

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

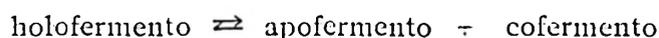
Estudios sobre carboxilasas

III.—Determinación de la constante de Michaelis-Menten de la descarboxilasa tirosínica

por R. Díaz Cadavieco y G. de la Fuente Sánchez

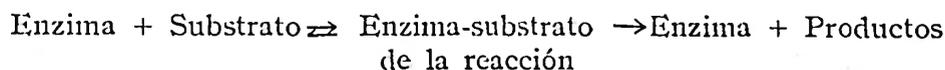
(Recibida para publicar el 3 de junio de 1954)

Condal y Cosín, en dos publicaciones anteriores sobre la descarboxilasa tirosínica, han atendido fundamentalmente al equilibrio :



observando en uno de ellos (3) que los datos experimentales no se ajustaban a la ecuación de activación (velocidad de descarboxilación en función de la concentración de cofermento para una cantidad fija de apofermento) dada por otros autores, siendo preciso introducir en ella una corrección. Basándose en el conocimiento de dicha ecuación de activación, diseñan un método analítico para la determinación de cod Descarboxilasa [piridoxal-fosfato] (4).

El objeto del presente trabajo es estudiar el efecto de la concentración de substrato (L-tirosina) sobre la velocidad de la reacción de la descarboxilasa tirosínica, es decir, considerar el equilibrio :



que obedece a la ley de acción de masas :

(1)

$$K_s = \frac{[\text{enzima libre}] [\text{substrato libre}]}{[\text{enzima-substrato}]} = \frac{[E - ES] [S]}{[ES]}$$

siendo : $[E]$ = concentración total del enzima
 $[ES]$ = concentración del complejo enzima-substrato
 $[S]$ = concentración total del substrato.

Para medir estas concentraciones en el equilibrio es preciso substituir $[E]$ y $[ES]$ por otras magnitudes fácilmente medibles que sean proporcionales a ellas.

Según la teoría de Michaelis-Menten (10), la más general en este campo, la velocidad de la reacción v , es proporcional al complejo enzima-substrato :

$$v = k [ES] \quad (2)$$

y cuando la concentración de substrato es tan alta que prácticamente todo el enzima se haya combinado con él, la velocidad alcanza su valor máximo, V , es decir : $[E] = [ES]$ y entonces :

$$V = k [E] \quad (3)$$

Substituyendo (2) y (3) en (1) tenemos :

$$v = \frac{V [S]}{K_s + [S]} \quad (4)$$

que es la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten, que relaciona la velocidad de la reacción v con la concentración de substrato S , manteniendo constante la concentración del enzima ; K_s es la constante de Michaelis-Menten y V es otra constante, la cual depende de la concentración del enzima y es una medida de la misma.

Esta teoría ha sido extremadamente útil como una primera aproximación del comportamiento de los diferentes enzimas, y al hacer posible la determinación del valor de K_s , ha proporcionado una base de comparación de los diferentes enzimas en términos de su afinidad y actividad.

La constante K_s ha sido determinada en todas las descarboxilasas de los aminoácidos, a excepción de la correspondiente a

la tirosina, debido a la pequeña solubilidad de este aminoácido.

Nosotros hemos efectuado la determinación de su valor empleando soluciones sobre-saturadas de L-tirosina en tampón de acetatos M/5 de pH 5'5, aplicando para ello los métodos gráficos de Lineweaver y Burk (9), quienes transforman la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten en la de una recta :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V} \quad (5)$$

cuya ordenada en el origen es $1/V$ y la pendiente K_s/V .

De todo ello se deduce un método sencillo para hallar las dos constantes de la ecuación, V y K_s , a partir de los datos experimentales, que son las velocidades de descarboxilación medidas con el aparato de Warburg, cuando se varía la concentración de sustrato (tirosina), manteniendo constante la cantidad de fermento (descarboxilasa tirosínica). El procedimiento es como sigue :

a) Se colocan en un sistema de coordenadas cartesianas los recíprocos de los valores experimentales : $[S]$ (concentración de sustrato), y v (velocidad de descarboxilación).

b) Se traza una recta que se ajuste lo mejor posible a los puntos representados, procurando que los comprenda a todos por igual.

c) Se lee en la escala de ordenadas el valor de V , y teniendo en cuenta este valor y el de la medida de la pendiente de la recta, que es igual a K_s/V , se calcula el de K_s .

Material y métodos

FERMENTO.

Como fuente de la descarboxilasa tirosínica se utiliza el microorganismo *Streptococcus faecalis* R (A. T. C. C. 8043).

El medio de cultivo ha sido el siguiente (1, 12) :

| Substancias | peso/100 c.c. | sol. madre | cc./100 cc. |
|------------------------|---------------|------------|-------------|
| Peptona bacteriológica | 1'0 gr. | sólido | |
| K_2HPO_4 | 1'0 » | íd. | |
| Sales B | | | 0'5 |
| Extracto de levadura | 1'0 » | sólido | |
| Glucosa | 1'0 » | íd. | |
| Piridoxal fosfato | 5 » | 0'002 % | 0'25 |
| Acido nicotínico | 50 » | 0'1 % | 0'05 |
| Tirosina | 10 mgr. | sólido | |
| Cistina | 20 mgr. | íd. | |

Las sales B es una mezcla de la siguiente composición :

| | |
|---------------------------------------|---------|
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 4'0 gr. |
| NaCl | 0'2 » |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 0'2 » |
| MnSO ₄ · 4H ₂ O | 0'2 » |

Se añaden dos gotas de HCl concentrado y agua hasta 100 c.c.

