera asimétrica de modo que se tiene un gradiente con dos componentes, uno correspondiente a la actividad de las partículas  $H^+$ ,  $\Delta pH$  de naturaleza osmótica y otro de naturaleza eléctrica resultado de la carga,  $\Delta \phi$ . Este estado generado, rico en energía, llamado fuerza protonotriz es capaz de realizar el fenómeno de fosforilación (Mitchell 1967).

Estos eventos eléctricos se realizan en una membrana cerrada que hace posible el establecimiento de ese gradiente de protones generado y evita la recombinación de los equivalentes

oxidados y reducidos lo que significaría pérdida de energía en forma de luz o de calor (Clayton 1970).

La membrana transforma la energía liberada por el transporte de  $e^-$  en la energía del gradiente que a su vez la convierte en energía química en los enlaces de alta energía del tercer fosfato del ATP.

A este nivel se acoplan las reacciones de óxido reducción de la transferencia de los electrones y la deshidratación en la síntesis del ATP.

De modo que en el arreglo anisotrópico de estos componentes se dan por lo menos 2 sitios o mejor aún, dos estados de almacenamiento energético que favorecen la síntesis del ATP (uno en la fotólisis del agua y el otro a nivel de la plastoquinona).

La membrana energizada eléctricamente se descarga por un flujo de protones a favor del gradiente mediante un sistema enzimático  $CF_1-F_0$  localizado en la membrana del cloroplasto con una polaridad: los botones de  $CF_1$  miran hacia el exterior de la membrana, mientras que  $F_0$  la atraviesa. Se considera que  $CF_1$  es responsable de la síntesis del ATP conteniendo el sitio activo de la enzima y que  $F_0$  contiene un canal por donde fluyen los protones.

Dada la distribución de  $H^+$  a través de la membrana y el agua formada en tal síntesis, así como su constante de equilibrio  $K_w$ , los iones  $H^+$  y  $OH^-$  se conducirán también en un sen-

tido dado por su atracción de cargas (Lehninger 1977).

La estequiometría del ATP en cloroplasto señala que por cada 3 protones que regresan al exterior, se sintetiza una molécula del adenosín trifosfato (Hinkle y McCarty 1978).

D) Parece que la fotofosforilación no está conectada a fenómenos de transporte de iones, aminoácidos o movimiento como se observa en mitocondrias y bacterias (Hinkle y col. 1978).

E) La fotofosforilación no cíclica conduce electrones hasta el aceptor del PS I con un  $E_0 \approx -0.6$  V.

Se localiza luego la ferredoxina que puede ceder sus electrones a diferentes moléculas:

-NADP ( $E_0 = -0.32$  Voltios) por medio de una flavoproteína,

-nitritos con producción de ión  $\text{NH}_4^+$ ,

-a la tiorredoxina por medio de la tiorredoxina - reductasa a su vez involucrada en la actividad de diferentes enzimas entre ellas p.e. las fosforribulosa cinasa y 3 fosfodeshidrogenasa (Wolosiuk R. 1979, comunicación personal).

-al oxígeno produciendo un radical superóxido  $\text{O}_2^-$  que a su vez produce  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Douce 1977).

Los productos de reacción son el oxígeno liberado, respuesta vinculada mayoritariamente al  $\text{PS}_{\text{II}}$  por los pigmentos cosechadores de luz; la reducción del NADP en NADPH y la fotofosforilación produciendo ATP.

F) Todos estos fenómenos se realizan en la membrana, pero el proceso fotosintético aún no ha concluído. La reducción del  $\text{CO}_2$  se lleva a cabo en el estroma donde se localizan los sistemas enzimáticos involucrados. Esta categoría de reacciones no precisa de luz para efectuarse y el gasto energético está dado por el poder reductor del NADPH y la energía de enlace acumulada en el ATP.

Los requerimientos son 2 moléculas de NADPH y 3 moléculas de ATP por molécula de  $\text{CO}_2$  asimilada.

Esta etapa de fijación de  $\text{CO}_2$  puede dividirse en tres grandes grupos de reacciones:

1. Fase de carboxilación:

En las plantas  $\text{C}_3$ , (llamadas así porque el primer compuesto en la fijación del  $\text{CO}_2$  tiene 3 átomos de carbono) se manifiesta la actividad de la ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa.

A partir de la ribulosa 1,5-difosfato se forman 2 moléculas de ácido 3 fosfoglicérico (PGA) consumiéndose una molécula de  $\text{CO}_2$  gaseoso y 1 molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  (Krogmam 1973). Esta reacción manifiesta un equilibrio favorable y la enzima tiene una alta afinidad por el  $\text{CO}_2$  con una  $K_m$  de 0.4-0.2 mM (Black 1973). El PGA es fosforilado después con gasto de ATP y se tiene DPGA.

2. Fase de la reducción:

Reducción de ácido difosfoglicérico a gliceraldehído-3-fosfato con gasto de NADPH.

3. Fase de producción:

Regeneración de la ribulosa 1,5-difosfato (Ciclo de Benson, Bassham y Calvin) por consumo de 5 moléculas de gliceraldehído y gasto de ATP.

5 moléculas  $C_3$  se arreglan para regenerar 3 moléculas  $C_5$  aceptoras de  $CO_2$ .

El gliceraldehído-3-fosfato es un metabolito básico que puede migrar a través de la membrana exterior del cloroplasto hacia el citoplasma para sintetizarse la sacarosa o bien puede dirigirse a síntesis de almidón dentro del organelo.

Por cada tres moléculas de  $CO_2$  que entran al proceso de reducción de pentosas-fosfato, una molécula de triosa fosfato ( $C_3$ ) se constituye en producto. Aunque pueda convertirse en almidón o sacarosa, también puede volver a entrar en la fase regenerativa, produciendo un efecto autocatalítico, como una reacción alimentadora que produce más aceptor de  $CO_2$  que el que se consume.

Tal característica es la base del crecimiento en estos organismos (Edwards y Walker 1979).

La eficiencia termodinámica del evento primario fotosintético ha sido calculada por diferentes investigadores y diferentes formas (Govindjee 1975). Los datos de Duysens y los de Calvin señalan un resultado límite de 70%. La secuencia temporal fue dada por Kamen en 1963:

1. Etapa de la física de la radiación. Incluye la excitación, migración y atrapamiento de la energía excitadora y dura de  $10^{-15}$  a  $10^{-16}$  seg.

2. Etapa fotoquímica. Se realiza la separación de cargas en la primera reacción redox. Su duración es de  $10^{-10}$  a  $10^{-3}$  seg.
3. Etapa bioquímica. Los efectos son la producción de oxígeno y la fijación del  $\text{CO}_2$  realizada por sistemas enzimáticos y serie de transportadores. Se lleva a cabo entre  $10^{-4}$  y  $10^{-2}$  seg

### Fotosíntesis en Cianofíceas

El fenómeno fotosintético sustancialmente es el mismo en los diferentes organismos que lo realizan, pero a lo largo de la línea evolutiva se pueden constatar variantes.

En un contexto general se pueden anotar ciertas características del proceso en cianofíceas:

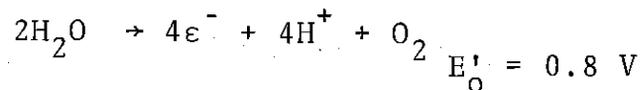
- a. A pesar de ser procariotes realizan fotosíntesis oxigénica del tipo de planta superior, con dos fotosistemas secuenciados y agua como agente reductor.
- b. No contienen cloroplastos, su fotosíntesis la llevan a cabo en la lamela tilacoidal.
- c. Sus pigmentos antena son las ficobilinas, proteínas con máximos de absorción entre 620 y 670 nm, a diferencia de la clorofila b con absorción máxima entre 645 y 662 nm.
- d. Parece que los carotenos no son agentes eficientes de transferencia de energía.

#### I. Producción de oxígeno

La presencia de sistemas enzimáticos responsables de la descomposición del agua como agente donador de electrones per-

mite visualizar cuantitativamente el fenómeno por la producción de oxígeno, ya sea como una medida de la integridad del aparato en su totalidad o bien como una medida parcial de cada uno de los dos fotosistemas mediante el empleo de donadores y aceptores artificiales de electrones.

La producción de oxígeno se vincula espacialmente al PS II con su complejo de antenas



que incluye 4 fotorreacciones que de modo cooperativo corresponden a la transferencia de 4 electrones y producen una molécula de  $\text{O}_2$  en el mismo fotocentro (Joliot 1975).

Estructuralmente incluye el sistema enzimático de fotólisis del agua con sus diferentes estados de excitación ( $S_0$ - $S_4$ ), el donador Z, el aceptor Q, el centro de reacción y las moléculas cosechadoras de luz.

La respuesta no sólo significa la presencia e integridad de estos componentes, sino también un estado abierto de ese aceptor del PS II, llamado Q, la integridad en la cadena de transportadores de electrones, la excitación del PS I y la presencia de los sistemas catalíticos que van desde la ferredoxina hasta el NADP para concluir en la reducción del  $\text{CO}_2$ .

Por tanto, la producción de oxígeno es una medida de la participación de los pigmentos auxiliares en el proceso.

## II. Membrana tilacoidal

La organización celular de estos organismos no tiene los plastidios de las plantas superiores que confinan en un organelo el sistema membranal que realiza el fenómeno, en cambio lo hace en las abundantes estructuras membranales de la lamela tilacoidal que contiene la organización anisotrópica de las moléculas formadoras de los dos fotosistemas acoplados; igualmente responde a procesos de comunicación, teniendo el fenómeno la misma vectorialidad que el cloroplasto y muy posiblemente la misma distribución de proteínas en la bicapa lipídica.

Dado que no hay la compartimentalización de las fosfoenolpiruvato (PEP) y ribulosa difosfato (RuBP) carboxilasas, presentes en plantas  $C_4$ , por este concepto estas algas son más semejantes a las plantas  $C_3$ . (Se denominan así en atención a que los primeros componentes de la fijación de  $CO_2$  tienen 4 o 3 átomos de carbono respectivamente. Zelitch 1979).

## III. Pigmentos auxiliares

Los pigmentos antena en cianofíceas son cromoproteínas que absorben luz entre 620 y 670 nm del espectro electromagnético para conducirla hasta el fotocentro II participando sólo en el evento físico del fenómeno y permitiendo se inicie el evento fotoquímico.

En algas verde-azules se conocen dos pigmentos: ficocianina y aloficocianina. En algas rojas además está presente la ficoeritrina.

El nombre de ficobilinas fue dado por Lemberg en 1828 por la semejanza del cromóforo con los ácidos biliares.

En 1942, Emmerson y Lewis indicaron la participación de la ficocianina en fotosíntesis. Sus observaciones en *Porphyridium cruentum* señalaban transferencia de energía desde la ficoeritrina ( $\lambda$  de máxima absorción 550 nm) hasta la clorofila a ( $\lambda$  máxima de fluorescencia 685 nm).

French y col. (1952) al trabajar con suspensiones de *Porphyridium cruentum* concluyeron de sus estudios de espectros de acción y fluorescencia que estos pigmentos transfieren energía señalando una eficiencia cercana al 100% para distancias de 10 nm y para tal efecto propusieron un orden unidireccional en la distribución de proteínas.

Blinks y col. (1954) se cuestionaron sobre la localización y la función de los pigmentos en *Oscillatoria* y *Anabaena* y encontraron el máximo de producción de oxígeno en la señal de la ficocianina proponiendo una transferencia de energía por resonancia en distancias cercanas a 40 Å.

O'hEocha y col. (1965) señalaron las características espectrales de la ficocianina (FC) tanto en el UV con una banda en 270-280 nm y un pico a 350 nm, además en el visible vieron el máximo de absorción a 620 nm. Sugirieron que la conformación nativa de la proteína obliga a los grupos prostéticos a asumir estructuras coplanares rígidas manifestándose en la fluorescencia y en el hipercromismo observados en la proteína nativa frente a la desnaturalizada. Bogorad (1975) ha estudiado la capacidad que tienen estos organismos de alterar su com-

posición de biliproteínas de acuerdo a la calidad de luz ambiente encontrando que se favorece la presencia de ficocianina (FC) con luz roja y la de ficoeritrina (FE) con luz verde o luz de lámpara fluorescente blanca fría. Aparentemente la aloficocianina (AFC) se sintetiza de modo independiente de la luz. Así mismo ha estudiado que el grupo cromóforo de ficoeritrina es la ficoeritrobilina y para FC y AFC es la ficocianobilina, cuyas fórmulas se anotan en la fig. 2. Se ven compuestos de una cadena tetrapirrólica abierta, de peso molecular de 600. La asociación del grupo prostético a la apoproteína está dado por un enlace covalente tioeter.

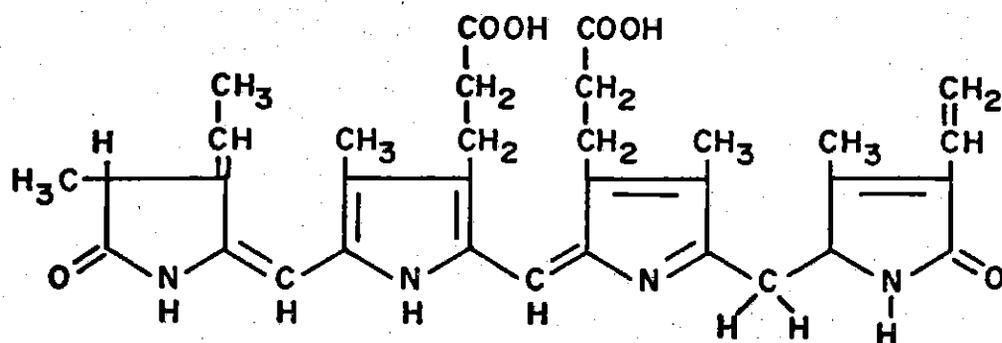
La FC tiene su máximo de absorción en 620 nm y fluoresce en 640 nm.

La aloficocianina absorbe en 650 y fluoresce en 660 nm. Estas diferencias espectrales son respuestas a diferentes uniones proteína-cromóforo, pues éste es el mismo para las dos moléculas. De igual modo son las apoproteínas las responsables de la agregación.

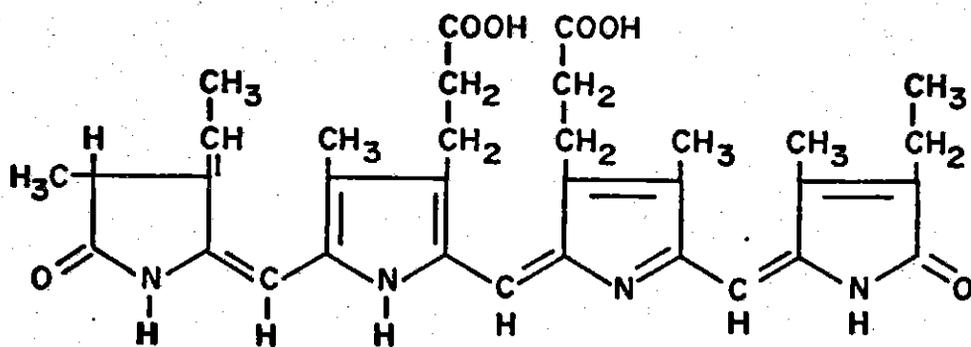
#### Funcionalidad de los pigmentos

En relación a la funcionalidad de estos pigmentos, Duysens (1952) observó que una gran porción de los cuantos empleados para dirigir fotosíntesis era absorbida por las ficobilinas, pues la fluorescencia de la clorofila era sensibilizada por tales pigmentos. French y col. (1952) experimentaron sobre lo mismo concluyendo que habría un mecanismo de transferencia de energía que luego Stryer (1967 y 1978) estudió y comprobó que

Figura 2. Fórmulas de los grupos cromóforos de las ficobiliproteínas. La ficoeritrobilina corresponde a la ficoeritrina y la ficocianobilina es el grupo prostético de la ficocianina y de la aloficocianina.



Ficoeritobilina



Ficocianobilina

era función de la distancia entre cromóforos de donador y aceptor de energía luminosa.

Bogorad (1975) reportó datos de efectividad cuántica de luz roja a luz verde en función de la producción de oxígeno de 7:1. De modo que estos y otros trabajos apuntaban en que estos pigmentos mantenían una orientación y una distancia entre los cromóforos que permitían la transferencia de energía a un alto nivel.

La implicación teórica de los trabajos de Förster (1960) se vió recíprocamente apoyada por los resultados experimentales obtenidos por fluorescencia en el aspecto funcional y por microscopía electrónica en el terreno morfológico.

#### Asociación de Pigmentos

En los numerosos trabajos de Gantt y sus colaboradores (1965, 1966a, 1966b), de Edwards y col. (1971), de Wildman y col. (1974) y otros, se ha reportado que en la membrana tilacoidal, del lado del estroma, se localizan unas partículas arregladas regularmente en filas paralelas separadas 60 nm que son densas a los electrones.

Los estudios de análisis de estas estructuras concluyen que son complejos macromoleculares de ficobiliproteínas ensambladas que se han llamado ficobilisomas (Gantt y col. 1966a) Estos macroagregados en rodofitas contienen ficoeritrina (FE) ficocianina (FC) y aloficocianina (AFC) mientras que las cianofíceas generalmente tienen los pigmentos FC y

AFC (Gantt y col. 1974).

La forma de esta partícula parece diferente según se trate de rodofíceas y cianofíceas. Gantt (1965) observó forma de prolato para las primeras y de disco para las últimas.

Glazer (1979) propuso que la forma responde a su composición: las fotografías de microscopía electrónica de *Synechococcus* spp. 6312 indican un centro de tres unidades agrupadas y bastones orientados de manera aproximadamente radial. La AFC parece ser responsable del centro y la longitud de los bastones es respuesta a la proporción de FC y de la FE si la contienen.

El tamaño para las algas rojas corresponde a una longitud de  $400 \text{ \AA}$  para el eje mayor y  $315 \text{ \AA}$  para el eje menor.

Las características de espectroscopía de absorción señalan para cianofíceas un hombro a 590 y un pico máximo a 620 nm, los cuales identifican a la FC y un hombro a 650 proveniente de la AFC.

La espectroscopía de fluorescencia estudiada por diferentes investigadores señala que al tener ficobilisomas de algas rojas y excitar a la FE se tiene fluorescencia en 680 nm (Gantt 1973, Ley y Butler 1977) siendo esta emisión una respuesta de una AFC en alto grado de asociación (Brown 1975, 1977; Glazer 1977, Zilinskas 1978).

En las cianobacterias la excitación a 550 nm responde con la emisión de fluorescencia de la AFC más allá de 660 nm, dependiendo del grado de agregación de la AFC.

Esta señal de emisión de fluorescencia del componente que guarda un estado energético menor, mide la transferencia de energía de los componentes del ficobilisoma. Si esto se hace *in vivo*, la emisión vista es la de la clorofila indicando la transferencia de energía completa del sistema colector de la luz hasta la clorofila que dispara la fotoquímica del fenómeno.

Los estudios de eficiencia de la transferencia manifiestan que llega a valores cercanos al 100%, lo cual evidencia un alto grado de acoplamiento pues las respuestas registradas *in vivo* señalan que la disipación energética como fluorescencia es mínima.

Cuando el aceptor Q está reducido o se reduce por adición de sustancias como el 3-(3,4 diclorofenil)-1,1-dimetil urea (DCMU), la fluorescencia aumenta, por lo tanto disminuye la respuesta fotoquímica.

Los trabajos de Tel-Or y Malkin (1977) y de Ley y Butler (1976) han apuntado en el sentido que hay un derrame de energía del PS II al PS I hasta con una eficiencia de 0.90 y 0.95 cuando las trampas de PS II están cerradas y esto se manifiesta en que la medida de transferencia energética se ve incrementada. Así mismo, los resultados de Wang y col. (1977) por espectros de acción concluyen que la distribución final de la energía de excitación es respuesta a la relación de clorofila:ficocianina y para que haya un alto rendimiento cuántico

hay necesidad de una distribución de pigmentos más o menos igual en los dos fotosistemas.

#### Composición del ficobilisoma

Los primeros trabajos de Gantt (1974) sobre la composición de los ficobilisomas pretendían responder si éste tenía o no clorofila como un componente. Dado que la proporción de clorofila a ficobilisoma era menor que una molécula por complejo, lo consideraron hasta ese momento sólo como un contaminante y se habló que el ficobilisoma sólo contenía ficobilinas.

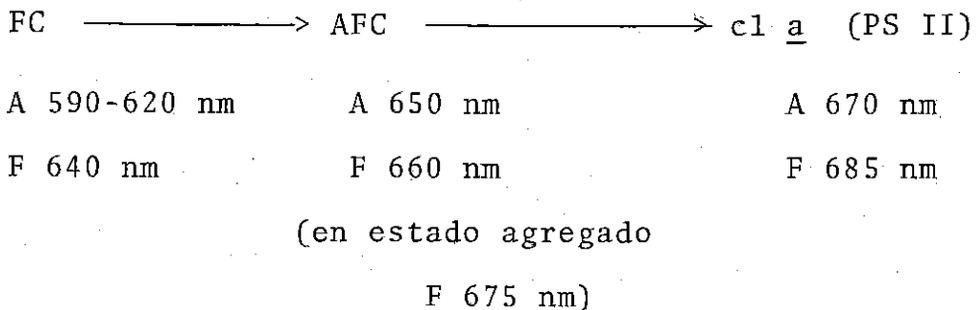
Sin embargo Gray (1975) reportó para *Nostoc* otros componentes además de las ficobilinas, inquirendose si son agentes de templado, se estequiometría o de ensamble. Igual pregunta se formularon N. Tandeau de Marsac y col. (1977) cuando observaron presencia de 15% de componentes protéicos que se hallaron durante adaptación cromática y que cuantificaron asociados a la cantidad de ficoeritrina o ficocianina presente.

En 1978, Yamanaka reportó y confirmó 5 polipéptidos no coloridos presentes de manera constitutiva en el ficobilisoma de *Anacystis nidulans* y de otras cianobacterias, proponiendo que uno de ellos participa en la unión del ficobilisoma a la membrana.

## Funcionalidad del ficobilisoma

La transferencia de energía llevada a cabo por resonancia dipolo-dipolo, estudiada por Förster (1960) involucra una orientación y distancia entre los cromóforos, naturaleza fluorescente del donador con una vida media suficiente y una frecuencia de resonancia puesta de manifiesto como una sobreposición del espectro de absorción del aceptor y el espectro de fluorescencia del donador. Estas condiciones se realizan en el ficobilisoma. Se registra una evidente sobreposición de los espectros de FC, AFC y clorofila (Gantt y col. 1974, Gantt 1975); la vida media de la FC es 2.25 nseg (Dale y Teale 1970); las moléculas están suficientemente empaçadas en el ficobilisoma y éstas a las lamelas (Gantt 1975) lo que se ha visto por los resultados de experimentación con fluorescencia y disociación. A partir de estudios de polarización de fluorescencia, Dale pudo inferir una orientación que permite la transferencia.

La direccionalidad de esta transferencia en cianofíceas sería



La eficiencia de la AFC como el mejor cosechador de luz se ha puesto de manifiesto por Lemasson (1973) por espectros de acción y cuando esta proteína se encuentra en cierto estado de mayor agregación su fluorescencia se desplaza hasta 670-675 nm lo cual optimiza el fenómeno. Los trabajos de Scott y Berns (1965) y de Brown (1975, 1977) consideran que esta agregación está influenciada por las condiciones de pH, fuerza iónica y posiblemente algún metal.

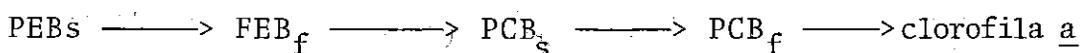
Los estudios de Gantt y colaboradores (1976a, 1976b) basados en mediciones de fluorescencia, de cinética de disociación y de respuesta inmunológica a anticuerpos específicos, llevaron a estos autores a postular un modelo de asociación que es congruente en su estado estructural y su respuesta funcional.

Consiste en un centro de AFC, posiblemente el centro de unión a la membrana, rodeado de FC formando una esfera o semiesfera.

Los experimentos de disociación por agentes perturbadores en enlace como fuerza iónica, pH, concentración y temperatura coinciden en señalar un aumento en la fluorescencia de los componentes de manera organizada, lo que evidencia una distribución estricta.

La proporción de pigmento liberado ha correspondido, en los estudios de Gantt en *Porphyridium cruentum*, al desa-

coplado energéticamente, por tanto se observa un aspecto funcional en relación estrecha con el aspecto estructural. Cuando Dale (1970) ha hecho sus consideraciones teórico experimentales sobre los cromóforos de FC de cianofíceas (C.FC) y los ha agrupado en dos categorías: sensibilizadores (s) poco accesibles y fluorescentes (f) con mayor grado de libertad, concluye que están orientados de tal modo



que los cromóforos "s" de la ficoeritrina o sea la ficoeritrobilina PEBs, captan luz que la transfieren a los "f" de la misma proteína y ésta a su vez se conduce a los cromóforos "s" y luego a los "f" de la ficocianina, es decir a la ficocianobilina PCB que a su vez la pasa de igual manera a los cromóforos de la aloficocianina y de ésta migra hasta la clorofila a.

Las distancias en los espectros de absorción y fluorescencia indican un sentido en esta conducción progresiva de energía luminosa favoreciéndose de una manera unidireccional. Así mismo se ve que es muy poco probable una conducción de energía de la PEB a la clorofila a por la gran diferencia energética que las separa y la distancia física.

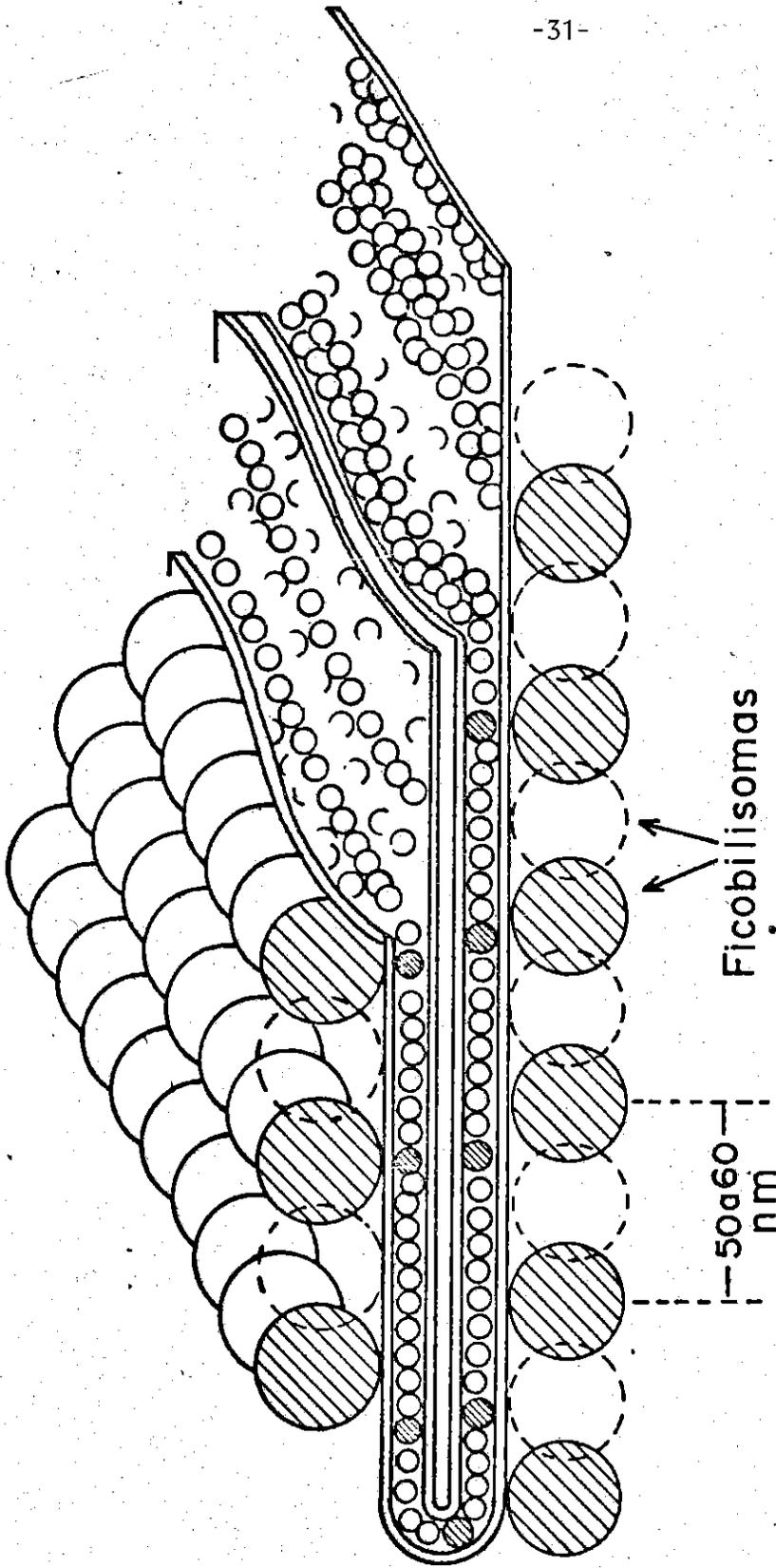
La cercanía física entre PCB y la clorofila es mayor que entre la PEB y la clorofila y mayor aún sería para la  $\text{PCB}_f$  de la AFC y la propia clorofila a.

El sitio de unión del ficobilisoma a la membrana debe ser altamente específico, posiblemente determinado por un componente de membrana (Gantt 1975) relacionado con un tipo de clorofila que los patrones de inducción de fluorescencia de Tel-Or y Malkin (1977) ponen de manifiesto. Aunque hasta hoy no se tienen los datos concluyentes, los trabajos de Clément y Lefort-Tran (1971) Lefort-Tran (1973) y Wollman (1979) sugieren una relación entre esa estructuración y la funcionalidad pues sus datos de criograbado señalan una fila de partículas de 10 nm de diámetro espaciadas con la misma proporción que están los ficobilisomas y posiblemente esto no significa sólo una coincidencia. En la fig. 3 se incluye el esquema de estos autores donde se relaciona la localización de los ficobilisomas y la organización encontrada en la membrana.

Las preguntas sobre la asociación de los pigmentos entre sí y la asociación con la membrana han de explicarse a nivel molecular o aun más estrictamente; los estudios iniciales de reconstitución parecen señalar respuestas prometedoras en el sentido que diferentes subunidades  $\alpha$  de la FC de diferentes especies de cianofíceas se agrupan con subunidades  $\beta$  con iguales estequiometrías (Glazer y Fang 1973a). Así mismo los resultados sugerentes de Tandeau de Marsac sobre los polipéptidos asociados a las ficobilinas coloridas parecen abrir la pregunta hacia los aspectos de ensamble y estequiometría.

El trabajo evolutivo en las algas rojas y verde-azules tiene una característica interesante: se ha adaptado a las

Figura 3. El esquema representa los resultados de criograbado de membranas que manifiestan partículas ordenadas en filas con distancia entre sí de 60 nm en la cara del lumen o cara Bu. La cara complementaria del lado de la matriz, Cu, también está constituida por un gran número de pequeñas partículas organizadas en filas. Los polímeros de ficobiliproteínas están situados en el exterior del tilacoide a 60 nm unos de otros. Se puede suponer una correspondencia entre ellos y las partículas membranales ya sea de la cara Bu o de la Cu que le es complementaria.



Representación esquemática del modelo de organización de tilacoides.

(Lefort-Tran y otros 1973.)

condiciones ambientales de diferentes habitats . . . mediante una apertura del rango de absorción de sus pigmentos o la variación de la  $\lambda$  a la que tiene su máxima absorción de modo que la producción de ficobilinas y además su organización en sistemas poliméricos de rigor geométrico no sólo ha asegurado su preservación y propagación sino que ha hecho más eficiente el proceso.

## Objetivo

I Medir la influencia de los pigmentos auxiliares en la fotosíntesis de *Spirulina maxima*.

Esto se hizo mediante la producción de oxígeno a longitudes de onda entre 400 y 700 nm en condiciones establecidas.

II Localización de los pigmentos auxiliares en la membrana tilacoidal.

Estas observaciones fueron hechas por microscopía electrónica.

III Aislamiento y caracterización del ficobilisoma.

Se buscaron las condiciones para tal separación, midiendo el grado de acoplamiento del sistema por espectros de fluorescencia. Se caracterizaron los componentes del complejo por espectroscopía de absorción y de fluorescencia, se midieron los pesos moleculares de sus subunidades por electroforesis con dodecil sulfato de sodio y se conoció la estequiometría de los pigmentos que forman el ficobilisoma.

## METODOS

### Cultivo del alga Spirulina maxima

El alga de estudio correspondió al cultivo natural de "El Caracol" de "Sosa Texcoco, S. A.", contenida en un acrílico con iluminación y aereación naturales y nutrientes adicionados en forma ocasional. Se cosechó pasando un flujo de cultivo por una malla de una fibra sintética llamada nyal de 15  $\mu\text{m}$  y se lavó resuspendiéndola a una concentración aproximada de 0.1 g/ml en el amortiguador seleccionado pasando con vacío por un filtro buchner con ocho a diez capas de gasa o bien por centrifugación a 5000 x g durante 10 minutos.

### Determinación de clorofila

Se midió por el método de Mac Kinney (1941) con la modificación previa de sonicar las muestras por 1 minuto manteniéndolas en baño de hielo.

A la muestra se agregó acetona hasta quedar el solvente al 80%, se agitó en un vortex por 1 minuto y se filtró en papel whatman No. 1 leyendo la densidad óptica del filtrado en un espectrofotómetro Beckman a 645 nm contra agua.

La concentración de clorofila en mg/ml de la suspensión original se calculó tomando en cuenta el coeficiente de absorción específico de la clorofila a 645 nm con la ecuación

$$\text{D.O.} = \epsilon Cx$$

relacionándola a la cantidad de muestra y su dilución, al valor  $\alpha_{645}$  de 16.75, al paso de luz, x, por una celda de 1 cm y que

Spirulina máxima sólo tiene clorofila a:

$$\text{Conc.} = \frac{\text{D.O.}_{645}}{16.75}$$

por tanto

$$\frac{25}{16.75} = 1.49$$

que significa un factor de corrección por el que tiene que afectarse la D.O. leída a 645 nm para obtener la concentración de clorofila en la muestra.

Medición de la intensidad luminosa.

Se empleó una fuente luminosa de 500 watts a 25 amperios, instalada a un monocromador con diafragma de entrada 10 mm y diafragma de salida 5 mm.

La intensidad luminosa a diferentes longitudes de onda se midió con un fotómetro al que se ajustó un filtro radiométrico, obteniéndose los valores en watts/cm<sup>2</sup>.

La conversión de watts/cm<sup>2</sup> a einstenios se hizo mediante la relación siguiente expresando  $\lambda$  en nanómetros:

$$1 \text{ watt/cm}^2 = 8.3 \times 10^{-9} (\lambda) \text{ einstenios/cm}^2 \cdot \text{seg}$$

Espectros de absorción

1) De soluciones

Los espectros de absorción fueron medidos en un espectrofotómetro DW Aminco Chance en un rango de 325 a 700 nm empleándose en esta zona lámpara de tungsteno y haciendo las correcciones por línea base.

## 2) De partículas

La obtención de este trazo se hizo en un espectrofotómetro, Aminco DW-2a con el empleo del agitador magnético para mantener la muestra en suspensión durante el ensayo.

### Primera derivada

Este registro se hizo en un espectrofotómetro Aminco DW-2a mediante el empleo de dos monocromadores defasados uno en relación al otro en 2 nm,  $\Delta\lambda$  que se mantuvo en el rango medido del espectro.

Se hizo un ajuste de línea base que se tomó por 0.

### Cambios en la concentración de oxígeno

Una muestra de alga fresca resuspendida en proporción de 0.1 g/ml en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.8 se lavó dos veces por centrifugación a 5000 x g durante 10 minutos.

El medio empleado para la determinación de consumo y producción de oxígeno fué el medio de Argel (Vega 1976) en el cual se adicionó el alga lavada a una concentración de 16 mg/ml. El volumen total de ensayo fue de 7 ml.

El equipo empleado en la medición de los cambios de concentración de oxígeno consistió en el electrodo de Clark bañado

con una solución saturada de KCl y aislado del medio por una membrana YSI tipo standar. El electrodo se colocó en una cámara con agitación y un baño a temperatura constante.

La circulación del agua se logró con un baño Haake tipo FE y la temperatura de las mediciones siempre fue 30°C.

La fuente luminosa colocada en forma directa a la cámara de ensayo a 2 cm de distancia, fue luz blanca de 25 watts. El electrodo se conectó a un amplificador YSI y la señal de éste se registró en un graficador Honeywell electronic 19. Después de calibrar el 0 y el 100% de saturación de oxígeno en el sistema haciendo coincidir la señal del monitor y el graficador, se comprobó la estabilización de la corriente de oxígeno a través de la membrana en el medio que iba a ser usado, observándose una línea horizontal recta.

Al introducir la muestra y disparar el funcionamiento del sistema de medición se obtuvieron líneas de pendiente constante de las cuales se calculó la cantidad de oxígeno de acuerdo a la saturación del sistema y calibración de la carta en función del tiempo, tomando en cuenta que la concentración de oxígeno en una solución saturada en la C. de México es 185  $\mu\text{M}$ .

La respuesta se dió en  $\mu\text{mol}$  de oxígeno/h. mg de clorofila.

#### Espectro de actividad fotosintética

Los valores en la concentración del consumo y producción de oxígeno a diferentes longitudes de onda se tomaron por medio

de un polarógrafo según las condiciones ya descritas, iluminando las muestras con luz monocromática proveniente de una lámpara de 500 watts y el monocromador ya citado, manteniéndose la cámara de ensayo a 2 cm de distancia. La intensidad luminosa a las diferentes longitudes de onda fue aproximadamente  $12 \text{ neinstenios cm}^{-2} \text{ seg}^{-1}$ .

El diagrama de este equipo se representa en la figura 4.

En el rango de trabajo se manifiesta una respuesta lineal entre la producción de oxígeno y la intensidad luminosa, estando la saturación a la luz muy por encima de la zona ensayada.

Los resultados se dan como

$\mu\text{molas de oxígeno/hora.mg clorofila}$

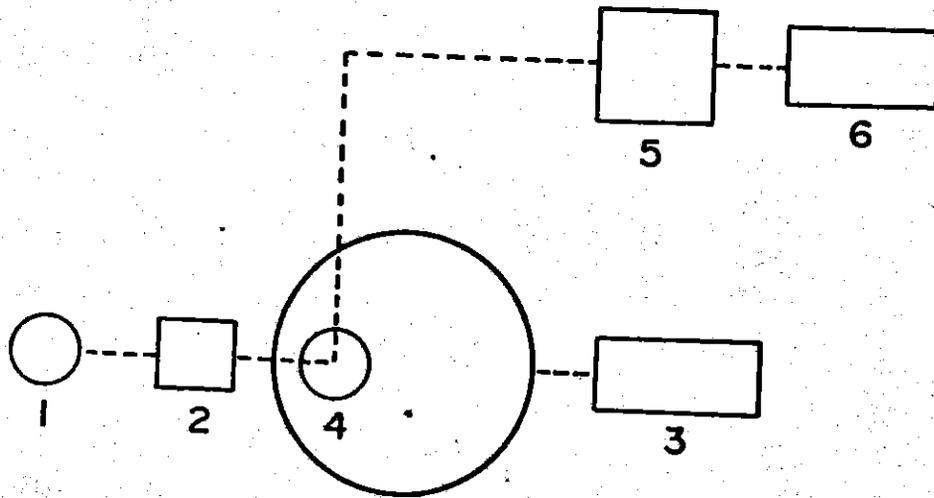
#### Espectros de fluorescencia

Las mediciones se hicieron en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman con diafragmas para los monocromadores de emisión y de excitación de 1 mm integrado a un graficador X Y, Hewlett Packard.

Las determinaciones indicadas se hicieron con el aditamento de fluorescencia de frente o microcelda con un paso de luz de 0.1 cm para evitar efecto de autoabsorción (Gilbault 1973) en un rango de 550 a 700 nm.

Figura 4. Las mediciones de producción de oxígeno se llevaron a cabo colocando la muestra en la cámara del polarógrafo a la que se insertó un electrodo de Clark (4). Dicha muestra estuvo iluminada por un rayo de luz (1) de longitud de onda seleccionada por un monocromador (2). El procedimiento se llevó a cabo a temperatura constante mediante el circulador de agua (3). La respuesta de concentración de oxígeno se amplificó (5) y esa señal eléctrica se llevó a un graficador (6).

# Dispositivo para medir producción de $O_2$ en función de la longitud de onda.



- 1\_ Fuente de luz
- 2\_ Monocromador
- 3\_ Circulador de agua
- 4\_ Cámara del polarógrafo y electrodo de Clark
- 5\_ Amplificador de señal
- 6\_ Graficador

Al medir fluorescencia en ficobilisomas se empleó una longitud de onda de 550 nm para excitar; cuando esta medición fue hecha en pigmentos aislados, se utilizó 550 nm para el caso de la ficocianina y 600 nm para la aloficocianina.

#### Gradientes de sacarosa

##### a) Gradiente continuo

Se preparó un gradiente lineal de sacarosa expresando la concentración a por ciento p/p de 1.0 M a 0.25 M (30.3-8.64% en amortiguador de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 0.75 M pH 7.0, mediante una bomba Densi-Flow con una agitación suficiente para realizar la mezcla de las soluciones y una velocidad de flujo de 1 ml/min.

La linealidad del gradiente se comprobó sacando fracciones de 0.8 ml con la misma bomba y midiendo su concentración de sacarosa en un refractómetro de Abbe.

##### b) Gradiente discontinuo

Se prepararon soluciones 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 y 2.0 M de sacarosa en amortiguador de fosfatos 0.75 M pH 7.0.

Se usaron dos tipos de gradientes con sus correspondientes proporciones de las fracciones :

2 M - 1 M - 0.75 M - 0.5 M - 0.25 M con 1.8:1.8:3.6:1.8:1.8 ml y 1 M - 0.75 M - 0.5 M - 0.25 M con 2:4:2:2 ml.

Las soluciones se adicionaron en forma manual en concentración decreciente, cuidando que las interfases fueran nítidas.

#### Aislamiento de ficobilisomas

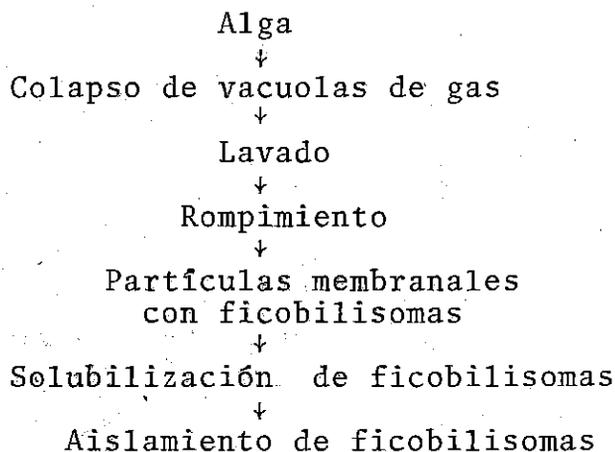
El método empleado ha sido el de Gannt (1972) con modificaciones.

Una muestra de alga resuspendida en solución reguladora de fosfatos 0.75 M pH 7.0 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) a concentración aproximada de 0.5 g/ml, se puso en una jeringa obturada con una llave de teflón y se le aplicó una presión moderada para romper las vacuolas de gas; al cabo de este paso, el alga adquirió una coloración más oscura y sedimentó con mayor facilidad (Walsby 1977). Se lavó centrifugándose dos veces a 5000 x g durante 10 minutos a temperatura de 20°C en el mismo amortiguador.

Las células del alga se rompieron macerándolas en un mortero con arena de mar purificada en proporción 1:3 p/p por 1 a 2 minutos; se resuspendió en el mismo amortiguador de fosfatos en proporción 1:3 p/v y se centrifugó suavemente (aproximadamente 500 x g) para remover la arena y las células enteras que no fueron rotas.

