

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Departamento de Bioquímica. Madrid
(Director: Prof. A. Santos-Ruiz)

Estudios sobre carboxilasas

I. — Nueva ecuación de activación de la descarboxilasa tirosínica

por Luis Condal Bosch y Rufino Cosía García

(Recibido para publicar el 16 de julio de 1952)

Las bacterias lácticas, al crecer en medio glucosado, convierten esta sustancia en ácido láctico, con lo cual provocan una disminución del pH del medio, que acostumbra a estar amortiguado con fosfato. Paralelamente a esta producción de ácido, el microorganismo produce un fermento que actúa sobre alguno de los aminoácidos presentes (arginina, ornitina, tirosina, lisina, ácido glutámico e histidina principalmente) convirtiéndolos en aminas, con lo cual, fisiológicamente hablando, la bacteria se defiende de la acidez excesiva del medio que inhibe su crecimiento y multiplicación (4, 9). Este fermento se llama DESCARBOXILASA (9, 16, 29).

Un cultivo de estas bacterias puede ser convertido en un polvo seco, libre de células, que posee la descarboxilasa en plena actividad (4, 11, 19). El estudio de estas descarboxilasas se lleva a cabo desde el año 1940, principalmente con el *aparato manométrico de Warburg* (9, 25), el cual sigue cuantitativamente los aumentos de presión producidos, en un vaso de reacción cerrado y en termostato, por el anhídrido carbónico producido en la descarboxilación.

Una de las descarboxilasas más estudiadas es la que produce el *Streptococcus faecalis R.* y que es específica para la L-tirosina (6, 4, 11, 19). Esto, sin duda, debido a dos razones: una es la facilidad con que se cultiva este microorganismo y la otra la facilidad con que se obtiene en el aparato de Warburg una concen-

tración constante de tirosina a causa de su limitada solubilidad en agua.

Este trabajo es el primero de una serie que se dedicarán a CARBOXILASAS, y en él centraremos nuestra atención en la disociación de la DESCARBOXILASA TIROSÍNICA en sus dos partes componentes, como ocurre con muchos otros fermentos:

$$\text{Holofermento} = \text{Apofermento} + \text{Cofermento}$$

reacción que obedece a la *ley de acción de las masas*:

$$K = \frac{[\text{Apofermento}] \cdot [\text{Cofermento}]}{[\text{Holofermento}]}$$

La medida de estas concentraciones en el equilibrio se lleva a cabo de la manera siguiente (10, 26):

1.º Se obtiene un polvo seco a partir de un cultivo de bacterias que por determinadas condiciones de crecimiento (ver más adelante) sólo han podido formar la parte macromolecular, o sea el APOFERMENTO. Aparte se dispone de COFERMENTO obtenido por síntesis química.

2.º Se llevan a cabo una serie de experiencias para medir la velocidad de descarboxilación de una determinada cantidad de polvo seco de bacterias (apofermento) en presencia de cantidades variables de cofermento. La L-tirosina se usa a la concentración de saturación.

3.º De hecho, estas medidas para calcular la constante de disociación K representan puntos de una función que relaciona la *velocidad de descarboxilación* con la cantidad o *concentración de cofermento*, para una cantidad fija de apofermento. Debido a esta relación funcional, se llama y a la velocidad de descarboxilación, y x a la concentración de cofermento añadido. Esta dependencia funcional recibe el nombre de CURVA DE ACTIVACIÓN y muestra forma hiperbólica, de manera que, para pequeñas cantidades de cofermento existe proporcionalidad entre esta cantidad y la velocidad de descarboxilación obtenida, mientras que al aumentar mucho el cofermento la velocidad de descarboxilación se acerca asintóticamente a una *velocidad máxima*, que se designa V y depende, como es natural, de la cantidad de apofermento, que es fija. Véase la forma de la curva de activación más adelante, en la fig. 3.

4.º Así podremos sustituir en la *ley de acción de las masas*, lo siguiente:

$[\text{Holofermento}] = y$; ya que la velocidad de descarboxilación es proporcional a cantidades de holofermento. Si y , como ocurre

en nuestro trabajo, es velocidad de descarboxilación *por unidad de volumen*, entonces la sustitución es más correcta.

[Apofermento] = $V - y$; pues la cantidad de apofermento presente en el equilibrio es igual a la que se ha puesto y que, convertida totalmente en holofermento tendría la velocidad de descarboxilación V , menos la cantidad presente en forma de holofermento, proporcional, como se ha dicho, a y . Nótese que, aunque la cantidad total de apofermento podría medirse en peso de polvo de bacterias, no conviene hacerlo así, pues no se le podría restar la cantidad de holofermento que medimos en otras unidades.

[Cofermento] = x ; se mide en peso, prescindiendo de la pureza del producto, lo cual debe tenerse en cuenta al comparar experiencias de autores que han usado cofermento de distinto origen. No se le resta la cantidad que está combinada formando holofermento, por suponerse despreciable. Esta suposición, ampliamente admitida hasta el presente, no puede sostenerse, según resulta de los datos que hemos obtenido, y la corrección correspondiente será el punto de partida de este trabajo.

Mediante estas sustituciones, la ecuación de disociación queda en la forma siguiente :

$$K = \frac{x : (V - y)}{y}$$

Como sea que $V - y$ e y vienen expresados en las mismas unidades, no importará cuáles sean y , como consecuencia, la constante de disociación K vendrá expresada en las mismas unidades que las empleadas para medir x .

5.º Separando variables en la ecuación de equilibrio se obtiene en forma matemática la *ecuación de activación*:

$$y = \frac{V \cdot x}{K + x}$$

que es la ecuación de una hipérbola de pendiente en el origen igual a V/K y asintótica horizontal $y = V$.

En el curso de unas mediciones llevadas a cabo con objeto de determinar la constante de equilibrio, se puso de manifiesto que los datos experimentales no encajaban en la ecuación dada por los diversos autores que se han ocupado del tema y que es la que acabamos de deducir. El trabajo de modificar esta ecuación, expresando más correctamente la concentración del cofermento presente

en el equilibrio, ha sido fructífero, pues no sólo se ha logrado determinar la verdadera constante de equilibrio, sino que, al modificar la ecuación de activación, ha habido que definir otra constante cuya determinación se hace también y cuyo significado es muy interesante.

Material y métodos

Apofermento. — Existen dos maneras de obtener apofermento libre de cofermento. Ambos parten de un cultivo centrifugado, lavado y tratado con acetona.

El primer método va eliminando el cofermento por purificaciones sucesivas (adsorción en fosfato cálcico y precipitación con sulfato amónico principalmente). Se puede decir que en realidad este método purifica la descarboxilasa aumentando enormemente la actividad por miligramo de sustancia, pero que en el transcurso de esta purificación se va perdiendo por disociación el cofermento (4).

