

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica  
Departamento de Bioquímica. Madrid  
(Prof. Dr. A. Santos Ruiz)

## Estudios sobre enzimas descarboxilantes XVIII. L. glutamato descarboxilasa

### Determinación de la constante de Michaelis-Menten. Su aplicación a la valoración de piridoxal-5-fosfato

por

F. Mayor, M.<sup>a</sup> Cascales, P. Marcos y A. Santos Ruiz

---

(Recibido para publicar el 11 de abril de 1962)

En una publicación anterior (16), dimos cuenta de la selección, entre cincuenta y nueve materiales vegetales, de la semilla de *Lupinus albus* como fuente más conveniente para la obtención de L. glutamato descarboxilasa, así como de la purificación parcial de la enzima. Otros datos, tales como su estabilización, acción de quelantes sobre el extracto crudo, etc., fueron igualmente consignados. En el presente trabajo exponemos los resultados obtenidos en la determinación de la constante de Michaelis-Menten  $K_m$  del extracto de *Lupinus* y de la enzima purificada, y en la aplicación de esta última a la valoración manométrica del piridoxal-5-fosfato (PLP). Creemos que las conclusiones alcanzadas, unidas a las de una segunda parte de este mismo trabajo (17) — que completan en algunos puntos las que aquí se refieren —, pueden contribuir al mejor conocimiento y utilidad de esta enzima que, tanto por su general ubicación como por la importancia metabólica del substrato y de los productos de la reacción, ocupa un plano importante entre las descarboxilasas de monopéptidos.

### Material y métodos

*Material.* Las determinaciones manométricas se han llevado a cabo en un aparato de Warburg (Braun, modelo SL 65). Los disgregadores mecánicos empleados son modelos de la casa Turmix Berrens y el molino de grano para la molturación de semillas es un modelo accionado a mano. El pH se ha medido con un aparato Radiometer L.22. Las determinaciones colorimétricas se han llevado a cabo en un fotocolorímetro Klett-Summerson. Las centrifugas utilizadas son los modelos Magnum MSE y centrifuga MSE refrigerada.

*Productos.* Acido L. glutámico Merck, BDH y Light, al estado de glutamato sódico pH 5,7 mediante la oportuna adición de sosa concentrada recién preparada. El PLP empleado procede de las firmas California Foundation for Biochemical Research, Merck y Hoffman La Roche. Los demás productos utilizados en el presente trabajo han sido obtenidos de las casas comerciales de nuestro país.

*Preparación de extractos crudos de las semillas de Lupinus albus.* La harina, obtenida por molturación hasta grano fino, se mezcla en Turmix con 5 volúmenes de tampón fosfatos Na-K M/4 pH 5,7 a 4° C, durante tres minutos. El homogenado resultante se filtra por tela. El filtrado se utiliza inmediatamente.

*Preparación de la enzima parcialmente purificada.* Se lleva a cabo como se indica en nuestro anterior trabajo sobre este tema (16). La determinación de proteínas se realiza por el procedimiento de LOWRY y colaboradores (15). En las condiciones experimentales empleadas para la determinación de actividad descarboxilante, hemos comprobado la inexistencia total de actividades ureásica y transaminantes. El aelectroforograma de la preparación proporciona, como indicamos, una banda euglobulínica prácticamente única.

*Determinación de la actividad enzimática.* Se ha realizado por el procedimiento habitual de Warburg, mediante la medida manométrica del CO<sub>2</sub> desprendido. La composición de los vasos se indica en el lugar correspondiente. El volumen final es de 4 ml. En el bulbo lateral se disponen, siempre, 0,5 ml de sustrato a la concentración oportuna. Temperatura: 37°C. Agitación: 3,5 de amplitud y 150 o.p.m. Atmósfera: aire; pH: 5,7. Para corregir el error por retención del tampón en las condiciones experimentales, hemos calculado la constante de vaso (KV) mediante la fórmula de JOHNSON (10). Los resultados de cada experiencia se han corregido con las lecturas simultáneas del termobarómetro y de los blancos. Las lecturas se han reali-

