

## Tesis de Posgrado

# La fumarasa de la levadura de panadería "Saccharomyces cerevisiae" : Obtención, purificación y propiedades

Favelukes, Gabriel

1957

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Favelukes, Gabriel. (1957). La fumarasa de la levadura de panadería "Saccharomyces cerevisiae" : Obtención, purificación y propiedades. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0937\\_Favelukes.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0937_Favelukes.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Favelukes, Gabriel. "La fumarasa de la levadura de panadería "Saccharomyces cerevisiae" : Obtención, purificación y propiedades". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1957.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0937\\_Favelukes.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0937_Favelukes.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

RESUMEN

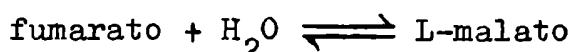
Se ha estudiado la obtención, purificación y propiedades de la fumarasa de levadura de panadería.

a) Se ha puesto a punto un método de dosaje de la actividad enzimática, independiente de toda consideración sobre la cinética de la reacción. En él se comparan los consumos de fumarato por la muestra de enzima en un tiempo standard (medidos con el método permanganométrico de Straub), con una curva patrón calibrada en unidades enzimáticas arbitrarias.

b) Se han obtenido extractos acelulares de fumarasa por autólisis en fosfato de polvo acetónico de levadura. El proceso de extracción se completa a pH 7 en 5 - 6 días, dando la enzima en forma totalmente soluble, con rendimiento y pureza comparables a los de las mejores preparaciones acelulares obtenidas por desintegración mecánica de la levadura.

c) Se han ensayado diversos métodos de purificación en los extractos acelulares: la clarificación inicial con gel de fosfato de calcio, seguida de un fraccionamiento con sulfato de amonio (0.40 - 0.60 sat.), un fraccionamiento con acetona a pH 7, y dos fraccionamientos con sulfato de amonio a pH 8 y 6, dió una preparación de una pureza 12.5 veces mayor que la inicial.

d) La enzima de levadura cataliza la reacción reversible



con una constante de equilibrio  $K_{ap} = \frac{(\text{L-malato})}{(\text{fumarato})} = 3.8$ , a pH 7 y 30°. Este valor está comprendido entre los hallados para otras fumarasas.

e) La actividad sobre el fumarato en ausencia de sales es óptima a pH 6.3; la presencia de fosfatos corre este máximo al alcalino. Los cationes alcalinos y alcalinotérreos no tienen influencia en la reacción de hidratación; los aniones arseniato, fosfato, sulfato y borato son activadores, y los cloruros, bromuros, y nitratos, son inhibidores (el fluoruro es indiferente). Los cloruros además intensifican la inactivación térmica de la enzima, que en su presencia es protegida por el fumarato. La cinética de la reacción de hidrata-

Res. de Tesis: 937

R937

ción en presencia de fosfato diluido demuestra un efecto activador del fumarato en concentraciones mayores de 4 mM, que no se observa en fosfato concentrado; éste también aumenta las constantes cinéticas de la reacción, y además resulta inhibitor cuando se pasa de 0.05 M a 0.1 M. Estos resultados son semejantes a los obtenidos con la fumarasa cristalizada de corazón de cerdo, y el mecanismo desarrollado para ésta da cuenta de aquellos hechos.

f) La fumarasa de levadura se diferencia de la enzima de cerdo en su inactivación rápida a pH inferiores a 6, y en su requerimiento de sulfhidrilos libres indispensables para su actividad catalítica: es inhibida por los reactivos para tioles o-iodosobenzoato, 3-aminilfenilarsenóxido y p-cloromercuribenzoato (el más eficaz), frente al último es reactivada por la cisteína. Los sustratos y el fosfato protegen la enzima frente a los tres reactivos: con el mercurial la protección de los primeros se extiende hasta  $10^{-4}$  M (del orden de la constante de Michaelis) en tanto que el efecto protector del fosfato es pobre. De acuerdo al modelo propuesto, el o los sulfhidrilos se hallarían en el área activa de la enzima que forma el complejo catalítico enzima-sustrato.

10784

Universidad Nacional de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

LA FUMARASA DE LA LEVADURA DE PANADERIA  
"SACCHAROMYCES CEREVISIAE"

Obtención, purificación y propiedades

Tesis para optar al título de Doctor en Química

por

GABRIEL FAVELUKES

TESIS: 937

Buenos Aires

1957

10784

# FORMA

Este trabajo fué llevado a cabo en la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Médicas de Buenos Aires, proyecto dirigido por el Prof. Dr. A. O. M. Stoppani. A él agradezco profundamente su constante guía, consejo y críticas, su apoyo y estímulo en circunstancias difíciles, y muy especialmente la oportunidad de realizar investigación bioquímica.

Desee hacer constar mi reconocimiento:

A la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias, que otorgó la beca "Laboratorios Millet" 1955.

A W. R. Squibb & Sons Argentina, por su apoyo financiero.

A la srta. Lilia Viñas y la Dra. Susana L. S. de Cavallero, por su invaluable ayuda en la preparación y corrección de manuscritos.

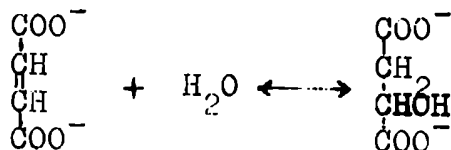
1974

a mis padres

a mi esposa

## INTRODUCCION

La hidratación reversible del fumarato a L-malato



es una importante reacción enzimática del mecanismo final de oxidación de metabolitos en gran número de organismos. Descubierta en 1917 por H. Winbeck<sup>(1)</sup> como corolario de una serie de investigaciones sobre la respiración y oxidaciones celulares, estudios posteriores establecieron su papel en la cadena de reacciones que por una parte oxidan a los productos de degradación de hidratos de carbono, grasas y proteínas, con la liberación y transferencia de energía requerida por las actividades vitales, y que por otra parte intervienen en numerosos procesos sintéticos: fijación de anhídrido carbónico, formación de carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. La importancia de la reacción catalizada por la fumarasa se ve corroborada por su extraordinaria difusión en los seres vivos (se la ha encontrado en bacterias, levaduras, hongos, plantas superiores y animales invertebrados y vertebrados) y también por la gran actividad catalítica que han demostrado ciertos organismos, comparada con otras reacciones relacionadas a ésta.

En este trabajo se ha estudiado la obtención, purificación y varias propiedades químicas y catalíticas de la fumarasa de la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae*. Previo a la exposición de estos estudios, haremos una relación de las investigaciones que han conducido al conocimiento actual de la enzima y su actividad, en diversos organismos.

### El descubrimiento de la fumarasa.

En sus estudios sobre respiración de tejidos animales, y sobre la oxidación de diversas sustancias por estos mismos tejidos, Thunberg por una parte, y Battelli y Stern por otra, observaron casi simultáneamente que algunos ácidos di- y tricarbónicos (succínico, fumárico, málico, cítrico y aconítico) te-

nían la propiedad de aumentar los intercambios respiratorios del músculo de rana<sup>(2)</sup>, y también que podían ser oxidados a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  por la papilla de tejidos en aerobiosis<sup>(3)</sup>; en particular se suponía que el ácido succínico era primeramente oxidado a málico. Corroborando la hipótesis que los ácidos dicarboxílicos son intermediarios en los procesos oxidativos vitales, Einbeck aisló e identificó los ácidos succínico y fumarico en extractos de músculo<sup>(4)</sup> y afirmó que el segundo es el producto inmediato de la oxidación del primero.

Estas investigaciones llevaron a Einbeck al descubrimiento en 1919 de la reacción de hidratación del fumarato, que encontró reversible, y cuyo producto afirmó que era el ácido málico ópticamente inactivo<sup>(1)</sup>. La naturaleza enzimática de la reacción fué establecida por Battelli y Stern<sup>(5)</sup> que denominaron "fumarasa" al fermento soluble correspondiente, y estudiaron sus principales propiedades y distribución en tejidos animales. Contemporáneamente, Dakin identificó el producto de la hidratación como ácido L-málico ópticamente activo, y observó que el ácido D-málico no es atacado por la enzima<sup>(6)</sup>.

Definidas así las características de la fumarasa y su reacción, siguieron numerosas investigaciones sobre su distribución en los seres vivos, sus propiedades y su papel en el metabolismo celular. En 1941, Laki y Laki, de la escuela de Szent-Györgyi, anunciaron la cristalización de la fumarasa de corazón de buey<sup>(7)</sup>. Su resultado fué rectificado por Scott<sup>(8)</sup> y por Racker<sup>(9)</sup> que encontraron que la enzima había sido adsorbida en la cristalización de otra proteína no identificada. Por último, en 1951, Massey obtuvo cristales puros de fumarasa de corazón de cerdo<sup>(10)</sup>, con los cuales tanto él como Alberty y sus colaboradores realizaron una nutrida serie de investigaciones sobre las propiedades catalíticas de la enzima, que llevaron a un conocimiento muy completo de su actividad.

#### Distribución de la fumarasa.

Los trabajos de Battelli y Stern<sup>(5)</sup> señalaron ya que la enzima se encontraba en cantidad considerable en tejidos animales de gran actividad metabólica: hígado, músculo, riñón, pulmón y cerebro. Los estudios posteriores han demostrado su presencia en los siguientes organismos:



Bacterias: *Escherichia coli* (11, 12), *Pseudomonas aeruginosa* (11) y *Pseudomonas fluorescens* (14), *Micrococcus lysodeikticus* (13), *Haemophilus pertussis* (15), *Pasteurella pestis* (16), *Mycobacterium tuberculosis* (17) y *Azotobacter vinelandii* (17 a).  
 Hongos: *Aspergillus niger* (18), *Mucor stolonifer* (19).  
 Levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* (20).  
 Protozoarios: *Trypanosoma cruzi* (21), *Paramecium caudatum* (22).  
 Plantas superiores: habas y arvejas, cereales, hortalizas y hojas de vegetales verdes (ver (23), (24)).  
 Invertebrados: langostino (23) y otros (25).  
 Vertebrados: anguila, bacalao, músculo de rana (23) y conejo: glóbulos rojos, hígado y músculo (25).

Los trabajos de histoquímica de los últimos años han revelado la distribución intracelular de la fumarasa (26); se la ha encontrado siempre asociada a las mitocondrias, partículas subcelulares con numerosas e intensas actividades metabólicas y que son asiento del sistema enzimático que lleva a cabo, entre otras, las reacciones del ciclo del ácido cítrico, el transporte de hidrógeno y de electrones de las oxidaciones correspondientes, las fosforilaciones asociadas y el sistema en el que está comprendida la fumarasa.

#### La fumarasa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Los primeros indicios de la existencia de la fumarasa en la levadura surgieron con el hallazgo por Müller (27) de la transformación del fumarato a L-lactato y CO<sub>2</sub>, y los estudios de Dakin (28) sobre el origen del L-malato que aparece en la fermentación de azúcares puros, y que también se forma cuantitativamente en presencia de fumarato. Como antecedentes se conocía la existencia de succinato en el contenido intracelular de la levadura (29) y la asimilación por ésta de L-malato, durante la fermentación alcohólica (30).

La fumarasa fué finalmente demostrada en *S. cerevisiae* por Jacobsohn (20), en 1931, quien encontró actividad hidratante del fumarato en células enteras de levaduras de alta y baja, y en preparados secos y extractos de Lebedev de levadura de baja, y comprobó la existencia de un equilibrio fumarato-L-malato en su presencia (20, 21), estudiando también la especificidad y los requerimientos para

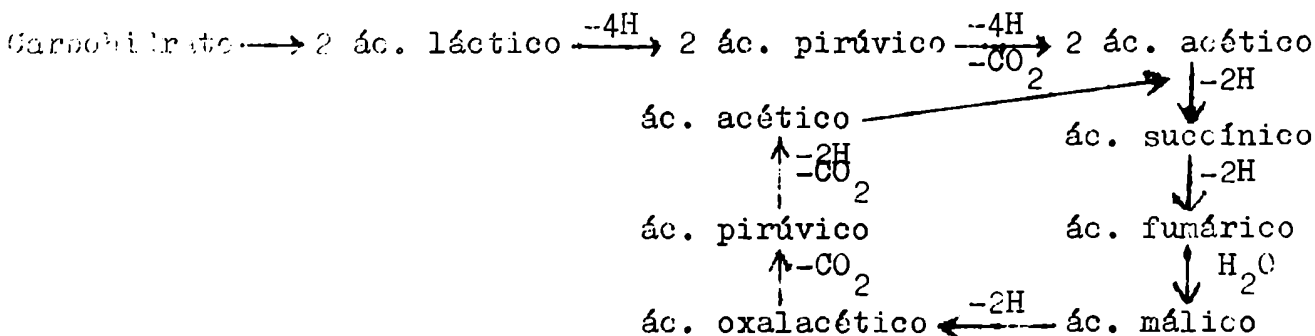
la actividad de la enzima (32).

Es interesante hacer notar que otros investigadores han negado la existencia de la enzima en la levadura de panadería (de alta): tanto Clutterbuck (25) como Kleinzeller (33), en experimentos con células enteras, no pudieron encontrar actividad frente al fumarato ni al malato, respectivamente. Este resultado negativo, entre otros, llevó en un momento dado a Krebs a descartar, para la levadura, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos como posible vía metabólica (34).

El papel de la fumarasa en el metabolismo celular: su vinculación a los mecanismos oxidativos.

Como hemos señalado, el descubrimiento de la reacción catalizada por la fumarasa tuvo lugar como consecuencia de una serie de investigaciones sobre los mecanismos de oxidación y respiración celular en tejidos animales, y se vió que esta reacción explicaba ciertas características de la acción de los ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos (C<sub>4</sub>) en dichas oxidaciones.

Los resultados de los trabajos de Thunberg, Battelli y Stern, y Einbeck, fueron integrados por el primero (35, 20, 34) en una "teoría general de la degradación oxidativa de los alimentos simples" en la que éstos serían quemados a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O mediante una serie de deshidrogenaciones combinadas con hidrólisis y decarboxilaciones, catalizadas por deshidrogenasas generalmente específicas; el H sería oxidado a H<sub>2</sub>O o sería tomado por otros sustratos hidrogenables; y el CO<sub>2</sub> resultaría de los mecanismos accesorios de hidratación y decarboxilación. El esquema de reacciones propuesto por Thunberg y por Knop (34) era el siguiente



Este esquema desarrollado en base a la teoría de Wieland sobre mecanismos oxidativos por deshidrogenación mediante la "activación del hidrógeno", explicaba la formación de succinato a partir de carbohidrato, piruvato y acetato, y justificaba la existencia en los tejidos de las reacciones a partir del succinato al oxalacetato; su debilidad residía en la reacción de condensación del acetato a succinato, que nunca pudo ser demostrada experimentalmente (y tampoco explicaba el papel del citrato como sustrato fácilmente oxidable a succinato).

Toeniessen y Brinkmann<sup>(34)</sup>, en base a experiencias de perfusión de músculo con piruvato y acetato, encontraron en 1930 que el úlbino no originaba succinato, en oposición al piruvato, del que se obtenía algo de succinato y formiato. Propusieron, como paso alternativo a la condensación de acético a succínico, la polimerización de pirúvico a 2,5-dicetoadípico, que por la pérdida de los dos carboxilos como formiato, daría succínico (y éste sí seguiría el esquema de Thunberg-Knoop hasta pirúvico, que volvería al ciclo). Este mecanismo, especialmente en lo que se refiere a la formación accesoria de ácido fórmico, nunca pudo ser verificado.

Papel de la fumarasa en el mecanismo del transporte de hidrógeno, según Szent-Györgyi.

Entre 1934 y 1937 Szent-Györgyi y sus discípulos estudiaron el papel de los ácidos  $C_4$  dicarboxílicos en las oxidaciones celulares y como resultado de sus investigaciones propusieron una teoría sobre el mecanismo de esos procesos<sup>(36)</sup> que se basa, entre otros, en los siguientes hechos experimentales de importancia sobresaliente:

a) el descubrimiento hecho por Gözsy y Szent-Györgyi en 1934 de la acción estabilizadora del fumarato en cantidades catalíticas, sobre la respiración de suspensiones de papilla de músculo en soluciones de fosfatos.

b) la reversibilidad de la oxidación del succinato a fumarato, en presencia de succinodeshidrogenasa.

c) la característica de la succinodeshidrogenasa de ser el único

sistema enzimático conocido entonces, capaz de acoplarse con gran efectividad al sistema de los citocromos y citocromooxidasa de Warburg-Keilin, para el transporte de hidrógeno.

d) la existencia en el músculo de la fumarasa, con una actividad catalítica muy elevada "comparable a la de la catalasa".

e) la alta capacidad de reducción del oxalacetato a L-malato por la málico deshidrogenasa del tejido muscular.

f) el efecto protector del fumarato frente a la inhibición de la respiración muscular por el malonato, protección que conducía, en acrobiosis, a la acumulación del succinato.

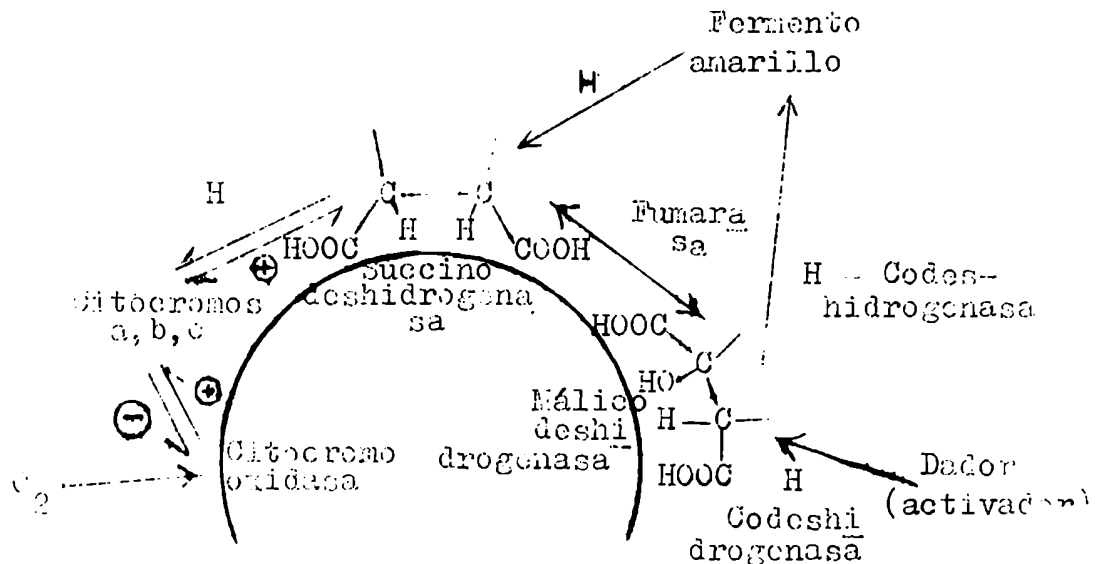
La teoría de Szent-Györgyi explicaba el mecanismo de transporte del hidrógeno proveniente de ciertas deshidrogenaciones importantes como la de los glúcidos, que en el músculo se transforman en ácido pirúvico, mediante reacciones que no pueden acoplarse directamente al sistema de Warburg-Keilin, y que pueden tener lugar con la reducción concomitante del oxalato a L-malato. En su forma final la teoría admitía que el H de un dador (metabolito) activado por la deshidrogenasa correspondiente, es transferido hasta combinarse con el  $O_2$  respiratorio, mediante una compleja cadena de sistemas enzimáticos redox. Esta cadena de reacciones estaría constituida por la cesión de los H del dador a la coenzima; la coenzima reducida transfiere sus dos H al sistema oxalacetato  $\xrightarrow{\text{málico deshidrogenasa } 2H}$  L-malato, y éste, por medio de la coenzima y el fermento amarillo de Warburg, cede dos H al sistema fumarato  $\xleftarrow{\text{succinodeshidrogenasa } -2H}$  succinato, que a su vez se oxida a través del sistema de citocromos-citocromooxidasa de Warburg-Keilin, para regenerar el fumarato inicial.

El resultado del proceso total es la deshidrogenación del dador inicial y la formación de una molécula de  $H_2O$ ; los mediadores de las reacciones intermedias son regenerados en su estado original en cada cesión de H. Los ácidos  $C_4$  dicarboxílicos actuarían en sus respectivos sistemas enzimáticos no como sustratos en el sentido tradicional, sino "activados" formando un complejo estable con la enzima en el que la respectiva estructura de 4 C es capaz de tomar 2 H saturando sus valencias, o de cederlos quedando sus valencias en un esta-

do más o menos libre; el papel de la fumarasa sería el de mantener una adecuada proporción entre las concentraciones de ambos sistemas redox, a través de la interconversión de fumarato y L-malato.

La teoría explica el efecto protector del fumarato frente al malonato (inhibidor específico de la succinodeshidrogenasa) suponiendo que la afinidad del fumarato por la enzima es mayor que la del succinato, y aún del malonato, por lo que desplaza a éste de la combinación inactiva con la enzima, y por captación de H de las reacciones precedentes se transforma en succinato; el succinato es desplazado por el malonato a su vez, y aparece en el medio como metabolito libre.

El esquema propuesto por Szent-Györgyi es el siguiente:



El mecanismo de Szent-Györgyi perdió gran parte de su interés cuando se descubrió la existencia de dos sistemas enzimáticos capaces de mediar en el transporte de H entre las coenzimas I (coenzima I, DPN) y coenzima II (TPN) y el sistema de los citocromos de Warburg-Keilin: estos dos sistemas son las citocromos c-reductasas de levadura e hígado específicas para DPN o para TPN, que hacen innecesaria la intervención de la succinodeshidrogenasa como eslabón entre las coenzimas y la cadena de los citocromos.

Queda sin embargo en pie la eventual intervención del sistema de la málico deshidrogenasa en las deshidrogenaciones desde el nivel de triosafofato hasta posiblemente  $\alpha$ -cetoglutarato, para dar succinato<sup>(34)</sup>.

Papel de la fumarasa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

En 1937 Krebs y Johnson<sup>(37)</sup> integraron en una nueva teoría los conocimientos acumulados sobre las oxidaciones celulares, tomando como fundamentos de la misma los siguientes hechos experimentales:

a) la rápida oxidación de citrato, isocitrato, cisaconitato y  $\alpha$ -cetoglutarato por el tejido muscular.

b) el efecto catalítico del citrato en la respiración tisular, comparable al del succinato.

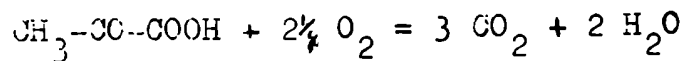
c) la síntesis del citrato por el tejido muscular a partir de oxalacetato.

d) la formación oxidativa de succinato a partir de fumarato u oxalacetato (de los cuales es precursor normal en aerobiosis) en el tejido inhibido por malonato. La reducción anaeróbica no tiene lugar en presencia de este inhibidor.

El punto d) sugería un mecanismo cíclico con procesos oxidativos intermedios, y en el que participarían los ácidos  $C_4$  dicarboxílicos. Fundado en esto, Krebs retomó la primitiva idea de Thunberg, ampliándola con la participación del citrato y sus derivados, y modificando totalmente el modo de entrada del resto de acético en el ciclo.

El esquema original de Krebs establecía la oxidación del resto  $C_3H_6O_3$  (último término de la degradación anaeróbica de la glucosa, en forma de triosafofato o lactato) a piruvato, y la introducción de un resto de dos carbonos en un ciclo de reacciones de degradación oxidativa del piruvato con el oxalacetato, para dar citrato; este compuesto es transformado por la "cítrico deshidrogenasa" (aconitasa + isocítrico deshidrogenasa) en  $\alpha$ -cetoglutarato; la descarboxilación oxidativa del último da succinato, y la posterior secuencia de reacciones es la familiar transformación de los ácidos  $C_4$  dicarboxílicos: succinato, fumarato, L-malato y oxalacetato. Este a su vez vuelve a condensarse oxidativamente con otra molécula de piruvato

recomienza el ciclo. El resultado neto del funcionamiento de este mecanismo es la oxidación completa de una molécula de piruvato



con la regeneración de todos los elementos intermediarios del ciclo.

Las posteriores investigaciones que se realizaron en músculo, hígado y bacterias, han esclarecido muchos aspectos de las reacciones de este mecanismo, y han establecido las interrelaciones del mismo con las otras actividades metabólicas celulares.

Se comprobó que en el hígado y bacterias el piruvato, combustible del ciclo, puede ser la materia prima para la formación de los intermediarios del mismo, mediante su carboxilación anaeróbica a oxalacetato (esto independiza al tejido de otras fuentes de suministro de ácidos C<sub>4</sub> dicarboxílicos necesarios para el ciclo)<sup>(39)</sup>. Se ha aclarado el mecanismo de incorporación del resto de dos carbonos en el citrato, que procede por la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-coenzima A (verdadero compuesto inicial del ciclo), y la condensación del último con el oxalacetato para dar citrato<sup>(41)</sup>; se ha descartado al cis-acnitato como intermediario entre el citrato y el D-isocitrato<sup>(42)</sup>; se ha dilucidado el mecanismo de las reacciones de descarboxilación oxidativa del isocitrato<sup>(42)</sup>,  $\alpha$ -cetoglutaratato (esta última con el intermediario succinil-CoA)<sup>(43)</sup> y del L-malato (enzima "málica" de Ochoa)<sup>(39, 44)</sup>.

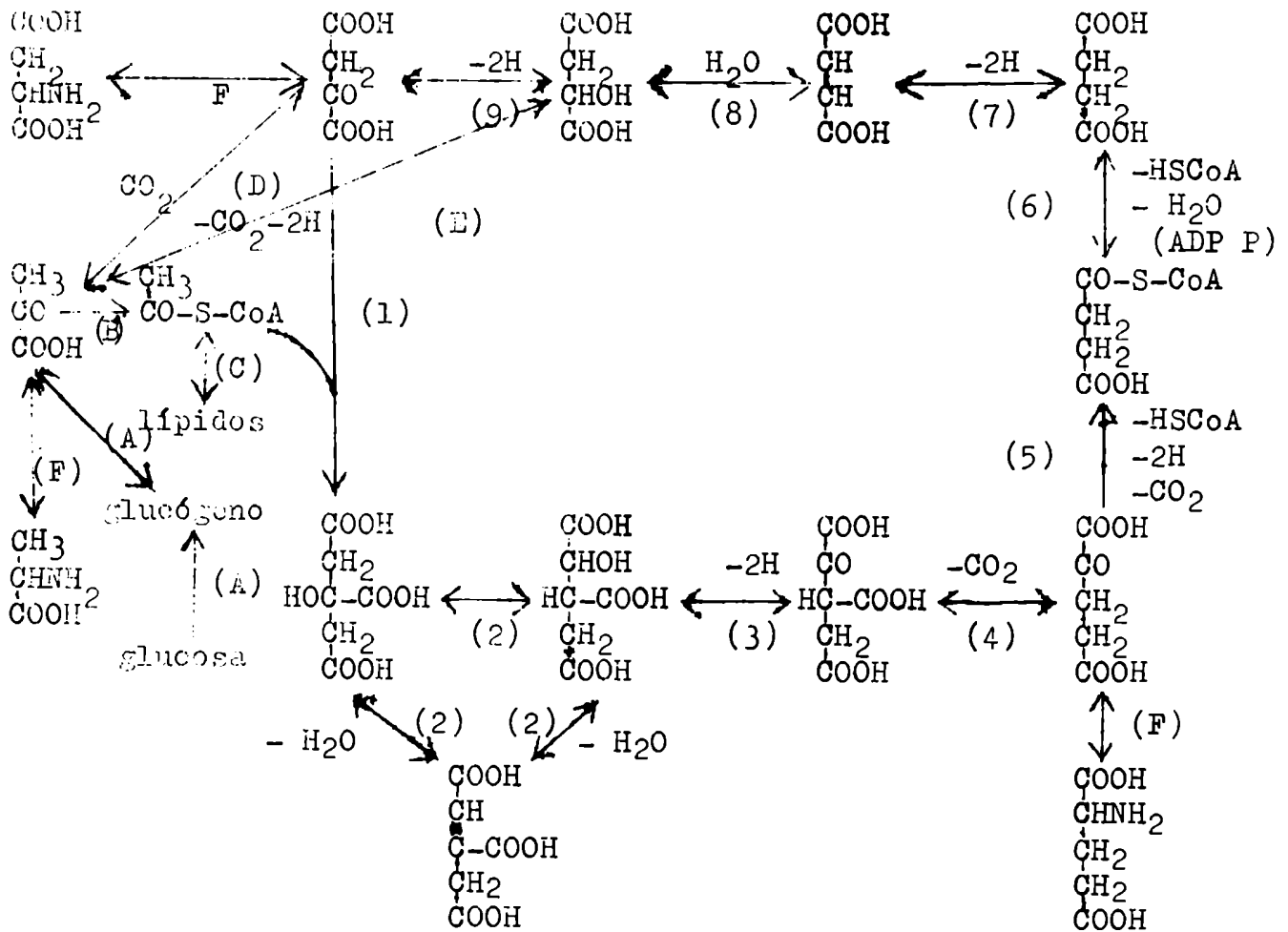
Asimismo se ha observado que a través del ciclo se puede oxidar los restos de 2 C provenientes no sólo de los hidratos de carbono (vía piruvato) sino también los que resultan de la degradación oxidativa de los ácidos grasos a acetil-CoA; también son oxidados por el ciclo los restos carbonados de los aminoácidos convertibles en oxalacetato, piruvato o  $\alpha$ -cetoglutaratato (por procesos de transaminación)<sup>(34)</sup> y a la inversa, del ciclo pueden obtenerse los esqueletos carbonados para la síntesis de esos aminoácidos.