El sobrenadante se recibió en un detergente no iónico, tritón X-100 a una concentración final entre 2 y 5% agitándose vigorosamente por 30 minutos a temperatura ambiente.

Las partículas se separaron en el residuo cuando se centrifugaron a 105000 x g a 20°C; ese residuo azul se resuspendió en 1ml del mismo amortiguador y se llevó a un gradiente continuo de sacarosa de 1.0M a 0.25M centrifugándose a 270000 x g durante 6 horas a 20°C (Ley y col. 1977).



Coeficiente de sedimentación del ficobilisoma

Se preparó un gradiente lineal de 1.0 M (30.3%) a 0.25 M (8.64%) de sacarosa en el amortiguador de fosfato ya descrito. A ese gradiente se adicionó 1 ml de muestra y se centrifugó a 39,000 rpm en un rotor SW 41 durante 6 horas a 20°C en una centrífuga Beckman L-75 con integrador.

Después se colectaron fracciones de 0.8 ml cuyo índice de refracción y porcentaje de sacarosa fueron medidos con un refractómetro de Abbe.

Los valores de absorbancia para cada fracción se registraron en un perfil localizando ahí la máxima densidad óptica a 620 nm, así como la correspondiente concentración de sacarosa y de esta manera se obtuvo la posición de la banda.

El dato del integrador incorporado al aparato de centrifugación se tomó para la determinación del coeficiente de sedimentación de la siguiente manera:

$$Z_0 = \frac{Z_1 r_2 - Z_2 r_1}{r_2 - r_1}$$

$Z_1$  = mínimo porcentaje p/p del gradiente de sacarosa

$Z_2$  = máximo porcentaje p/p del gradiente de sacarosa

$r_1$  = menisco del tubo: distancia radial mínima a partir del eje de la centrífuga.

$r_2$  = fondo del tubo: distancia radial máxima del eje de la centrífuga.

$Z_0$  = Concentración del soluto correspondiente a la extrapolación de la distribución del gradiente a radio cero.

El valor de  $Z_0$  a la densidad de 1.3 para proteínas y a la temperatura de trabajo de 20°C, se correlacionó con el valor  $\Delta I$  de la concentración de sacarosa p/p en el cual sedimentó la partícula menos el valor mínimo del gradiente dado en el menisco ( $I_p - I_m$ ) obteniéndose en tablas (Griffith 1976) los valores correspondientes  $\Delta I$  empleados en la fórmula:

$$s_{20,w} = \frac{\Delta I}{\omega^2 t}$$

El valor  $\omega^2 t$  se obtuvo en el integrador de la centrífuga, donde  $\omega$  es la velocidad angular en rad/seg y que está dada por  $\frac{2 \pi}{60}$  rpm. Si se toma en cuenta la velocidad en rpm a la que estuvo sometida la muestra y el tiempo convertido a segundos que duró la centrifugación, el valor de  $\omega^2 t$  puede darse en segundos.

De ese modo, el coeficiente de sedimentación o sea la velocidad de sedimentación por unidad de fuerza centrífuga en svedbergs (S) o sea  $10^{-13}$  s, se calculó con la misma relación:

$$s_{20,w} = \frac{\Delta I}{\omega^2 t}$$

donde  $\omega^2 t$  en segundos es el valor dado por el integrador del aparato.

#### Disociación de ficobilisomas

A) Por descenso de temperatura. La muestra de ficobilisomas se incubó a 4°C, tomándose el registro de su espectro de fluorescencia a distintos tiempos en el rango entre 590 y 700 nm con una longitud de onda de excitación de 550 nm.

El experimento fue observado en una duración comprendida entre 2 y 25 horas.

B) Por efecto de dilución

Las muestras se diluyeron de 2 a 60 veces tomándose su espectro de fluorescencia como ya quedó descrito.

Microscopía electrónica

A) Inclusiones

Las muestras de alga a una concentración de 0.1 g/ml aproximadamente, se fijaron por 2 horas a 4° en glutaraldehído al 2% en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4 (según Sörensen) formándose una pastilla de 0.5 mm de altura aproximadamente en un tubo de microfuga de 0.5 ml de capacidad; se retiró el fijador reemplazándose por medio de lavado que consistió de sacarosa 0.25 M en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4 dejándose por 12 horas.

El medio de lavado se sustituyó por una solución al 2% de tetraóxido de osmio (Palade 1952; Sabatini 1963) en amortiguador de fosfatos a 4° por 2 horas para la postfijación, eliminándose después y lavando 4 veces durante 15 min cada vez procediendo luego a la deshidratación con una serie de concentraciones de etanol absoluto del 30 (2x10 min cada uno), después una mezcla de etanol con óxido de propileno 1:1 (2x15 min) y luego óxido de propileno (2x30 min) que fue sustituido por una dilución 1:1 de óxido de propileno-Epon (Luft 1961) para infiltrar la muestra durante 12 a 24 horas procediendo después a transferir dicha muestra a cápsulas BEEM previamente

identificadas y llenas de resina Epon sin diluir. Cuando las muestras llegaron al fondo de la cápsula se colocaron en una estufa de polimerización a 60° por 24 a 36 horas.

Después de tallar las pirámides de tamaño apropiado, se procedió a realizar cortes entre 60 y 90 nm aproximadamente (con colores de interferencia de gris a plateado) con una navaja de diamante los cuales se recogieron con rejillas de cobre no cubiertas de 300-400 mesh.

Se contrastaron con acetato de uranilo al 2% en solución acuosa y citrato de plomo al 2% (Watson 1958) (Reynolds 1963).

El tratamiento se hizo a temperatura de 20°C y las muestras se observaron al microscopio.

#### B) Tinción negativa

En rejilla de cobre con película cubierta de carbón se puso una gota de muestra, después de un minuto se eliminó el exceso con papel filtro Whatman # 1, colocando en seguida 1 gota de ac. fosfotúngstico al 2% en solución acuosa a pH 6.8 (Horne 1959, Breener y Horne 1959) volviendo a eliminar el exceso después de 1 a 2 minutos.

El material seco se observó al microscopio.

#### C) Criograbado

La muestra en forma de pasta se colocó en un portamuestra de oro y se congeló en freón 12 enfriado con nitrógeno líquido,

transfiriéndose después al nitrógeno líquido pasándose a la un idad de criograbado Balzers, enfriada a la temperatura de  $-150^{\circ}\text{C}$  y se procedió a la fractura sublimándose a  $-100^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se evaporó platino-carbón y carbón respectivamente a los ángulos adecuados, permitiendo que la muestra alcanzara la temperatura ambiente, procedimiento luego a retirar las réplicas de la superficie fracturada. (Moor 1963). El material orgánico adherido a la réplica, se digirió con una mezcla de 5 g de  $\text{H}_2\text{-Cr}_2\text{O}_7$  en 50 ml de agua y 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. por 12 horas (en ocasiones se trató después con hipoclorito de sodio. Santander 1968).

Las muestras recogidas en rejillas de cobre de 400 mesh sin cubierta, se observaron al microscopio electrónico como en los otros casos, marca Jeol Modelo 100B operando a 600 KV.

#### Determinación de fosfatos

De acuerdo al método de Fiske and Subarrow, la medición se manejó de la siguiente manera:

- a) Cada tubo con 7.8 ml de agua fue adicionado de 0.2 ml de solución problema. Para el caso del blanco esos 0.2 ml del problema se reemplazaron por 0.2 ml de agua y en el caso del estándar por 0.2 ml de una solución que contenía 2.5 mmolas de fosfato monosódico y disódico.
- b) A todos se le adicionó 1 ml de molibdato de amonio agitando para la formación del fosfomolibdato de amonio.
- c) Se agregó 1 ml de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  con agitación para incorporar el reactivo.

El sulfato ferroso se preparó con 4 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7.5 N y se aforó a 40 ml con agua. El molibdato amonio con 66 g llevado a 1 litro con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7.5 N.

#### Determinación de conductividad

En un conductímetro calibrado se hicieron las mediciones introduciendo la muestra al bulbo que contenía el electrodo, manteniendo constante la temperatura.

El resultado en micro o milimhos del problema, se relacionó con los patrones fijados.

#### Determinación de proteína

Se siguió el método de Lowry (1951) empleando como estándar albúmina bovina a una concentración de 1 mg/ml y los siguientes reactivos:

A.-  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en NaOH 0.1N

B.-  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1% y

tartrato doble de sodio y potasio al 1%

c.- 50 ml de A + 1 ml de B

Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:1

Las muestras se adicionaron de 5 ml de solución C agitando y dejando reposar 10 minutos, agregando después 0.5 ml de reactivo de Folin dejando reposar 40 minutos más, para leerse en el espectrofotómetro a 750 nm y compararse con la curva patrón preparada con el estándar citado de albúmina bovina en el rango en el cual este método es sensible.

## Cromatografía en Hidroxilapatita

### Primera columna

El soporte  $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$  (Bernardi 1968) fue resuspendido en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 equilibrándose con unos 50 ml de igual amortiguador hasta tener un flujo de unos 3 ml/hora.

Las dimensiones de la columna fueron 7.5 cm de largo y 2.5 cm de diámetro; en ella se puso una muestra de 7-10 ml de ficobilisomas colectados, concentrados por membrana de amicón PM-10 y dializados durante una noche en amortiguador 10 mM de fosfatos pH 7.0.

A pesar que la muestra estaba en 10 mM de fosfato y la columna fue calibrada con un amortiguador 50 mM de fosfatos, se corrió la cromatografía y se obtuvieron buenos resultados los cuales se incluyen.

### Segunda columna

La hidroxilapatita de igual lote fue resuspendida en 10 mM de fosfatos pH 7.0 equilibrándose con el mismo amortiguador y llegando a un flujo semejante al anterior.

La longitud de la columna fue 7.5 cm y su diámetro 2.5 cm. La muestra se solubilizó en 10 mM de fosfatos pH 7.0, agitando aproximadamente 1 cm de la parte superior del soporte para evitar la formación de burbujas, eluyéndose con un gradiente lineal de fosfatos desde 10 mM hasta 200 mM.

### Tercera columna

El soporte fue preparado en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 con 0.02 % de azida de sodio para evitar contaminación bacteriana.

Las dimensiones de la columna fueron 9.8 cm de longitud x 3.7 cm de diámetro, el volumen colectado antes de la aparición del color fue 16 ml dejándose eluir hasta ver una separación de tonos azules; se colectó la FC y después la AFC.

La FC aislada separada se concentró por amición PM-10. La AFC eluída se pasó a otra columna de hidroxilapatita.

### Cuarta columna

El amortiguador usado fue fosfatos 50 mM pH 7.0 (desde este momento dichos amortiguadores siempre fueron adicionados de azida de sodio al 0.02% y gramicidina 1 µg/ml).

Las medidas de la columna fueron 16.3 cm de longitud y 1.8 cm de diámetro.

10 ml de la ficocianina obtenida de la tercera columna y concentrada por membrana de amición PM-10 se recromatografiaron en hidroxilapatita con igual amortiguador eluyéndose con la misma solución de fosfatos. Se tuvo un volumen de 31 ml antes de aparecer el color azul y se colectaron fracciones de 5 ml cada una.

La aloficocianina adherida a la matriz de hidroxilapatita se separó de ahí, por medio de presión de aire, depositándose el contenido de la columna sobre un refractario pyrex.

procediendo a cortarla con una navaja; se pasó a otra columna de hidroxilapatita, de dimensiones 12.5 cm x 2.4 cm eluyéndose con un gradiente de fosfatos de 50 a 200 mM pH 7.0, siendo las fracciones de 5 ml cada una y el volumen que precedió al tono azul de 19 ml.

#### Quinta columna

Se empleó el mismo amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0. Las dimensiones de la columna fueron 21 cm de largo y 2.1 cm de diámetro.

Se eluyó con el mismo amortiguador y las fracciones donde se recogió la ficocianina fueron de 5 ml. La aloficocianina se separó como en el caso anterior y se eluyó con igual gradiente de 40 mM a 200 mM.

A cada una de las fracciones de las columnas se les sometió al análisis descrito en "Resultados".

#### Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se siguió el método referido por Gantt (1974) haciéndose en tubos de 10 cm de longitud y 0.5 cm de diámetro.

El gel se preparó mezclando 5 ml de A, 10 ml de B y 33 ml de C.

A: 5.83 g de tris y 0.46 ml de temed ajustando a pH 7.9

B: 24 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida /100 ml

C: 14 mg de persulfato de amonio/100 ml.

El amortiguador del reservorio fue asparagina 0.034 M ajustado a pH 7.3 con trizma-base.

Los ficobilisomas disociados o los pigmentos por separado se disolvieron en sacarosa al 15% poniendo sobre el gel 25 µg de proteína.

La electroforesis se realizó a 325 voltios, manteniendo una temperatura de 10°C por medio de circulación de agua durante 3 a 4 horas.

Una vez separadas las bandas, manifiestas por su color intrínseco, se sacaron del tubo y se tiñeron con azul de Coomassie al 0.2% en 10% de metanol v/v y 7% de ácido acético durante 40 minutos a 37°C, después se destiñeron con igual solvente.

#### Electroforesis con Dodecil Sulfato de Sodio (DSS)

##### Patrón No. 1

Se llevó a cabo electroforesis con dodecil sulfato de sodio para obtener criterio de pureza y dato de peso molecular en los pigmentos ya aislados.

El amortiguador concentrado para el reservorio fue glicina 767 mM tris 74 mM pH 7.3 ( Laemli 1970) diluido 1:4 + 10ml de DSS al 10%.

El amortiguador del gel de separación fue tris 2 M pH 8.8 (20%).

El amortiguador del gel de condensación fue el anterior pero al 6.5%.

La proporción de persulfato de amonio fue 1% y de TEMED

10%, la relación de bisacrilamida a acrilamida de 1:37 y 11% de acrilamida.

La solución digestora mantuvo una concentración final de 1% de DSS, 1% de mercaptoetanol, 5% de glicerol y 0.005% de azul de bromofenol.

Se usaron como marcadores, proteínas de peso molecular conocido empleándose 25  $\mu$ g de citocromo c de caballo, lisozi-  
ma, mioglobina, ovoalbúmina, albúmina de suero, quimotripsino-  
génico, cadenas ligera y pesada de  $\gamma$  globulina y apoferritina.

Los geles se tiñeron y destiñeron de la forma ya des-  
crita.

#### Patrón No. 2

1 mg de ficobiliproteína liofilizada, disuelta en 1.0 ml de fosfato de sodio 10 mM pH 7.0, 1% de SDS y 1% de mer-  
captoetanol se digirió durante 3 minutos a 90°C dejándola  
enfriar y luego siendo aplicada a geles preparados con 10% de  
acrilamida con una proporción de 1:37 de bisacrilamida a  
acrilamida, tomándose para el gel de condensación 3% de acri-  
lamida.

El amortiguador del reservorio fue preparado con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot$   
 $\text{H}_2\text{O}$  3.5 mM y 19.0 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.012% de DSS pH 7.3.

La corrida se hizo durante 4-6 horas aplicando una co-  
rriente de 8 mA/tubo.

Después de la migración, los geles se sacaron, tiñéndose  
con 0.2% de azul de Coomassie en 10% de metanol v/v, 7% de  
ácido acético durante 40 min a 37°C; la destinción se hizo de

la manera ya citada.

#### Patrón No. 3

Se siguió el método general del patrón No. 2 para trabajar en placa con la modificación de poner una relación de 1:27 de bisacrilamida a acrilamida y se corrió a 8 mA/pozo durante 8-10 horas.

#### Patrón No. 4

Se siguió en términos generales el patrón No. 2 con amortiguador de fosfatos pH 7.3 10% de acrilamida con la diferencia de tener una relación b:a de 1:18.5. La corriente empleada fue 8 mA/pozo durante 10-12 horas.

#### Patrón No. 5

Se prepararon placas agregando cantidades crecientes de proteína, desde 5 hasta 50  $\mu\text{g}$  (variando 5  $\mu\text{g}$ ) en un gel que fue adicionado de poliacrilamida lineal al 0.3%, acrilamida total 10% y 1:18.5 la relación bisacrilamida a acrilamida.

Se aplicó una corriente de 20 mA a una temperatura de 10°C por recirculación de agua durante 20 horas, cambiando el amortiguador de fosfatos del reservorio cada 6-8 horas.

Se tiñeron en la forma antes descrita.

## COEFICIENTE DE SEDIMENTACION DE FICOCIANINA Y DE ALOFICOCIANINA

Se prepararon gradientes de sacarosa de 0.15 M a 0.8 M (5 a 25%) en amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.0 (Zilinskas 1978) de la manera ya indicada.

Sobre el gradiente se colocó 1 ml de muestra de los pigmentos ya aislados por cromatografía y se centrifugaron 18 horas a 39 000 rpm con un rotor SW 41 a 20°C tomando el valor dado por el integrador.

Se separaron las fracciones, leyendo su densidad óptica a 620 nm para la ficocianina y 650 nm para la aloficocianina y se siguió el método de localización de la banda y cálculo del dato, de la manera ya referida.

## REGISTRO DENSITOMETRICO DE LOS ELECTROFOREGRAMAS

Para obtener estos trazos del electroforegrama se empleó un espectrofotómetro Gilford 240 acoplado a un Registrador Gilford 6040.

El aparato se calibró a la máxima longitud de onda de absorción del azul de Coomassie o sea 567.5 nm

La muestra se colocó en la celda con agua bidestilada cuidando que no hubiesen burbujas y que la superficie del gel fuera tersa. Si el gel tiene zonas deterioradas, se registra un artefacto en el trazo obtenido.

Se midió una zona no teñida del gel, la cual se tomó como blanco de ahí se ajustó el aparato, después se hizo des-

plazar la celda que contenía el electroforegrama a una velocidad dada que permitiese resolver los componentes en un trazo que fue recogido en el graficador.

#### MEDICION DE DENSIDAD OPTICA DE LAS BANDAS DE LOS ELECTROFOREGRAMAS

Las bandas coloridas de los electroforegramas, se cortaron, homogenizándose con un vástago por unos 3 minutos en 50% de etanol v/v, luego se incubaron por 1 hora a 37°C y se centrifugaron a baja velocidad durante 10 min. El sobrenadante quedó azul y el gel totalmente incoloro.

Se leyó la densidad óptica de las soluciones a 567.5 nm.

#### Cromatografía en Sephadex G-200

Una columna de 62 cm de longitud y 1.5 cm de diámetro fue empacada con Sephadex G-200 en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 y equilibrada con la misma solución reguladora hasta tener una velocidad de 6 ml/hora.

Se calibró con cuatro marcadores protéicos: citocromo c, ovoalbúmina,  $\gamma$  globulina y apoferritina. El volumen vacío se midió con azul de dextrán.

La muestra de ficobilisomas disociados por diálisis en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0 y concentrada por membrana de amicon PM-10, se adicionó en la parte superior de la columna. Se colectaron fracciones de 3 ml mediante un colector LKB 7000 que fueron monitoreados por su densidad óptica a 620, 650 y 280 nm.

MATERIALES

Reactivos		P.M.	
Acido acético	$\text{CH}_3\text{-COOH}$	60.05	Baker
Acido dicrómico	$\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	217.985	Baker
Acido etilendiamino tetraacético EDTA		336.2	Sigma
Acido fosfórico	$\text{H}_3\text{PO}_4$	98.00	Mallinckrodt
Acido fosfotúngstico	$\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}\cdot 14\text{H}_2\text{O}$	3133.27	Poli Sciences Inc
Acido sulfúrico	$\text{H}_2\text{SO}_4$	98	Merck
Acetona	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	58.08	Baker
Acetato de uranilo	$\text{UO}_2(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	424.19	Poli Sciences Inc
Acrilamida	$\text{CH}_2\text{-CH-CO}\cdot\text{NH}_2$	71.08	Bio-Rad
Albúmina bovina	lote #84C-8100	99% pureza	Sigma
Albúmina de suero (grado electroforético)			Schwarz/Mann
Alcohol etílico absoluto	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	46	Merck
Anhidrido dodecilnil succinico DDSA			E. Microscopy Sciences
Anhidrido metil ná dico (NAM)			E. Microscopy Sciences
Apoferritina (grado electroforético)			Schwarz/Mann
Arena de Mar purificada			Merck
Asparagina	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$	150.14	Merck
Azul de bromofenol	3'3''5'5'' tetrabromofenol sulfonftaleína		Sigma
Azul de Coomassie	Azul Brillante		Sigma

Azul de Dextran 2000			Pharmacia
Azida de sodio	$\text{NaN}_3$	65.02	Sigma
Benzil dimetil amina			E. Microscopy Sciences
Bicarbonato de sodio	$\text{NaHCO}_3$	84.01	Baker
Bisacrilamida	N,N'-metilen Bisacrilamida	154.17	Bio-Rad
Carbón activado			Bio-Rad
Carbonato de sodio	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	106	Baker
Cianuro de potasio	KCN	65.11	Baker
Citrato de plomo	$\text{Pb}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1053.88	Poly Sciences Inc.
Citocromo C de caballo (grado electroforético)			Schwarz/Mann
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	110.99	Merck
Cloruro de manganeso	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	197.91	Merck
Solucion saturada de cloruro de potasio	KCl	74.56	YSI
Cloruro de potasio	KCl	74.56	Merck
Cloruro de sodio	NaCl	58.5	Merck
3-(3-4 diclorofenil)-1, 1-dimetil urea DCMU		223.10	ICN
Sephadex DEAE 50			Pharmacia
Dodecil sulfato de sodio		288.4	Sigma
Dioxano	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$	88.11	Merck
Epon			Miller Stephenson Comp. (Shell Corp.)
Folin-Ciocalteu	Lote 140428c		Sigma
Fosfato de potasio dibásico	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	174.18	Merck

Fosfato de potasio monobásico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136.09	Merck
Fosfato disódico heptahidratado	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	272	Merck
Fosfato monosódico monihidratado	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	137.99	Merck
Glicerol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	92.09	Eastman
Glicina	$\text{CH}_2\text{NH}_2\text{-COOH}$	71.0	Sigma
γ globulina (grado electroforético)			Schwarz/Mann
Glutaraldehído			E. Microscopy Sciences
Gramicidina			Sigma
Hidroxilapatita	Lote No. 44212		BDH
Hipoclorito de sodio	$\text{NaClO}$	74.45	Ladd Research Inc
Lisozima			Sigma
Manitol	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$	182.17	Merck
Mercaptoetanol 2-Hidroxietil mercaptano		78.1	Sigma
Metanol	$\text{CH}_3\text{OH}$	32.043	Baker
Mioglobina (grado electroforético)			Schwarz/Mann
Molibdato de amonio	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1235.86	Merck
Nitrato de sodio	$\text{NaNO}_3$	85.0	Merck
Nitrato de cobalto	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	291.052	Baker
Nitrógeno líquido			Liquid Carbonic
Ovoalbúmina (grado electroforético)		45000	Schwarz/Mann
Oxido de propileno			

Platino-Carbón			Ladd Research
Persulfato de amonio		228.2	Sigma
Poliacrilamida lineal			BDH
Quimotripsinógeno (grado electroforético)			Schwarz/Mann
Sacarosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.3	Merck
Sephadex G-200			Pharmacia
Sulfato cúprico	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	249.68	Baker
Sulfato de magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246.498	Baker
Sulfato de níquel	$NiSO_4 \cdot 6H_2O$	262.872	Baker
Sulfato de sodio	$Na_2SO_4$	142.04	Merck
Sulfato de zinc	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287.558	Baker
Sulfato ferroso	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	277.9	Sigma
Tartrato doble de sodio y potasio	$C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$	282.23	Merck
Temed. N,N,N'N' tetrametil etilendiamina			Bio-Rad
Tetraóxido de osmio	$OsO_4$	254.20	Engelhard Ind.
Tris-HCl hidroximetilamino metano		121.14	Merck
Tritón X-100			Sigma
Trizma base			Sigma

\* Medio de Argel modificado (por exclusión de algunos componentes) pH 9.5  
(Vega, 1976).

	g/l
NaHCO <sub>3</sub>	22
NaNO <sub>3</sub>	3
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.33 <sup>(a)</sup>
KCl	1.44
NaCl	1.00
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anh.	1.00
EDTA	0.07
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.05
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01

Solución 1 de oligoelementos

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.860
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.810
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.220
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.044
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.079
NiSO <sub>4</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.047

(a) ml para una concentración de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85%.

EQUIPO

Bomba de gradientes Buchler Densi Flow Modelo II C.  
Colector de Fracciones LKB 7000.  
Centrífuga L-75 con integrador (Beckman).  
Circulador de agua Haake tipo FE.  
Conductímetro tipo CDM 2d.  
Desteñidor de geles Bio-Rad Modelo 172A con cartucho de carbón activado.  
Electroforesis en placa Bio-Rad Modelo 220.  
Electroforesis en tubo de Bio-Rad Modelo 150A.  
Espectrofluorómetro Aminco Bowman acoplado a un graficador XY H, Packard y aditamento de fluorescencia de frente.  
Espectrofotómetro Beckman DB.  
Espectrofotómetro Cary 15.  
Espectrofotómetro DW Aminco Chance con lámpara de tungsteno para el visible  
Espectrofotómetro DW-2a Aminco con agitador magnético.  
Espectrofotómetro Gilford 240 de geles para barrido y registrador G 6040.  
Espectrofotómetro Zeiss PMQII con lámpara incandescente de tungsteno 6W 30W o lámpara de deuterio tipo H 30DS (en el UV).  
Filtro radiométrico con lectura espectral plana entre 450 y 900 nm.  
Fuente de poder Searle de Buchler Instruments.  
Fuente luminosa de 25 watts.  
Fuente luminosa de 500 watts.  
Homogenizador Virtis 45S con vaso 16-101.

Membranas de Amicón PM-10, XM 100A y XM 300

Mezclador de gradientes Varigrad.

Microcentrífuga Beckman 152.

Microscopio electrónico Jeol 100 B.

Microtomo C. Reichert Om U<sub>3</sub>.

Monocromador Bauch & Lomb con diafragma de entrada 10 mm y diafragma de salida 5 mm.

Polarógrafo YSI, Electrodo de Clark y cámara del electrodo, monitor y graficador Honeywell electronic 19.

Potenciómetro Corning Modelo 12 con escala expandida.

Radiómetro-Fotómetro 40A Opto-Meter de Light Measuring Instruments

Refractómetro de Abbe.

Sonicador Branson Sonifier B-12 a 600 watts, con empleo de micropunta.

Unidad de Criograbado Balzers.

## RESULTADOS

### Espectro de Actividad fotosintética

La influencia de los pigmentos auxiliares en la fotosíntesis de *Spirulina máxima* se midió por un espectro de actividad fotosintética seleccionando la respuesta de producción de oxígeno en función de la longitud de onda en el rango entre 400 y 700 nm.

Un espectro de acción permite la identificación de sustancias responsables de un fenómeno; dicha respuesta se normaliza y se grafica el inverso de la intensidad luminosa que produjo esa respuesta vs la longitud de onda. La comparación entre el espectro de acción y el espectro de absorción de los sensibilizadores establece una relación estrecha entre la respuesta analizada y la identidad espectroscópica de los componentes en el fenómeno de estudio.

Para tal efecto, se procedió a medir el espectro de absorción en el sistema analizado.

#### 1. Espectro de absorción e identificación de pigmentos en *Spirulina máxima*.

El espectro de absorción de *Spirulina máxima* completo en el rango citado se hizo en un espectrofotómetro Aminco-Chance con una operación general del siguiente tipo: el paso de la luz de una fuente por el sistema óptico del aparato

igual a las intensidades de dos rayos, los cuales son colimados y dispersados saliendo por un diafragma, luego, mediante un alternador se cortan y se ponen en fase a una frecuencia fija para pasar alternativamente a través de otros espejos hasta las celdas de la referencia y de la muestra, esa luz transmitida activa la fotomultiplicadora que genera una señal la cual se amplifica por su sistema de dinodo y luego se registra. El contenido de la celda se mantuvo en agitación para evitar la sedimentación de la muestra y por tanto permitir la interacción entre la luz y los pigmentos fotosensibles, así mismo la cercanía de la celda al fototubo limitó la pérdida de señal luminosa que se recogió luego como señal eléctrica (Manual de operación del Espectrofotómetro Amingo-Chance).

Muchos trabajos de análisis espectroscópico sobre los pigmentos *in vivo* responsables de la fotosíntesis en algas verde-azules han puesto de manifiesto los siguientes compuestos y sus picos u hombros de absorción:

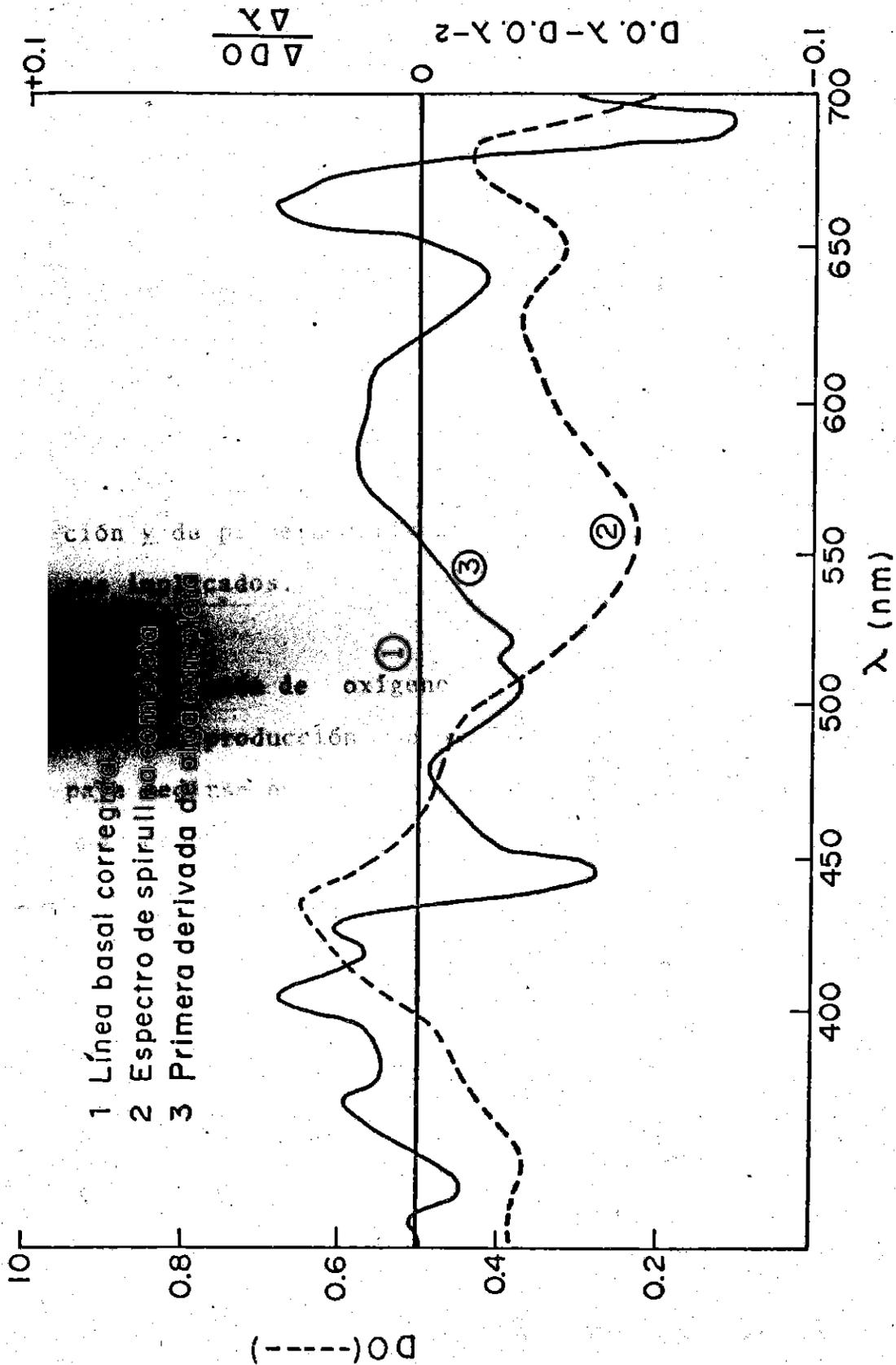
	Señales de Absorbancia	Coefficiente de extinción mg/ml, 1 cm	Referencias
Clorofila	385-395	$\epsilon_{678} = 67.5$	Wildman y col. 1974
	420-425		
	675-679		
	678		Arnon 1974
Ficocianina	585-595		Wildman y col. 1974.
	625-630		

		$\epsilon_{620}=4.16$	Gantt y col. 1974
Aloficocianina	645-650		Wildman y col. 1974
		$\epsilon_{650}=5.00$	Gantt y col. 1974
Carotenos	435-440 480-490		Wildman y col. 1974

En la fig. 5 se describe el espectro de absorción del alga completa y se observan los picos responsables de tales pigmentos: la clorofila se manifiesta en la zona del azul con un pico a 442 nm y otra señal en el rango del rojo a 675 nm. La relación  $D. O. 442/D.O. 675$  es 1.48, valor que indica la presencia de otros componentes que también absorben en la zona del azul e inclusive afectan la simetría de la señal; estas sustancias con respuesta entre 450 y 550 nm son los carotenos que Dumartrait (1976) ha encontrado en *Spirulina platensis* y Gómez Lojero en *Spirulina maxima* en la zona entre 475 y 500 nm.

El pico en 620 nm responde a la ficocianina (Gantt y col. 1974). La relación  $D. O. 620/D.O. 675$  es de 0.87 poniendo de manifiesto el alto contenido de este pigmento en el sistema de estudio; el trazo de la primera derivada en este punto, corresponde a cero, o sea da identidad de un máximo de absorción; de hecho la ficocianina es el pigmento auxiliar mas abundante de *Spirulina maxima*.

Figura 5. Espectro de absorción y primera derivada de una muestra de alga completa de *Spirulina maxima*. El espectro de absorción, corregido por línea base, muestra sus valores máximos en 442 y 675 que identifican a la clorofila, en 620 que corresponde a la ficocianina. La zona de 450 a 550 responde a los carotenos. La primera derivada manifiesta con valores 0 o cambios de pendiente los máximos de absorción o los otros componentes. el  $\Delta\lambda$  fue de 2 nm.



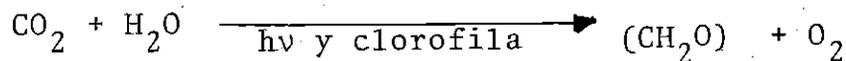
ción y de p...  
...  
... de oxígeno  
... producción

En el espectro de absorción obtenido no se hace visible la señal de AFC en 650 nm por el enmascaramiento de la gran cantidad de clorofila, ya que en este punto comienza la señal de tal pigmento.

La primera derivada señala con sus picos los niveles energéticos a los cuales se detectan componentes, poniéndose de relieve la heterogeneidad de las entidades presentes; los máximos de absorción se leen en el trazo como derivada cero y se comprueba que hay congruencia en los registros de absorción y de primera derivada que señalan presencia de los pigmentos implicados.

## 2. Producción de oxígeno

La producción de oxígeno fue la respuesta seleccionada para medirse en función de la longitud de onda, tal medida es una respuesta del proceso fotosintético,

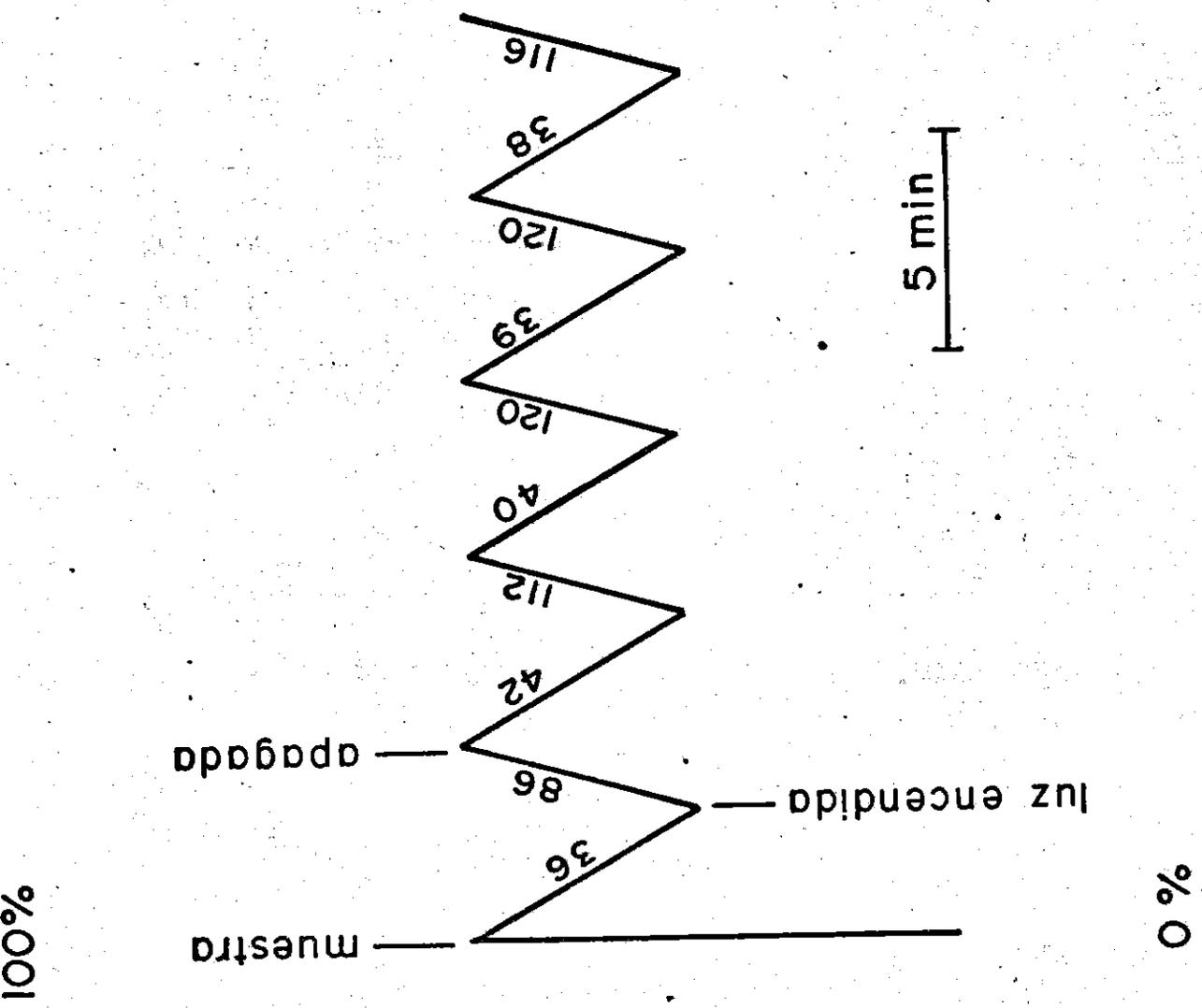


En las condiciones empleadas, con una cantidad alta de aceptor de electrones, este dato significa la actividad de los dos sistemas fotoexcitables.

Esa producción de oxígeno se midió polarográficamente dando períodos luz-oscuridad al sistema, obteniéndose respuestas como la señalada en la fig. 6.

La inyección de la muestra a la cámara en oscuridad ofrece una respuesta de consumo inicial de oxígeno; cuando se pone

Figura 6. Trazo del polarógrafo en consumo y producción de oxígeno con períodos de luz y oscuridad. Se incluyen los datos de las pendientes en  $\mu\text{molas O}_2/\text{h.mg}$  clorofila.



en presencia de luz, la pendiente cambia de signo y da señal de producción la cual se mide teniendo en cuenta la calibración de la carta y el tiempo de ensayo, refiriendo el resultado a concentración de clorofila, como es usual en este campo.

El primer ciclo oscuridad-luz presenta valores aparentemente menores que los obtenidos en los siguientes ciclos en los cuales se ve un registro cuantitativamente estable en un tiempo aproximado de 15 minutos; esto delimita el tiempo de observación en un estado estacionario que asegura relativa uniformidad de la respuesta.

Se observó un paralelismo entre el consumo y la producción de oxígeno, de modo que se ven afectadas las dos señales por agentes físicos o químicos tales como el tiempo, incubación en la luz, temperatura etc., por tanto se tomó el valor del consumo como un índice indirecto de la viabilidad del alga en su respuesta en la liberación de oxígeno.

Así pues, la producción de oxígeno en muestras de alga completa fue medida en condiciones estandarizadas de naturaleza de amortiguador empleado, cantidad de alga, temperatura, pH, intensidad luminosa y viabilidad del alga, parámetros que se analizan en el Apéndice.

Se cuestionó si las mediciones de producción de oxígeno reflejaban los valores netos ya que se sabe que tanto las plantas superiores como las algas realizan el proceso respiratorio y entonces el valor observado en la producción es in-

ferior al real puesto que parte de ese oxígeno producido por fotosíntesis estaría implicado en el fenómeno respiratorio.

La corrección cuantitativa al proceso no se conoce, tan sólo se marcan los límites; la subestimación se toma como la respuesta leída en el polarógrafo y como dato de sobrestimación se considera la suma de los valores del consumo y de la producción asumiendo que el consumo en la oscuridad permanece en igual proporción en presencia de la luz como Van Norman (1952) señaló con sus experimentos realizados con isótopos pesados de oxígeno donde  $^{34}\text{O}$  que pone en fase gaseosa se consume en forma proporcional a la velocidad de respiración y  $^{32}\text{O}$  presente en el agua se consume en la oscuridad pero también es consumido y producido en la luz.

En los experimentos aquí efectuados, se mantuvo alta la concentración de  $\text{CO}_2$  (26 mM o 50 mM de bicarbonato) para asegurar el flujo de electrones hasta el aceptor final y reducir el efecto de respiración en la luz y muy por arriba del valor de compensación o sea la concentración de  $\text{CO}_2$  arriba de la cual se observa fotosíntesis neta.

### 3. Espectro de actividad fotosintética con luz monocromática

Se midió la producción de oxígeno en condiciones estandarizadas, empleando medio de Argel (26 mM de bicarbonato de sodio) para asegurar una alta proporción de aceptor final de electrones.

Cuando se probaron otros amortiguadores, manteniendo 50 mM de bicarbonato, se obtuvo sólo 28% de la respuesta vista con el medio de Argel.

Una condición experimental limitante de este estudio fue la baja intensidad de luz monocromática a pesar de emplear una fuente de 500 watts, pues ésta se redujo mucho al pasar por el monocromador; sus valores se señalan en la tabla I y en la fig. 7, esta condición de trabajo no permitió normalizar la respuesta para graficar los parámetros acostumbrados de  $1/I_0$  vs  $\lambda$ , sino que se graficó la eficiencia fotosintética a diferentes longitudes de onda, comparando con los valores del espectro de absorción, viendo la concordancia de los dos datos en la zona de absorción de las ficobilinas.

Se procedió a medir el cambio en la concentración de oxígeno ( $O_2$ ) al variar la longitud de onda entre 400 y 700 nm localizándose una respuesta positiva a partir de 550 nm; los valores más altos se encontraron en la zona de 600-650 nm que es donde se localiza la absorción de las ficobilinas. El valor a 650 nm a veces fue igual que a 620 nm y en ocasiones se vió aumentado, indicando así que la aloficocianina que absorbe a esa  $\lambda$  de manera preferente, tiene la mayor eficiencia en el fenómeno.