El medio de cultivo se prepara : a) disolviendo la glucosa, extracto de levadura, ácido nicotínico y piridoxal fosfato en un volumen de agua destilada de 400 c.c. (cuando se prepara un litro de medio); b) a la leptonina, sales B y K₂HPO₄ se añade 300 c.c. de agua y se calienta al baño maría a 80° C unos 15 minutos para que flocule el precipitado y se filtre sobre a); c) la tirosina y cistina se disuelven en una cantidad pequeña de agua con ayuda de unas gotas de HCl concentrado y se añade agua hasta 200 c.c. y se junta con las otras sustancias. Se calienta al baño maría a 80° C para expulsar el tolueno y se filtra después de ajustar el pH a 7,1—7,3 y completar con agua el volumen de un litro.

La estirpe se conserva en un cultivo de agar de la siguiente composición :

| | |
|----------------------|-------|
| Glucosa | 0'5 % |
| Acetato sódico | 0'6 % |
| Extracto de levadura | |
| Difco. | 1'0 % |
| Agar | 1'5 % |

Se miden unos 5 c.c. en cada tubo de ensayo, se esteriliza en autoclave 20 m. a 115° C y se deja enfriar en posición inclinada.

Los trasplantes y la siembra del cultivo definitivo se hace a través de un cultivo líquido intermedio de unos 10 c.c. de la misma composición que el medio de cultivo citado en primer lugar. Estos cultivos intermedios se mantienen en estufa a 37° C durante 24 horas. La siembra del medio de cultivo final se hace diluyendo con agua estéril uno intermedio en la relación de 1 : 20, y de esta suspensión se mide un volumen de 4 c.c./1.000 c.c. de medio. Se incuba 20 horas a 37° C y si el crecimiento es completo, el pH del medio es 4,4—4,6.

Se enfría a 0° C y se centrifuga a 3.000 revoluciones por minuto. El residuo se lava dos veces con NaCl al 0'9 %, previamente enfriado a 0° C. Las bacterias se suspenden en un pequeño volumen de agua (5 cc.), y cuando se ha conseguido una homogenización perfecta, se vierte gota a gota, agitando enérgicamen-

te sobre 40 cc. de acetona anhidra y neutra al permanganato que se ha enfriado a 0° C. Se mantiene a 0° C durante unos 10 minutos para que floculen todas las proteínas y el líquido que sobrenade sea transparente.

Se filtra con succión y el residuo se lava dos veces con acetona para secarlo. Se deja unos minutos al aire hasta que quede totalmente seco al evaporarse la acetona y se coloca en tubos pequeños dentro de otros que contienen ácido sulfúrico concentrado y van provistos de una tubuladura para hacer el vacío. Finalmente, se hace el vacío y se lleva a la nevera, conservando en estas condiciones la actividad durante varios meses.

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES SOBRESATURADAS DE TIROSINA.

Una solución sobresaturada de L-tirosina en tampón de acetatos M/5 de pH 5'5 contiene 0'472 gr. por 1.000 c.c. que equivale a una molaridad de 0'0026 M.

Nosotros hemos estudiado la estabilidad de las soluciones sobresaturadas de tirosina en el tampón y pH arriba citados, de las siguientes molaridades:

- | | |
|--------------|--------------|
| (a) 0'0208 M | (d) 0'0100 M |
| (b) 0'0156 M | (e) 0'0080 M |
| (c) 0'0130 M | (f) 0'0050 M |

Primeramente hemos preparado una solución 0'0208 M colocando en un erlenmeyer Jena o Pyrex la cantidad calculada de L-tirosina y el volumen correspondiente de tampón. Se calienta cuidadosamente agitando de vez en cuando. Cuando toda la L-tirosina se ha disuelto, se filtra en caliente para separar cualquier indicio que pueda actuar con posterioridad de núcleo de cristalización. La solución que está a unos 80° C se enfría bruscamente con agua corriente hasta unos 40° C con el fin de ganar tiempo y favorecer la estabilidad de la sobresaturación, puesto que al enfriar rápidamente las moléculas no tienen tiempo de ordenarse y se dificulta el proceso de su cristalización.

A partir de esta solución, mediante dilución con el tampón calentado previamente a 30° C, se preparan las restantes soluciones de tirosina.

En cada vaso del Warburg se ponen 3 c.c. de estas soluciones, se mete en el termostato a 30° C y se somete a una pequeña agitación durante unos ocho minutos; al sacar los vasos del termostato se observa que en las soluciones (a) y (b) hay tirosina cristalizada, pero en los restantes vasos se ha mantenido la sobre-

saturación, lo cual indica que las soluciones correspondientes son estables en condiciones semejantes a las que tendrán lugar en las experiencias posteriores.

En estas experiencias la temperatura ambiente en el laboratorio fué de $30^{\circ} \text{C} \pm 1$ y todo el material de vidrio, vasos, pipetas, etc., fué calentado previamente a dicha temperatura.

TÉCNICA MANOMÉTRICA DE WARBURG.

1. *Aparato.* — Para determinar las velocidades de descarboxilación se ha utilizado el aparato de Warburg (15) provisto de unos vasos cónicos con brazo lateral y capacidad total de 17-18 c.c. que son los que corrientemente se utilizan en dicho aparato.

2. *Substrato.* — Hemos empleado como substrato soluciones sobresaturadas de L-tirosina (B. D. H.) en solución amortiguadora de acetato sódico M/5 de pH 5'5.