Una función muy importante adyacente al ciclo es el aprovechamiento de la energía liberada en las oxidaciones del mismo<sup>(45)</sup>.

En el ciclo en sí se ha observado la formación de uniones fosfato ri-

cas en energía, en la reacción de fosforólisis de la succinil-coenzima A para dar succinato libre<sup>(43)</sup>; también se forman en la decarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-coenzima A<sup>(41)</sup>. Pero la mayor proporción de fosforilaciones está asociada a los mecanismos de transporte de H y de electrones de la succinoxidasa, y los que oxidan a las coenzimas I y II (DPNH y TPNH) reducidas durante el funcionamiento del ciclo<sup>(45)</sup>. Este mecanismo de transferencia de energía responsable del aprovechamiento vital de una gran parte de la energía libre de oxidación total del glucógeno y la glucosa.

El esquema actualizado del ciclo, con algunas reacciones intermedias importantes, es el siguiente:



Los sistemas enzimáticos que intervienen en estas reacciones son los siguientes:



- (1) Enzima condensante de Ochoa
  - (2) aconitasa
  - (3) Isocítrico deshidrogenasa (TPN)
  - (4) Isocítrico deshidrogenasa ( $Mn^{++}$ )
  - (5)  $\alpha$ -cetoglutarico deshidrogenasa (DPN)
  - (6) Enzima fosforilante de Kaufman
  - (7) Succinodeshidrogenasa
  - (8) Fumarasa
  - (9) Málico deshidrogenasa (DPN)
- 
- (A) Enzimas del metabolismo intermedio del glucógeno y de la glucosa
  - (B) Sistema de la pirúvico-oxidasa (CoA)
  - (C) Sistema enzimático de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (como acil-S-CoA)
  - (D) Sistema carboxilante del hígado
  - (E) Enzima "málica" de Ochoa (en el hígado de paloma)
  - (F) Transaminasas (estas reacciones deben ser acopladas de a pares).

El ciclo del ácido cítrico fué primitivamente elaborado para explicar los mecanismos de oxidación del piruvato en el músculo pectoral de paloma<sup>(34)</sup>. Los estudios posteriores han mostrado que este esquema puede ser aplicado a varios tejidos de los mamíferos (músculo, hígado), y que las enzimas que intervienen en el mismo tienen una difusión muy amplia en organismos uni- y pluricelulares. Es probable que el ciclo, o partes del mismo, actúen en otros casos con funciones no semejantes a las que desempeñan en el músculo de mamífero. En *Escherichia coli* se ha hecho un estudio muy completo<sup>(46)</sup> de los procesos metabólicos, empleando  $C^{14}$ ,  $N^{15}$ ,  $S^{35}$  y  $P^{32}$ . De esta investigación surge que las reacciones del ciclo son empleadas por la bacteria como herramienta de síntesis de los diversos compuestos requeridos para su crecimiento, pero es posible que la energía obtenida de la oxidación de la glucosa no derive del funcionamiento del ciclo.

El papel de la fumarasa en la levadura: los mecanismos de oxidación del acetato y piruvato.

La levadura de panadería está especialmente adaptada para el consumo de azúcares, principalmente glucosa, como fuentes de C y de energía requeridas para sus funciones vitales. El proceso mediante el cual obtiene esa energía puede conducir en anaerobiosis a la formación de etanol y CO<sub>2</sub>, o a la oxidación completa a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O en presencia de O<sub>2</sub>. Ambas vías metabólicas tienen una serie de intermediarios comunes, entre los cuales el último, el piruvato, ocupa una posición principalísima. La dilucidación del mecanismo de oxidación de la glucosa implica conocer el del piruvato, lo cual es facilitado por ser éste casi tan eficaz sustrato como la primera.

Los estudios sobre metabolismo del piruvato en la levadura lo han asociado frecuentemente al acetato, otro sustrato de aquélla, aunque no tan efectivo; este nexo posiblemente se debe a una analogía con los esquemas metabólicos en los tejidos animales, donde ambos tienen un mismo mecanismo oxidativo, y también a la posibilidad en la levadura de obtener el acetato por decarboxilación oxidativa del piruvato.

En lo que sigue se resumen las investigaciones sobre dichas vías metabólicas en *S. cerevisiae*, encaminadas en los últimos tiempos a decidir sobre la posible existencia y funciones del ciclo del ácido cítrico en este organismo.

Cuando Jacobsohn demostró en 1931 la presencia de fumarasa en las levaduras de alta y baja<sup>(20)</sup>, creyó que este hallazgo apoyaba la extensión de la teoría de Thunberg-Knoop a las mismas. Aunque varias investigaciones posteriores rechazaron esa interpretación, la fumarasa quedó incorporada a los esquemas del metabolismo oxidativo de la levadura propuestos hasta ahora.

El esclarecimiento de la vía metabólica del acetato en la levadura tropezó con una dificultad no siempre reconocida: la falta de permeabilidad de su membrana para los aniones di- o policargados, que puede obviarse trabajando en medio ácido (que reprime la ionización de los ácidos orgánicos)<sup>(47)</sup> o destruyendo la capacidad selecti

va de la membrana con un tratamiento de congelación con aire líquido o  $\text{CO}_2$  sólido, y fusión posterior (48, 49). Este hecho fué causa de que algunos investigadores no encontrasen ciertas actividades enzimáticas como la de fumarasa (Glutterbuck<sup>(25)</sup>, Kleinzeller<sup>(33)</sup>), aconitasa (Krebs<sup>(34)</sup>) y ciertas deshidrogenasas que pudieron ser demostradas mediante uno de los procedimientos de permeabilización antes descritos (47, 48, 49).

Los experimentos de Wieland y colaboradores<sup>(50)</sup> sobre formación de citrato y succinato durante la oxidación de acetato (que, marcado con deuterio, aparecía como precursor de los mismos) fueron interpretados por éstos en base al esquema de Thunberg-Knoop, y postulando una reacción lateral de condensación del acético con oxalacético para dar cítrico.

Lynen y col.<sup>(47, 48)</sup>, mediante el uso de células congeladas o en medio ácido, demostraron la capacidad de las mismas de deshidrogenar los cuatro intermediarios del ciclo del ácido cítrico: citrato, acetoglutarato, succinato y malato, y también la inhibición por malonato de la respiración en medio de acetato, y su recuperación por fumarato, con formación cuantitativa de succinato. Estos hechos, análogos a los encontrados en el músculo, fueron explicados por Lynen suponiendo la existencia de un ciclo del ácido cítrico semejante al del músculo de paloma. También descartó el funcionamiento del mecanismo de Szent-Györgyi sobre transporte del H de las deshidrogenaciones, puesto que el malónico no inhibe la oxidación del alcohol a ácido acético.

La experiencia fundamental de incubación de acetato y fumarato en presencia de malonato, fué repetida por Lynen<sup>(53)</sup>, con acetato deuterado: el succinato formado estaba marcado en un 33%, demostrando que el acetato era un precursor, y descartando la reducción del fumarato por la fumarico hidrogenasa de Fischer y Eysenbach<sup>(54)</sup>.

La hipótesis de Lynen sobre la vía metabólica oxidativa del acetato a través del ciclo del ácido cítrico, fué apoyada por Weinhouse y Millington<sup>(55)</sup>, que estudiaron por incubación con acetato

marcado con  $C^{13}$ , la distribución del isótopo en el cítrico, succínico y  $CO_2$  producidos; sin embargo admitían que, en parte, el succínico se formaba a través de un mecanismo que no comprendía al cítrico.

Barrón y colaboradores<sup>(56)</sup>, en experimentos con piruvato y levadura de panadería, concluyen que la vía de oxidación correspondiente tiene por intermediarios al acetato y succinato; observan la acumulación de este último por inhibición con malónico en medio ácido y la capacidad de la levadura de oxidar succínico y cítrico a otros ácidos. En base a estas observaciones proponen que también el piruvato es oxidado a través del ciclo del ácido cítrico.

Hasta ahora hemos hecho mención de trabajos que justifican la existencia en la levadura del ciclo del ácido cítrico como mecanismo principal de degradación aeróbica del piruvato y el acetato.

También se ha querido encontrar evidencias favorables al ciclo en los siguientes argumentos:

Se ha podido determinar en extractos acelulares, o en células tratadas para aumentar su permeabilidad, la presencia de las siguientes enzimas vinculadas al ciclo del ácido cítrico:

aceto-coenzima A quinasa<sup>(57, 57a)</sup>

aconitasa<sup>(7, 48, 49, 55, 58, 62, 63)</sup>

isocítrico deshidrogenasas (TPN y DPN)<sup>(48, 58, 59, 60, 62, 63)</sup>

$\alpha$ -cetoglutarico deshidrogenasa<sup>(48, 58, 58a)</sup>

succinodeshidrogenasa<sup>(48, 61, 62)</sup>

fumarasa<sup>(20, 49, 62, 63)</sup>

malónico deshidrogenasa<sup>(48, 62)</sup>

Puede verse que el sistema enzimático requerido para el ciclo está aparentemente completo, por lo que existe la posibilidad de su funcionamiento. Más aún, dicho sistema está organizado en partículas subcelulares<sup>(64, 65)</sup> que se comportan como mitocondrias<sup>(65, 66)</sup>: se tiñen intravitalmente con Jano B, son capaces de oxidar aeróbicamente los ácidos tri y dicarboxílicos del ciclo (el fumarato y el malato con menor velocidad que los otros), y en aerobiosis oxidan el piruvato a  $CO_2$  y  $H_2O$ , sólo en presencia de cantidades catalíticas de

los ácidos del ciclo, siendo el malato el más activo; el malonato inhibe la oxidación del piruvato activada por succinato como ácido C<sub>4</sub>, pero el agregado de malato reactiva el sistema, y la cantidad de piruvato oxidada depende de la de malato presente<sup>(65)</sup>.

Se puede observar que todas estas características son muy semejantes a las que se dan en tejidos animales en los que se admite el funcionamiento del ciclo: se podría inferir de ello que el ciclo opera en la oxidación del piruvato y del acetato por la levadura.

Hay sin embargo opiniones en contrario: el hecho de la existencia de una serie de enzimas no prueba que éstas actúen en un cierto sentido exclusivamente<sup>(49)</sup>, ni tampoco lo demuestra el que estas enzimas estén organizadas en estructuras intracelulares diferenciadas<sup>(65)</sup>. Con respecto a la vía oxidativa del acetato, Linnane y Still en sus ya aludidos estudios con mitocondrias de levadura<sup>(65)</sup>, encontraron que el único activador que posibilita la oxidación del acetato por aquéllas, es el  $\alpha$ -cetoglutarato (a diferencia del piruvato, frente al que son activos todos los intermediarios del ciclo). Una posible explicación de este comportamiento singular sería el requerimiento de la formación de acetyl-S-CoA para entrar al ciclo, formación que en la levadura se realizaría acoplada a la liberación de succinato de la succinil-S-CoA, producto de la decarboxilación oxidativa del  $\alpha$ -cetoglutarato (recuérdese sin embargo que en presencia de acetato, oxalacetato, CoA, ATP y Mg<sup>++</sup> los extractos de levadura desintegrada sintetizan citrato<sup>(57)</sup>). Pero quizás la razón es más compleja: Krebs y col.<sup>(49)</sup> han realizado experimentos con levadura tratada con nieve carbónica, que destruye la selectividad de la membrana en forma semejante al tratamiento con aire líquido<sup>(48)</sup>. En esos estudios han podido establecer que el sistema que oxida al acetato tiene propiedades que difieren del correspondiente para succinato: la inhibición por malonato de la oxidación por células en medio ácido<sup>(47, 56)</sup> requiere para el acetato concentraciones de inhibidor mucho mayores que para succinato, no es reversible por lavado de las células y no es obser-

vable con células congeladas, en concentraciones de malonato que inhiben totalmente la succinodeshidrogenasa; además, el efecto protector del fumarato para la oxidación del piruvato en presencia de malonato, que con células en medio ácido resulta en la acumulación de succinato (Lynen<sup>(53)</sup>) depende de la concentración de células usada: cuando la suspensión es diluida no se observa el efecto protector. En otros experimentos en los que la levadura congelada se incubaba en aerobiosis con acetato radioactivo, se aislaba una serie de hipotéticos intermediarios en su oxidación: succinato, fumarato, L-malato,  $\alpha$ -cetoglutarato, formiato y acetilacetato: ninguno era radioactivo; y por último en un experimento comparativo entre levadura fresca a pH 5.0 y levadura congelada, la incubación de acetato radioactivo y succinato no isotópico producía en el primer caso una apreciable radioactividad en el succinato, mientras que en el segundo no se observaba succinato marcado.

Krebs concluye que el mecanismo de oxidación del acetato no incluye ninguno de los metabolitos estudiados, y que por lo tanto el ciclo no opera en la levadura como vía oxidativa del acético. Pero cada la presencia de sus componentes, sugiere que el mismo, o partes de él, actúan en la formación de los intermediarios para los procesos sintéticos que requiere el crecimiento de la levadura.

El papel sintético del ciclo ha sido confirmado en microorganismos como *Escherichia coli* y *Torulopsis utilis*, por los estudios de Roberts y col<sup>(46)</sup> (a los cuales ya nos habíamos referido); pero esto no excluye que para el primero se postule, en base a estudios sobre mutantes con deficiencias metabólicas<sup>(46a)</sup>, que la oxidación del acetato se realiza a través del ciclo.

Wang, Cheldelin y col.<sup>(53a)</sup> han estudiado en la levadura de panadería la síntesis de aminoácidos totales a partir de glucosa, piruvato, acetato y  $\text{CO}_2$ , utilizando  $\text{C}^{14}$ . Sus resultados son interpretados suponiendo el funcionamiento del ciclo como vía de entrada de restos de 2 C, y además admitiendo un mecanismo de fijación de  $\text{CO}_2$  sobre el piruvato del tipo de las reacciones de carboxilación de Wood

y Werkman, o de Ochoa, a oxalacético o málico. Pero para explicar el origen del aspartato obtenido por crecimiento en acetato, postulan un tercer mecanismo de condensación de dos acetatos, del tipo de Thunberg.

Como puede verse, hay una serie de interpretaciones contradictorias de muchos experimentos complejos, en los que la modificación de alguna de sus condiciones hace obtener resultados completamente diferentes. El problema de decidir sobre el papel del ciclo del ácido cítrico en la levadura, y sobre otros mecanismos en el metabolismo del acetato, aguarda todavía una decisión terminante; posiblemente ésta se pueda obtener por el análisis cinético de la incorporación de los restos atómicos de un cierto sustrato (por ejemplo el piruvato o acetato) en los diferentes metabolitos intermedios de la célula, con lo que se podrá trazar un mapa del flujo de esos restos atómicos, y estará contestada la pregunta sobre la vía metabólica de ese sustrato en las condiciones elegidas.

#### Posibles relaciones metabólicas inmediatas de los sustratos de la fumarasa en la levadura.

Independientemente de estos esquemas sobre mecanismos oxidativos en los cuales podría estar involucrada la reacción de la fumarasa, se ha observado en la levadura una serie de actividades enzimáticas que tienen por sustrato ya sea al fumarato o al L-malato. Las enzimas para el fumarato conocidas en la levadura son:

a) succinodeshidrogenasa: es una flavoproteína que contiene Fe, que cataliza la oxidación reversible del succinato a fumarato, acoplada al sistema de los citocromos-citocromooxidasa<sup>(48, 61)</sup>.

b) fumarico hidrogenasa: es una flavoproteína diferente de la anterior, que es activada por iones  $Fe^{++}$ , y cataliza la reducción del fumarato a succinato (prácticamente irreversible por el alto potencial de reducción del leucocolorante que se acopla)<sup>(54)</sup>.

c) argininosuccinasa: cataliza la adición reversible del grupo amino terminal de la arginina sobre la doble ligadura del fumarato, dando argininosuccinato. Es el paso final del mecanismo de síntesis de la arginina, por condensación de citrulina y aspartato a arginino-

succinato y la posterior liberación de arginina y fumarato (a su vez el esqueleto carbonado de la citrulina proviene del glutamato)<sup>(67)</sup>.

d) adenilosuccinasa: cataliza la adición reversible del amidógeno en el núcleo de la adenosina-5'-fosfato (AMP) sobre la doble ligadura del fumarato, dando adenilosuccinato<sup>(68)</sup>. Se cree que es el paso final en la síntesis de AMP en la levadura; en *Escherichia coli* se ha demostrado que el adenilosuccinato se forma a partir de la inosina-5'-fosfato (IMP) y aspartato, asociado a la hidrólisis de una unión pirofosfato de la guanosina trifosfato (GTP)<sup>(69)</sup>.

e) aspartasa: esta enzima interviene en la adición reversible del  $\text{NH}_3$  sobre la doble ligadura del fumarato, para dar aspartato. En las suspensiones de levadura de panadería secada no pudo demostrarse su presencia<sup>(70)</sup> pero dado que esa actividad fué encontrada en levadura de cerveza<sup>(71, 72)</sup> Hachn y Leopold<sup>(72)</sup> sugieren que las condiciones de trabajo elegidas para la primera investigación no eran óptimas (lo cual explicaría el resultado negativo), y dejan abierta la posibilidad de la existencia de la aspartasa en la levadura de panadería.

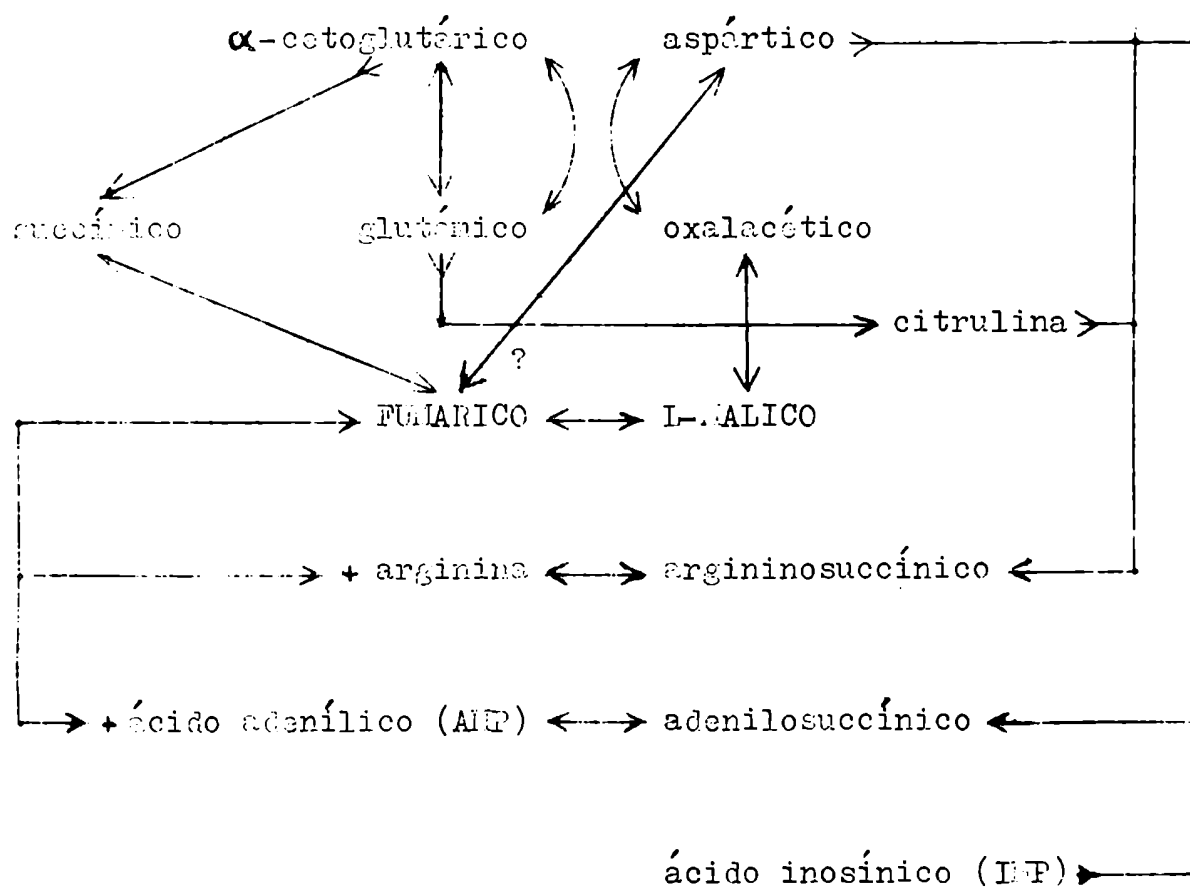
La única enzima demostrada en levadura cuyo sustrato es el L-malato, es la málicodeshidrogenasa<sup>(48)</sup>: cataliza la oxidación reversible del mismo a oxalacetato, teniendo por aceptor de hidrógeno acoplado al difosfopiridinonucleótido (DPN). El oxalacetato es la fuente principal de aspartato en la levadura, por transaminación acoplada al glutamato; además se condensa con la acetilcoenzima A para dar citrato, y puede decarboxilarse reversiblemente dando finalmente piruvato.

Todas estas posibles vías metabólicas no han sido todavía evaluadas en su importancia relativa, ni en el flujo de compuestos a través de las mismas. Un esquema que muestra sus eventuales relaciones, centradas en la fumarasa, se acompaña a continuación.

En él se puede apreciar el papel que tocaría desempeñar a los ácidos  $\text{C}_5$  y  $\text{C}_4$  dicarboxílicos y aminados: el  $\alpha$ -cetoglutarato sería el compuesto que fijaría nitrógeno amínico<sup>(59)</sup> y el glutamato el precursor de una serie de aminoácidos tanto los de  $\text{C}_5$  como los de  $\text{C}_4$  o  $\text{C}_3$  (estos últimos por transaminación del oxalacetato o del piruva-



Relaciones metabólicas inmediatas de los sustratos  
de la fumarasa en la levadura



to). Un mecanismo adicional de fijación de amoníaco, la reacción de la aspartasa, no se ha confirmado en la levadura de cerveza (v. s.) y además de ello la escasa actividad encontrada en la levadura de baja<sup>(72)</sup> y en *Propionibacterium* y *Pseudomonas*<sup>(70)</sup> hace pensar que, de existir, este paso no debe ser metabólicamente importante.

El aspártico, a más de dar origen, con su esqueleto carbonado, a varios aminoácidos<sup>(46)</sup>, actuaría como transportador de grupos  $\text{NH}_2$ , interviniendo no solamente en reacciones de transaminación, sino también en la formación de diaminas intermediarias complejas como los mencionados argininosuccinato y adenilosuccinato<sup>(67, 68)</sup>, y estos compuestos, por una reacción semejante a la de la aspartasa, se escinden en la otra rama de la diamina, liberando arginina o ácido adenílico (ambos con un grupo  $-\text{NH}_2$  ganado en el proceso) y fumarato. El proceso neto ha sido la transferencia de un grupo  $-\text{NH}_2$  del aspartato de la citulina o el ácido inosínico; el fumarato, por la intervención de la fumarasa, málico deshidrogenasa y transaminasa acoplada al glutamato, regenera el aspartato, y se cumple de esa manera un ciclo amiativo completo.

Hemos señalado estos dos ciclos para destacar que la fumarasa está incluida no sólo en la malla de reacciones que obtienen energía de combustión y producen esqueletos carbonados para la actividad sintética de la levadura, sino que también participa de la incorporación y transferencia de grupos amidógenos en compuestos fundamentales como los transportadores de esa energía (la familia del ácido adenílico) los aminoácidos básicos indispensables para la formación de nucleoproteínas reguladoras de la reproducción celular.

Capítulo I - Referencias bibliográficas

- (1) Einbeck, H., Biochem. Zs., 95, 296 (1919).
- (2) Thunberg, T., Skand. Arch. Physiol., 22, 430 (1909); 24, 23, 72 (1910); Chem. Abs.
- (3) Battelli, F. y Stern, L., Compt. rend. Soc. Biol., 69, 301, 552 (1910).
- (4) Einbeck, H., Z. physiol. Chem., 87, 145 (1913); 90, 301 (1914).
- (5) Battelli, F. y Stern, L., Compt. rend. Soc. Biol., 84, 305 (1921).
- (6) Dakin, H. D., J. Biol. Chem., 52, 183 (1922).
- (7) Laki, E. y Laki, K., Enzymologia, 9, 139 (1941).
- (8) Scott, E. M., Arch. Biochem., 18, 131 (1948).
- (9) Racker, E., Biochim. Biophys. Acta, 4, 211 (1950).
- (10) Massey, V., Nature, 167, 769 (1951); Biochem. J., 51, 490 (1952).
- (11) Quastel, J. H. y Whetham, M. D., Biochem. J., 18, 519 (1924).
- (12) Woolf, B., Biochem. J., 23, 472 (1929).
- (13) Penrose, H. y Quastel, J. H., Proc. Roy. Soc. Lond. B 107, 168 (1930); citado por Quastel, J. H., Biochem. J., 25, 898 (1931).
- (14) Kogut, M. y Podoski, E. P., Biochem. J., 55, 800 (1953).
- (15) Abe, S., Japan J. Bacteriol., 7, 85 (1952); Chem. Abs.
- (16) Englesberg, E., Bentoff Levy, J. y Gibor, A., J. Bacteriol. 68, 178 (1954); Chem. Abs.
- (17) Yamamura, Y. y Akabori, Sh., Congr. Intern. Biochim.- Résumés communs. 2<sup>e</sup> Congr. Paris 1952, 45; Chem. Abs.
- (17a) Alexander, M. y Wilson, P. W., Appl. Microbiol., 2, 135 (1954); Chem. Abs.
- (18) Challenger, F. y Klein, L., J. Chem. Soc., 1929, 1644.
- (19) Butkewitsch, Wl. y Fédoroff, M. W., Biochem. Zs., 207, 302 (1929).
- (20) Jacobsohn, K. P., Biochem. Zs., 234, 401 (1931).
- (21) Baernstein, H. D., Exptl. Parasitol., 2, 380 (1953); Chem. Abs.
- (22) Endahl, G. L. y Krueger, K., Science, 120, 578 (1954).
- (23) Jacobsohn, K. P. y Da Cruz, A., Compt. rend. Soc. Biol., 109, 506 (1932).

- (24) Mikhlín, D. M. y Bronovitskaya, Z. S., Doklady Akad. Nauk. SSSR, 89, 893 (1953); Chem. Abs.
- (25) Clutterbuck, P. W., Biochem. J., 22, 1193 (1928).
- (26) Schneider, W. C., J. Histochem. and Cytochem., 1, 212 (1953); Ann. Rev. Biochem., 25, 201 (1956).  
Kuff, E. L., J. Biol. Chem., 207, 361 (1954).  
Shepherd, J. A. y Kalnitsky, G., J. Biol. Chem., 207, 605 (1954).  
Shepherd, J. A., Li, Y. W., Mason, E. E. y Ziffren, S. E., J. Biol. Chem., 213, 405 (1955).  
de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R. Wattiaux, R. y Appelmans, F., Biochem. J., 60, 604 (1955).
- (27) Müller, H., Helv. Chim. Acta, 5, 163 (1922), citado en (20).
- (28) Dakin, H. D., J. Biol. Chem., 61, 139 (1924).
- (29) Kunz, R., Z. Nahr.-Genussm., 12, 641; Chem. Abs. (1907).
- (30) Mestrezat, W., 7<sup>th</sup> Int. Congr. Appl. Chem. Lond. (1909); J. Soc. Chem. Ind., 28, 734; Chem. Abs.
- (31) Jacobsohn, K. P., Bello-Pereira, F. y Tapadinhas, J., Biochem. Zs. 254, 112 (1932).
- (32) Jacobsohn, K. P., Biochem. Zs., 243, 1 (1931).
- (33) Kleinzeller, A., Biochem. J., 35, 495 (1941).
- (34) Krebs, H. A., Adv. Enzymology, vol. III, 191 (1943).
- (35) Thunberg, T., Skand. Arch. Physiol., 40, 1 (1920); Chem. Abs.; Ber. ges. Physiol.
- (36) Szent-Györgyi, A., "Studies on biological oxidation and some of its catalysts", Leipzig, 1937, pág. 17.
- (37) Krebs, H. A., y Johnson, W. A., Enzymologia, 4, 148 (1937); citado en (34).
- (38) Sumner, J. B. y Myrbäck, K., "The Enzymes", Academic Press, 1952
- (39) Ochoa, S., "Enzymatic Mechanisms of Carbon Dioxide Fixation", en Sumner-Myrbäck (38), vol. II, pág. 929.
- (40) Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., "Methods in Enzymology", Academic Press, 1955.
- (41) Ochoa, S., en -Colowick-Kaplan (40), vol. I, pág. 685.