El segundo procedimiento no efectúa ninguna purificación del polvo seco obtenido al tratar las bacterias por acetona, evitando la formación de cofermento por el uso de un medio de cultivo sintético en cuya composición se ha eliminado cuidadosamente la piridoxina (vitamina B₆) y derivados. Esta sustancia es un factor de crecimiento para las bacterias lácticas (18) y es preciso compensar esta deficiencia con la adición de D-alanina al medio de cultivo (2, 24). Al parecer, este aminoácido dextrógiro, indispensable a estas bacterias, se lo proporcionan normalmente por inversión de signo óptico de la L-alanina natural, abundante y de fácil síntesis biológica, y en esta inversión juega un papel imprescindible algún derivado de la piridoxina (15).

Nosotros hemos utilizado este segundo procedimiento por ser más sencillo y más eficiente, con la técnica que se describe a continuación:

Como medio de cultivo se ha utilizado el preconizado por varios autores que han trabajado con el *Streptococcus faecalis* R (2, 26) modificado posteriormente (19) con el fin de obtener un mayor rendimiento de polvo seco y alguna otra modificación que hemos añadido nosotros para adaptarnos a las sustancias disponibles. La composición del medio de cultivo:

	gr./l.		mg./l.
Fosfato dipotásico	10	Clorhidrato de guanina	5
Acetato sódico	2	Uracilo	5
Glucosa	10	Sulfato de adenina	5
Hidrolizado de caseína	10	Riboflavina	1
Sulfato magnésico	0,2	Acido nicotínico	5
Cloruro sódico	0,01	Pantotenato cálcico	1
Sulfato ferroso	0,01	Acido fólico	0,04
Sulfato manganoso	0,01	Biotina	0,001
L-alanina	0,2		
L-cistina	0,2		
L-tirosina	0,1		
L-triptófano	0,1	Tiglicolato sódico	100

Para preparar el medio de cultivo se juntan todos los productos de la lista de la izquierda, añadiendo agua destilada hasta medio litro, y se calienta a baño maría a 80° C. hasta que flocule bien el precipitado que

se forma. Al líquido filtrado se añaden las vitaminas y factores de crecimiento que figuran en la lista de la derecha y se vuelve a calentar a 80° C. si alguna de las soluciones que se usan para dosificar dichos productos fuera alcohólica o estuviera conservada bajo tolueno. Se ajusta el pH a 7,1-7,3, se completa agua hasta 1 litro. Se añade el tioglicolato sódico y se esteriliza en autoclave a 115° C. durante veinte minutos.

El microorganismo utilizado fué el *Streptococcus faecalis* R. (A. T. C. C. 8043), el cual se mantuvo en tubos de agar inclinado, de la siguiente composición :

Glucosa	0,5 %
Acetato sódico	0,6 %
Agar	1,5 %
Extracto seco de levadura, Difco	1,0 %

La cepa se renovaba cada quince o veinte días, sembrando como intermedio un cultivo líquido en tubos de ensayos con la misma composición dada anteriormente para el medio de cultivo sintético, con la diferencia de una pequeña adición (0,01 mg./l.) de piridoxal. Estos cultivos intermedios se mantienen en estufa a 37° C. durante veinticuatro horas, después de las cuales se siembran suficientes tubos de agar para poder desecharlos después de haber sacado de ellos una siembra, con lo cual se evitan contaminaciones molestas de la estirpe. Después de veinticuatro horas de estufa, se guardan en la nevera.

Para obtener el apofermento libre de cofermento, se prepara un litro del medio de cultivo sintético. Se esteriliza, ya colocado en cuatro erlenmeyers de 1 litro cada uno, con el fin de que la profundidad del líquido sea poca, habiendo sacado un par de tubos de ensayo (10 c. c. cada uno) en los que antes de esterilizar se ha hecho la adición de una pequeña cantidad de piridoxal, como se ha dicho para los cultivos intermedios. De un tubo de agar se siembra uno o dos de estos tubos, los cuales se incuban veinticuatro horas, después de las cuales se diluye una parte de estos cultivos con agua estéril (o cloruro sódico al 0,9 %) en la proporción de 1:20, y con esta dilución se siembran los cuatro erlenmeyers en la proporción de 2,5 c. c. cada uno. Se incuban los erlenmeyers veinte horas, a 37° C., en la estufa, con lo cual el crecimiento es casi completo y la cantidad de descarboxilasa máxima, lo que puede comprobarse por un pH de 4,4 a 4,6.

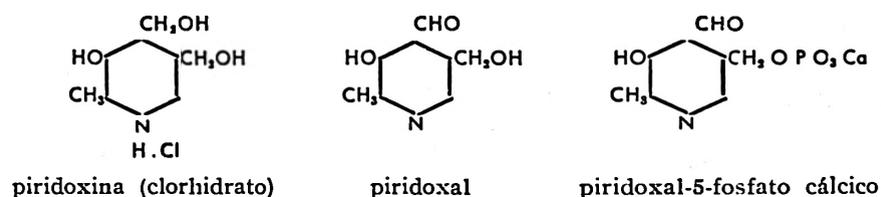
Se enfría el cultivo con hielo y se centrifuga a unas 3.000 revoluciones por minuto. Si la recolección se efectúa a mayor velocidad, el apelmazamiento de las bacterias hace difícil el lavado. Se lava dos veces con disolución de cloruro sódico al 0,9 %, enfriando con hielo lo mejor que se pueda. Las bacterias obtenidas de esta manera se suspenden en unos 5 c. c. de agua destilada, formando una pasta fluida que, una vez bien homogenizada, se vierte lentamente y agitando sobre 40 c. c. de acetona pura previamente enfriada a 0° C. La acetona no debe decolorar el permanganato y debe ser anhidra. Se deja en la nevera unos diez minutos, con el fin de que las proteínas precipitadas se agrupen en grandes floculos.

Se filtra a succión y se lava dos veces con acetona para eliminar completamente el agua. El polvo así obtenido se deja unos minutos al aire, con lo cual se evapora la acetona y se le puede despegar fácilmente del papel de filtro. Se concluye el secado en un pequeño desecador con ácido sulfúrico y vacío, que se coloca en la nevera. En este mismo desecador, el polvo seco se conserva varios meses sin pérdida sensible de su actividad descarboxilásica.

De un litro, de medio de cultivo, nos ha resultado un promedio de 400 mg. de polvo seco, cuyo poder descarboxilásico era, también como término medio, de unos 480 μ l./hora y miligramo de polvo; compárese con la bibliografía (4, 19, 26).

Cofermento. — Aunque el cofermento se puede extraer de los extractos de levadura con relativa facilidad (8, 26), no es un proceso útil desde el momento en que fué sintetizado por vía química con relativa facilidad.