Se prepara aparte la solución de tirosina de mayor molaridad y a partir de ésta, diluyéndola convenientemente con el mismo tampón, se obtienen las restantes. En el compartimento principal de cada vaso se colocan 2'7 c.c. de cada una de dichas soluciones.

Trabajamos siempre con un volumen de líquido constante de 3'0 c.c. de modo que la concentración inicial de L-tirosina experimenta una dilución cuyo factor es 0'9.

3. *Fermento.* — El polvo de microbio se disuelve en el tampón de acetatos, con lo que se obtiene una solución opalescente debido a los restos celulares. Se coloca un volumen de 0'3 c.c. en el brazo lateral del vaso.

La cantidad de polvo de microbio por vaso es de 4'; 5'; 5'; 6'; 10; 10 mg. para cada una de las seis series, respectivamente.

4. *Descarboxilación.* — Todas las experiencias de descarboxilación se han realizado a 30°C y como ya hemos dicho anteriormente hemos mantenido la misma temperatura en el laboratorio y en el material.

Los vasos con sus correspondientes manómetros se introducen en el termostato y se someten a una pequeña agitación durante 7 a 8 minutos, al cabo de los cuales se sacan para volcar la tirosina. Inmediatamente se vuelven al termostato y se aumenta la velocidad de agitación. Después de dos minutos para que se restablezca el equilibrio térmico se hace la primera lectura; las restantes se realizaron a intervalos de 2,5 minutos hasta un total de 20 minutos.

5. *Determinación de la velocidad inicial de descarboxilación.* — La velocidad inicial de descarboxilación se determina de la siguiente manera:

a) A las lecturas de los manómetros que son mm. de presión de líquido de Brodie, se les resta la efectuada en el tiempo cero, o sea, la primera lectura, corregida con la variación sufrida por el termobarómetro.

b) Se llevan las lecturas corregidas a un sistema de coordenadas cartesianas representándolas en función del tiempo, y se dibuja la recta ideal de descarboxilación que mejor comprenda los tres o cuatro primeros puntos.

c) Se mide la pendiente de la recta, expresando la velocidad de descarboxilación en mm. de presión del líquido de Brodie / h. c.c., la cual al multiplicarla por la constante del vaso viene en μ l de CO_2 / h. c.c.

A continuación damos un resumen de las operaciones realizadas para determinar la velocidad de descarboxilación.

Resultados

Mediante el aparato de Warburg hemos determinado un conjunto de valores de la función $v = f(S, V)$, variando los valores de S, para varios valores de V.

El conjunto de valores de v que corresponden a un valor dado de V, y que por lo tanto, están en la misma curva v-S, denominamos Serie.

Nosotros hemos realizado seis series de experiencias (de las cuales dos están repetidas), como se puede ver en la Tabla I, columnas 1.^a y 2.^a.

En cada serie se emplean tres y como máximo cuatro concentraciones distintas de sustrato (tirosina) de forma que sus valores abarquen una variación de concentración lo más amplia posible experimentalmente; aunque en el caso de la tirosina, debido a su poca solubilidad necesariamente no es grande.

Como trabajamos con cinco vasos, sin contar el del termobarómetro, en la serie en que figuran cuatro concentraciones diferentes de tirosina (serie núm. 2 y 3), se repite una de las concentraciones (la $[S] = 0'0112$ M); y dos en el caso de que sean tres las concentraciones distintas de tirosina (series núm. 1, 4, 5 y 6), repitiendo las medidas de v para los valores de $[S]$ igual a $0'0112$ y $0'0050$ M.

Las cantidades de fermento por vaso, medidas en mg. de polvo seco, son para cada serie las siguientes:

| | | | | | | |
|------------|---|---|---|---|----|----|
| Serie núm. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| mgs. | 4 | 5 | 5 | 6 | 10 | 10 |