- (42) Bartus, C. y Lynen, F., Adv. Enzymology, vol. X, 167 (1950).
- (43) Kaufman, S., en -Colowick- Kaplan (40), vol. I, pág. 714.
- (44) Ochoa, S., en -Colowick- Kaplan (40), vol. I, pág. 739.
- (45) Baldwin, E., "Dynamic Aspects of Biochemistry", Cambridge, 1949, pág. 381.
- (46) Roberts, R. B., Abelson, P. H., Cowie, D. B., Bolton, E. T. y Britten, R. J., "Studies of Biosynthesis in Escherichia Coli", Washington, 1955.
- (46a) Gilvarg, Ch. y Davis, B. D., J. Biol. Chem., 222, 307 (1956).
- (47) Lynen, F., Liebigs Ann., 554, 40 (1943).
- (48) Lynen, F. y Neciullah, N., Liebigs Ann., 541, 203 (1939).
- (49) Krebs, H. A., Gurin, S. y Eggleston, L. V., Biochem. J., 51, 614 (1952).
- (50) Wieland, H. y Sonderhoff, R., Liebigs Ann., 499, 213 (1932).  
Sonderhoff, R. y Deffner, M., Liebigs Ann., 536, 36 (1938).  
Sonderhoff, R. y Thomas, H., Liebigs Ann., 530, 195 (1937). Citados en (48) y (52).
- (51) Bamann, E. y Myrbäck, K., "Die Methoden der Fermentforschung", Leipzig, 1941.
- (52) Bernhauer, K. y Knobloch, H., en -Bamann- Myrbäck (51), pág. 2464.
- (53) Lynen, F., Liebigs Ann., 558, 47 (1947), citado en (42).
- (53a) Wang, Ch. H., Thomas, R. C., Cheldelin, V. H. y Christensen, B. E., J. Biol. Chem., 197, 663 (1952).  
Wang, Ch. H., Christensen, B. E., y Cheldelin, V. H., J. Biol. Chem., 201, 683 (1953).  
Wang, Ch. H., Christensen, B. E. y Cheldelin, V. H., J. Biol. Chem., 213, 365 (1955).
- (54) Fischer, F. G., Erg. Enzymforschung, 8, 185 (1939).
- (55) Weinhouse, S. y Millington, R. H., J. Am. Chem. Soc., 69, 3089 (1947).
- (56) Barrón, E. S. G., Ardao, M. I. y Hearon, M., J. Gen. Physiol., 34, 211 (1950).
- (57) Novelli, G. D. y Lipmann, F., J. Biol. Chem., 182, 213 (1950).

- (57a) Jonos, M. E. y Lipmann, F., en -Colowick- Kaplan (40), vol. I, pág. 585; Berg, P., J. Biol. Chem., 222, 991 (1956).
- (58) Foulkes, E. C., Biochem. J., 48, 378 (1951).
- (58a) Neuberg, C. y Ringer, M., Biochem. Zs., 71, 226, 237 (1915).
- (59) v. Euler, H., Adler, E., Günther, G. y Elliot, L., Enzymologia, 6, 337 (1939).
- (60) Kornberg, A., en -Colowick- Kaplan (40), vol. I, págs. 705 y 707.
- (61) Singer, T. P., Thimot, N. Z., Massey, V. y Kearney, E. B., Arch. Biochem. Biophys., 62, 497 (1956).
- (62) Slonimski, P. P. y Hirsch, H. M., Compt. Rend., 235, <sup>741</sup>/914 (1952); Chem. Abs.
- (63) Hirsch, H. M., Biochim. Biophys. Acta, 9, 674 (1952).
- (64) Nossal, P. M., Biochem. J., 57, 62 (1954).
- (65) Linnanc, A. W. y Still, J. L., Arch. Biochem. Biophys., 59, 383 (1955).
- (66) Bautz, E. y Marquardt, H., Naturwissenschaften, 40, 531 (1953); Chem. Abs.
- (67) Newmeyer, D., en Ratner, S., Adv. Enzymology, vol. XV, pág. 319 (1954).
- (68) Carter, C. E. y Cohen, L. H., J. Am. Chem. Soc., 77, 499 (1955).  
Carter, C. E., Ann. Rev. Biochemistry, 25, 123 (1956).
- (69) Lieberman, I., J. Biol. Chem., 223, 327 (1956).
- (70) Virtanen, A. I. y Tarnanen, J., Biochem. Zs., 250, 192 (1932).
- (71) Sumiki, Y., Bull. Japan Soc. Ferment., 23, 33 (1928).
- (72) Haehn, H. y Leopold, H., Biochem. Zs., 292, 380 (1937).

## CAPITULO II

### MÉTODOS EXPERIMENTALES GENERALES

#### A - DOSAJE DE LA ACTIVIDAD DE FUMARASA

En condiciones definidas, existe una relación precisa entre la cantidad de una enzima presente en una solución y las cantidades de sustrato transformadas por acción de la misma. La medida de dicha cantidad de enzima (o dosaje de la actividad enzimática) en unidades arbitrarias, se realiza midiendo esas transformaciones a lo largo de la reacción, y aplicando a esa determinación la relación empírica o teórica hallada entre la concentración enzimática (actividad) y sus efectos.

En el caso de la fumarasa se puede observar la desaparición o formación de ambos sustratos, fumarato o L-malato, midiendo por métodos adecuados la concentración de los mismos a tiempos diversos; con estos resultados se puede calcular la concentración del catalizador, sea aplicándoles un tratamiento cinético que presupone un dado mecanismo de reacción, o bien comparándolos con los obtenidos con alícuotas de un extracto enzimático patrón, de actividad arbitrariamente elegida.

#### I - Métodos de determinación de los sustratos.

Los dos procedimientos de dosaje de la enzima implican el dosaje de fumarato o L-malato durante la reacción. Entre los muchos métodos de que se dispone para estas determinaciones, varios de los cuales se han utilizado en los dosajes de fumarasa, podemos mencionar:

##### a) Métodos de dosaje de fumarato:

- i - Gravimétricos: 1 - precipitación con  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  en alcohol 20%, y pesada o medida del volumen del precipitado rojizo (Batelli y Stern<sup>(1)</sup>).
- 2 - precipitación con  $\text{NO}_3\text{Hg}$  y pesada del precipitado (Hahn y Haarmann<sup>(2)</sup>).
- ii - Volumétricos: 3 - precipitación con  $\text{NO}_3\text{Hg}$ , redisolución y oxi-

dación del  $\text{Hg}^+$  precipitado a  $\text{Hg}^{++}$ , y valoración de éste con  $\text{SCN}^-$  (Stotz<sup>(3)</sup>).

4 - precipitación con  $\text{NO}_3\text{Hg}$ , redisolución y bromación de la doble ligadura; el  $\text{Br}_2$  en exceso se titula con IK y  $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$  (Szegedy<sup>(4)</sup>).

5 - permanganimetría en medio sulfúrico (Straub<sup>(6)</sup>, Butkewitsch y Fedoroff<sup>(38)</sup>).

iii - Manométrico: 6 - hidrogenación a succinato con Zn y HCl y determinación manométrica de éste con succinoxidasa (Krebs, Smyth y Evans<sup>(7)</sup>).

iv - Colorimétrico: 7 - precipitación del complejo fumarato- $\text{Cu}^{++}$ -piridina  
/ determinación colorimétrica del  $\text{Cu}^{++}$  en el precipitado con dietilditiocarbamato (Marshall, Orten y Smith<sup>(8)</sup>).

v - Espectrofotométrico: 8 - medida de la densidad óptica de soluciones de fumarato en una amplia banda de longitudes de onda entre 300 - 205 milimicrones (Racker<sup>(9)</sup>).

b) Métodos de dosaje de malato:

i - Polarimétricos (estos métodos permiten decidir sobre el isómero presente en la muestra): 9 - formación del complejo malato-uranilo (cuya rotación muy exaltada es del mismo signo que el isómero presente) (Dakin<sup>(10)</sup>; Quastel y Whetham<sup>(11)</sup>; Clutterbuck<sup>(12)</sup>; Jacobsohn<sup>(13)</sup>; Straub<sup>(14)</sup>).

10 - polarimetría del complejo malato - molibdato (de rotación muy aumentada y de signo contrario a la del isómero presente) (Auerbach y Krüger<sup>(15)</sup>); o determinación de la rotación del complejo malato - molibdato - citrato, mucho más sensible que la anterior (Krebs y Eggleston<sup>(16)</sup>).

Colorimétricos: 11 - oxidación del malato (ambos isómeros) con  $\text{MnO}_4\text{K}$  y  $\text{BrK}$ , y precipitación del derivado dibromado con di-nitrofenilhidrazina, seguido de su determinación colorimétrica en medio alcalino (Pucher, Vickery y Wakeman<sup>(17)</sup>; Suomalainen y Arhimo<sup>(18)</sup>).

iii - Fluorométricos: 12 - métodos basados en la formación de pro-



ductos de condensación de intensa fluorescencia, por reacción en medio sulfúrico concentrado, con  $\beta$ -naftol (Leininger y Katz<sup>(19)</sup>; Loewus, Tchen y Vennesland<sup>(20)</sup>); con resorcina (Guinn Barr<sup>(21)</sup>); o con homoumbeliferona (Hummel<sup>(22)</sup>).

iv - Fenométricos: 13 - decarboxilación simple a ácido-láctico por el *Lactobacillus arabinosus* (Nossal<sup>(23)</sup>), o por el *Bacterium gracile* (Rentschler<sup>(24)</sup>; Gachot<sup>(25)</sup>) (ambos métodos específicos para ácido L-málico).

v - Espectrofotométrico: 14 - decarboxilación oxidativa del L-malato a piruvato (específica), por la "enzima málica" de hígado de paloma, en presencia de trifosfopiridinanucleótido (TPN) y de iones  $Mn^{++}$ ; se sigue espectrofotométricamente por la reducción del TPN, a 340 milimicrones (Ochoa, Mehler y Kornberg<sup>(26)</sup>).

De todos estos métodos, el más accesible por su relativa sencillez y falta de exigencias de instrumental, es el de permanganimetría de fumarato. Desarrollado por Straub en 1935<sup>(6)</sup> para la investigación de ácido fumárico en tejidos animales, fué utilizado en 1941 por Laki y Laki<sup>(27)</sup> para su dosaje de actividad de fumarasa, y posteriormente Scott y Powell<sup>(28)</sup> y Scott<sup>(29)</sup> lo emplearon, con modificaciones, en sus estudios sobre propiedades cinéticas y purificación de la misma enzima.

El método de Straub se funda en las propiedades reductoras de la doble ligadura del ácido fumárico, puestas de manifiesto en su reacción con el permanganato de potasio en medio sulfúrico; este proceso rompe oxidativamente la molécula, con una relación estequiométrica teórica de seis equivalentes oxidimétricos de permanganato por cada mol de ácido fumárico que reacciona.

## II - Estudios sobre el método permanganimétrico para fumarato.

En base

al método de Straub hemos puesto a punto un procedimiento para titular fumarato, en el que se han considerado los siguientes aspectos:

a - Estudios cualitativos

1- especificidad de la reacción: la solución diluida de permanganato de potasio (0,01 - 0,05 N) es rápidamente decolorada, en solución sulfúrica diluida y a temperatura ambiente, por el ácido fumárico, pero no por los ácidos alcoholes como el málico o el tartárico.

2- punto final de la reacción: si se deja gotear solución de permanganato de potasio 0,02 N sobre una solución de ácido fumárico en ácido sulfúrico 0,5 N, agitando muy brevemente durante el agregado de cada gota, se observa que los tiempos sucesivos de decoloración de éstas son muy cortos (del orden de 1 segundo) a lo largo de una considerable adición de reactivo; al acercarse a la relación de 4 - 5 equivalentes de permanganato por mol de ácido fumárico presente, los tiempos de decoloración van aumentando muy paulatinamente a 2 y 3 segundos por gota. El tiempo de 4 segundos se da para solamente una gota y la inmediata posterior a ésta tarda en decolorarse 5 - 6 segundos, tiempo que se mantiene constante durante el agregado posterior, gota a gota, de una considerable cantidad de permanganato de potasio.

El número de gotas en que se desarrolla este cambio de tiempos de decoloración, depende de la cantidad de fumarato presente al principio: con muestras de 10 micromoles de fumarato se utiliza 10-12 gotas en el intervalo del cambio; con 4 micromoles el número de gotas reduce a 4 - 5 ( $\text{MnO}_4\text{K}$  0,02 N).

El débil color de la gota de  $\text{MnO}_4\text{K}$  en proceso de ser reducida en la solución, puede ser observado más o menos fácilmente de acuerdo a la forma del recipiente, la iluminación, el volumen de solución, etc. Hemos comprobado que en el caso de tener unos 4 - 5 ml de solución en un vaso de precipitados pequeño, con un fondo ligeramente en forma de cúpula, se puede observar una débil tonalidad rosada que ya no se advierte si colocamos la solución en un erlenmeyer del mismo volumen. Hemos aprovechado la mayor sensibilidad que ofrecen estos vasos, empleándolos como recipientes de titulación de fumarato a lo largo de todo el trabajo.

Hemos visto también que, trabajando con solución de permanganato de potasio 0,02 N, el volumen de 0,025 ml por gota es el mí-

nimo adecuado para su buena observación en 5 ml de volumen total, en los vasitos precitados.

En base a estos resultados, se ha adoptado como punto final de la reacción, la gota de 0,025 ml que produce durante 4 segundos color rosado, tal como se observa en un vasito de precipitados de 25 ml, con fondo en cúpula, y con un volumen presente de 4 - 5 ml. Este punto es relativamente reproducible.

b - Estequiometría de la reacción:

En el curso de los ensayos de titulación del fumarato se ha observado que no existe proporcionalidad entre las cantidades de fumarato presentes y los volúmenes de permanganato gastados en la reacción: en una experiencia típica se titulaba en tubo de ensayos cantidades crecientes de ácido fumárico, empleando solución de permanganato de potasio 0,04 N. Los resultados se dan en la Tabla I: se observa (salvo en el caso de 2,50 micromoles de fumarato) una ligera pero sostenida tendencia a disminuir el equivalente por mol de fumarato presente, al aumentar las cantidades de éste. Aún cuando las diferencias en el coeficiente estequimétrico son pequeñas, obligan a introducir una corrección si se desea obtener con relativa exactitud la cantidad de fumarato presente en la muestra titulada. Como se verá más adelante, el método de desaje de actividad prescinde de estos aspectos de la reacción.

c - Condiciones de trabajo adoptadas para nuestra experiencias de rutina:

Se titula el fumarato en cantidades entre 3 y 10 micromoles con  $\text{KMnO}_4$  0,02 N; se emplea una bureta de 3 ml con punta adelgazada que da gotas de 0,025 ml, y como recipientes de reacción vasos de precipitado de 25 ml, de vidrio delgado, con fondo en cúpula. La muestra, generalmente de 0,5 ml, se diluye en 2,5 - 3,5 ml de ácido sulfúrico 0,7 N (ácido concentrado de  $d = 1,92$ , diluido 1:50) de manera de tener un volumen total de unos 5 ml en el punto final; el reactivo se agrega gota a gota con agitación, esperando la total decoloración antes del agregado de una nueva gota. Cuando el tiempo de decoloración llega a 4 segundos, el volumen de reactivo usado se toma como resulta-

Tabla I

Estequiometría de la titulación de fumarato con  $\text{MnO}_4\text{K}$

Se toma cantidades crecientes de fumarato de sodio en 0.5 ml de solución de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  2N; se titula en tubo de ensayo, con  $\text{MnO}_4\text{K}$  0.04 N en una bureta de punta capilar, que da gotas de 0.015 ml; punto final: gota decolorada en 4 segundos; determinaciones por duplicado.

Fumarato µmoles	$\text{MnO}_4\text{K}$ ml. (promedio)	<u>equivalentes <math>\text{MnO}_4\text{K}</math></u> mol fumarato
12.50	1.525	4.88 ± 0.05
10.0	1.245	4.98 ± 0.06
7.50	0.975	5.20 ± 0.07
5.00	0.66	5.27 ± 0.12
2.50	0.31	4.97 ± 0.20

do de la titulación. Este dato se utiliza sin correcciones en el dosaje de actividad.

### III - Consideraciones sobre métodos de dosaje de fumarasa.

Para medir la concentración de una enzima en una solución activa, se puede proceder según dos métodos diferentes que tienen una base común: la cantidad de enzima presente se mide por sus efectos, y éstos serán iguales para iguales cantidades de enzima, en las mismas condiciones.

En lo que estos dos métodos difieren es que el primero no presupone una relación conocida entre las cantidades de enzima presentes y sus efectos, y se obtiene aquéllas empíricamente por comparación de éstos con los efectos de cantidades conocidas (en unidades arbitrarias); en cambio el segundo parte de una relación preestablecida/entre enzima - consumo de sustrato, y no es menester calibrar el método para medir en unidades arbitrarias la cantidad de enzima.

En la literatura se encuentran varios procedimientos de dosaje de fumarasa, que se basan en consideraciones como las mencionadas en segundo término. Los hay que procuran medir la velocidad inicial de la reacción, para una concentración de sustrato que sature la enzima, es decir, que asegure que el factor limitante del proceso será la cantidad de catalizador presente. Estos métodos exigen la medición de la aparición o consumo de sustrato en función del tiempo, y la extrapolación gráfica de esta transformación al comienzo de la reacción. La velocidad inicial mide en estas condiciones la concentración de enzima presente. Entre otros, han utilizado estos métodos Ochoa y col. (26), Racker<sup>(9)</sup>, Massey<sup>(30)</sup> Frieden, Bock y Alberty<sup>(31)</sup>, Hirsch y col.<sup>(32)</sup> y Nossal<sup>(37)</sup>.

Otros métodos, basados en estudios previos sobre la cinética química de la reacción realizada en condiciones análogas a las anteriores (el factor limitante de la velocidad es la concentración de enzima) admiten para el proceso un cierto mecanismo, y mediante la aplicación de las correspondientes ecuaciones al resultado a un tiempo dado de la concentración de sustrato que se consume o que se forma,

calculan la concentración de catalizador presente, Así, Laki y Laki<sup>(27)</sup>, suponen que la reacción de hidratación del fumarato, con una concentración inicial de sustrato 0,025 M, transcurre a velocidad constante hasta un grado de avance de la reacción cercano al equilibrio, y que esta velocidad es proporcional a la concentración de enzima: de aquí, el consumo de sustrato en 5 minutos de reacción, nos mide la actividad presente, en unidades convencionales. La misma suposición respecto de la constancia de la velocidad de la reacción la había hecho anteriormente Clutterbuck<sup>(12)</sup>.

Jacobsohn y col.<sup>(33)</sup>, mediante estudios polarimétricos de la cinética de la hidratación del fumarato, concluyen que el mecanismo de ésta corresponde a una reacción reversible de 1<sup>er</sup> orden en ambos sentidos: encuentran que, partiendo tanto de fumarato como de L-malato, la expresión  $k = k_1 + k_2 = \frac{1}{t} \ln \frac{x}{x_\infty - x}$  se cumple a lo largo de cada reacción, pero el valor  $(k_1 + k_2)$  (la suma de las constantes cinéticas de primer orden, de la reacción directa y la inversa) difiere para ambos sustratos, siendo a 37°C

$$(k_1 + k_2)_{\text{fumarato}} = 0,5 (k_1 + k_2)_{\text{L-malato}}$$

Este hecho, que Jacobsohn deja sin explicar, no es compatible con el mecanismo propuesto. Independientemente de ello, estos investigadores hallaron que  $k = (k_1 + k_2)_{\text{fumarato}}$  era proporcional a la cantidad de enzima presente en el ensayo, en condiciones dadas<sup>(33)</sup>; consecuentemente utilizaron este dato como medida de dicha cantidad, y definieron<sup>(34)</sup> la "capacidad de hidratación" ("Hydratisierungsfähigkeit") o  $H_f = \frac{k \cdot c}{g}$  en que  $k$  = constante cinética hallada

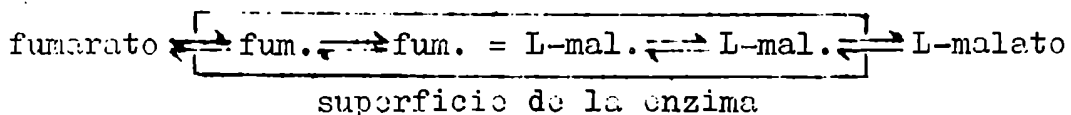
$c$  = concentración inicial de fumarato  
 $g$  = peso seco de la preparación enzimática utilizada en el ensayo.

que según estos autores mide la actividad específica (cantidad de enzima por unidad de peso seco de la preparación enzimática) del material que se utiliza en el experimento.

El término  $H_f$  así definido depende de la concentración ini-

cial de sustrato en el ensayo de actividad: por lo tanto, para medir el contenido de fumarasa de una preparación (su actividad específica) se podrá utilizar esta expresión si se conviene en que su valor es sólo comparativo respecto de otras medidas, expresadas con la misma concentración inicial de sustrato. A este respecto consideramos que la expresión  $\frac{k}{g}$  (con los mismos significados anteriores para  $k$  y  $g$ ) mide la actividad específica independientemente de cualquier condición experimental. Del trabajo mencionado<sup>(35)</sup> parece desprenderse que en todos sus dosajes los autores han empleado como sustrato, fumarato de sodio de sodio en concentración inicial 2% (en ácido fumárico); con esta observación es fácil transformar sus valores  $H_f$  (para esa concentración) a  $\frac{k}{g}$ , de validez general.

Posteriormente se han ocupado del problema Scott y Powell<sup>(29)</sup> que encuentran que las afirmaciones de Laki y Laki no son sostenibles, y basándose en el resultado anómalo de Jacobsohn y col. ya mencionado, rechazan el esquema cinético aplicado por los mismos. Proponen una expresión analítica basada en un mecanismo de formación reversible de complejos de la enzima con ambos sustratos, complejos que por un proceso de activación podrían dar el complejo enzimático del otro sustrato:



La expresión de la marcha de la reacción que se obtiene de este planteo reproduce los datos experimentales de Scott y Powell, y permite calcular, en base a la medida de la concentración de un sustrato al tiempo  $t$ , la velocidad inicial de reacción, que mide la concentración de enzima (Scott<sup>(29)</sup>).

En nuestro caso hemos preferido no formular hipótesis alguna sobre la naturaleza de la reacción con la fumarasa de levadura, sino comparar la acción sobre el sustrato de una muestra/<sup>des-</sup>conocida de enzima, con respecto a las de una serie de alícuotas crecientes, conocidas, de un mismo extracto activo tomado como patrón; método semejante en esencia al propuesto por Bodansky para medir concentraciones enzi-

máticas en general (39).

Realización práctica del dosaje y cálculo de la actividad:  
definición de la unidad de fumarasa.

Este dosaje de la actividad enzimática fué realizado prácticamente adoptando condiciones de trabajo parecidas a las de Laki y Laki: a 2 ml de buffer fosfato 0,2 M pH 7,0 se añaden en un tubo pequeño la enzima, completando el volumen a 3 ml con agua destilada; se termostatiza a 30° y se incuba durante 5 minutos con 1 ml de fumarato de sodio 0,1 M pH 7,0; la reacción se interrumpe por agregado de 1 ml de solución de ácido tricloroacético 20%. Conjuntamente con el tubo con enzima se preparan un blanco con enzima sin fumarato, y un testigo con fumarato y sin enzima.

Los tubos de dosaje se centrifugan, y los sobrenadantes se titulan con  $MnO_4K$  según la técnica antes descripta, tomando 0,5 ml de muestra.

Como se puede ver, la enzima actúa en un medio de fosfato 0,1 M y fumarato de sodio 0,025 M pH 7,0; la cantidad total de fumarato presente es de 100 micromoles.

Cálculo de la actividad dosada: Llamemos  $T_d$  al volumen de  $MnO_4K$  gastado para titular 0,5 ml de líquido de dosaje

$T_b$ : volumen gastado para 0,5 ml de blanco (corresponde a las sustancias reductoras presentes en el extracto a medir)

$T_t$ : volumen gastado para 0,5 ml de testigo (que contiene 10 micromoles de ácido fumárico)

$T_d - T_b = T_f$ : volumen gastado para titular el fumarato presente en 0,5 ml de líquido de dosaje.

La relación  $C = 100 \left(1 - \frac{T_f}{T_t}\right)$   $\mu$ moles ("consumo") nos mide en una escala no lineal la proporción del fumarato inicial transformado por la enzima en L-malato: esta relación así hallada no es la proporción en sí, dado que el coeficiente estequiométrico de la <sup>reacción</sup> titulación con  $MnO_4I$ , varía con la cantidad de fumarato presente; pero para cada proporción



fumarato consumido existirá un sólo valor de  $C = 100(1 - \frac{T_f}{T_t})$   $\mu\text{moles}$   
 100  $\mu\text{moles}$  iniciales

los, si se mantienen constantes todas las condiciones de la titulación.

En todo dosaje de actividad realizado con el procedimiento antedicho, la proporción de fumarato transformado por la enzima dependerá solamente de la cantidad de ésta presente; y por lo tanto esa cantidad estará directamente vinculada a la relación C ("consumo") obtenida para ese dosaje particular. Si ahora tomamos una serie de alícuotas crecientes de un extracto activo (por ejemplo desde 0,02 ml hasta 1 ml) y medimos para las mismas los respectivos "consumos" C tendremos una curva que nos relaciona los C obtenidos con las cantidades de enzima presentes en las alícuotas, que serán proporcionales a sus volúmenes.

Definición de la unidad de fumarasa: Para asignar al extracto enzimático patrón una concentración enzimática en unidades definidas independientemente de dicho extracto, y consiguientemente medir en esas unidades la actividad de cualquier otra solución, hemos procedido en la siguiente forma:

Se extrapola la relación

$$\text{"consumo unitario"} = \frac{C \text{ } \mu\text{moles}}{\text{vol.alic.} \times 5 \text{ min}}$$

a volumen de enzima cero, obteniéndose  $C_0$ ; esa relación nos dará C  $\mu\text{moles}$  transformados en 1 minuto por 1 ml de extracto patrón en 4 ml de fumarato de sodio 0,025 M y fosfato 0,1 M pH 7,0 a 30° si no existiese la reacción inversa (es decir, es una medida de la velocidad inicial de hidrólisis). Cuando  $C_0 = 1 \text{ } \mu\text{mol/ml/min.}$  se tiene realizada la unidad de actividad enzimática por ml de extracto; y en general el  $C_0$  así definido será la concentración de enzima en esas unidades por ml de extracto estudiado. Se asigna entonces a 1,0 ml de extracto patrón la actividad  $C_0$  correspondiente, y con un simple cambio de escalas en el gráfico correspondiente se tiene la curva que vincula las unidades de actividad enzimática presente en el dosaje, con el "consumo" C respectivo. Cuando se desea medir la actividad enzimática de una solución desconocida, se obtiene el "consumo" C correspondiente a una alícuota

de la misma, se interpola en el gráfico C - Actividad, y la cantidad de unidades de fumarasa así determinada se divide por el volumen de solución enzimática empleado en el dosaje; esto nos da el número de unidades de enzima presentes en un mililitro de solución activa.

Hemos esquematizado en la Tabla II la forma de disponer los dosajes de enzima, y los resultados obtenidos para los "consumos" correspondientes a alícuotas crecientes del extracto patrón, a pH 6.0 y 7.0, con estos datos se construyeron las curvas de "consumo" C vs. volumen de enzima presente, en el Gráfico I. Se observa en ellas que contrariamente a lo que afirman Laki y Laki, la relación entre "consumo" observado y cantidad de enzima presente no es lineal, ni siquiera en el ámbito de los primeros 40 % de "consumo".

También aparecen las curvas de "consumo unitario" vs. enzima presente, que extrapoladas a volumen de enzima 0 (cero), nos dan, respectivamente, las "actividades" del extracto patrón, a pH 6.0 y 7.0:  $A_{6.0} = 32$  u/ml, y  $A_{7.0} = 42.5$  u/ml.

A lo largo de todo el trabajo hemos medido las actividades enzimáticas a pH 7.0 (excepto que esté expresamente indicado de otra manera). Por ello hemos tomado para nuestro extracto patrón  $E = 42.5$  u/ml, y consiguientemente hemos dibujado la escala superior del gráfico en unidades enzimáticas, a pH 7.0.

#### IV - Consideraciones cinéticas sobre la curva de dosaje de la fumarasa

Las curvas experimentales de dosaje a pH 6.0 y 7.0 nos suministran una serie de valores de los "consumos" C en función de la cantidad de enzima presente E, medida en las unidades antes definidas. En la Tabla III hemos reunido algunos de estos valores (interpolados en el Gráfico I para una serie de E crecientes) y con ellos hemos calculado las funciones  $\log_{10}(a - C)$  para  $a=76$  hasta 84. Si representamos la familia de curvas  $\log_{10}(a - C)$  vs E, podremos ver que con ciertos valores de a, a saber  $a=76$  para experiencias a pH 6.0, y  $a=84$  para experiencias a pH 7.0 (Gráfico II), se obtienen funciones prácticamente lineales, de la forma  $\log_{10}(a - C) = bE + d$ .