La estructura química de la codescarboxilasa no pudo ser determinada directamente por purificación y análisis subsiguiente (8), sino que fué preciso fijarse en qué un derivado de la piridoxina era mucho más activo que ésta como factor de crecimiento de las bacterias lácticas (21, 22, 10), siendo identificado posteriormente como derivado aldehídico y bautizado con el nombre de *piridoxal*. Investigaciones posteriores concretaron que la codescarboxilasa era un derivado fosforilado de esta sustancia (11, 12, 13, 1), habiéndose llevado a cabo la síntesis total (23, 14, 26) y estando actualmente probado que la *codescarboxilasa* es un *piridoxal-5-fosfato* (27, 5):



Nosotros empleamos como cofermento una pequeña cantidad de piridoxal-5-fosfato cálcico (5) que nos cedió amablemente K. Folkers («Research Laboratories, Merck & C., Inc.», Rahway., N. J., U. S. A.). Ha sido determinada la actividad de este compuesto (26, 17) y, aunque el análisis químico parece no dar más del 50 %, por medios biológicos puede determinarse una pureza del 80 %; para nuestros cálculos tomaremos 70 %, dado por un análisis reciente (17), teniendo en cuenta el amplio error de que puede estar afectado este dato.

El principal problema en el manejo de esta sustancia está en su dosificación. Dada la pequeña cantidad de que disponíamos (25 mg.) y la inestabilidad de las disoluciones diluídas de esta sustancia, sólo parecían posibles dos soluciones. La primera consistiría en pesar cantidades muy pequeñas (0,2-0,4 mg.) con una precisión del 2-3 % ($\pm 0,008$ mg. aproximadamente), mientras que la segunda era encontrar una solución de piridoxal-fosfato que a una dilución relativamente grande (10 mg./l.) no sufriera una pérdida mayor de 2-3 % después de un mes de conservación en nevera.

La primera solución fué desechada por no disponer de una microbalanza con sensibilidad suficiente. La segunda solución era más fácil de enfocar, pues existe referencia bibliográfica (20) de haberse utilizado una solución de piridoxal-fosfato en mezcla amortiguadora de borato 0,1 M. y pH = 8,5 a una concentración de 0,16 mg./l., manteniendo su plena actividad después de cien horas de conservación en nevera, mientras que una solución en agua de análoga concentración pierde el 60 % de su poder descarboxilásico en cuarenta y ocho horas a -4° C. Esta pequeña concentración no nos bastaba, y unas pruebas que hicimos para lograr una concentración de 10 mg./l. en la mezcla boratada dicha, no

dieron resultados homogéneos, debido sin duda a la pequeña solubilidad del piridoxalfosfato a este pH.

Después de estas tentativas infructuosas, se llevó a cabo un método de dilución en polvo. Una pequeña cantidad de piridoxalfosfato (10 miligramos aproximadamente) se mezcla con 199 veces su peso de arena de cuarzo (calcinada y tratada para análisis) previamente pulverizada y tamizada a polvo fino. Después de homogenizar con cuidado esta mezcla, se divide (por el procedimiento de cuarteo, como en las tomas de muestra) en porciones de 20-25 mg., introduciendo cada una de ellas en una ampolla de inyectable de 1 c. c. color topacio, se deja unas horas en desecador con hidróxido potásico sólido y se cierran a la lámpara, guardándolas en nevera hasta el momento del uso.

Para cada experiencia a realizar en el aparato de Warburg (ver más adelante) se abría una de dichas ampollas, se pesaba su contenido y se disolvía en 10-13 c. c. (según el peso en miligramos) de solución 0,005 N. de hidróxido sódico recién preparada por dilución de otra más concentrada (normal, por ejemplo) con agua hervida. El piridoxalfosfato se disuelve bien en esta disolución ligeramente alcalina (5) y el corto tiempo que permanece en presencia de esa alcalinidad no afecta en nada la estabilidad (8). Con este método se consiguen soluciones de concentración 10 mg./l., o sea 10 γ /c. c., de la cual se obtienen las demás concentraciones, según se necesitan para cada vaso del aparato de Warburg, por dilución con el hidróxido sódico 0,005 N. antedicho.

A pesar de las inexactitudes que este procedimiento entraña, fué el único que se encontró factible y la experiencia ha demostrado que los errores de dilución son menores del 5 % si se procede con el debido cuidado.

Aparato de Warburg. — Para determinar las velocidades de descarboxilación se ha utilizado el aparato de Warburg (25) provisto de unos vasos cónicos con brazo lateral y capacidad total de 17-18 c. c., que son los que normalmente se utilizan en dicho aparato.

Cómo sustrato se ha empleado L-tirosina cristalizada en cantidad suficiente para mantener una concentración de saturación más el gasto por descarboxilación. En la práctica se emplearon cuatro miligramos por vaso. Habiendo observado que una pequeña cantidad de agua que pudiera quedar en el brazo lateral al volcar la suspensión de tirosina, podía retener una cantidad apreciable de anhídrido carbónico, se utilizó la máxima cantidad de líquido que permitía con seguridad el brazo lateral (0,7 c. c.) y, en vez de utilizar suspensión acuosa se usó suspensión en acetato M/5 amortiguado a pH 5,5, el mismo que se utiliza para disolver el apofermento. Con el fin de que el sustrato se vaya disolviendo rápidamente a medida que se va descaboxilando, es preciso que la velocidad de agitación de los vasos sea de 80 a 100 vaivenes por minuto.

El polvo seco (apofermento) se disuelve con facilidad en agua si está bien conservado, pero es conveniente homogenizarlo previamente en un morterito con más gotas de agua; la solución es opalescente a causa de restos celulares.

Para nuestras experiencias hemos disuelto el polvo de microbios en solución amortiguadora de acetato de pH 5,5 procurando que cada 1,3 centímetro cúbico (cantidad usada por vaso) contuviera 1, 1,5, 2 ó 3 mg. de dicho polvo, según la serie.

De la solución de piridoxalfosfato diluida cómo se ha dicho anteriormente, se añadía 1 c. c. por vaso, mezclándolo en el compartimiento central con los 1,3 c. c. de apofermento; la débil basicidad de la solución

de cofermento es amortiguada enteramente por la solución amortiguadora de acetato, quedando finalmente el pH 5,5, que es el óptimo para la descarboxilación de la tirosina (4).

La técnica utilizada por algunos autores de desalojar el aire de los vasos del aparato de Warburg con nitrógeno, no es enteramente necesaria (4, 7, 8, 26) y por esto no se la ha utilizado; no obstante algún autor nota cierta mejora en la velocidad de descarboxilación cuando se trabaja en atmósfera de nitrógeno (20).

Una vez unidos los vasos a sus correspondientes manómetros e introducidos en el termostato, se pone en marcha la agitación durante 12-15 minutos, con el fin de conseguir equilibrio en la temperatura de los vasos. Se escogió el valor de 28,5° C. como temperatura de descarboxilación, pues si se pasa apreciablemente de 30° C. la descarboxilasa se inhibe progresivamente (4); además, la temperatura escogida es la usada por varios autores (9, 20).