Revisando la zona de los carotenos se aprecia que éstos, prácticamente no responden en la producción de oxígeno medido en estas condiciones, así que puede inferirse un bajo acoplamiento en transferencia de energía y esto dirige una presunción en el sentido de otra funcionalidad de estos pigmentos,

T A B L A 1

ESPECTRO DE EFICIENCIA FOTOSINTETICA  
CON LUZ MONOCROMATICA

$\lambda$ en nm	Producción de oxígeno en $\mu$ molar de $O_2$ /h.mg cl	Intensidad luminosa $\mu$ . einstenios. $cm^{-2}$ . h $^{-1}$
400	13.51	3.46
425	14.24	4.04
450	14.74	4.61
475	14.74	5.43
500	14.98	5.06
525	14.49	5.04
550	18.4	5.47
575	20.12	5.69
590	19.88	5.32
610	20.6	5.32
620	21.59	5.80
640	21.59	5.59
650	21.59	5.63
675	19.73	5.59
700	15.35	5.24

Producción de oxígeno en función de la longitud de onda a las intensidades marcadas. Se hizo corrección por el consumo con la oscuridad. Consumo inicial de oxígeno 16.2  $\mu$ molas de  $O_2$  h $^{-1}$  mg clorofila $^{-1}$ , concentración del alga: 16 mg/ml en medio de Argel pH 9.5, temperatura 30°C, cantidad total de clorofila 72.3  $\mu$ g; separación entre en monocromador y el filtro 5 mm.

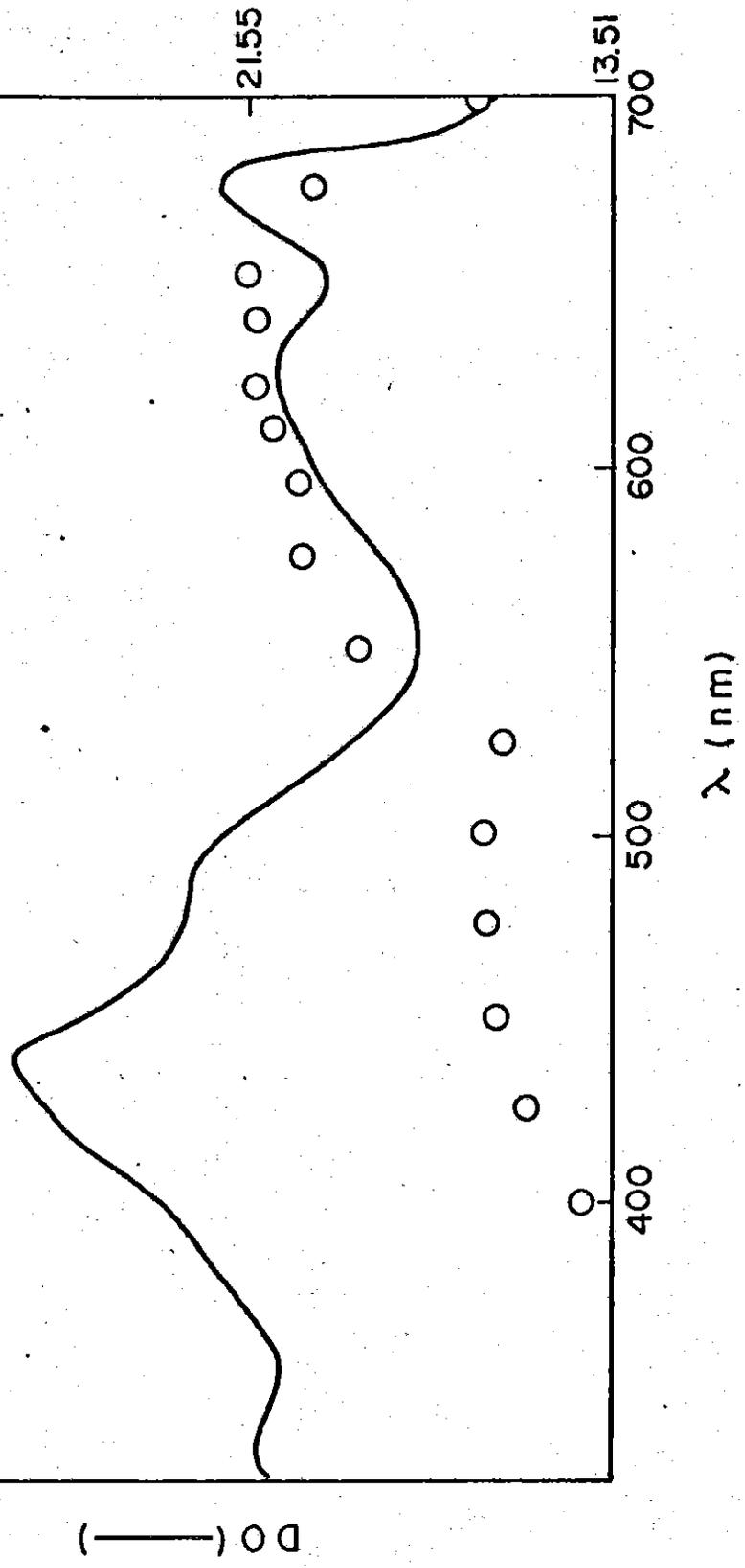
Corriente 25 amperios, potencia de la lámpara 500 wattios, diafragma de entrada 10 mm, diafragma de salida 5 mm. La intensidad luminosa fue medida con un fotómetro y filtro radiométrico. Las mediciones se hicieron con un polarógrafo YSI conectado a un graficador Honeywell 19 electronic.

Figura 7. Espectro de absorción del alga intacta (—) y señales de producción de oxígeno a ciertas longitudes de onda (o). En la zona responsable de las ficobilinas se pone de manifiesto la doble respuesta.

Espectros de absorción y de actividad fotosintética con luz monocromática en Spirulina maxima

A = actividad fotosintética en  $\mu\text{molas O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \text{mg. clorofila}^{-1}$

- 78 -  
 $\mu\text{molas O}_2 / \text{h} \cdot \text{mg clorofina}$



como puede ser la de antioxidantes.

Se pudo apreciar una pequeña respuesta a 675, por lo menos parece que hay cierta influencia de la clorofila del centro de reacción I.

Los trabajos de Tel-Or y Malkin (1977) postulan que el rendimiento cuántico de producción de oxígeno en el PSII se ve contribuido por las respuestas de los pigmentos componentes: ficobilinas, clorofila y carotenos:

Rendimiento cuántico

$$\phi_{PSII} = \phi_{II} \left[ \alpha_{II} (PC) + \beta_{II} (Cl) + \gamma_{II} (Car) \right]$$

donde  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  significan las posibilidades de transferencia de energía y (PC) (Cl) y (Car) son las absorciones fraccionales; si se analiza la zona de absorción de las ficobilinas entre 580 y 650 nm donde se ve que la contribución de absorción fraccional para estos pigmentos es alta, para clorofila es muy baja y para carotenos es nula, los términos  $\beta$  (Cl) y  $\gamma$  (car) se verán afectados por sus correspondientes valores, por tanto el rendimiento cuántico del PSII tendrá por componente efectivo a las ficobilinas como principal contribuyente del fenómeno.

Entonces, cuando se ve el rendimiento cuántico del PSII en ese rango de  $\lambda$ , los valores encontrados en la zona serán la absorción fraccional por su coeficiente de transferencia y la señal en el registro del espectro de acción se acercará a

una línea recta horizontal (fig. 7). Si se desglosara la respuesta para FC y AFC y considerando la absorción fraccional de AFC menor que la FC, (Gantt 1974, Lemasson 1973) el ver una respuesta experimental para 650 igual o mayor que a 620 nm hablaría de una eficiencia mayor de este pigmento en el fenómeno medido.

Esta dependencia teórica de las ficobilinas en la producción de oxígeno, afianza el resultado experimental encontrado.

La figura 7 compara los espectros de absorción y de producción obtenidos.

La interpretación cuantitativa se hizo en el nivel de sobreestimación del oxígeno producido, haciendo una suma algebraica del valor del consumo en la oscuridad y el valor correspondiente a la producción neta que a ciertas longitudes de onda sólo se manifestó como disminución del consumo original.

En la zona de los carotenos no se reflejó respuesta, lo cual se esperaba, pues estos pigmentos se localizan de manera casi total en el PSI (Tel-Or y Malkin 1977).

La respuesta a 675 nm no es muy baja, lo que hablaría de la contribución de la clorofila *per se* y como un enmascaramiento que disminuyera la interpretación cuantitativa de los pigmentos que absorben en 620-650 (Gantt 1975) pero el dato de la respuesta a 442 nm, que es muy bajo, le resta relevancia a la clorofila que influyera en el valor de las ficobilinas.

Se ve una gran diferencia de un orden de magnitud en la respuesta de producción de oxígeno en la luz blanca referida en la señal de la fig. 6 y la luz monocromática del espectro de acción de la fig. 7, esta gran diferencia es un reflejo de la baja intensidad luminosa en el espectro de acción, pues las otras condiciones se mantuvieron. En mejores condiciones experimentales se esperaría mayor semejanza entre la respuesta de absorción y de acción en la zona de las ficobilinas pero los limitantes de intensidad luminosa reducen esta respuesta.

De este modo, la zona un tanto aplanada entre 600-650 nm, que registra los valores máximos, vincula la respuesta con la naturaleza de los pigmentos protéicos de las bilinas..

#### Asociación de los pigmentos auxiliares.

En cianobacterias y rodofitas, los pigmentos antena constituidos por ficobilinas se localizan como una asociación polimérica situada sobre las lamelas tilacoidales orientadas hacia el estroma.

Estos sistemas de agregación multiprotéica llamados ficobilisomas por Gantt y Conti (1966a), persumiblemente tienen un alto grado de organización que permite la transferencia de energía luminosa de la ficocianina (en el caso de una cianofícea) a la aloficocianina hasta la clorofila a del centro de reacción del PS II para disparar el evento fotoquímico.

## Integridad del ficobilisoma

La integridad del ficobilisoma tanto *in vivo* como *in vitro*, se mantiene en ciertas condiciones y la alteración de ellas libera los componentes del mismo.

Esta integridad puede estudiarse a otros niveles además de la eficiencia cuántica de la fotosíntesis ya referida.

En este trabajo se han seleccionado dos: *in situ*, el aspecto estructural por microscopía electrónica y la medición funcional de la transferencia de energía analizada por espectros de fluorescencia en preparaciones de ficobilisomas aislados.

## Localización del ficobilisoma estudiado por microscopía electrónica

La localización del ficobilisoma en la membrana tilacoidal fue estudiada por microscopía electrónica haciendo observaciones en cortes finos, criograbado y tinciones negativas tanto en muestras de alga intacta como en preparaciones aisladas de estos agregados.

### a) Inclusiones

Para tener un criterio de comparación, se tomó la imagen revelada de un cultivo de *Anabaena sp* de la cual se tiene certeza que posee ficobilisomas (Wildman y col. 1974); éste funciona en luz limitante condición que favorece la presencia de pigmentos antena eficientes.

Figura 8. Fotomicrografía de *Anabaena sp* mostrando ficobilisomas. La muestra se fijó en glutaraldehído al 2% tiñéndose con tetraóxido de osmio 2 horas; el contraste se logró con acetato de uranilo y citrato de plomo. La amplificación es de 28500X. El proceso se realizó a temperatura ambiente.

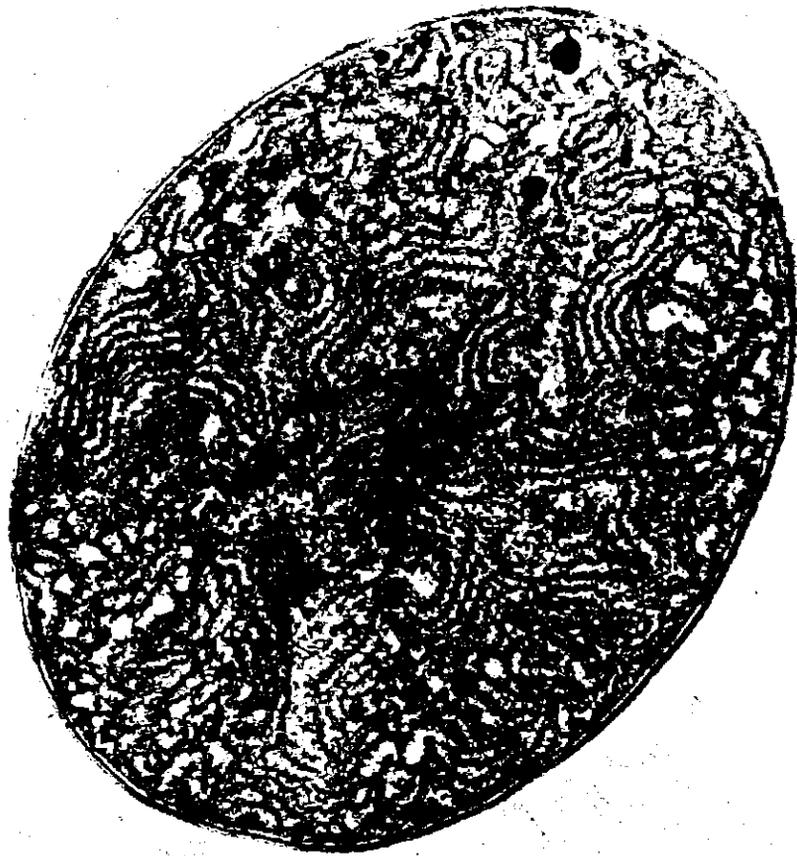


Figura 9. Membranas tilocoidales de *Anabaena* sp con ficobilisomas asociados. Amplificación de la anterior a 76000 X.

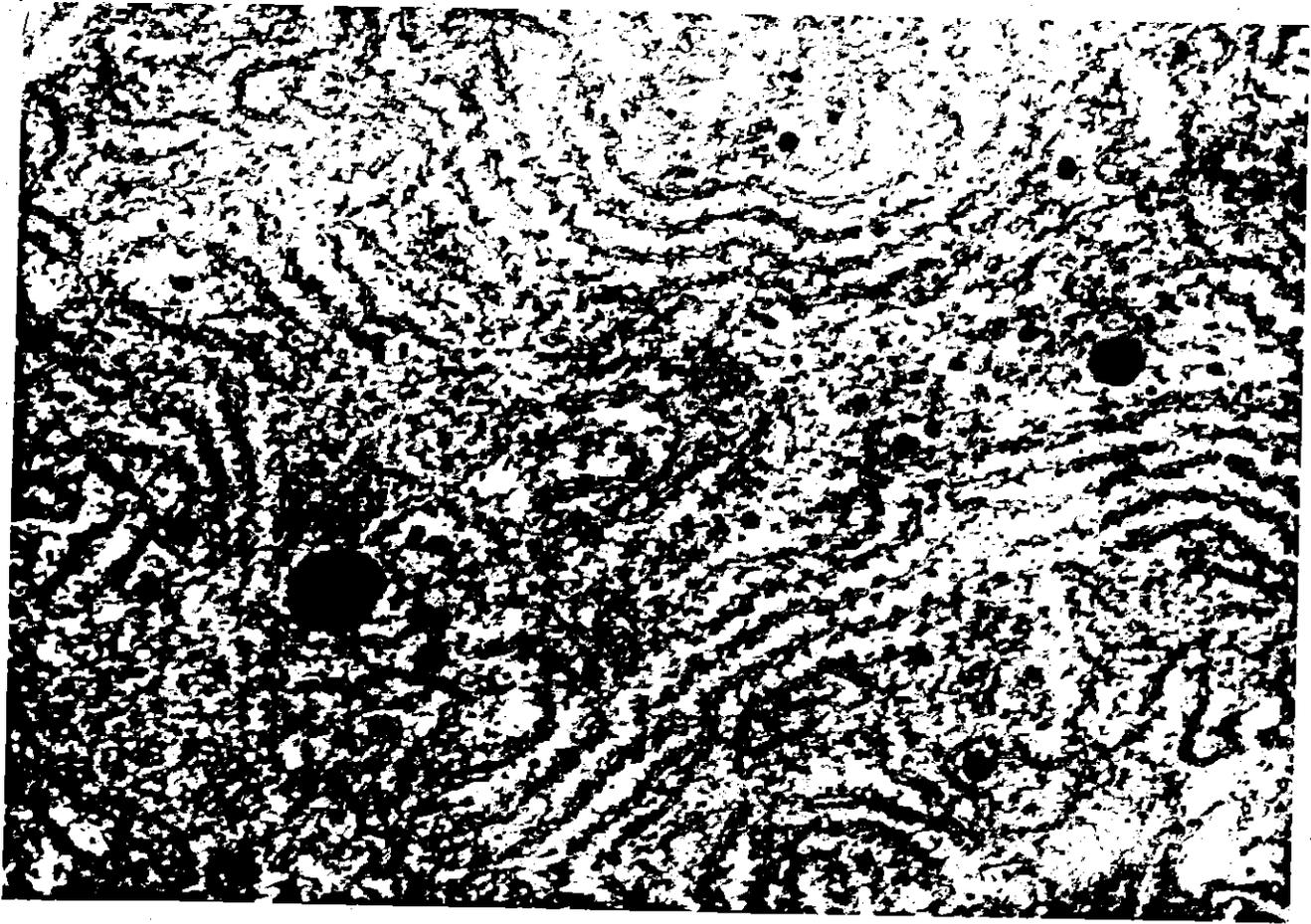


Figura 10. A. Membranas tilacoidales de *S. máxima* intacta con presencia de ficobilisomas.

Las condiciones de fijación son 2% de glutaraldehído durante 2 horas; la tinción fué con tetraóxido de osmio por 2 horas más, empleando citrato de plomo y acetato de uranilo para contrastar. Amplificación 95000 X.

El proceso se realizó a temperatura ambiente.

B. Membranas de *Spirulina máxima* congeladas sin ficobilisomas.

El tratamiento fue igual que el señalado en A y la amplificación es de 114000 X; el proceso se realizó a 4°C.

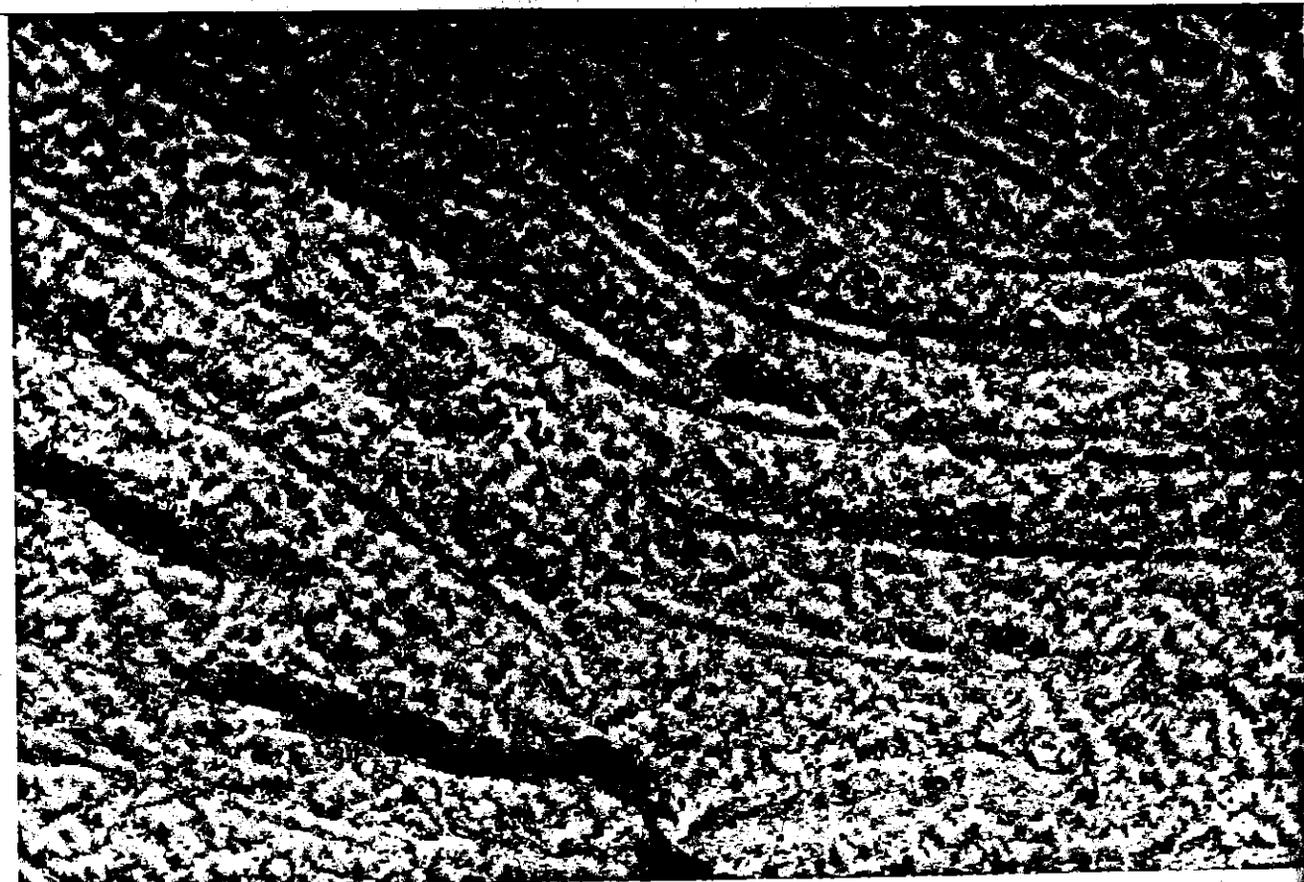
Se pone de manifiesto la presencia y ausencia de estructuras adosadas a la membrana en las correspondientes fotografías.

A



La estructura organizada del microorganismo

B



La imagen de una célula completa revela la presencia de estructuras periódicas asociadas a la membrana tilacoidal en arreglos regulares orientados hacia el estroma; la fotografía mostrada en la fig. 8 tiene el esquema señalado a pesar de una amplificación relativamente baja que es de 28500 X. El detalle que se observa en la fig. 9, pone de manifiesto la misma presencia a una amplificación de 76000 X donde resalta la presencia de dichas partículas.

#### Comparación de membranas con presencia y ausencia de ficobilisomas

La estructura organizada del ficobilisoma se mantiene unida a la membrana en las condiciones que prevalecen en su microambiente vital; cuando éste se altera por condiciones fisicoquímicas como dilución, disminución de fuerza iónica o descenso de temperatura (Gantt 1975), se provoca una liberación física de los componentes.

Se indujo una disociación de estos pigmentos, sometiendo la muestra a congelación en nitrógeno líquido y luego manteniéndola a 4°C por 6 a 8 horas.

La imagen ofrecida al microscopio se comparó con la obtenida en otra muestra de alga intacta. El efecto se pone de manifiesto en las fotografías presentadas en la fig. 10.

Mientras que la imagen A (amplificación de 95000 X) corresponde al alga intacta y da cierta rugosidad periódica, esto no se observa en B a pesar que se tiene mayor amplificación o sea 114000 X, donde no se registra ninguna estructura asociada.

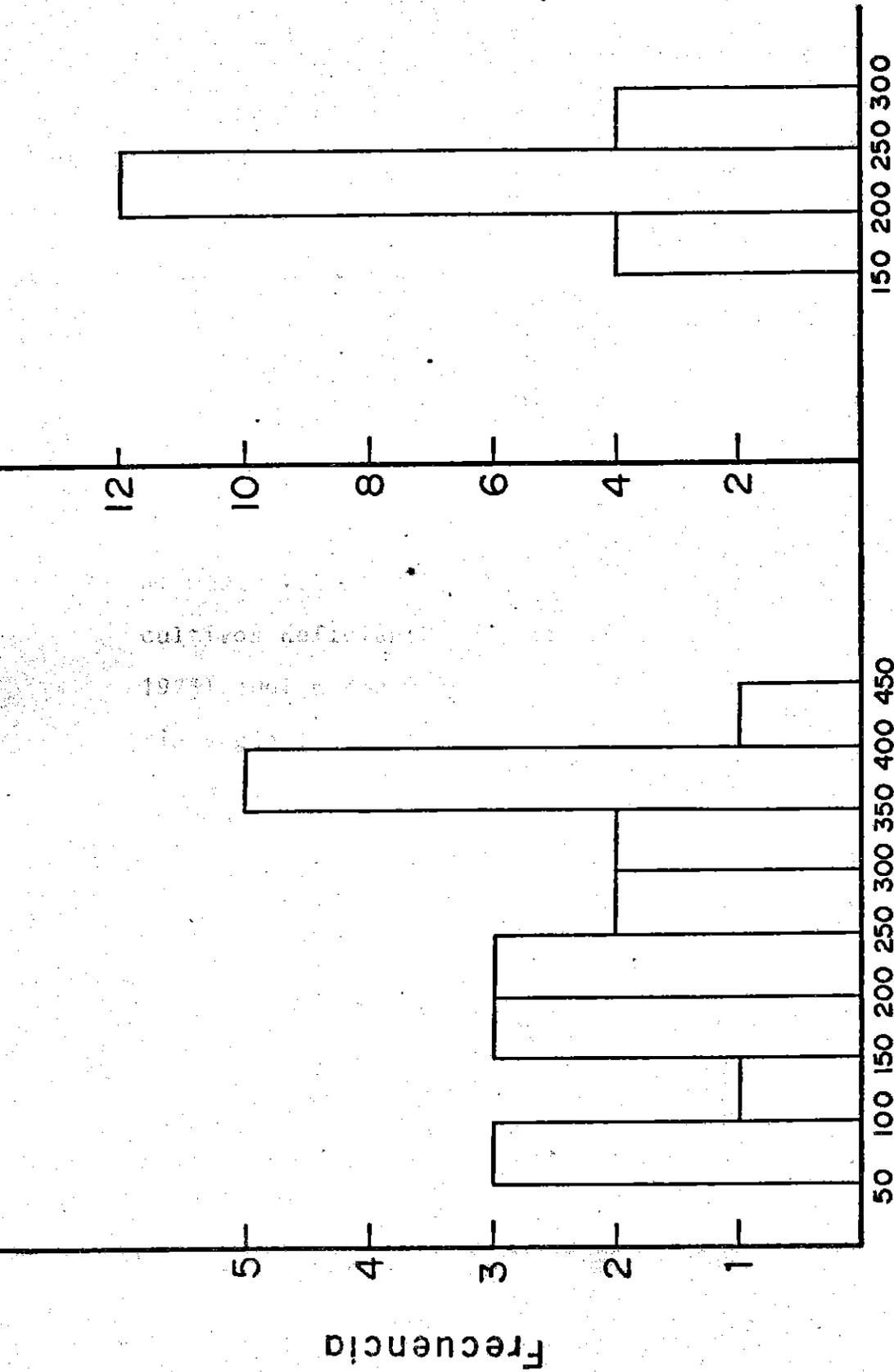
El tamaño promedio de la partícula, tanto para *Spirulina* como *Anabaena* fue semejante; 263 Å para la primera y 267 Å para la segunda lo cual se observa en los histogramas presentados en la fig. 11. La heterogeneidad en el cultivo de *Spirulina*, resalta, no así *Anabaena*, crecida en condiciones controladas de laboratorio en que se manifiesta apreciable homogeneidad.

Algunas fotografías de tinción negativa de la fracción donde se concentró el complejo aislado, manifestaron que la forma de la partícula era casi esférica, con un diámetro de unos 250 Å, apreciando ciertas zonas aplanadas que pueden sugerir la zona de unión a la lamela.

Tomando en cuenta los reportes de Scott y Berns (1965) que cita que las moléculas de ficocianina tiene forma de disco y un diámetro de 120 Å y 60 Å para el eje menor y hasta ha dado dimensiones de 120 x 30 Å, así como los datos de Glazer (1977) que señala que los cristales de aloficocianina se agrupan como monedas de 30 x 120 Å, un ficobilisoma de las dimensiones descritas agruparía teóricamente, en una primera aproximación 27 moléculas de ficobiliproteínas, asumiendo que los ficobilisomas son esféricos y que las unidades son cilíndricas de las dimensiones dadas y que no hay espacios vacíos en él.

Un método tentativo en el acomodamiento de las ficobilinas tomando en consideración la forma de disco, tomaría re-

Figura 11. Medición de la frecuencia con que se presentaron ficobilisomas con el eje mayor de las dimensiones dadas en angstroms. El esquema "A" corresponde a *Spirulina* y el "B" a *Anabaena*.



Histogramas que manifiestan la proporción de ficobilisomas de S. maxima y Anabaena sp.

ferencia del modelo propuesto por Gantt (1976b) y la regla empírica que señala Lemasson (1973) sosteniendo una proporción de 10% o menos para la aloficocianina en cianofíceas, aunque la proporción de AFC para *Nostoc sp* que reportan Zilinskas y col. (1978) es de 30% cuando se crece en luz blanca fluorescente. Este modelo indica entre 22 y 28 moléculas totales con un 10% aproximado de AFC y el restante de FC.

La proporción de los ficobilisomas en un cultivo, se ve influenciada por la cantidad de nitratos suplementados al medio, tales ficobilinas disminuyen hasta desaparecer en cultivos deficientes de este nutriente. (Lemasson y col. 1973). Del mismo modo, la proporción de los componentes varía según la intensidad y la distribución energética de la radiación incidente (Bogorad 1975, Glazer 1977).

En las condiciones naturales del cultivo estudiado de *Spirulina maxima*, se observó la presencia de ficobilisomas, si bien no de la manera conspicua que se hace presente en el cultivo comparativo de *Anabaena sp*.

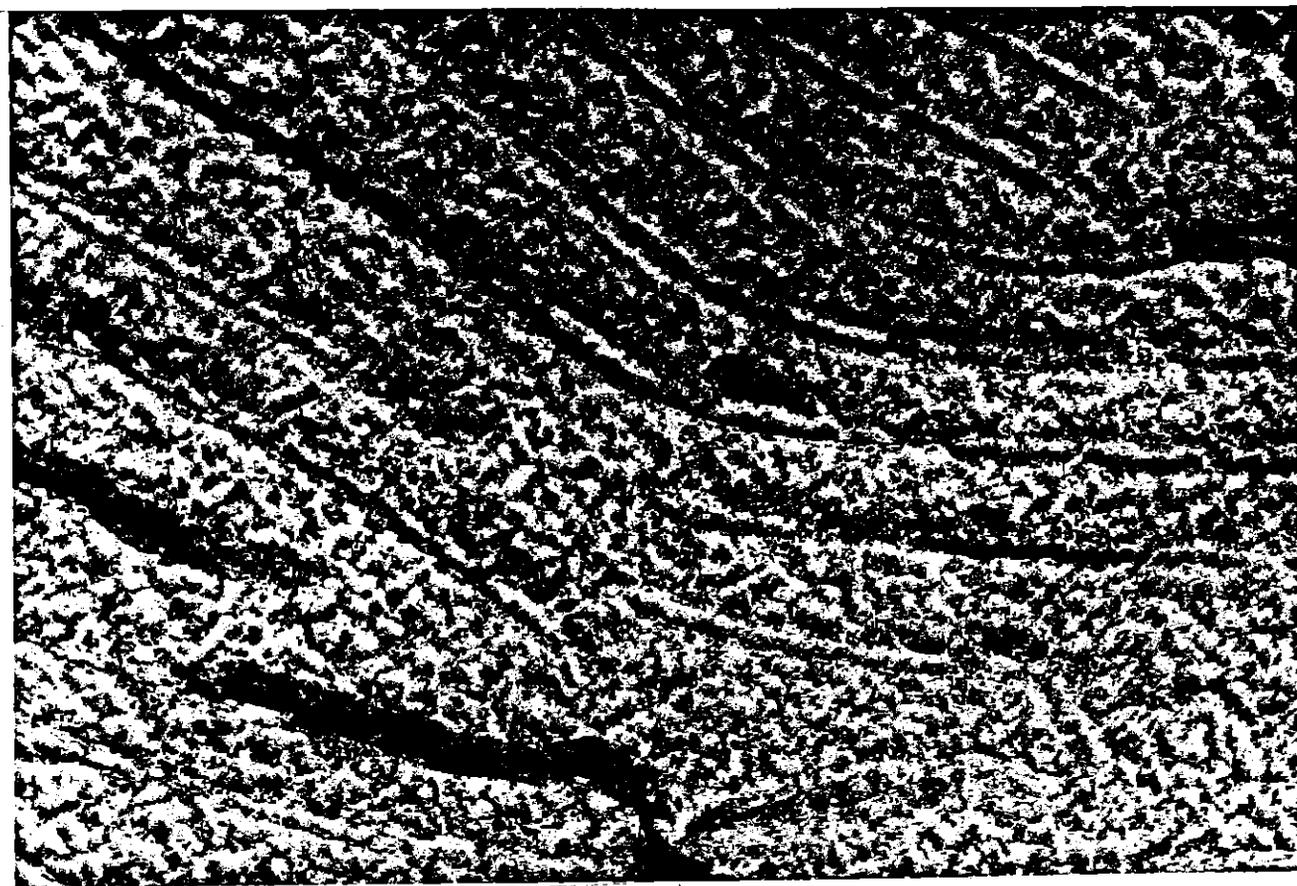
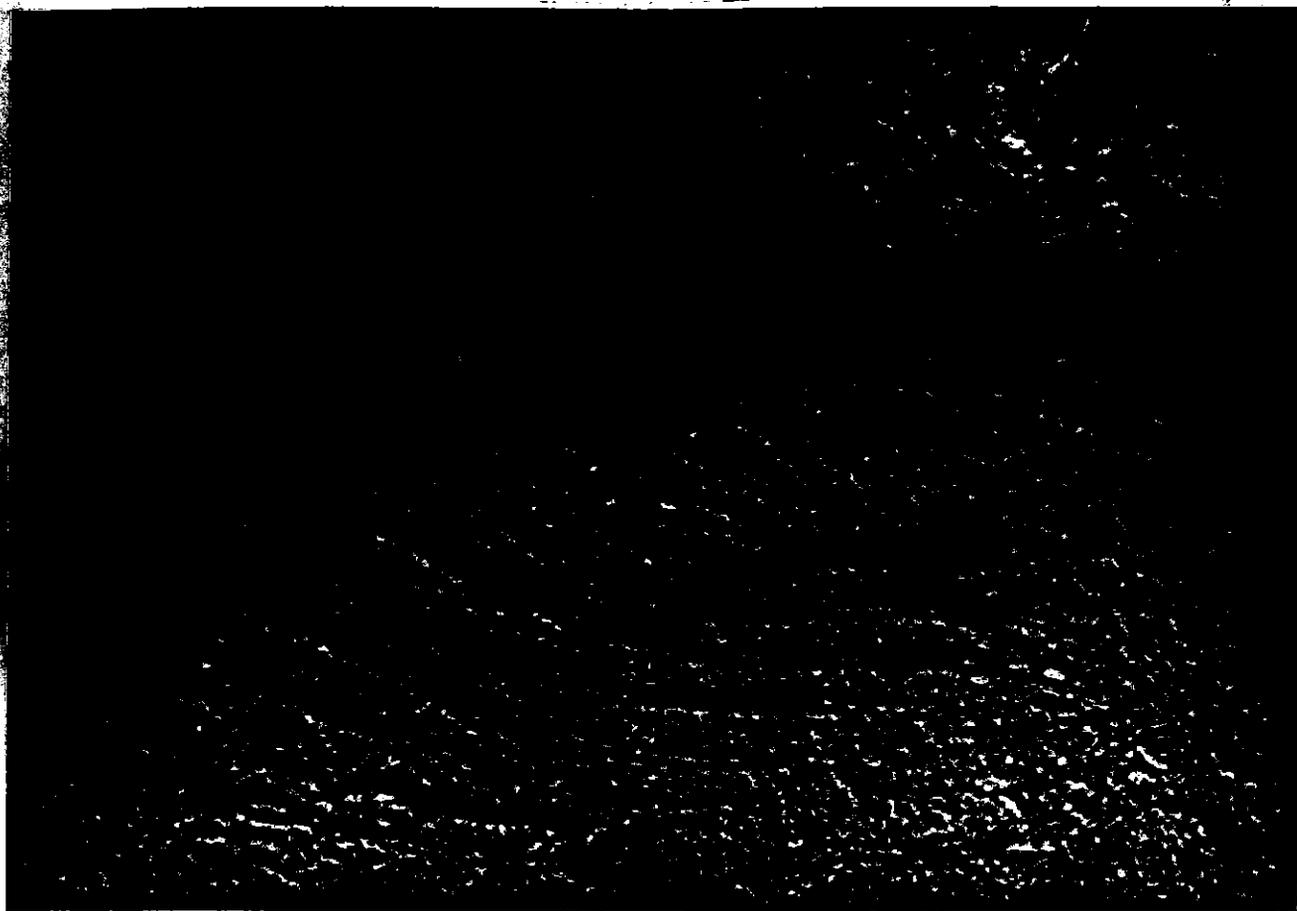
### Criograbado

Las fotografías presentadas en la fig. 12 corresponden a imágenes de criograbado de membranas tilacoidales que no han sido congeladas con anterioridad al tratamiento propio del grabado en frío (A) y se compara esta fotografía con la imagen de otras membranas que han sido congeladas en nitró-

Figura 12. Criograbado de una muestra de membranas tilacoidales de *Spirulina maxima*.

A. Membranas intactas sin congelación previa al tratamiento de observación. Amplificación 76000 X.

B. Criograbado proveniente de una muestra congelada previamente al tratamiento que no muestra ficobilisomas. La amplificación es de 160000 X.



geno líquido y luego mantenidas a 4°C durante 12 horas, previamente al tratamiento del proceso de criograbado (B).

Aunque la segunda fotografía tiene una amplificación mayor que la primera, no se aprecia algún arreglo de partículas o depresiones periódicas que sugiera la presencia de ficobilisomas. En la fotografía A, abajo a la izquierda, se observan partículas en disposición regular congruente a la separación observada en las inclusiones anteriores.

Se puede decir que el ensamble de las ficobilinas para formar el ficobilisoma es un proceso complejo donde posiblemente estén involucrados otros polipéptidos aparte de los que estructural y funcionalmente se enuncian; la obtención de 4 a 8 bandas de polipéptidos lograda en electroforesis con dodecil sulfato de sodio por Tandeau de Marsac (1977) sugiere tal implicación. Además algunos de estos péptidos los localiza también en fracciones membranales y él sugiere si algunos de ellos son componentes de la membrana que participen en la unión al ficobilisoma.

Los trabajos de Lefort-Tran y col. (1973), Glazer (1977) y Wollman (1979) sobre ficobilisomas y las imágenes de criograbado en las membranas que los contienen, han ofrecido resultados de complementareidad entre las partículas de la cara de la fractura exoplásmica y los de la cara de fractura protoplásmica. Señalan que la disposición de los ficobilisomas en la zona externa del tilacoide tiene relación con otra organización particular homóloga, no menos estricta. Suponen que las

partículas de la fractura exoplásmica EF serían estructuras asociadas a los ficobilisomas pudiendo ser unidades con clorofila del  $PS_{II}$  y que sean zonas de contacto como lo muestra el modelo presentado en la fig. 3.

Lefort-Tran propone un modelo de la organización de los tilacoides con el acomodamiento de los ficobilisomas en orden a las partículas descritas, el cual presenta fundamentación y congruencia experimental donde los ficobilisomas estarían localizados sobre las partículas EF que tienen una separación entre ellas exactamente igual que la registrada en los ficobilisomas o bien en la otra zona que le es complementaria a la primera.

Además, E. y Branton (1974) han estudiado que ciertas proteínas periféricas (en este caso serían los FBS) cuando están unidos a proteínas integrales (en el caso EF) inducen en éstas un estado de agregación.

En algún caso, en muestras congeladas, la imagen del criograbado presentó una granulación semejante a las partículas connotadas como EF de la fractura exoplásmica que bien pueden estar relacionadas con estas imágenes.

#### Ficobilisomas

Los datos de la literatura concuerdan con que los pigmentos auxiliares en las algas cianofíceas y rodofíceas se

localizan en complejos multiprotéicos llamados ficobilisomas que a su vez se arreglan periódicamente sobre la membrana tilacoidal. (Gantt 1966a, Glazer 1977).

#### A. Aislamiento de los ficobilisomas

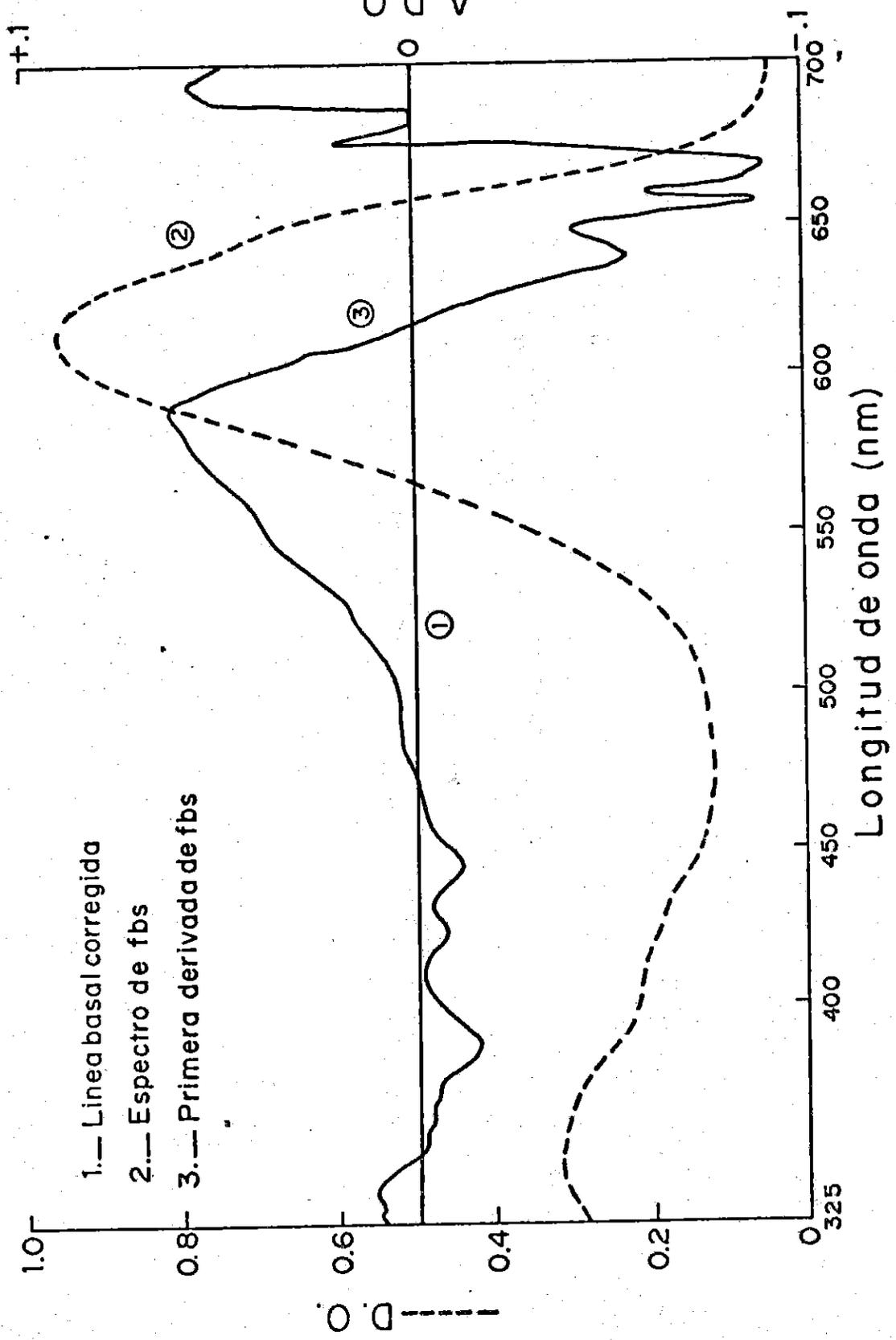
Se aislaron estos complejos según el procedimiento reportado en Métodos y Materiales.

La centrifugación de las membranas disueltas con detergente que contienen los pigmentos auxiliares ponen de manifiesto un residuo azul. Cuando se analizó por espectroscopía de absorción se obtuvo un registro como el señalado en la fig. 13. Se aprecia un pico a 620 nm y un hombro a 650 nm; la primera derivada corrobora estas señales a las mismas longitudes de onda. La respuesta de absorción no revela presencia de clorofila a 675 nm aunque la primera derivada sí manifiesta algún indicio de componentes en esta zona.