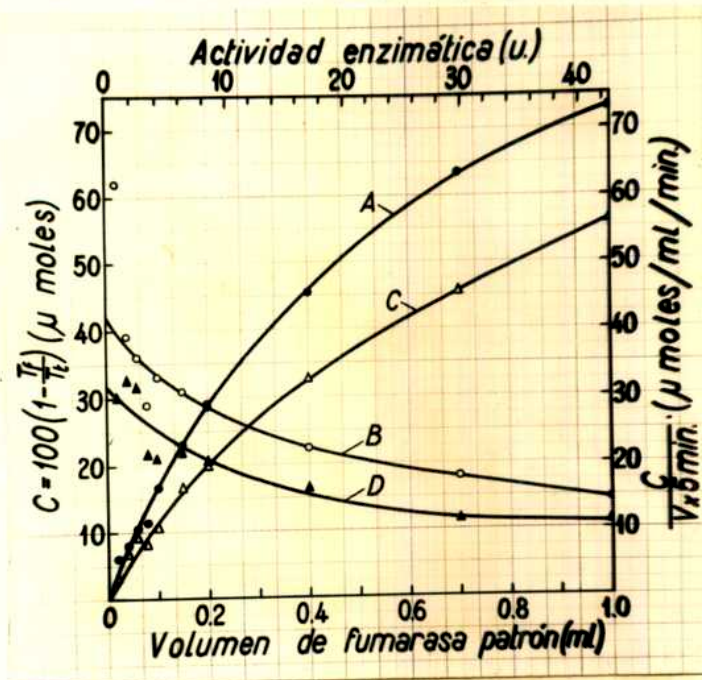
Tabla II

Obtención de la curva de dosaje de la actividad enzimática

Se incubaba a 30° C durante 5 minutos, 2 ml de fosfato 0.2 M pH 6.0 o 7.0, fumarasa y agua destilada hasta completar 3 ml, con 1 ml de fumarato de sodio 0.1 M pH 6.0 o 7.0; se interrumpe la reacción con 1 ml de ácido tricloroacético 20%. Se centrifuga y titula por duplicado 0.5 ml del sobrenadante acidificado con 2.5 ml SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 1:50 (v/v), con MnO<sub>4</sub>K 0.02 N. Se preparan testigos sin enzima y un blanco de 0.5 ml de enzima sin sustrato. Desviación de las titulaciones: ± 0.015 ml.

Enzima ml	Titulación de fumarato MnO <sub>4</sub> K, ml T <sub>f</sub> =T <sub>d</sub> -T <sub>b</sub>	C = 100 (1 - $\frac{T_f}{T_t}$ ) μ moles	$\frac{\text{C } \mu\text{moles}}{\text{E ml} \times 5 \text{ min}}$
Experimentos a pH 6.0			
0.02	2.54	3.0	30
0.04	2.45	6.5	32.5
0.06	2.38	9.5	31.6
0.08	2.41	8.4	21
0.10	2.36	10.3	20.6
0.15	2.20	16.8	22.4
0.20	2.13	19.8	19.8
0.40	1.81	32.8	16.4
0.70	1.53	45.8	11.4
1.00	1.31	56.2	11.2
---	T <sub>t</sub> { 2.56	---	---
---	{ 2.70	---	---
Experimentos a pH 7.0			
0.02	2.54	6.2	62
0.04	2.50	7.8	39.5
0.06	2.43	10.7	35.6
0.08	2.40	11.7	29.2
0.10	2.27	16.6	33.2
0.15	2.10	23.2	31.0
0.20	1.96	28.8	23.8
0.40	1.54	45.5	22.7
0.70	0.99	63.5	18.1
1.00	0.89	73.1	18.6
---	T <sub>v</sub> { 2.74	---	---
---	{ 2.60	---	---
0.50	T <sub>b</sub> 0.08	0.16/ml enz.	---

Gráfico I



"Consumos" C de fumarato a pH 6 y 7, en función de la actividad presente: curva de dosaje de la fumarasa

Resultados de la Tabla II. Abscisa inferior: volumen de extracto patrón presente en la reacción. Abscisa superior: unidades enzimáticas presentes en la reacción (pH 7.0). Ordenada izquierda: "consumo" C de fumarato en 5 minutos. Ordenada derecha: "consumo unitario" de fumarato para 1 minuto y 1 ml de extracto patrón.

Curva A: "consumo" C a pH 7.0 en 5 minutos; curva de dosaje de la enzima (abscisa superior).

Curva B: "consumo unitario" a pH 7.0.

Curva C: "consumo" C a pH 6.0, en 5 minutos.

Curva D: "consumo unitario" a pH 6.0.

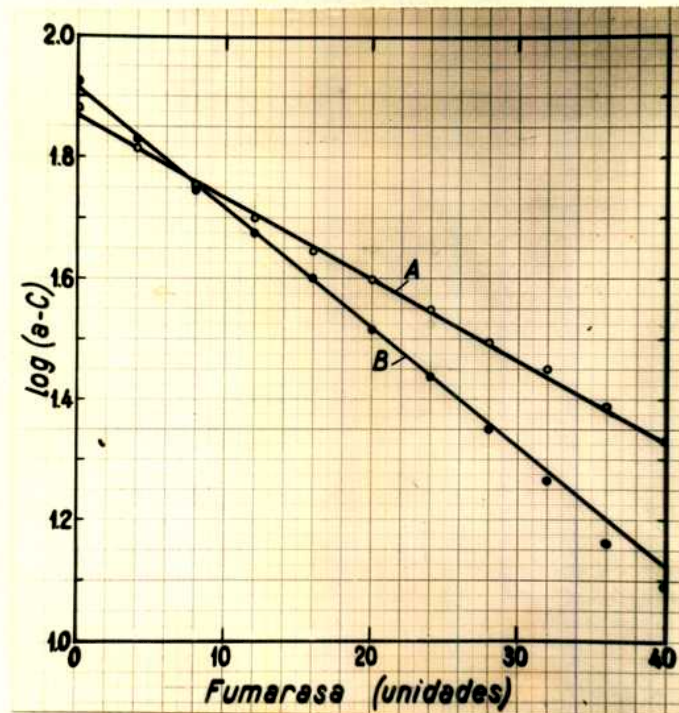
Fumarato 0.025 M, fosfato 0.1 M; volumen, 4 ml; incubación, 5 minutos a 30°C.

Tabla III

Funciones  $\log(a-C)$  vs.  $E$ , a pH 6.0 y 7.0, para diversos valores de  $a$

pH	$E$ , u	$C$ , $\mu$ moles	$a = 76$	$a = 79$	$a = 81$	$a = 84$
6.0	4	11.0	1.813	1.833	1.845	1.863
	8	19.5	1.752	1.775	1.789	1.810
	12	26.0	1.699	1.724	1.740	1.763
	16	32.0	1.643	1.672	1.690	1.716
	20	36.5	1.597	1.628	1.648	1.677
	24	40.5	1.550	1.585	1.607	1.638
	28	44.7	1.496	1.535	1.560	1.594
	32	48.0	1.447	1.491	1.519	1.556
	36	51.5	1.389	1.439	1.470	1.512
	40	54.5	1.332	1.389	1.423	1.470
7.0	0	0.0	1.881	1.898	1.908	1.924
	4	16.5	1.775	1.796	1.810	1.829
	8	28.0	1.681	1.708	1.724	1.748
	12	36.5	1.597	1.628	1.643	1.672
	16	44.0	1.505	1.544	1.568	1.602
	20	51.0	1.398	1.447	1.477	1.518
	24	56.5	1.290	1.352	1.389	1.439
	28	61.5	1.161	1.243	1.290	1.352
	32	65.7	1.013	1.124	1.185	1.262
	36	69.5	0.813	0.978	1.061	1.161
40	71.7	0.634	0.863	0.969	1.090	

## Gráfico II



Funciones  $\log(a - C)$  vs. E

Resultados de la Tabla III. Curva A: pH 6.0,  $a = 76$ . Curva B: pH 7.0,  $a = 84$ .

Se observa que la recta a pH 6.0 reproduce muy bien los puntos obtenidos de la curva de dosaje, que llegan a  $C = 54$ . En cambio a pH 7.0 se observa una regular concordancia hasta  $E = 28$  (aproximadamente  $C = 60$ ) y por encima de éste la desviación es marcada. Esto nos indicaría que la ecuación empírica anterior es útil hasta este límite de consumo.

Esta ecuación es análoga a la que nos da el curso de una reacción reversible de primer orden en ambos sentidos (ya postulada por Jacobsohn y col. (34) para la fumarasa)

$$\ln \frac{x_0 - x}{x - x_e} = (k_1 + k_2) t$$

en donde:  $x_0$  = concentración inicial del reactivo que desaparece

$x$  = concentración del reactivo al tiempo  $t$

$x_e$  = concentración del reactivo en el equilibrio

$k_1$  = velocidad específica de la reacción directa

$k_2$  = velocidad específica de la reacción inversa.

En el caso de tener una reacción de catálisis homogénea, esta ecuación se transforma en

$$\ln \frac{x_0 - x}{x - x_e} = (k_1' + k_2'') t \cdot E$$

en donde:  $E$  = concentración de catalizador

$k_1'$  y  $k_2''$  = las velocidades específicas para la concentración unitaria de catalizador. Los otros términos tienen el significado anterior.

Esta ecuación nos da

$$\ln (x - x_e) = - (k_1' + k_2'') \cdot t \cdot E + \ln (x_0 - x_e)$$

La identidad formal de esta expresión con la ecuación empírica (1) es inmediata, si adoptamos las siguientes equivalencias:

$-0.43 (k_1' + k_2'') \cdot t = b$  (término constante puesto que todos los dosajes se realizan en periodos de 5 minutos)

$x_0 - x = C$  y por lo tanto  $x - x_e = (x_0 - x_e) - C = a - C$

$$x_0 - x_0 = a$$

$$\log (x_0 - x_0) = d$$

Esto nos sugeriría que los valores de a o de d para pH 6.0 y 7.0 nos estarían dando las concentraciones de L-malato en el equilibrio a ambos pH. Esta hipótesis no es muy sostenible, dada la discrepancia entre a y antilog d a ambos pH, y también porque repetidos estudios sobre el equilibrio de la fumarasa (ver el capítulo V)<sup>(31)</sup> mostraron que el mismo es independiente del pH, entre 6.0 y 9; mientras que los parámetros a y d dependen de este último.

Una estimación de estas consideraciones, y del hecho de no reproducir los resultados experimentales de "consumos" por encima de  $C = 60$ , y de que esos "consumos" no son los que tienen lugar en realidad, sino modificados por la no linealidad de las titulaciones permanganométricas (ver más arriba), nos lleva a concluir que la ecuación empírica hallada es sólo una primera aproximación grosera para la dilucidación del mecanismo de reacción, la cual requiere un tipo de experimentación mucho más completa y precisa que la que nos ha llevado a nuestros resultados anteriores.

#### B - MEDIDA DE LA CONCENTRACION PROTEICA

Al comienzo del trabajo se siguió, con pequeñas modificaciones, el método turbidimétrico de Stadtman, Novelli y Lipmann<sup>(36)</sup>, con ácido tricloroacético. Posteriormente, y con el fin de tener mayor reproducibilidad en las determinaciones, se adoptó el método colorimétrico de Lowry y col.<sup>(37)</sup> que emplea el reactivo fenólico de Folin - Ciocalteu y un reactivo de biuret modificado; la curva de calibración se hizo con seroalbúmina de bovino cristalizada.

#### C - EXPRESION DE LA PUREZA DE LAS PREPARACIONES

El grado de purificación alcanzado en una preparación se mide por el  $Q_{\text{Fumarato}}$ , o sea la cantidad de microlitros de fumarato considerado como gas perfecto a 0°C y 760 mm Hg, que es transformada en una hora por un mg de proteína de la preparación, a dilución infi-



nita. En nuestro caso

$$Q_f = \frac{\mu\text{l fumarato consumido}}{\text{mg proteína} \times \text{hora}} =$$
$$= \frac{E \frac{\mu\text{moles}}{\text{min. ml}} \times 60 \frac{\text{min}}{\text{hora}} \times 22,4 \frac{\mu\text{litró}}{\mu\text{mol}}}{P \text{ mg proteína/ml}} = \frac{E}{P} \times 1344 \mu\text{l/mg/h}$$

#### D - MEDICION DEL PH

Excepto en donde se indique lo contrario, todas las determinaciones de pH se hicieron colorimétricamente por comparación con las soluciones buffer de Sørensen. Los indicadores utilizados fueron el rojo de metilo (pH 4.5 - 6.3), rojo de fenol (pH 6.3 - 7.8), rojo de cresol (pH 7.5 - 8.5) y azul de timol (pH 8 - 9). Cuando se medían soluciones que no contenían proteínas se pudo emplear en el intervalo pH 6 - 7.5 el azul de bromotimol (en presencia de proteínas es adsorbido por éstas y vira al amarillo).

Capítulo II - Referencias bibliográficas

- (1) Battelli, F. y Stern, L., *Compt. rend. Soc. Biol.*, 84, 305 (1921-I).
- (2) Hahn, A. y Haarmann, W., *Z. Biol.*, 87, 107 (1928). *Chem. Zentr.* 1928 I, 2076.
- (3) Stotz, E., *J. Biol. Chem.*, 118, 471 (1937).
- (4) Szegedy, E., *Z. analyt. Chem.*, 109, 95, 316 (1937), citado en <sup>(5)</sup> Tomo III, pág. 2328.
- (5) Bamann, E. y Myrbäck, K., "Die Methoden der Fermentforschung", Leipzig, 1941 y New York, 1943.
- (6) Straub, F., *Z. physiol. Chem.*, 236, 43 (1935).
- (7) Krebs, H. A., Smyth, D. A. y Evans, E. A. jr., *Biochem. J.*, 34, 1041 (1940).
- (8) Marshall, L. M., Orten, J. M. y Smith, A. H., *Arch. Biochem.*, 24, 110 (1949).
- (9) Racker, E., *Biochim. et Biophys. Acta*, 4, 211 (1950).
- (10) Dakin, H. D., *J. Biol. Chem.*, 52, 183 (1922).
- (11) Questel, J. H. y Whetham, M. D., *Biochem. J.*, 18, 519 (1924).
- (12) Clutterbuck, P. W., *Biochem. J.*, 21, 512 (1927).
- (13) Jacobsen, K. P., *Biochem. Z.*, 234, 401 (1931).
- (14) Straub, F. B., *Z. physiol. Chem.*, 244, 117 (1936).
- (15) Auerbach, F. y Krüger, D., *Z. unters. Nahr. mitt usw.*, 46, 97 (1923); *ibid.*, 46, 179 (1923), citado en ref. <sup>(5)</sup>, pág. 1056-1057.
- (16) Krebs, H. A. y Eggleston, L. V., *Biochem. J.*, 37, 335 (1943).
- (17) Pucher, G. W., Vickery, H. B. y Wakeman, A. J., *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 6, 288 (1934).
- (18) Suomalainen, H. y Arhimo, E., (i) *Z. anal. Chem.*, 128, 206 (1948) *Chem. Abs.*, 42, 5804 (1948).  
(ii) *Anal. Chem.*, 19, 207 (1947). *Chem. Abs.*, 41, 3017 (1947).
- (19) Leininger, E. y Katz, S., *Anal. Chem.*, 21, 1375 (1949).
- (20) Loewus, F. A., Tchen, T. T. y Vennesland, B., *J. Biol. Chem.*,

212, 737 (1955).

- (21) Guinn Barr, J., Plant Physiol., 23, 443 (1948). Chem. Abs., 43, 267 (1949).
- (22) Hummel, J. P., J. Biol. Chem., 180, 1225 (1949).
- (23) Nessel, P. M., Biochem. J., 50, 349 (1952). Chem. Abs., 46, 3598 (1952).
- (24) Reutschler, H., Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 39, 30 (1948). Chem. Abs., 42, 7483 (1948).
- (25) Gachot, H., Journée vinicole, 22, N° 6313, pág. 1 (set. 1948). Chem. Abs., 43, 1146 (1949).
- (26) Cohen, S., Schler, A. H. y Kornberg, A., J. Biol. Chem., 174, 979 (1948).
- (27) Laki, K. y Laki, E., Enzymologia, 9, 139 (1941).
- (28) Scott, E. M. y Powell, R., J. Am. Chem. Soc., 70, 1104 (1948).
- (29) Scott, E. M., Arch. Biochem, 18, 131 (1948).
- (30) Massey, V., Biochem. J., 51, 490 (1952).
- (31) Beck, R. M. y Alberty, R. A., J. Am. Chem. Soc., 75, 1921 (1953).
- (32) Hirsch, H. M., Biochim. et Biophys. Acta, 9, 674 (1952)  
Sloninski, P. P. y Hirsch, H. M., Compt. Rend. Acad. Sci., 235, 914 (1952).
- (33) Jacobsohn, K. P., Bello-Pereira, F. y Tapadinhas, J., Biochem. Z., 254, 112 (1932).
- (34) Jacobsohn, K. P. y Da Cruz, A., Biochem. Z., 261, 267 (1933).
- (35) Stadtman, E. R., Novelli, G. D. y Lipmann, F., J. Biol. Chem., 191, 365 (1951).
- (36) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- (37) Nessel, P. M., Biochem. J., 57, 62 (1954).
- (38) Butkowitsch, M. S. y Fedoroff, M. W., Biochem. Z., 207, 302 (1929).
- (39) Sedansky, G., J. Biol. Chem., 205, 731 (1953).

### CAPITULO III

#### OBTENCION DE EXTRACTOS ACELULARES DE FUMARASA DE S. CEREVISIAE

Hemos hecho ya referencia en la introducción a los estudios realizados en diversos organismos y tejidos animales, sobre la distribución intracelular de la fumarasa. De esos estudios se ha concluido que esta enzima forma parte de las mitocondrias, en las que estaría encerrada, en solución, rodeada por una suerte de membrana<sup>(1)</sup>.

Los estudios sobre distribución intracelular en la levadura han dado resultados que dependían fuertemente de los métodos de obtención de extractos acelulares. Hirsch<sup>(2)</sup>, trabajando con un desintegrador mecánico de alta velocidad, obtuvo extractos de levadura en que la actividad de fumarasa y aconitasa no sedimentaba por centrifugación diferencial. Nossal diseñó un desintegrador ultrarrápido de gran eficiencia, con el que pudo preparar<sup>(3)</sup>, con tiempos de agitación muy cortos (10 segundos), extractos acelulares de levadura de panadería en los que aparecía asociada la fumarasa a una fracción particulada sedimentable entre 3500-10000 x g, y que exhibía una serie de actividades de deshidrogenasas vinculadas al ciclo del ácido cítrico<sup>(3a)</sup>; al aumentar los períodos de desintegración hasta 90 segundos toda la actividad de fumarasa y de aconitasa pasaba de la fracción sedimentable a la soluble (> 10000 x g). Posteriormente, Linnane y Still<sup>(4)</sup> consiguieron obtener con el agitador de Nossal preparaciones subcelulares particuladas, con las propiedades bioquímicas y de tinción de las mitocondrias, y que eran capaces de oxidar fumarato y L-malato (véase el Cap. I, Introducción). Estos resultados indican que la fumarasa de levadura está formando parte de las mitocondrias, y que su asociación con éstas es lo suficientemente fuerte como para requerir un tratamiento de solubilización intenso.

También se concluye lo mismo de los estudios de Krebs y col.<sup>(5)</sup> sobre permeabilidad de la membrana de levadura tratada con nieve carbónica: se observa que las suspensiones de células así condicionadas son permeables al fumarato y L-malato, entre otros metabolitos, y que éstos tienen acceso a la fumarasa intracelular, capaz de actuar so

bre los mismos; pero la enzima no es solubilizada por este tratamiento.

Es frecuente que en la levadura, como en otros microorganismos, se plantea este tipo de problema para la extracción de una enzima. La primera preparación soluble de un sistema enzimático intracelular fué realizada precisamente a partir de levadura, en 1897, por E. Buchner<sup>(6)</sup>, que obtuvo por desintegración mecánica y prensado de las células, un extracto que producía la fermentación alcohólica de la glucosa, y al que denominó "zimas".

Posteriormente se han desarrollado otras técnicas de preparación de extractos acelulares, aplicables a microorganismos, y con ellas se ha obtenido soluble la fumarasa de diversos orígenes; también se hallaron procedimientos para aumentar la permeabilidad de las membranas respecto de los sustratos enzimáticos<sup>(7,8,9)</sup> y poder así demostrar las actividades intracelulares de microorganismos.

La primera preparación acelular de fumarasa de microorganismos fué obtenida por Jacobsohn<sup>(9)</sup> quien en 1931 preparó, a partir de levadura de cerveza de fermentación baja, un extracto macerado de células secadas al aire (extracto de Lebedew) con una baja actividad de fumarasa. Guastel<sup>(10)</sup> obtuvo paralelamente extractos acelulares activos a partir de suspensiones de *Escherichia coli* en buffer de fosfatos, por autólisis a 37°C durante tres días; también preparó extractos activos de células de *Micrococcus lysodeikticus* lisadas con saliva o clara de huevo, a 37-45°C, durante unos minutos.<sup>(11)</sup>

Recientemente la enzima ha sido solubilizada de diversos microorganismos, en general por procedimientos mecánicos de disgregación de las estructuras celulares: en *Mycobacterium tuberculosis*<sup>(12)</sup> las células se congelaban y fundían repetidamente, y luego eran molidas con polvo de cuarzo. En *Pseudomonas fluorescens*<sup>(13)</sup>, se prensaban mezcladas con polvo de Pyrex en una prensa bacteriana de Hughes, o se agitaban con perlititas de vidrio ("ballotini") en un desintegrador de Mickle. En *Escherichia coli* y *Azotobacter* se obtuvo el extracto por desintegración sónica<sup>(14)</sup>.

Estos métodos han sido aplicados también a la levadura, so-

metiendo sus células a una agitación mecánica muy intensa, con ballotini. Trabajando en esa forma, Hirsch<sup>(2)</sup>, Nossal<sup>(3,3a)</sup> y col.<sup>(15)</sup> y Linane y Still<sup>(4)</sup> (ya mencionados anteriormente) obtuvieron extractos que tenían diversas distribuciones de la actividad entre las fracciones particuladas y no sedimentables, de acuerdo a las condiciones de disgregación elegidas.

En este trabajo hemos preparado los extractos acelulares de fumarasa por autólisis de levadura secada con acetona y éter.

Este método, fundamentalmente diferente de los procedimientos mecánicos ya mencionados, fué desarrollado y empleado por primera vez por Albert, Buchner y Rapp<sup>(16)</sup>, quienes lo aplicaron justamente a la levadura, para la obtención de la "zimasa" por un método alternativo del primitivo (molienda y prensado de las células). Aquél es una forma del tratamiento con solventes orgánicos (etanol y butanol entre otros, además de los mencionados) que se emplea para deshidratar preparaciones celulares o particuladas (por ejemplo mitocondrias), modificando las estructuras celulares, labilizando los complejos lipoproteicos, aumentando la permeabilidad de las membranas y posibilitando la solubilización acuosa de ciertos componentes no extraíbles de otra manera.

La aplicación de este método a la extracción de la fumarasa ha dado resultados satisfactorios: ha permitido prepararla a partir del bacilo de la tuberculosis<sup>(12a)</sup>, y en nuestro caso hemos obtenido la enzima totalmente soluble y libre de partículas activas sedimentables, extrayendo con buffer de fosfatos, polvos acetónicos de levadura de panadería, de acuerdo a la observación de Stoppani (resultados no publicados) sobre la presencia de fumarasa y aconitasa en dichos extractos, preparados según el procedimiento indicado más abajo.

#### Parte experimental

Material biológico de partida: Se ha utilizado levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae* producida industrialmente por la Cía Argentina de Levaduras E.N. Este material se obtenía fresco prensado, y adi-

cionado de fécula para su conservación. Un análisis microbiológico realizado en este laboratorio no reveló ninguna contaminación biológica significativa.

Para su posterior manipulación, la levadura (un paquete de 1/2 kg) se lava suspendiéndola en 1-1,5 ls. de agua corriente, y se centrifuga; se separa la capa de células de la de almidón, y aquéllas vuelven a suspenderse en agua corriente; por último se filtra con succión, hasta total escurrimiento del líquido de lavado. La torta de levadura así preparada se guarda en frío (0-5°C).

Preparación de polvos acetónicos de levadura: 250 g de torta de levadura fría se suspenden en una licuadora eléctrica con 600-700 ml de acetona seca, a -18°C; después de un minuto de agitación se filtra con succión por un buchner frío. Se repite el tratamiento otras dos veces, manipulando rápidamente para evitar que la temperatura suba por encima de 5°C. La torta de la tercera filtración se lava con dos porciones de 150 ml de éter etílico libre de peróxidos, a -18°C, se escurre bien con succión y se extiende sobre una hoja de papel de filtro, desmenuzándose bajo una corriente de aire de un ventilador eléctrico. Cuando el polvo finamente dividido y muy blanquecino está seco, se lo guarda en un desecador al vacío con hidróxido de potasio como deshidratante, y vaselina líquida para absorber la acetona remanente. Este polvo acetónico, obtenido en un rendimiento de 100-120 g/250 g torta de levadura lavada, es estable indefinidamente.

Obtención de extractos acelulares activos: 80 g de polvo acetónico se dispersan con licuadora eléctrica en 325 ml de solución de fosfato dipotásico 0.092 M. Se deja esta suspensión a temperatura ambiente durante 1-2 horas, controlando periódicamente el pH con indicador rojo de fenol. Se observa una caída de pH pronunciada, a veces hasta 6-6.5, que debe corregirse por agregado gradual de amoníaco (solución concentrada 12 M), llevando el pH a 7-7.5. Se deja en heladera durante 5-6 días con agitación ocasional y cuidando de controlar y corregir el pH de manera de mantenerlo entre los límites de 6.5-7.5. Al cabo de este tiem-

po durante el cual se consumen los metabolitos de las células por la actividad de sus sistemas enzimáticos (origen de la acidificación de los extractos) se ha liberado la cantidad máxima de fumarasa que pasa a la solución. El extracto tiene un olor agradable, aromático y algo sulfhídrico; de acuerdo al pH que haya predominado en la extracción se obtendrá líquidos de color obscuro (alcalinos) o claros (ácidos).

El extracto se centrifuga a 2000 rpm, se decanta el sobrenadante y el precipitado de material celular se reextrae suspendiéndolo en 100 ml de buffer de fosfato 0.092 M, pH 7.0. Se deja en heladera hasta el día siguiente, se centrifuga a 2000 rpm y el sobrenadante claro se reúne con el extracto anterior, previo toma de muestras.

Una precaución importante de esta preparación es impedir su acidificación por debajo de pH 6.5: a pH cercano a 6 la enzima se inactiva gradualmente, y cuando la acidez se hace mayor la pérdida de actividad puede ser total.

### Resultados

El método que hemos utilizado para obtener los extractos de fumarasa nos ha dado preparaciones satisfactorias tanto en rendimiento de enzima como en su pureza. En la Tabla I se resumen los resultados obtenidos con varios extractos preparados según este procedimiento: la cantidad de enzima obtenida a partir del polvo de levadura es considerable. Así, por gramo de levadura seca se obtiene normalmente entre 260 y 278 unidades en solución, cifra variable que puede depender entre otras cosas de la partida de levadura usada (cuyo contenido en fumarasa estará determinado muy principalmente por la tensión de  $O_2$  durante su crecimiento<sup>(2a)</sup>), de pequeñas diferencias en la operación del secado acetónico, y también de la marcha del proceso de extracción, especialmente en lo referente al pH que predomine en ésta. Referido a la levadura fresca, aquel resultado nos da un contenido mínimo posible de 105 - 112 unidades de enzima por gramo de células enteras, con un  $Q_{\text{fumarato}} = 350 - 375$ .

La concentración enzimática y actividad específica de los



Tabla I

Actividad total en extractos acelulares de sucesivos preparados de polvo acetónico de levadura

El extracto total se compone del sobrenadante de la extracción y de los lavados del precipitado ya extraído.

Preparado de polvo acetónico	1	1	1	2	3	3	3
Extracto	A <sup>‡</sup>	B <sup>‡</sup>	C	D	E	F	G
Polvo acetónico utilizado, g	520	295	150	500	492	508	123
<u>Fosfato ml</u> polvo acet. g	4.65	4.65	4.35	4.35	4.06	4.06	4.06
Tiempo de extracción, días	6	6	5	4	5	5	6
Sobrenadante de la extracción							
Actividad, u/ml	62	66	65	--	80	81	80
Actividad total 10 <sup>2</sup> u	1040 <sup>‡</sup>	625 <sup>‡</sup>	375	--	1225	1210	288
Ofumarato	3200	3400	3370	--	2240	2020	2430
<u>Actividad u</u> polvo acet. g	200	210	250	--	250	238	234
Extracto total	A + B	C	D	E + F	G		
Actividad, u/ml	58 <sup>⊙</sup>	47.5 <sup>⊙</sup>	70	78	67		
Actividad total 10 <sup>2</sup> u	1940 <sup>⊙</sup>	419 <sup>⊙</sup>	1390	2620	328		
Ofumarato	3170 <sup>⊙</sup>	3170 <sup>⊙</sup>	--	2380	2330		
<u>Actividad u</u> polvo acet. g	238 <sup>‡</sup>	278	278	262	266		
Ofumarato (polvo acet.)	320 <sup>‡</sup>	375	375	352	358		

⊙ Estos resultados se han calculado por suma de los volúmenes, actividades y proteínas totales de los sobrenadantes y lavados de la extracción.

