

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica. — Madrid
Director: Prof. Dr. A. Santos Ruiz

Estudios sobre carboxilasas

V. Composición en aminoácidos de la bacteria *Streptococcus faecalis* R.

R. Díaz Cadavieco y G. de la Fuente Sánchez

(Recibido para publicar el 3 de febrero de 1955)

Como complemento a nuestras dos anteriores notas relativas a determinación de la constante de Michaelis-Menten para la decarboxilasa tirosínica y a la acción inhibitoria de la tiramina sobre el mismo fermento (1, 2), hemos considerado de interés hacer un estudio de la composición en aminoácidos de las proteínas que integran las células de la bacteria *Streptococcus faecalis* R., que ha sido empleada como fuente del enzima citado.

Con anterioridad, Freeland y Gale (3) publicaron un trabajo en este sentido a fin de determinar si la composición en aminoácidos de las proteínas de la bacteria varía con las condiciones de crecimiento del organismo. Estos autores emplearon decarboxilasas específicas para determinar los siguientes aminoácidos: arginina, lisina, histidina, tirosina y ácido glutámico.

Nosotros hemos aplicado la cromatografía sobre papel, en su modalidad monodimensional ascendente a la separación de los siguientes aminoácidos.

Ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glicocola, treonina, alanina, arginina, tirosina, histidina, valina, metionina, isoleucina, leucina y prolina.

La determinación cuantitativa de estos aminoácidos se ha efectuado midiendo la densidad total del color por fotometría directa sobre el papel.

Material y métodos

Obtención de la bacteria. — Como fuente de la bacteria hemos utilizado el microorganismo *Streptococcus faecalis* R. (A. T. C. C. 8.043).

La composición del medio de cultivo, su preparación, conservación, trasplantes y siembra se detallan en una publicación anterior (1).

TÉCNICA CROMATOGRÁFICA.

Papel y disolventes. — Hemos empleado papel de filtro S. y S. 2.043, cortado en tiras de 6 cm. de ancho, lavadas previamente con solución tampón 0.067 M del pH deseado y secadas a la temperatura ambiente.

El disolvente se saturó de la disolución tampón poniendo ambos juntos en un embudo de decantación durante una noche a 25°.

Como quiera que en las determinaciones de prolina, isoleucina y leucina el frente del disolvente alcanza el extremo del papel antes de finalizar la experiencia, se debe coser un pequeño rollo de algodón en el extremo más alto de la tira de papel para evitar el regreso del disolvente después de alcanzar el borde (5).

Las modalidades y pH de los tampones empleados fueron los siguientes :

pH

Composición

8.4 50 cm.³ de ácido bórico y ClK 0.067 M + 8.5 cm.³ de NaOH 0.067 M.

12.0 50 cm.³ de Na₂HPO₄ 0.067 M + 50 cm.³ de NaOH 0.067 M.

Los disolventes empleados fueron :

Disolvente	pH	Molaridad	Aminoácido	Tiempo (horas)	% de ácido acético en la ninhidrina
Fenol	12'0	0'067	Acido aspártico Acido glutámico Serina Glicocola Treonina Alanina	40	4
M-cresol	8'4	0'067	Alanina + arginina Tirosina Histidina Valina Metionina	52	2
alcohol bencílico y butílico (1:1)	8'4	0'067	Prolina Isoleucina Leucina	60	2

Aparato. — Nuestra cámara de cromatografía ha sido una probeta de 70 × 80 cm., cerrada por un cristal plano, provista de dos agujeros redondos, que están tapados por tapones de goma atravesados por alambre de acero inoxidable y de cuyo extremo interior cuelgan las dos tiras de papel de filtro. El disolvente se coloca en un cristallizador en el fondo de la cámara y fuera de él la solución tampón saturada de disolvente.

Colocación de la muestra. — Todas las soluciones patrón e hidrolizados fueron ajustados a pH 6.2. Se colocaron 13.8 μ l a lo largo de una línea situada a 5 cm. del extremo inferior del papel de filtro, empleando para ello un capilar previamente tarado y una regla.

Humedad. — A fin de trabajar con un grado de humedad constante, el papel de filtro se mantuvo doce horas en el interior de la cámara de cromatografía antes de sumergirlo en el disolvente.