zado a intervalos de dos minutos. Una vez en el baño termos-tático, los vasos se dejan durante 10 minutos en agitación suave, para conseguir el equilibrio térmico del sistema. Se paran, se sitúan los mandos en las nuevas condiciones de agitación y amplitud, y se mezclan los componentes de cada vaso a intervalos de 10 segundos. Al reintegrarlos al baño se acciona el mando individual del conjunto manómetro-vaso, que proporciona las condiciones de agitación propias del período de lectura. Se considera valor a tiempo cero la lectura realizada a los dos minutos después de haber volcado el contenido del bulbo lateral en el compartimento central del vaso.

### Resultados

*K<sub>m</sub> del extracto crudo.* En la tabla I se expresan los resultados obtenidos en numerosas series concordantes, utilizando el extracto crudo frente a distintas concentraciones de sustrato. Mientras que en el purificado la reacción es de orden cero — en el intervalo de tiempo considerado —, en el extracto se produce una disminución progresiva de actividad, que ha sido comentada extensamente por varios autores (1, 2, 21). Por esta razón, hemos empleado el sistema propuesto por SCHALES y SCHALES (21, 22) que procura una estricta relación lineal entre la velocidad de reacción y la cantidad total de CO<sub>2</sub> liberado en un tiempo dado. En consecuencia, las velocidades iniciales se han determinado mediante la representación, en abscisas, de los  $\mu$  de CO<sub>2</sub> desprendidos en cada intervalo de lectura y, en ordena-

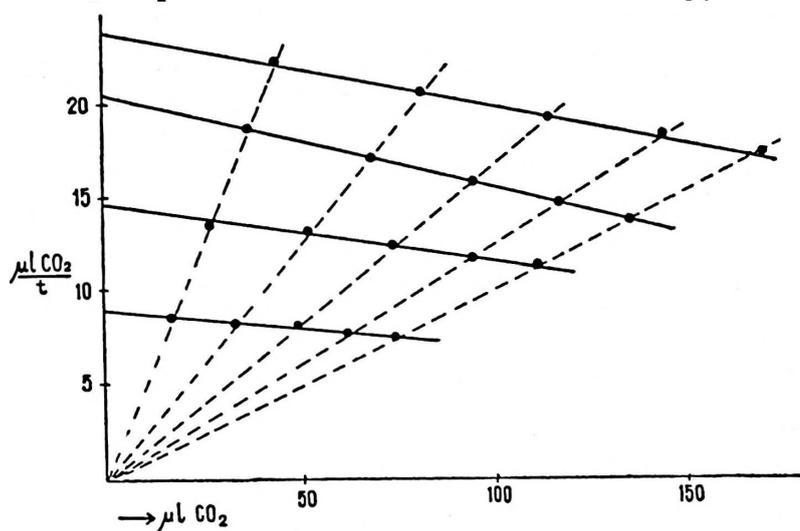


FIGURA I. — Cálculo de las velocidades iniciales de descarboxilación en el extracto crudo de *Lupinus albus*.

das, de los  $\mu\text{l CO}_2/\text{tiempo}$  (fig. 1). Los vasos contenían, en su compartimento central, 1 ml de extracto en tampón fosfatos Na-K M/4 pH 5,7, en la proporción 1p/5v; 0,3 ml de una solución de PLP que contiene 100  $\mu\text{g}$  por ml y 2,2 ml de tampón fosfatos. En el brazo lateral, se disponen 0,5 ml de soluciones de glutamato sódico de la molaridad conveniente para dar las concentraciones finales expresadas en la tabla I. Las condiciones experimentales son las indicadas.

TABLA I

Velocidades de reacción de la L.(+).glutamato descarboxilasa del extrato crudo de *Lupinus albus*, frente a distintas concentraciones de substrato.