‡ En este experimento el rendimiento en enzima es bajo, debido a pérdidas accidentales en la centrifugación.

diferentes extractos ha oscilado entre 40 y 80 unidades/ml y  $Q_{\text{fumarasa}} = 2000$  y  $3400$ , predominando los extractos con  $60 - 70$  u/ml y  $Q_f = 2500$ . Esas variaciones en la concentración de los extractos totales se han debido a los diferentes tiempos de extracción empleados; cuando se dejó ese período en 5 - 6 días, la actividad de los primeros sobrenadantes se hacía  $65 - 80$  u/ml, y es en esas condiciones que se obtenía el rendimiento antes mencionado. También contribuyen a ese efecto las diferencias en los volúmenes de los líquidos de lavado que diluyen el sobrenadante original. Las diferencias de actividad específica entre los diversos extractos indican que las sucesivas preparaciones no reproducían el grado de solubilización de las proteínas que acompañan a fumarasa; este efecto no se ha podido correlacionar claramente con las condiciones particulares de cada preparación.

Estudio del proceso de solubilización de la enzima:

Una vez suspendido

el polvo acetónico en la solución de fosfato, se ha seguido a lo largo de la extracción la marcha de la solubilización de la enzima; paralelamente se estudió la distribución de actividad de fumarasa en las distintas fracciones obtenidas por centrifugación diferencial de la suspensión.

En la Tabla II y el Gráfico I se dan los resultados obtenidos con dos extractos en autólisis: en ambas experiencias se observa que el proceso de extracción es regular y continuo, y que la velocidad con que se solubiliza la enzima es semejante en los dos casos: aproximadamente 10 unidades /ml por día. La mayor cantidad de enzima extraída en el experimento 2854 durante las primeras 8 horas (curva A) posiblemente se deba a un predominio de pH más altos (8.0) que para el experimento 4155, en ese mismo período. Aparentemente en ninguno de los dos experimentos se ha llegado al final del proceso de extracción pues no se observa la meseta correspondiente, ni aún a los 5 días de tratamiento.

Respecto del estado de la fumarasa en la solución, los

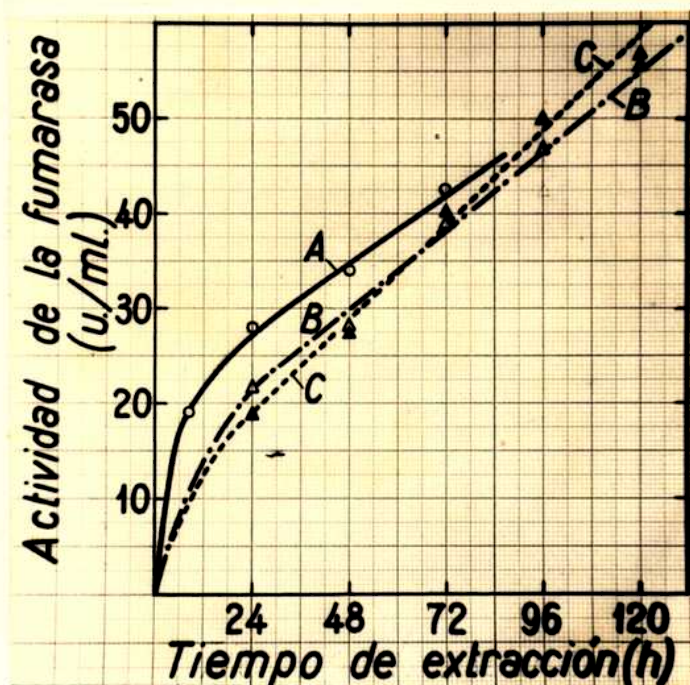
Tabla II

Estudio del proceso de extracción de la fumarasa  
y de su distribución en los extractos

Das preparaciones diferentes de polvo acetónico de levadura (A y B) se extraen con  $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$  0.092 M, en proporción de 4.65 ml/g de polvo; durante la extracción se mantiene el pH entre los límites siguientes: extracto A, pH 6.8-8.0; B, 6.2-7.1. Las muestras tomadas a los tiempos indicados se centrifugan inmediatamente a 2600 x g, dosándose la actividad y proteína de los sobrenadantes; en el experimento B éstos se fraccionan por centrifugación diferencial a 10000 x g, y se dosan los sobrenadantes y precipitados suspendidos en fosfato 0.01 M pH 7.

Experi- mento	Tiempo de extracción horas	Extracto total sobrenadante 2600 x g		Centrifugación diferencial			
		activ. u/ml	$Q_f$	sobrenadante 10000 x g activ. u/ml	$Q_f$	precipitado 10000 x g activ. u/ml	$Q_f$
A	8	19	1900				
	24	28	2000				
	48	34	2000				
	72	42.5	2300				
B	24	22	1900	19	3050	0	0
	48	28	2400	28	3700	0	0
	72	39	2050	40	3100	0	0
	96	47	2400	50	3200	0	0
	120	56	2850	57	3000	0	0

Gráfico I



Marcha del proceso de extracción de la fumarasa,  
y formas solubles de la misma

Resultados de la Tabla II.

Curva A, ○ : actividad total soluble en el extracto A libre de células.

Curva B, △ : actividad total en el extracto B libre de células, soluble a 2600 x g.

Curva C, △ : actividad del extracto B, soluble a 10000 x g.

Fraccionamientos por centrifugación diferencial demuestran que la totalidad de la actividad extraída de las células (soluble a 2600 x g) reside en la fracción no sedimentable a 10000 x g, ya desde el primer día de extracción; no se ha podido observar en ningún momento una diferencia significativa de actividad entre el extracto total libre de células, y su sobrenadante a 10000 x g. Esto excluye la hipótesis que la fumarasa pase a la solución como parte de mitocondrias u otras partículas subcelulares, y que se separe de ellas en un proceso posterior que tuviese lugar en la solución; y la lentitud de la marcha de la solubilización demuestra que previo a ésta se requiere otro tipo de fenómeno, probablemente de autólisis, que tendría lugar a nivel de las estructuras intracelulares, labilizando o rompiendo los vínculos de la fumarasa con las células.

### Discusión

La cantidad total de fumarasa presente en la levadura no puede ser medida por métodos directos. La falta de permeabilidad de la membrana para el fumarato y el L-malato<sup>(19, 20, 7, 5)</sup> no permite su dosaje en la célula fresca, entera; pero ciertos métodos de alteración de esa permeabilidad (congelamiento con aire líquido o nieve carbónica) hacen detectable la presencia de la enzima en el interior de la célula.<sup>(5)</sup>

En la Tabla III hemos reunido los resultados obtenidos por varios autores en sus preparaciones de fumarasa de levadura, recalculando sus datos para nuestras condiciones de dosaje, haciéndolos comparables a los nuestros. Entre ellos hemos incluido la única determinación conocida de actividad en la célula no disgregada (pero tratada con nieve carbónica); con éstas Krebs y col.<sup>(5)</sup> obtienen un  $Q_{\text{fumarato}}$  = 210 aproximadamente (que corresponde a un contenido de 160 unidades de enzima por gramo de levadura seca). Nuestros resultados de actividad obtenida en los extractos (Tabla I) nos indican un  $Q_{\text{fumarato}}$  = 375 para las células enteras (rendimiento máximo alcanzado), y Nessel<sup>(3a)</sup> ha conseguido extractos por desintegración mecánica duran-

Tabla III

Actividad de fumarasa en preparados de levadura de diversos autores

Autor	Tipo de preparación, factor de conversión f.c.ii (véase la página siguiente) y $Q_{\text{fumarato}}$ obtenido.			
Krebs, Curia y Aggles-ten (5)	Levadura de panadería tratada con nieve carbónica, descongelada, lavada y suspendida en agua destilada; f.c.=2.75. $Q_{\text{fumarato}} = 210$			
Mirsch (2)	S.cerevisiae 59H (normal) cultivado en aerobiosis o anaerobiosis, suspendido en fosfato 0.1 M pH 7.3, y desintegrado con "ballotini" en un agitador ultrarrápido; el extracto entero es el sobrenadante de 1700 x g; f.c.=0.88. $Q_{\text{fumarato}} = 2310$ (aerobiosis); 346 (anaerobiosis)			
Nossal (3a)	Levadura de panadería, fresca, suspendida en ClK 0.9%, desintegrada a 193 con "ballotini" en un agitador ultrarrápido durante 10, 30 o 90 segundos; el extracto entero, sobrenadante de 1000 x g, es fraccionado por centrifugación diferencial; f.c.=6.9 (0.4 para el peso seco/peso húmedo de levadura). tiempo de agitación segundos			
	extracto entero	$Q_{\text{fumarato}}$ precipitado 3500 x g	$Q_{\text{fumarato}}$ precipitado 10000 x g	sobrenadante 10000 x g
	10	750	1070	870
	30	905	420	1370
	90	930	41	1460
	Actividad máxima extraída, u/g lev.(peso seco) = 320 $Q_{\text{fumarato}}$ (levadura entera) = 435 (Tabla 10, (3a)).			
Manson y Nossal (15)	Levadura de panadería, fresca, o tratada con nieve carbónica y descongelada, desintegrada durante 10 segundos según (3a); el extracto entero, sobrenadante de 1000 x g, se fracciona por centrifugación diferencial; f.c.=6.9.			
	material de partida	extracto entero, $Q_f$	precipitado 10000 x g, $Q_f$	Sobrenadante 10000 x g, $Q_f$
	células frescas	1070	1030	1220
	células congeladas	990	760	1120

(la Tabla continúa en la página sig.)

Tabla III (continuación)

El f.c. = factor de conversión de los resultados originales, obtenidos en condiciones de desaje diversas, al pasarlos a las condiciones de este trabajo: consumo de fumarato 0.025 M en fosfato 0.1 M pH 7.0, a 30°C. Para obtener los factores de conversión se han usado los resultados de Passy<sup>(17)</sup> sobre velocidades de la reacción directa inversa, e influencia del pH, de la temperatura, y de diversos autores, sobre las mismas; también se utilizó el coeficiente de extinción molar del fumarato a 240 m $\mu$  hallado por Alberty y col.<sup>(18)</sup>. Así se ha estimado los siguientes factores de conversión: fosfato 0.01 M a 0.1 M, f.c.=1.0; CO<sub>2</sub>HNa 0.0166 M pH 7.3 (Krebs y col.<sup>(5)</sup>) a fosfato 0.1 M pH 7.0 (estimado por analogía con otros aniones) f.c.=2.2; L-malato pH 7.0 a fumarato pH 7.0, f.c.=2.6; L-malato pH 7.3 a fumarato pH 7.0, f.c.=2.0; conversión de temperatura, 20°C a 30°C, f.c.=1.6; 25°C a 30°C, f.c.=1.25 (para fumarato); peso seco de la levadura (estimado) f.c.=0.40 (g/g levadura fresca).

El f.c. para cada autor es el producto de los f.c. parciales detallados correspondientes al pasaje desde sus condiciones de desaje, a las de este trabajo.

te 90 seg., cuyas distintas fracciones, sedimentables o no, totalizaban sumadas un  $Q_{\text{fumarato}} = 435$ . Esto nos hace inferir que las condiciones para que se revele totalmente la actividad enzimática presente, requirieron una solubilización completa de la enzima. Nossal ha encontrado como evidencia adicional de esto, el hecho paradójico que la actividad de un extracto acelular original es menor que la suma de las actividades de las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial, y menor que la actividad del mismo extracto reconstituido con esas fracciones (siendo esa diferencia del orden del 10 - 25%). Esta actividad intracelular potencial es muy alta comparada con las de otras enzimas relacionadas metabólicamente con la fumarasa<sup>(2a, 3a)</sup>; la gran capacidad de transformar ambos sustratos, uno en otro, hace pensar que en condiciones fisiológicas las cantidades intracelulares de ambos metabolitos están probablemente en un quasi equilibrio.

La eficiencia de la extracción:

Los resultados publicados hasta ahora sobre extractos de levadura con actividad de fumarasa, han sido obtenidos por desintegración mecánica de ésta. Por este método se ha llegado a extraer hasta 325 unidades/ g levadura (peso seco) (Nossal<sup>(3a)</sup>), con actividades específicas en la solución de  $Q_f = 1460$ , y Hirsch<sup>(2)</sup> por un procedimiento análogo ha obtenido extractos con  $Q_f = 2310$ . Nuestras preparaciones se comparan favorablemente con esos extractos, puesto que con un rendimiento en la extracción del 85% del de Nossal, se ha llegado a actividades específicas 2.2 veces mayores que las suyas, y 1.4 veces las de Hirsch. El factor que condiciona esto es el método de extracción (hecha abstracción de las posibles diferencias metabólicas entre cepas de levadura distintas): la ruptura mecánica de las estructuras celulares solubilizaría proteínas que no se obtienen en solución cuando se produce la autólisis de esas estructuras. Aún cuando no se conocen bien los mecanismos de labilización y solubilización de los componentes celulares, esa diferencia es fácilmente comprensible si se piensa en la inespecificidad de los métodos mecánicos frente a los fenómenos de desintegración enzimática que tendrían lugar en la autólisis durante la extracción de nuestros preparados.



Capítulo III - Referencias bibliográficas

- (1) Schneider, J. G. y Hogoboom, G. H., Ann. Rev. Biochem., 25, 201 (1956).  
Morton, R. K., en Colowick - Kaplan "Methods in Enzymology", New York (1955), Vol. I, pág. 27.
- (2) Hirsch, H. F., Biochim. Biophys. Acta, 9, 674 (1952).
- (2a) Slonimski, P. P. y Hirsch, H. F., Compt. Rend., 235, 914 (1952); Chem. Abs.
- (3) Nossal, P. M., Biochim. Biophys. Acta, 11, 596 (1953)
- (3a) Nossal, P. M., Biochem. J., 57, 62 (1954).
- (4) Mantano, A. S. y Still, J. L., Arch. Biochem. Biophys., 59, 383 (1955).
- (5) Krebs, H. A., Gurin, S. y Eggleston, L. V., Biochem. J., 51, 614 (1952).
- (6) Buchner, E., Buchner, H. y Hahn, M., "Die Zymasegärung" (1903).
- (7) Lynen, F. y Naciullah, N., Liebigs Ann., 541, 203 (1939).
- (8) Lynen, F., Liebigs Ann., 554, 40 (1943).
- (9) Jacobson, K. P., Biochem. Z., 234, 401 (1931).
- (10) Quastel, J. H., Biochem. J., 25, 898 (1931).
- (11) Penrose, E. y Quastel, J. H., Proc. Royal Soc. London B, 107, 168 (1930; citado en(11)).
- (12) Yamamura, Y. y Akabori, Sh., Congr. Intern. Biochim. Resúms comuns. 2<sup>o</sup> Congr. Paris 1952, 45; Chem. Abs.
- (12a) Yamamura, Y., Fusonose, F., Nagai, S. y Kusonose, E., J. Biochem. (Japón) 41, 513 (1954); Chem. Abs.
- (13) Fogut, . y Podolski, E. P., Biochem. J., 55, 800 (1953).
- (14) Frieden, G., Bock, R. H. y Alberty, R. A., J. Am. Chem. Soc., 76, 2482 (1954).
- (15) Hansen, E. A. y Nossal, P. M., Biochim. Biophys. Acta, 16, 502 (1955).
- (16) Alberty, R., Buchner, E. y Rapp, R., Ber., 35, 2376 (1902).
- (17) Cassey, V., Biochem. J., 53, 67, 72 (1953).

- (18) Alberty, R. A., Massey, V., Frieden, C. y Fuhlbrigge, A. R., J.  
Am. Chem. Soc., 76, 2485 (1954).
- (19) Clutterbuck, P. M., Biochem. J., 22, 1193 (1928).
- (20) Linszeller, A., Biochem. J., 35, 495 (1941)

## CAPITULO IV

### PURIFICACION DE LA FUMARASA

El interés despertado por la fumarasa estimuló sucesivos intentos de purificación de la misma, que condujeron finalmente a la cristalización de la enzima obtenida de corazón de cerdo.

En 1923 Tsuchihashi<sup>(1)</sup> purificó parcialmente la enzima de hígado humano por precipitación con sulfato de amonio. Posteriormente (1941) los estudios de la escuela de Szent György sobre la función de los ácidos C<sub>4</sub> dicarboxílicos en el metabolismo celular, llevaron a Laki y Laki<sup>(2)</sup> a una considerable purificación de la enzima de corazón de vacuno: obtenían un producto cristalino con una pureza 28 veces mayor. Scott<sup>(3)</sup> estudió este método de preparación, y concluyó que los cristales no eran de fumarasa; ésta era arrastrada por los primeros, y posteriores refraccionamientos con sulfato de amonio permitían purificar aún más la actividad que se obtenía como precipitado amorfo.

En 1951 Massey anunció haber obtenido cristales de fumarasa de corazón de cerdo<sup>(4)</sup>, por un método sencillo y que daba excelente rendimiento: la enzima cristalina tenía una pureza 2100 veces mayor que el extracto inicial. Posteriormente a este resultado, Alberty y col.<sup>(5)</sup> también obtuvieron la enzima cristalina de la misma fuente, con un método de preparación aún más sencillo, si bien el rendimiento no llegaba al de Massey.

La fumarasa de otros organismos no ha sido purificada todavía. En ese sentido, aún cuando las propiedades de la enzima de esos orígenes sean semejantes a las de la enzima de Massey, la distinta naturaleza y variable complejidad de los diversos extractos plantean problemas de purificación diferentes de los que fueron resueltos en el corazón de cerdo. Tal ocurre en la levadura, en la que hay que buscar otros caminos para purificar la enzima.

En lo que sigue se describen los estudios sobre purificación llevados a cabo con nuestros extractos, y los ensayos previos sobre la estabilidad de la fumarasa en los mismos.

Estabilidad de la enzima: estudios preliminares en los extractos originales.

Con el objeto de establecer la resistencia de la enzima a condiciones ambientales extremas, y fijar así límites de seguridad para la buena conservación de la actividad en las operaciones y experiencias que se describen más adelante, hemos sometido los extractos a diversos tratamientos a pH y temperaturas variados, observando posteriormente la actividad residual.

A - Conservación de la enzima: La actividad de las soluciones enzimáticas se puede preservar congelándolas a  $-18^{\circ}\text{C}$ , y en este estado se conserva indefinidamente, con muy pequeñas pérdidas: una fracción de actividad 120 u/ml y  $Q_f = 4000$ , después de permanecer 7 meses en la congeladora perdió 8% de su contenido enzimático. La conservación de las soluciones a  $2 - 5^{\circ}\text{C}$  no es tan eficiente, y en dos o tres semanas se producen inactivaciones considerables (debidas quizás a desarrollos bacterianos). A pH 7 la enzima tolera bien las temperaturas hasta de  $30^{\circ}\text{C}$  por períodos de varias horas, lo que permite trabajar a temperatura ambiente

B - Estabilidad de la enzima a pH diversos: El intervalo óptimo de pH para la conservación de la actividad a  $5^{\circ}\text{C}$  es de 6.5 - 8; a medida que las condiciones ambientales se alejan de ese intervalo, las pérdidas de actividad aumentan. Se han realizado experiencias de acidificación de los extractos, descritas en la Tabla I A, en las que a temperatura ambiente se llevaba alícuotas de un extracto a diversos pH, neutralizándolos a los 30 minutos, centrifugando y midiendo la actividad remanente en el sobrenadante. Los resultados indican que por debajo de pH 6 hay inactivaciones significativas: a pH 5.8 se ha perdido 13% de actividad respecto de la inicial a 6.4, y a pH 5.2 la pérdida llega a 43%; en el Gráfico I se puede ver que la curva de actividad remanente cae en el lado ácido con pendiente cada vez mayor (una experiencia similar con un extracto menos activo dió puntos a

Tabla I

A.- Estabilidad de la enzima en el extracto original,  
a diversos pH ácidos

En dos experimentos diferentes, los extractos A y B son acidificados a diversos pH, a temperatura ambiente; a los 30 minutos se centrifuga y se neutraliza con hidróxido de amonio 4 M. Se mide la actividad de los sobrenadantes: en ambos experimentos el resultado para pH 5.8 se toma como actividad relativa 100, y se refieren al mismo las otras actividades obtenidas.

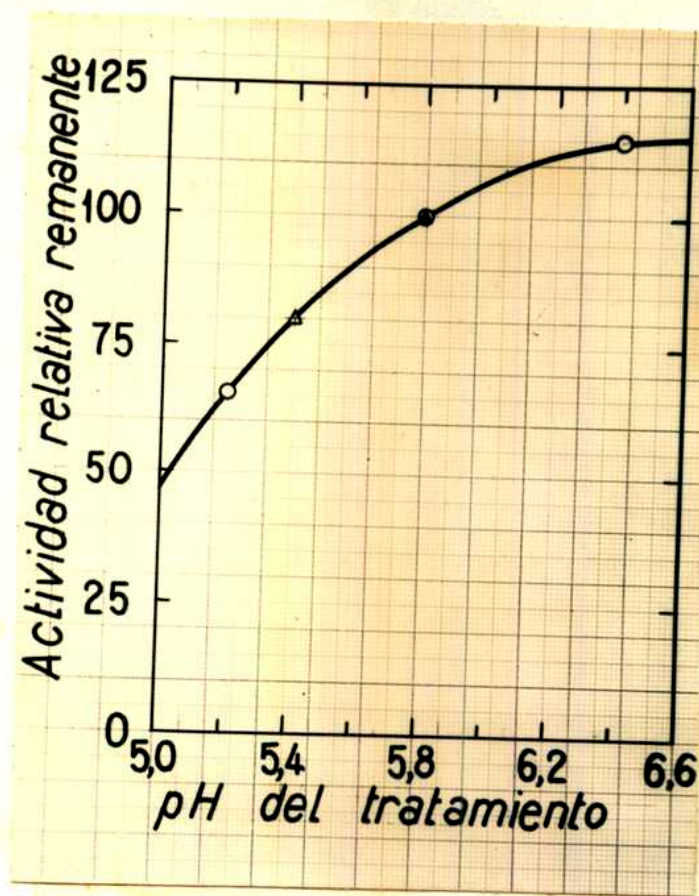
Extracto	pH alcanzado	Actividad remanente, u/ml	$Q_{\text{fumarato}}$	Actividad relativa (A <sub>pH 5.8</sub> =100)
A	6.4	23	1470	115
	5.8	20	1800	100
	3.2	13	1450	65.5
B	5.8	8.2	580	100
	5.4	6.5	490	80

B.- Estabilidad de la enzima purificada en medio alcalino

Una preparación de enzima purificada, de actividad = 32 u/ml y de  $Q_{\text{fumarato}} = 14200$ , en un medio de fosfatos 0.04 M, se lleva al pH indicado con hidróxido de amonio 4 M: no hay formación de turbidez o precipitado. Inmediatamente se vuelve a ajustar el pH a neutralidad, con ácido cítrico 1 M, y se mide la actividad remanente.

pH alcanzado	Actividad remanente	
	unidades	% del inicial
7.0	160	100
9.5	95	59

Gráfico I



Estabilidad de la enzima en medio ácido

Resultados de la Tabla I. Los extractos se llevan a diversos pH durante 30 minutos, a temperatura ambiente. La actividad remanente después del tratamiento se expresa como % de la actividad del mismo extracto a pH 5.8. Extracto A: ○ .- Extracto B: ▲ .-

pH 5.8 y 5.4 que se superponen muy bien en la curva anterior) y la acidificación hasta pH 4 - 5 conduce a una inactivación completa (Tabla II) que puede ser aminorada por la presencia de sulfato de amonio concentrado. Paralelamente a esas pérdidas de actividad se ha observado el enturbiamiento creciente de la solución, y grados de acidez alta provocan la aparición de grumos y coágulos (a pH 4.9 precipita, en una fracción purificada el 44% de la proteína); estos precipitados se solubilizan si inmediatamente de formados se alcaliniza el medio, pese a la inactivación ácida de la fumarasa es irreversible en todos los casos.

En experimentos similares (Tabla I B) en medio alcalino a pH 9.5 se ha observado también una considerable inactivación irreversible de la enzima (41%) pero no se producía ningún precipitado o turbiedad.

C - Estabilidad térmica: Frente a la desnaturalización térmica la enzima presenta su óptimo de estabilidad a pH 6.1 - 6.3. En la Tabla III se dan los resultados de varias experiencias en que el extracto enzimático se calentaba por períodos y a temperaturas y pH diversos. La zona de pH en la que se conserva parte de la actividad es estrecha: tanto a pH 5.8 como a pH 7.0 la inactivación por calentamiento a no más de 55° C, durante 15 minutos, ha sido total.

Los mejores resultados se lograron calentando el extracto en esa forma y en el intervalo ya mencionado de pH 6.1 - 6.3; en esas condiciones se obtiene un precipitado voluminoso de proteína desnaturalizada, y el sobrenadante, totalmente transparente y de color amarillo, posee una actividad por ml entre 45 y 65% de la inicial a pH neutro, con una pureza que puede llegar a 1.5 veces la original. La pérdida de actividad es elevada, y se agrava por el volumen considerable de extracto retenido por el precipitado desnaturalizado: en el extracto B el rendimiento total de actividad fué de 33% de la cantidad inicial de enzima. Parte de las pérdidas se deben al proceso de acidificación de la solución para llegar al pH 6.1 - 6.2 buscado: en

Tabla II

Solubilidad y estabilidad de la enzima en medio ácido  
con y sin sulfato de amonio

La enzima constituida de actividad = 32 u/ml y de  $^{14}C$  fumarato = 14200 se lleva en el pH que se indica, con ácido cítrico 1 M, en un medio con 0.04 M de fosfatos 0.04 M y sulfato de amonio de la saturación. Se centrifuga inmediatamente y se suspende el precipitado en 0.04 M de fosfatos a pH 7.0. El sobrenadante se ajusta a las nuevas condiciones de saturación salina y pH, se centrifuga y se suspende el nuevo precipitado en 0.04 M de fosfatos. Se miden las actividades de los precipitados.

Experiencia: acidificación del medio y posterior agregado del sulfato de amonio.

						Totales recuperados
Sulfato de amonio, sat.	0	0	0	0.4	0.6	---
pH alcanzado	7.0	4.9	3.9	3.9	3.6	
Precipitados: actividad total, u	160	2	0	0	0	2
recuperada % inicial	100	1.2	0	0	0	1.2
proteína recuperada % inicial	100	44	28	6	4	32

Experiencia: agregado de sulfato de amonio y posterior acidificación.

						Totales recuperados
Sulfato de amonio, sat.	0	0.40	0.40	0.60		---
pH alcanzado	7.0	4.8	4.0	3.9		---
Precipitados: actividad total, u	160	2	26.6	1.8		30.4
recuperada % inicial	100	1.2	16	1.1		18.3
proteína recuperada % inicial	100	8.6	76	14.4		99



Tabla III

Inactivación térmica de la enzima en los extractos

El extracto original (A, B, C, o D) se lleva en frío al pH indicado, con ácido cítrico 1 M o hidróxido de amonio 4 M. Se calienta a la temperatura indicada durante 15 minutos, y se enfría rápidamente; se dona la actividad en el sobrenadante lámpido.

Extrac- to	pH al canzado	Activ. en frío u/ml	Q <sub>f</sub> en frío	Temp. alcan- zada °	Activ. remanente en el calentado u/ml % inicial	Q <sub>f</sub> del calentado
A	5.8	8.2	----	55°	0	----
	5.4	6.5	----	55°	0	----
B	6.0	32.5	1870	55°	24	74
	5.5	40	2450	55°	6	15
	7.5	50	2880	55°	0	0
	7.3	45	2450	55°	0	0
B	7.8	42	2170	----	----	----
	6.1	----	----	55°	27	65
	7.8	13	2240	----	----	----
	6.1	----	----	55°	6.5	50
D	.3	50	2450	56°	22.5	45
D <sub>1</sub> <sup>a</sup>	6.3	30.5	2340	55°	19.4	58

<sup>a</sup> El extracto D<sub>1</sub> es el sobrenadante del extracto original D, clarifi-  
cado con gel de fosfato de calcio.

el extracto B la pérdida de enzima en este proceso fué de 28% y de sólo 19% del inicial, en el calentamiento en sí.

Conclusiones: Las condiciones óptimas para la preservación de la actividad durante las diversas manipulaciones de la enzima, requieren una temperatura no mayor de 30°, y un pH de 6.5 - 8.

A temperaturas más elevadas el pH óptimo de conservación se hace menor: 6.1 - 6.3; pero se observan inactivaciones considerables. Los pH bajos, inferiores a 6.3, traen en frío una gradual inactivación irreversible, que se acentúa mucho cerca de pH 5; aún a pH 6.3 se han observado pérdidas grandes de actividad en períodos de varios días de duración. También hay inactivación a pH superiores a 9.

Para la conservación de las diversas preparaciones lo más apropiado es mantenerlas congeladas a -15 a -18° C, preferiblemente a guardarlas en solución a 5° C; la fusión de esas preparaciones no provoca inactivaciones significativas.

### Purificación de los extractos

Los extractos enzimáticos cuya preparación y algunas propiedades se describieron en los capítulos anteriores, son soluciones complejas de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos en un medio de sales inorgánicas -principalmente fosfatos del buffer de extracción- y metabolitos de bajo peso molecular y coenzimas que han difundido del cuerpo celular.

La purificación de la enzima involucra su separación en mayor o menor grado de esos componentes y su concentración en volumen.

Se ha estudiado la aplicación de varios métodos de fraccionamiento a estos extractos, con resultados variables. Merced a los mismos se ha llegado a tener fracciones activas con una pureza de 10 - 12 veces la inicial.