Después de centrifugar a 270000  $\times$  g se obtuvieron zonas perfectamente claras que se describen a continuación y se esquematizan en la fig. 14:

a) una banda azul brillante con la migración mayor, localizada a una concentración de sacarosa de 24% o sea 0.77 M. Cuando se empleó un gradiente discontinuo de sacarosa, esa banda se localizó en la interfase 1 M-0.75 M.

Figura 13. Espectro de absorción y primera derivada de ficobilisomas obtenidos previamente a su purificación. En los dos trazos se ven señales a 620 (FC) y 650 (AFC). La señal de la clorofila en 675 sólo es captada en la primera derivada.  $\Delta\lambda$  empleado para la derivada: 2 nm.



b) en la parte media del tubo se localizó una banda azul pálido (10-18% de sacarosa). Tal fracción se analizó por espectroscopía de absorción y fluorescencia identificando solamente agragados de ficocianina lo cual significa que los pigmentos menos asociados, por su menor tamaño, no se desplazan a lo largo del gradiente y se define bien la separación del material asociado del no asociado.

c) en la parte superior a 10% de sacarosa una banda verdosa que identifica predominantemente clorofila y también carotenos.

#### B) Identificación espectroscópica del ficobilisoma

La fracción aislada de la banda "a" se analizó por espectroscopía de absorción y fluorescencia y se refiere en la figura 15.

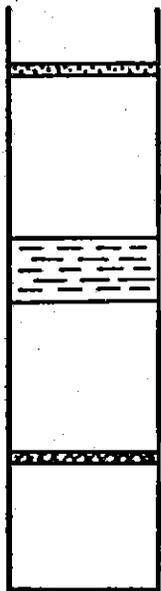
#### Espectro de absorción del ficobilisoma

El trazo de absorción indica dos componetes: ficocianina con un máximo a 620 nm y aloficocianina con el hombro a 650 nm. No se aprecia ninguna señal de la cual sea responsable la clorofila.

#### Fluorescencia del ficobilisoma

El espectro de fluorescencia fue tomado con una celda de 0.1 cm de diámetro interno o con aditamento de fluorescencia de frente para evitar o reducir el efecto de autoabsorción (Gilbault 1973) que se presenta con muestras concentradas y celdas ordinarias de 1 cm de paso de luz.

Figura 14. Esquema de las bandas observadas en al centrifugación de ficobilisomas a 270000 x g en un gradiente continuo de sacarosa 0.25 M a 1.0 M en amortiguador de fosfatos 0.75 M pH 7.0. A las concentraciones indicadas se obtienen tres bandas que identifican clorofila, agregados de ficocianina y ficobilisomas en sentido de arriba hacia abajo respectivamente.

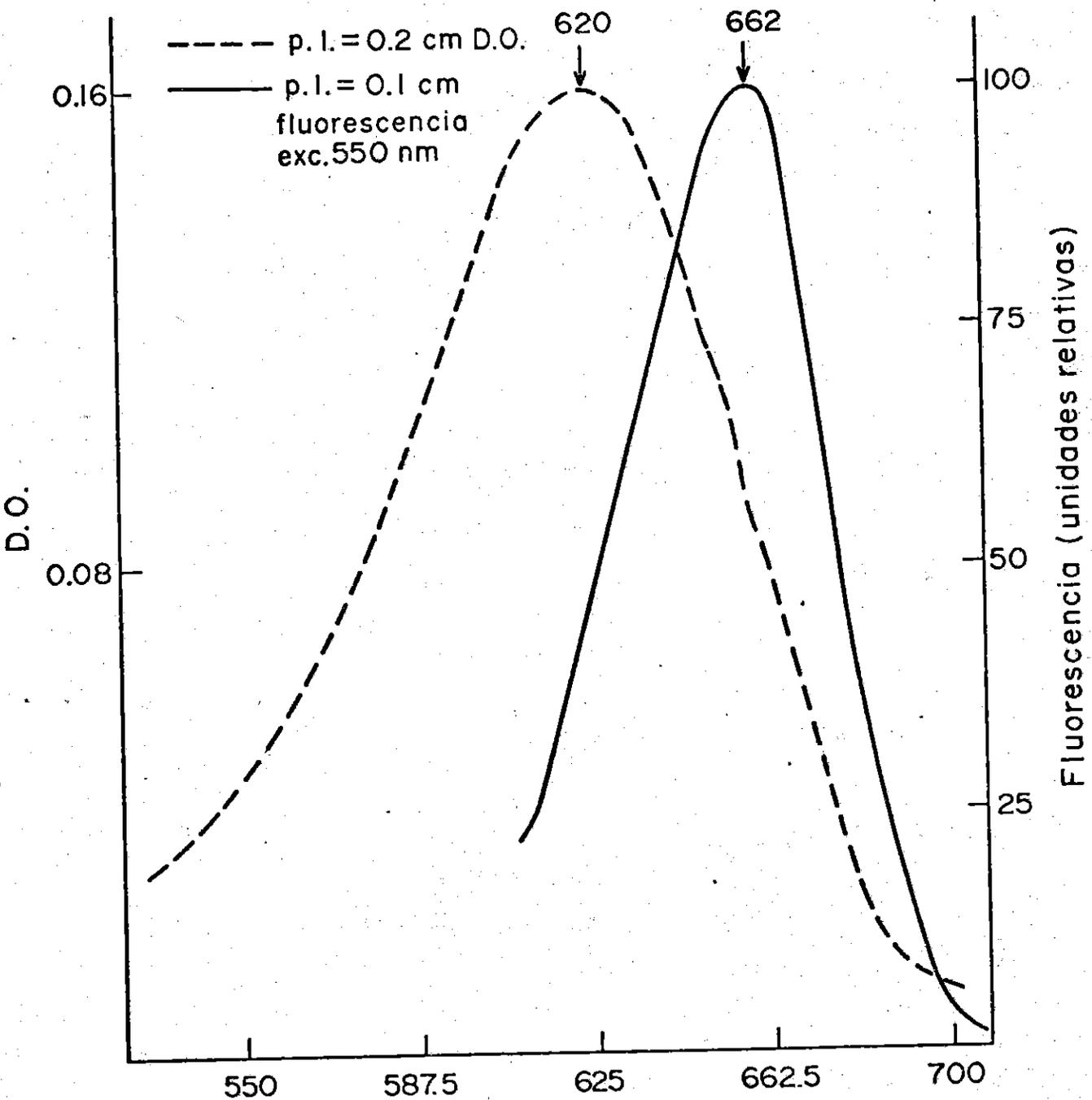


← Zona verdosa (10 % de sacarosa)

← Zona azul p<sup>á</sup>lida (18 % de sacarosa)

← Banda azul brillante (24 % de sacarosa)

Figura 15. El espectro de absorción de ficobilisomas muestra un pico en 620 nm (FC) y un hombro a 650 nm (AFC) ---. El trazo de fluorescencia manifiesta un máximo en 662 nm valor que indica la fluorescencia de la AFC, ———.



Espectro de absorción y fluorescencia en ficobilisomas

Dicho espectro manifiesta un valor máximo de 662 nm, del cual es responsable la AFC o sea el componente de menor estado energético.

Este dato concuerda con la ausencia de clorofila, pues en caso de estar presente y acoplada, el valor de emisión registraría señal de 685 nm, lo cual no se marca.

C) Coeficiente de sedimentación de los ficobilisomas  
La figura 16 muestra la separación de ficobilisomas en un gradiente lineal de sacarosa de 0.25 M a 1 M, a partir de 1 ml de muestra con una concentración aproximada de 1.5 unidades de densidad óptica a 620 nm.

La muestra se corrió a 39000 rpm durante 6 horas en un rotor SW 41 a 20°C. Se recolectaron alícuotas de 0.85 ml desde la parte superior hasta el fondo y se midió la concentración de sacarosa por refractometría y su absorbancia a 620 nm. Se usó el método ya referido para estimar el coeficiente de sedimentación  $S_{20, w}$  con los datos siguientes:

$$Z_1 = 8.64 \%$$

$$Z_2 = 30.33 \%$$

$$r_1 = 6.63 \text{ cm}$$

$$r_2 = 15.23 \text{ cm}$$

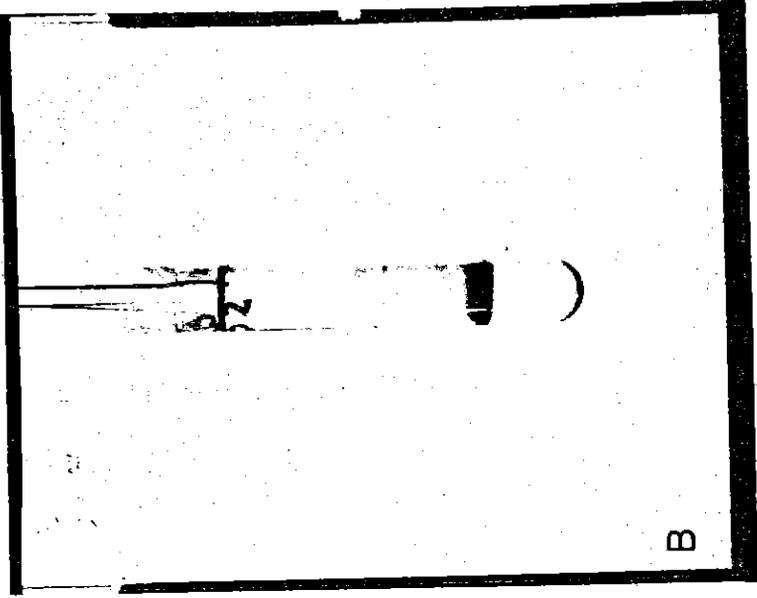
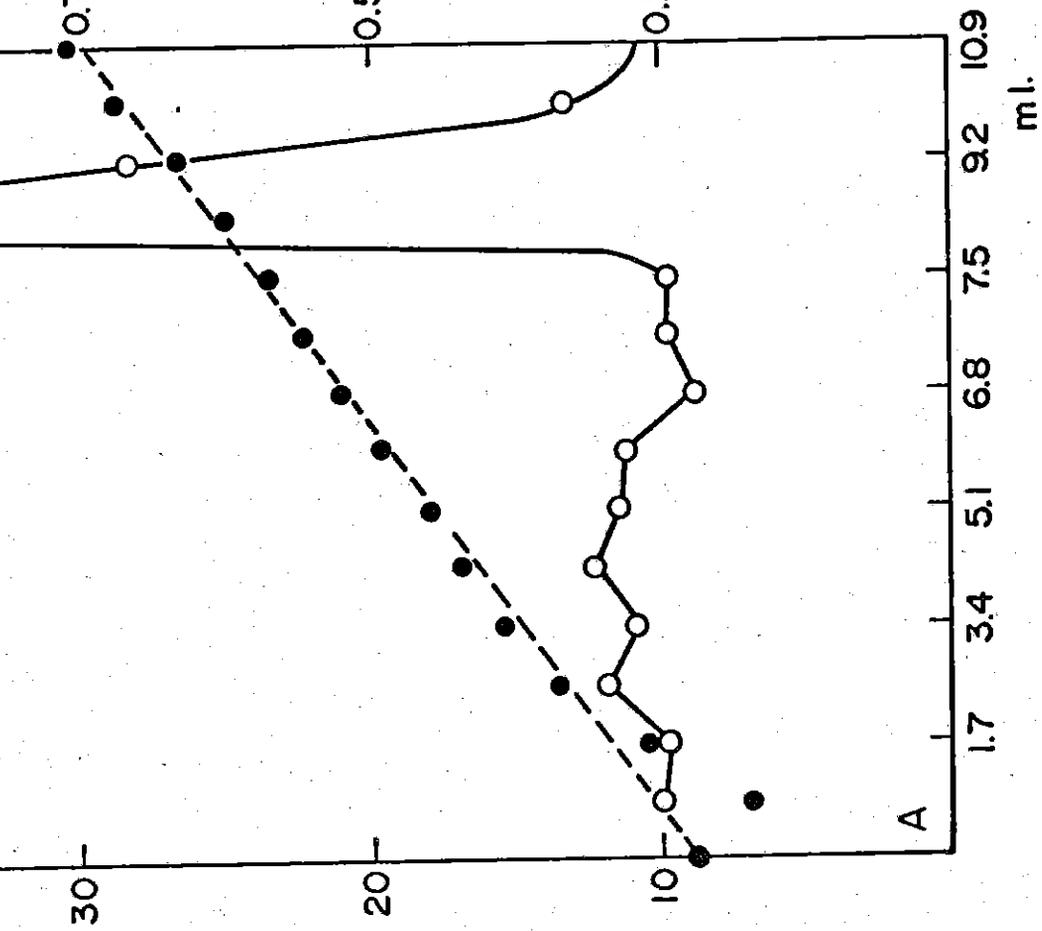
empleando la fórmula descrita en Materiales y Métodos. Se obtuvo el valor  $Z_0$  de - 8.08; empleando un dato de 1.3 como

Figura 16. A. Coeficiente de sedimentación en muestra de fibrotilisomas aislados en un gradiente de sacarosa en amortiguador de fosfatos 0.75 M durante 6 horas a 39000 rpm en un rotor SW 41 a 20°C. Los valores de concentración de sacarosa (o-o-o) se midieron por refractometría.

B. Imagen de la banda obtenida en la misma centrifugación.

sw,20 de ficobilisomas

% de sacarosa p/p



D.O. 620 nm

0.75  
0.5  
0.25

A

como densidad de este material protéico y 20°C de temperatura para encontrar  $\Delta I$  en las tablas con el valor  $I_b - I_m$  de 25-8 que fue 2.3904 - 0.8302 resultado que dió 1.5602 y el valor del integrador de  $5.2664 \times 10^{11}$  segundos.

$$s_{20,w} = \frac{\Delta I}{\omega^2 t} = \frac{1.5602}{5.2664 \times 10^{11}} = 29.6 \times 10^{-13} \text{ seg.} = 29.6$$

La desviación estándar que se obtuvo en los diferentes experimentos realizados fue de  $\pm 4$  por lo que el valor  $s_{20,w}$  es de  $29.6 \pm 4$  por lo que el valor  $s_{20,w}$  es de  $29.6 \pm 4$  svedbergs.

D) Estimación del peso molecular del ficobilisoma

El coeficiente de sedimentación es un dato en relación con el peso molecular de acuerdo a la forma y al grado de hidratación de la molécula.

Van Holde (1971) señala estos valores S a 20°C:

polimetil metacrilato con P.M. de 1 420 000	S = 48.5
Ribosomas de <i>E. Coli</i>	900 000      30
Ureasa (Lehninger 1977)	482 700      18.6
Albúmina serobovina	66 500      5. 01

Lo que significa que si el complejo se considera esférico y no está hidratado, con una razón axial cercana a 1, el peso molecular aproximado del agregado molecular sería alrededor de 900 000 daltones.

## E) Integridad funcional del ficobilisoma

La integridad funcional de los ficobilisomas puede medirse por espectros de fluorescencia del aceptor, método que permite conocer la transferencia de energía de un donador a un aceptor y es un reflejo del grado de acoplamiento del sistema.

En el proceso fotosintético se transmite energía luminosa de longitud de onda de mayor energía (620-650 nm) hasta la clorofila del PS<sub>II</sub> (685 nm) (Stryer 1967, 1978; Colbow 1973; Gantt 1973; Ley y Butler 1976).

Se ha reportado por muchos autores (Förster 1960, Knox 1975, Ley y Butler 1977) que la naturaleza de la transferencia de energía es de resonancia dipolo-dipolo.

Este tipo de resonancia consiste en que el estado basal del sistema molecular de la ficocianina a nivel de sistemas electrónicos  $\Pi$  o  $n$  de los cromóforos de la ficocianina, es decir de la ficocianobilina son excitados a  $\Pi^*$  por fotones de cierta energía  $h\nu$  (620 nm), luego se desexcita y antes de fluorescer esta energía es reabsorbida por la aloficocianina (650 nm) para seguir transfiriéndose a la AFC B con absorción máxima a 672 nm y ésta a su vez donarla a la clorofila a del PSII que comienza la respuesta fotoquímica.

La teoría de Förster sobre la resonancia analiza los factores que intervienen en este proceso.

$$E = \frac{r^{-6}}{(r^{-6} + R_0^{-6})}$$

donde  $r$  es la distancia entre los cromóforos del donador y del aceptor y  $R_0$  es la distancia a la cual se tiene el 50% de eficiencia. Este valor está

dado por:

$$R_0 = (JK^2Q_0n^{-4})^{1/6} \times 9.7 \times 10^3 \text{ \AA}$$

donde

J = integral de la sobreposición del espectro de fluorescencia del donador con el espectro de absorción del aceptor.

$Q_0$  = rendimiento cuántico de la fluorescencia del donador de energía sin transferencia.

$K^2$  = factor de orientación para la interacción dipolo-dipolo.

n = índice de refracción del medio.

Por lo tanto, es de señalarse que las condiciones para que este proceso se verifique son:

a) cercanía entre los cromóforos, b) la relación de frecuencias de niveles vibracionales y de relajación de los componentes involucrados, dato que se refleja en la sobreposición de los espectros de fluorescencia del donador y de absorción del aceptor y c) la orientación de esos cromóforos.

La estrategia experimental para utilizar esta medición consiste en tener esas condiciones en el sistema de estudio, las cuales se reflejan en que i) las entidades implicadas en el proceso tiene características espectroscópicas diferentes, ii) el donador y el aceptor son fluorescentes, iii) existe sobreposición de los espectros antes citados.

### Mediciones experimentales:

Una forma de medir la transferencia de energía es mediante los espectros de emisión de fluorescencia y otra por los espectros de excitación del aceptor.

Para los primeros se excita a una  $\lambda$  hacia el azul donde el espectro de absorción registre una zona de sensibilidad a la excitación; si existe transferencia de esa excitación, se manifestará como la fluorescencia del componente que tiene un estado energético menor.

La otra manera es con el espectro de excitación del aceptor fijando la  $\lambda$  de la máxima fluorescencia. A tal longitud de onda, ese espectro está relacionado con los coeficientes de extinción del donador y del aceptor y con la eficiencia de la transferencia de modo que cuando hay 100% de transferencia el espectro de excitación corresponde a la suma de los espectros de absorción de los dos cromóforos y en ausencia de la transferencia el espectro de excitación es idéntico al espectro de absorción del aceptor (Stryer y col. 1967). De este modo, al tener muestras de ficobilisomas y tomar su espectro de emisión en una microcelda de 0.1 cm de paso de luz o con el aditamento de fluorescencia de frente para evitar la autoabsorción, se encontraron los siguientes resultados:

### Espectros de emisión de fluorescencia

Cuando se excita a 590 nm, que corresponde a un pequeño hombro en la absorbencia de la FC que en este sistema es el

donador, se obtuvo fluorescencia a 662 nm, valor que identifica a la AFC; no se encontraron resultados más altos aún con muestras más concentradas, como los que han reportado los trabajos de Gyzi y col. 1974, Gantt y col. 1976b, Brown y col. 1975, 1977, los cuales señalan aloficocianina más eficiente o en estado de agregación tal, que optimiza el fenómeno de transferencia de energía pues su emisión de fluorescencia de 672-675, es un puente entre la AFC ordinaria que fluoresce en 660-662 y la clorofila de la membrana que lo hace en 685 nm.

#### Limitaciones en la transferencia de energía:

El dato encontrado manifiesta una aloficocianina presente en tan baja proporción que no fuese detectada, o que la proporción de FC sea tan alta que enmascare o desplace la respuesta neta hacia el 640, o que esté debilmente acoplada o una tercera alternativa es que en *Spirulina maxima* no se encuentren tipos de aloficocianina que absorban y emitan tan cerca del rojo como se ha reportado, sin embargo esta última posibilidad no permitiría explicar la eficiencia cuántica fotoquímica cuando se ilumina a la *Spirulina in vivo*.

#### Espectros de excitación

En los espectros de excitación recogidos a 675 nm se obtuvieron las señales de absorción de 590 y 620 de los que

es responsable de la FC y otra señal a 650 a la cual responde la AFC.

De este modo se deduce que hay una interacción de excitación y relajación electrónica entre las moléculas que tienen entre sí una distancia menor de 60 Å (Stryer, 1978) por tanto, se presume la asociación de estos componentes protéicos. *In vivo*, la secuencia de transferencia abarca desde la FC hasta la clorofila del PSII. (Tel-Or y Malkin 1977). En el ficobilisoma extraído de *Spirulina maxima* la transferencia se observó de la FC a la AFC emisora a 662 nm evidenciando un acoplamiento entre estas moléculas.

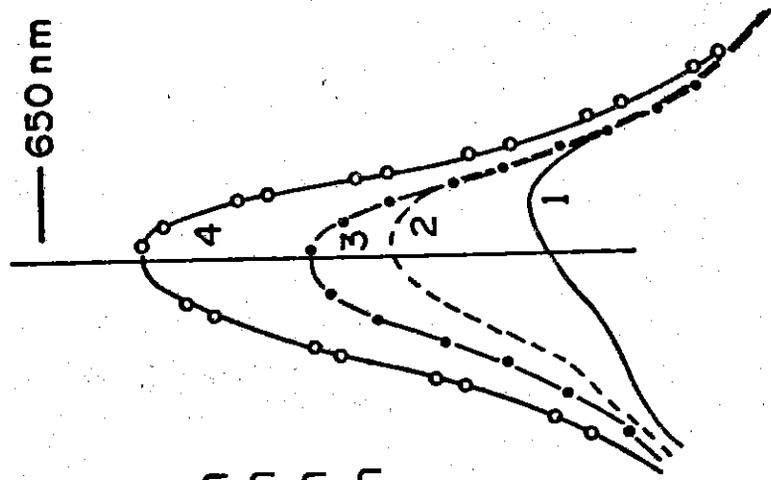
#### Disociación de ficobilisomas

Así como los espectros de fluorescencia son índice de la asociación de un sistema, también pueden reflejar una disociación del mismo.

##### a) Por descenso de temperatura:

Cuando se indujo la disociación del ficobilisoma sometándolo a descenso de temperatura, el espectro de fluorescencia relatado en la fig 15, manifestó, en función del tiempo, que el pico de la AFC se corría hacia el azul, al mismo tiempo fue aumentando la intensidad de esa fluorescencia; al cabo de 25 horas observadas se notó un desplazamiento de 10 nm y un aumento en la intensidad de 2.6 veces; sin duda eso significa la liberación de los componentes; como la FC esta presente de manera mayoritaria, al pasar el tiempo se manifestó la fluorescencia de la misma como se indica en la figura 17.

Figura 17. El efecto del descenso de temperatura sobre la asociación de ficobilisomas se manifiesta como un corrimiento de la fluorescencia hacia el azul y aumento de la misma en función del tiempo.



- 1 basal 660 nm
- 2 2 hrs 653 nm
- 3 13 hrs 651 nm
- 4 25 hrs 650 nm

intensidad de fluorescencia

Disociación de ficobilisomas por el frío en función de tiempo

Se pone en evidencia la disociación de la AFC, lo que afianza la proposición de la participación de enlaces hidrofóbicos en el ficobilisoma a nivel de asociación entre las subunidades de ésta. Cuando Ohad y col. (1980) disocian AFC hasta  $(\alpha_1\beta_1)$  obtienen fluorescencia de 647 nm. También puede pensarse en la disociación entre AFC y FC si se analiza la asimetría del registro de fluorescencia, que señala mayor proporción del pigmento emisor hacia el azul.

b) Por dilución;

La dilución de las muestras también induce la disociación del ficobilisoma; esto fue comprobado, como lo anterior, en muchas ocasiones, en cuyo caso el espectro de fluorescencia obtenido reflejaba mayoritariamente la fluorescencia de la FC o desplazamiento de la fluorescencia de la AFC.

En este caso se observa de manera muy clara la disociación entre la AFC y la FC.

c) Por disminución de fuerza iónica:

Otro agente perturbador de enlace, que es la fuerza iónica baja, se manifestó desacoplando el ficobilisoma.

El amortiguador empleado en el proceso de obtención del agregado fue fosfatos 0.75 M ( $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$ ) pH 7.0; inclusive hay reportes de Gantt (1972) que emplea 0.5 M de igual amortiguador para la obtención de estas estructuras en *P. cruentum*, pero fuerzas iónicas menores actúan disociando el complejo.

Los resultados de fluorescencia a 640 nm indican que la disociación preferente fue entre EC y AFC, lo cual sugiere que las interacciones entre estas dos proteínas involucra zonas de enlaces hidrofóbicos que las mantiene asociadas.

#### Caracterización de pigmentos

Después de haber estudiado la influencia de los pigmentos auxiliares en la fotosíntesis de *Spirulina maxima* mediante el espectro de acción y de haber relacionado su funcionalidad a la asociación de los mismos en el ficobilisoma, se caracterizaron los pigmentos contenidos en el complejo.

#### Disociación de ficobilisomas

Para esto los ficobilisomas obtenidos se disociaron mediante diálisis por una noche en un amortiguador de baja fuerza iónica, en este caso se usó fosfatos 50 mM pH 7.0 a 4°C.

#### Cromatografía en hidroxilapatita

El material dializado y concentrado por membrana de amicon PM-10, se cromatografió en una columna empacada con hidroxilapatita; en la elución de las fracciones se observaron dos bandas azules, la que migró primero siempre fue más intensa y fluorescente que la otra la cual registró un azul pálido.

### Patrón de elución de la ficocianina

El perfil de elución de la cromatografía se muestra en la fig. 18 donde se observan los datos de absorción a 620 nm ya que los datos reportados por diferentes autores, entre otros Glazer (1977) señalan este valor como la longitud de onda a la que tiene su máxima absorción la ficocianina de cianobacterias.

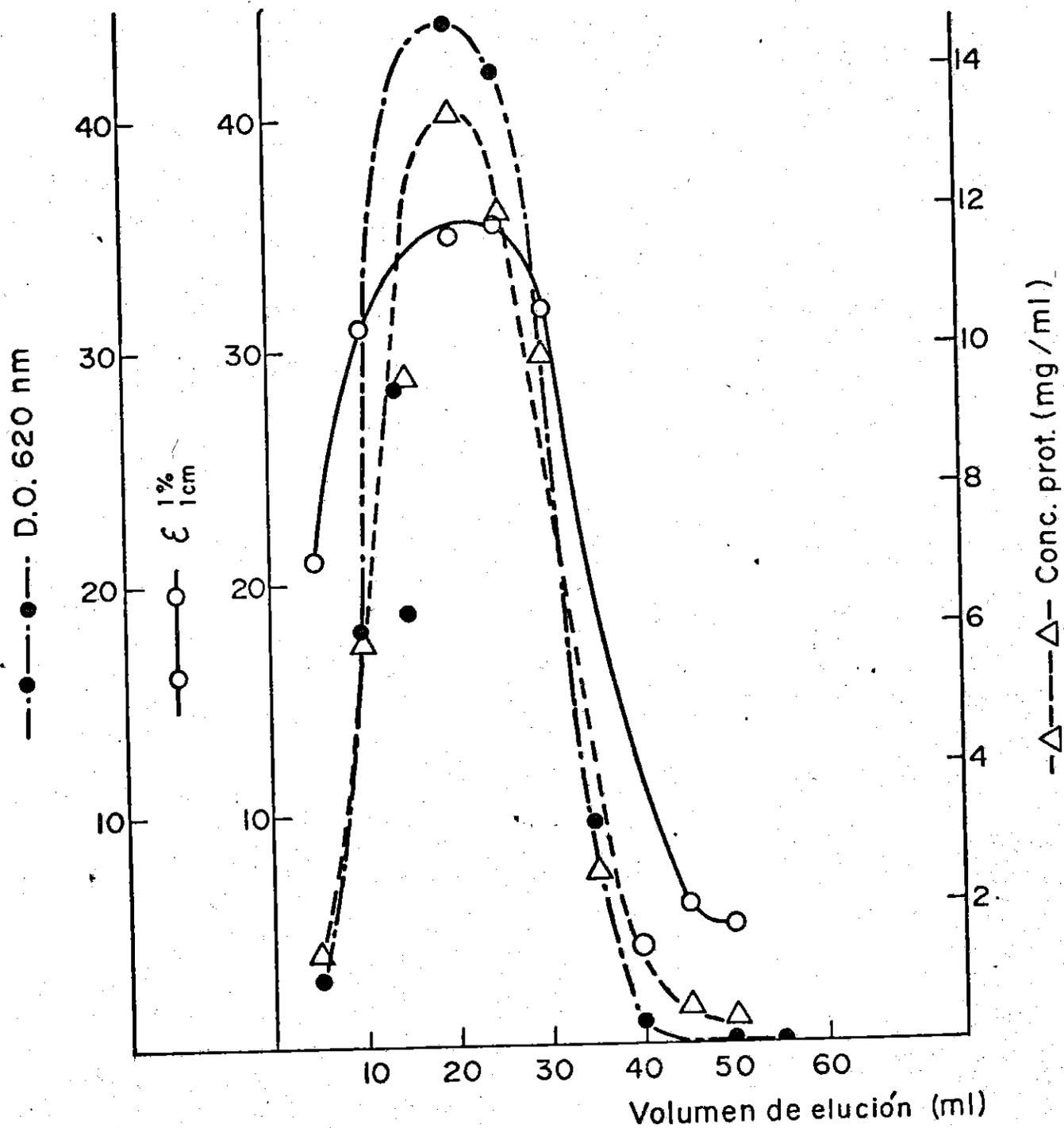
### Criterio de la selección de fracciones

El criterio para seleccionar las mejores fracciones de FC fue relacionar la D.O.<sub>620 nm</sub> entre la concentración de muestra para obtener el máximo coeficiente de extinción porcentual  $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}$  que se pone de manifiesto en la misma figura. Además la relación entre las unidades de densidad óptica a la longitud de onda de los máximos de absorción de los dos componentes, D.O.<sub>620</sub>/D.O.<sub>650</sub> fue óptima (8.16) para la fracción señalada por los otros conceptos. Igual sucedió con la relación de intensidad de fluorescencia a la longitud de onda máxima de los dos componentes: IF 638 nm/I.F. 662 nm (3.7) y como índice complementario se tomó en cuenta la densidad óptica a 280 nm, que señala una banda de absorción genérica para proteínas. Se observó pues, una zona perfectamente delimitada que concreta la presencia de las fracciones más puras.

Figura 18. Perfil de elución de la ficocianina en hidroxilapatita con un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0.

La columna fue cargada con 10 ml de ficobilisomas disociados y concentrados, separándose fracciones de 5 ml. A cada fracción se le midió su densidad óptica a 620 nm ( $\bullet$ ), su concentración de proteína en mg/ml ( $\Delta$ ), su coeficiente de extinción  $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}$  (o) obtenido con celda de 1 cm de paso de luz.

La fracción 4 se manifestó con los mejores resultados.



Coeficiente de extinción  $\epsilon_1^{1\%}$  cm

Este dato se determinó por la relación  $\epsilon = \frac{D.O.}{\text{conc.} \times l}$  empleado una celda de 1 cm de paso de luz y correspondió para la fracción # 4 a  $32.8 \text{ l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Desafortunadamente en esta prueba cromatográfica no se registra un coeficiente mayor de 50, aunque en otros ensayos se obtuvieron valores mejores. Dado que las pruebas de electroforesis manifiestan homogeneidad, se podría atribuir ese resultado relativamente bajo una proporción apreciable de proteína desnaturalizada.

#### Espectro de absorción

A cada una de las fracciones se le tomó su espectro de absorción, señalándose la densidad óptica más alta para la fracción 4 según se observa del perfil citado. El espectro de ficocianina en el rango de 325 a 700 nm se indica en la fig. 19 el cual manifiesta una banda de máxima absorción a 617 nm y un ligero hombro a 590 nm. La zona del ultravioleta entre 340 y 360 nm indica también una señal como una zona de menor absorción.

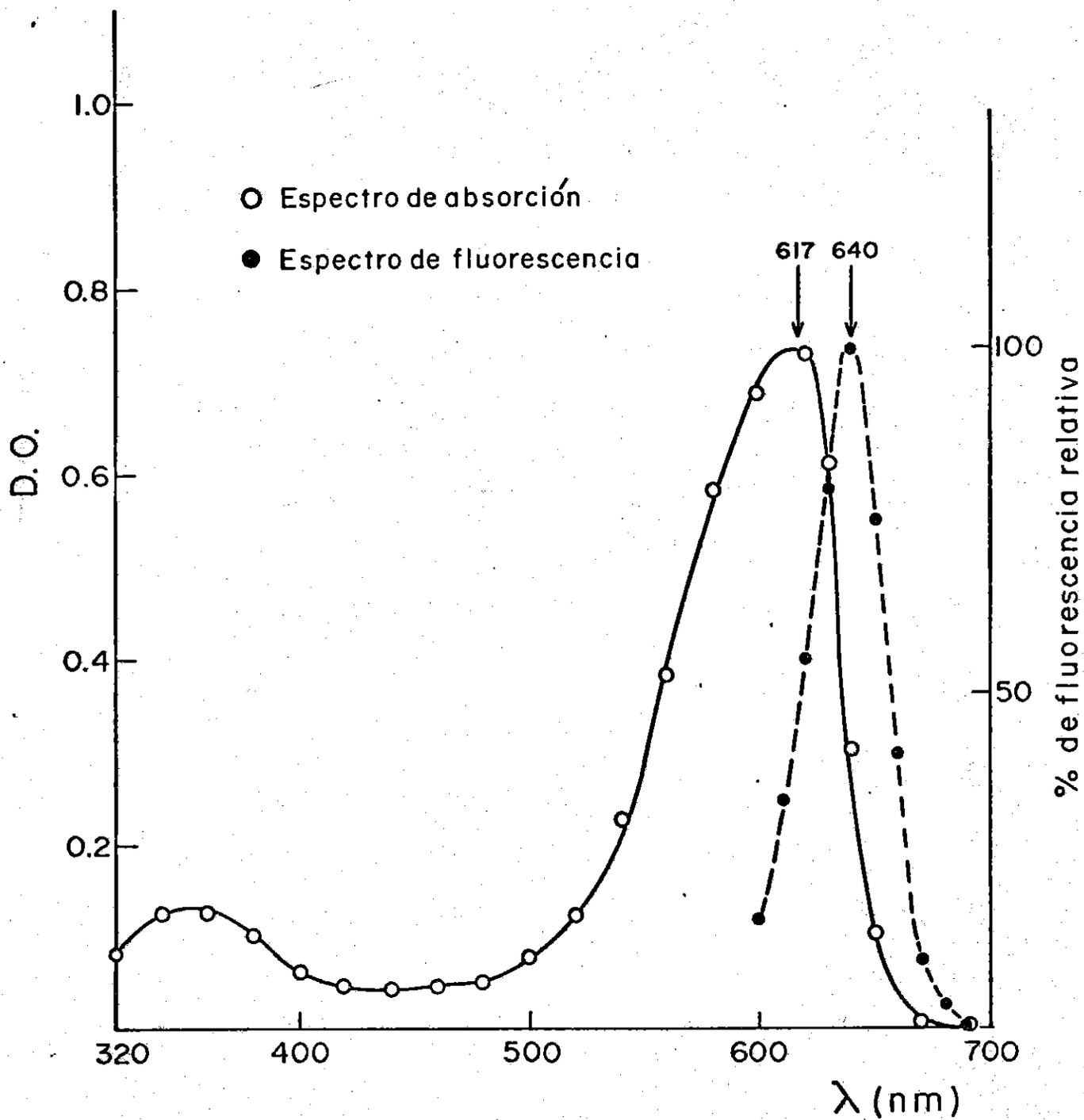
Curiosamente, el máximo obtenido en este caso es 617 nm a diferencia que en todos los otros casos se tuvo 620 nm y esta variación puede ser congruente con la desnaturalización sugerida por el bajo coeficiente de extinción, donde la pérdida de la conformación nativa modifica la presencia o interacción de los cromóforos responsables de la absorción de luz.

Esta respuesta de desplazamiento hacia el azul puede

Figura 19. Espectros de absorción y de fluorescencia de ficocianina obtenida por cromatografía en hidroxilapatita.

1. Espectro de absorción de la muestra correspondiente a la fracción 4 con una concentración de 13.4 mg/ml diluída 1:60 en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 y paso de luz de 1 cm.

2. Espectro de fluorescencia con aditamento de fluorescencia de frente a la muestra directa en el mismo amortiguador.  $\lambda$  excitación: 550 nm.



deberse a cierta disociación entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la FC pues Glazer y Fang (1973b) ya lo habían observado en sus experimentos de disociación y reconstitución y Gantt (1975) propone dos constantes de disociación al manifestarse dos comportamientos en los fenómenos de desagregación.

Se puede hacer una proposición aún más fina de acuerdo a los trabajos de Dale y Teale (1970) que dan evidencia de dos tipos ambientales para estos cromóforos, unos fluorescentes que tienen más libertad de movimiento porque están expuestos y otros casi inaccesibles, sensibilizadores.

Cabe pues, la posibilidad que los fenómenos de disociación de la FC afecten la orientación y distancias entre un tipo y otro de cromóforos y la respuesta espectroscópica sea, por tanto, diferente.

#### Espectro de fluorescencia

Esa misma fracción fué analizada al espectrofluorómetro con una longitud de onda de excitación de 550 nm con el fin de dar fotones energizados de tal  $h\nu$  que sean aprovechados en grado máximo por los niveles electrónicos capaces de excitarse y de relajarse por fluorescencia.

Se empleo el aditamento de fluorescencia de frente para reducir los efectos de autoabsorción y la señal de máxima fluorescencia se localizó a 640 nm, siendo la concentración de la muestra de 13.4 mg/ml.

### Coefficiente de sedimentación

La fracción de FC cromatográficamente pura, con una concentración de 13.4 mg/ml se sometió a centrifugación en gradiente lineal de sacarosa de 0.15 a 0.8 M en amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.0 durante 18 horas a 20°C y se obtuvo un valor en el integrador de  $9.2138 \times 10^{11}$  seg.

Con los siguientes datos:

$$Z_1 = 3.4 \% \text{ p/p de sacarosa}$$

$$Z_2 = 23.2 \% \text{ p/p de sacarosa}$$

$$r_1 = 6.63 \text{ cm}$$

$$r_2 = 15.23 \text{ cm}$$

se calculó una  $Z_0$  como se relató en Materiales y Métodos dando una cifra de -11.86. La diferencia  $I_b - I_m$  fue de 10.6-3.4 y se encontró en tablas un  $\Delta I$  de 0.7693- 0.2245 = 0.5349,

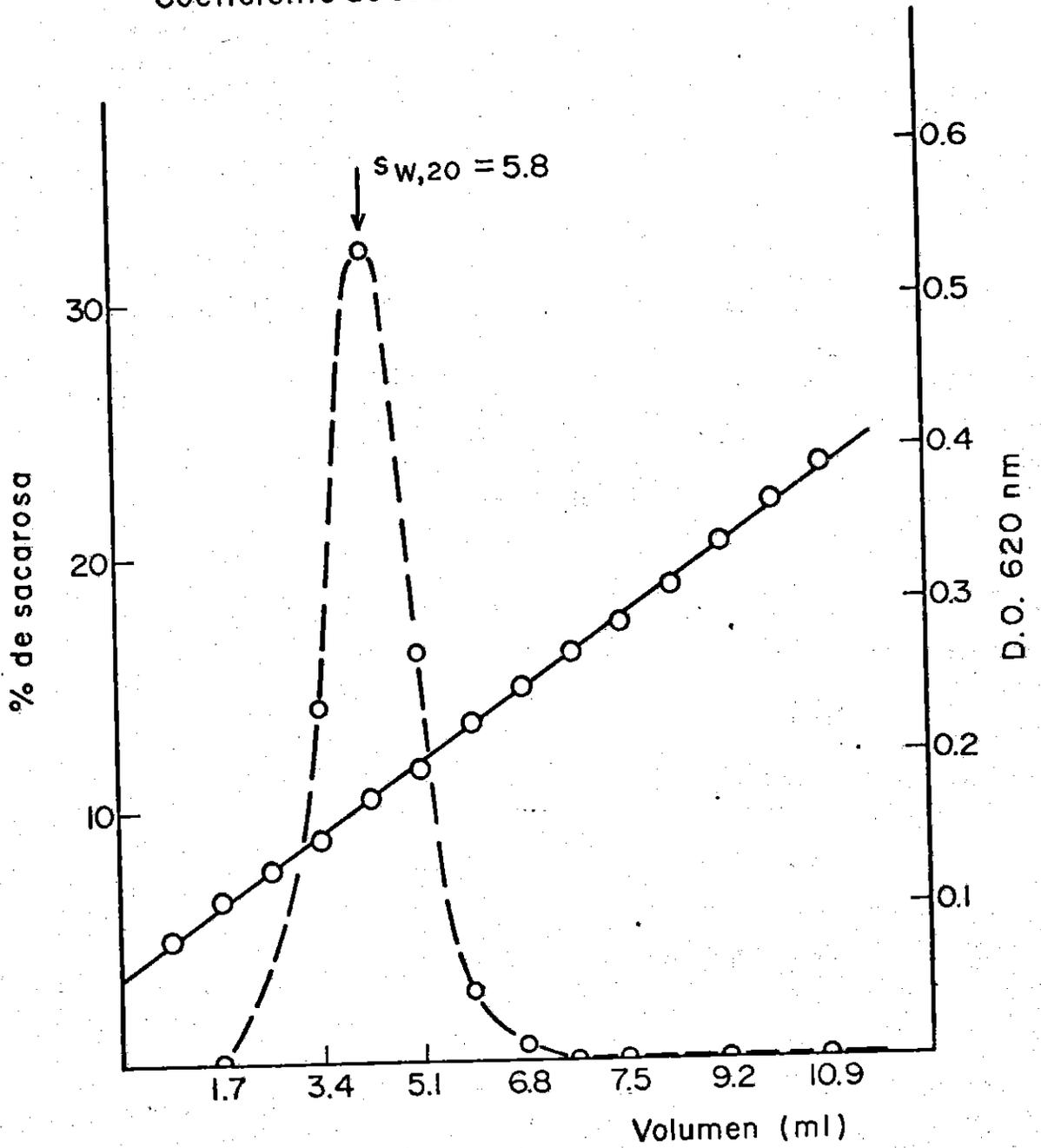
$$s_{20,w} = \frac{\Delta I}{\omega^2 t} = \frac{0.5349}{9.2138 \times 10^{11}} = 5.8 \times 10^{-13} = 5.8$$

Otros resultados obtenidos con concentraciones semejantes ofrecieron pequeñas diferencias que reflejaron el grado de asociación del sistema analizado.

Figura 20. Coeficiente de sedimentación de una muestra de ficocianina por centrifugación en gradiente lineal de sacarosa de 0.15 a 0.8 M durante 18 horas a 20°C.

El valor de  $\omega^2 t$  fue de  $9.2138 \times 10^{11}$  seg. La concentración de la muestra fue de 13.4 mg/ml. Se empleó un rotor SW 41 a 39000 rpm. El gradiente de sacarosa fue obtenido por el refractómetro de Abbe medido en cada una de las fracciones.

### Coeficiente de sedimentacion de ficocianina



Este valor de coeficiente de sedimentación no es estricto porque no se han considerado factores como la viscosidad, la difusión, la densidad del solvente ni el dato responde a una secuencia experimental de FC en concentraciones crecientes, pero esta aproximación tiene un grado de confiabilidad apoyado en los valores semejantes obtenidos para concentraciones semejantes.

Ya que el parámetro citado es respuesta a la forma de una molécula y a su grado de hidratación, e infiriendo como primera aproximación que estas proteínas fueran globulares y anhidras, se pretendió correlacionar los valores de  $s_{20,w}$  para FC y AFC con el  $s_{20,w}$  hallado para el ficobilisoma e inferir cuantas unidades estrían formando el macrocomplejo; este aspecto se discutirá adelante, donde se presente el coeficiente  $s_{20,w}$  encontrado para la AFC.