(S)	$\mu\text{l CO}_2 \cdot 10'$	Velocidades iniciales		
		$V_i$	$V_i \cdot 10 \cdot K_v$	$10^3/v$
0,068	208			
0,051	199			
0,034	191	23,8	261	3,8
0,017	160	20,4	240	4,2
0,0085	137	14,6	186	5,4
0,00425	96	9,2	124	8,1

De acuerdo con la representación de actividad frente a concentración de substrato, se escogieron las concentraciones de glutamato más adecuadas para la determinación de la  $K_m$ . Siguiendo el método de LINEWEAVER y BURK (14), que enfrenta los valores de  $1/(S)$  y  $10^3/v$  en las ordenadas cartesianas (fig. 2), se obtuvo un valor de  $K_m = 5,5 \times 10^{-3} \text{ M}/1$ .

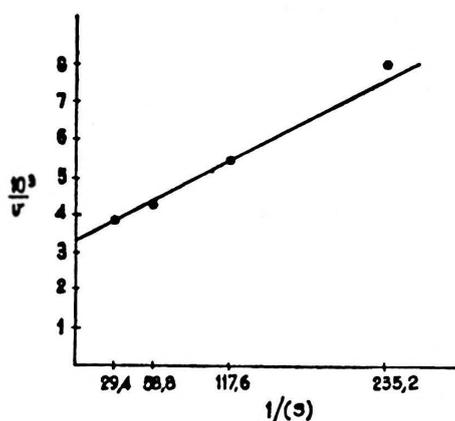


FIGURA 2. — Cálculo de la  $K_m$  de la L-glutamato descarboxilasa del extracto de *Lupinus albus*.

$K_m$  del preparado purificado. Los resultados obtenidos en varias series, utilizando distintas preparaciones enzimáticas frente a una gama de concentraciones de glutamato sódico, se indican en la tabla II. El compartimento central del vaso contiene

TABLA II

Velocidades de reacción de la L.(+).glutamato descarboxilasa purificada frente a distintas concentraciones de sustrato.

(S)	v	1/V	$K_m$ gráfica	$K_m = \frac{(S) \cdot (V - v)}{v}$
0,051	129	5,6	$2,12 \times 10^{-2}$	0,0194
0,034	108			0,0220
0,017	78			0,0218
0,0085	49			0,0222
0,00425	32			0,0194
				0,0209
0,0425	240	3	$2,10 \times 10^{-2}$	0,0165
0,02825	174			0,0258
0,02125	160			0,0230
0,017	140			0,0232
0,0085	92			0,0221
0,00425	61			0,0191
				0,0216
0,02825	111	5,5	$2,25 \times 10^{-2}$	0,0181
0,02125	87			0,0232
0,017	74			0,0248
0,0085	47			0,0244
0,00425	28			0,0233
0,00085	8			0,0185
				0,0222
0,017	130	3	$2,4 \times 10^{-2}$	0,0265
0,0113	106			0,0242
0,0085	80			0,0266
0,0068	69			0,0260
0,0034	45			0,0218
0,0017	29			0,0174
				0,0238

0,4 ml de preparación enzimática en glicerina (equivalente a 0,2 ml de enzima purificada); 0,3 ml de PLP (100  $\mu$ g por ml); y 2,8 ml de tampón fosfatos Na-K M/4 pH 5,7. En el bulbo lateral, 0,5 ml de glutamato sódico pH 5,7 a la concentración oportuna.