#### a) Desnaturalización térmica diferencial

Basado en los resultados de la Tabla III se había utilizado en las primeras preparaciones una etapa inicial consistente en un calentamiento a 54° durante 15 minutos, a pH 6.2. Se obtenía una purificación de aproximadamente 1,5 veces, con una pérdida de actividad del 40 - 50%; el extracto quedaba muy clarificado. La poca reproducibilidad de este paso, y la inactivación considerable que implicaba (llegó en varios extractos al 70% de la inicial) aconsejaron abandonar este procedimiento.

#### b) Tratamiento con gel de fosfato de calcio

Con el fin de clarificar los extractos iniciales, oscuros y ligeramente turbios, se introdujo un tratamiento con gel de fosfato de calcio (preparado según Keilin y Hartree<sup>(6)</sup>), que, en las condiciones de trabajo, no adsorbe la enzima y sí arrastra impurezas diversas.

El extracto (a pH 7, en buffer de fosfatos 0.092 M, y con una fuerza iónica mínima  $\mu = 0.20 - 0.25$ ) se mezcla en frío con 0.1 volumen de gel de fosfato de calcio (56.5 mg peso seco/ml); se agita y deja 30 minutos, y se centrifuga. El sobrenadante, que contiene to-

de la actividad inicial, ha aumentado su  $Q_{\text{fumarato}}$  en un 10 - 20% y se ha clarificado notablemente: es un líquido transparente de color amarillo.

En la Tabla IV se dan los resultados de experiencias preliminares realizadas con fracciones activas diversas, y de operaciones de rutina con dos extractos crudos, según se describe más arriba.

Como se puede observar, la recuperación de la enzima en la fracción no adsorbida es prácticamente cuantitativa; esto se debe a la alta concentración de aniones polivalentes (fosfato) que impide la adsorción de la mayoría de las proteínas presentes (Colowick<sup>(7)</sup>). En medios con baja concentración de electrolitos la enzima puede ser totalmente adsorbida por el gel de fosfato de calcio (véase el Apéndice sobre adsorción de la enzima).

### c) Fraccionamientos salinos con sulfato de amonio

El fraccionamiento con sulfato de amonio de extractos activos en diversos estados de pureza (extractos crudos, calentados, tratados con gel de fosfato de calcio, o provenientes de fraccionamientos salinos o con solventes) permitió una apreciable purificación de la enzima, con buenos rendimientos.

Se ha realizado numerosos fraccionamientos, que podemos clasificar en ensayos preliminares, fraccionamientos de rutina, y curvas de precipitación de la actividad de fracciones purificadas.

Métodos experimentales: Se utilizó en la mayoría de los fraccionamientos sulfato de amonio p. a. (C. Erba o Riedel) puesto que con calidades inferiores se observaba una inactivación muy pronunciada de la enzima. La droga se agregaba con agitación, en porciones pequeñas de solución saturada a 5° C (para precipitar volúmenes pequeños) o como sólido bien pulverizado en mortero.

La concentración de sulfato de amonio alcanzada en una operación se expresa como fracción decimal de la saturación total alcanzable: en el caso de aumentarse la concentración salina de  $\underline{v}$  ml de u-

Tabla IV

Tratamiento de los extractos con gel de fosfato de calcio

A - Experimentos preliminares: Se tratan cantidades iguales de un mismo extracto, a pH 6.2 y en frío, con cantidades crecientes de gel de fosfato de calcio; se eluye el precipitado con solución de fosfato 0.1 M pH 7.3 y sulfato de amonio 5%. Extractos A (original calentado), B (original calentado) y C (original). Las actividades y proteínas totales obtenidas se expresan como % de la cantidad inicial.

Extracto tratado:	A		B		C		
Actividad total, u	77		178		68		
Proteína total, mg	28.4		79		43.5		
$\text{Ca}^{++}$ fumarato	3650		3020		2100		
Gel agregado:							
peso seco, mg	18	36	56	112	224	448	56
Volumen final, ml	7.2	7.2	16	16	16	16	3.0
Sobrenadante:							
Actividad total %	93	89	94	84	100	93	98.5
Proteína total %	104	79	85	71	83	76	77
$\text{Ca}^{++}$ fumarato	3300	4050	3400	3600	3650	3720	2680
Purificación, veces	0.9	1.1	1.13	1.2	1.21	1.23	1.27
Fluido:							
Actividad total %	0	3	0.5	0.7	3	6	---

B - Preparaciones de rutinas: el extracto original a pH neutro y en frío se trata con 0.1 volumen de gel de fosfato de calcio (56.5 mg/ml de residuo seco), se centrifuga y desecha el precipitado. Extractos A y B (respectivamente): volúmenes, 3300 y 490 ml; actividades totales, 262000 y 33000 u; proteínas totales, 148000 y 19000 mg;  $\text{Ca}^{++}$  fumarato, 2380 y 2330. La actividad y proteína totales obtenidas se expresan como % del inicial.

Extracto tratado	A	B
Gel agregado, peso seco/proteína total, mg/mg	0.13	0.14
pH del tratamiento	7.1	7.4
Sobrenadante:		
Actividad total %	100	97.5
Proteína total %	87	88
$\text{Ca}^{++}$ fumarato	2730	2560
Purificación, veces	1.15	1.10

na solución de saturación  $A$  por agregado de  $v_s$  ml de solución saturada de sal (saturación 1.00), la saturación final de la mezcla es:

$$S = \frac{v \times A + v_s \times 1.00}{v + v_s}$$

En donde se supone que el volumen final de la mezcla es la suma de los volúmenes de los componentes, y se desprecian efectos de contracción de volumen.

Cuando hemos empleado droga sólida para aumentar el grado de saturación salina de la solución, hemos utilizado para el cálculo de la saturación resultante el nomograma de Dixon<sup>(8)</sup>.

En las precipitaciones se controlaba el pH, agregando, paulativamente al sulfato de amonio, solución de amoníaco concentrado hasta el pH deseado (medido éste con indicadores).

La suspensión del precipitado en el líquido madre se dejaba reposar en frío (5° C) entre 30 minutos y una noche, y se centrifugaba a 3000 - 4000 rpm; cuando fué posible, la centrifugación se hizo a 5° C.

El precipitado de cada operación se disolvía en una pequeña cantidad de buffer de fosfatos, y se dializaba contra solución diluida de buffer de fosfatos a 5° C, durante 12 o más horas. La solución resultante generalmente se clarificaba centrifugando a alta velocidad (10000 - 12000 rpm) y se guardaba el sobrenadante a -18°, previa medida del volumen y toma de muestra.

Resultados: En los fraccionamientos tanto de extractos crudos como de fracciones purificadas por calentamiento y adsorción, la actividad precipita a pH 7 entre 0.40 y 0.60 saturación de sulfato de amonio (Tabla V).

Los ensayos de precipitación a pH variados no dieron diferencias de comportamiento significativas, dentro del intervalo de estabilidad de la enzima; cuando el pH era 5 o menor, las pérdidas de actividad por inactivación llegaban a ser totales.

Estos resultados se vieron confirmados en los fracciona-

Tabla V

Fraccionamientos con sulfato de amonio: ensayos preliminares

Los resultados de actividades totales de las fracciones obtenidas se expresan como % del total inicial.

Fraccionamiento N° 1: Tres porciones de un extracto original calentado a 55°C y tratado con gel de fosfato de calcio (actividad, 17 u/ml; proteína, 10.4 mg/ml; fumarato, 2220, y volumen, 7.0 ml cada una) se fraccionan a pH 6, 7 y 8 respectivamente. El pH se ajusta con ácido cítrico 1 M o hidróxido de amonio 4 M. Las precipitadas se disuelven en fosfato 0.1 M pH 7.

pH	Sorte de saturación	Actividad total %	Q <sub>fumarato</sub>	Purificación veces
6.0	0.0-0.4	0	0	0
	0.4-0.6	88	7950	3.6
	0.6-1.0	2.9	170	0.08
7.0	0.0-0.4	0	0	0
	0.4-0.6	92	8300	3.7
	0.6-1.0	2.0	113	0.05
8.0	0.0-0.4	0	0	0
	0.4-0.6	92	7300	3.3
	0.6-1.0	0	0	0

Fraccionamientos N° 2 y 3: Dos extractos (2 y 3) calentados y clarificados, análogos al anterior (actividades, 19 y 10.5 u/ml; Q<sub>fumarato</sub>, 1860 y 2100; volúmenes, 80 y 378 ml, respectivamente) se fraccionan en frío, a pH 7.0.

Fraccionamiento N°	Sorte de saturación	Actividad total, %	Q <sub>fumarato</sub>	Purificación veces
2	0.0-0.4	1	950	0.5
	0.4-0.6	65	5000	2.7
3	0.0-0.4	4.2	1560	0.7
	0.4-0.6	100	3260	1.55

Fraccionamiento N° 9: Un extracto original no purificado (actividad, 42 u/ml, Q<sub>fumarato</sub>, 2180, volumen, 30 ml) se fracciona a pH 7.0 con solución saturada de sulfato de amonio.

Sorte de saturación	Actividad total, %	Q <sub>fumarato</sub>	Purificación veces
0.0-0.4	5.8	630	0.3
0.4-0.6	81.5	5350	2.5
1.0		0	0

mientos de rutina (Tabla VI), que se realizaban a pH 7.0 y a 5° C, y en los que la actividad se recuperaba en la fracción precipitada a 0.40 - 0.60 saturación, con rendimiento del 80 - 90%; la pureza de la fracción activa era 1.8 - 2.3 veces la inicial. Para obtener buenos rendimientos el pH de la preparación debe mantenerse en todo momento alrededor de 7, y es conveniente limitar el tiempo de diálisis a un día, pues en otras condiciones hay peligro de inactivación (Véase por ejemplo en la Tabla VI el fraccionamiento N° 15).

En algunos fraccionamientos se pretendió aumentar la relación de purificación estrechando el corte de saturación: entre 0.45 y 0.60 de saturación precipitaba 78% de la actividad, y la pureza (en el experimento N° 14) aumentaba 2.3 veces. Este modo de operar no es conveniente en un primer fraccionamiento, en que los límites de la curva de precipitación se amplían por interacción con las otras sustancias de la mezcla compleja que acompaña a la enzima.

Tampoco es útil ensanchar ese intervalo de saturación (como se hiciera en los experimentos N° 15 y 18 esperando rendimientos de enzima mayores) porque cae la pureza de la fracción activa resultante.

Combinando la clarificación con gel de fosfato del extracto original, y dos fraccionamientos sucesivos con sulfato de amonio, el primero (N° 18) a pH 7.0 entre 0.40 y 0.65 y el segundo (N° 19) a pH 7.5 - 8.0 entre 0.45 y 0.60 de saturación salina, se obtuvo una preparación activa con un rendimiento total de 63% de la actividad y una purificación de 3 veces respecto del extracto original.

#### Curvas de precipitación de la enzima en soluciones de sulfato de amonio:

Los intervalos de saturación en que tiene lugar la precipitación de la actividad, de sus soluciones de sulfato de amonio, dependen de las sustancias que la acompañan, especialmente proteínas y ácidos nucleicos. En la Tabla VII y el Gráfico II se ha descrito los resultados de fraccionamientos salinos detallados de preparaciones de distinta pureza inicial:  $Q_f = 3880$  (Fraccionamiento N° 4, pH 7);



Tabla VI

Fraccionamientos con sulfato de amonio  
resultados de preparaciones de rutina

Se trabaja con extractos originales tratados con gel de fosfato de calcio (extractos clarificados) excepto donde se indica, agregando el sulfato de amonio sólido, a 5°C y con agitación mecánica, y ajustándose el pH a 7.0 con hidróxido de amonio 4 M. Los precipitados se disuelven en fosfato 0.01 M pH 7.0, y se dializan según se indica. Los resultados de actividades totales de las fracciones obtenidas se expresan como % del total inicial.

Fraccionamiento N° 13. extracto clarificado (actividad, 36 u/ml; proteína, 17.6 mg/ml;  $Q_{\text{fumarato}}$ , 2750; actividad total, 37200 u). El precipitado activo se dializa en frío una noche, contra fosfato 0.01 M pH 7.0.

Corte de saturación	Actividad total %	$Q_{\text{fumarato}}$	Purificación veces
0.4-0.6	91	6300	2.2

Fraccionamiento N° 14. extracto clarificado (actividad, 66 u/ml, proteína, 30 mg/ml;  $Q_{\text{fumarato}}$ , 3100; actividad total, 134000 u). El primer precipitado, 0.0-0.45 sat., se lava con solución de sulfato de amonio 0.45 sat. a pH 7.0, y el lavado se reúne con el primer sobrenadante. El corte activo se dializa a 5°C primero contra agua destilada (diálisis rápida con agitación) y luego contra fosfato 0.01 M pH 7.0.

Corte de saturación	Actividad total %	$Q_{\text{fumarato}}$	Purificación veces.
0.45-0.60	78	7200	2.3

Fraccionamiento N° 15. extracto clarificado (actividad, 77 u/ml;  $Q_{\text{fumarato}}$ , 2730; actividad total, 262000 u). Se lava el primer precipitado con solución de sulfato de amonio 0.40 sat. y se procede como en el fraccionamiento anterior. Se dializa las fracciones obtenidas contra fosfato 0.01 M pH 7.0 y luego contra fosfato 0.01 M pH 6.3.

Corte de saturación	Actividad total %	$Q_{\text{fumarato}}$	Purificación veces
0.00-0.40	4.5	980	0.35
0.40-0.62	68 *	3900 *	1.4 *

\* El bajo rendimiento y pureza se debe al sustrato a una inactivación durante la preparación del sustrato.

(continúa la Tabla VI)

Tabla VI (continuación)

Fraccionamiento N° 18: extracto clarificado (actividad, 64 u/ml; proteína, 33.6 mg/ml;  $Q_{\text{fumarato}}$ , 2560; actividad total, 31400 u). Se lava el primer precipitado como en el fraccionamiento N° 14; se dializan las fracciones obtenidas contra fosfato 0.005 M pH 7.0.

Corte de saturación	Actividad total %	$Q_{\text{fumarato}}$	Purificación veces
0.00-0.40	8	1290	0.5
0.40-0.65	86	4750	1.85

Fraccionamiento N° 19: fracción precipitada entre 0.40-0.65 sat. del fraccionamiento N° 18 (actividad, 150 u/ml; proteína, 42.4 mg/ml;  $Q_{\text{fumarato}}$ , 4750; actividad total, 26400 u). Se trabaja a pH 8; los precipitados suspendidos en agua destilada se dializan exhaustivamente contra fosfato 0.005 M pH 7.0.

Corte de saturación	Actividad total %	$Q_{\text{fumarato}}$	Purificación veces
0.00-0.45	14.5	3650	0.8
0.45-0.60	78	7050	1.5

## Tabla VII

### Estudios sobre la curva de precipitación de la enzima en soluciones de sulfato de amonio

Los resultados de actividades y proteínas totales de las fracciones obtenidas se expresan como % de los totales iniciales.

Fraccionamiento N° 4. Una preparación precipitada entre 0.4-0.6 saturación de sulfato de amonio (actividad, 54 u/ml; proteína, 18.7 mg/ml;  $Q_{\text{fumarato}}$ , 3880; actividad total, 3950 u) se fracciona a pH 3 con solución saturada de sulfato de amonio. Los precipitados se disuelven en fosfato 0.1 M pH 7.0; el último sobrenadante a 0.70 sat. se mide como tal.

Corte de saturación	Actividad total %	Proteína total %	$Q_{\text{fumarato}}$
0.00-0.40	7.3	11.6	2450
0.40-0.45	21	10	8250
0.45-0.50	30	8.2	14300
0.50-0.55	34	15.3	8570
0.55-0.60	2.7	21.2	500
0.60-0.65	0.2	15	47
0.65-0.70	0	9.3	0
sobrenadante de 0.70 sat.	0	8.5	0
suma de las fracciones obtenidas	95.2	99.1	---

(continúa)

Tabla VII (continuación)

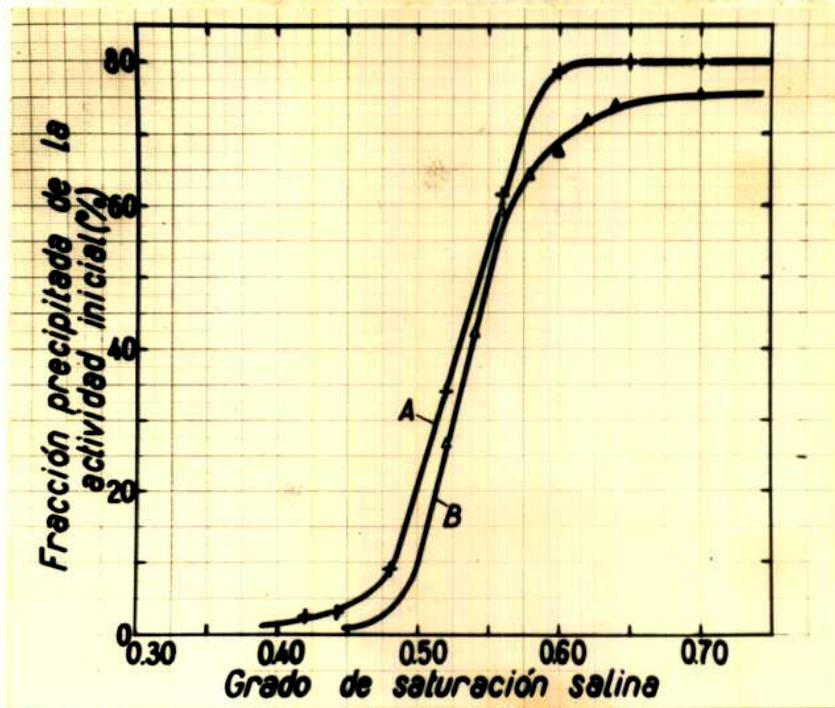
Fraccionamiento N° 12: Una preparación purificada por fraccionamiento con acetona (actividad, 130 u/ml; proteína, 14.0 mg/ml, Q<sub>fumarato</sub>, 12500; actividad total, 12400 u) se fracciona a pH 8 y 5°C con sulfato de amonio sólido. Los precipitados se disuelven y dializan con fosfato 0.01 M pH 7.0.

Corte de saturación	Actividad total %	Proteína total %	Q <sub>fumarato</sub>
0.00-0.42	2.5	4.5	6900
0.42-0.44	0.2	0.4	6750
0.44-0.48	6.4	8.2	9600
0.48-0.52	25	14.9	20800
0.52-0.56	27.6	11.6	29500
0.56-0.60	17	11.9	20600
0.60-0.65	1.5	7.8	2360
0.65-0.70	0	4.3	0
0.70-0.75	0	1.6	0
sobrenadante de 0.75 sat.	0	1.0	0
suma de las fracciones obtenidas	80.2	66.2	---

Fraccionamiento N° 13: El corte 0.52-0.56 sat. del fraccionamiento anterior (N° 12) (actividad, 670 u/ml; proteína, 27.2 mg/ml; Q<sub>fumarato</sub>, 33300; actividad total, 2350 u) se fracciona a pH 6 y 5°C con solución saturada de sulfato de amonio. Hasta 0.48 sat. aparece una turbidez no sedimentable; el primer precipitado se obtiene entre 0.48-0.52 sat. Los precipitados se disuelven y dializan con fosfato 0.01 M pH 7.0.

Corte de saturación	Actividad total %	Proteína total %	Q <sub>fumarato</sub>
0.00-0.48	turbidez no sedimentable		---
0.00-0.48-0.52	26.5	24.2	36100
0.52-0.54	15.6	13.6	38500
0.54-0.56	17	14.8	38000
0.56-0.58	5.4	6.8	26000
0.58-0.60	3.2	6.8	15500
0.60-0.62	4.3	8.6	16700
0.62-0.64	1.8	4.9	12200
0.64-0.70	1.8	6.5	9500
suma de las fracciones obtenidas.	75.6	86.2	---

Gráfico II



Precipitación de la fumarasa en soluciones de sulfato de amonio

Resultados de la Tabla VII: fracción de la actividad inicial que precipita al alcanzar el grado de saturación indicado.

Curva A, : fraccionamiento N° 12, a pH 8.

Curva B, : fraccionamiento N° 13, a pH 6.

$Q_f = 12500$  (Fraccionamiento N° 12, pH 8, Curva A) y  $Q_f = 33300$  (Fraccionamiento N° 13, pH 6, Curva B).

Se puede observar que el efecto más visible del aumento de pureza de la preparación, es el corrimiento de la curva de precipitación hacia las concentraciones salinas crecientes: con una pureza baja el intervalo de precipitación es de 0.40 - 0.55 saturación; al utilizar fracciones iniciales más puras, la actividad precipita entre 0.47 - 0.60. Además se puede ver un ligero estrechamiento de la banda de precipitación y la pendiente del mismo tiende a aumentar (sobre todo en la Curva B). Se observa también (comparando las curvas A y B) la escasa influencia del cambio de pH (8 y 6 respectivamente) en la solubilidad de la enzima en esas soluciones.

Esta correlación de los resultados con la pureza del preparado inicial se explica porque con el aumento de esta última, disminuyen los fenómenos de coprecipitación y adsorción en precipitados, debidos a las interacciones de los componentes del complejo sistema en que se encuentra la fumarasa.

En el último de los fraccionamientos mencionados (N° 13, Curva B) la pureza de las fracciones más activas obtenidas, no aumentó grandemente respecto de la inicial: se llegó a  $Q_f = 38000$  para el punto 0.52 - 0.56 saturación salina, con una purificación de 1.14 veces la de partida. Esto nos indica que ese material ya no es susceptible de purificación mediante los fraccionamientos con sulfato de amonio. Incidentalmente, la fracción de  $Q_f = 38000$  fué la más pura de las obtenidas en este trabajo: su relación de pureza era 12.5 veces mayor que la del extracto original con el que se preparó ( $Q_f = 3100$ )

#### d) Fraccionamientos con solventes orgánicos

El método de precipitación fraccionada de proteínas con solventes orgánicos, en frío y con baja fuerza iónica, fué aplicado a diversas preparaciones activas purificadas, provenientes de fraccionamientos con sulfato de amonio.

Métodos experimentales: Los ensayos realizados pueden ser divididos en experiencias preliminares y estudios detallados.

Las primeras se realizaron con un equipo precario, consistente en una centrífuga común de laboratorio, cuya carcasa, con una aislación térmica exterior, se cubría en su parte inferior con nieve carbónica desmenuzada. Las centrifugaciones se realizaban entonces a temperaturas muy bajas, que podían llegar a  $-20^{\circ}$  C, y que paulatina-mente subían hasta  $-5^{\circ}$  y aún  $0^{\circ}$  al final de la operación. El ambiente interior de la centrífuga era muy rico en anhídrido carbónico, por lo que se tenía que tapar los tubos para evitar la acidificación de su contenido. En algunos experimentos no fué posible evitar el congelamiento parcial de los tubos, con su consecuencia de la precipitación del contenido en condiciones no controladas de concentración de sol-vente. A pesar de todo esto algunos de estos fraccionamientos con ace- tona dieron indicaciones útiles sobre el comportamiento de las prepa- raciones de estos tipos de ensayos; en la Tabla VIII se ordenan esos resultados, que fueron obtenidos de la siguiente manera:

El preparado activo, generalmente en un medio de buffer de fosfatos diluido (0.01 M, pH 7.0) se enfría hasta cerca de su punto de congelación ( $0^{\circ}$  -  $-1^{\circ}$ ). Se le agrega con agitación, y enfriando, la acetona a  $-18^{\circ}$ , en un volumen medido; se controla y corrige el pH, con indicador y amoníaco, y se centrifuga a 3000 - 3500 rpm durante 15 - 30 minutos. En todas estas operaciones (salvo la centrifugación) se cuida de mantener la temperatura al mínimo por encima del punto de congelamiento de la mezcla. El precipitado se disuelve rápidamente en buffer de fosfatos 0.01 M, pH 7, y se dializa contra el mismo, en frío.

Al sobrenadante, mantenido en frío, se le vuelve a agregar acetona helada con la misma técnica anterior, para recoger una nueva fracción.

La concentración de acetona se expresa como volumen de solvente % volumen total, y se calcula con la siguiente fórmula:

### Tabla VIII

#### Fraccionamientos con acetona: ensayos preliminares

Experiencias realizadas con la centrífuga enfriada por nieve carbónica: la temperatura oscilaba en un intervalo de  $-10^{\circ}$  a  $-15^{\circ}\text{C}$ . Los resultados de actividades totales de las fracciones obtenidas se expresan como % del total inicial.

Fraccionamiento N° 1: Una preparación precipitada entre 0.40-0.55 saturación de sulfato de amonio, y sin dializar (actividad, 30 u/ml; proteína, 3.8 mg/ml;  $Q_{\text{fumarato}}$ , 10500; actividad total, 300 u) se fracciona con acetona, corrigiendo el pH con hidróxido de amonio 4 M. Los precipitados se disuelven en fosfato 0.01M pH 7.

Condiciones de precipitación			Actividad total %	$Q_{\text{fumarato}}$
Intervalo acetona % v/v	pH final	Temp. $^{\circ}\text{C}$		
0.0-32.5	7.0	-3	3.8	4100
32.5-44.0	6.3	-3	21	10100
44.0-51.0	5.6	-6	52	21200
51.0-59.0	7.4	-11	0	0
59.0-68.0	7.3	-6	0	0
68.0-78.0	7.3	-6	0	0

Fraccionamiento N° 2: Se realizan dos fraccionamientos paralelos, a pH 6 y 7.6 respectivamente, sobre una preparación precipitada entre 0.40-0.55 saturación de sulfato de amonio, dializada contra fosfato 0.001 M pH 7 (actividad, 12 u/ml; proteína, 2.8 mg/ml;  $Q_{\text{fumarato}}$ , 5800; actividad total, 120 u). Los precipitados se suspenden y dializan con fosfato 0.01 M pH 7.

Condiciones de precipitación		Actividad total %	$Q_{\text{fumarato}}$
pH	intervalo acetona % v/v		
6.1-6.2	0-30	23	5400
	30-40	79	19000
	40-50	10	7300
	50-60	6	4000
7.6	0-30-40-50	0	0
	50-60	5	3000

(continúa la Tabla VIII)



Tabla VIII (continuación)

Fraccionamiento N° 3. Se utiliza una preparación precipitada entre 0.40-0.55 sat. de sulfato de amonio, dializada (actividad, 27 u/ml, proteína, 4.7 mg/ml; Q<sub>fumarato</sub>, 7700; actividad total, 1480 u).

Condiciones de precipitación		Actividad total %	Q <sub>fumarato</sub>
pH final	intervalo acetona % v/v		
7.9	0-30	3	7200
6.0	30-40	16	11500
6.1	40-50	53	19400

Fraccionamientos N° 5 y 6. Se utilizan sendas preparaciones 5 y 6, precipitadas entre 0.4-0.6 sat. de sulfato de amonio, y dializadas contra fosfato (actividades, 166 y 175 u/ml; proteínas, 42.2 y 41 mg/ml; Q<sub>fumarato</sub>, 5050 y 5700; actividades totales, 13300 y 14000 u, respectivamente).

Preparación	Condiciones de precipitación		Actividad total %	Q <sub>fumarato</sub>
	intervalo acetona % v/v	pH final		
5	0-30	6.7	6.6	4150
	30-50	6.7	65	8400
6	0-30	6.4	11	4200
	30-50 †	7.0	38 †	10800

† El bajo rendimiento de la fracción 30-50 en el fraccionamiento N° 6 se debió a la rotura de varios tubos durante su centrifugación.

$$\text{Acetona \% (v/v)} = \frac{v_1 \times \text{Ac}_1 + v_2 \times 100}{v_1 + v_2}$$

en donde  $v_1$  = volumen de la fracción a la que se agrega la acetona  
 $\text{Ac}_1$  = concentración de acetona de dicha fracción, como % (v/v)  
 $v_2$  = volumen de acetona agregado.  
y en la que se supone que no hay contracción de volumen durante la mezcla.

Los estudios detallados se llevaron a cabo en la misma forma que los anteriores, empleando una centrífuga refrigerada International. Se procuró mantener la temperatura de todas las operaciones cercana al punto de congelación, pero cuidando que ésta no tuviera lugar. Se realizaron tres fraccionamientos con acetona y uno con etanol (alcohol de 96° considerado como 100%); la concentración de solvente se calculaba según la expresión dada anteriormente.

Resultados: Tanto los ensayos preliminares (Tabla VIII) como los fraccionamientos detallados con acetona (Tabla IX) e con alcohol, muestran claramente la estrecha dependencia entre la solubilidad de la enzima y el pH del medio, en soluciones con solventes orgánicos. Esta relación se hace muy visible en el experimento N° 2 (Tabla VIII) en que se hacen dos fraccionamientos paralelos con acetona, a pH 6 y 7.6: en tanto que en el primero la actividad precipita mayormente entre 30 - 40% acetona (79% de la actividad inicial) a pH alcalino se obtiene la primera precipitación de actividad (5% de la inicial) entre 50 y 60% de acetona.