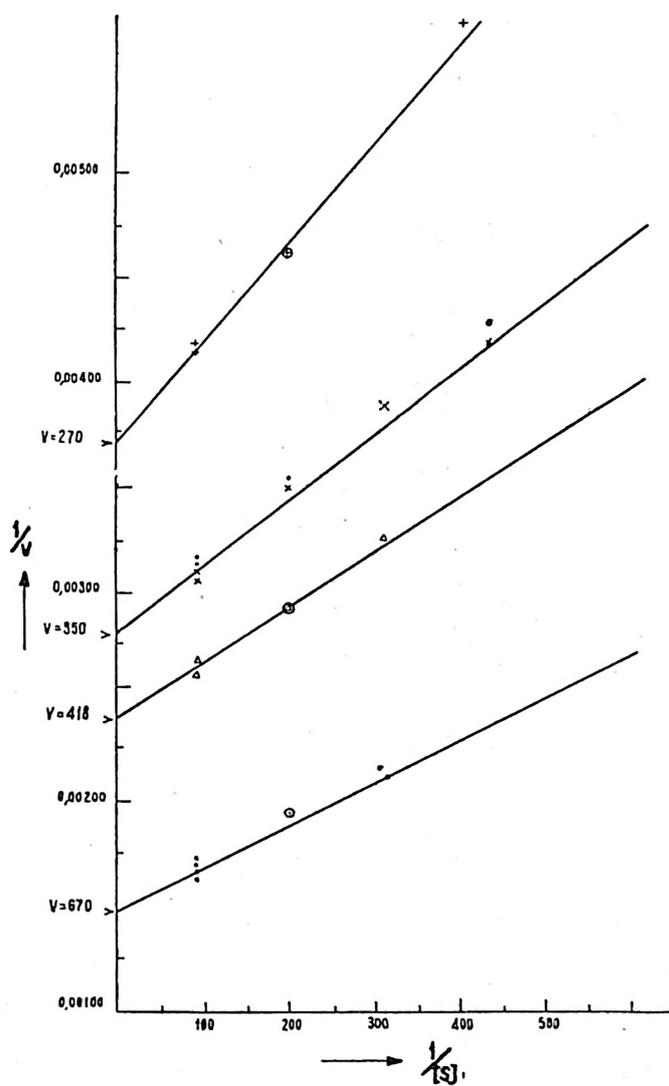
TABLA I

| [S] | v | $1/[S]$ | $1/v$ | V | V-v | $\frac{V}{v}$ | Esgráfica | $K_s \frac{[S](Vv)}{v}$ |
|-------------|-----|---------|---------|-----|-----|---------------|-----------|-------------------------|
| SERIE N.º 1 | | | | | | | | |
| 0'0112 | 240 | 89 | 0'00416 | 270 | 30 | 1'12 | 0'0013 | 0'0014 |
| 0'0112 | 243 | 89 | 0'00411 | | 27 | 1'11 | | 0'0012 |
| 0'0050 | 217 | 200 | 0'00460 | | 53 | 1'24 | | 0'0013 |
| 0'0050 | 217 | 200 | 0'00460 | | 53 | 1'24 | | 0'0013 |
| 0'0025 | 175 | 400 | 0'00571 | | 95 | 1'54 | | 0'0013 |
| SERIE N.º 2 | | | | | | | | |
| 0'0112 | 326 | 89 | 0'00306 | 350 | 24 | 1'07 | 0'0012 | 0'0008 |
| 0'0112 | 322 | 89 | 0'00310 | | 28 | 1'06 | | 0'0010 |
| 0'0050 | 285 | 200 | 0'00350 | | 65 | 1'23 | | 0'0011 |
| 0'0032 | 257 | 312 | 0'00389 | | 93 | 1'36 | | 0'0011 |
| 0'0023 | 240 | 434 | 0'00416 | | 110 | 1'46 | | 0'0010 |
| SERIE N.º 3 | | | | | | | | |
| 0'0112 | 316 | 89 | 0'00316 | 352 | 36 | 1'11 | 0'0012 | 0'0012 |
| 0'0112 | 320 | 89 | 0'00312 | | 32 | 1'10 | | 0'0011 |
| 0'0050 | 282 | 200 | 0'00354 | | 70 | 1'24 | | 0'0012 |
| 0'0032 | 257 | 312 | 0'00389 | | 95 | 1'37 | | 0'0012 |
| 0'0023 | 231 | 434 | 0'00432 | | 121 | 1'52 | | 0'0012 |
| SERIE N.º 4 | | | | | | | | |
| 0'0112 | 377 | 89 | 0'00265 | 418 | 41 | 1'10 | 0'0011 | 0'0012 |
| 0'0112 | 382 | 89 | 0'00261 | | 36 | 1'09 | | 0'0010 |
| 0'0050 | 341 | 200 | 0'00293 | | 77 | 1'22 | | 0'0011 |
| 0'0050 | 341 | 200 | 0'00293 | | 77 | 1'22 | | 0'0011 |
| 0'0032 | 305 | 312 | 0'00327 | | 113 | 1'37 | | 0'0012 |
| SERIE N.º 5 | | | | | | | | |
| 0'0112 | 604 | 89 | 0'00165 | 675 | 71 | 1'11 | 0'0015 | 0'0013 |
| 0'0112 | 596 | 89 | 0'00167 | | 79 | 1'13 | | 0'0015 |
| 0'0050 | 515 | 200 | 0'00194 | | 160 | 1'31 | | 0'0015 |
| 0'0050 | 515 | 200 | 0'00194 | | 160 | 1'31 | | 0'0015 |
| 0'0032 | 462 | 312 | 0'00216 | | 213 | 1'46 | | 0'0014 |
| SERIE N.º 6 | | | | | | | | |
| 0'0112 | 583 | 89 | 0'00171 | 660 | 75 | 1'12 | 0'0013 | 0'0014 |
| 0'0112 | 591 | 89 | 0'00169 | | 67 | 1'11 | | 0'0013 |
| 0'0050 | 515 | 200 | 0'00194 | | 143 | 1'27 | | 0'0014 |
| 0'0050 | 515 | 200 | 0'00194 | | 143 | 1'27 | | 0'0014 |
| 0'0032 | 468 | 312 | 0'00213 | | 190 | 1'41 | | 0'0013 |
| | | | | | | | 0'0013 | 0'0012 |

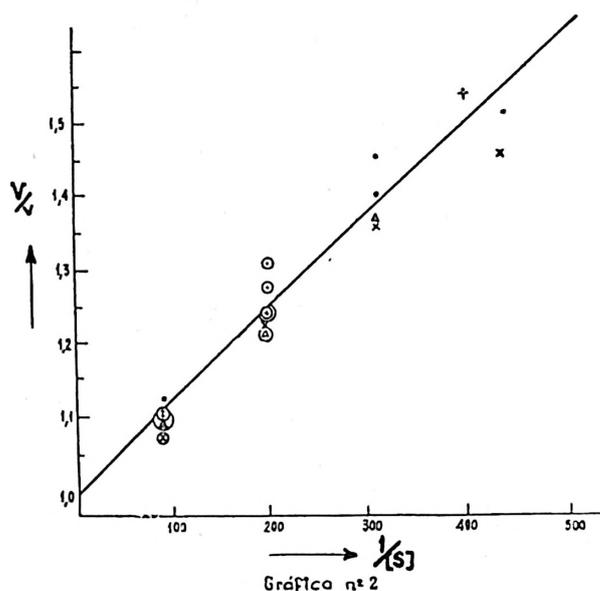
En las columnas 3.^a y 4.^a de la misma Tabla I aparecen tabulados los valores recíprocos de [S] y v.