Secado. — Los cromatogramas desarrollados con fenol se secan en corriente de aire de 25° C y a continuación se lavan dos veces con éter anhidro libre de peróxidos. Los desarrollados con m-cresol se calientan una hora a 60° C en una estufa de corriente de aire y luego se lavan con éter un par de veces. La mezcla de alcohol bencílico y butílico (1:1) se elimina sometiendo el cromatograma a una corriente de aire a la temperatura ambiente.

Colorante y desarrollo del color. — Los aminoácidos se colorean sumergiendo los cromatogramas en 2 % de ninhidrina disuelta en acetona, que contiene una cantidad pequeña de ácido acético, y el color se desarrolla colocando los cromatogramas en una estufa a 80° C durante quince minutos, estando el aire saturado de vapor de agua, excepto en la determinación de prolina, que empleamos 0.2 % de isatina + 4 % de ácido acético en acetona.

Determinación de la densidad total del color. — A continuación determinamos la densidad total del color por fotometría sobre el papel de filtro. Para ello medimos la densidad óptica a intervalos de 2 mm. a lo largo del papel, desplazando el cromatograma frente a una rendija de 35 × 0.5 mm., que es atravesada por la luz verde obtenida con ayuda de una bombilla (6 V. ; 4.5 A.), en combinación de una lente y de un filtro de interferencia con una banda de absorción de 570 m μ (en el caso de la prolina de 600 m μ) (fig. 1). Estos valores se representan en coordenadas cartesianas en función de la distancia y se dibuja la línea de la base que mejor se ajuste a los valores

dados por el blanco del papel a lo largo del cromatograma (figs. 1 bis, 2 y 3). Finalmente, se mide con un planímetro la superficie limitada por la curva y la línea de la base, siendo estos valores directamente proporcionales a la concentración de los aminoácidos.

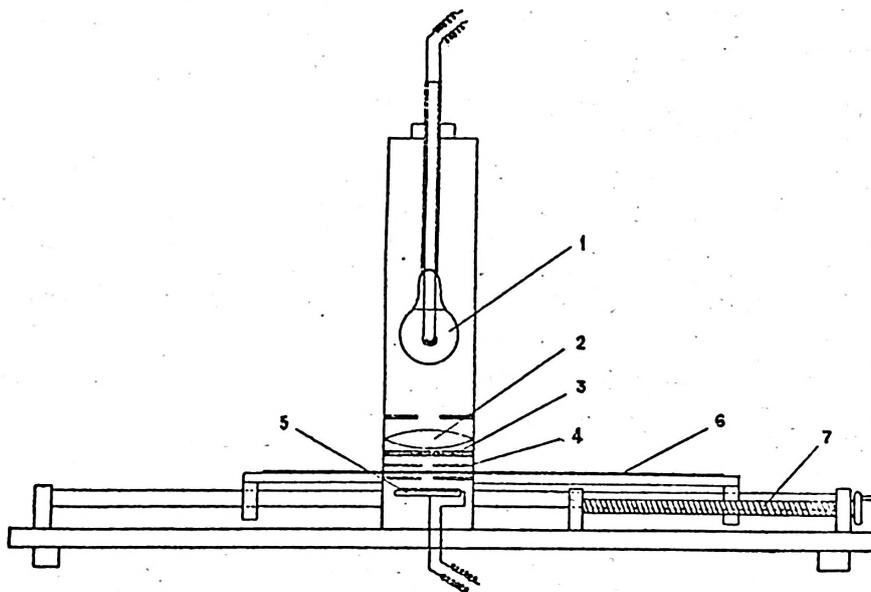


Figura 1

Condiciones de hidrólisis. — Los hidrolizados se efectuaron de acuerdo con Jacobsen (4), para que la destrucción de los aminoácidos sea mínima.

Se pesan 41.2 mg. de bacteria, se disuelven en 4 cc. de HCl concentrado y se añaden otros 4 cc. de agua. Se calienta durante veintidós horas a reflujo con baño de glicerina a una temperatura de 115-120° C. El HCl se separa destilándolo varias veces bajo vacío en atmósfera de nitrógeno. El residuo fué disuelto en 3 cc. de agua, se añade NaOH 0.1 n para ajustar el pH a 6.4 y, finalmente, un 10 % de alcohol isopropílico.

Resultados

La tabla I contiene una lista de los aminoácidos investigados por nosotros y el tanto por ciento en que dichos aminoácidos se encuentran en el polvo de microbio (gráficas 2, 3 y 4).