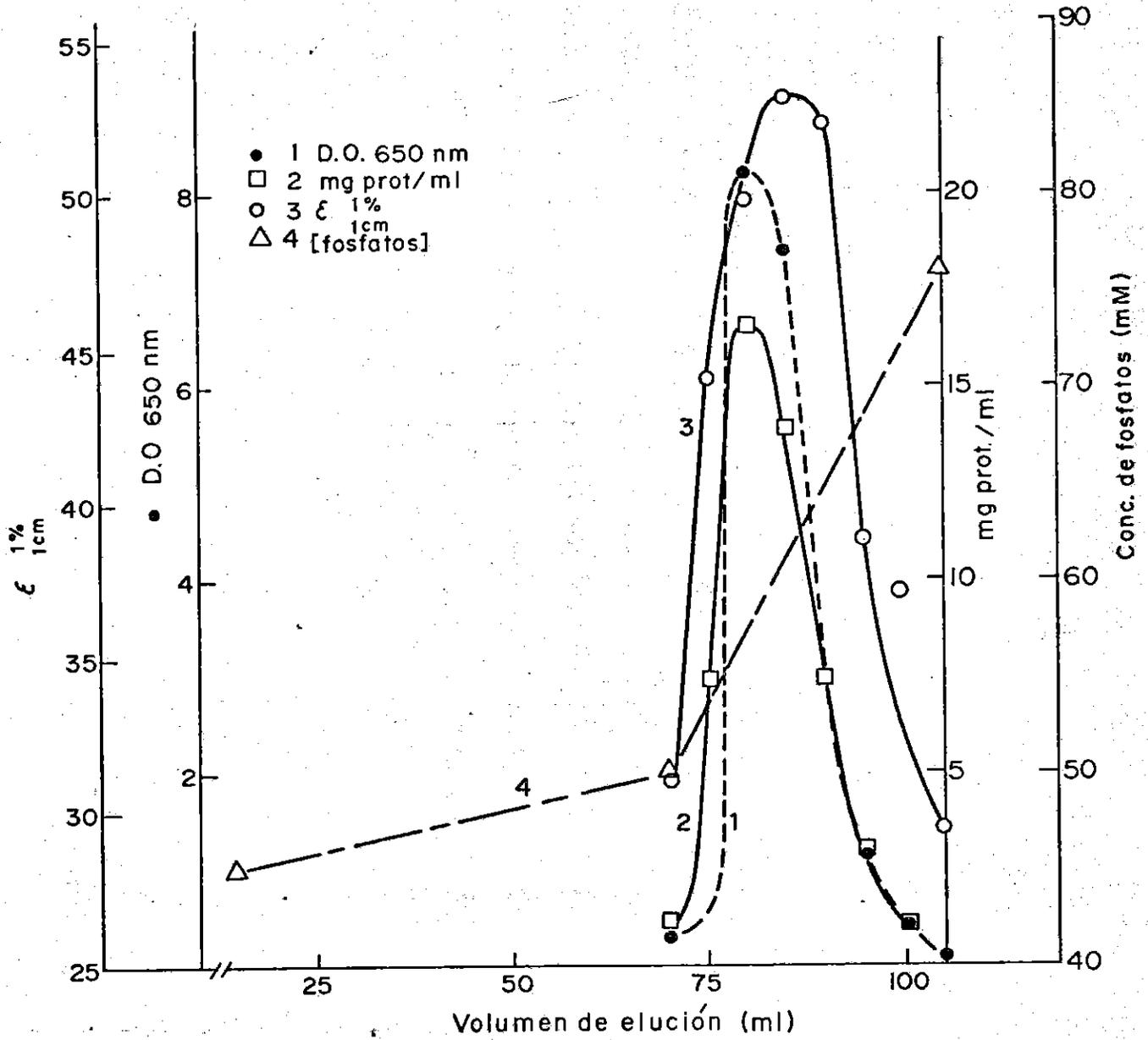
#### Separación y Purificación de la Aloficocianina

La columna de hidroxilapatita donde se puso la muestra de ficobilisomas disocados y se cromatografió la FC como primer producto de elución, manifestó también otra banda azul pálido con una migración menor. Esta zona fue cortada y se adicionó a otra columna de hidroxilapatita recromatografiándose mediante un gradiente lineal de fosfatos desde 40 hasta 200 mM.

Los datos bibliográficos sobre los valores de absorción y fluorescencia para AFC de cianobacterias, están de acuerdo en señalar una  $\lambda$  de máxima absorción a 650 nm y una  $\lambda$  de máxima fluorescencia a 660 nm (Glazer 1977).

Figura 21. Perfil de elución de la alofococianina en cromatografía en hidroxilapatita en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.3 eluída en gradiente de fosfatos. Se colectaron fracciones de 5 ml a las que se les analizó:

- (●) densidad óptica a 650 nm,
- (▣) mg de proteína/ml obtenida por el método de Lowry
- (○) coeficiente de extinción porcentual  $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}$
- (Δ) gradiente de fosfatos.



### Criterio de Pureza

Por tanto, el perfil de elución de esta muestra que se refiere en la fig. 21 fue seguido por su densidad óptica a 650 nm indicando un volumen de 80-85 ml como el que contiene la mayor proporción de AFC. Con los valores de densidad óptica obtenidos y la concentración medida por el método de Lowry que también se graficó en la misma figura, se obtuvo el máximo coeficiente de extinción porcentual encontrándose los mejores resultados entre 80 y 90 ml correspondiendo un dato de  $53.3 (1\%^{-1}\text{cm}^{-1})$  en la fracción 17.

Cada tubo fue también analizado en cuanto a su concentración de fosfato y con esos resultados se trazó el gradiente que se señala en la misma figura; la aloficocianina se eluyó entre 55 y 70 mM tanto en este caso como en otras ocasiones.

La relación  $DO_{620\text{nm}}/DO_{650\text{nm}}$  manifestó en ese punto el mínimo valor, lo cual significa la presencia en máxima concentración del componente absorbente a 650 nm; así mismo la relación de intensidad de fluorescencia  $IF_{638}/IF_{662\text{nm}}$  de los dos componentes del sistema, tiene consistencia con la apreciación citada.

### Espectro de absorción

Las mejores fracciones, seleccionadas por sus valores de  $\epsilon$  más altos, fueron caracterizadas por sus cualidades espectroscópicas.

En la fig 22 se anota el trazo de la densidad óptica observada en un rango entre 320 a 700 nm de la fracción No. 17 diluída 1:10; su máximo corresponde a 650 nm, hay una zona sensible a la luz entre 520 y 630 nm y otra de menor respuesta en el UV entre 325 y 380 nm.

Se observa una diferencia entre los espectros de absorción de FC y AFC, de la cual no es responsable el grupo prostético, ficocianobilina, porque es el mismo (Dale y Teale 1970, Glazer 1977). Tal diferencia es la respuesta a diferentes microambientes protéicos que bien pueden presentar diferentes grados de electronegatividad y sistemas conjugados que afectan el nivel de interacción de orbitales e influyen en la respuesta espectroscópica.

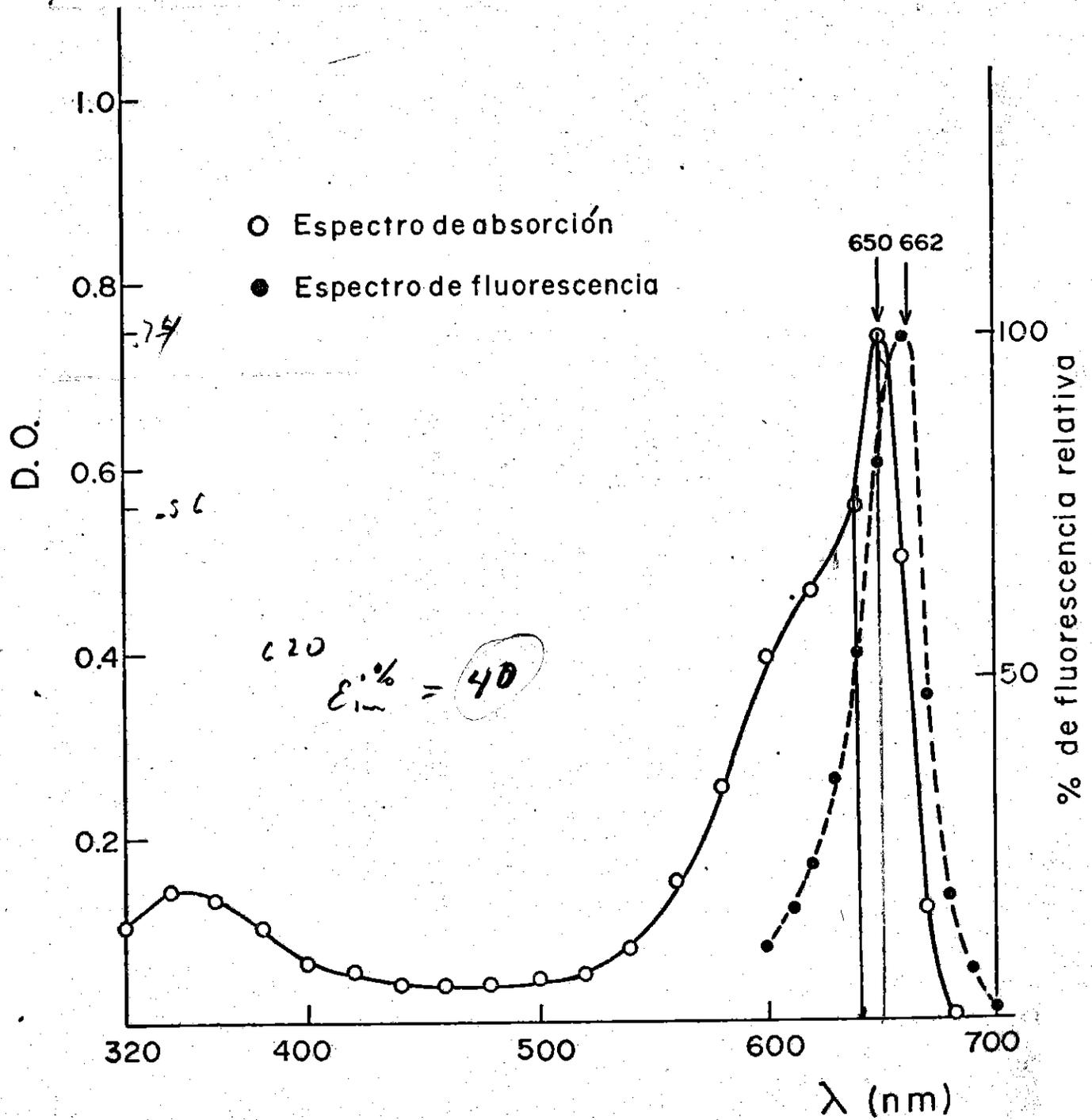
Así mismo, la medición de la luz transmitida por la muestra es un significado de la asociación de las moléculas de AFC, pues Brown (1975) ya ha analizado las diferencias en este parámetro cuando modifica el estado de agregación ya sea por concentración de la muestra o fuerza iónica dada por el amortiguador.

#### Espectro de fluorescencia

Cuando una muestra de AFC se excita con cuantos de luz de longitud de onda de 600 nm, los cromóforos responsables de la señal de absorción son excitados en transiciones operacionalmente observables y cuando se relajan, emiten fluo-

Figura 22. Espectros de absorción y fluorescencia de alo-  
ficocianina obtenida por cromatografía en hidroxilapatita,  
fracción 17. Espectro de absorción: dilución 1:10.

Espectro de emisión: fluorescencia de frente a  $\lambda$  de  
excitación de 600 nm.



rescencia equivalente a un estado energético menor situándose en 662 nm (fig. 22).

El desplazamiento de Stokes entre el máximo de absorción y el máximo de fluorescencia es de 12 nm, valor que manifiesta la disipación de energía durante la vida media del estado excitado antes de volver a su estado basal. Este valor es pequeño y no da índice de cambios bruscos en la geometría molecular cuando se excita ni de fenómenos de ionización.

Este espectro también es un reflejo del estado de agregación de esta proteína pues la dilución o el empleo de amortiguadores de baja fuerza iónica desplaza el valor máximo hacia el azul.

La fluorescencia máxima obtenida en el ficobilisoma fue la misma que la obtenida en el pigmento aislado, lo cual sugiere que en el ficobilisoma no se registró una asociación molecular mayor que desplazara este valor hacia el rojo en la zona más cercana a la fluorescencia de la clorofila, sin embargo cuando se vinculan los valores de fluorescencia de los ficobilisomas asociados y disociados con los pigmentos libres que se ven en la figura 23, se encuentran relaciones cuya exploración parece interesante.

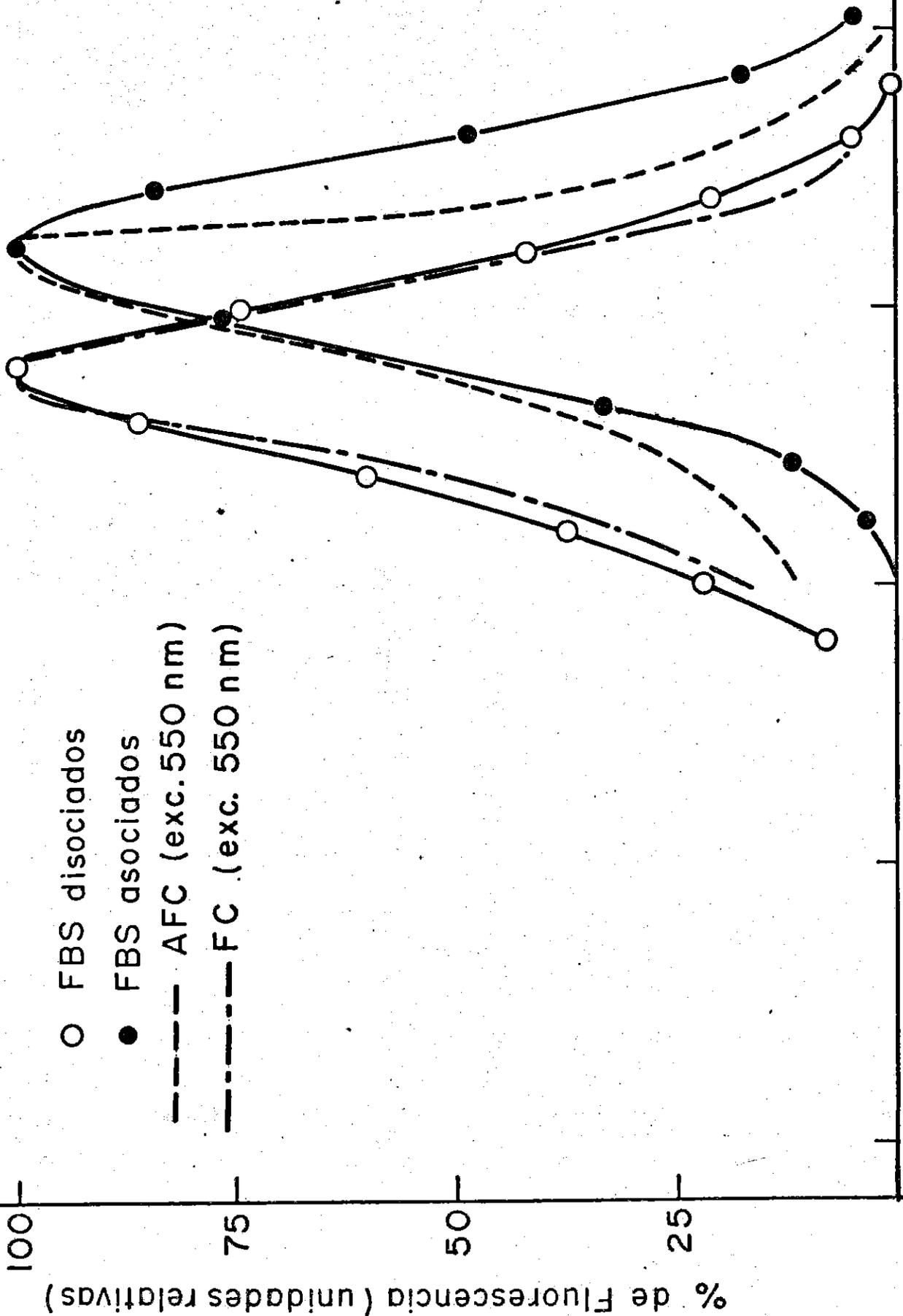
a) El máximo de fluorescencia del ficobilisoma asociado es el mismo que la fluorescencia de la aloficocianina libre, lo que da evidencia de la transferencia de energía.

b) Se observa que la fluorescencia de la ficocianina es esencialmente la misma que la de los ficobilisomas dializa-

Figura 23. Comparación de espectros de fluorescencia de los ficobilisomas asociados y disociados y de los pigmentos aislados.

La semejanza entre la ficocianina libre -.-.-. y ficobilisomas disociados (o) es notable, considerándose iguales. Entre los ficobilisomas asociados y la aloficocianina libre hay igualdad en el máximo de fluorescencia pero no hay coincidencia en el trazo ubicado hacia el rojo: (●) y -----.

UNIDADES



○ FBS disociados

● FBS asociados

--- AFC (exc. 550 nm)

- · - · - FC (exc. 550 nm)

% de Fluorescencia (unidades relativas)

significa desacoplamiento del sistema.

c) Hay una zona hacia el rojo donde no hay coincidencia entre los espectros de ficobilisomas asociados y aloficocianina aislada.

Esa zona que ofrece el ficobilisoma íntegro incluye otro componente además de la aloficocianina libre medida, en tal cantidad que no se identificó por los métodos empleados pero que se manifiesta por esta relación; la exploración de este componente parece promisorio (Diego González, comunicación personal).

#### Coeficiente de sedimentación

El valor obtenido para las muestras de AFC fue medido con un tratamiento semejante al realizado con la FC.

El valor estimado para esta proteína no es de la fracción más pura de la columna reseñada sino de otro ensayo cromatográfico; el valor obtenido ha sido reproducible en tres muestras con concentraciones semejantes y se ha considerado representativo dentro de los límites ya comentados, es pues la razón por la cual se incluye en la caracterización de AFC. La concentración de la muestra analizada fue de 678 µg/ml y la centrifugación se realizó en el gradiente de sacarosa y amortiguador ya citado, en las mismas condiciones de operación con el dato del integrador, también dicho.

Los valores de operación fueron estos:

$$Z_1 = 2.3\% \text{ p/p de sacarosa}$$

$$Z_2 = 21.0\% \text{ p/p de sacarosa}$$

$$r_1 = 6.63 \text{ cm}$$

$$r_2 = 15.23 \text{ cm}$$

calculándose  $Z_0$  de -12.11

La localización de la banda en el gradiente correspondió a 10.2% de sacarosa, la del menisco fue 2.3% de sacarosa.

$$I_b - I_m = 10.2 - 2.3$$

que ofreció según el método y tablas de Griffith (1976) un  $\Delta I$  de 0.579 y  $s_{20,w} = \frac{\Delta I}{\omega^2 t} = \frac{0.5794}{9.2138 \times 10^{11}} = 6.2 \times 10^{-13} \text{ seg} = 6.2$

que se presenta en la fig. 24 con la localización de la banda protéica mediante el trazo del gradiente y la densidad óptica a 650 nm.

Relación de los coeficientes de sedimentación de las unidades y del complejo

Como se anotó antes, los valores  $s_{20,w}$  hallados para la FC y la AFC se correlacionaron con el  $s_{20,w}$  encontrado para el ficobilisoma, buscando una aproximación del número de unidad protéicas que estuviesen formando el sistema complejo. (Luis González de la Vara, comunicación personal).

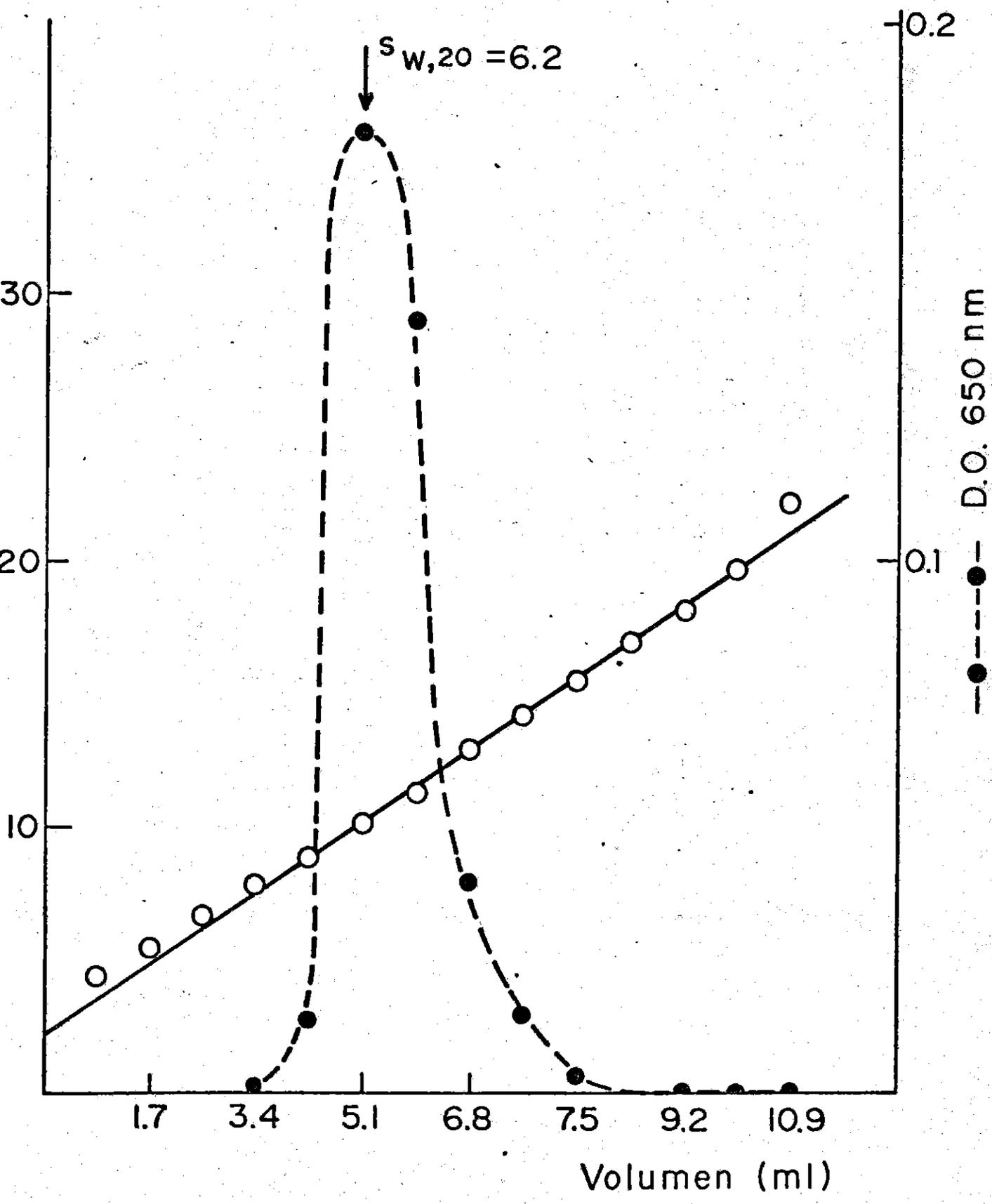
I. Para esto, se hicieron ciertas suposiciones:

a) el ficobilisoma tiene forma esférica

Figura 24. Coeficiente de sedimentación de una muestra de AFC por centrifugación en gradiente lineal de sacarosa de 0.15 a 0.8 M en amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.0.

La centrifugación se hizo en un rotor SW 41 a 39000 rpm durante 18 horas a 20°C. El valor  $\omega^2 t$  fue de  $9.2138 \times 10^{11}$  seg. La concentración de la muestra de 678  $\mu\text{g/ml}$ . El gradiente de sacarosa se midió refractométricamente en cada una de las fracciones y el cálculo de  $s$  se relata en el texto.

### Coeficiente de sedimentacion de aloficocianina



- b) las ficobilinas son globulares y de tamaño semejante pues se tomó un promedio de 6.0 S
- c) los valores  $\bar{v}$ ,  $\rho$ ,  $N$  y  $\eta$  son constantes
- d) las unidades se acomodan de manera que no hay espacios vacíos; por lo tanto, el número de ficobilinas ( $n$ ) presentes en un ficobilisoma (fbs) es función del coeficiente de las ficobilinas  $S_u$  (unidad) y del coeficiente del ficobilisoma  $S_c$  (complejo).

$n$  = número de ficobilinas (fb) en el ficobilisoma (fbs)

$$n = f(S_u, S_c)$$

a partir de las fórmulas generales de sedimentación:

$$1. S = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{Nf}$$

$$2. f = 6\pi\eta r$$

sustituyendo 2 en 1:

$$3. \frac{SN6\pi\eta r}{1-\bar{v}\rho} = M$$

Para el ficobilisoma se tiene:

$$4. \frac{S_c N6\pi\eta}{1-\bar{v}\rho} = \frac{Mc}{r_c}$$

Si se hace la relación a partir de los volúmenes se tiene que el volumen del ficobilisoma es igual a  $n$  veces el volumen de una ficobilina.

$$5. nV_u = V_c$$

$$6. \frac{4}{3} \pi r_c^3 = n \frac{4}{3} \pi r_u^3$$

$$n = \frac{\frac{4}{3} \pi r_c^3}{\frac{4}{3} \pi r_u^3} = \frac{r_c^3}{r_u^3}$$

$$r_c^3 = nr_u^3$$

$$7. r_c = \sqrt[3]{nr_u^3}$$

La relación hecha para los volúmenes, también es válida para el peso molecular:

$$8. M_c = nM_u$$

sustituyendo 7 y 8 en 4:

$$9. S_c \frac{N_6 \Pi \eta}{1 - \bar{v} \rho} = \frac{nM_u}{(nr_u^3)^{1/3}} = n^{2/3} \frac{M_u}{r_u}$$

$$10. S_u \frac{N_6 \Pi \eta}{1 - \bar{v} \rho} = \frac{M_u}{r_u}$$

$$11. \frac{S_c}{S_u} = n^{2/3}$$

$$12. \left( \frac{S_c}{S_u} \right)^{3/2} = n$$

Sustituyendo los valores experimentales calculados:

$$n = \left( \frac{29.6}{6.0} \right)^{3/2} = 10.94$$

Lo cual dice que de acuerdo a las consideraciones hechas la relación de los coeficientes de sedimentación indica que 10 a 11 ficobilinas esféricas estarían formando un FBS también esférico.

II. Se puede hacer una segunda aproximación con la consideración de ficobilinas no esféricas, sino de forma discoidal, con dimensiones de  $120 \times 60 \text{ \AA}$  según los datos bibliográficos ya citados por Glazer, tomándose entonces una razón axial de 2, la que corresponde según Van Holde (1971) a una relación  $f/f_0$  de 1.041.

De estos conceptos, se tendría que aplicando la ecuación No. 4 al ficobilisoma:

$$S_c = \frac{nM (1 - \bar{v}\rho)}{N6\pi\eta r_u}$$

convirtiendo  $V = m \cdot \bar{v}$  y  $m = \frac{M}{N}$

donde  $m$  es la masa de una ficobilina:

$$13. V = \frac{4}{3} \pi r^3 = nm\bar{v} = n \frac{M}{N} \bar{v}$$

Se considera  $\bar{v}$  igual para ficobilinas y ficobilisomas:

$$14. S_u = \frac{M (1 - \bar{v}\rho)}{Nf} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N \left(\frac{f}{f_0}\right) f_0^{1/3}} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N \left(\frac{f}{f_0}\right) 6\pi m r_{ou}}$$

$$15. r_{ou} = \left( \frac{3M \bar{v}}{4\pi N} \right)^{1/3}$$

$$16. \quad r_c = \left( \frac{3nM\bar{v}}{4\pi N} \right)^{1/3}$$

$$17. \quad \frac{r_c}{r_{o_u}} = n^{1/3}$$

La relación de radios del PBS y de las unidades (si fueran esféricas) se manifiesta en el número de unidades  $n^{1/3}$  a partir de 4, 14 y 17 se tiene que:

$$18. \quad \frac{S_c}{S_u} = \frac{n (f/f_o)^{r_{o_u}}}{r_c} = \frac{n (f/f_o)^{r_{o_u}}}{r_c}$$

$$19. \quad \frac{S_c}{S_u} = n^{2/3} (f/f_o)$$

$$20. \quad n = \left( \frac{S_c / S_u}{f/f_o} \right)^{3/2}$$

Con los valores encontrados:

$$n = \left( \frac{29.6/6.0}{1.041} \right)^{3/2} = 10.30$$

III. Si se tienen las dimensiones de 120:30 Å para las unidades protéicas, se tiene una razón axial de 4 correspondiente a  $f/f_o = 1.18$  y el resultado es:

$$n = \left( \frac{29.6/6}{1.18} \right)^{3/2} = 8.54$$

Esta apreciación más estricta, donde  $n$  es la relación de los coeficientes afectada por la corrección debida a  $f/f_0$ , dada por la forma molecular sugerida, restringe el valor de  $n$  con 2 a 3 unidades protéicas.

Se sabe que en los fenómenos de sedimentación una molécula oblató que se toma como esfera se considera como una molécula menos masiva; en la centrifugación la molécula se desplaza en función de su tamaño y de su forma; mientras que en el volumen de una esfera,  $r$  está afectado por una potencia cúbica, el concepto de forma y por tanto del  $f/f_0$  maneja el radio de manera lineal, por eso el coeficiente de sedimentación es un reflejo predominante del tamaño molecular.

Por tanto, en la primera aproximación se subestima la masa y de esa manera el valor de  $n$  se ve aumentado, ese número pues, representa un número máximo de unidades protéicas constituyentes del FBS. En cambio la última aproximación es más realista por la corrección de forma.

Los cálculos de peso molecular obtenidos por filtración en gel para la FC y electroforesis para la AFC manifiestan consistencia con el peso total del ficobilisoma:

7	unidades FC	$(\alpha\beta)_6$	con P.M. de 150 000	cada una y
1	"	AFC $(\alpha\beta)_3$	83 100	da un

peso molecular del ficobilisoma de 1 133 100, valor aproximado al sugerido por el  $s_{20,w}$  de  $29.6 \pm 4$  (alrededor de  $1 \times$

En el caso presente de *Spirulina maxima*, se han encontrado ficobilisomas con un peso molecular aparente de  $1 \times 10^6$ , unos 250 Å de diámetro y una migración entre 1 M y 0.75 M en gradiente discontinuo centrifugando a 270 000 x g durante 6 horas, resultados que apuntan en el sentido de unos ficobilisomas más pequeños que los de *Porphyridium crentum*, que contiene ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina y tiene un P.M. de  $2-3 \times 10^6$ , un tamaño de 450 Å de diámetro revelado por microscopía electrónica y una migración en gradiente de sacarosa en la interfase 2M-1M (Gantt 1974).

Además los datos de fluorescencia que marcan un máximo a 662 nm y el origen del cultivo que estuvo sujeto a condiciones variables a veces precarias, sugiere con un apreciable criterio de confiabilidad que en *S. maxima*, los ficobilisomas son más pequeños o que se han disociado en cierta proporción.

Sería muy interesante distinguir si en *S. maxima*, y en condiciones deficientes de nutrientes nitrogenados, disminuye el número de ficobilisomas o disminuye su tamaño.

#### Electroforesis en geles de poliacrilamida

##### a) Ficocianina:

Las fracciones consideradas más puras fueron sometidas a una migración en un campo eléctrico con un amortiguador de asparagina 34 mM, pH 7.3 con una relación de bisacrilamida a acrilamida de 1:37 corriéndose a 325 voltios por 4 horas a 10°C.

El resultado obtenido fue una banda de color intrínseco azul cuya fotografía se presenta en la fig. 25a.

El registro sacado con el espectrofotómetro de barrido Gilford, confirmó el mismo resultado y tal trazo se observa en la misma figura (b).

b) Aloficocianina:

Las muestras de aloficocianina que se hicieron migrar en las condiciones ya descritas para FC, manifestaron una banda, la cual se observa en la fig. 25c. Cuando se analizó al espectrofotómetro de barrido se comprobó la misma y única presencia; este dato se señala con la indicación "d" en la misma figura.

Tanto AFC como FC en este patrón de electroforesis dieron una sola banda con una migración ligeramente mayor para AFC con movilidad 0.61 y 0.60 para la FC.

Electroforesis en geles de poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio:

a) Ficocianina

Al emplear el detergente aniónico de lauril sulfato de sodio y favorecer el desplazamiento en el campo eléctrico por efecto de tamaño molecular con un amortiguador de glicina 192 mM, tris 18.5 mM pH 7.3 con una concentración de acrilamida de 11%, relación b:a de 1:37, la ficocianina siguió presentando una banda a la migración realizada por 5 horas y 3 mA/tubo.

7.3 dil. 1:4 con DSS al 1% corrida durante 5 hrs. (patrón No. 1 de Materiales y Métodos).

f) Fotografía del gel corrido en amortiguador de glicina 192 mM, tris 18.5 mM pH 7.3, acrilamida 11%, relación b:a de 1:37 durante 5 horas a 3 mA/tubo.

g) Registro del espectrofotómetro de barrido del mismo gel donde se comprueban las dos bandas recogidas a la migración. D.O. máxima del pico 1, 0.485 v 0.407 para el pico menor (2).  $\lambda$  de lectura 567.5 nm, abertura del diafragma 0.523 mm.



Figura 25. Patrones de migración de FC en poliacrilamida:

a) Esquema de la migración electroforética de FC en geles de poliacrilamida relación b:a 1:37 en amortiguador de asparagina 0.034 M pH 7.3; la muestra fue de 25  $\mu$ g y se corrió durante 4 hrs a 325 V a 10°C.

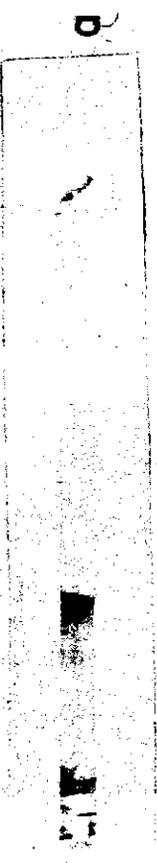
b) El registro del espectrofotómetro de barrido se corrió ajustando a una  $\lambda$  de 567.5 nm con una abertura del diafragma de 0.53 mm haciendo la lectura en la dirección del origen del gel al frente del colorante.

La densidad óptica máxima corresponde a 0.48 unidades.

c) Electroforegrama de AFC en gel de poliacrilamida, corrido en amortiguador de asparagina 34 mM pH 7.3 a 10°C y 325 voltios durante 4 horas. Concentración de acrilamida 10%, b:a 1:37, empleando 25  $\mu$ g de muestra.

d) Registro de espectrofotómetro de barrido del mismo electroforegrama ajustado a  $\lambda$  de 567 nm, abertura del diafragma 0.523 mm y D.O. máx. = 0.454.

e) Esquema de la migración de una muestra de 25  $\mu$ g de FC con DSS en amortiguador de glicina 767 mM tris 74 mM pH



b  
FC en  
poliacrilamida



c

d  
AFC en  
poliacrilamida



g  
AFC en  
poliacrilamida  
con SDS

Hasta aquí, las condiciones del procedimiento sólo manifestaron una subunidad al campo eléctrico generado, lo que se muestra en el resultado (e) de la figura 25.

b) Aloficocianina

La aloficocianina tratada por este mismo patrón No. 1 ya referido, dió dos bandas a la migración en campo eléctrico cuando estuvo actuando el DSS separando las subunidades que la forman. La fig. 25(f) es la fotografía del gel obtenido en el tratamiento ya citado de 5 h a 3 mA/tubo y junto con él se presenta el registro espectrofotométrico corrido en un Gilford con dos señales de diferentes máximos en la densidad óptica; la primera describe el componente de peso molecular mayor porque migra menos que la segunda señal que tiene mayor movilidad porque su tamaño es menor, fig. 25(g).

Este mismo procedimiento del patrón 2 se llevó a cabo en placas y el resultado se relacionó a una curva calibrada con marcadores calculándose el peso molecular aparente tanto para FC como para AFC. Los resultados para FC corresponden a los pozos 2 y 4 con P.M. de 14500; para la AFC se utilizan los pozos 1,3 y 5 donde se ven dos bandas y los P.M. calculados fueron 13500 y 14200 presentados en la fig. 26 A.

Las proteínas empleadas fueron citocromo c de caballo, lisozima, mioglobina, cadenas ligera y pesada y  $\gamma$  globulina, quimotripsinógeno, ovoalbúmina, albúmina y apoferritina. La fotografía de este experimento así como los datos obtenidos se señalan en la fig. 26 B.

Figura 26. A) Electroforesis en acrilamida normal con amortiguador tris-glicina.

Pozos 1,3 y 5: AFC; 2 y 4: FC.

Pozo 6: citocromo c y apoferritina

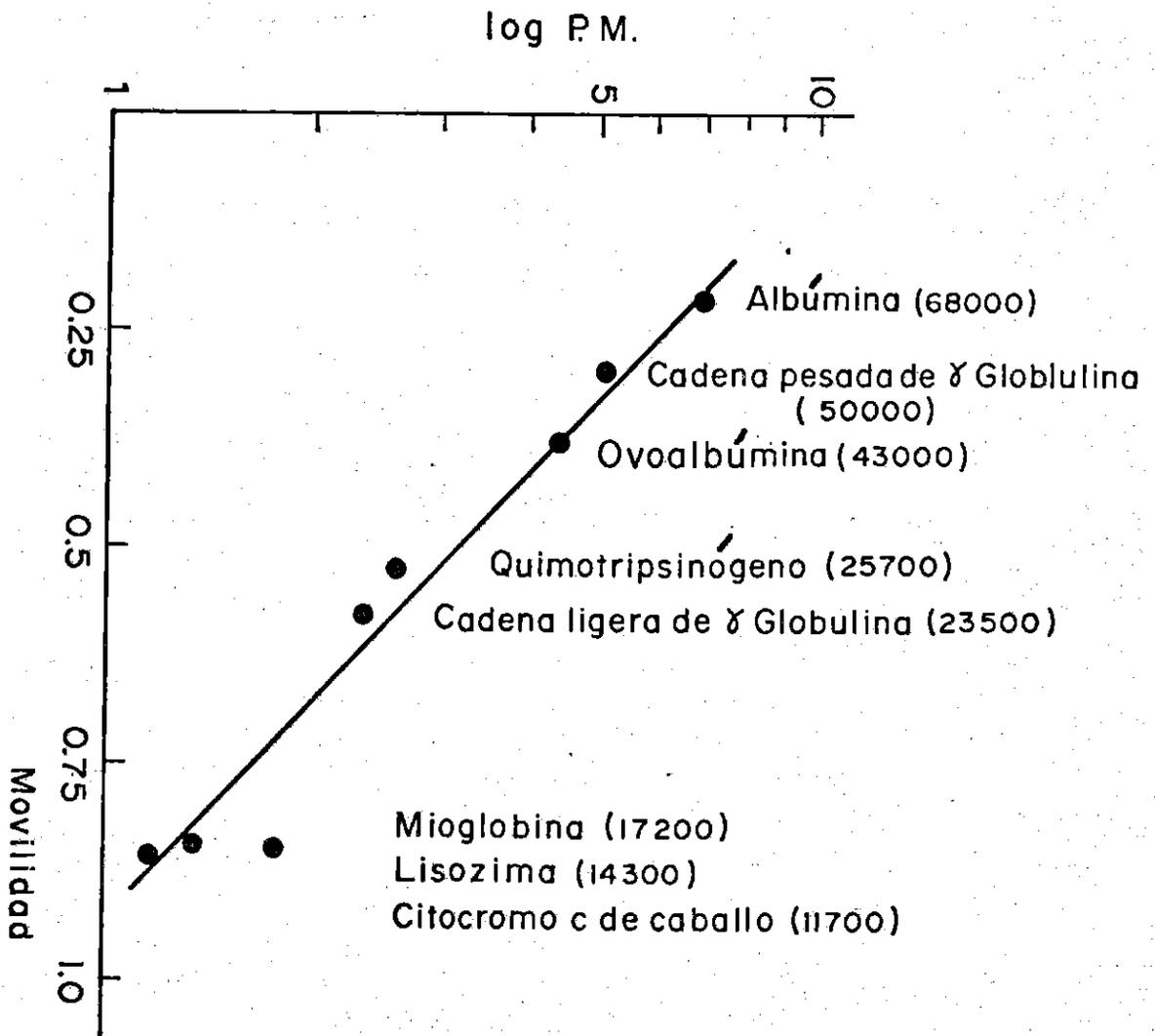
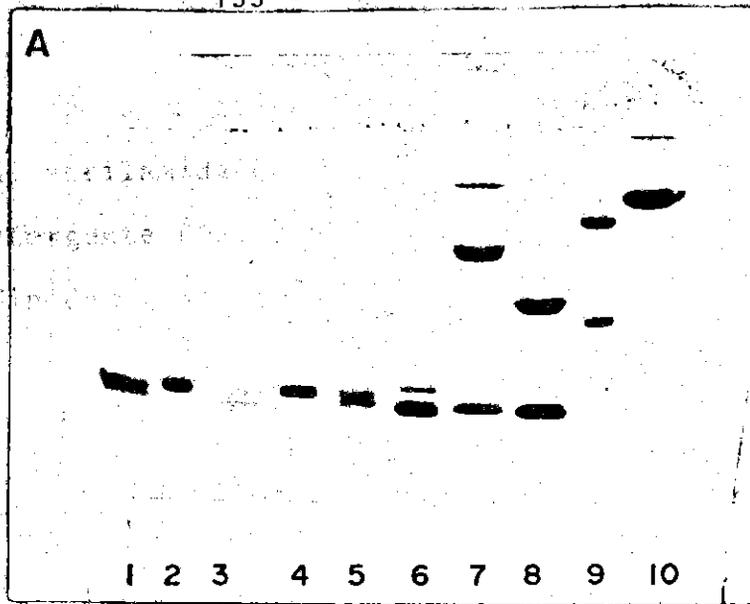
7: ovoalbúmina y mioglobina

8: quimotripsinógeno y lisozima

9:  $\gamma$  globulina

10: albúmina

B) Calibración de pesos moleculares con marcadores proteicos.



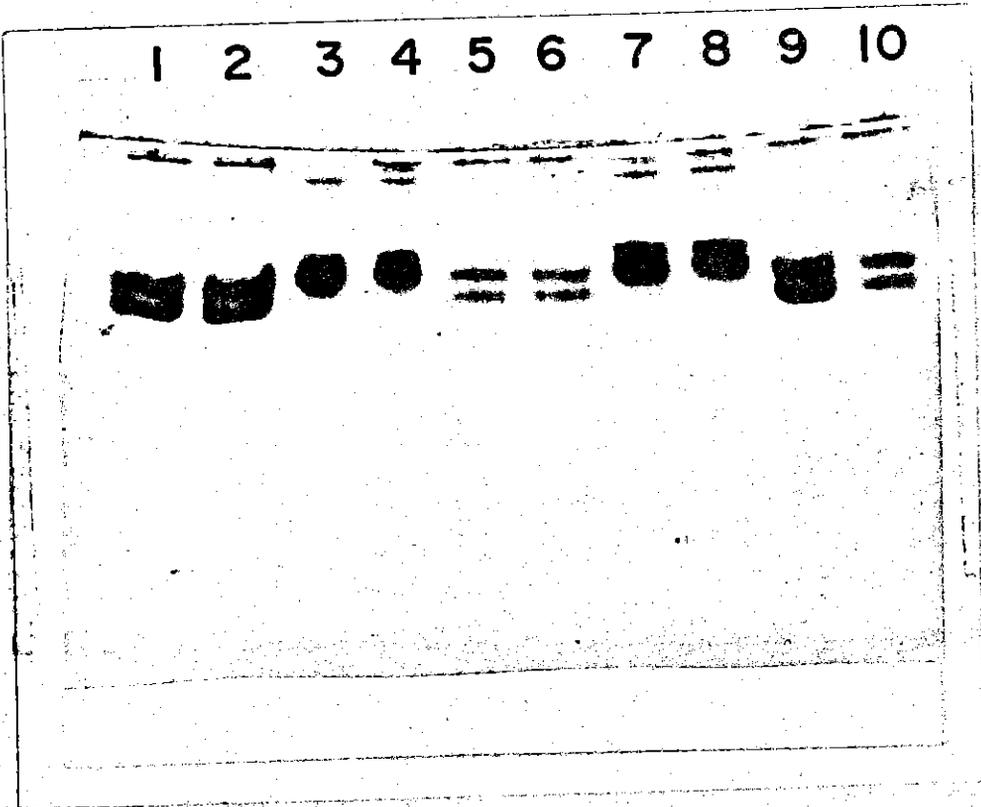
Cuando se empleó amortiguador de fosfatos a pH 7.3, una concentración de acrilamida de 10%, la misma relación de b:a de 1:37 y el detergente DSS, la misma muestra dió 2 bandas aunque poco definidas (Patrón No. 2 de Materiales y Métodos). Es de apreciarse que la diferente naturaleza del amortiguador, la adición de 1% de mercaptoetanol en la digestión y una corriente de 8 mA/tubo hizo posible una ligera separación en las bandas de FC.