Estos datos tienen una inmediata interpretación llevando los valores de $1/[S]$ y $1/v$ a un sistema de coordenadas cartesianas (Gráfica núm. 1), pudiéndose observar que se encuentran distribuidos a lo largo de una recta cuya ordenada en el origen nos da el valor de V (Tabla I, columna 5.^a).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$



y midiendo las pendientes permite el cálculo gráfico de K_s (la constante de Michaelis-Menten), en cada una de las series, pudiéndose observar que su valor se mantiene constante al variar ampliamente la cantidad de fermento empleado de una serie a otra (V entre 270-675).



Calculado el valor de V , como hemos indicado más arriba, todas las magnitudes que intervienen en la determinación de K_s son ya conocidas

$$K_s = \frac{(V - v) [S]}{v}$$

y por consiguiente es posible su cálculo (Tabla I, columna 9.^a).

Por otra parte, la ecuación de velocidad 5 se puede escribir de la siguiente manera:

$$\frac{V}{v} = K_s \frac{1}{[S]} + 1$$

lo que permite representar en una sola gráfica los valores experimentales de las seis series, llevando al eje de ordenadas los valores de $\frac{V}{v}$ y en abscisas los de $1/[S]$ (Gráfica núm. 2).

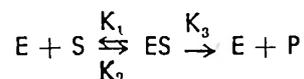
El examen de los valores de K_s que figuran en las columnas 8.^a y 9.^a de la Tabla indica que hay una concordancia satisfactoria entre los valores de K_s (calculado gráficamente) ($= 0'0013 M$) y el obtenido a partir de la ecuación de velocidad ($= 0'0012 M$).

Finalmente, la representación de $\frac{V}{v} - \frac{1}{[S]}$ pone de manifiesto de una manera gráfica que, dentro del campo de variación de $[S]$ en que hemos trabajado, la K_s se mantiene constante, lo cual había sido observado anteriormente del examen de los valores de las columnas 8.^a y 9.^a de la Tabla.

Discusión

A. SIGNIFICADO DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN.

La teoría de Michaelis-Menten que se puede formular :



postula que k_1 y k_2 tienen un valor muy grande en comparación con k_3 (pero sobre todo $k_2 > k_3$); por lo tanto, la cinética de la reacción está regida por la descomposición de $ES \xrightarrow{k_3} E + P$ lo que equivale a decir que la reacción es monomolecular.

Postula, además, que la concentración de enzima es muy pequeña comparada con la de sustrato de modo que :

$$K_s = \frac{[E - ES] [S - ES]}{[ES]} = \frac{[E - ES] [S]}{[ES]}$$

De esta forma se deduce la ecuación de Michaelis-Menten :

$$v = \frac{V [S]}{K_s + [S]}$$

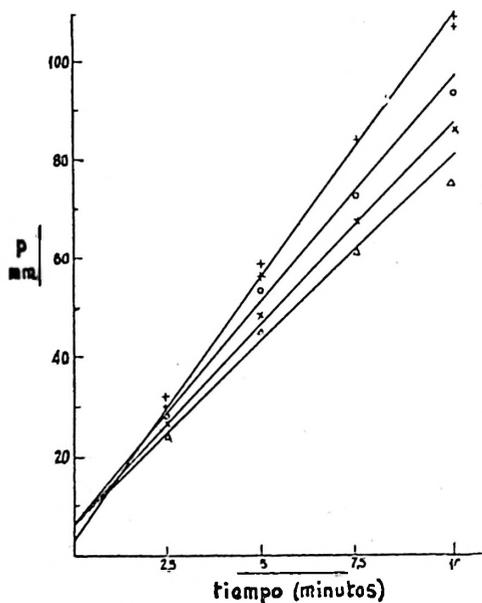
que permite seguir la variación de la velocidad de la reacción (v) en función de la concentración de sustrato (S), interviniendo una constante (K_s), llamada constante de Michaelis-Menten, cuya significación, si se cumplen las condiciones antes citadas,

es la de una verdadera constante de disociación del complejo ES en enzima y sustrato y, en consecuencia, su valor recíproco es una medida de la afinidad del enzima para con el sustrato.

Numéricamente K_s es igual a la concentración de sustrato para la cual la velocidad es mitad de su valor máximo, como es fácil de deducir de la ecuación citada en último lugar al hacer $v = \frac{1}{2} V$.

Frente al esquema sencillo formulado por Michaelis-Menten han surgido críticas muy duras.