A fin de corregir en el hidrolizado total los valores de los

TABLA I

AMINOACIDOS	gr. de aminoácido/100 gr. de bacteria Valor medio	gr. de aminoácido/100 gr. de bacteria (retenido) Valor medio	gr. de aminoácido/100 gr. de bacteria (corregidos) Valor medio
Acido aspártico	5'9	0'2	5'7
Acido glutámico	7'3	0'3	6'5
Serina	1'4	0'1	1'3
Glicocola	2'5	0'1	2'4
Treonina	3'0	0'0	3'0
Alanina	5'4	0'6	4'8
Alanina + arginina	13'6	1'1	12'5
Arginina (*)	8'2	0'5	7'7
Tirosina	2'7	0'2	2'5
Histidina	1'6	0'0	1'6
Valina	4'3	0'0	4'3
Metionina	1'2	0'0	1'2
Isoleucina	8'0	0'0	8'0
Leucina	10'4	0'0	10'4
Prolina	1'2	0'0	1'2

(*) Valores calculados por diferencia.

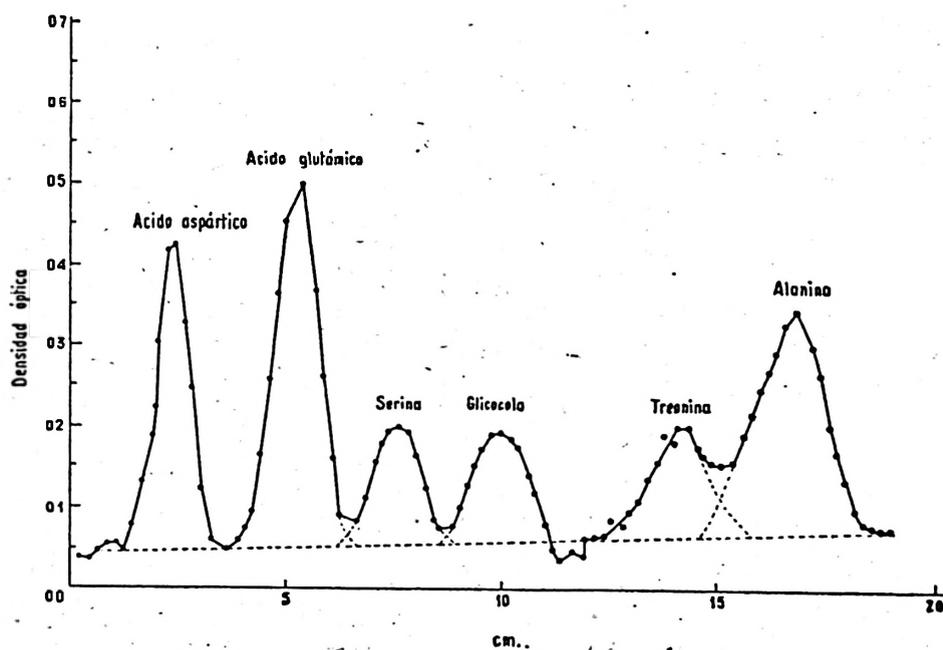


Figura 1 bis

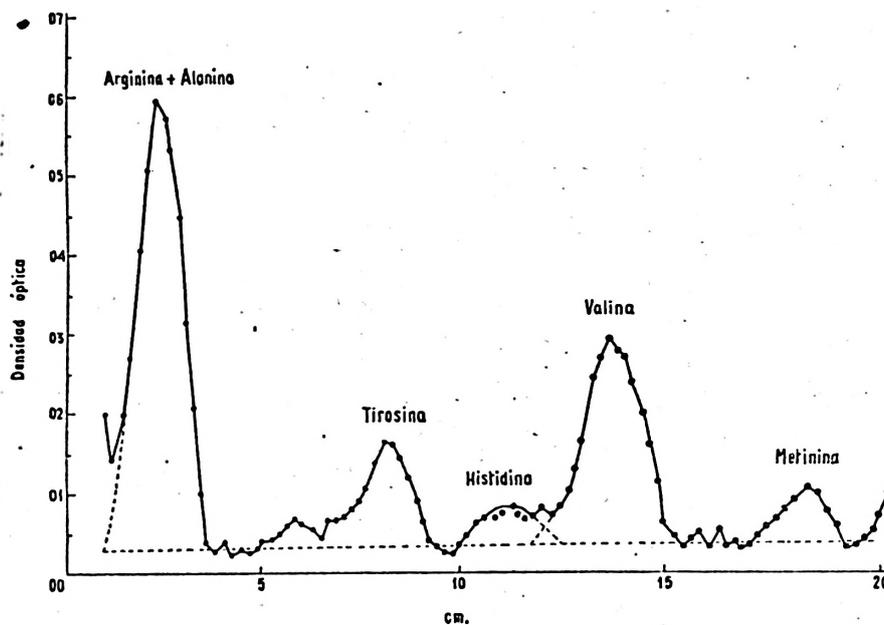


Figura 2

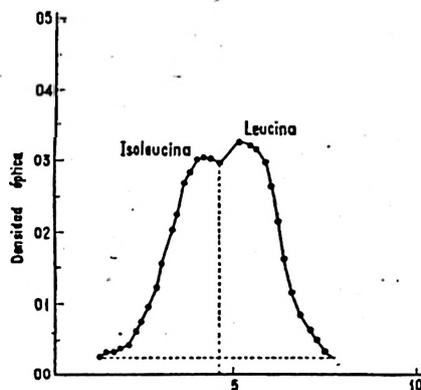


Figura 3

aminoácidos libres aportados por el medio de cultivo, se forma una suspensión de 48.5 mg. de bacteria en 1.5 cm.³ de agua. Se calienta al baño María durante veinte minutos; se centrifuga y se decanta el líquido. Este líquido se somete también a la cromatografía (tabla I, columna 3).

Discusión

La cromatografía sobre papel es un procedimiento analítico extraordinariamente manejable y sensible, y resulta muy útil cuando se manejan cantidades pequeñas de mezclas inorgánicas y de sustancias orgánicas. Su aplicación al análisis de los hidrolizados de proteínas permite obtener valores exactos para la mayoría de los aminoácidos.

Los valores publicados en la tabla I ponen de manifiesto que en la composición de la bacteria que nosotros hemos utilizado como fuente de la decarboxilasa tirosínica intervienen los catorce aminoácidos investigados cuantitativamente, encontrando que existe una mayor proporción de leucina, isoleucina y arginina, siguiendo en importancia los ácidos glutámico y aspártico, la alanina y valina, la treonina, tirosina y glicocola, y, finalmente, la histidina, serina, metionina y prolina.