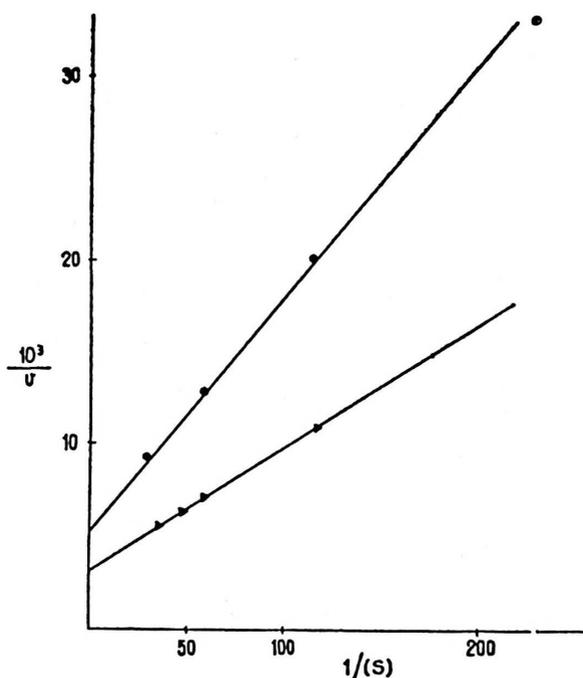


FIGURA 3.—Determinación de la  $K_m$  de la enzima purificada, según el método gráfico de LINEWEAVER y BURK.

La  $K_m$  gráfica, hallada por el procedimiento de LINEWEAVER y BURK (14) (fig. 3; se representan las dos primeras series de la tabla, como ejemplo de distintas  $V_i$ ), coincide sensiblemente con los valores obtenidos, conocida la  $V$ , aplicando la fórmula:

$$K_m = \frac{(V-v) \cdot (S)}{v}$$

La ecuación de velocidad de LINEWEAVER y BURK, puede escribirse del siguiente modo:

$$\frac{V}{v} = K_m \frac{1}{(S)} + 1$$

lo que permite representar en una sola gráfica los valores de las diversas series, llevando al eje de ordenadas los valores de  $V/v$  y al de abscisas los de  $1/(S)$  (fig. 4).

El examen de los valores de  $K_m$  que figuran en la tabla II, indica que hay una concordancia satisfactoria entre los valores hallados gráficamente y los calculados de acuerdo con la V. La  $K_m$  de la enzima parcialmente purificada, de la procedencia y en las condiciones experimentales detalladas, posee un valor de

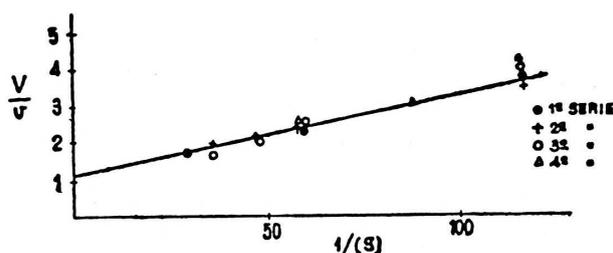


FIGURA 4. — Coincidencia de los valores cinéticos obtenidos en las distintas series realizadas con el purificado de L.(+).glutamato descarboxilasa.

$2,19 \times 10^{-2}$  M. La figura 3 pone de manifiesto de una manera gráfica que, dentro del campo de variación de (S) en que hemos trabajado, la  $K_m$  se mantiene dentro de unos límites estrechos, de acuerdo con los datos consignados en la última columna de la tabla II.

TABLA III

Valores de  $K_m$  de la L.(+).glutamato descarboxilasa de diversos orígenes

Origen	Valor $K_m$ (M por l.)	Autores
Zanahoria	$3,6 \pm 0,4 \times 10^{-3}$	SCHALES y SCHALES (21)
Cebada	$9,6 \times 10^{-3}$	BEEVERS (2)
Cerebro de rata	$6,4 \times 10^{-3}$	ROBERTS y FRANKEL (19)
<i>Rodotorula glutinis</i>	$2,75 \times 10^{-3}$	KRISHNAWAMY y GIRI (12)
<i>E. Coli</i> (libre de células)	$2,7 \times 10^{-3}$	GALE (6)
<i>E. Coli</i>	$2,69 \times 10^{-3}$	ROBERTS (20)
<i>E. Coli</i>	$4,5 \times 10^{-3}$	NAJJAR (18)
<i>E. Coli</i>	$8,2 \times 10^{-4}$	SHUKUYA y SCHWERT (24)
<i>Cl. welchii</i> (organismo intacto)	$5 \times 10^{-3}$	TAYLOR y GALE (26)
<i>Cl. welchii</i> (parcialmente purificado)	$2,5 \times 10^{-3}$	TAYLOR y GALE (26)

*Aplicación de la enzima purificada a la valoración de PLP.* La unión entre la apoenzima y la coenzima es muy débil en la glutamato descarboxilasa. También en la lisina descarboxilasa (23) se ha comprobado igual fragilidad de enlace. Sin embargo,

la arpártico descarboxilasa (4) y la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa (3) retienen fuertemente a la coenzima, incluso a través de largos procesos de purificación. Debido a la inconsistencia de la integridad holoenzimática, el purificado posee una actividad inferior al 25 % sin adición de PLP. La sucesiva activación de esta preparación, mayoritariamente apoenzimática, por cantidades crecientes de PLP, permite su aplicación a la valoración cuantitativa de la coenzima.