| Tiempo (minutos) | 0 | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 12,5 | 15 | 17,5 | 20 | |
|------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|-----|
| 1 | lecturas (P) | 62 | 92 | 119 | 147 | 172 | 191 | 210 | 227 | 244 |
| | $P_0 + corr.$ | | 62 | 62 | 63 | 63 | 62 | 62 | 64 | 64 |
| | mm (corregidos) | 0 | 30 | 57 | 84 | 109 | 129 | 148 | 163 | 180 |
| 2 | P | 75 | 106 | 133 | 160 | 187 | 208 | 226 | 243 | 262 |
| | $P_0 + c$ | | 75 | 75 | 76 | 76 | 75 | 73 | 77 | 77 |
| | mm | 0 | 31 | 58 | 84 | 111 | 133 | 151 | 166 | 185 |
| 3 | P | 72 | 100 | 124 | 146 | 166 | 181 | 192 | 204 | 214 |
| | $P_0 + c$ | | 72 | 72 | 73 | 73 | 72 | 72 | 74 | 74 |
| | mm | 0 | 28 | 54 | 73 | 93 | 109 | 120 | 130 | 140 |
| 4 | P | 144 | 144 | 144 | 145 | 145 | 144 | 144 | 146 | 146 |
| | P_0 | | 144 | 144 | 144 | 144 | 144 | 144 | 144 | 144 |
| | corrección | | 0 | 0 | +1 | +1 | 0 | 0 | +2 | +2 |
| 5 | P | 44 | 70 | 93 | 114 | 134 | 146 | 154 | 159 | 159 |
| | $P_0 + c$ | | 44 | 44 | 45 | 45 | 44 | 44 | 46 | 46 |
| | mm | 0 | 26 | 49 | 69 | 89 | 102 | 110 | 113 | 115 |
| 6 | P | 68 | 93 | 115 | 153 | 144 | 147 | | | |
| | $P_0 + c$ | | 68 | 68 | 69 | 69 | 68 | | | |
| | mm. | 0 | 23 | 47 | 64 | 75 | 89 | | | |



| Vaso | Tirosina (pag) | Signo | Pendiente en el gráfico | constante del vaso (pag) | Velocidad de descarboxilación per vaso | Velocidad de descarboxilación per c.c. |
|------|----------------|-------|-------------------------|--------------------------|--|--|
| nº | [S] mols/l | | mm/h | $\mu\text{l}/\text{mm}$ | $\mu\text{l}/\text{h}$ | $\mu\text{l}^V/\text{h.c.c.}$ |
| 1 | 0,0112 | + | 106 | 1,54 | 978 | 326 |
| 2 | 0,0112 | + | 106 | 1,52 | 966 | 322 |
| 3 | 0,0050 | o | 92 | 1,55 | 855 | 285 |
| 5 | 0,0032 | x | 83 | 1,55 | 771 | 257 |
| 6 | 0,0023 | Δ | 78 | 1,54 | 720 | 240 |

Briggs y Haldane (2) ponen objeciones a la sencilla derivación de Michaelis-Menten, pues lleva consigo el admitir que la velocidad de formación y disociación de ES en $E + S$ es infinita en comparación con la velocidad de hidrólisis observada (k_1 y $k_2 \gg k_3$).

Basándose en consideraciones de estadística molecular ellos rechazan esa suposición y presentan el mismo esquema de reacción, admitiendo igualmente que la concentración de enzima es muy pequeña frente a la de sustrato.

Manejando principios elementales de cinética y aplicando el cálculo matemático se llega a la ecuación :

$$v = \frac{V [S]}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + [S]}$$

Y si hacemos $\frac{k_2 + k_3}{k_1}$ que es un cociente constante igual a K_s , esta ecuación es formalmente idéntica a la ecuación de Michaelis-Menten, pero varía el significado de K_s que en este caso no es una verdadera constante de disociación del complejo enzima-sustrato, sino una constante característica del enzima resultante de la combinación de tres constantes de velocidad.

Por lo tanto, la K_s calculada a partir de los datos experimentales puede no ser la verdadera constante de disociación del complejo ES, aunque en la mayoría de los casos puede emplearse como tal.

B. VELOCIDAD MÁXIMA.

Aunque hemos introducido el término V en la ecuación de Michaelis-Menten, es importante darse cuenta de que la velocidad máxima no se puede obtener en este tipo de reacciones que son asintóticas y tienden hacia un valor hipotético, el cual nunca se alcanza. En consecuencia, no nos podemos imaginar el empleo de un exceso de sustrato para saturar el enzima, excepto en un sentido muy figurativo.

No careció de importancia la crítica formulada por Nelson (11) a la teoría de Michaelis-Menten en el sentido de que una de las mayores dificultades en aplicar la teoría y calcular K_s es determinar V experimentalmente. Si se hace aumentando continuamente la concentración de sustrato, las desviaciones aumentan debido a la acción represiva de los productos de la reacción, hecho que había sido señalado claramente por Henri (7) y que

Michaelis y Menten eliminan de una manera parcial separando experimentalmente esta acción mediante la determinación de la velocidad inicial de la reacción y no sobrepasando una concentración de sacarosa de 5-6 %.

Lineweaver y Burk (9) han proporcionado una ingeniosa solución al problema de calcular V experimentalmente, haciendo transformaciones algebraicas en la ecuación de Michaelis.

Así se obtiene la ecuación :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$

Y representando $1/v$ frente a $1/[S]$, los puntos estarán sobre una línea recta de ordenada en el origen $1/V$ y pendiente K_s/V .

Esto significa experimentalmente que se pueden emplear concentraciones moderadas de sustrato, puesto que tanto si adoptamos un método gráfico para determinar V y K_s , como si hacemos un ajuste de los datos y determinamos analíticamente la recta, el valor de V lo calculamos por extrapolación a cero en la escala $1/[S]$, lo que equivale a una concentración de S igual a infinito.

C. IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO ENZIMA-SUSTRATO.

La idea de la formación de un compuesto enzima-sustrato ha resultado ser extremadamente útil, no obstante el carácter puramente hipotético que ha tenido hasta hace unos años.

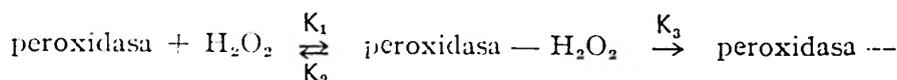
Recientemente, se ha podido comprobar directamente la existencia de compuestos intermedios entre enzimas y sustratos.