Con objeto de dilucidar el comportamiento de la FC en la migración electroforética y resolver mejor las dos posibles subunidades de esta proteína, se aumentó la proporción de bis-acrilamida a 1:27 pero los resultados no fueron más definidos ni en resolución de las bandas ni en la migración en función del tiempo y corriente eléctrica (Patrón No. 3) que fue 8 mA/tubo y 8-10 horas. Se realizó otra serie de experimentos preparando geles con una relación b:a de 1:18.5 de malla más cerrada que permitiese una mejor resolución de las bandas aunque no tuviera la migración deseada (patrón No. 4). Después de 10-12 horas de mantener la corriente de 8 mA/pozo, se obtuvo un patrón con dos bandas bien separadas aunque se tuvo una migración pequeña. Estos resultados se indican en la fig. 27 y las muestras referidas corresponden a los pozos 7 y 8 que reproducen resultados de otra fracción de FC, también purificada cromatográficamente en otra ocasión y se señala en los pozos 3 y 4.

Figura 27. Electroforesis en gel de acrilamida al 10%, con relación b:a de 1:18.5 en amortiguador de fosfatos pH 7.3 a 8 m A/pozo por 8-10 horas.

Muestras: 1 y 2: AFC de la 3a. columna; 3 y 4 FC de la 4a. columna; 5 y 6 AFC de la 4a. columna, 7 y 8; FC de la 5a. columna; 9 y 10: AFC de la 5a. columna.

En cada caso se emplearon 25 µg.



La resolución lograda para la AFC es perfectamente clara y se señala en los pozos 9 y 10 con resultados reproducidos para otra muestra de AFC en los pozos 1 y 2 así como 5 y 6.

Tomando en cuenta esta serie de experimentos se puede decir que la ficocianina contiene dos subunidades de peso molecular cercano a 14500 daltones que son resueltos por dodecil sulfato de sodio y mercaptoetanol en malla cerrada por doble proporción de bisacrilamida, en condiciones de 8 mA/pozo durante 10-12 horas.

El registro del espectrofotómetro de barrido de estos electroforegramas también da dos picos asimétricos que corroboran los resultados de la electroforesis.

Estos resultados a la mibración electroforética de las dos proteínas FC y AFC en diferentes patrones se concentran a continuación:

	Número de bandas en patrones de electroforesis	
	FC	AFC
Patrón de asparagina	1	1
Patrón No. 1 tris-glicina con DSS b:a 1.:37	1*	2#
Patrón No. 2 fosfatos con DSS y mercaptoetanol b:a 1:37	2	2
Patrón No. 4 fosfatos con DSS b:a 1:18.5	2	2

\* P.M. 14500

# P.M. 13500 y 14200

### Estequiometría de la AFC

A partir de las señales del espectrofotómetro de barrido se pretendió calcular la estequiometría de las subunidades de la aloficocianina.

Para esto se hicieron placas de poliacrilamida con DSS donde se pusieron muestras crecientes de aloficocianina desde 5 hasta 50  $\mu\text{g}$  (patrón No. 5 de Materiales y Métodos).

Al mantener un campo eléctrico con 8 mA/pozo durante 12 horas se obtuvieron dos bandas a las cuales se les tomó su trazo con el espectrofotómetro Gilford dando dos picos de dos subunidades; la subunidad  $\alpha$  de peso molecular mayor y el pico  $\beta$  de mayor migración y peso molecular menor.

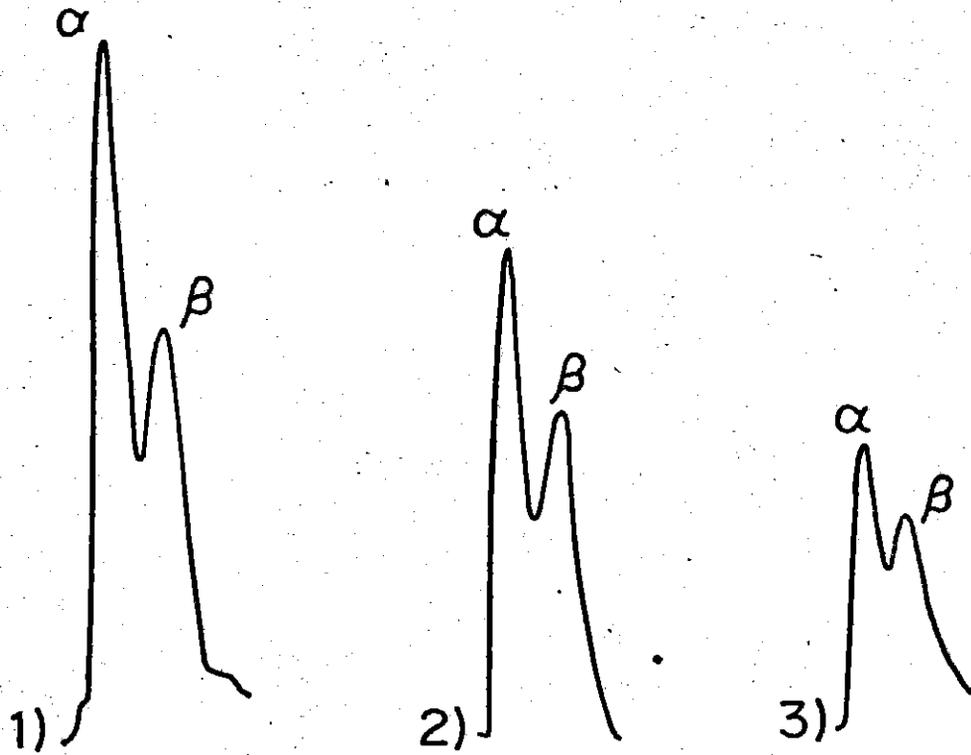
La densidad óptica de los picos de las muestras guardan una correlación en función de su concentración como se anota en la fig. 28 donde se ponen de manifiesto tres de las diez señales analizadas, las cuales podrían manifestar su estequiometría.

Esta relación se conoció midiendo la altura que registran al densitómetro esas subunidades o bien extrayendo de los gels el colorante de Coomassie con alcohol etílico al 50% y midiendo su densidad óptica a 567.5 nm.

Estos datos se graficaron y se obtuvieron líneas experimentales con cierta dispersión. En la fig. 29 (A) se manifiestan los resultados al manejar la altura de las señales del espectrofotómetro y la indicada como B refleja los resul-

Figura 28. Trazo densitométrico de geles de poliacrilamida de AFC con DSS. Las concentraciones de muestra son: 1) 40  $\mu\text{g}$ , 2) 25  $\mu\text{g}$  3) 15  $\mu\text{g}$ .

El trazo de izquierda a derecha está en sentido de menor a mayor migración.



TRAZOS DENSITOMETRICOS DE GELES DE  
POLIACRILAMIDA DE AFC EN SDS

Figura 29. Obtención de estequiometría de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la AFC.

A) Tratamiento por medición de registros densitométricos. Se midió la longitud del registro como una proporción de la densidad óptica en función de la concentración de la muestra.

B) Tratamiento por extracción y lectura de la densidad óptica a 567,5 nm en función de la concentración de la muestra.

En los dos casos la relación de pendientes es de 1.5,

- Línea teórica de la banda  $\alpha$
- Línea teórica de la banda  $\beta$

D.0.567 nm

0.4

0.3

0.2

0.1

24

20

16

12

8

4

Longitud de registro  $\lambda$  (nm)

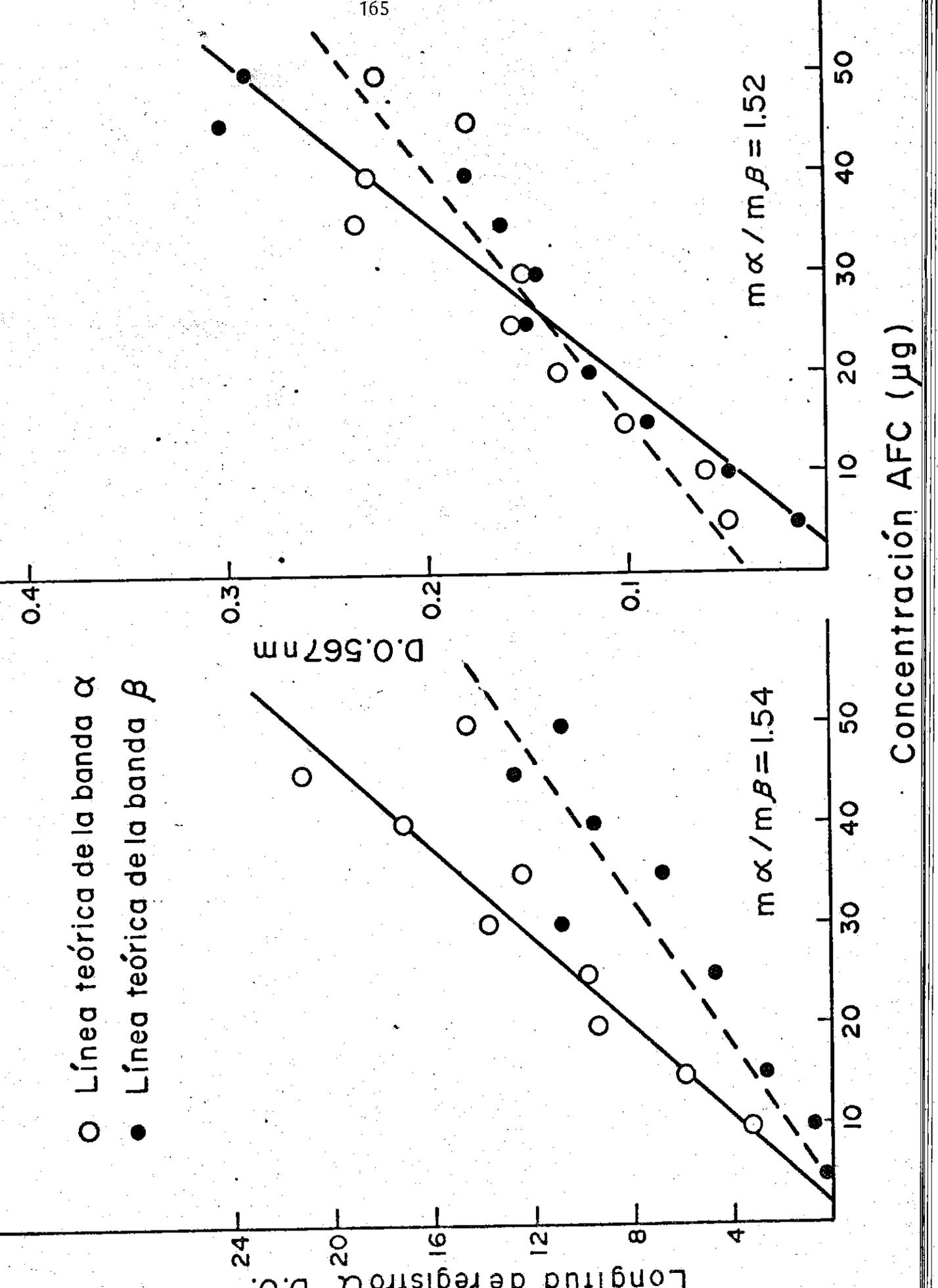
$m\alpha / m\beta = 1.54$

$m\alpha / m\beta = 1.52$

10 20 30 40 50

10 20 30 40 50

Concentración AFC ( $\mu\text{g}$ )



todos cuando se hizo la extracción y se leyó su densidad óptica a 567.5 nm.

En (A) los puntos experimentales manifiestan un coeficiente de correlación de 0.93, se han tratado por el método de mínimos cuadrados para calcular la recta teórica que se adjunta. La relación de las pendientes  $\alpha/\beta$  da un número de 1.54 del cual se saca una proporción de 3:2 subunidades  $\alpha:\beta$  de aloficocianina.

En (B) se hace un tratamiento semejante y la relación coincide con el mismo 1,5 y por tanto la misma estequiometría.

Las dos series de datos indican la misma tendencia y aunque haya limitaciones de orden experimental, la consistencia de resultados es sugerente de ser real.

### Filtración en gel

Con el objeto de conocer los pesos moleculares de la ficocianina y la aloficocianina se procedió a realizar una filtración en gel de los ficobilisomas disociados.

Estos, fueron dializados en frío a 4°C y concentrados para colocarse en la parte superior de una columna de Sephadex G-200 que fue calibrada con cuatro marcadores de peso molecular conocido.

Estas proteínas fueron citocromo c, ovoalbúmina, y globulina y apoferritina.

La fig. 30 presenta el perfil de elución de las fracciones registrándose la densidad óptica a 280 nm, a 620 y señala también la relación  $D.O._{620}/D.O._{650}$  que da un valor adimensional y que se incluye en la representación gráfica sólo para ilustrar la localización del pigmento aloficocianina.

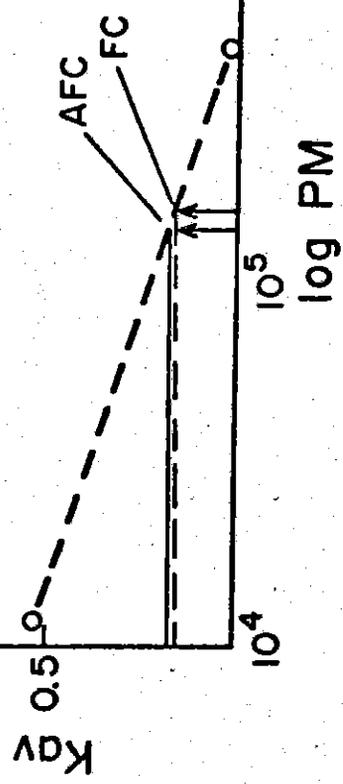
Se ponen de manifiesto los picos correspondientes a los marcadores así como la fracción que tiene su máxima absorben-  
cia a 620 nm manifestándose así la FC y corresponde a un volumen de 44.4 ml.

Cuando se grafica la  $K_{av}$  o sea el coeficiente de partición entre la fase líquida y la fase de gel de cada uno de

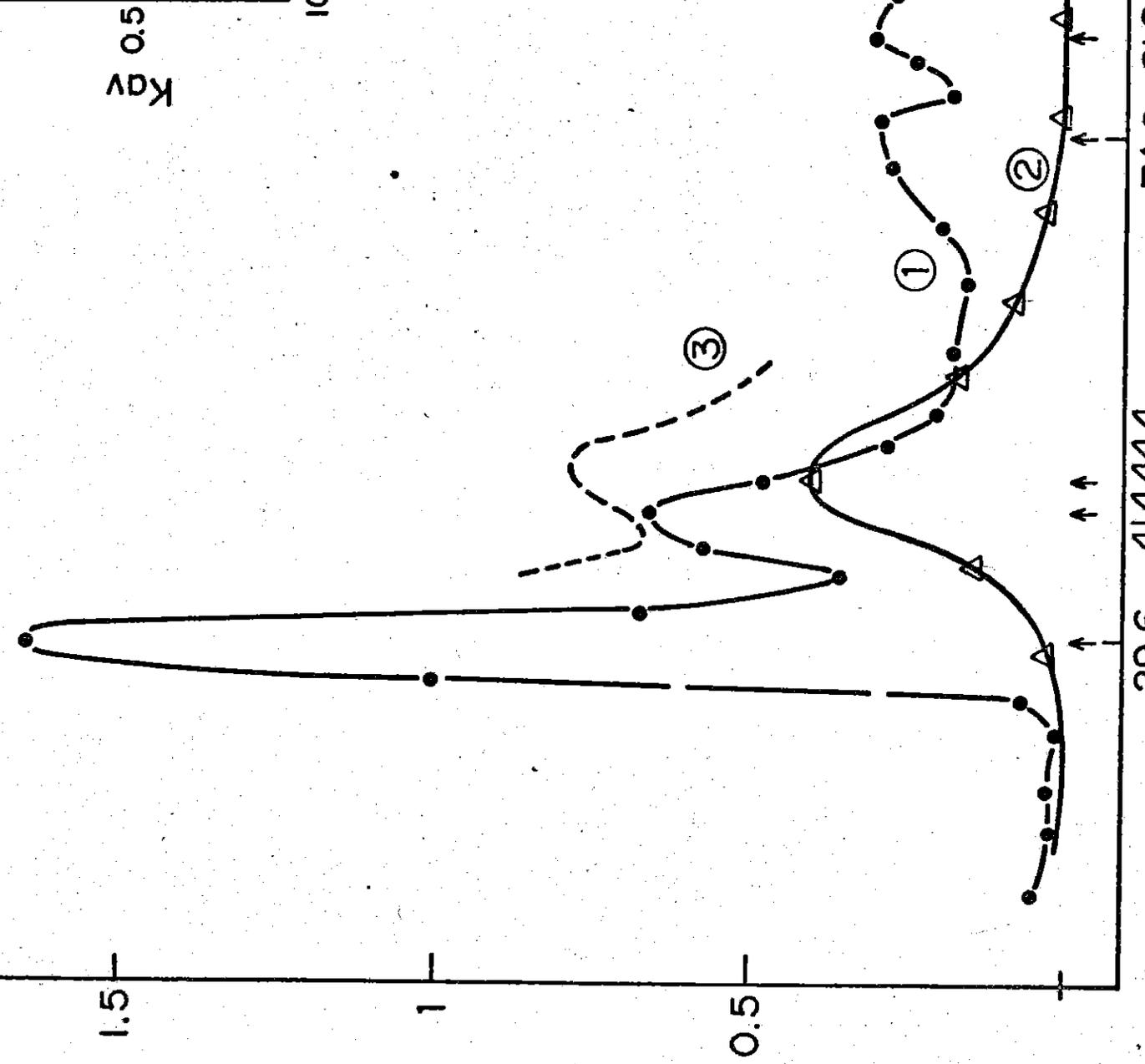
Figura 30. Filtración en gel de los ficobilisomas disociados.  
El trazo 1 indica la presencia de marcadores seguidos por su densidad óptica a 280 nm.

El trazo 2 la densidad óptica a 620 nm, localizándose la presencia de ficocianina.

El trazo 3 la relación de densidades 650/620 que señala la presencia de aloficocianina.



- 1 D.O. 280 nm
- 2 D.O. 620 nm
- 3 D.O. 650/620 nm



los componentes protéicos de la columna en función del tamaño molecular expresado como log P.M. se tiene una recta (Reiland 1971).

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

$V_e$  = volumen de elución

$V_o$  = volumen muerto

$V_t$  = volumen total

Al situar las condiciones de elución de la FC en la recta se encontró un PM aparente de 150 000 - 155 000;

Se consideró antes que la FC está formada por monómeros con dos subunidades, una  $\alpha$  y otra  $\beta$  con un P.M. alrededor de 15 000. Si se toma en cuenta que la asociación más frecuente en este compuesto es de hexámeros con S. y Berns (1965) y McColl (1971) han propuesto y comprobado, se tendrá un peso molecular teórico de  $\approx$  180 000 donde el resultado experimental obtenido representaría un 86% del dato teórico.

b) aloficocianina:

En la elución de las fracciones de este mismo procedimiento, se calculó la presencia de aloficocianina por la relación de D.O.  $_{650nm}$  / D.O.  $_{620nm}$ ; el perfil de elución señala la región de la gráfica donde este valor se hace presente, localizándose muy cerca de la ficocianina.

Al calcular la  $K_{av}$  para AFC y leerla en la recta calibrada se tiene un valor aparente de  $\approx 140\ 000$ , valor que presupone un cierto grado de asociación molecular, dato que al discutirse a la luz de los resultados de electroforesis en DSS y donde se halla un peso molecular de 70 000 para la estequiometría propuesta  $\alpha:\beta$  3:2, significaría una doble agregación.

Relación FC/AFC de las fracciones obtenidas de la cromatografía en hidroxilapatita

Se buscó la relación FC/AFC en los pigmentos aislados cromatográficamente, provenientes de los ficobilisomas disociados para compararse con la relación encontrada en el complejo asociado.

Para esto se hizo el tratamiento que Bennett y Bogorad (1973) han propuesto para calcular la proporción de FC y AFC a partir de sus coeficientes de extinción a las densidades ópticas de 615 y 652 nm.

$$FC = \frac{D.O._{615} - 0.474(D.O._{652})}{5.34}$$

$$AFC = \frac{D.O._{652} - 0.208(D.O._{615})}{5.09}$$

$$\text{Los valores de } \frac{\Sigma FC}{\Sigma AFC} \text{ de } \frac{29.6156}{4.0317} = 7.34$$

dieron una relación de 1 molécula de AFC por 7.34 de FC lo cual está en congruencia con los resultados obtenidos por los coeficientes de sedimentación en su aproximación estricta (8.54)

Los resultados de relación de pigmentos aislados y la relación de unidades integrantes del FBS asociado se afianzan recíprocamente.

Relación de estequiometrías de los pigmentos aislados y del ficobilisoma:

La estequiometría del ficobilisoma se calculó de acuerdo a los coeficientes de sedimentación tanto de la partícula íntegra obtenida como de las subunidades libres mediante la relación matemática encontrada.

En la primera suposición de partículas esféricas se obtiene un valor de 10.9 y la suposición más estricta de moléculas de proteínas, con forma de prolato y razón axial de 4, (Glazer, 1977) se calcula un valor de 8.54.

Esto significa que de 8.54 a 10.9 moléculas de proteínas forman un ficobilisoma en las condiciones estudiadas, datos recogidos en la tabla II.

A su vez el tratamiento por coeficiente de extinción hecho en las fracciones obtenidas de ficobilisomas disociados, ofrece una relación de FC:AFC de 7.34:1.

Tomando en cuenta los datos de Gantt (1975) para el modelo del ficobilisoma y las proporciones aproximadas de 10% de AFC en el sistema, se encuentra que:

Proporción de FC : 7.34

Proporción de AFC: 1

Total de moléculas presentes por ficobilisomas: 8.34 que está de acuerdo completo con la aproximación más rigurosa, encontrada por los valores de coeficientes de sedimentación ya referidos (8.54) dato que significa un peso molecular de 900 000 y que está de acuerdo con los datos de filtración en gel que ofrecen un valor de 1 190 000. Los datos por electroforesis con DSS, tomando en cuenta la estequiometría encontrada para la AFC, dieron un peso molecular de  $1.3 \times 10^6$ .

#### Reproducibilidad de resultados

Los resultados referentes a la caracterización de los pigmentos que se han descrito correspondieron a las fracciones de un ensayo cromatográfico con la excepción ya dicha del coeficiente de sedimentación de la AFC.

Dichos valores guardan consistencia con los otros tratados de forma similar.

El resumen de estos datos se recoge en la Tabla III y la caracterización lograda de los dos pigmentos implicados en el ficobilisoma se reseña también a continuación (Tabla IV).

TABLA II

ESTEQUIOMETRIA DEL FICOBILISOMA  
POR COEFICIENTE DE SEDIMENTACION

s<sub>20,w</sub>

Fbs	29.6 ± 4
FC	6.0
AFC	6.0

1a. Suposición: Partículas esféricas

Relación axial 1

$$n = \left( \frac{S_c}{S_u} \right)^{3/2} = 10.94$$

2a. Suposición: Unidades con

Relación axial 2

$$n = \left( \frac{S_c/S_u}{f/f_0} \right)^{3/2} = 10.30$$

3a. Suposición: Unidades con

Relación axial 4

$$= 8.54$$

ESTEQUIOMETRIA FC/AFC POR COEFICIENTES DE EXTINCION

D.O.<sub>615</sub> - 0.474 (D.O.<sub>652</sub>)

5.34

D.O.<sub>652</sub> - 0.208 (D.O.<sub>615</sub>)

5.09

FC presente 7.34  
AFC presente 1

$$\frac{\Sigma FC}{\Sigma AFC} = 7.34$$

Total de moléculas por  
FBS 8.34

TABLA III

FRACCIONES DE LAS COLUMNAS DE CROMATOGRAFIA

	1a.	2a.	3a.	4a.	5a.
<u><math>\lambda</math> de máxima absorbancia</u>					
FC	620	620	-	620	617
AFC	650	650	650	650	650
<u><math>\lambda</math> de máxima fluorescencia</u>					
FC	634	633	-	N.D.	640
AFC	660	653.5	660	N.D.	662
<u>Coefficiente de extinción <math>\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}</math></u>					
FC	56.2	42.5	N.D.	32.9	32.8
AFC	45.	36.8	46.6	34.5	53.3
<u>Coefficiente de sedimentación <math>s_{20,w}^s</math></u>					
FC	—	—	—	6.6	5.8
AFC	—	—	6.4, 6.0	6.2	

TABLA V  
CARACTERIZACION DE PIGMENTOS

Ficocianina:

Máximo de absorción	620 nm
Máximo de emisión de fluorescencia	640 nm
Coefficiente de extinción $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}$	56.2 % <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
Coefficiente de sedimentación [FC] 13.4 mg/ml	5.8 S
Bandas de electroforesis con SDS	
b:a	1:18.5      2
Peso molecular de 1 subunidad	14500
Peso molecular de la proteína completa (filtración en gel)	1.5 x 10 <sup>5</sup>

Aloficocianina:

Máximo de absorción	650 nm
Máximo de e. de fluorescencia	662 nm
Coefficiente de extinción $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}$	53.3 % <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
Coefficiente de sedimentación [AFC] 0.678 mg/ml	6.2 S
Número de bandas en electroforesis con DSS	2
Peso molecular de subunidades obtenidas por electroforesis con DSS	13500 y 14200
Estequiometría de subunidades $\alpha:\beta$	3:2

## DISCUSION

Los pigmentos auxiliares, ficocianina y aloficocianina son responsables del evento físico de la fotosíntesis en *Spirulina maxima* mediante la captura de energía luminosa, la formación de estados electrónicos  $\pi$  en esas moléculas y la transferencia unidireccional de esa excitación; dicha energía queda atrapada en la clorofila a del centro de reacción del PS<sub>II</sub> e inicia la etapa fotoquímica por medio de la transferencia de electrones de donadores a aceptores.

El grado de acoplamiento de los pigmentos antena pudo cuantificarse por la medición de la producción de oxígeno; el estado estacionario  $S_3$  es proporcional a la intensidad luminosa en la zona lineal de la curva de saturación de esta cinética, por tanto la producción de oxígeno, es una determinación justificada de la velocidad fotoquímica del PS<sub>II</sub> y una estimación relativa del tamaño de la antena del mismo fotosistema (Diner y col. 1979). Por espectros de eficiencia fotosintética se vió que los pigmentos que dan la mayor respuesta son las ficobilinas en una zona de 550-650 nm, en cambio los carotenos no reflejaron una actividad en la captura y transferencia de fotones que fuese mensurable en las condiciones experimentales empleadas.

El rango de absorción de los pigmentos auxiliares en cianofíceas presenta un hombro a 590 y  $\lambda$  máxima a 620 nm

para la ficocianina, 650 para la aloficocianina ( y 672 para la aloficocianina B encontrada ya en varias especies). Tal secuencia sugiere una interacción de orden físico entre ellos y la clorofila a que se absorbe en 675 nm, ya que sus espectros de fluorescencia y absorción se sobrepone uno a otro en forma progresiva. De hecho, la excitación que se genera en orbitales  $\pi$  se conduce de uno a otro pigmento por mecanismos de excitación débil del tipo resonancia dipolo-dipolo. Este proceso implica una organización interna a nivel de distancia entre los cromóforos, una orientación de los mismos y una sobreposición de frecuencia entre el donador y el aceptor.

La asociación sugerida por tales propiedades espectroscópicas se comprobó por los espectros de eficiencia fotosintética hallando una relación entre la zona del espectro que corresponde a las ficobilinas y la respuesta en la producción de oxígeno.

Cuando analizó la contribución de la ficocianina, los carotenos y la clorofila al rendimiento cuántico del  $PS_{II}$  (Tel-Or y Malkin, 1977) se observó que la ficocianina y la respuesta se vió muy restringida.

Los resultados obtenidos con luz monocromática de intensidades correspondientes a valores cercanos a 10 neinstenios/cm<sup>2</sup>, seg<sup>-1</sup> baja la proporción del estado de oxidación  $S_3$ , por eso el resultado de producción de oxígeno se vió muy disminuído ya que los dos factores eran pequeños.

La proporción de los pigmentos asociados puede medirse por patrones de inducción de fluorescencia (Malkin y Kok 1966). Este procedimiento de ver el cambio de la intensidad de fluorescencia con el tiempo desde  $F_0$  (fluorescencia constante) de bajo nivel hacia un estado estacionario  $F_\infty$ , en sistemas acoplados y no acoplados permitiría hacer una comparación ilustrativa. El grado de acoplamiento se juzga en función de la diferencia de la  $F_\infty - F_0$ . Entre mayor sea la diferencia, mayor será el grado de acoplamiento.

La fluorescencia variable, es decir  $F_\infty - F_0$  en función del tiempo, se debe a la clorofila a (Tel-Or y Malkin, 1977) y se vería aumentada al disminuir las trampas abiertas, llegando a un máximo cuando todo Q esté reducido y por tanto la energía se disipe como fluorescencia y quede bloqueada la vía fotoquímica.

Otro aspecto que favorece la transferencia de energía de las ficobilinas a la clorofila es la naturaleza hidrofílica de las primeras y su localización en la zona externa de la lamela. Los lípidos polares de la membrana, el agua, las uniones de puentes de hidrógeno y fuerzas débiles no covalentes favorecen ciertas interacciones que promueven un estado conformacional del agregado de ficobilinas que mantienen orientados sus cromóforos de manera que hacen óptimo el proceso de transferencia de energía en directa proporción al grado de asociación, hasta la clorofila "expuesta" de Lavorel (1966) y

que después Malkin (1977) definió como fluorescente.

De modo que la interacción cromóforo-proteína-proteína es una contribución en apoyo del arreglo regular de subunidades con una orientación definida.

Las observaciones generales obtenidas en la estandarización de las condiciones en que se midió la producción de oxígeno condujeron a comprobar una relación entre la respiración del alga y la fotosíntesis, de modo que un parámetro indirecto de la viabilidad del alga fue el mantenimiento del consumo de oxígeno en oscuridad.

Van Norman y col. (1952) ya lo habían propuesto en conclusión de sus experimentos con isótopos pesados y naturales de oxígeno para discriminar los dos procesos.

El espectro de actividad fotosintética medido respondió al fenómeno global y no a respuestas por separado de cada uno de los fotosistemas, lo que hubiera involucrado una discriminación espacial del fenómeno y la contribución por separado de los pigmentos implicados en cada fotocentro.

En tal espectro se comprobó una transferencia de energía luminosa en las ficobilinas en cooperación con la clorofila que se manifestó como producción de oxígeno en las  $\lambda$  de absorción de esos pigmentos.

En dicho registro se observó una caída en el rojo y otra en el azul. Esto habla de una contribución muy baja de la clorofila y los datos obtenidos en el 675 parecen indicar que se trata de clorofila no unida directamente al centro de reac-

ción del  $PS_{II}$  posiblemente la que Malkin señala no fluorescente.

Muy probablemente también aquí se refleje clorofila del  $PS_I$  ya que se está midiendo un espectro de acción total, no excluyente del  $PS_{II}$ . y hay datos en *P. aeruginosa* que el 95% de la clorofila a se encuentra asociada al  $PS_I$  (Ley y Butler 1976).

La suposición antes mencionada sobre la presencia de pigmentos libres en las muestras del alga empleada, reduce la proporción de la máxima eficiencia en el proceso y por tanto el empleo de las trampas abiertas para hacer fotoquímica y que la transferencia de energía del  $PS_{II}$  al  $PS_I$  sea óptima. Si bien no puede decirse eso, se ve, sin embargo una respuesta cualitativa que identifica a las ficobilinas como efectores del proceso.

#### Morfología y localización del ficobilisoma

En el marco de referencia de los trabajos de Gantt (desde 1965 hasta la fecha) y de otros autores, los ficobilisomas guardan un arreglo interior y una periodicidad en la lamela.

Los resultados obtenidos en la localización del ficobilisoma de *Spirulina maxima* manifiestan ese patrón general de agregación intramolecular y de localización ordenada con ciertas diferencias menores.

En *S. maxima* se ha visto cierta heterogeneidad en el tamaño de las partículas *in vivo* que responden en promedio a

260 Å alcanzando límites superiores hasta 400 Å. *Anabaena sp.* que fue tomada como control presentó dimensiones semejantes pero más homogeneidad.

Para *Porphyridium cruentum* (rodoficea con ficobilisomas que contienen FE, FC y AFC) Gantt en 1972 refirió dimensiones de 450 Å para el eje mayor de un prolato y 300 Å para el eje menor.

En primer lugar hay semejanza en los tamaños observados en las dos cianofíceas; mientras que *P. cruentum* es rodoficea y contiene tres tipos de pigmentos, se podría presuponer que su templado fuera diferente y su tamaño más grande. Pareciera que la limitación de nutrientes pudiese afectar el tamaño del ficobilisoma, pero los estudios de desagregación llevaron a proponer una estequiometría dada y si el medio está limitado de nitrógeno se ve una reducción en el número de ficobilisomas y no en el tamaño de los mismos (Gantt 1975).

Otra alternativa más plausible sería que el ficobilisoma de *Spirulina maxima* se obtuviese un tanto disociado.

La distancia calculada entre los ficobilisomas fue de 40 nm, lo que guarda relación con los resultados de 60 nm que midieron Lefort-Tran en 1973 y T. de Marsac en 1977 para *Porphyridium cruentum*.

Además, en el estudio de *S. maxima* se empleó un cultivo natural en cambio el de *Anabaena sp.* se sometió a luz deficiente con lo cual se incrementa el nivel de pigmentos.

Se pudo constatar que el descenso de temperatura así como el de la fuerza iónica del amortiguador, inducía una desagregación en estas estructuras; cuando se congelaron las muestras de manera previa al tratamiento para su observación, los ficobilisomas desaparecieron en su totalidad o en gran parte.

La obtención de estas estructuras fue satisfactoria bajo las siguientes condiciones experimentales: alta fuerza iónica, concentración de la muestra alrededor de 30-50  $\mu\text{g/ml}$  y temperatura ambiente durante todo el proceso, datos que recientemente han sido ya publicados (Gantt 1979).

La identificación de los ficobilisomas se hizo bajo los criterios espectroscópicos tanto de absorción como de fluorescencia. Se registró la absorbancia de la FC y la AFC así como la primera derivada sin hallar respuesta de clorofila contaminante, pues al excitar la muestra a 442 nm, no se recogió fluorescencia correspondiente a este componente (685 nm) y en el registro de su densidad óptica o de la derivada tampoco se tuvo una señal, como tampoco se vió algún dato de otros polipéptidos con coeficiente de extinción perceptible.

Cuando se calculó teóricamente el número de moléculas de proteína contenido en un ficobilisoma de las proporciones mencionadas y asumiendo una forma esférica de él, así como teniendo en cuenta las dimensiones y forma de las proteínas FC y AFC (Glazer 1977) se tuvo un número máximo de 27 moléculas que se empastrarían sin dejar espacios vacíos. Este valor

se repitió cuando se hizo un modelo con monedas pues la semejanza es literalmente apropiada y se hallaron valores entre 27 y 28 unidades integrantes. Esto sólo pretendió estimar un número tentativo de entidades que se empacarían en un FBS, pero el hecho es que el peso molecular calculado por coeficiente de sedimentación restringe esta suposición en límites más reales.

El valor de 29.6 S obtenido significa un peso molecular aproximado de 900 000 si se asume que es esférico y que no está hidratado. El número de 22-28 moléculas de proteína con un P. M. por unidad de 125 000 (Gantt y col. 1974) daría un peso molecular conservador de  $2.7 \times 10^6$ , lo cual sobrepasa el valor correspondiente al coeficiente de sedimentación hallado.

En cambio cuando se hace un análisis del coeficiente de sedimentación del FBS en relación a los coeficientes de sedimentación de las proteínas obtenidas por disociación del complejo, los resultados obtenidos indicaron que entre 8 y 9 moléculas de proteína formarían el ficobilisoma de las características planteadas.

Esto guarda coherencia con el peso molecular ya citado, con el tamaño del ficobilisoma visto por microscopía electrónica y con el análisis de coeficiente de extinción. (Benett y Bogorad 1973) o sea 87.5% de FC y 12.5% de AFC, aunque estos valores se verían reducidos un poco si se incluye la AFC B (sólo sugerida por relación de espectroscopía de fluorescencia) y los posibles polipéptidos que integran el ficobilisoma y que

se sugirieron levemente en algunos registros electroforéticos.

Los resultados de estequiometría de pigmentos de *Porphyridium cruentum* deducidos por cinética de disociación y empleo de anticuerpos (Gantt y col. 1976a) indican una proporción de 84% de FE, 11% de FC y 4% de AFC.

La integridad funcional del complejo, medida por espectros de fluorescencia permitió conocer que hay transferencia de energía en el sistema ya que al excitar a 590 nm se logró una emisión de fluorescencia a 662 nm que habla de dos componentes FC y AFC que actúan transfiriendo energía uno al otro.

La excitación a 550 nm no altera la respuesta cualitativa de la fluorescencia, pero sí disminuye su intensidad, por lo que se escogió la primera y significa que la luz de 550 ó 590 nm es tomada por la FC y la energía es conducida por sus cromóforos hasta los de AFC que emiten a 662 nm. También los espectros de excitación del aceptor (675 nm) fueron índice sensible de la transferencia, manifestándose como cooperadores de la respuesta la FC (590 y 620 nm) y AFC (650 nm).

La diferente accesibilidad propuesta para los cromóforos favorece una transmisión tridimensional que es más real. De acuerdo con estos conceptos de cromóforos sensibilizadores (ocultos) y fluorescentes (accesibles) la secuencia para *Spirulina maxima* de  $FC_s$  —  $FC_f$  —  $AFC_s$  —  $AFC_f$  — clorofila es muy atractiva de un estudio para su comprobación u objeción.

Sin duda que un aspecto importante en la eficiencia del proceso de transferencia energética es la agregación de la FC y de la AFC y el número de moléculas de cada proteína que for-

man un ficobilisoma; de la primera, Scott y col. (1965) han citado que el pH cercano a la neutralidad y algunos iones favorecen una agregación en hexámeros y que el estado de mayor agregación promueve desplazamientos espectroscópicos hacia el rojo (Gray y Gantt 1975). Los resultados en el acoplamiento de los ficobilisomas en diferentes estadios de crecimiento y nutrición, guardaron semejanza, de modo que estas diferencias de estados metabólicos no afectaron las respuestas ya citadas lo que afianza la proposición de Gantt (1975) de una organización en el templado, lo que genéticamente es coherente con otro tipo de ensambles como el de proteína de fagos y de ribosomas.

El número de unidades encontrado fue entre 7 a 8 moléculas de FC y 1 de AFC, calculado como ya se dijo por concepto de coeficiente de sedimentación y coeficiente de extinción.

La proporción de FC:AFC encontrada de 7.34:1 permite establecer una semejanza con la de Anacystis nidulans de 6:1 y asumir que el tritón X-100 no provoca agregación de los complejos en el método de separación; esto sí sucede con otros sistemas que tienen una proporción muy alta de AFC. (Glazer y col. 1979). De otro modo el dato reflejaría un coeficiente de sedimentación adulterado por este concepto.

La proporción mínima de AFC/FBS implica una estricta conformación interior de la AFC, así como su orientación en

relación a la FC, hechos que se comprueban en la eficiencia del fenómeno de transferencia energética.

Otra cuestión muy interesante al análisis es la relación del ficobilisoma con la membrana; en 1975 Gantt presentó una relación de 2000 moléculas de clorofila por ficobilisoma añadiendo una estimación de 70 a 80 moléculas proteicas por ficobilisoma de 250 000 de peso molecular por unidad; estas proporciones significan un peso total de 17.5 a  $20 \times 10^6$  con un coeficiente de sedimentación del orden de 100 S. Cuando se calcula el volumen de las subunidades cilíndricas de  $30 \times 120 \text{ \AA}$  y el volumen del ficobilisoma esférico se tiene un diámetro de 358-375  $\text{\AA}$ , dato en concordancia con las dimensiones referidas para *Porphyridium cruentum* en 1974. Si se toma el peso molecular por unidad de 125 000 como reportó la misma autora en 1974, el peso molecular total se reduce a la mitad y por consecuencia el coeficiente de sedimentación también disminuye, dando un valor que parece más acertado.

Además si se han calculado 250 moléculas de clorofila por centro de reacción y la relación de clorofila a ficobilisoma fuera de 2000:1 significaría la presencia de 1 FBS por 8 centros de reacción para abastecer de energía luminosa implicando además el problema topológico que esto trae consigo. Esta conclusión no está de acuerdo con las observaciones de criograbado que ponen de manifiesto una disposición semejante en-

tre los FBS y partículas de membrana con clorofila que guardan una distribución homóloga ni los datos de separación entre centro de reacción de  $PS_{II}$  de Wollman (1979) de 400 a 500 Å.

Se podría pensar en la eficiencia de un ficobilisoma para abastecer de energía a ocho centros de reacción pero se ve que el modelo del ficobilisoma no es adecuado para proponer intercomunicación de energía luminosa entre varios centros de reacción pues no hay contacto físico entre ellos y no es favorable la migración de energía de la  $cl\ a$  hasta la FC o FE que tendría que verificarse. Sin embargo, Joliot en 1973, concluyó de unos experimentos en una mutante de *Chlamydomonas* con antena  $cl\ a/cl\ b$  que se interconectaban por lo menos tres unidades fotosintéticas.

Al estudiar la disociación de las estructuras de ficobilisomas por las perturbaciones en los enlaces provocados por descenso de temperatura, dilución a concentraciones menores de 30-40  $\mu\text{g/ml}$  y el descenso de fuerza iónica, se vió que al destruir la organización espacial se interrumpió el fenómeno de transferencia de energía y de ese modo la respuesta en la fluorescencia se manifestaba con el valor de la FC libre que iba aumentando en función del tiempo. El efecto de la temperatura condujo a inferir la implicación de enlaces hidrofóbicos en el estado de agregación de esas proteínas entre si.

De modo que se comprobó ciertos grados de acoplamiento en el ficobilisoma; a) a nivel de las subunidades ( $\alpha \beta$ ) de la AFC (electroforesis con DSS, b) agrupaciones ( $\alpha_3 \beta_3$ ) de AFC para formar dos entidades de éstas (resultados de filtración en gel) o bien ( $\alpha_6 \beta_6$ ), c) agrupaciones ( $\alpha \beta$ ) de FC (resultados de electroforesis con DSS), d) asociaciones ( $\alpha \beta$ )<sub>6</sub> (filtración en gel), e) asociaciones entre FC y AFC (coeficiente de sedimentación, transferencia de energía), f) se presupone también la asociación entre la AFC B (dato sugerido por fluorescencia comparativa) y la AFC (desplazamiento en la fluorescencia de 662 a 660 nm en la disociación de FBS).

El corrimiento hacia el azul no representa una desnaturalización del sistema sino un desacoplamiento, porque cuando se analiza el espectro de absorción no hay un decremento.