Después del tiempo dado para igualarse las temperaturas, se vuelca la suspensión de tirosina en el compartimento central, procurando realizar la operación con cierta rapidez a fin de que no se enfrien mucho los vasos. Se toman lecturas de los manómetros cada 2,5 minutos durante media hora o hasta tope del manómetro; se corrigen estas lecturas según las variaciones del vaso termobarométrico y restándoles la lectura inicial. Los números resultantes (milímetros de presión en función del tiempo) se expresan gráficamente y se toma como velocidad de descarboxilación la pendiente de la parte recta; prescindiendo, por tanto, de los últimos puntos que forman parte de una zona curva tendiendo a horizontal. Este cálculo gráfico requiere cierto trabajo y habilidad, pero es muy superior en exactitud al usado corrientemente (4, 20, 25) de promediar la variación de presión en los tres primeros intervalos de cinco minutos.

Esta velocidad de descarboxilación viene expresada en mm./hora y es menester multiplicar por la constante del vaso (54) para que resulte en μ l/h.; este valor se acostumbra a llamar Q y nosotros la hemos dividido por tres (número de centímetros cúbicos de líquido en cada vaso) con el fin de obtener una velocidad de descarboxilación por centímetro cúbico de líquido. O sea que, atendiendo a que esta nueva velocidad de descarboxilación por unidad de volumen ya la hemos llamado y , tendremos: $y = Q/3$.

Para determinar la constante de disociación y comprobar hasta qué punto la ecuación de activación dada anteriormente en la literatura científica es correcta, se llevaron a cabo, con todo cuidado, 51 determinaciones de la velocidad de descarboxilación, variando las cantidades de cofermento y apofermento utilizadas. Estas determinaciones están divididas en cuatro series, según la cantidad de polvo de microbios utilizada, según se ha citado anteriormente. La cantidad de cofermento se varió ampliamente en cada serie, realizando por partida doble las experiencias correspondientes a los valores más altos con el fin de lograr mejor exactitud en la extrapolación de los valores de y al hallar el de V para cada serie (ver más adelante). El valor de x , cómo puede suponerse, viene expresado como $mg.$ de piridoxalfofato cálcico por centímetro cúbico.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Serie n.º 1 (1 mg. de polvo de microbios por vaso)		Serie n.º 2 (1,5 mg./vaso)		Serie n.º 3 (1 mg./vaso)		Serie n.º 4 (3 mg./vaso)	
x	y	x	y	x	y	x	y
120	145	110	219	160	304	180	425
120	150	110	223	160	297	180	441
60	143	55	205	80	272	90	403
60	136	55	205	80	280	90	414
30	120	33	186	40	240	45	365
50	127	33	186	40	260	45	380
12	93	22	162	28	230	27	330
6	67	11	107	14	162	18	260
3,6	48	5,5	69	10	130	13,5	198
2,4	38	2,2	30	4	64,5	4,5	95
1,2	28,5	—	—	1,6	37,5	1,8	56,5
0,0	17	0,0	0	0,0	15	0,0	28,5

Determinación de la velocidad máxima. — La determinación de V podría hacerse experimentalmente usando una cantidad muy grande de cofermento ($y = V$ para $x \rightarrow \infty$). Esto resultó impracticable, ya que concentraciones de piridoxalfosfato mayores de 500 m γ /c. c. presentan irregularidades en la velocidad de descarboxilación consistentes principalmente en un efecto inhibitor. Por esta razón, V se ha determinado por extrapolación gráfica a partir de los valores de y correspondientes a los tres mayores de x , para cada serie.

Para ello es preciso utilizar un gráfico en el que abscisas y ordenadas vengan convenientemente modificados para obtener una representación lineal. Haciendo operaciones en la ecuación de activación

$$y = \frac{V \cdot x}{K + x}, \text{ obtendremos:}$$

$$\frac{1}{y} = \frac{1}{V} + \frac{K}{V} \cdot \frac{1}{x}$$

de donde se deduce que si la curva de activación se representa gráficamente tomando en abscisas y ordenadas en vez de x e y , sus valores inversos, resulta una recta de ordenada en el origen igual a $1/V$ (3).

En la figura número 1 se ha efectuado esta extrapolación para

las cuatro series; en abcisas y ordenadas se han dibujado escalas de inversos para hacer más rápida la colocación de puntos y la lectura de V .

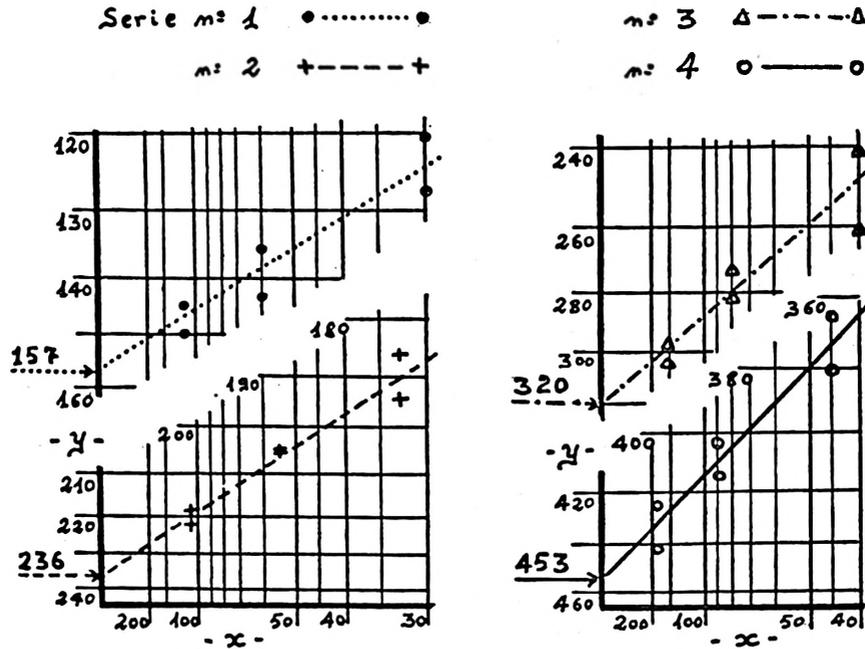


Figura n.º 1

Así se han obtenido los siguientes resultados :

Serie	n.º	1	2	3	4
V =		157	236	320	453

Corrección por decarboxilación residual. — En los resultados experimentales puede observarse que para el valor $x = 0$ (ausencia de piridoxal-fosfato) la velocidad de decarboxilación no es nula más que para la segunda serie. Esto se debe, con gran probabilidad, a que el apofermento o polvo de microbios no está libre por completo de cofermento y es un fenómeno que se ha presentado en casi la misma escala a todos los autores que determinan curvas de activación de la decarboxilasa tirosínica.

Prescindiendo ahora de la causa real y verdadera de esta *decarboxilación residual*, nos interesa corregir el defecto y para ello lo mejor es suponer la causa anterior verdadera y evaluar la cantidad de cofermento residual a que corresponde y después sumar este valor a todos los valores de x de la serie en cuestión.