Los valores obtenidos en una determinación indican, como se expresa en la curva correspondiente (fig. 4), una relación proporcional, en las condiciones experimentales, entre la actividad descarboxilante y la cantidad presente de coenzima. La medida manométrica del CO<sub>2</sub> desprendido se realiza a 37°C, habiendo transcurrido una hora desde la adición de PLP hasta la lectura a tiempo cero (media hora a la temperatura ambiente y media hora de incubación previa en el baño termostático, con una agitación de 150 o.p.m. y 2,5 de amplitud). En el compartimento central del vaso se añaden 0,4 ml de preparación enzimática (que equivalen a 0,2 ml de enzima); 0,3 ml de PLP a las concentraciones de 100, 67, 30, 25, 20, 15, 10 y 5 µg por ml. y 2,8 ml de tampón fosfatos Na-K M/4 pH 5,7. En el bulbo lateral, 0,5 ml de glutamato sódico al 8 % (0,554 M). En el momento de volcar el substrato, la agitación se coloca en 3,5 de amplitud. Los porcentajes de actividad obtenidos en las distintas experiencias son sensiblemente concordantes. Trabajando en las condiciones señaladas, se obtiene una relación actividad-concentración de PLP perfectamente lineal en el intervalo que comprende 1-6 µM de PLP por litro.

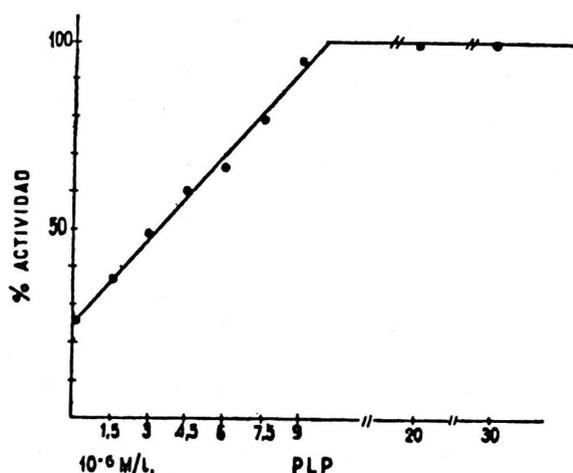


FIGURA 5. — Valoración del piridoxal.5.fosfato con la enzima purificada.  
100 % actividad = 130 µl CO<sub>2</sub> en 10 min.

### Discusión

$K_m$ . La tabla III recoge los valores obtenidos por diversos autores para la  $K_m$  de la l-glutamato descarboxilasa. Como vemos, los resultados no sólo varían notablemente con los materiales empleados como fuente enzimática, sino dentro de los mismos orígenes.