En otros fraccionamientos se ha observado también esta tendencia de la enzima a precipitar en concentraciones de solvente mayores, cuando el pH aumenta; en el experimento N° 12 (Tabla IX) se obtiene una considerable separación de la actividad (45% de la inicial) entre 0 - 36% acetona, en el intervalo de pH 5.9 - 6.7 (tuvo lugar una acidificación del medio no controlada); en cambio en los fraccionamientos N° 11 y 13 realizados a pH 7, los precipitados acti-

Tabla IX

Fraccionamientos en acetona: experimentos detallados

Experimentos realizados con una centrifuga refrigerada "International". Los porcentajes de actividades totales de las fracciones obtenidas se expresan como % del total inicial.

Fraccionamiento N° 11: Se trabaja a pH 7.0 y -3 a -5°C, con una preparación precipitada entre 0.40-0.60 sat. de sulfato de amonio, dializada contra fosfato 0.01 M pH 7 (actividad, 188 u/ml; proteína, 39.8 mg/ml; Q<sub>fumarato</sub>, 6300; actividad total, 3300 u).

Intervalo acetona % v/v	Actividad total %	Q <sub>fumarato</sub>	Purificación veces
0-28	0.3	6350	---
29-32	0.7	7100	----
32-38	0.2	1640	----
38-44	46	18700	3.0
44-50	20	11400	1.8

Fraccionamiento N° 12: Preparación inicial precipitada entre 0.45-0.60 sat. de sulfato de amonio, dializada contra fosfato 0.01 M pH 7.0 (actividad, 288 u/ml; proteína, 54 mg/ml; Q<sub>fumarato</sub>, 7200; actividad total, 69000 u). Temperatura, -5 a -8°C.

Intervalo acetona % v/v	pH final	Actividad total %	Q <sub>fumarato</sub>	Purificación veces
0-36	5.9-6.7	45 §	9500	1.3
36-50	7.0	19	10800	1.5

§ La proporción elevada de actividad obtenida en la primera fracción (0-36 % acetona, 45 % actividad) se debe probablemente a la acidificación no controlada (pH 5.9) que tuvo lugar paralelamente a la precipitación.

Fraccionamiento N° 13: Se trabaja a pH 6.9-7.1 y -1 a -10°C, con una mezcla de varias preparaciones reunidas (actividad, 190 u/ml; proteína, 37 mg/ml; Q<sub>fumarato</sub>, 6900; actividad total 36000 u), dializada contra fosfato 0.01 M pH 7.

Intervalo acetona % v/v	Actividad total %	Q <sub>fumarato</sub>	Purificación veces
0-30	0	0	---
30-37	0.3	420	----
37-40	0.8	5100	----
40-47	1.0	1100	---
47-53	9	7400	1.06

vos se obtienen por encima de 38 y 47% acetona respectivamente; y en un fraccionamiento con alcohol a pH 8.6, la actividad comienza a precipitar por encima de 50% solvente (3.3% del inicial entre 50 - 60% alcohol).

Esta regularidad de comportamiento pudo observarse sólo cualitativamente: las diferencias entre fraccionamientos con acetona realizados en iguales condiciones de pH y presencia de sales, son muy apreciables; estos cambios de comportamiento sospechamos que pueden deberse a las variaciones de temperatura de uno a otro experimento (hay evidencias cualitativas en este sentido) y a las diferencias en el contenido de ácidos nucleicos para las diversas preparaciones iniciales: éstos últimos, en medios de fuerza iónica y constante dieléctrica reducidas, forman con las proteínas complejos cuya solubilidad difiere de la de éstas, y traen como consecuencia el ensanchamiento y corrimiento de los cortes activos de los fraccionamientos con solventes.

La purificación y el rendimiento en enzima de los fraccionamientos ha sido variable, <sup>pero en general,</sup> a pH inferiores a 7, se recupera en el total de los precipitados un 65 - 75% de la actividad inicial, y un 50% de ésta puede obtenerse con una pureza 2 y media a 3 veces la inicial (fraccionamientos con acetona N° 2, 3 y 11) en las fracciones precipitadas en el intervalo entre 30 - 50% acetona (según el pH de precipitación).

Todos estos resultados aconsejan realizar los fraccionamientos con acetona en un intervalo de pH entre 6.2 - 6.5 (con lo que la actividad precipita a concentraciones de acetona más bajas, y disminuyen los peligros de desnaturalización por el solvente), y separar en cada experimento las fracciones (presumiblemente entre 30- 50% acetona) con mayor actividad y pureza: esto permitiría sortear la ya mencionada falta de reproducibilidad de estas operaciones.

### Discusión y conclusiones sobre la purificación de la enzima

La naturaleza compleja de los extractos acelulares que contienen la fumarasa, exige la combinación de varios métodos para una purificación modesta de la enzima: en cada uno de estos procedimientos las interacciones y perturbaciones de los demás componentes del sistema a purificar se manifiesta de diferente manera, lo que permite su gradual eliminación.

La sucesiva aplicación de los siguientes métodos: clarificación con gel de fosfato de calcio, fraccionamiento con sulfato de amonio entre 0.40 - 0.60 saturación, fraccionamiento con acetona a pH 7.0 entre 38 - 44% (v/v), y dos fraccionamientos sucesivos con sulfato de amonio a pH 7.5 y 6, respectivamente, tomando las fracciones precipitadas entre 0.52 - 0.56 saturación, dió como resultado una preparación 12.5 veces más pura que el extracto original, con un rendimiento total de 2.5% de la actividad inicial (Tabla X).

La consideración de los sucesivos pasos, su rendimiento en actividad y eficacia purificadora, nos indica que a partir del fraccionamiento con acetona, las subsiguientes operaciones no dan purificaciones que justifiquen la baja recuperación de la enzima. Deberá buscarse condiciones de separación más específicas que permitan rendimientos y purezas mayores. En este sentido, los experimentos de adsorción (véase apéndice de este capítulo) y de tratamientos térmicos con protectores (Capítulo V) señalan una posible vía a seguir.

Comparando el esquema anterior con los procedimientos de purificación de Laki y Laki<sup>(2)</sup>, Massey<sup>(4)</sup>, y Alberty y col.<sup>(5)</sup>, se puede ver una semejanza en el comportamiento de las fumarasas de corazón de bucy, de cerdo, y de levadura: son precipitadas de sus soluciones por el sulfato de amonio entre 0.45 - 0.60 saturación, estrechándose el intervalo al aumentar la pureza. Pero la analogía entre ambas purificaciones no va más allá: tanto Massey como Alberty utilizan un primer paso de alto rendimiento en actividad y pureza, consistente en la acidificación del extracto a pH 5.2 en que precipita isoelectricamente la fumarasa, con su separación de gran cantidad de im-

Tabla X

Marcha de la purificación de la enzima

Fracción	Rendimiento actividad % de la inicial	Q <sub>fumarato</sub>	Purificación veces
Extracto original	100	3100	1.00
Extracto clarificado con gel de fosfato de calcio	97	3350	1.08
Fracción precipitada entre 0.40-0.60 saturación de sulfato de amonio	38	6300	2.0
Fracción precipitada a pH 7.0 entre 38-44% acetona (v/v)	40.5	18700	6.0
Fracción precipitada a pH 8 entre 0.52-0.56 saturación de sulfato de amonio	11.2	29500	9.5
Fracción precipitada a pH 6 entre 0.52-0.56 saturación de sulfato de amonio	2.5	38300	12.5

purezas. Como se vió en el capítulo anterior, la fumarasa de levadura no tolera los tratamientos ácidos por su inmediata inactivación, y esto hace desear este tipo de operaciones de purificación.

Otra circunstancia que hace necesario optar por métodos diferentes es la ya referida presencia, en los extractos de levadura, de polisacáridos y sobre todo ácidos nucleicos, abundantes en ese organismo, y cuyas interacciones con las proteínas tornan menos selectivos los métodos de purificación tradicionales.

## Apéndice

### Adsorción de la enzima

La adsorción o la posterior elución de ciertos componentes de sistemas biológicos es un método fructífero que se ha aplicado a la purificación de muchas sustancias naturales, especialmente de tipo proteico, como hormonas, toxinas y enzimas. Su uso se practica hace ya muchos años, y desde los trabajos de Willstätter sobre purificación de la peroxidasa e invertasa mediante el empleo de adsorbentes diversos, ha quedado incorporado definitivamente a la metodología enzimática.

La fumarasa de origen animal ha podido también ser purificada por este procedimiento: en uno de los pasos iniciales de la preparación de Laki y Laki<sup>(2)</sup> a partir de corazón de vacuno, se emplea gel de fosfato de calcio para la adsorción de la enzima, y se la eluye luego con buen rendimiento y aumento de pureza. Davydova<sup>(9)</sup> encuentra que el gel de alúmina es un mejor adsorbente que el de fosfato de calcio para la fumarasa. Massey<sup>(4)</sup> vuelve a adsorber la enzima de corazón de cerdo con gel de fosfato, con una elución de rendimiento cuantitativo y buena purificación; y en un paso posterior por un método de adsorción fraccionada separa de la solución ciertos componentes no activos, enriqueciendo de esta manera la pureza de la preparación, y posibilitando la cristalización de la fumarasa.

Respecto de la fumarasa de levadura, habíamos visto en los estudios sobre purificación de los extractos crudos, que la enzima de los mismos no era adsorbida por el gel de fosfato de calcio.

Con el fin de estudiar las condiciones que harían posible dicha adsorción, y para explorar nuevas vías de purificación, hemos ensayado el uso del gel de fosfato de calcio y el de alúmina " $\chi$ " sobre fracciones activas de diversa pureza, que habían sido dializadas contra soluciones de baja concentración iónica. Los resultados que se describen más adelante indicaron que la enzima es efectivamente adsorbida por los agentes mencionados, en condiciones adecuadas de trabajo,



Y que éste puede constituir un método eficaz para la purificación de la misma.

Métodos experimentales: En una serie de ensayos se han empleado como adsorbentes gel de fosfato de calcio, preparado según Keilin y Hartree<sup>(6)</sup>, y gel de alúmina " $\gamma$ " según Willstätter, preparado de acuerdo a las instrucciones de Bauer<sup>(10)</sup>.

Del gel de fosfato se han utilizado dos preparaciones, una con un período de envejecimiento de un año, y la otra hecha recientemente. El gel de alúmina había madurado durante 4 meses, y la reacción de calentamiento con amoníaco indicaba que se trataba de la modificación " $\gamma$ ".

Los tres geles se acidificaron hasta pH 6.2 con ácido fosfórico: el pH se medía con indicadores en el sobrenadante claro después de centrifugar una porción de gel.

En las experiencias en que así se indica, la porción de gel se centrifugaba y se desechaba el sobrenadante, antes de mezclarlo con el extracto a adsorber. Este procedimiento, recomendado por Colowick<sup>(7)</sup>, tiene por fin evitar la dilución de los sobrenadantes de la adsorción, con el líquido que dispersa al gel.

Las fracciones activas empleadas en estos experimentos provenían de un fraccionamiento con sulfato de amonio: se trata de los cortes 0.0 - 0.45 y 0.45 - 0.60 saturación; ambos fueron dializados exhaustivamente contra buffer de fosfatos muy diluido: el primero tenía una concentración 0.005 M, y el segundo 0.0024 M. Las actividades y purezas de los mismos eran, respectivamente, 74 y 210 u/ml, y  $Q_{\text{fumarato}}$ , 3000 y 6100.

La forma de disponer las operaciones era, en general, la siguiente:

La preparación enzimática se ajustaba en frío a pH 6.2 con ácido fosfórico 1 M; para ello se empleaba como indicador rojo de metilo. Se diluía convenientemente con agua destilada y se mezclaba en frío (5° C) con el adsorbente, previamente centrifugado; se controla-

ba y volvía a ajustar el pH, y se dejaba en frío un lapso de entre 15 minutos y tres horas. Se centrifugaba a 5°; el sobrenadante se guardaba para su dosaje, y el precipitado se eluía suspendiéndolo y centrifugándolo 4 a 5 veces con porciones sucesivas del eluyente elegido, generalmente a temperatura ambiente o a 35 - 40°.

Resultados: 1º) En todos los experimentos ha habido una significativa adsorción de enzima, que en condiciones adecuadas ha llegado a ser total (Tabla XV). Esto ha sido posible por la baja concentración iónica del medio de adsorción (las preparaciones enzimáticas tenían solamente fosfatos por debajo de 0.005 M, y los adsorbentes, el electrolito correspondiente a su solubilidad), y también por emplearse un pH mínimo - pH 6.2- compatible con la estabilidad de la enzima.

2º) El gel de fosfato de calcio envejecido tiene una menor capacidad de adsorción total que el gel fresco y también difieren ligeramente en su capacidad de purificación relativa de la enzima: en los experimentos de las Tablas XI y XV se adsorbe una misma fracción purificada, con geles envejecido y reciente, respectivamente; se observa que mientras el gel envejecido da un eluido de 0.55 mg de proteína y 3.75 unidades de enzima por mg de gel (peso seco), los valores correspondientes para el gel reciente son 0.77 y 4.0 respectivamente: es como si el gel envejecido conservase su capacidad de adsorción de la enzima en un grado algo mayor que para las otras proteínas.

3º) El gel de alúmina "Y" es un adsorbente más eficaz que el de fosfato de calcio, fresco o envejecido, pero su capacidad de purificación relativa de la enzima es semejante a la del gel de fosfato envejecido. En la Tabla XI se obtuvo para el gel de alúmina eluidos de 0.79 mg de proteína y 5.45 unidades de enzima por mg de peso seco de gel; comparándolos con los valores correspondientes de 0.55 y 3.75 para el gel de fosfato envejecido (ya mencionados) se observa que la capacidad de adsorción es mayor, pero la pureza de ambos eluidos es semejante ( $Q_f = 9300$  y  $9200$ ).

4º) En adsorciones realizadas a pH 6.0 y 6.4 (Tabla XII)

Tabla XI

Adsorción de la enzima en geles de fosfato de calcio  
y de alúmina "Y"

Una preparación precipitada entre 0.45-0.60 sat. de sulfato de amonio, cuyo contenido de sales (fosfatos) es en la mezcla final 0.0016 M, se trata durante tres horas a pH 6.2 y a 5°C con geles de fosfato de calcio (envejecido) o de alúmina "Y"; el gel centrifugado se eluye con 5 porciones de fosfato 0.2 M pH 7.2. Mezcla final: enzima, 105 u/ml, proteína, 23.2 mg/ml; gel de fosfato de calcio o de alúmina, peso seco (respectivamente) 14.1 y 6.9 mg/ml. Eluyente, volumen total/volumen de mezcla, 0.83 ml/ml. Resultados de actividades y proteínas totales de las fracciones obtenidas en % del total inicial.

Gel adsorbente	Fosfato de calcio	Alúmina "Y"
Actividad no adsorbida, %	48	53
adsorbida (por diferencia) %	52	47
eluida, %	50	36
Proteína no adsorbida, %	61	65
adsorbida (por diferencia) %	39	35
eluida, %	33.5	23.5
Quantumato inicial	6100	6100
del no adsorbido	4700	5000
del adsorbido (por diferencia)	8200	8150
del eluido	9200	9300

Tabla XII

Adsorción y elución selectivas: influencia del pH

Tres porciones de una preparación precipitada entre 0.0-0.45 sat. de sulfato de amonio, se tratan a 5°C a diferentes pH (experimento A, pH 6.0; B, 6.4; C, 6.4) con la misma proporción de gel de fosfato de calcio envejecido. Mezclas de adsorción: enzima, 37 u/ml; proteína, 16.6 mg/ml; gel, peso seco, 14 mg/ml. Se eluye el gel precipitado con porciones sucesivas de fosfato 0.2 M de pH 6.8 o 7.3 (experimento A, 0.5 ml/ml de mezcla, pH 7.3; B, 0.4 ml/ml, pH 6.8, y luego 0.33 ml/ml pH 7.3; C, 0.56 ml/ml, pH 7.3). Resultados de actividades y proteínas totales de las fracciones obtenidas en % del total inicial.

experimento	A	B	C
Actividad no adsorbida, %	14	16	16
adsorbida (por diferencia) %	86	84	84
eluida: 1er. eluido %	70	60	78
2º eluido %	--	10	--
Proteína no adsorbida %	25	24.5	25.5
adsorbida (por diferencia) %	75	75.5	74.5
eluida: 1er. eluido %	46.5	37	47.5
2º eluido %	--	9.8	--
Quantarato inicial	3000	3000	3000
no adsorbido	1620	1920	1850
adsorbido (por diferencia)	3440	3340	3400
eluido: 1er. eluido	4400	4900	4900
2º eluido	-----	3200	-----

Tabla XIII

Elución selectiva

Una preparación precipitada entre 0.0-0.45 sat. de sulfato de amonio, dializada contra fosfato 0.005 M, se tratada a pH 6.3 y 5°C con gel de fosfato de calcio envejecido. La mezcla de adsorción (actividad, 21.2 u/ml; proteína, 8.3 mg/ml; gel (peso seco), 11.3 mg/ml) se distribuye en siete alícuotas que se centrifugan, se reúnen los sobrenadantes (iguales) y los precipitados de gel se eluyen individualmente con cuatro porciones sucesivas de la solución que se indica (volumen utilizado, 0.69 ml/mg gel, peso seco).

A - Adsorción: resultados de actividades y proteínas totales en % del total inicial.

Actividad total: no adsorbida, %	12.9
adsorbida (por diferencia), %	87.1
Proteína total: no adsorbida, %	39
adsorbida (por diferencia), %	61
$Q_{\text{fumarato}}$ del inicial	3430
del no adsorbido	1150
del adsorbido (por diferencia)	4900

B - Elución: el adsorbido sobre el gel tiene actividad = 1.65 u/mg de gel (peso seco), proteína = 0.45 mg/mg gel, y  $Q_{\text{fumarato}}$  = 4900. Resultados de actividades y proteínas totales eluidas en % del total adsorbido.

Eluyente	pH	Actividad %	Proteína %	$Q_{\text{fumarato}}$
Fosfato 0.05 M	6.6	16	38	2050
Fosfato 0.10 M	6.6	42	52	3950
Fosfato 0.20 M	6.6	81	62	6400
Fosfato 0.05 M	7.0	48.5	48	5000
Fosfato 0.10 M	7.0	81	55	7200
Fosfato 0.20 M	7.0	88.5	68	8350
Fosfato 0.01 M + fumarato 0.01 M	7.0	20	20	-

Tabla XIV

Adsorciones sucesivas

Una preparación precipitada entre 0.0-0.45 sat. de sulfato de amonio de actividad = 74 u/ml, concentración proteica = 33 mg/ml, y  $Q_{\text{fumarato}} = 3000$ , es tratada a pH 6.2 y 5°C con gel de fosfato de calcio C. vejeido, previamente centrifugado, en 4 adsorciones sucesivas, cada una con 7.1 mg (peso seco)/ml de preparado activo. Los precipitados de las adsorciones se eluyen a 40°C con fosfato 0.2 M pH 7.0, en proporciones de 0.59, 0.61, 0.55 y 0.54 ml/ml preparado inicial respectivamente. Resultados de actividades y proteínas totales de las fracciones eluidas en % del total inicial.

Adsorción (eluido)	Actividad %	Proteína %	$Q_{\text{fumarato}}$
1ª	12.4	11.6	3000
2ª	18.2	11.0	5200
3ª	26.4	10.4	8000
4ª	18.9	8.1	7300
sobrenadante final	7.2	45	500
suma de las fracciones obtenidas	83	83	---

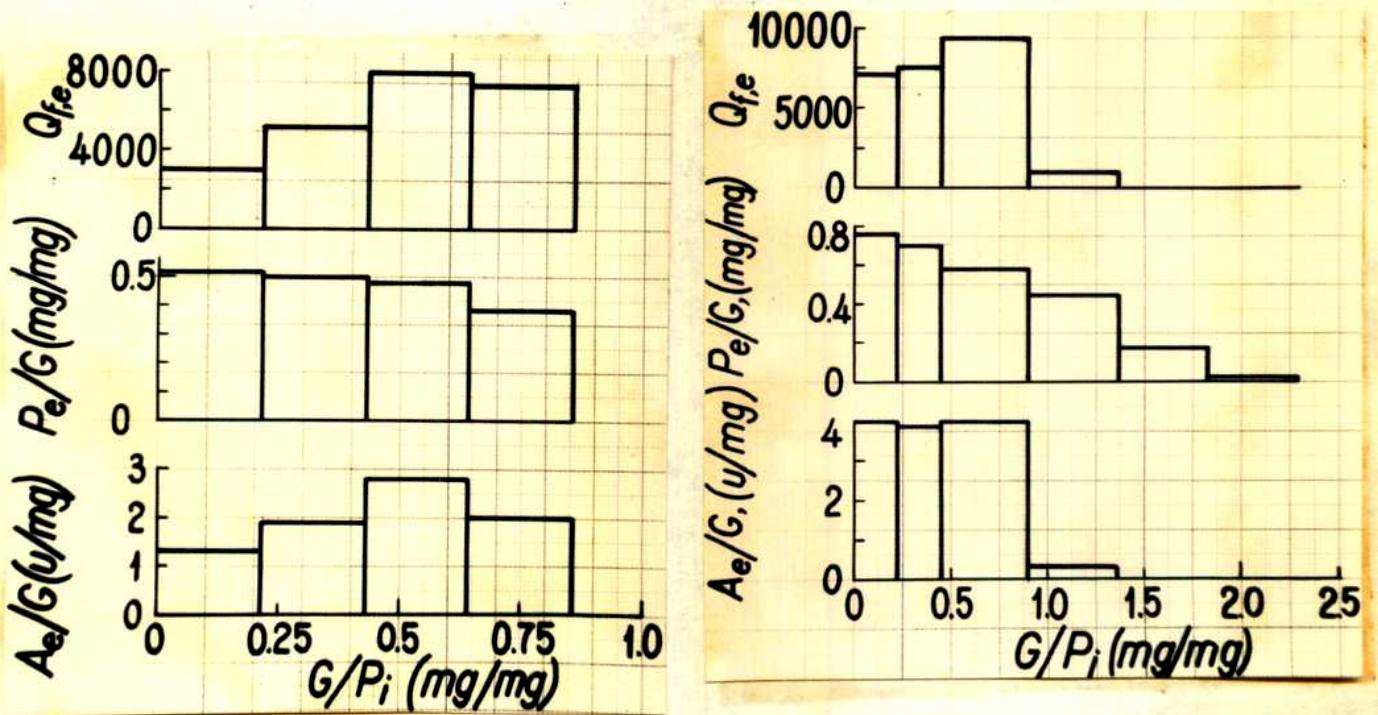
Tabla XV

Adsorciones sucesivas

Una preparación precipitada entre 0.45-0.60 sat. de sulfato de amonio, con una concentración salina (fosfato) de 0.0024 M, se trata a pH 6.2 y 5°C con seis porciones sucesivas de gel de fosfato de calcio recientemente preparado, centrifugadas antes de su uso. Los precipitados de gel con los adsorbidos se eluyen a temperatura ambiente con sucesivas porciones de fosfato 0.2 M pH 7.0. Preparación inicial: actividad, 43 u/ml; proteína, 10 mg/ml;  $Q_{\text{fumarato}}$ , 5800; volumen, 6.0 ml. Resultados de las actividades y proteínas totales de las fracciones eluidas, en % del total inicial.

Fracción	Gel empleado (peso seco), mg	Eluyente, volumen, ml	Actividad total %	Proteína total %	$Q_{\text{fumarato}}$
1ª adsorción, eluido	13.7	3.0	21.0	17.5	6900
2ª adsorción, eluido	13.7	2.5	20.5	16.2	7300
3ª adsorción, eluido	27.5	3.0	43.0	26.5	9400
4ª adsorción, eluido	27.5	2.5	3.5	20.0	980
5ª adsorción, eluido	27.5	2.0	0	7.7	0
6ª adsorción, eluido	27.5	1.0	0	0.9	0
sobrenadante final	---	---	0	3.8	0
suma de las fracciones obtenidas		---	88	93	---

Gráfico III



Adsorciones sucesivas con gel de fosfato de calcio

1-Preparación de  $Q_{\text{fumarato}}=3000$ ; gel envejecido, cuatro adsorciones sucesivas (Tabla XIV).

2-Preparación de  $Q_{\text{fumarato}}=5800$ ; gel reciente, seis adsorciones sucesivas (Tabla XV).

Adsorción a pH 6.2 y 5°C, elución con fosfato 0.2 M pH 7.0.

Abcisas: cantidad total de gel (peso seco) agregada hasta la adsorción correspondiente/proteína total inicial:  $G/P_i$ , mg/mg.  
 Ordenadas: actividad total eluida/cantidad parcial de gel (peso seco) en la correspondiente adsorción:  $A_e/G$ , u/mg.  
 proteína total eluida/cantidad parcial de gel (peso seco) en la correspondiente adsorción:  $P_e/G$ , mg/mg.  
 $Q_{\text{fumarato}}$  del eluido:  $Q_{f,e}$ .



se obtiene una recuperación de enzima y purificación ligeramente mayores en el eluido que proviene de pH 6.4; 78% y  $Q_f = 4900$  contra 70% y 4400 (a pH 6.0). Esto puede deberse a una lenta inactivación del adsorbido a pH 6.0, dado que los sobrenadantes de la adsorción daban en ambos casos cifras semejantes para la actividad no adsorbida, y la cantidad de proteína en ambos eluidos era la misma.

5º) En experimentos de adsorciones sucesivas sobre una muestra de enzima, sea con una preparación purificada y gel de fosfato de calcio fresco (Tabla XV) como con una preparación de baja pureza y gel envejecido (Tabla XIV), se observa que las sucesivas fracciones de gel adsorben cantidades decrecientes de proteína, hasta agotarla prácticamente (Gráfico III); pero la pureza de la enzima adsorbida paralelamente comienza en la primera adsorción con un valor cercano al de partida, y aumenta hasta las últimas fracciones activas, cayendo después bruscamente al agotarse la enzima en el sobrenadante. Esto nos indica que la afinidad del gel por la enzima es mediana: previa a ella fija otras proteínas más afines y después de desaparecer aquella, todavía quedan en solución ciertas proteínas más resistentes a la adsorción.

Se puede ver sobre todo en experimentos con gel envejecido (Tablas XI a XIV) que cuando la relación  $\frac{\text{proteína presente}}{\text{peso seco de gel}}$  tiene un valor del orden de 3 o más, la cantidad de proteína eluida por mg de gel es más o menos constante, del orden de 0.5 para el gel envejecido. En el experimento de la Tabla XIII se partía de una relación inicial de 0.73 mg de proteína presente/ mg gel, obteniéndose todavía un eluido de 0.45 mg/ mg gel. En cambio esta regularidad no se observa en la actividad adsorbida: ésta depende fuertemente de la composición de la mezcla proteica que la acompaña en la solución inicial y se puede dar el caso (Tabla XIV) que, a pesar de disminuir para varias adsorciones sucesivas la relación inicial  $\frac{\text{actividad presente}}{\text{peso seco de gel}}$ , aumenta en las mismas operaciones la adsorción de la enzima por mg de gel. Esto nos indicaría que (en una aproximación grosera) el gel adsorben-

te tiene una cierta capacidad de adsorción de ciertas sustancias proteicas, tal que llega a saturarse en forma más o menos indiscriminada, con 0.5 mg de proteína/ mg de gel. Pero, respecto de una cierta proteína, su tendencia a ser adsorbida compite con las demás presentes, y ello trae como consecuencia que ciertas proteínas sean adsorbidas con más facilidad o antes que otras, que a su vez lo serán gradualmente, a medida que vayan desapareciendo de la solución las primeras.

6º) Las condiciones de elución han demostrado ser un factor adicional de importancia para la recuperación y purificación convenientes de la enzima.

En varios experimentos (Tablas XI, XII y XIII) la cantidad de enzima y de proteína que se ha adsorbido en el gel ha podido ser calculada por diferencia entre las cantidades de actividad o proteína iniciales y las remanentes en el sobrenadante de la adsorción, suponiendo que en este proceso no hay desnaturalización o inactivación de las mismas. Al eluirse posteriormente los geles, la recuperación de los adsorbidos no fué completa en ningún caso y se pudo observar que de acuerdo a esas condiciones de elución elegidas, se obtenían fracciones con rendimientos variables, y en las que la pureza de la enzima era mayor o menor que en el adsorbido.

El proceso de elución ha sido estudiado parcialmente en los experimentos correspondientes a la Tablas XII y XIII. En ellos se puede ver que el aumento del pH y de la concentración del eluyente producen efectos paralelos: la elución de una mayor cantidad de proteína y de enzima. Estos efectos no se dan de igual manera: a pH 6.6 y concentración 0.05 M el buffer fosfato eluye 38% de la proteína presente, pero sólo 16% de la enzima; y el mismo eluyente a pH 7.0 triplica la elución de enzima (a 48.5%), pero la de proteína aumenta en sólo 1/4 de la anterior (hasta 48%).

Parecería que el aumento de pH es más efectivo que el de la concentración del eluyente para eluir la enzima, preferencialmente respecto de las otras proteínas: a pH 7.0 el buffer 0.1 M nos da un

Eluido con un  $Q_{\text{fumarato}} = 7200$  (1.5 veces el del adsorbido) y 81% de recuperación de la enzima; para esa misma recuperación, a pH 6.6 y concentración 0.2 M el  $Q_{\text{fumarato}}$  ha bajado a 6400 (han aumentado las proteínas inactivas) y al eluir con buffer 0.2 M de pH 7.0 se obtiene una recuperación mayor (88.5%) pero con un  $Q_f$  relativamente inferior: 5350.