La organización del ficobilisomas a nivel de estequiometría, templado y ensamble no ha sido resuelta en su totalidad. El acoplamiento de esta estructura a la membrana en un orden claramente definido, implica una serie de factores precisos y conjugados entre sí donde se pronuncian interacciones lípido-proteína y se vinculan a componentes específicos de la membrana incluyéndose funciones reguladoras por demás complejas.

#### Caracterización de los pigmentos

La caracterización de los pigmentos del ficobilisoma permitió reconocer a la ficocianina y a la aloficocianina como

los componentes del mismo. Hay cianofíceas que además de contener estas dos proteínas, también registran ficoeritrina, incluso Dumartrait (1976) presume que se localiza en *Spirulina plantesis*; este no fue el caso de *Spirulina maxima* en la que no se encontró ésta por criterio de espectroscopía de absorción, de fluorescencia y de acción, así como por cromatografía o electroforesis.

Los valores de máxima longitud de onda de absorbancia y fluorescencia tanto para la ficocianina como para la aloficocianina están de acuerdo con los resultados presentados en la literatura: absorbancia de FC: 620 nm, fluorescencia: 640 nm. Para la aloficocianina: absorbancia de 650 nm y fluorescencia de 660 nm. (Gantt y col. 1974, Bogorad, 1975 y Glazer 1977).

Como han analizado Bryant y col. (1978) dichas propiedades espectroscópicas dependen de la naturaleza química exacta del grupo prostético unido covalentemente, de la influencia del medio, del número de cromóforos que según Williams y col. (1978) han propuesto uno para la subunidad  $\alpha$  y dos para la subunidad  $\beta$  de la ficocianina y Glazer (1977) a su vez ha citado un cromóforo para cada una de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la aloficocianina.

Tal modulación de cromóforos se ve influenciada por interacciones no covalentes entre las bilinas unidas y la proteína en su conformación nativa y el estado de agregación de las proteínas, así como la naturaleza química del cromóforo y la pertur-

bación inducida por el enlace entre las bilinas y la cadena polipeptídica.

Los autores están de acuerdo en la identidad del cromóforo de FC y de AFC y Brown y col. (1977) señalan que al romper la interacción cromóforo-proteína con urea 8 M, se obtiene una banda a 660 nm que corresponde a la ficocianobilina en su forma de cloruro, por tanto la respuesta de 620 nm para la FC y 650 nm para la AFC se atribuye a interacciones cromóforo-proteína.

Ese hipsocromismo puede deberse a cambios en las funciones de onda de los electrones implicados en la transición óptica al interaccionar con moléculas vecinas o con proteínas o lípidos de la membrana.

Por los criterios de espectroscopía de absorción o de fluorescencia no se tuvo evidencia de aloficocianina emisora mas allá de 662 nm, posiblemente por su baja proporción, pues L. y Butler (1977) la encontraron en *Porphiridium cruentum* en una proporción de 1/15 de la AFC y esto limita mucho su detección cuantitativa.

Por métodos electroforéticos se localizaron dos bandas para la FC con P.M. cercano a 14500 y para la AFC otras dos, llamando  $\alpha$  a la de mayor migración y peso molecular de 13500 y  $\beta$  a la de menor movilidad y P.M. de 14200 con una relación  $3\alpha:2\beta$ . la cual está de acuerdo a los valores reportados en la bibliografía (Bennett y B. 1971, Glazer 1977).

Estas subunidades tienden a asociarse para formar monómeros ( $\alpha \beta$ ) (esta notación fue hecha anterior al reporte estequiométrico de Zilinskas en 1978 de  $2\alpha:3\beta$ . Como la relación es diferente de 1:1 cabe una aclaración de lo que se llamó monómero  $\alpha \beta$ ) estos a su vez se asocian según las condiciones de pH, fuerza iónica y concentración para formar hexámeros en el caso de la FC:  $(\alpha \beta)_6$  y trímeros para la AFC  $(\alpha \beta)_3$ . (Glazer, 1977). El valor encontrado para el coeficiente de sedimentación de la AFC de 6.2 significa un alto grado de asociación en las condiciones de pH 7.0. Hay observaciones que el pH afecta la asociación *in vitro* de esta proteína hallando valores de 2.8S a pH entre 3.5-4.0 (Ohad y col. 1980).

Este arreglo desplaza el máximo de absorción hacia el rojo aumentando también el coeficiente de extinción. De una manera semejante el mayor estado de agregación también se manifiesta en el valor del peso molecular de las proteínas; cuando se varía la condición de pH de 5 a 7 se han encontrado diferencias de casi 50% (Glazer y col. 1973b).

D. y Teale (1970) y Glazer (1977) han hecho responsables de la absorción a 600-605 nm a los cromóforos sensibilizadores presentes preferentemente en la subunidad  $\beta$ , mientras que los que absorben en 630-635 nm son los fluorescentes y están en la  $\alpha$ .

Puede pensarse que los cromóforos de la subunidad  $\beta$  reaccionan primero a la luz y esta excitación se canaliza hacia

los cromóforos "f" presentes en subunidades  $\alpha$  que responden a la fluorescencia.

Los autores consideran plausible una diferencia química entre los dos tipos de cromóforos y se sabe que en C-FC hay el doble de cromóforos cosechadores, además han obtenido cambios de dicroísmo circular que apoyan la fuerte interacción de los cromóforos.

Además, los mismos investigadores han descrito cierta orientación de los cromóforos situando los "f" de manera expuesta y los "s" menos accesibles.

Los experimentos de la influencia del pH sobre la agregación de AFC *in vitro* afianzan el dato que la asociación de esta proteína se realiza por una gran proporción de enlaces hidrofóbicos.

De igual modo en la periferia se ve influencia de puentes de hidrógeno y fuerzas electrostáticas sobre la unión de estas subunidades  $\beta$ , sin conocer si esta unión es con las subunidades  $\alpha$  para formar los monómeros o con otras subunidades  $\beta$  para formar los hexámeros.

Se podría especular de acuerdo a la funcionalidad propuesta de captar luz, si de manera predominante las subunidades  $\beta$  miran hacia el exterior, pero si se incluye el dato de poca accesibilidad de cromóforos "s" presentes de manera mayoritaria en las subunidades  $\beta$ , quizá algunas zonas de  $\alpha$  también lo hagan. Otra posibilidad puede ser que las dos subunidades

compartan los dos tipos de cromóforos aunque uno de ellos sea predominante. Parece presentarse cierto compromiso que sólo puede resolverse con estudios ulteriores analizando la topología y un recurso puede ser la titulación de cromóforos en disociación y reconstitución, medidos por fluorescencia.

Si los cromóforos presentes en la AFC también fuesen de dos tipos con respuestas espectroscópicas diferentes, equivalentes a los de FC de 608 y 630 nm, la respuesta se reflejaría en la fluorescencia. Gysi (1974) ya señaló que la subunidad  $\alpha$  de la C-FC de *Mastigocladus 1*. tiene mayor fluorescencia hacia el rojo que la  $\beta$ .

En el caso de disociación de subunidades con cromóforos "f" de AFC, la fluorescencia se verá perturbada desplazándose hacia el azul: si se pierden los "s" sucede algo semejante con un mayor corrimiento, pues falta un intermediario en la transferencia de energía. Para el caso de ficobilisomas intactos, esto sería poco probable, partiendo del modelo de Gantt en que la aloficocianina está protegida en el centro del complejo.

Cuando se midió la fluorescencia de los ficobilisomas intactos y se encontró dato de fluorescencia de ficocianina, observado por el pico a 662 nm que no es totalmente simétrico, sino con una mayor área hacia la zona del azul, es decir de la FC, estaba indicando que el proceso medido en esa situación tenía una eficiencia menor que el 100%, probablemente por cierta disociación del sistema, además en ese dato se reflejaba

la ficocianina no acoplada y la sintetizada *de novo* que aún no se incorporaba al ficobilisoma.

Si han disminuído las subunidades con cromóforos "s" o "f" de la FC, la respuesta de fluorescencia será menor aunque haya suficientes subunidades con "s" o "f" de la AFC y la respuesta no llega a verse en 678 nm.

La disociación de la FC influye en el proceso de transferencia de energía; *in vivo* la asociación puede ser más alta y el procedimiento de obtención provocar cierto cambio conformacional y/o la disociación retroalimentándose estos efectos que se manifiestan como disminución del valor de transferencia *in vitro*, pero que pudiera ser mas alta *in vivo*.

La estequiometría encontrada para la AFC de *S. maxima* de  $\alpha:\beta$  3:2, tomando como subunidades  $\alpha$  la de peso molecular mayor y por  $\beta$  el componente menor, tiene paridad con el dato que en 1978 presentaron Zilinskas y col. en *Nostoc sp.* en el componente llamado AFC I responsable de máxima fluorescencia en 678 nm: ellos llaman  $\alpha$  al componente de mayor migración y  $\beta$  al de menor movilidad y citan la relación 2 :3 .

No se tuvieron los espectros de absorción de tales subunidades para su discriminación en el visible, pero la subunidad mas pesada manifiesta mayor respuesta a la luz y quizá eso signifique interacciones que favorezcan orientación de los cromóforos o el propio estado de agregación de esta proteína.

A lo largo de muchos trabajos se pensó que la respuesta espectroscópica de 672-678 nm propuesta para la AFC B sólo pudiera ser señal de la agregación ya que varios autores (Gray y Gantt 1975,, Brown y col. 1975, 1977, y otros) lo habían propuesto en base a sus datos experimentales pero Ley y Butler dan evidencias que es un componente diferente, pues lo identifican por electroforesis con DSS, de acuerdo a su punto isoeléctrico, inmunológicamente y comparan sus espectros de absorción y fluorescencia con cristales de alofococianina donde el grado de asociación es máximo.

A pesar que en este trabajo no se obtuvo ese componente, cuando se analizan los espectros de fluorescencia de los pigmentos libres y de los ficobilisomas asociados y disociados, se puede ver una zona que no coincide entre ficobilisomas asociados y AFC, lo cual puede sugerir la proposición de otro componente que fuese responsable de emisión hacia el rojo, pues es hacia esa zona donde existe la diferencia. Se hicieron esfuerzos por encontrar ese componente haciendo mediciones de espectros de excitación y no se registró señal que lo comprobara.

El sistema colector de energía luminosa que es el ensamblaje protéico del ficobilisoma ha permitido en las cianobacterias a lo largo de millones de años.

La evolución de los pigmentos antena en las plantas superiores ha logrado una economía energética sustituyendo

estas moléculas complejas por otra mucho más sencilla como es la clorofila b. La adaptación de una célula al medio a veces se realiza mediante una variación molecular o como agregación o de una manera más elaborada como la presencia de otra molécula.

## RESUMEN

Se midió la influencia de los pigmentos auxiliares en la fotosíntesis de *Spirulina maxima* por espectros de eficiencia fotosintética y se encontró que los pigmentos que absorben entre 550 y 650 nm, es decir las ficobilinas, son los principales responsables del proceso.

Tales pigmentos se encuentran acoplados en ficobilisomas y de ese modo realizan la transferencia de energía luminosa con alta eficiencia.

La funcionalidad del ficobilisoma aislado se midió por espectros de fluorescencia y al registrarse la fluorescencia de la aloficoanina, se comprobó la transferencia de energía entre sus componentes.

La localización de estos pigmentos asociados se hizo por microscopía electrónica encontrando arreglos moleculares, situados sobre la lamela tilacoidal de 250 Å de diámetro, separados entre sí unos 400 Å.

Los resultados de la eficiencia fotosintética, de la transferencia de energía y la visualización de la distribución periódica de estructuras sobre la membrana del tilacoide comprueban el acoplamiento de estos pigmentos en sistemas ordenados tanto desde el punto de vista del complejo mismo como de éste y la membrana.

La estequiometría del ficobilisoma se analizó por medio de la relación entre el coeficiente de sedimentación del ficobilisoma para el que se encontró 29.6 S y del coeficiente de sus componentes: FC (5.8 S) y AFC (6.2 S), encontrando una relación de 8.54 unidades por complejo.

Se encontró la misma proporción por los coeficientes de extinción que dan una cifra de FC:AFC de 7.34:1; de modo que un ficobilisoma de *Spirulina maxima* en las condiciones de este estudio manifiesta que contiene 7 moléculas de ficocianina y 1 de aloficocianina.

El ficobilisoma dializado presentó esos dos componentes mayores, FC y AFC, pero la comparación de los espectros de fluorescencia de ficobilisomas asociados, de ficobilisomas disociados y los pigmentos libres sugiere la presencia de otro componente con comportamiento de emisión de fluorescencia entre 662 y 685 nm.

La ficocianina manifestó una  $\lambda$  de máxima absorción de 620 nm, emite fluorescencia a 640 nm, tiene un coeficiente de sedimentación de 5.8 S, presenta dos bandas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, de peso molecular de 14 500 y el peso molecular de la proteína se calculó en 150 000.

La aloficocianina ofrece su máxima absorbanza a 650 nm, fluoresce a 662 nm, tiene un valor de sedimentación de 6.2 S. El peso molecular de la unidad indica 140 000 lo cual manifies-

ta un grado de asociación porque los resultados de electroforesis en geles de poliacrilamida ponen en evidencia dos bandas con P.M. DE 14 200 y 13 500. Estas subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  guardan una estequiometría de 3:2.

BIBLIOGRAFIA

Arnon, D.I. (1974) Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. *Biochim. Biophys. Acta*, 357, 231-245.

Bennett, A., and Bogorad, L. (1971) Properties of subunits and aggregates of blue-green algal biliproteins. *Biochemistry*, 10, 3625-3634.

Bennett, A., and Bogorad, L. (1973) Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue green algae. *J. Cell Biol.*, 58, 419-435.

Bernardi, G., and Kawasaki, T. (1968) Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns. *Biochim. Biophys. Acta*, 160, 301-310.

Black, C.C. (1973) Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO<sub>2</sub> uptake. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 24, 253-286.

Blankenship, E. R., and Parson, W.W. (1978) The photochemical electron transfer reactions of photosynthetic bacteria and plants. *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 635-653.

Blinks, R. L. (1954) The photosynthetic function of pigments other chlorophyll. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 5, 93-114.

Bogorad, L. (1975) Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26, 369-401.

Brenner, S., and Horne, W. R. (1959) A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, 34, 103-110.

Brown, S. A., Foster, A. J., Voynow, V. P., ~~Frangblau, C.~~, and Troxler, F.R. (1975) Allophycocyanin from the filamentous cyanophyte *Phormidium luridum*. *Biochemistry*, 14, 3581-3588.

Brown, S. A., and Troxler, F. R. (1977) Properties and N-terminal sequence of allophycocyanin from the unicellular cyanophyte *Cyanidium caldarium*. *Biochemistry J.* 163, 571-581.

Bryant, A. D., Hixson, S. C., and Glazer, N. A. (1978) Structural studies on phycobiliproteins. III. Comparison on bilin-containing peptides from the  $\beta$  subunits of C-phycocyanin, R-phycocyanin and phycoerythrocyanin. *J. Biol. Chem.*, 253, 220-225.

Chanthavong, P. (1974) Ultrastructure de *Spirulina platensis* Diplôme d'études approfondis. Université de Dijon, France.

Clayton, K. R. (1970) Light and living matter. Vol. I. The physical part. Mc Grow-Hill Book Company.

Clément-Metral, J. D., and Lefort-Tran, M. (1971) Fluorescence transfer in glutaraldehyde fixed particles of the red alga *Porphyridium cruentum* [N] *FEBS Letters*, 12, 225-228.

Colbow, K. (1973) Energy transfer in photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 314, 320-327.

Dale, E. R., and Teale, J. W. (1970) Number and distribution of chromophore types in native phycobiliproteins. *Photochem. Photobiol.*, 12, 99-117.

Delpeuch, F., Joseph, A., et Cavalier, C. (1976) Consommation alimentaire et apport nutritionnel des algues bleues [*Oscillatoria platensis*] chez quelques populations du Kanem (Tchad). *Ann. Nutr. Alim.*, 29, 497-516.

- Diner, A. B., and Wollman, F. A. (1979) Functional comparison of the photosystem II center-antenna complex of a phycocyanin-less mutant of *Cyanidium caldarium* with that of *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiol.*, 63, 20-25.
- Douce, R., et Joyard, J. (1977) Le chloroplaste. *La Recherche*, 79, 527-537.
- Duysens, L. N. M. (1952) Transfer of excitation energy in photosynthesis. Tesis. Domplein 2, Utrecht. Netherlands.
- Edwards, G. E., and Walker, A. D. (1979) C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and CAM: some aspects of photosynthetic carbon assimilation. Packard Publishing Ltd. Sussex. In press.
- Edwards, R. M., and Gantt, E. (1971) Phycobilisomes of the thermophilic blue-green alga *Synechococcus lividus*. *J. Cell Biol.*, 50, 896-900.
- Elgsaeter, A., and Branton, D. (1974) Intermembrane particle aggregation in erythrocyte ghosts. *J. Cell Biol.*, 63, 1018-1030.
- Farrar, V. W. (1966) Tecuítlatl: a glimpse of aztec food technology. *Nature*, 211, 341-342.
- Förster, Th. (1960) Transfer mechanisms of electronic excitation energy. *Rad. Res. Suppl.* 2, 326-339.
- French, S. C., and Young, K. V. (1952) The fluorescence spectra of red algae and the transfer of energy from phycoerythrin to phycocyanin and chlorophyll, *J. Gen. Physiol.*, 35, 873-890.
- Gantt, E., and Conti, S. F. (1965) The ultrastructure of *Porphyridium cruentum*. *J. Cell Biol.*, 26, 365-381.

Gantt, E., and Conti, S. F. (1966a) Granules associated with the chloroplast lamellae of *Porphyridium cruentum*. J. Cell Biol., 29, 423-434.

Gantt, E., and Conti, S. F. (1966b) Phycobiliprotein localization in algae. Brookhaven Symp. Biol. B. National Laboratory, 19, 393-405.

Gantt, E., and Conti, S. F. (1969) Ultrastructure of blue-green algae. J. Bact., 97, 1486-1493.

Gantt, E., and Lipschultz, A. C. (1972) Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*. I. Isolation. J. Cell Biol, 54, 313-324.

Gantt, E., and Lipschultz, A. C. (1973) Energy transfer in phycobilisomes from phycoerythrin to allophycocyanin. Biochim. Biophys. Acta, 292, 858-861.

Gantt, E., and Lipschultz, A. C. (1974) Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*: Pigment Analysis. Biochemistry, 13, 2960-2966.

Gantt, E. (1975) Phycobilisomes: Light-harvesting pigment complex. BioScience, 25, 781-788.

Gantt, E., Lipschultz, A. C., and Zilinskas, B. (1976a) Further evidence for a phycobilisome model from selective dissociation, fluorescence emission, immunoprecipitation, and electron microscopy. Biochim. Biophys. Acta, 430, 375-388.

Gantt, E., Lipschultz, A. C., and Zilinskas, A. B. (1976b) Phycobilisomes in relation to the thylakoidal membrane. Brookhaven Symp. Biol. B. National Lab. Upton, N.Y. 28, 347-357.

Gantt, E., Lipschultz, A. C., Grabowski, J., and Zimmerman, K. B. (1979) Phycobilisomes from blue-green and red algae. Isolation criteria and dissociation characteristics. *Plant Physiol.*, 63, 615-620.

Glazer, N. A., and Fang, S. (1973a) Formation of hybrid proteins from the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of phycocyanins of unicellular and filamentous blue-green algae. *J. Biol. Chem.*, 248, 663-671.

Glazer, N. A., Fang, S., and Brown, M. D. (1973b) Spectroscopic properties of C-phycocyanin and of its  $\alpha$  and  $\beta$  subunits, *J. Biol. Chem.*, 248, 5679-5685.

Glazer, N. A. (1977) Structure and molecular organization of the photosynthetic accessory pigments of cyanobacteria and red algae. *Mol. Cell. Biochem.*, 18, 125-140.

Glazer, N. A., Williams, C. R., Yamanaka, G., and Schachman, K. H. (1979) Characterization of cyanobacterial phycobilisomes inwitterionic detergents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 6162-6166.

Govindjee, and Govindjee, R. (1975) Introduction to photosynthesis. *Bioenergetics of Photosynthesis*. Academic Press, 1-50.

Grabowski, J., and Gantt, E. (1977) Photophysical properties of phycobiliproteins from phycobilisomes: fluorescence lifetimes, quantum yields, and polarization spectra. *Photochem. Photobiol.*, 28, 39-45.

Gray, H. B., and Gantt, E. (1975) Spectral properties of phycobilisomes and phycobiliproteins from the blue-green algae *Nostoc* sp. *Photochem. Photobiol.* 21, 121-128.

Griffith, O. M. (1976) Techniques of preparative, zonal and continuous flow ultracentrifugation. Spinco Division. Beckman Instruments. 2nd. Edition.

Guérin-Dumartrait, E., et Moyse, A. (1976) Caractéristiques biologiques des *Spirulines*. Ann. Nutr. Alim., 30, 489-496.

Gilbault, G. G. (1973) Practical fluorescence, theory, methods, and techniques. Marcel Dekker, Inc. N. York.

Gysi, J., and Zuber, H. (1974) Isolation and characterization of allophycocyanin II from the thermophilic blue-green algae *Mastigocladus laminosus* cohn. FEBS Letters, 48, 209-213.

Hinkle, C. P., and Mc Carty, E. R. (1978) How cells make ATP. Scien. Am., 238, 104-121.

Horne, W. R., Breener, S., Watson, A. P., and Wildy, P. (1959) The icosahedral form of an adenovirus. J. Mol. Biol., 1, 84-86.

Joliot, P., Bennoun, P., and Joliot, A. (1973) New evidence supporting energy transfer between photosynthetic units. Biochim. Biophys. Acta, 305, 317-328.

Joliot, P., and Kok, B. (1975) Oxygen evolution in photosynthesis. Bioenergetics of Photosynthesis. Academic Press, 388-411.

Knox, S. R. (1975) Excitation energy transfer and migrations, theoretical considerations. Bioenergetics of Photosynthesis. Academic Press, 189-192.

Krogmann, W. D. (1973) The biochemistry of green plants. Foundations of Modern Biochemistry Series. Prentice-Hall. New Jersey.

Kwok, K. H., Ulrich, E. L., Krogmann, W. D., and Gómez, L. C.

(1979) Isolation of photosynthetic catalysts from cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 545, 236-248.

Laemli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 227, 680-685.

Lavorel, J. (1966) The mechanisms of quanta accumulation and photochemical processes in photosynthesis. Louis de Broglie (Ed) *Wave mechanisms and molecular Biology*. Addison-Wesley, Netherlands, 150-169.

Lefort-Tran, M., Cohen-Bazire, G., et Pouphe, M. (1973) Les membranes photosynthétiques des algues à biliprotéines observées après cryodécapage. *J. Ultrastruct. Res.* 44, 199-209.

Lehninger, L. A. (1977) *Biochemistry*. Worth Publishers Inc. New York, 509-542.

Lemasson, C., Tandeau de M. N., and Cohen-Bazire, G. (1973) Role of allophycocyanin as a light-harvesting pigment in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 3130-3133.

Ley, C. A., and Butler, L. W. (1976) Efficiency of energy transfer from photosystem II to photosystem I in *Porphyridium cruentum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 3957-3960.

Ley, C. A., and Butler, L. W. (1977) Isolation and function of allophycocyanin B of *Porphyridium cruentum*. *Plant Physiol.*, 59, 974-980.

Lowry, D. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

- Luft, H. J. (1961) Improvements in epoxy resin. Embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cyt.*, 9, 409-414.
- MacColl, R., Berns, S. D., and Koven, L. N. (1971) Effect of salts on C-phycocyanin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 146, 477-482.
- Mac Kinney, G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, 140, 315-322.
- Malkin, S., and Kok, B. (1966) Fluorescence induction studies in isolated chloroplasts I. Number of components involved in the reaction and quantum yields. *Biochim. Biophys. Acta*, 126, 413-432.
- Mitchel, P. (1967) Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria: natural fuel cells and polar cells. *Fed. Proc.*, 26, 1370-1379.
- Moor, H., and Mühlethaler, K. (1963) Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell Biol.*, 17, 609-628.
- Ohad, I., Jörg, H., Schneider, A. W., Gendel, S., and Bogorad, L. (1980) Light-induced changes in allophycocyanin. *Plant Physiol.*, 65, 6-12.
- O'hEocha, C. (1965) Biliproteins of algae. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 16, 415-434.
- Palade, E. G. (1952) A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.*, 95, 285-298.
- Reiland, J. (1971) Gel Filtration. *Methods Enzimol.*, 22, 287-321.

- Reynolds, E. S. (1963) The use of lead citrate and high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 208-212.
- Sabatini, D. D., Bensch, K., and Barnett, J. R. (1963) Cytochemistry and electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 19-58.
- Santander, G. R. (1968) Técnicas de microscopía electrónica en Biología. Ed. Aguilar. Madrid, 44-60.
- Sauer, K. (1975) Primary events and the trapping of energy. *Bioenergetics of photosynthesis*. Academic Press, 116-175.
- Scott, E., and Berns, D. (1965) Protein-protein interaction. The phycocyanin system. *Biochemistry*, 4, 2597-2606.
- Spector, M., and Winget, D. (1980) Purification of a manganese-containing protein involved in photosynthetic oxygen evolution and its use in reconstituting an active membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 957-959.
- Stryer, L., and Haugland, P. R. (1967) Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 58, 719-726.
- Stryer, L. (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Ann. Rev. Biochem.* 47, 819-846.
- Tel-Or, E., and Malkin, S. (1977) The photochemical and fluorescence properties of whole cells, spheroplast and spheroplast particles from the blue-green algae Phormidium luridum. *Biochem. Biophys. Acta*, 459, 157-174.
- Tandeau de M., N., and Cohen-Bazire, G. (1977) Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Van Holde, E. (1971) Physical Biochemistry. Prentice-Hall Inc. New Jersey, 98-121.

Van Norman, W.R., and Brown, H.A. (1952) The relative rates of photosynthetic assimilation of isotopic forms of carbon dioxide. *Plant Physiol.*, 27, 691-707.

Vega, A. E. (1976) Determinación de la velocidad específica de crecimiento del alga verde-azul *Spirulina maxima* en diferentes condiciones experimentales. Tesis. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México.

Walsby, A. E. (1977) I vacuoli gassosi delle alghe azzurre. *Le Scienze. Ed. italiana di Sci. Am.*, 112, 78-89.

Wang, T. R., Stevens, R. C. L., and Myers, J. (1977) Action spectra for photoreactions I and II of photosynthesis in the blue-green algae *Anacystis nidulans*. *Photochem. Photobiol.*, 25, 103-108.

Watson, L. M. (1958) Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cyt.*, 4, 475-478.

Wildman, B. R., and Bowen, C. C. (1974) Phycobilisomes in blue-green algae. *J. Bact.*, 117, 866-881.

Williams, P. V., and Glazer, N. A. (1978) Structural studies on phycobiliproteins. I. Bilin-containing peptides of C-phycocyanin. *J. Biol. Chem.*, 253, 202-211.

Witt, H. T. (1975) Primary acts of energy conservation in the functional membrane of photosynthesis. *Bienergetics of photosynthesis*. Academic Press Inc. London, 493-554.

Wollman, F. A. (1979) Ultrastructural comparison of *Cyanidium caldarium* wild type and III-C mutant lacking phycobilisomes. *Plant Physiol.*, 63, 375-381.

Yamanaka, G., Glazer, N. A., and Williams, C. R. (1978) Cyanobacterial phycobilisomes. *J. Biol. Chem.*, 253, 8303-8310.

Zelitch, I. (1979) Photosynthesis and plant productivity. *Chem. Enger. News*, 57, 28-48.

Zilinskas, A. B., Zimmerman, B. K., and Gantt, E. (1978) Allophycocyanin forms isolated from *Nostoc* sp. phycobilisomes. *Photochem. Photobiol.*, 27, 587-595.

## APENDICE

Para conocer la respuesta de la producción de oxígeno en función de la longitud de onda, fue necesario estandarizar las condiciones de trabajo.

Cantidad de alga empleada:

Se hicieron mediciones de producción y consumo de oxígeno empleando cantidades crecientes de alga. Esta se resuspendió en un amortiguador de fosfatos de potasio mono y dibásico 30 mM pH 10.0, bicarbonato de sodio 50 mM, manitol 0.5 M y temperatura de 30°C. Se intentó con este pH sabiendo que el alga crece en medios con alta alcalinidad y se adicionó manitol para mantener isotónica la solución.

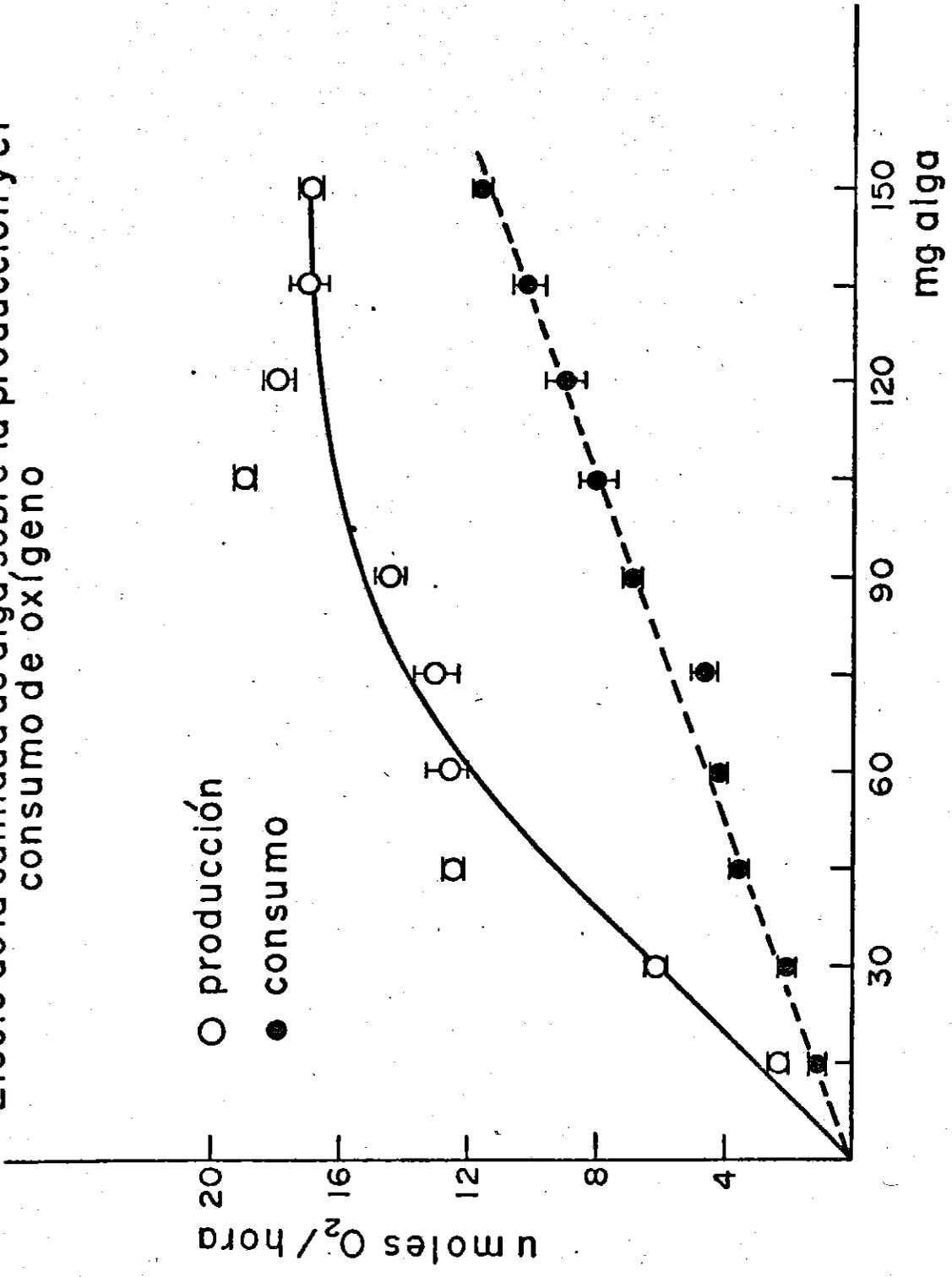
La producción de oxígeno siguió un comportamiento de curva de saturación. Una zona donde la respuesta es proporcional a la cantidad de alga y depende de ésta y otra donde la cantidad de oxígeno no depende ya de la cantidad de alga que ha ido aumentando, sino que la luz que incide sobre la muestra es la responsable del efecto. A pesar que aumenta la cantidad de alga, la luz que interacciona con la muestra es aproximadamente constante y se manifiesta como saturación en la respuesta del sistema.

El consumo aumentó en proporción a la cantidad de alga, probándose hasta 225 mg de la misma (dato no mostrado) lo que habla que este comportamiento es independiente de la luz y

Figura 1'. Medición de la producción de oxígeno dependiente de luz y el consumo en la oscuridad como  $\mu\text{mol}$  de oxígeno/h en función de la cantidad de alga completa empleada.

La muestra se resuspendió en amortiguador de fosfato 30 mM bicarbonato de sodio 50 mM, manitol 0.5 M pH 10.0 a la temperatura de 30°C. Las mediciones se hicieron en un polarógrafo y cada punto corresponde al promedio de cuatro determinaciones. Se empleó una lámpara de 25 w a una distancia de 2 cms.

Efecto de la cantidad de alga sobre la producción y el consumo de oxígeno



puede excluirse que se trata de una fotorrespiración.

Si el consumo se grafica como  $\mu\text{mol}$  de oxígeno/h. . mg de clorofila se tiene una línea recta que comprueba que permanece constante.

### Temperatura

La muestra contenía 90 mg de alga en un volumen total de 5 ml con amortiguador de fosfatos 30 mM, bicarbonato 50 mM manitol 0.5 M, pH 10. La temperatura se ajustó con un circulador de agua a 20, 25, 28 y 30°C. Cada punto experimental es el promedio de 4 respuestas del polarógrafo con desviación estándar entre 3.05 y 6.11.

La gráfica expresa una serie de experimentos, habiéndose hecho tres series equivalentes con diferentes muestras de alga.

Se midió el efecto de la temperatura sobre la respuesta de consumo y producción de oxígeno en un rango entre 20 y 30°C. Como la solubilidad del oxígeno se ve afectada por la temperatura, se hicieron correcciones dadas por la Ley de Henry.

$$K = P/X$$

donde K es la constante de solubilidad a determinadas temperaturas y su valor se registra en tablas,

P es la presión parcial del gas y

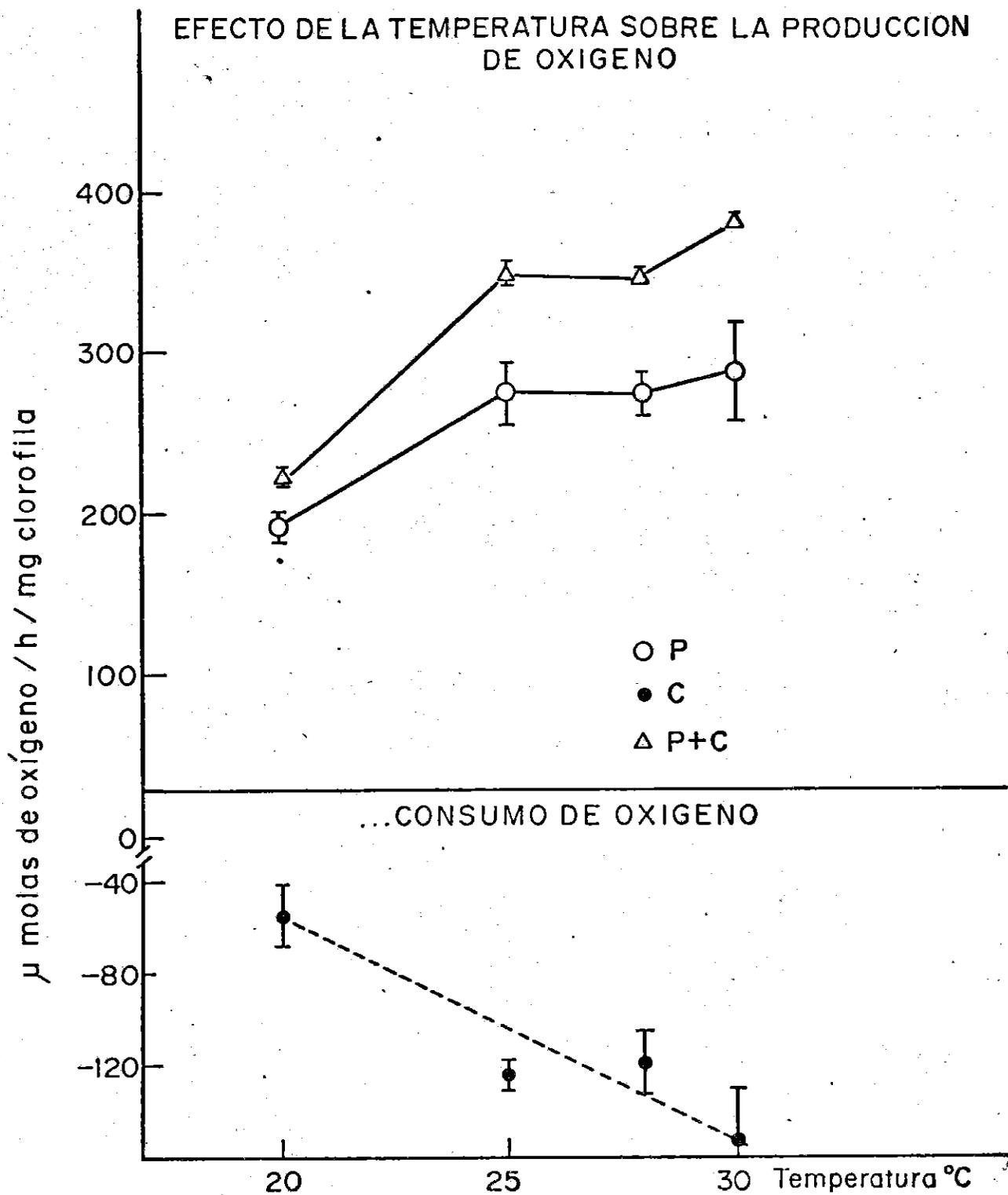
X es la fracción molar

Figura 2'. Dependencia de la producción de oxígeno en la luz y el consumo en la oscuridad.

Las otras condiciones son iguales que en la fig. 1'.

La cantidad de alga empleada fue 90 mg resuspendida en amortiguador de fosfatos descrito en la figura anterior. Cada experimento se repitió cuatro veces por serie.

### EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCCION DE OXIGENO



Al graficar ciertos valores se pueden interpolar algunos otros. De esa manera se encontró X para ciertas temperaturas y con ella se hicieron las correcciones necesarias.

Presión parcial de oxígeno: 20.946% de la presión atmosférica que es 592 mm Hg = 124.000

a 20°C  $K_2 = 2.95 \times 10^7$

$$2.95 \times 10^7 = \frac{(124)(55.49)}{X}$$

$$X = 2.3 \times 10^{-4} M$$

Para un volumen de 5 ml:

$$\begin{aligned} X &= 23 \times 10^{-7} \text{ átomo gramo de oxígeno} \\ &= 1.15 \text{ molas } O_2 \end{aligned}$$

Al multiplicar el dato de la pendiente por el factor que relaciona el tiempo de la medición a 1 hora se tiene el valor de la concentración de oxígeno medido/hora, resultados que se tienen en la fig. 2'

pH

Las variaciones en la respuesta al consumo y producción de oxígeno por efecto del pH se midieron empleando 90 mg totales de alga en un volumen de 5 ml de amortiguador de fosfatos 30 mM, bicarbonato de sodio 50 mM, manitol 0.5 M ajustando el pH indicado para cada experimento, siendo la temperatura de ensayo de 30°C.

La observación general en las tres series de experimen-

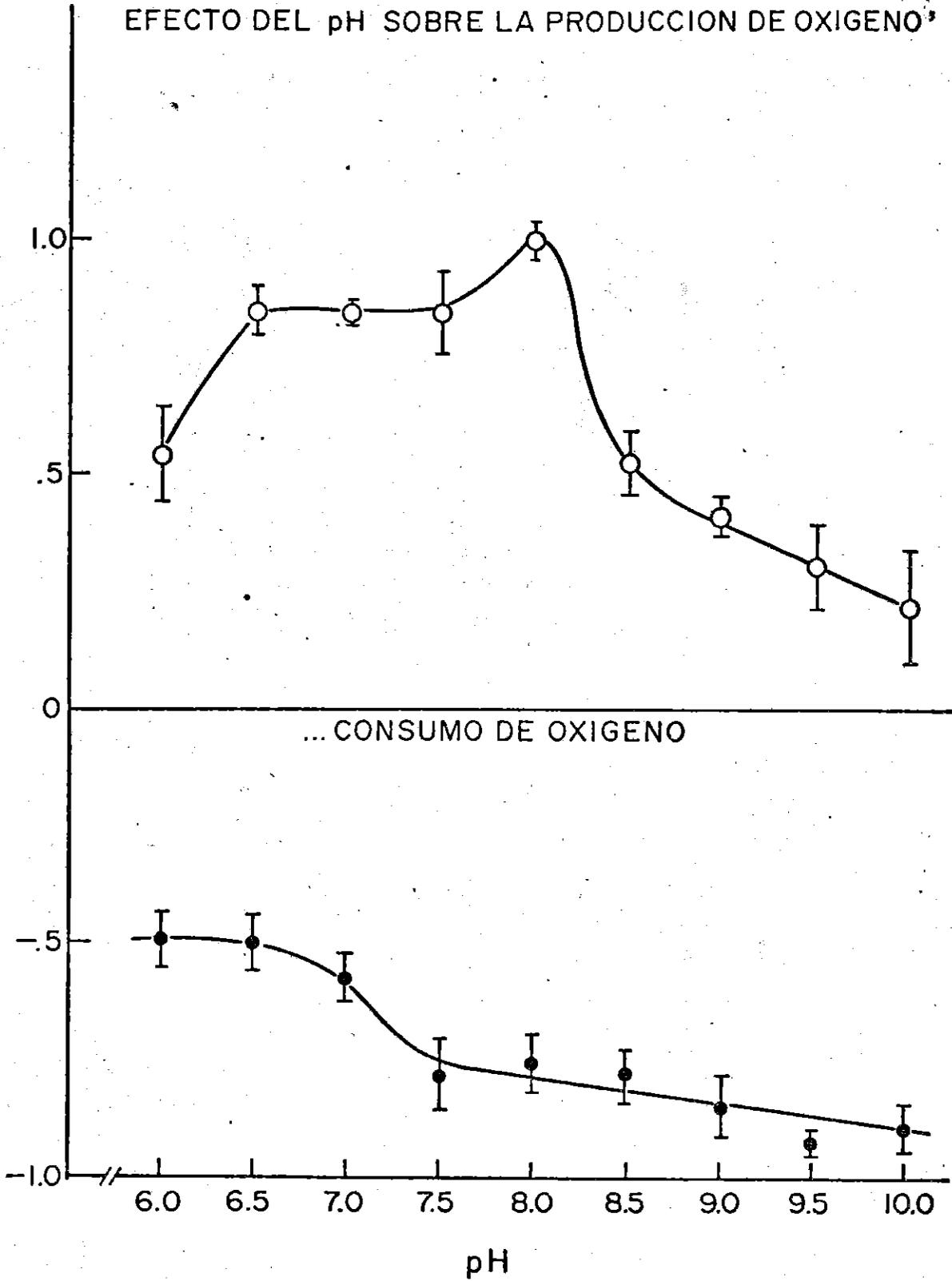
Figura 3'. El efecto del pH sobre la producción y el consumo de oxígeno se midió con el amortiguador de fosfatos ya dicho ajustando el pH en cada caso.

Los resultados graficados son el resumen de tres series de experimentos repitiendo en cada serie cuatro veces cada condición de pH ensayada. Dado que cada serie se hizo con diferente muestra de alga, los resultados por ser variables se normalizaron a 1.0 para la producción y 1.0 para el consumo.

Las otras condiciones experimentales son iguales que en la figura 1' .