Para evaluar este cofermento residual a partir de los datos obtenidos hemos encontrado práctico y científico un método de extrapolación gráfica a base de utilizar una *ecuación de activación reducida*.

Damos el nombre de *velocidad reducida de descarboxilación*,

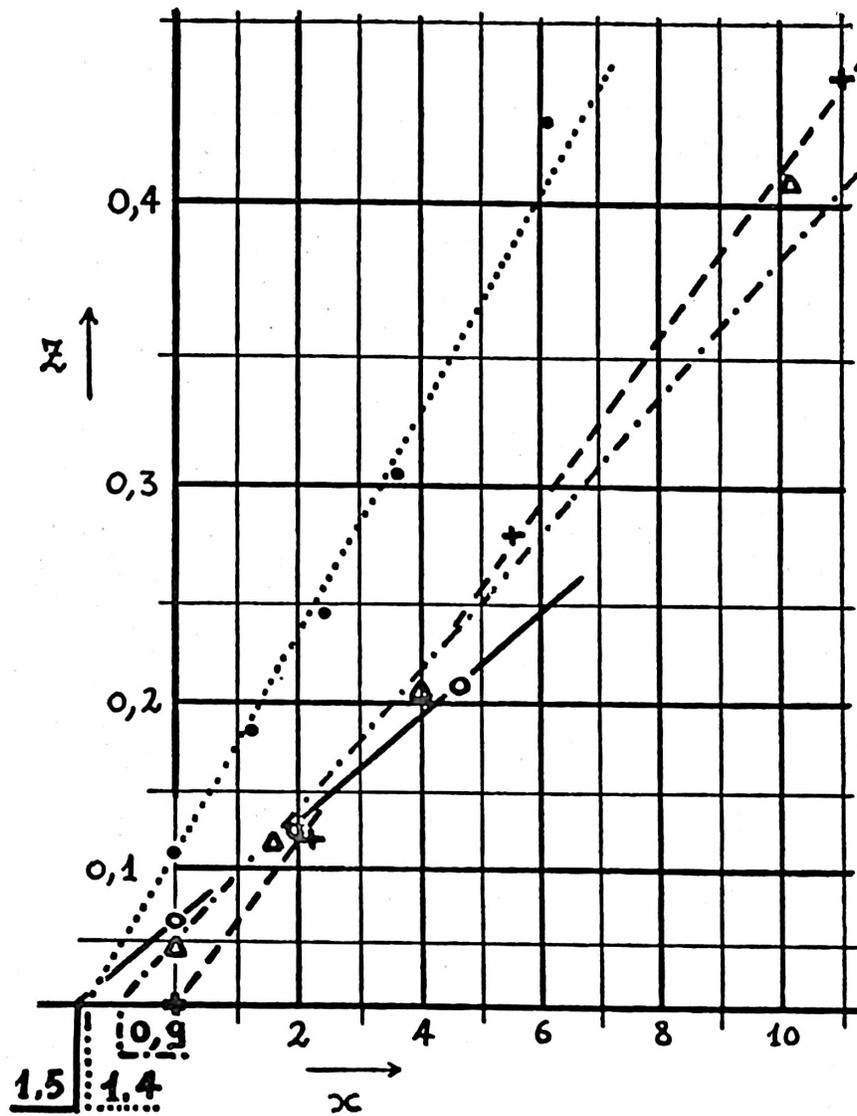


Figura n.º 2

que denotamos z , a la velocidad de descarboxilación medida como fracción de la velocidad máxima, o sea que

$$z = y/V \quad \text{y, por tanto,}$$

ecuación reducida de activación será la que resulta de efectuar el cambio de variable $y = z \cdot V$ en la ecuación de activación, con lo cual se elimina V , quedando en definitiva :

$$z = \frac{x}{K + x}$$

Y haciendo operaciones para que resulte una ecuación lineal respecto x :

$$\frac{z}{1 - z} = \frac{1}{K} \cdot x$$

O sea, que poniendo en un gráfico los valores $z/1 - z$ en ordenadas y los de x en abscisas debe resultar una recta que pasa por el origen; si esto no sucede así sino que las rectas (una para cada serie) cortan el eje de abscisas en su parte negativa, esta *abscisa en el origen* es exactamente la cantidad que hay que sumar a x para corregir la descarboxilación residual.

En la figura 2 se ha efectuado esta determinación para cada una de las cuatro series de mediciones; en ordenadas figura una escala previamente calculada de $1/1 - z$ donde se puede leer directamente z para mayor comodidad. Los valores de z que se necesitan para este gráfico figuran en la tabla de conjunto que se da más adelante.

Así resulta que los valores que hay que sumar a los de x en cada una de las series para corregirlo son los siguientes :

S e r i e	n.º	1	2	3	4
my. a sumar a x		1,4	0,0	0,9	1,5

El hecho particular de que la segunda serie no precise corrección no es ninguna cosa anormal, sobre todo teniendo en cuenta que el valor $x = 0$ dió un valor nulo para la velocidad de descarboxilación.

Resultados

A continuación reunimos en una tabla los valores corregidos de x , la velocidad máxima V , para cada serie, la velocidad de descarboxilación z , la concentración real de apofermento $V - y$ y el valor de la constante de disociación K_1 .

x	y	Y	z	V-y	K _a
Serie n.º 1					
121,4	148	157	0,935	9	7,4
61,4	140		0,895	17	7,7
31,4	123		0,790	34	8,8
13,4	93		0,595	64	9,2
7,4	67		0,425	90	9,9
5,0	48		0,305	109	11,4
3,8	38,5		0,245	118,5	11,6
2,6	28,5		0,180	128,5	11,7
1,4	17		0,110	140	11,5
Serie n.º 2					
110	222	236	0,900	14	6,9
55	205		0,840	31	8,4
33	180		0,770	56	10,3
22	162		0,690	74	10,2
11	107		0,435	129	13,2
5,5	69		0,280	167	12,5
2	30		0,120	206	13,7
Serie n.º 3					
160,9	300	320	0,945	20	10,7
80,9	276		0,870	44	12,8
40,9	250		0,795	70	11,4
28,9	230		0,730	90	11,3
14,9	162		0,515	158	14,6
10,9	130		0,410	190	15,8
4,9	64,5		0,205	255,5	19,5
2,5	37,5		0,120	282,5	19,0
0,9	15		0,045	305	18,2
Serie n.º 4					
181,5	434	453	0,960	19	8,0
91,5	410		0,905	42	9,2
46,5	372		0,820	81	10,1
23,5	330		0,730	123	10,8
19,5	260		0,570	193	14,6
15,0	198		0,435	255	19,7
6,0	95		0,210	358	22,2
3,3	56,5		0,125	396,5	23,1
1,5	28,5		0,065	424,5	22,5

Se observará que desde este momento llamamos K_a a la constante de disociación definida por la fórmula $K_a = \frac{x(V-y)}{y}$

pues se trata de una *constante aparente* y así la distinguiremos de la verdadera constante de disociación que llamaremos K_v .