El valor de  $K_m$  que hemos hallado para el extracto crudo de *Lupinus albus* ( $5,5 \times 10^{-3}$  M) cae dentro de los límites que pueden considerarse normales en relación a otros materiales vegetales. El valor de  $K_m$  de la preparación enzimática parcialmente purificada ( $2,2 \times 10^{-2}$  M) es, aproximadamente, cuatro veces superior al del extracto, lo que, reiterados ambos en numerosas experiencias, nos indica claramente una pérdida de la afinidad enzimática durante el proceso de purificación. TAYLOR y GALE (26), al intentar purificar el enzima de *Clostridium welchii*, observaron un fenómeno paralelo, según se consigna en la tabla III. El hecho de que el extracto crudo y el purificado den distintos valores puede ser explicado por una inactivación parcial de grupos activos, producida por los tratamientos propios del proceso de purificación. SHUKUYA y SCHWERT (24) han atribuido la diferencia del valor hallado por ellos en *E. Coli* con el de otros autores, por haber utilizado estos últimos tampón acetato, poco favorable para la actividad enzimática. KING y BROWN (11) han encontrado, en el caso de la leucina descarboxilasa de *Proteus* distintos valores ( $4,5 \times 10^{-2}$ ;  $2,7 \times 10^{-2}$  y  $5,6 \times 10^{-2}$  M) según los pH de ensayo. A pesar de tratarse de un hallazgo totalmente normal, puesto que la  $K_m$  es función del pH, estos autores explican las variaciones observadas basándose en que los cambios de pH reducen la estabilidad de la base de Schiff que, según el mecanismo enzimático admitido, se forma entre substrato y coenzima, afectándose la afinidad enzima-substrato y disminuyendo, en consecuencia, la  $K_m$ . Nada parece contradecir la suposición de que, en nuestro caso, la fracción apoenzimática obtenida haya sufrido una pequeña modificación en el área activa, como tributo a la mayor actividad específica alcanzada en su purificación.

Las variaciones de la velocidad máxima pueden deberse a la presencia, en el extracto crudo, de sustancias activadoras o desinhibidoras, eliminadas en el purificado. A este respecto es interesante citar la fuerte activación que produce el glutatión sobre la actividad de la enzima purificada, según comunicamos en el siguiente trabajo de esta serie (17). La activación producida por el glutatión indica la existencia de grupos tiólicos, necesarios para la actividad enzimática, bloqueados al estado de puente disulfuro en el curso del método de preparación. El

bloqueo de los grupos SH que se produce particularmente en ausencia de coenzima, podría explicar, dada la inconsistencia de la unión apoenzima-coenzima, la sucesiva disminución de la actividad de los extractos.

*Aplicación del preparado purificado a la determinación enzimática de PLP.* El primer método analítico enzimático para la valoración de PLP fue propuesto por GALE y EPPS (7) utilizando apodescarboxilasa tirosínica de *Streptococcus faecalis*, método modificado posteriormente por UMBREIT y cols. (27), HURWITZ (9), SLOANE-STANLEY (25), CONDAL y COSÍN (5), GUNSALUS (8) y LABOUESSE y cols. (13). La apodescarboxilasa tirosínica obtenida cultivando *Str. faecalis* cepa R (ATCC 8043) en medio sintético desprovisto de vitamina B<sub>6</sub>, permite la valoración de cantidades mucho menores de PLP (0,025 µg). Sin embargo, la aseguibilidad del material de origen y la sencilla obtención de la preparación enzimática que nosotros hemos manejado, puede prestar utilidad a nuestro método cuando lo permita la proporción de piridoxal-5-fosfato en las muestras problema o exista la posibilidad de su concentración. Por otra parte, la preparación de apodescarboxilasa tirosínica posee una fosfocinasa, capaz de catalizar la fosforilación del piridoxal en presencia de ATP, que impide una valoración selectiva del derivado fosforilado en muestras (homogenados, etc.) que contengan los sustratos de la reacción de transferencia. Las cantidades absolutas de CO<sub>2</sub> liberado son notablemente mayores en nuestro caso, lo que permite una mejor comparación, en las curvas patrón, de las lecturas correspondientes al problema. A pesar de su menor sensibilidad puede ser, por tanto, método de elección en algunos casos.

### Resumen

Se estudia la influencia de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción de la L-glutamato descarboxilasa de *Lupinus albus*. Los datos experimentales obtenidos se ajustan a la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten, calculando, analítica y gráficamente, el valor de la Km, que ha resultado ser igual, para la enzima de esta procedencia y en las condiciones experimentales, a  $5,5 \times 10^{-3}$  M en el caso del extracto crudo y a  $2,2 \times 10^{-3}$  M en el de la enzima parcialmente purificada.