Los estudios fueron hechos en las catalasas y peroxidasas que son, sin duda alguna, las reacciones enzimáticas más intensamente estudiadas como lo atestigua su abundante literatura.

Stern (13) realizó medidas directas del complejo catalasa-monoetil peróxido de hidrógeno por espectroscopia y encontró que este compuesto era inestable, pero no dió ningún dato sobre la cantidad o la velocidad de descomposición del monoetil peróxido de hidrógeno en las experiencias espectroscópicas.

Al mismo tiempo, Keilin y Mann (8) estudian también espectroscópicamente el compuesto peroxidasa y H_2O_2 y observan que se forma un complejo peroxidasa- H_2O_2 , y que se descompone rápidamente en presencia de un aceptor de oxígeno, pero no dan ninguna relación directa entre este compuesto intermedio y la actividad enzimática.

Son los trabajos de Chance (5) con peroxididas los que aclaran este punto al hacer un estudio minucioso del equilibrio:



productos y determinar las constantes de velocidad k_1 , k_2 y k_3 de formación y disociación del complejo intermedio. Estos nuevos datos han sido comparados con la constante de Michaelis calculada por el procedimiento clásico y encuentran una coincidencia muy satisfactoria, demostrando la validez, al menos en el caso de estas enzimas, de uno de los postulados de partida, esto es, que la actividad del enzima está estrechamente ligada al compuesto intermedio enzima-sustrato.

Estos estudios son muy complejos a causa del gran número de dificultades técnicas y a la escasez de métodos apropiados para detectar los compuestos enzima-sustrato durante la acción catalítica.

Se comprende fácilmente que la sensibilidad y rapidez de tales métodos deben ser muy superiores a los empleados en los estudios del proceso total.

Los estudios espectrofotométricos han sido muy aplicados. Están basados en que la formación del compuesto enzima-sustrato va acompañada de variaciones de sus propiedades ópticas y magnéticas, lo cual permite la medida cuantitativa de la formación del complejo enzima-sustrato.

Las variaciones de la susceptibilidad paramagnética de las hemoproteínas, no solamente da información de la formación del complejo enzima-sustrato, sino también indica el tipo de enlaces y valencia del ión en el compuesto. Estos métodos teóricamente son mucho más satisfactorios que los métodos ópticos, aunque tienen el inconveniente que su sensibilidad es inferior al 1 % de la alcanzada por métodos espectrofotométricos y la velocidad de respuesta es inferior al 0'1 % (14).

D. MÉTODOS GRÁFICOS PARA CALCULAR K_s .

El procedimiento más elemental e inexacto de calcular K_s consiste en representar en coordenadas cartesianas la velocidad inicial de la reacción, respecto a la concentración de sustrato, tomando luego el valor de la concentración de sustrato que corresponde a una actividad mitad de la máxima.

Por este método se ha calculado, entre otras muchas, la constante de Michaelis-Menten de las descarboxilasas de los aminoácidos: 1 (—) histidina; 1 (—) lisina; 1 (+) arginina; 1 (+)

ácido glutámico y 1 (+) ornitina, excepto la de la 1 (—) tirosina debido a la poca solubilidad de este aminoácido (6).

Una primera mejora consistió en tomar en abscisas $-\lg[S]$ y en ordenadas v , obteniéndose una curva en forma de «ese», procediendo en lo demás como se ha indicado anteriormente; pero este procedimiento es, además de incómodo, poco exacto.

Sin duda alguna, es la representación propuesta por Lineweaver y Burk la más ampliamente aceptada, siendo sus ventajas:

a) Convierte la ecuación teórica en la de una recta resultando más fácil unir los puntos reales.

b) Permite el cálculo de V , eliminando el factor de mayor indeterminación en el cálculo de K_s .

c) Desde un punto de vista teórico pone a nuestra disposición un método sencillo para ensayar si una reacción enzimática se ajusta al esquema formulado por Michaelis-Menten o requiere una interpretación más compleja.

d) De la medida de la ordenada en el origen y la pendiente de la recta se calcula del valor de K_s .

e) Finalmente, esta ecuación desempeña un papel fundamental en los estudios de inhibición.

Lineweaver y Burk propusieron dos ecuaciones:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}; \quad \frac{[S]}{v} = \frac{1}{V} [S] + \frac{K_s}{V}$$

De la primera ya hemos indicado su empleo.

En la segunda ecuación, representando los valores de $[S]/v$ respecto a $[S]$ se obtiene una línea recta de pendiente $1/V$ y ordenada en el origen K_s/V , pero sólo ha sido empleada en algunos casos aislados.

E. CRÍTICA DEL VALOR DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN DE LA DESCARBOXILASA TIROSÍNICA.

El hecho de que no se haya determinado la constante de Michaelis-Menten de la descarboxilasa tirosínica con anterioridad, se debe a dos razones:

1.^a A la escasa solubilidad del aminoácido en agua o en soluciones débilmente ácidas, que determina que la concentración más grande de 1 (—) tirosina sea 0'0026 M, que corresponde a una solución saturada de pH 5'5, y 30° C.

2.^a El no emplear las ecuaciones de Lineweaver y Burk para determinar las constantes V y K_s .

La primera dificultad fué superada por nosotros empleando

soluciones sobresaturadas de tirosina hasta una concentración máxima de 0'0112 M, estudiando previamente su estabilidad en condiciones de tiempo y temperatura idénticas a las experimentales (pág. 4).

Pero existe otra dificultad también de tipo experimental que limitó nuestro trabajo y que consiste en la determinación de la velocidad inicial de la reacción.