Resumen

Se realiza por cromatografía sobre papel el análisis de los aminoácidos contenidos en un hidrolizado total de la bacteria *Streptococcus faecalis* R.

Se emplea la técnica monodimensional ascendente y la determinación cuantitativa se efectúa por fotometría directa sobre el papel.

Hemos encontrado que existe en su composición una mayor proporción de leucina, isoleucina y arginina (10.4 ; 8.0 y 7.7 %, respectivamente), siguiendo en importancia los ácidos glutámico y aspártico, la alanina y valina (6.5 % ; 5.7 % ; 4.8 % ; 4.8 %), la treonina, tirosina y glicocola (3.0 % ; 2.5 % ; 2.4 %), y, finalmente, la histidina, serina, metionina y prolina (1.6 % ; 1.3 % ; 1.2 % y 1.2 %).

Summary

The amino-acids contained in the bacteria *Streptococcus faecalis* R. hydrolysate are investigated by paper chromatography. The monodimensional ascendant method is employed, photometry being practiced direct on paper.

The amino-acids in greater proportion are : Leucine (10.4 %), Isoleucine (8.0 %) and Arginine (7.7 %). There are also Glutamic acid (6.5 %), Aspartic acid (5.7 %), Alanine (4.8 %), Valine (4.8 %), Threonine (3.0 %), Tyrosine (2.5 %), Glycine (2.4 %), Histidine (1.6 %), Methionine (1.2 %) and Proline (1.2 %).

Bibliografía

- (1) DÍAZ CADAVIECO, R. y DE LA FUENTE SÁNCHEZ, G. : *R. esp. Fistol.*; **10**, 103, 1954.
- (2) DÍAZ CADAVIECO, R. y DE LA FUENTE SÁNCHEZ, G. : *R. esp. Fistol.*; **10**, 235, 1954.
- (3) FREELAND, J. C. y GALE, E. F. : *Biochem. J.*; **41**, 135, 1947.
- (4) JACOBSEN, C. F. : *Compt. rend. Lab. Carlsberg ser. Chim.*; **26**, 455, 1949.
- (5) MIETTINEN, J. K. y VIRTANEN, A. I. : *Acta Chem. Scand.*; **3**, 459, 1949.