El hecho de que la constante K_a no sea constante, como se puede ver en la tabla anterior, plantea el problema de la validez de la ecuación de activación

$$y = \frac{x}{K_a + x} \quad \text{con cuya ayuda se calcula.}$$

Otra manera de poner de manifiesto la incapacidad de esta ecuación de activación para encajar los datos experimentales consiste en fijarse en la ecuación de activación reducida $z = \frac{x}{K_a + x}$

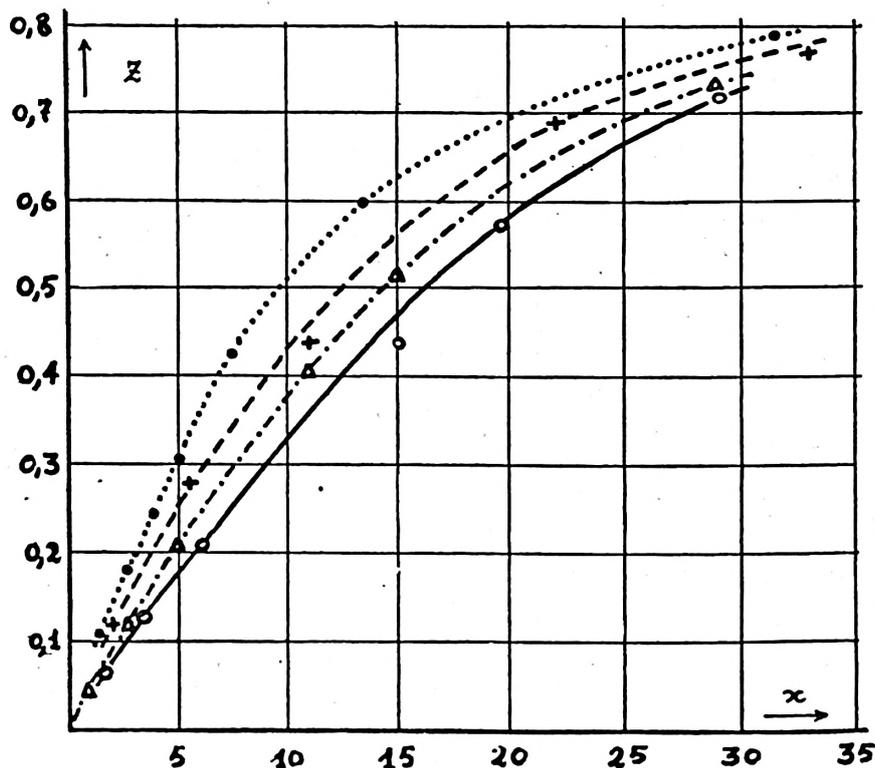


Figura n.º 3

en la cual se nos dice que en un gráfico en que se ponga z en función de x deben coincidir en una sola curva de activación los puntos procedentes de distintas series, ya que la ecuación reducida es independiente de V . Este gráfico corresponde a la figura n.º 3 en la cual se puede observar de una manera clara que los puntos de cada serie dibujan una curva particular de activación.

Discusión

Nueva ecuación de activación. — La modificación que se propone consiste en expresar la concentración de cofermento más correctamente, prescindiendo de la suposición de que la cantidad que se combina en forma de holofermento es despreciable, y considerando la cantidad de cofermento existente en el equilibrio como igual a la que hemos añadido menos la que se ha transformado en holofermento. Esto presenta el inconveniente de que las unidades en que se miden estos dos valores que deben restarse son heterogéneas y, por tanto, es menester multiplicar uno de ellos por una constante de equivalencia, de esta manera :

$$[\text{Cofermento}] = x - c \cdot y$$

con lo cual la ecuación de disociación quedaría en la siguiente forma :

$$K_v = \frac{(x - c \cdot y) \cdot (V - y)}{y}$$

en la que figuran las siguientes dos constantes :

K_v = CONSTANTE DE DISOCIACIÓN (verdadera constante).

c = CONSTANTE DE EQUIVALENCIA (entre las unidades de medida de cofermento y holofermento o sea, más concretamente, $m\gamma$. de cofermento que entran a formar parte de la cantidad de holofermento que posee una velocidad de decarboxilación de $1 \mu\text{l./h.}$).

Con el fin de determinar estas dos constantes a partir de los datos que hemos obtenido en las cuatro series de mediciones, transformaremos la ecuación de la siguiente manera :

$$K_v = \frac{(x - c \cdot y) (V - y)}{y} = \frac{x (V - y)}{y} - c (V - y)$$

y haciendo la sustitución de K_a en vez de su valor, como se ha definido antes, y despejándolo, resulta :

$$K_a = K_v + c (V - y)$$

Si ahora expresamos gráficamente los valores experimentales

tomando en abscisas valores de $V - y$ y en ordenadas los calculados de K_a , obtendremos una recta cuya ordenada en el origen será K_v con una pendiente igual a c .

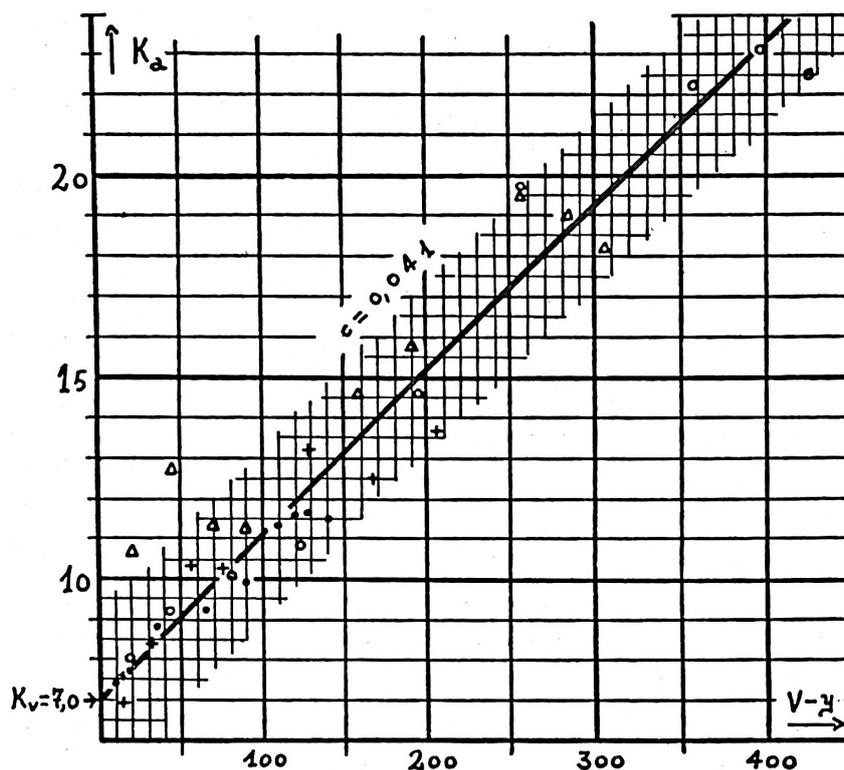


Figura n.º 4

A pesar de los errores experimentales, es evidente en la figura n.º 4 la dependencia lineal entre K_a y $V - y$, confirmando la ecuación modificada. De una manera muy sencilla, por lectura de la ordenada en el origen y cálculo gráfico de la pendiente, se hallan para las dos constantes los siguientes valores :

$K_v = 7,0$ m γ . de piridoxal-fosfato cálcico (70 %) / cc.