En los trabajos con descarboxilasas de aminoácidos, se toma como velocidad inicial el número de μ l de CO_2 desprendidos durante los primeros cinco minutos (v_5).

Este valor v_5 , para concentraciones no alejadas de la saturación (y por encima de ella), corresponde a un punto próximo a la recta que resulta de extrapolar a cero la curva μ l de CO_2 — tiempo.

Esto se realiza trazando la línea que une los tres primeros puntos obtenidos al leer los manómetros a intervalos de 2'5 minutos, los cuales se encuentran en relación lineal.

Al disminuir la concentración de sustrato, los puntos se curvan rápidamente, siendo preciso determinar la velocidad inicial de reacción trazando la tangente geométrica a la curva en el origen; procedimiento éste que no empleamos porque está sujeto a grandes errores y conduce en la práctica a resultados bastantes arbitrarios.

Por esta razón no hemos empleado concentraciones de 1(—) tirosina inferiores a 0'0023 M, y entre este valor y el de 0'0112 M tomado como límite superior de concentración sólo es posible manejar tres y como máximo cuatro concentraciones diferentes de sustrato, afinando todo lo posible las medidas manométricas en el Warburg.

Dentro de esta variación limitada de la concentración de sustrato, los valores experimentales se ajustan perfectamente bien a la ecuación de Michaelis-Menten cuando se varía con gran amplitud el valor de la constante V.

Debido a las circunstancias que acabamos de señalar no nos es lícito sacar más conclusiones que el del valor de la constante de Michaelis-Menten de la descarboxilasa tirosínica que es $1'3 \cdot 10^{-3}$ M, o sea, del mismo orden que la K_s de la lisina $1'5 \cdot 10^{-3}$ y, por lo tanto, se encuentra entre los valores de K_s de la 1 (—) histidina y 1 + arginina ($7'5 \cdot 10^{-4}$ M) y los correspondientes de la L (+) ornitina y 1 (+) ácido glutámico ($4 \cdot 10^{-3}$ M y $2'7 \cdot 10^{-3}$ M, respectivamente (6).

La teoría de Michaelis-Menten ha sido extraordinariamente útil como una primera aproximación para explicar el comportamiento de los enzimas, y ha proporcionado una base de compa-

ración de los diferentes fermentos en términos de su afinidad y actividad.

Y no se puede negar que ha servido para imponer orden en el amplio campo de investigación enzimática, en donde, a falta de una teoría con base química, se había acumulado abundante material experimental que resultaba difícil de ordenar y clasificar.

Resumen

Hemos estudiado la influencia de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción de la descarboxilasa tirosínica producida por el *Streptococcus faecalis* R, empleando para ello soluciones sobresaturadas de tirosina.

Las experiencias se han llevado a cabo en el aparato de Warburg, siguiendo fácilmente el curso de la reacción por el aumento de presión producido por el CO₂ que se desprende.

Utilizando métodos gráficos se determina la velocidad de descarboxilación inicial, v , y la velocidad máxima, V , variando todo lo posible experimentalmente las concentraciones de sustrato y enzima.

Nuestros datos experimentales se ajustan a la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten, calculando analítica y gráficamente el valor de la constante de Michaelis-Menten, K_s , que resulta ser igual a 0'0012 M.

Se discute el significado de dicha constante, así como los diferentes métodos empleados en su cálculo y en la determinación de V .

Summary

A study has been carried out on the influence of the variation in concentration of the substrate and the enzyme on the speed of reaction of tyrosine decarboxylase produced by the *Streptococcus Faecalis* R, employing Warburg's technique.

The dates obtained are in accordance with the equation of speed of Michaelis-Menten. Graphically and analytically the constant of Michaelis-Menten, K_s , has been calculated and amounts to 0,0012 M.

The signification of this constant as well as the different methods employed in calculating same and in determinating the maximal speed, are discussed.

Bibliografía

1. BARTON-WRIGHT, E. C.: Practical methode for the microbiological assay of the vitamin B complex and essential amino acids. Ashe Laboratories, pág. 54.
2. BRIGGS, C. E. y HALDANE, J. B. S.: *Biochem. J.*, **19**, 338, 1925.
3. CONDAL BOSCH, L. y COSÍN GARCÍA, R.: *R. esp. Fisiol*, **8**, 153, 1952.
4. CONDAL BOSCH, L. y COSÍN GARCÍA, R.: *R. esp. Fisiol*, **9**, 189, 1953.
5. CHANCE, B.: *J. Biol. Chem.*, **151**, 553, 1943.
6. GALE, E. F.: *Advances in Enzymology*, **6**, 1, 1946.
7. HENRI, V.: Tesis Doctoral. París, 1903.

8. KEILIN, D. y MANN, T. : *Proc. Roy. Soc. (London) B* **122**, 119, 1937.
9. LINEWEAVER, H. y BURK, D. : *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658, 1934.
10. MICHAELIS, L. y MENTEN, M. L. : *Biochem. Zeitschr.*, **49**, 333, 1913.
11. NELSON, J. M. y VOSBURG, W. C. : *J. Am. Chem. Soc.*, **39**, 790, 1917.
12. SLOANE-STANLEY, G. C. : *Biochem. J.*, **44**, 373, 1949.
13. STERN, E. C. : *Enzymologia*, **4**, 145, 1937.
14. THEORELL, H. : *Arkiv. Kem. Mineral. Geol.*, 16 A, **1**, 8, 1943.
15. UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. y STAUFER, J. F. : *Manometric techniques and related methods for the study of tissue metabolism*. Burgess Publishing Co. Minneapolis. Minn. 1945.