### EFFECTO DEL pH SOBRE LA PRODUCCION DE OXIGENO

ACTIVIDAD FOTOSINTETICA NORMALIZADA



tos realizados fue un aumento del consumo en función del pH, en la producción un ascenso hasta pH 8.0 que fue el máximo y después un descenso. En la gráfica 3' se anota el resumen de ese comportamiento que fue normalizado a 1.0 tanto para la producción como el consumo ya que los resultados eran variables al provenir de distintas muestras de alga.

El valor máximo de producción a pH 8.0 se midió en intervalo de 30 min; si se hacen experiencias con duración de 2 h, el pH que mantuvo su respuesta fue el de 10.5.

#### Clorofila

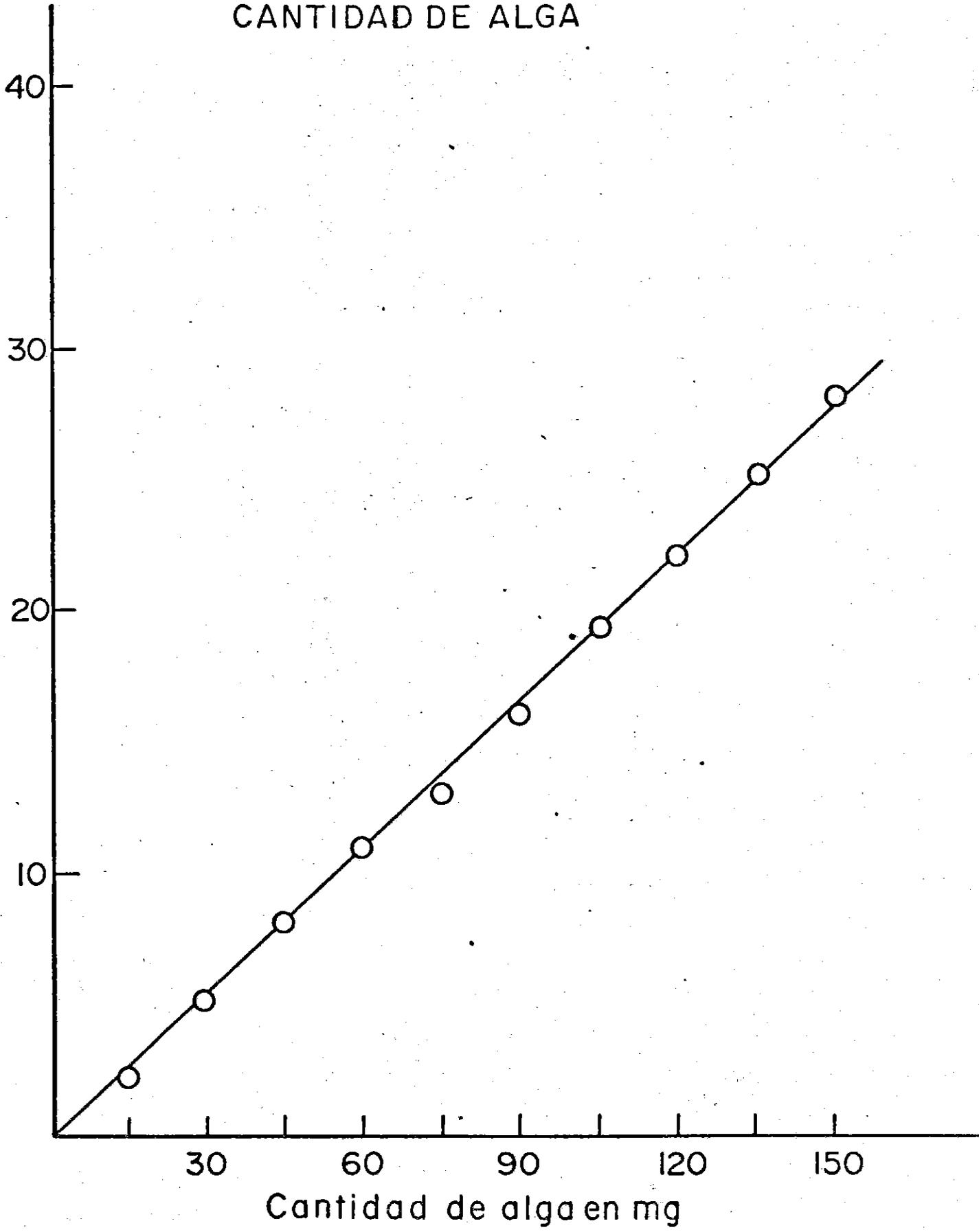
Como las respuestas de consumo y producción de oxígeno se dan en relación a la clorofila presente, se calibró el sistema midiendo la proporción de este pigmento en función de la cantidad de alga, encontrándose lineal como se ve en el trazo de la figura 4'. La cuantificación de clorofila se hizo por el método de Mac Kinney ya referido. Los resultados obtenidos provienen de alga del mismo día.

#### Intensidad Luminosa.

Se montó un dispositivo con agitación conectado a un diafragma, una ventana por la que pasó luz de una lámpara de xenón y un fotómetro que registró intensidad luminosa en unidades relativas desde 0 hasta 25.

Figura 4'. Se midió la proporción de clorofila en función de la cantidad de alga.

# CONCENTRACION DE CLOROFILA EN FUNCION DE CANTIDAD DE ALGA



El fotómetro a la intensidad deseada, se ajustó con el diafragma; la separación entre la salida de la luz y la cámara fue de 8 mm.

Cuando las muestras de 90 mg, en el amortiguador citado se incubaron a la luz por un período de 60 min previos a la medición, se tuvo una estabilidad en la respuesta a la producción de 71-85% y valores sensiblemente altos que reflejaron un estado y una concentración de los estados de oxidación que favoreció el fenómeno (fig. 5') mientras que la no incubada sólo tuvo de 20-48%. Los consumos en los dos casos tuvieron una estabilidad de 74%.

Las unidades relativas de 5-25 del fotómetro empleado se relacionaron con las mediciones dadas por el fotómetro 40A Opto-Meter y filtro radiométrico para conocer su equivalencia en  $\text{watts/cm}^2$  y éstas son las que se anotan en las abscisas.

La cercanía de la lámpara aumentó la temperatura de la muestra y en este caso no se dispuso de baño de agua, por tanto esta condición experimental fue variable y se hizo un control de la respuesta tomando en primer término la medición de la intensidad más alta, dato que se anota como (1), luego se hicieron las mediciones partiendo de 5 hasta 25 en orden ascendente; el valor obtenido en la intensidad 25 por segunda vez indicó un descenso de la respuesta (2) que se adjudicó al efecto de calentamiento excesivo de la muestra en el tiempo transcurrido.

Figura 5'. Producción de oxígeno en función de la intensidad de la luz. Dicha intensidad fue medida en presencia de un filtro radiométrico.

Las condiciones de trabajo son las ordinarias con la diferencia que estas muestras estuvieron incubadas a la luz durante 60 min en amortiguador de fosfatos a pH 7.0.

### Producción de oxígeno en función de la intensidad luminosa.

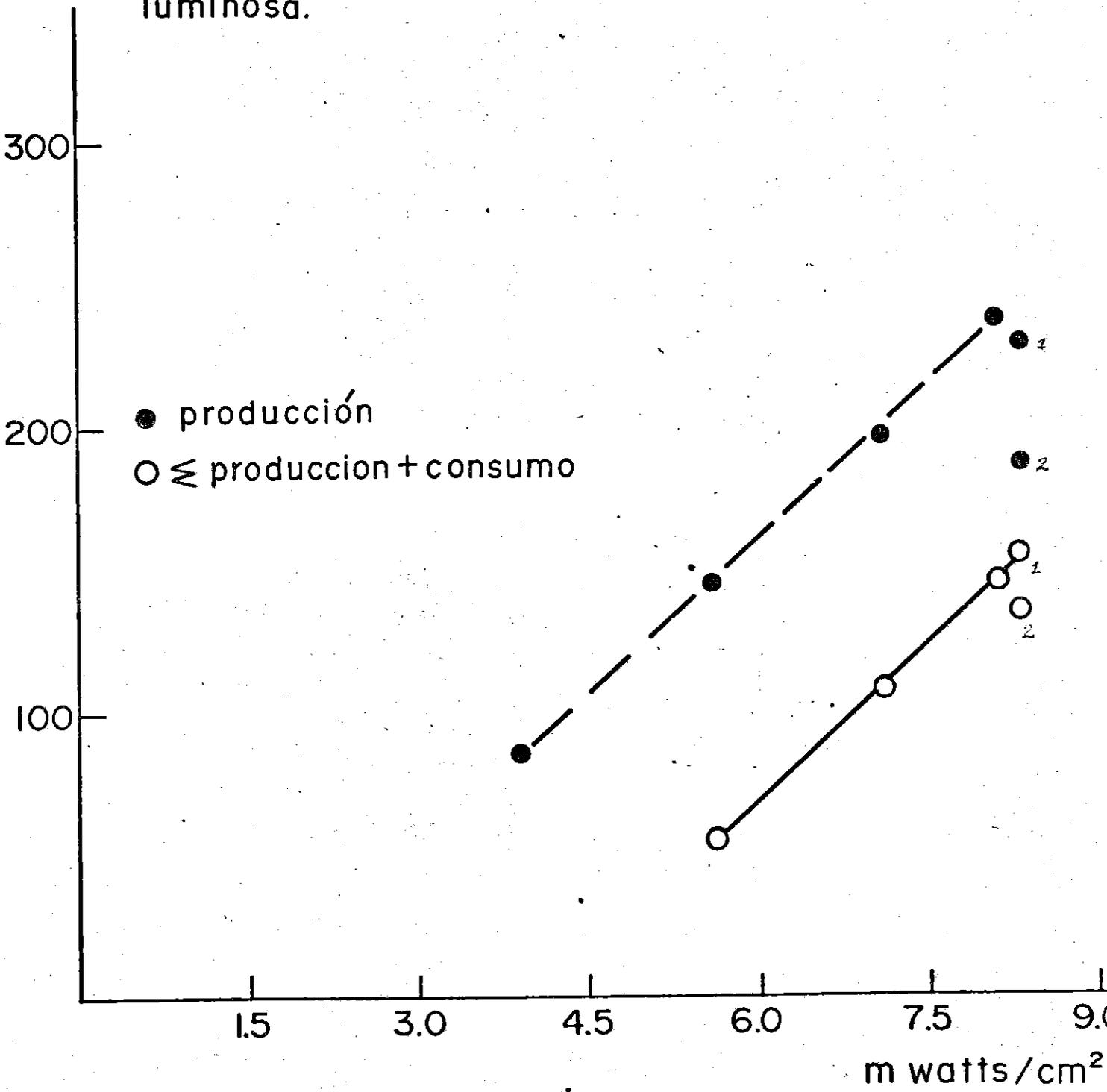
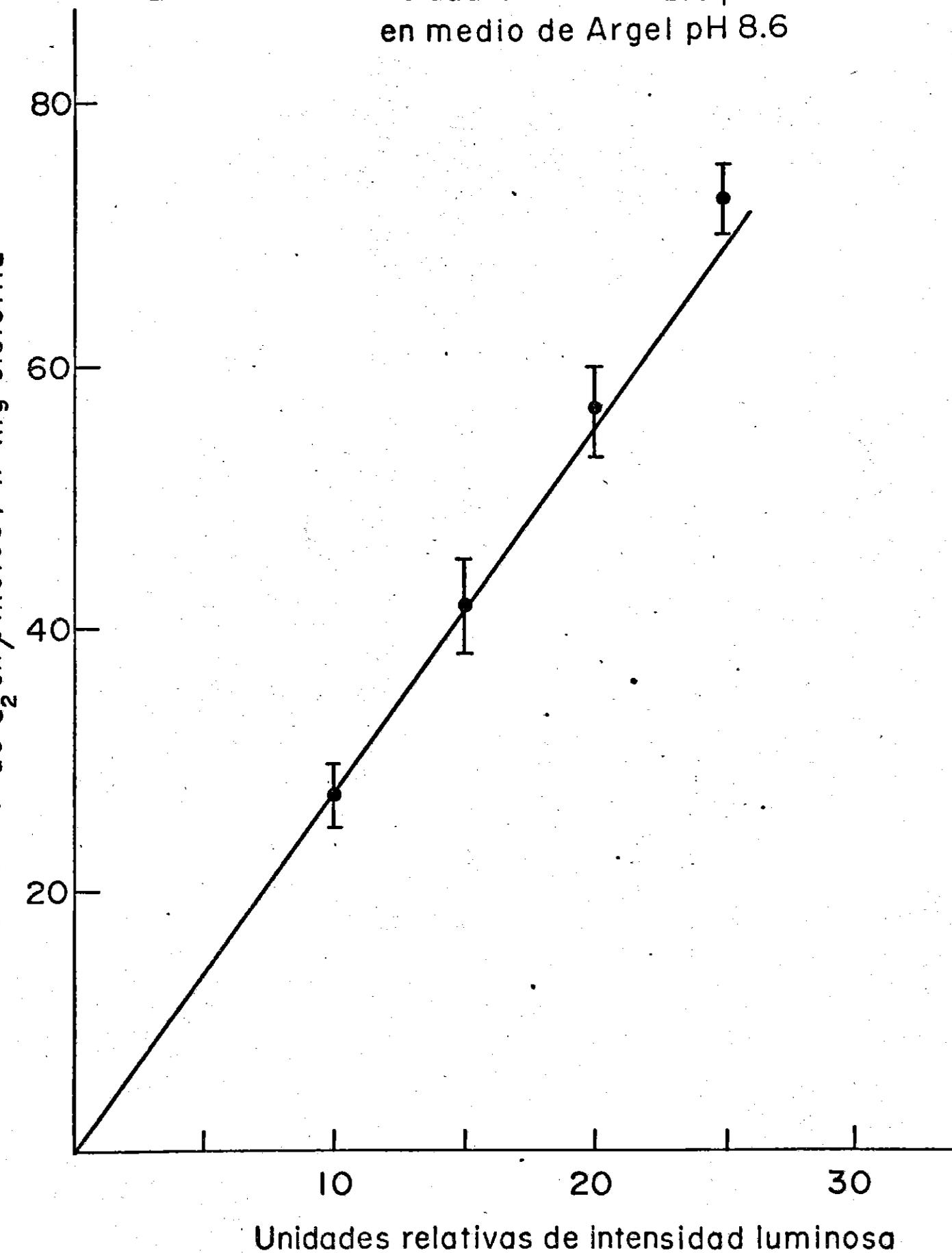


Figura 6'. Producción de oxígeno en función de la intensidad de la luz en Medio de Argel.

La muestra se preincubó a la luz por una hora, la intensidad luminosa se midió en unidades relativas cuya equivalencia a  $\text{mw/cm}^2$  corresponde a los puntos experimentales de la figura anterior.

El pH del medio fue 8.6.

# Efecto de la intensidad luminosa sobre producción de O<sub>2</sub> en medio de Argel pH 8.6



Los puntos con abscisas 8.1 y 8.3 mwatts/cm<sup>2</sup> que corresponden a las intensidades 20-25 respectivamente indican con mucha probabilidad una medición experimental burda.

En estas condiciones se observa que hay un punto donde el consumo es igual a la producción y equivale a 88  $\mu$ molas de O<sub>2</sub>/h . mg de clorofila. Si se considera el valor que ofrece el polarógrafo como la producción real de oxígeno, este punto de compensación se ve a 6.6 mwatts/cm<sup>2</sup> y si se considera la sobreestimación, es decir que la producción real corresponde a la lectura que da el polarógrafo más la del consumo en iguales condiciones, la intensidad a la que se tendría fotosíntesis neta sería de 4.0 mwatts.cm<sup>-2</sup>. El hecho demuestra que a 5.6 ya se midió producción y parece esto sugerir que la aproximación de P+C es más cercana a la real.

Si se extrapola la respuesta de producción de oxígeno a intensidad de luz 0, se ve un consumo teórico de 150  $\mu$ molas /h . mg de clorofila; en la sobreestimación ese resultado está dado por el valor de 88 que para esta estimación se convierte en el eje x y el punto de extrapolación que corresponde a 60, lo que suma 148.

Otro tratamiento preliminar en estas estimaciones manifestó que la extrapolación de la sobreestimación sí coincide con el 0 y la de la subestimación se acerca sensiblemente al valor medido por el polarógrafo. La resolución de estas estimaciones necesita un mayor estudio.

Cuando se hizo el tratamiento del alga en medio de Argeta pH 8.6, con la consideración de las unidades relativas de intensidad luminosa, se encontró una relación lineal como se pone de manifiesto en la figura 6' .

#### Viabilidad del alga

Las muestras se trataron con el mismo amortiguador indicado en estas series de experimentos a pH 7.0 y se incubaron a la luz con la suposición de favorecer la acción de la ribulosa difosfato carboxilasa y de un modo asegurar el flujo de electrones por la cadena transportadora, además de favorecer la oxidación del agua. El control se hizo con una muestra sometida a un tratamiento similar excepto en la incubación a la luz. Los resultados se grafican en la fig. 7' donde se aprecia un rápido decaimiento de la respuesta en los primeros 60' observados. Se interpretó este decremento de actividad como viabilidad del alga.

Los valores del consumo en cada uno de los dos casos, se mantuvieron relativamente constantes.

Cuando se analizaron otras condiciones de pH se tuvieron los resultados que se señalan:

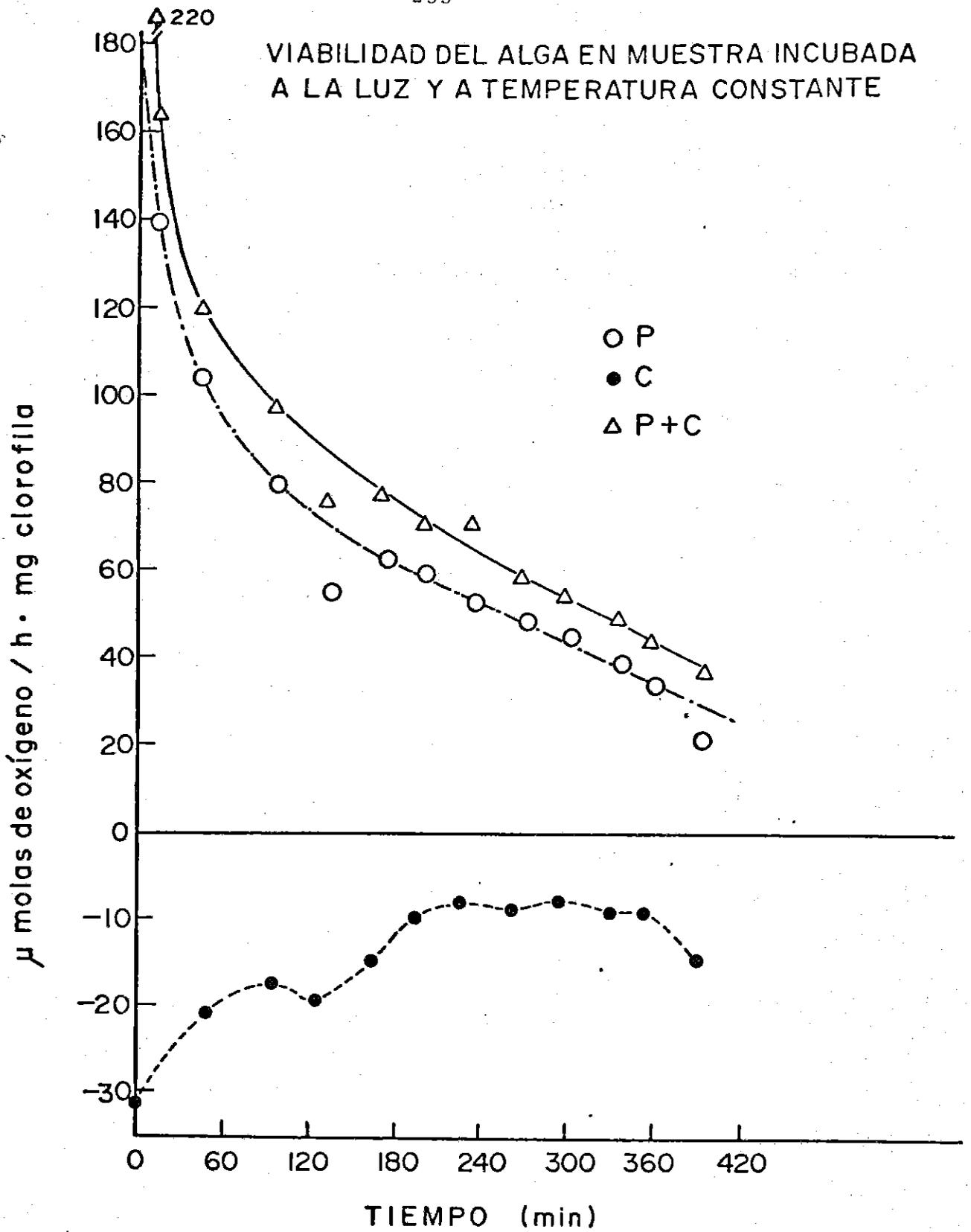
	% de disminución de la respuesta	
	consumo	producción
pH 6.8		
a 60 min	5-10	12.5
180 "	14-22	48-69
pH 8.0		
a 50 min	40	50
180 "	62	69
pH 10.5		
a 60 min	35	28
180 "	65	50

El amortiguador a pH 6.8 dió las mejores respuestas tanto para el consumo como para la producción en los primeros 60 min viéndose la menor disminución de la respuesta. Mientras que a pH 10.5 a las tres horas el porcentaje de disminución de consumo fue de 65%, a pH 8.0 a las seis horas se tuvo una disminución semejante.

Figura 7'. Efecto del tiempo en la producción y consumo de oxígeno.

Las muestras en las condiciones ya referidas se incubaron en la luz y se mantuvieron a temperatura constante.

### VIABILIDAD DEL ALGA EN MUESTRA INCUBADA A LA LUZ Y A TEMPERATURA CONSTANTE



### Efecto Emerson

μmolas de O<sub>2</sub>/h . mg de clorofila

Consumo en la oscuridad	-33.0
+ laser	-20.0
- laser	-31
luz de 680 nm	5
luz de 680 nm + laser	20
luz blanca	120

Hay un efecto positivo si la producción de oxígeno es mayor al operar los dos sistemas de modo simultáneo que la suma de la producción de cada uno de los dos sistemas.

En este caso:

$$\frac{20}{(33-20)+5} = 1.1$$

Aunque el valor es muy cercano a 1.0 se observa un efecto Emerson de pequeña escala. El laser (que sensibiliza al PSII) abate el consumo de -33 a -20 y es necesaria además la luz de 680 nm para verse una producción de 20 μmolas de O<sub>2</sub>/h . mg de clorofila.

## Inhibidores

### A) Del proceso fotosintético

Se utilizó DCMU 3-(3-4 Diclorofenil)-1,1-dimetil urea para detener la respuesta fotosintética ya que actúa a nivel del intermediario B contiguo al aceptor primario del  $PS_{II}$  bloqueando el transporte de electrones.

Cuando se utilizó  $3 \times 10^{-6}$  M de DCMU y se observó la respuesta a diferentes  $pH_s$ , se halló que hay un consumo en la luz inferior al consumo en oscuridad que a su vez va decayendo, a pH 6.0 se aprecia que en la luz se consume el 42% del visto en la oscuridad y ese valor decae hasta 33%.

pH 6.5	es de 22% y baja a 8%
7.0	3% " a 0
7.5 y 8.0	no hay consumo
8,5	10%
9.0	10% a 7%
9.5	10% a 3%
10.0	consumo de 26% que pasa a una producción de 50%

Cuando se estudió la respuesta a diferentes concentraciones de DCMU desde  $1.2 \times 10^{-8}$  M hasta  $2.4 \times 10^{-6}$  M en las condiciones usuales a pH 7.0, se observó una inhibición creciente en la producción de oxígeno y queda descrita en la fig. 8' donde se compara este comportamiento y otro semejante observado a pH 10.5.

Figura 8'. Inhibición de la producción de oxígeno por DCMU en amortiguadores a pH 7.0 y 10.5; las otras condiciones son las señaladas en la figura 1'.

INHIBICION EN LA PRODUCCION DE OXIGENO POR DCMU

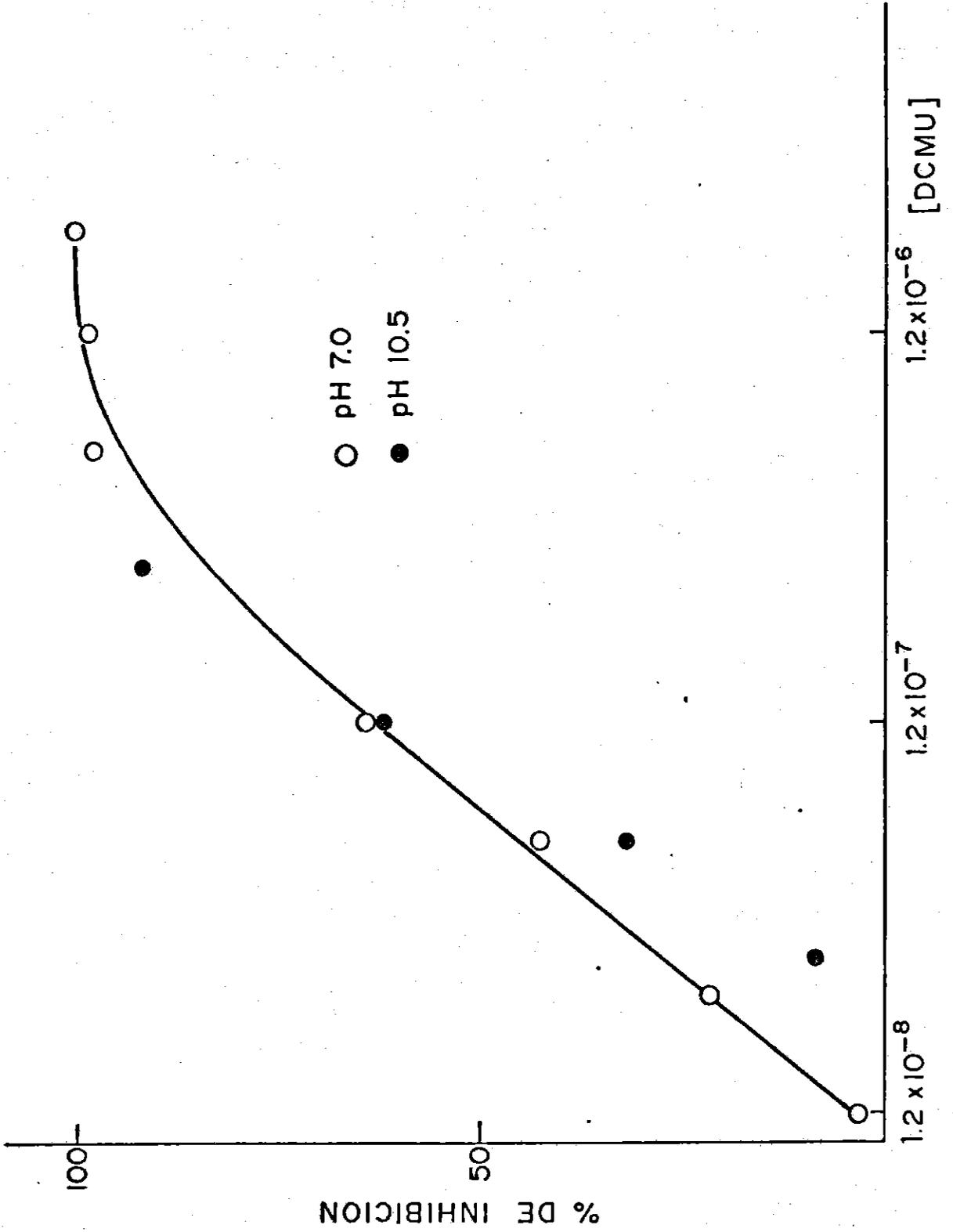
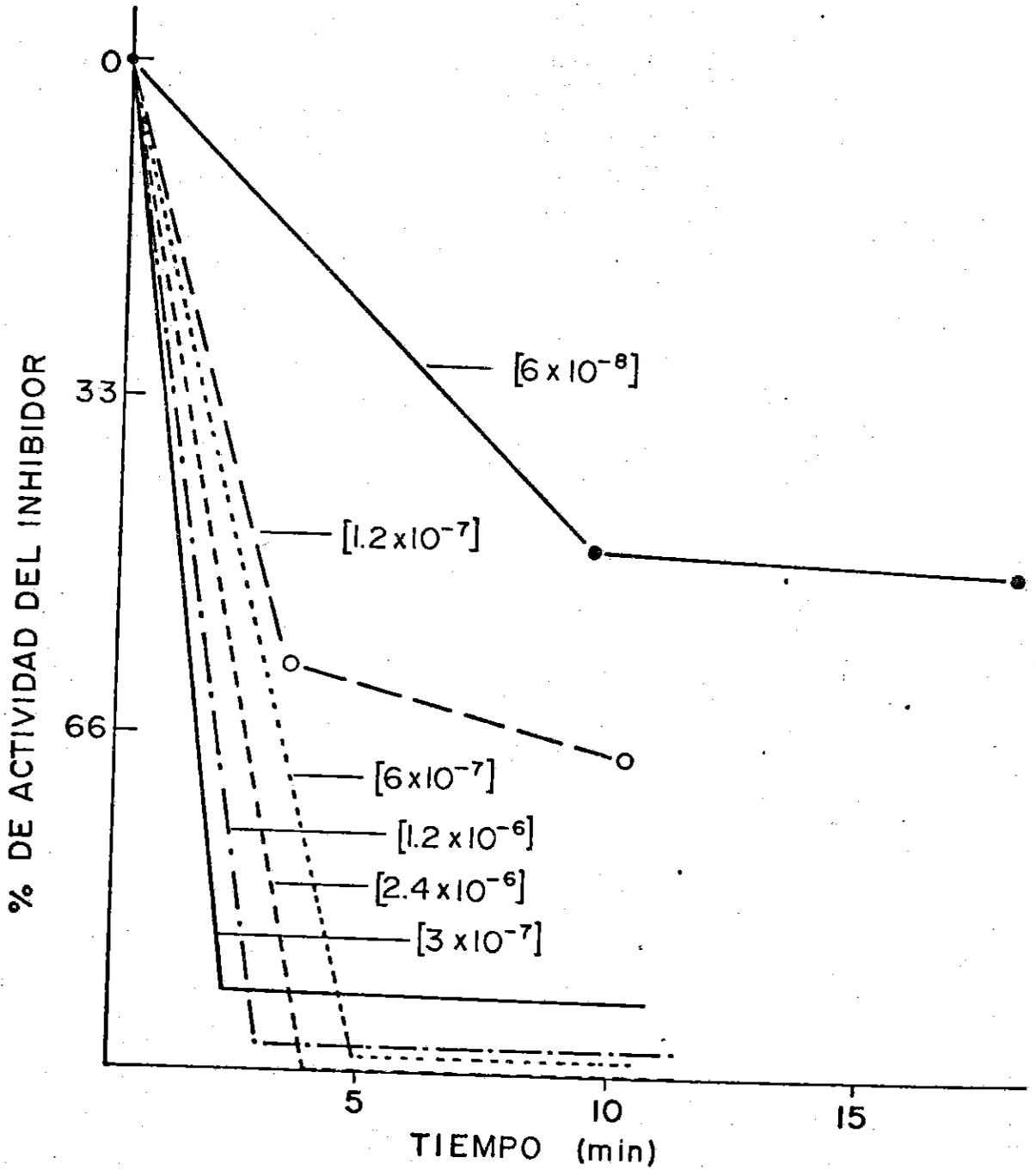


Figura 9'. Medición de la respuesta de inhibición en la producción de oxígeno por DCMU en función del tiempo. Se comparan diferentes proporciones de inhibidor y se observa su efecto a ciertos períodos de tiempo.

La producción está dada en  $\mu\text{molas de O}_2/\text{h} \cdot \text{mg}$  de clorofila. Se utilizó un amortiguador de fosfatos 30 mM, bicarbonato de sodio 50 mM, manitol 0.5 M pH 7.0, una temperatura de 28°C y una distancia de la muestra a la lámpara de 2.5 cm.

### EFFECTO DE INHIBICION DEL DCMU EN FUNCION DEL TIEMPO pH 7.0



La influencia del DCMU también ha sido observada como disminución del consumo en la oscuridad en diferentes proporciones, aún encontrándose datos donde la relación de consumo sin DCMU/consumo con DCMU fueron menores que la unidad.

Cuando se observó el efecto del inhibidor DCMU en diferentes proporciones que equivalen a las concentraciones finales desde  $6 \times 10^{-8}$  a  $2.4 \times 10^{-6}$  y pH 7.0 con diferentes intervalos de tiempo se pudo ver el momento en que se alcanzó la máxima inhibición. Si con 200  $\mu$ l de DCMU ( $2.4 \times 10^{-6}$ ) se llegó a 100% de inhibición 4 min, con 100  $\mu$ l se llega a 95% en 3 minutos, etc. Estos valores se indican en la figura 9' y hablan de la penetración del inhibidor a la membrana fotosintética.

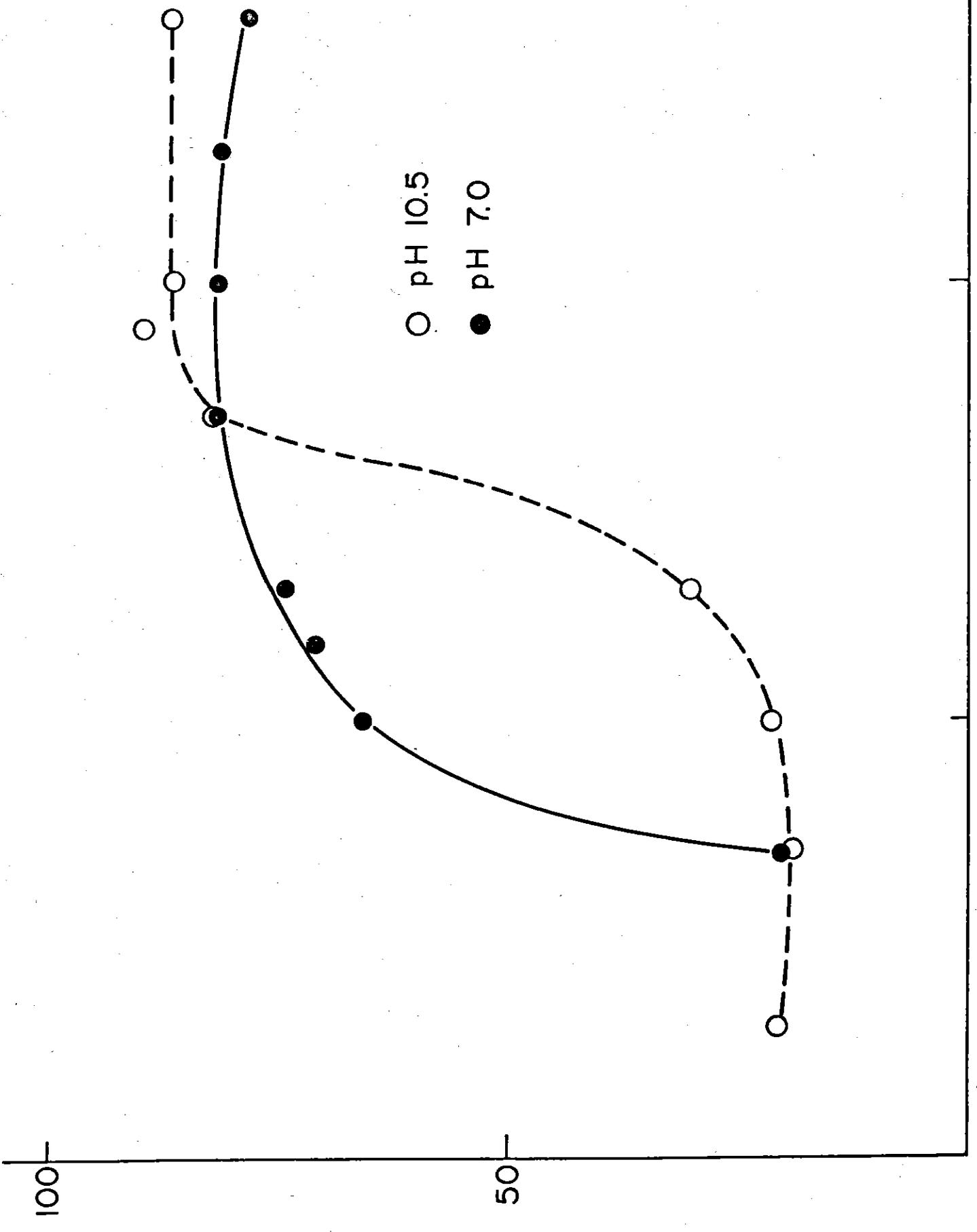
El hecho que se encuentre consumo de  $O_2$  en la luz en presencia de DCMU, favorece la idea de suponer que la fotosíntesis y el consumo de  $O_2$  son concomitantes.

#### B) Inhibición de la respiración

Para bloquear el consumo de oxígeno se empleó KCN en concentraciones entre  $2 \times 10^{-5}$  M y  $4 \times 10^{-3}$  M adicionándolo después de varios ciclos consumo-producción estabilizados; las condiciones de amortiguador, temperatura, intensidad luminosa son los ya señalados.

Las respuestas controles de los consumos antes de la adición del inhibidor se mantuvieron homogéneas a lo largo del experimento con la variabilidad experimental tolerable.

Figura 10'. Inhibición en el consumo de oxígeno por KCN a pH 7.0 y 10.5. Las otras condiciones son iguales a las referidas en la figura 1'.



○ pH 10.5  
● pH 7.0

% DE INIBICION

100

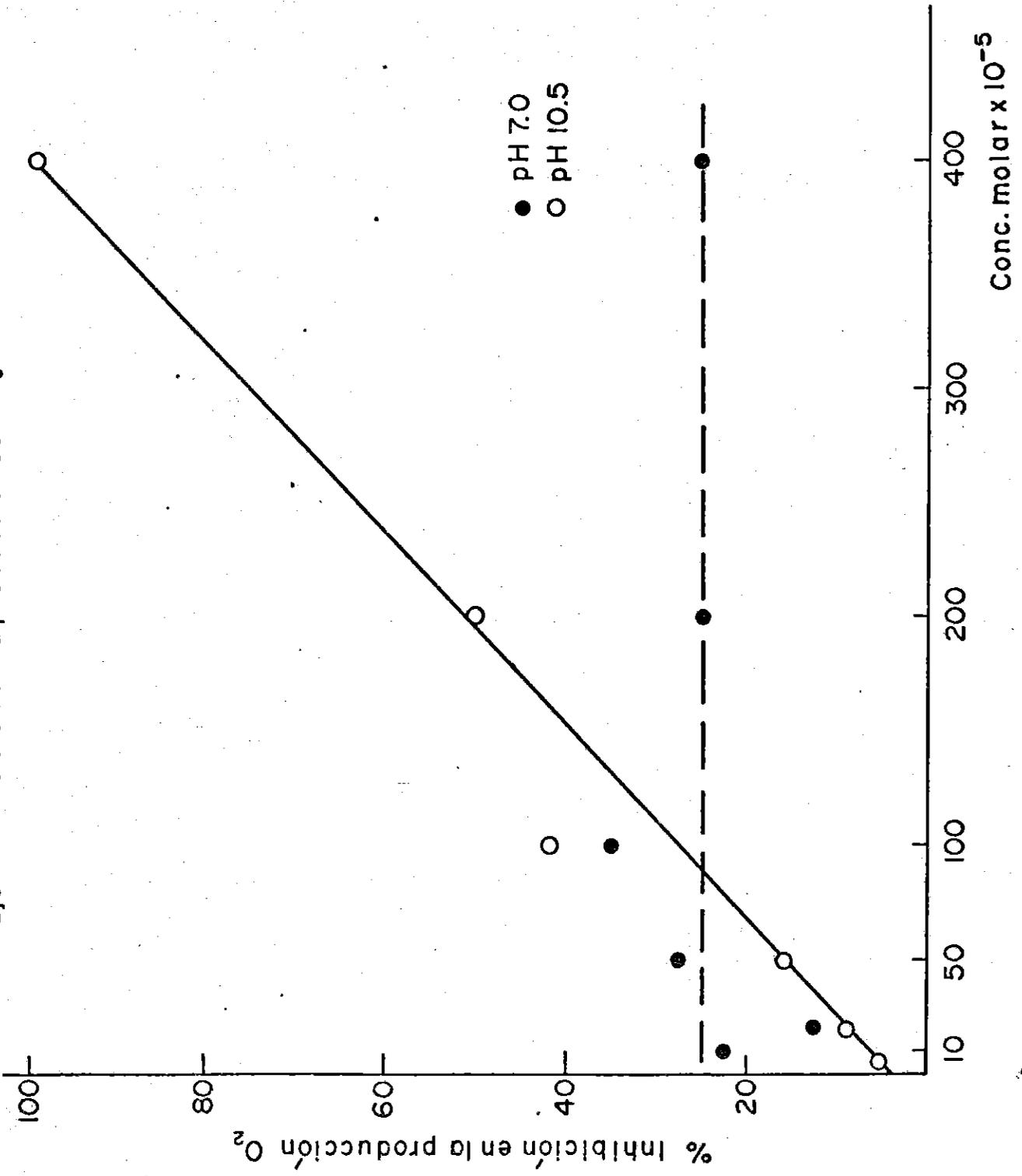
50

1, 2, 3, 4, 5

Figura 11'. Inhibición en la producción de oxígeno por KCN.

Las condiciones experimentales son las indicadas en la figura 1'.

Porcentaje de inhibición en la producción de oxígeno con K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

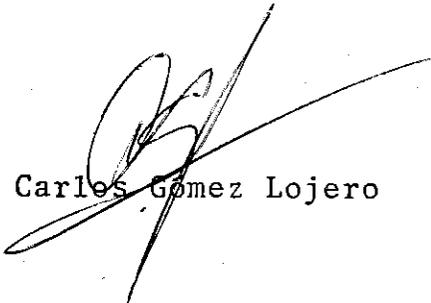


La inhibición del consumo de oxígeno presentó el comportamiento descrito en la gráfica 10' donde se comparan las respuestas a pH 7.0 y 10.5. Se alcanzan inhibiciones cuantitativas semejantes, pero a pH 7.0 el comportamiento es más sensible, pues aún a concentraciones bajas del inhibidor se ve un efecto más marcado que a pH 10.5.

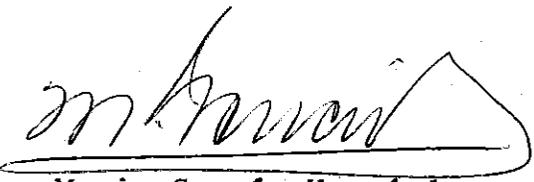
También la producción de oxígeno se vió afectada por la adición del inhibidor; tanto a pH 7.0 como a 10.5 descrito en la figura 11', donde se indica el porcentaje del descenso de la respuesta al adicionar el inhibidor.

Con un pH alcalino se notó proporcionalidad y mayor sensibilidad de modo que a la concentración de 4 mM de KCN hay una inhibición total de la producción, como se muestra en la gráfica; en cambio a pH 7 aunque también se manifestó un decremento en la respuesta, osciló entre 12.5 y 41.4 % manteniendo en las concentraciones más altas un valor de 22.5 % de inhibición.

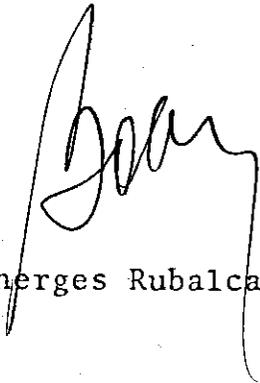
El Jurado designado por el Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, aprobó esta Tesis el día 9 de julio de mil novecientos ochenta.



Dr. Carlos Gómez Lojero



Dr. Mario García Hernández



Dr. Boanerges Rubalcava



Dr. Edmundo Calva