$c = 0,041$ m γ . de piridoxal-fosfato cálcico (70 %) / μ l. de anhídrido carbónico.

Como los errores experimentales del método de Warburg son apreciables, no es fácil trazar con seguridad la recta más probable en el gráfico precedente y por ello la recta que figura en él es el promedio de varios trazados. Asimismo y para proceder más cien-

tíficamente se ha realizado el cálculo de dichas constantes por el *método de los mínimos cuadrados*. El cálculo que se hace normalmente para esta clase de ajuste (3) parte del supuesto de que los errores están en la variable que se coloca en ordenadas, mientras que son exactos los valores en abscisas; por esto en nuestro caso ha debido usarse otro proceso de cálculo, más reciente, en el que supone igual probabilidad de error en abscisas y ordenadas (28).

Los valores encontrados por este método (rechazando los dos puntos de la segunda serie que se apartan excesivamente de la recta y que por consideraciones de índole teórica hay razón para suponerlos erróneos) son los siguientes:

$$K_v = 7,02 \quad c = 0,0409$$

en completa concordancia con lo encontrado gráficamente; la mayor precisión conseguida por este método no tiene interés, dados los errores del orden del 3 % en los datos que han servido de punto de partida.

Estas constantes vienen dadas en las unidades usadas corrientemente en los trabajos con el aparato de Warburg y en descarboxilasas, pero ahora conviene pasarlos a unidades más universales o sea a MOLES-LITROS-SEGUNDOS. Para ello se utiliza como valor de pureza del piridoxal-fosfato cálcico empleado el 70 %, que como se ha dicho anteriormente se trata sólo de un valor aproximado y un peso molecular de 285.

$$K_v = \frac{0,7 \text{ gr./gr.} \times 7,0 \text{ m}\gamma./\text{c.c.} \times 10^{-9} \text{ m}\gamma./\text{gr.} \times 10^3 \text{ c.c./l}}{285 \text{ gr./mol}} = 1,7 \cdot 10^8 \text{ moles/litro}$$

$$c = \frac{0,7 \text{ gr./gr.} \times 0,041 \text{ m}\gamma.\text{h./}\mu\text{l.} \times 10^{-9} \text{ gr./m}\gamma. \cdot 22,4 \cdot 10^6 \mu\text{l./mol} \cdot 3600 \text{ seg./h.}}{585 \text{ gr./mol}} = 8,1 \cdot 10^{-3} \text{ seg.}$$

Constante de equilibrio. — La ecuación de activación que hemos tenido que modificar por inadecuada fué comprobada por Gunsalus (10,26) dando para K el valor de $3 \cdot 10^{-7}$ moles/litro; es preciso, por tanto, dar explicación de porqué esta ecuación le sirvió y la discordancia del resultado en la constante de equilibrio. En realidad no puede establecerse comparación, pues Gunsalus trabajó con una mezcla de piridoxal y A. T. P. (adenosintrifosfato) como cofermento y el valor que sustituía en x era la concentración de piridoxal; teniendo esto en cuenta y partiendo de la base de que el A. T. P. es un dador del radical fosfórico, por comparación de ambas constantes se deduce que la conversión del piridoxal en piridoxal-fosfato por medio del A. T. P. es una reacción de equilibrio con una relación de concentraciones de ambos productos (piridoxal : piridoxal-fosfato) de alrededor de 18.

Gunsalus, en un trabajo posterior (13) en el que estudia las propiedades de la descarboxilasa sintética, reconoce que el piridoxal-fosfato posee un poder cod Descarboxilásico 18 veces mayor que la mezcla piridoxal más A. T. P.

Por otra parte es natural que la ecuación de activación no modificada encajara los datos experimentales, pues trabajando con una mezcla de piridoxal y A. T. P. el piridoxal-fosfato que se une al apofermento para formar el fermento completo es re- puesto inmediatamente a expensas de la mayor cantidad de piridoxal presente. Además, aún en experiencias efectuadas con piridoxal-fosfato puede haber aparente concordancia si sólo se lleva a cabo *una sola curva de activación*.

Significado de la constante de equivalencia. — La definición de la misma que hemos dado deja bien claro su significado, pero aquí queremos reparar más bien en aquellas consecuencias o datos que pueden deducirse de este significado.

En primer lugar podemos calcular un valor absoluto de la velocidad de descarboxilación; en efecto, el valor $8,1 \cdot 10^{-3}$ seg. representa moles de cofermento combinado que producen un mol de anhídrido carbónico por segundo y, por tanto, su valor inverso será:

MOLÉCULAS DE TIROSINA DECARBOXILADAS POR UNA MOLÉCULA DE HOLOFERMENTO = 1 2 3 (nótense las condiciones en que este valor tiene validez: pH = 5,5; t = 28,5° C. y tirosina a saturación en atmósfera de aire).

Un segundo dato interesante que se puede calcular a partir de la constante de equivalencia, es el PESO EQUIVALENTE DEL APOFERMENTO; para ello haría falta saber la velocidad de descarboxilación de 1 mg. de apofermento puro en presencia de un exceso de cofermento. Este dato no existe, pero suponiendo que un purificado de apofermento obtenido por Epps (4) es apofermento puro podemos dar un esquema de este cálculo y un valor plausible por cuanto la purificación llevada a cabo por el citado autor es muy completa, por lo que a los procesos actuales de separación de proteínas se refiere.

Epps da como velocidad máxima de descarboxilación V de su producto altamente purificado 46.300 μ l./h. mg. de carbono (Q^c) y admitiendo un contenido en carbono del 50 % (cifra media muy frecuente en proteínas) resulta una velocidad de descarboxilación de 23,150 μ l./h. mg. de proteína. Este cálculo se hace porque dicho autor no aisló la última sustancia en forma seca y referió el poder descarboxilante al contenido en carbono de la disolución (4). Multiplicando este valor por la constante de equivalencia y por la pureza del piridoxal-fosfato y dividiendo por el peso molecular de este último producto resulta:

$$\frac{23.150 \mu\text{l./h.mg. } 0,041 \text{ mg./}\mu\text{l. } 0,7 \text{ gr./gr.}}{285 \cdot 10^9 \text{ mg.}} = 2,33 \cdot 10^{-9} \text{ moles cofermento/mg. apofermento}$$

y por tanto un mol de cofermento se combina con $1/2,33 \cdot 10^{-9} = 4,3 \cdot 10^8$ mg. del apofermento purificado al máximo por Epps.