La preparación enzimática permite la valoración manométrica, en las condiciones que se indican, de cantidades de piridoxal-5-fosfato que oscilan de 0,3 a 1,5 µg por ml.

Se discuten los resultados obtenidos.

### Summary

**Studies on decarboxylating enzymes. XVIII. L-glutamate decarboxylase from *L. albus*.  $K_m$  and application to pyridoxal-5-phosphate determination.**

The Michaelis constant of L-glutamate decarboxylase of *Lupinus albus* has been determined. In the experimental conditions, we have found the values of  $K_m = 5,5 \times 10^{-3}$  M for the seed extract and  $K_m = 2,2 \times 10^{-2}$  M in the case of the enzyme partially purified. The study has been carried out employing the Warburg manometric technique.

The enzyme preparation can be used for the accurate enzymatic measurement of pyridoxal-5-phosphate in amounts ranging from 0.3 to 1.5  $\mu\text{g}$  per ml.

The reported results are discussed.

### Bibliografía

- (1) AXELROD, J. and colab. : *J. of Agricultural and food Chem.* **3**, 1039 1955.
- (2) BEEVERS, H. : *Biochem. J.*, **48**, 132 1951.
- (3) CANAL, N. y MAFFEI FACCIOLI, A. : *Com. V Jorn. Bioquim. Latinas*, 1-26 1959.
- (4) CATTANEO-LACOMBE, J. and colab. : *Biochem. Biophys. Acta*, **30**, 458 1958.
- (5) CONDAL, L. y COSIN, R. : *R. Esp. Fisiol.*, **9**, 189 1953.
- (6) GALE, E. F. : *Biochem. J.*, **35**, 66 1940.
- (7) GALE, E. F. and EPPS, S. : *Biochem. J.*, **38**, 250 1944.
- (8) GUNSAUS, I. C. and colab. : En *Methods in Enzymology*. COLOWICK y KAPLAN, Ed. Vol. III, pág. 963 1957.
- (9) HURWITZ, J. : *J. Biol. Chem.*, **205**, 935 1953.
- (10) JOHNSON, M. S. : En *Manometric Techniques and related methods*, de UMBREIT W. W. y colab. pág. 18 1948.
- (11) KING, H. K. and BROWN, S. J. C. : *Biochem. J.*, **74**/1,3P 1960.
- (12) KRISHNAWAMY and GIRI, K. V. : *Biochem. J.*, **62**, 30 1956.
- (13) LABOUESSE, J. and colab. : *Biochem. Biophys. Acta*, **39**, 372 1960
- (14) LINEWEAVER, H. and BURK, D. : *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658 1934.
- (15) LOWRY, S. and colab. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 1951.
- (16) MAYOR, F. : *An. Real Acad. Farm.*, **25**/3, 219 1959.
- (17) MAYOR, F. y colab. : *R. Esp. Fisiol.*, **18**, 89 1962.
- (18) NAJJAR, V. A. and Fisher. : *J. Biol. Chem.*, **206**, 215 1954.
- (19) ROBERTS, E. and FRANKEL, S. : *J. Biol. Chem.*, **188**, 789 1951 ; **190**, 505 1951.
- (20) ROBERTS, E. : *J. Biol. Chem.*, **198**, 495 1952.
- (21) SCHALES, O. and SCHALES, S. : *Arch. Biochem.*, **11**, 155 1956.
- (22) SCHALES, O. and SCHALES, S. : En *Methods in Enzymology*. COLOWICK y KAPLAN, Ed. Vol. II, págs. 190 1956.

- (23) SHER, L. H. and MALLETE, M. F. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **53** 354. 1954.
- (24) SHUKUYA, R. and SCHWERT, G. W. : *J. Biol. Chem.*, **235/6**, 1649, 1653, 1658. 1960.
- (25) SLOANE-STANLEY, G. H. : *Biochem. J.*, **44**, 567. 1949.
- (26) TAYLOR and GALE, E. F. : *Biochem. J.*, **39**, 55. 1945.
- (27) UMBREIT, W. W. and colab. : *Arch. Biochem.*, **7**, 185, 1945.