Es decir, que la apodescarboxilasa tirosínica obtenida del *Streptococcus faecalis* R. tiene, hechas las suposiciones dichas, un peso equivalente igual a 430.000.

Este valor, junto con alguna determinación de peso molecular de la micela proteica de esta sustancia, permitiría calcular el número de moléculas de cofermento soportadas por una unidad coloidal de apofermento.

Resumen

Se estudia el equilibrio de disociación de la descarboxilasa tirosínica producida por el *Streptococcus faecalis* R.

Para ello se usa la técnica manométrica de Warburg y para determinar la velocidad de descarboxilación se sigue un método gráfico. El cálculo de la velocidad máxima se realiza mediante extrapolación gráfica y se desarrolla un método para corregir la descarboxilación residual. Asimismo se propone un procedimiento para la dilución de piridoxal-fosfato (cofermento sintético) que llena las exigencias de la técnica utilizada. Se llevan a cabo medidas de la velocidad de descarboxilación variando ampliamente las concentraciones de cofermento y apofermento dentro de las posibilidades experimentales.

La ecuación de activación (velocidad de descarboxilación en función de la concentración de cofermento para una cantidad fija de apofermento) dada por otros autores resulta demasiado sencilla para ajustar el conjunto de datos experimentales que hemos obtenido; para lograr esta adaptación es necesario modificar la ecuación de activación.

En la ecuación de activación modificada figura una nueva constante que llamamos constante de equivalencia ya que representa la relación entre las unidades usadas para medir la concentración de cofermento y las utilizadas para el apofermento.

Se determina la constante de equilibrio y la constante de equivalencia por el método gráfico y por el de los mínimos cuadrados, después de haber logrado una dependencia lineal entre las variables.

A partir de la constante de equivalencia se calcula una velocidad absoluta de descarboxilación y, además, se analiza la posibilidad de conocer, a partir del mismo dato, el peso equivalente de la apodescarboxilasa tirosínica en su reacción de disociación.

Summary

The dissociation equilibrium of the tyrosine decarboxylase produced by *Streptococcus faecalis* R. is studied.

The Warburg manometric technique is used to measure the decarboxylation rate with a graphical method for better accuracy. The estimation of the maximum rate is accomplished by graphical extrapolation and a mathematical method for correcting residual decarboxilation is develo-

ped. A procedure of dilution of piridoxal-phosphate (synthetic coenzyme) is proposed which is suitable for manometric technique. Measures of the decarboxylation rate are performed with a great range of coenzyme and apoenzyme concentrations, when permitting experimental possibilities.

The activation equation (decarboxylation rate vs. coenzyme concentration at a fixed level of apoenzyme), given by others authors does not fit our experimental measures; to get it fitting the activation equation is modified. In the modified equation there is a new constant which we call *equivalence constant* because it expresses the relation between the coenzyme and apoenzyme units used.

The equilibrium constant K and the equivalence constant c are determined by the graphical and least squares methods, after obtaining a lineal dependence between the variables.

From the value of the equivalence constant a absolute decarboxylation rate is calculated and the possibility of computing the equivalent weight of the tyrosine apodecarboxylase in their dissociation reaction is discussed.

Bibliografía

- (1) BADDILEY, J. y GALE, E. F. : *Nature*, **155**, 727, 1945.
- (2) BELLAMY, W. D. y GUNSALUS, I. C. : *Jour. Bact.*, **48**, 191, 1944.
- (3) DAVIS, D. S. : *Empirical Equations and Nomography*, págs. 6 y 12, 1.ª ed. Mc Graw-Hill, New York, 1943.
- (4) EPPS, H. M. R. : *Biochem. J.*, **38**, 242, 1944.
- (5) FOLKERS, K., HEYL, D., LUZ, E. y HARRIS, S. A. : *Jour. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3430, 1951.
- (6) GALE, E. F. : *Biochem. J.*, **34**, 846, 1940.
- (7) GALE, E. F. y EPPS, H. M. R. : *Biochem. J.*, **36**, 600, 1942.
- (8) GALE, E. F. y EPPS, H. M. R. : *Biochem. J.*, **38**, 250, 1944.
- (9) GALE, E. F. : *Advances in Enzymologie*, **6**, 1, 1946.
- (10) GUNSALUS, I. C. y BELLAMY, W. D. : *J. Biol. Chem.*, **155**, 357, 1944.
- (11) GUNSALUS, I. C. y BELLAMY, W. D. : *J. Biol. Chem.*, **155**, 557, 1944.
- (12) GUNSALUS, I. C., BELLAMY, W. D. y UMBREIT, W. W. : *J. Biol. Chem.*, **155**, 685, 1944.
- (13) GUNSALUS, I. C., UMBREIT, W. W., BELLAMY, W. D. y FORST, C. E. : *J. Biol. Chem.*, **161**, 743, 1945.
- (14) HARRIS, S. A., HEYL, D. y FOLKERS, K. : *Jour. Am. Chem. Soc.*, **66**, 2088, 1944.
- (15) HOLDEN, J. T. y SNELL, E. E. : *J. Biol. Chem.*, **178**, 799, 1949.
- (16) KARRER, P. : *Schweiz. Z. Path. u. Bak.*, **10**, 351, 1947.
- (17) MACNUTT, W. S. y SNELL, E. E. : *J. Biol. Chem.*, **182**, 557, 1950.
- (18) MÜLLER, E. F. : *Zsch. physiol. Chem.*, **254**, 285, 1938.
- (19) SLOANE-STANLEY, G. H. : *Biochem. J.*, **44**, 373, 1949.
- (20) SLOANE-STANLEY, G. H. : *Biochem. J.*, **44**, 567, 1949.
- (21) SNELL, E. E., GUIRARD, B. M. y WILLIAMS, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **143**, 519, 1942.
- (22) SNELL, E. E. : *J. Biol. Chem.*, **154**, 313, 1944.
- (23) SNELL, E. E. : *Jour. Am. Chem. Soc.*, **66**, 2082, 1944.

- (24) SNELL, E. E. : *J. Biol. Chem.*, **158**, 497, 1945.
- (25) UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. y STAUFFER, U. F. : *Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism*, 1945.
- (26) UMBREIT, W. W., BELLAMY, W. D. y GUNSALUS, I. C. : *Arch. Biochem.*, **7**, 185, 1945.
- (27) UMBREIT, W. W. y GUNSALUS, I. C. : *J. Biol. Chem.*, **179**, 279, 1949.
- (28) WEISSBERGER, A. : *Physical Methods of Organic Chemistry* - Thomson, G. H. «Vapor Pressure», pág. 211. — *Interscience Publishers*, New York, 1949.
- (29) WERLE, E. : *Zeitsch. Vi|Ho|Fe*, **1**, 504, 1947|8.