En el experimento de la Tabla XII, aunque no es cuantitativamente comparable al de la XIII, se observa la máxima recuperación de la actividad (93% del adsorbido) y pureza ( $Q_f = 4900$ ) a pH 7.3 y concentración de eluyente 0.2 M, por comparación con una elución compuesta, en que primero se usó buffer 0.2 M pH 6.8 (eluido con 71% de recuperación de enzima y  $Q_f = 4900$ ) y luego el mismo buffer 0.2 M pH 7.3 del ensayo paralelo (con 12% de recuperación de actividad y  $Q_f = 3200$ ). Es interesante hacer notar que aquí se ha llegado en ambos ensayos a la misma elución total de proteína, y que en el segundo ensayo se habría inactivado parte de la enzima que se ha podido obtener en una sola elución a pH 7.3.

Por último, en el experimento de la Tabla XIII se hizo un ensayo de elución con el sustrato a pH 7.0, en una solución de buffer diluido: fumarato de sodio 0.01 M y fosfato 0.01 M. La recuperación de enzima y proteína en el eluido fué semejante: 30.5 y 28% del adsorbido, respectivamente; la pureza ( $Q_f = 5400$ ) apenas mayor que la de este último (4900). Estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos eluyendo con fosfato 0.05 M pH 7.0: en este último caso, a pH 7.0, la fuerza iónica es aproximadamente doble de la del eluyente anterior ( $\mu = 0.11$  y 0.052 respectivamente). Aquí se obtuvo una recuperación igual para la enzima y la proteína: 48.5 y 48%, con  $Q_f = 5000$  (análogo al adsorbido).

Estos resultados no indican un efecto ostensible del sustrato sobre la elución de la enzima: con una pureza semejante a la de pectina, el rendimiento es bastante menor que con un buffer inespecífico de fuerza iónica doble. Ciertamente no es un efecto del orden encontrado por Heppel y Hilmoe<sup>(11)</sup>, quienes eluyen la pirofosfata

sa inorgánica de levadura con una muy pequeña concentración de sustrato, pirofosfato inorgánico 0.001 M. Esto no excluye la posibilidad de encontrar condiciones de elución bien específicas que permitan un alto rendimiento de enzima y al mismo tiempo una purificación considerable.

Conclusiones: La fumarasa puede ser adsorbida cuantitativamente y eluida con buena recuperación, utilizando gel de fosfato de calcio o de alúmina " $\gamma$ ". Es primordial tener una baja concentración de electrolitos (0.01 M) y un pH entre 6.2 y 6.4.

Son condiciones convenientes de trabajo: una preparación diluida, con concentración proteica entre 10 - 20 mg/ml; una relación de proteína / peso seco de gel de fosfato de calcio no menor de 2 - 3 mg/mg, y que puede ser mayor; desarrollar la operación en adsorciones sucesivas, tomadas varias porciones de gel centrifugadas que totalicen alrededor de 1 mg gel/ mg proteína inicial; eluir las diferentes porciones de gel separadamente, comenzando por un eluyente diluido y ácido, como buffer de fosfatos 0.05 M pH 6.5, y terminando con un buffer 0.1 M pH 7.5 que contendrá la mayor parte de la enzima con una pureza doble al triple de la inicial.

Capítulo IV - Referencias bibliográficas

- (1) Tsuchinashi, T., Biochem. Z., 140, 161 (1923).
- (2) Laki, S. y Laki, F., Enzymologia, 9, 139 (1941).
- (3) Scott, E.F., Arch. Biochem., 18, 131 (1948).
- (4) Massey, V., Nature, 167, 769 (1951); Biochem. J., 51, 490 (1952).
- (5) Frieden, I., Sock, R. A. y Alberty, R.A., J. Am. Chem. Soc., 76, 2482 (1954).
- (6) Hillin, D. y Hartree, E. F., Proc. Royal Soc. London, B 124, 397 (1938).
- (7) Solowick, S. P., en Colowick-Kaplan, "Methods in Enzymology", New York (1955), Vol. 1, pág. 90.
- (8) Dixon, M., Biochem. J., 54, 457 (1953).
- (9) Davydeva, S. Ya., Biokhimiya, 12, 135 (1947), citada en (3):
- (10) Bauer, E., en Bamann, E. y Myrbäck, K., "Die Methoden der Fermentforschung", Leipzig (1941), pág. 1449.
- (11) Heppel, L. A. y Hilme, R. J., J. Biol. Chem., 192, 87 (1951).

## CAPITULO V

### PROPIEDADES QUIMICAS Y CATALITICAS DE LA FUMARASA DE S. CEREVISIAE

La hidratación reversible de dobles ligaduras es una reacción conocida en química orgánica, que puede transcurrir en solución acuosa y a temperaturas ordinarias, en presencia de ácidos fuertes diluidos y medianamente concentrados<sup>(1, 2, 3)</sup>. Este tipo de reacciones tiene lugar también en las células, catalizadas por enzimas específicas: se conocen, además de la fumarasa, una serie de enzimas capaces de saturar dobles ligaduras, ya sea con una molécula de agua, o introduciendo un grupo amina primaria o secundaria: entre ellas la aconitasa<sup>(4a, b)</sup>, la crotonasa<sup>(5a, b)</sup> y la 5-dehidroquinasa<sup>(6)</sup> (hidratasa), y la aspartasa<sup>(7)</sup>, argininosuccinasa<sup>(8)</sup> y adenilosuccinasa<sup>(9)</sup> (aminasas). Es una característica de todos estos sistemas llevar a un equilibrio entre los reactivos; por lo demás demandan en cada caso condiciones particulares de composición del medio, presencia de cofactores, etc., que no permiten generalizar sobre el mecanismo de la reacción.

La fumarasa de diversos orígenes, tanto de microorganismos como de plantas y animales superiores, ha sido muy estudiada en sus propiedades catalíticas. Hasta 1951 habían aparecido numerosos trabajos (entre ellos una larga lista de K. P. Jacobsohn y colaboradores) en los que en forma semicuantitativa se habían establecido las características principales de la enzima y la reacción correspondiente: equilibrio, especificidad respecto de los sustratos, inexistencia de cofactores indispensables, activación por varios aniones, especialmente fosfato, curva y óptimo de pH, calor de la reacción total y energía de activación, constantes cinéticas para ambos sustratos, efectos inhibidores de diversas sustancias e inactivaciones por diferentes agentes. La disponibilidad de la enzima cristalizada de corazón de cerdo<sup>(10)</sup>, y de un método espectrofotométrico simple y muy preciso para la medición continua de la marcha de la reacción<sup>(11)</sup>, permitieron primero a Massey y luego a Alberty y su grupo de colaboradores, encarar estudios muy detallados y precisos sobre las propiedades catalíticas

de la enzima pura. Muchas de las características encontradas previamente fueron reinvestigadas, y se pudo establecer la influencia del pH y de los aniones sobre las dos reacciones opuestas; la existencia de una serie de inhibidores competitivos cuyas constantes cinéticas estudiadas en función del pH arrojaron luz sobre la estructura del sitio activo de la enzima; se volvió a investigar la termodinámica de la reacción total, y la energética del proceso de activación de los reactivos.

El grupo de Wisconsin hizo un detallado análisis cinético de ambas reacciones, directa e inversa, especialmente sobre las relaciones entre el equilibrio y las constantes cinéticas, y sobre la influencia que tienen en éstas el pH, la naturaleza del buffer usado, y los mismos sustratos, juntamente con estudios sobre el estado dinámico del H lábil del L-malato en presencia de la enzima. Todos estos resultados han hecho de la fumarasa de cerdo una de las enzimas catalíticamente mejor conocidas.

En lo que sigue transcribimos nuestros resultados sobre algunas características de la actividad de la fumarasa de levadura: equilibrio, influencia del pH y sales diversas, constantes cinéticas del fumarato, y acción de algunos inhibidores. Como se verá, aquéllos siguen en líneas generales las observaciones hechas con enzimas de otros orígenes. Además demuestran que, como diferencia esencial con la enzima de cerdo, la de levadura es una enzima tiol, cuyos grupos sulfhidri los son protegidos por los sustratos y por el fosfato contra la acción de los reactivos específicos.

#### Identificación de los productos de la reacción enzimática

La enzima cuya obtención y purificación hemos descrito cataliza la desaparición del fumarato en las soluciones de dosaje. Con el objeto de identificarla inequívocamente, hemos estudiado el producto de la reacción con el fumarato como sustrato, y también su actividad frente al L-malato. Nuestros experimentos demuestran que efectivamente se trata de la fumarasa, definida por la hidratación reversible del fumarato a L-malato.

Parte experimental. a) Aislamiento e identificación de los productos de reacción a partir del fumarato: En una solución en la que la preparación enzimática actuó sobre fumarato de sodio en ausencia de otras sustancias, se identificó por una técnica de cromatografía de partición sobre papel, ácido málico. Se procedió en la siguiente forma:

Se incubó a 30° C durante una hora, fumarato de sodio 0.05 M pH 7.2 y enzima en concentración de 3 unidades/ml. La reacción se interrumpió calentando el tubo en agua a ebullición, y se sedimentó el coágulo de proteína por centrifugación a alta velocidad. Dos muestras de la solución límpida se sembraron paralelamente a dos testigos, uno de fumarato de sodio y otro de ácido L-málico, en una misma hoja de papel Whatman N° 1, y se corrieron en cromatografía unidimensional descendente, con el sistema de solventes butanol:ácido propiónico:agua:: 46.6 ml:21.0 ml:32.2ml <sup>(12)</sup>; los ácidos libres se revelaron con verde de bromocresol.

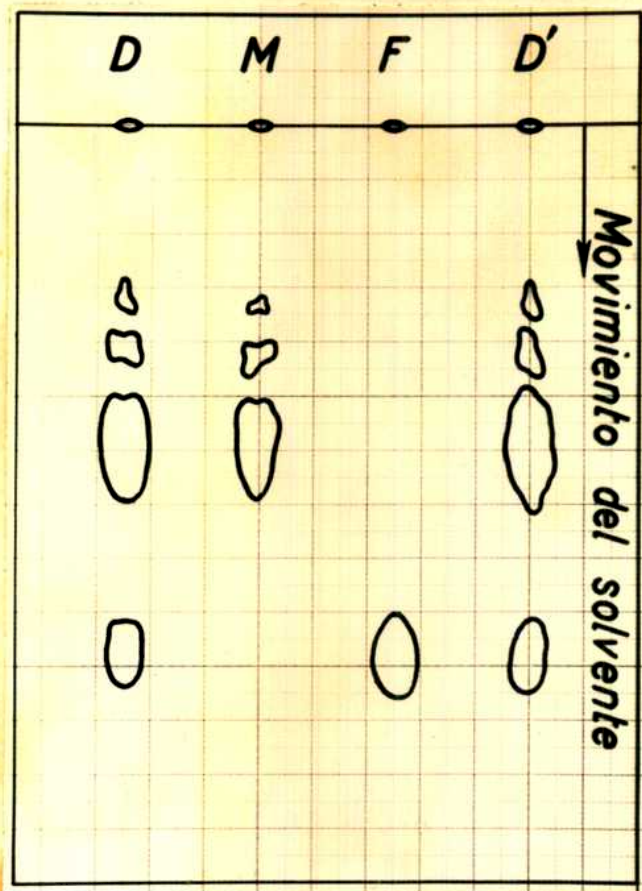
Se puede ver en el Gráfico I un dibujo del cromatograma revelado. Las muestras D y D' de ambos extremos son las de la solución incubada con la enzima; la muestra M es de ácido málico y la F es de fumarato.

Se observa que las dos manchas que corresponden a D y D' se identifican perfectamente en posición, forma y tamaño, con las manchas del ácido L-málico (M) y del fumárico (F) (las "colas" de las manchas de ácido L-málico son características de éste).

Este resultado nos permite afirmar que el producto de la actividad de la enzima sobre el fumarato es el malato. El método cromatográfico no es capaz de decidir con certeza sobre la configuración del isómero óptico presente: ésta última podrá ser establecida por métodos polarimétricos como el que se describe en el párrafo siguiente.

b) Estudios sobre el equilibrio a partir de ambos sustratos: en experimentos sobre equilibrio se estableció que, al igual que el fumarato, el L-malato es un sustrato de la misma; además se comprobó que partiendo indistintamente de uno u otro reactivo (en iguales concentraciones iniciales) se alcanzaba la misma concentración final de fumarato





Identificación de los productos de la reacción enzimática

Cromatografía de partición en papel, unidimensional descendente, con el sistema de solventes butanol:propiónico:agua (véase el texto).  
 Muestras D y D': solución con fumarato y el producto de reacción.  
 Muestra M, testigo de ácido málico.  
 Muestra F, testigo de ácido fumárico.

(o de L-malato). Por último, se verificó, por mediciones polarimétricas, que el malato producido a partir de fumarato es el isómero L-.

Se han realizado los siguientes experimentos: se incubó durante 12 horas, a 30°C, dos soluciones de fumarato de Tris (Tris = tris (hidroximetil)aminometano) y L-malato de Tris, respectivamente, de concentración inicial 0.02 N, pH 7.4, y conteniendo 0.55 unidades de enzima por ml de mezcla. Se detuvo la reacción por acidificación, y luego de coagular por calor y centrifugar las proteínas, se determinó en varias alícuotas de ambas mezclas de equilibrio, fumarato por permanganimetría, y L-malato por polarimetría del complejo malato-nolibrato-citrato<sup>(13)</sup>.

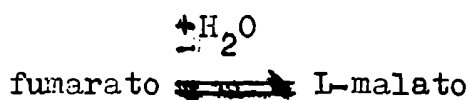
En muestras de tubos líquidos de reacción, que contienen iguales alícuotas de las soluciones iniciales, se han obtenido los siguientes resultados de medidas por los métodos mencionados:

	Titulación de fumarato K <sub>2</sub> MnO <sub>4</sub> 0.02 N, ml	Medida de malato (2 dm), °
Equilibrio a partir de fumarato 0.02 N.	2.25	♦ 2.58
Equilibrio a partir de L-malato 0.02 N.	2.26	+2.61
	2.23	+2.59

† Se agradece al Dr. V. Deulofeu y al Dr. C. L. Galmarini las mediciones polarimétricas.

Se puede observar que con los dos reactivos iniciales, indistintamente, se llega a un punto final común, ya se lo mida como fumarato o como L-malato (las diferencias de lecturas para el malato se pueden deber a la presencia de proteína que no ha coagulado igualmente en los tres casos). Esto por supuesto corrobora la igual capacidad de ambos reactivos para actuar como sustratos de la enzima. Además se observa que el signo de la rotación óptica del complejo malato-nolibrato-citrato es positivo: esto corresponde al isómero L-malato (Krebs y Eggleston<sup>(13)</sup>), que se obtiene en el equilibrio, no sólo cuando se parte del mismo como sustrato, sino también a partir de fumarato. Esta comprobación viene a completar lo dicho en el párrafo anterior, sobre cronotografía de los productos a partir de fumarato.

Conclusiones: La enzima que estudiamos cataliza la reacción reversible



Actúa, pues, como la fumarasa de los tejidos animales, según lo estudiaran Battelli y Stern<sup>(14)</sup>, y Dakin<sup>(15)</sup>; de acuerdo a la definición de los primeros, la enzima es por lo tanto la fumarasa de la levadura de panadería.

### Estudios sobre la catálisis por la fumarasa

Se han llevado a cabo experimentos destinados a comparar el comportamiento de la enzima de levadura con la de otros orígenes, especialmente respecto del equilibrio que se establece en su presencia y de la influencia que ejerce la composición iónica del medio sobre las propiedades catalíticas. Estos experimentos que se describen a continuación, hacen resaltar la analogía con las características de otras fumarasas ya estudiadas.

#### i) Constanta de equilibrio de la reacción.

Cuando H. Einbeck describió<sup>(16)</sup> en 1919 la hidratación del fumarato por la papilla de músculo, ya estableció que se producía un equilibrio con el malato formado. Los estudios posteriores han resultado en constantes de equilibrio que discrepan apreciablemente según los autores y la enzima utilizada; entre estas determinaciones se han efectuado algunas con preparados de células y extractos de levadura de cerveza y de panadería (Jacobsohn y colaboradores<sup>(17,18)</sup>).

Empleando preparados de fumarasa purificada y dializada en la que se puedan descartar otras actividades que modifiquen el sistema final, hemos estudiado el equilibrio a partir de fumarato o de L-malato 0.02 N, a pH 7.5 y 30°C, en ausencia de otras sales. A continuación se describen nuestros experimentos.

Parte experimental: Las drogas empleadas fueron: ácido fumárico recristalizado, p.f. 294°C (tubo cerrado); ácido L-málico de Pfenstiehl, p.f. 103°C; y tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris) de Sigma Chemical Co. Las soluciones se prepararon con cantidades equivalentes del sustrato y de Tris, ajustándolo al pH deseado con hidróxido de sodio.

La preparación enzimática libre de sales (fosfato residual, de terminado según Fiske y Subbarow<sup>(19)</sup>,  $2.4 \times 10^{-3}$  M) tenía una actividad = 110 u/ml, y  $Q_{\text{fumarato}} = 3700$ .

Las mezclas de reacción estaban inicialmente constituídas por 30 ml de solución de sustrato (fumarato o L-malato de Tris y sodio) 0.02 M pH 7.5-7.6, y 0.15 ml de enzima (0.5 % v/v) que dan una concentración final de 5 u.enzimáticas/ml. Se dejaron en un termostato a 30°C durante 12 horas, y se interrumpió la reacción con el agregado de 0.2 volúmenes de solución de ácido tricloroacético 20 %. Se coaguló la proteína calentando la mezcla durante 5 minutos en baño maría hirviente; se centrifugó y tituló fumárico en el líquido claro. La titulación se comparó a un testigo de fumarato de composición idéntica a la mezcla de reacción, en el que se había reemplazado la enzima por agua destilada.

Titulación del fumárico: se realizó por permanganimetría según Straub (ver Métodos, Cap. II). Para obviar la falta de proporcionalidad estequiométrica entre las cantidades de fumárico presentes y las de permanganato consumidas, se tomaron volúmenes de muestra que consumían muy aproximadamente el mismo volumen de reactivo: en un ámbito pequeño volúmenes se consideró que el consumo de permanganato es proporcional al fumarato titulado.

Resultados: En la Tabla I se dispone el protocolo de las determinaciones efectuadas. Se ve que tanto a partir de fumarato como de L-malato se ha llegado a una misma composición final: 21 % de fumárico presente respecto del sustrato inicial; esto nos demuestra que se ha alcanzado un verdadero equilibrio. La constante aparente de equilibrio  $K_{\text{ap}}$  resulta:

Tabla I

Determinación de la constante de equilibrio de la reacción enzimática

La mezcla de reacción está compuesta por 30 ml de fumarato o L-malato de Tris y sodio 0.02 M pH 7.5-7.6 y 0.15 ml (0.5 % v/v) de enzima (actividad = 110 u/ml,  $Q_{fumarato} = 3700$ ) que dan 5 u/ml finales; se mantiene a 30°C durante 12 horas, y se mezcla a 0.2 vols. de ácido tricloroacético 20%, calentándose a 100°C durante 5 minutos. El líquido trifugado claro se titula en medio sulfúrico con  $KMnO_4$  0.02 N. Análogamente se procede con testigos en los que se reemplaza la enzima por agua destilada.  $K_{ap} = (L-malato)_{eq} / (fumarato)_{eq}$ .

Experimento	equilibrio fumarato	equilibrio L-malato	equilibrio L-malato	testigo fumarato	testigo fumarato
Sustrato	fumarato	L-malato	L-malato	fumarato	fumarato
pH: inicial	7.5-7.6	7.5-7.6	7.5-7.6	---	---
final	7.5	7.2-7.3	7.2	---	---
Titulación de fumarato:					
volumen de muestra, ml	2.50	2.50	2.50	0.50	0.50
número de titulaciones	4	4	4	6	6
$KMnO_4$ prom. y desviación promedio, ml	2.26 ± 0.0025	2.26 ± 0.0075	2.23 ± 0.0025	2.15 ± 0.006	2.15 ± 0.010
$KMnO_4$ para 2.5 ml de muestra	2.26	2.26	2.23	10.75	
Concentración de fumarato en el equilibrio, M	0.00420	0.00420	0.00416	-----	
$K_{ap}$	3.76	3.76	3.81	-----	

$$K_{ap} = \frac{(\text{L-malato})_{eq}}{(\text{fumarato})_{eq}} = \frac{79}{21} = 3.8$$

donde  $(\text{L-malato})_{eq}$  y  $(\text{fumarato})_{eq}$  designan las concentraciones totales de los sustratos en todas sus formas iónicas, en el equilibrio.

Los valores de  $K_{ap}$  a 30°C registrados en la literatura, son:

autores	preparación	$K_{ap}$
Krebs, Smyth y Evans (20)	fumarasa de un extracto de músculo de paloma, no purificado	3.54
Scott y Powell (21) (de su fig. 2)	fumarasa de corazón de vacuno, purificada	3.6 - 3.7
Massey (22) (de su fig. 12)	fumarasa de corazón de cerdo, cristalizada	3.55 - 3.7
Bock y Alberty (23) (de su fig. 3)	fumarasa de corazón de cerdo, cristalizada	3.96

Se puede observar que nuestros resultados están muy aproximadamente comprendidos entre éstos. Por las discrepancias halladas hay algunas causas: la constante aparente de equilibrio depende, entre otros parámetros, de la fuerza iónica del medio<sup>(23)</sup>, factor importante en este caso para explicar la variación de valores. Además debe tenerse en cuenta que el método de determinación de  $K$  seguido en esos casos implica el dosaje de uno de los sustratos, en el equilibrio, y el cómputo de la concentración del otro por diferencia del primero con su concentración inicial: esto introduce en  $K$  el error de la determinación analítica, dos veces, aumentando su propio error. En nuestro caso, el límite estimado de error del método permanganométrico nos daría una imprecisión de 4% en la constante determinada.

Jacobsen y col.<sup>(19)</sup> han obtenido algunos resultados de equilibrios en presencia de células enteras de levadura de panadería y de cerveza, y también con extracto de Lebedew de esta última. Sus determinaciones, a 38°C, dan constantes muy bajas (2.8 para levadura entera de panadería y 1.55 para la de cervecería). Estos resultados fueron obtenidos en incubaciones largas (2 a 4 días) y no se ha computado el eventual consumo de los sustratos por las células vivas, en ese período, por lo que pueden estar afectados de errores grandes.

ii) Influencia del medio iónico en la actividad hidratante de la enzima

Es bien conocida la influencia del pH y del medio iónico en la actividad de las enzimas. Con la fumarasa de diversos orígenes se ha comprobado la existencia de pH óptimos de actividad, y se observó el efecto activador de varias sales, en especial los fosfatos. En la fumarasa cristalizada de corazón de cerdo, esas características han podido ser interpretadas con un modelo en el que dos grupos ionizables de la enzima (cuyas constantes de disociación son afectadas tanto por los sustratos como por diversos aniones) son los responsables de la actividad catalítica de la misma.

Los estudios que luego detallamos demuestran en la enzima de levadura propiedades catalíticas semejantes a las de la enzima de cerdo y de *Escherichia coli*: curva de pH, falta de influencia de los cationes alcalinos y alcalinotérreos, y activación por los aniones polivalentes; e influencia del fumarato y del fosfato en las constantes cinéticas de la reacción de hidratación.

Parte experimental: La enzima (una preparación precipitada entre 0.45-0.50 saturación de sulfato de amonio, dializada exhaustivamente contra fosfato diluido) tenía como único agregado salino el fosfato residual en concentración  $2.4 \times 10^{-3}$  M (determinado según Fiske y Subbarow (19)).

Las drogas empleadas fueron: ácido fumárico recristalizado varias veces, p.f. 294°C; tris-(hidroximetil)-aminometano de Sigma Chemical Co. (en lo sucesivo "Tris"); las demás sales eran reactivos para análisis (se agradece al Dr. E. Cabib una muestra de fluoruro de sodio).

Las soluciones de ácido fumárico se neutralizaron al pH deseado con base libre Tris; en los experimentos de la curva de pH se midió éste con potenciómetro y electrodo de vidrio, a temperatura ambiente.

La curva de actividad vs. pH (Tabla II) y la influencia de las diversas sales ensayadas (Tablas III y IV) se obtuvieron incubando a 30°C durante 5 minutos, alícuotas iguales de enzima, en 4 ml totales de un medio que contenía fumarato de Tris 0.025 M del pH indicado, fos

fato  $5 \times 10^{-5}$  M (residuo de la preparación enzimática) y la sal que se indica en cada caso. La reacción se detenía con 1 ml de ácido tricloroacético 20 % (p/v); en el sobrenadante claro se titulaba por permanganometría (Cap. II) el fumarato residual. Previo cálculo del "consumo" C de fumarato (por comparación con un control sin enzima) se determinaba la actividad observada en el Gráfico I, Cap. II.

Esa actividad así obtenida es una medida semicuantitativa de la actividad verdadera (dada por la velocidad inicial de hidratación del fumarato) y ello resulta de las diferentes condiciones de dosaje adoptadas en estas experiencias respecto de las del Gráfico I (composición y pH del medio variables, comparadas con la presencia de fosfato 0.1 M pH 7.0 para el último), que pueden llevar en cada caso a formas diferentes de la función "consumo"-actividad; a pesar de esto; como a mayor "consumo" corresponde siempre mayor actividad, con estos resultados se puede establecer relaciones comparativas dentro de cada grupo de experimentos afines.

Las constantes cinéticas de la reacción de hidratación fueron estudiadas con la preparación de enzima antes descrita, incubando alícuotas iguales con fumarato de sodio en concentraciones decrecientes (entre 20 y 2.22 mM), y en presencia de fosfato 10 o 100 mM pH 7.0 a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Se midió la velocidad inicial de desaparición del fumarato, por el método espectrofotométrico de Racker<sup>(11)</sup>, siguiendo la disminución de la densidad óptica D a 290 m $\mu$  en función del tiempo, y extrapolando gráficamente a  $t = 0$  la velocidad  $v_i = dD/dt$ .

Resultados: 1- La actividad a diferentes pH en ausencia de sales.

En la Tabla II y el Gráfico II se representan las actividades observadas a 30°C en medios de fumarato de Tris 0.025 M de diferentes pH entre 5.91 y 8.11. La curva resultante tiene un máximo a pH 6.3, y ambas ramas laterales desarrolladas en distinto grado: la rama ácida se extiende unas cuatro décimas de pH, cayendo la actividad un 9 %, y no puede observarse su prolongación hasta pH menores, debido a la creciente inactivación de la enzima en los mismos (Cap. IV). En la re



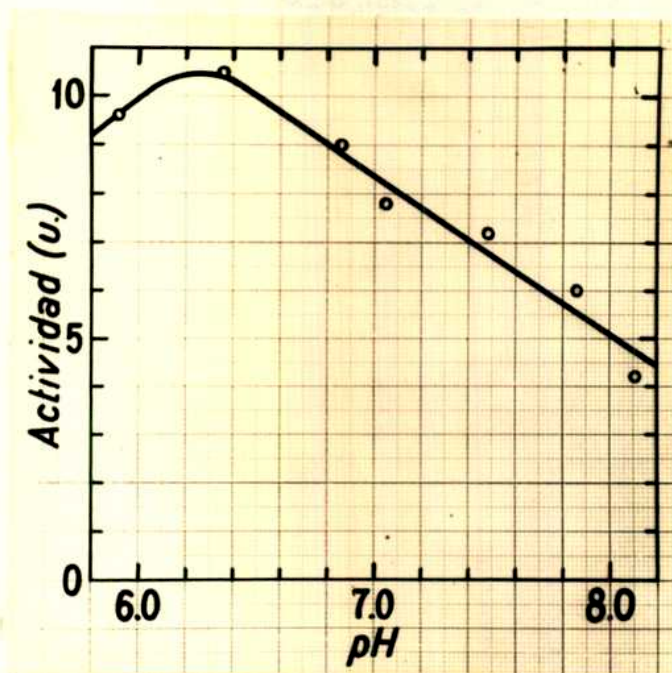
Tabla II

Actividad de la fumarasa a diferentes pH, en ausencia de sales

En un medio de 4 ml de fosfato  $5 \times 10^{-5} M$ , exento de otras sales, y pH que se indica, se incubó a 30°C durante 5 minutos, la enzima (10 unidades, fumarato = 4700) y fumarato de Tris 0.025M. Se interrumpió la reacción con 1 ml de ácido tricloroacético 20% (p/v) y se tituló el fumarato residual en el centrifugado claro, por permanganato. Se calcula el "consumo" C de fumarato por comparación con un control sin enzima; se computa la actividad en el Gráfico I, Cap. II. Experimentos por triplicado.

	"Consumo" C micromoles	Actividad unidades	Actividad relativa, %
5.91	31	9.6	91
6.3	33	10.5	100
6.96	30	9.0	86
7.05	26.5	7.8	74
7.45	25	7.2	69
7.85	21.3	6.0	57
8.11	16.6	4.2	40

Gráfico II



Variación con el pH de la actividad hidratante de la fumarasa  
en ausencia de sales

Resultados de la Tabla II. fumarato 0.025 M; incubación a 30° durante 5 minutos.

na alcalina se ha podido observar, en un intervalo de unas dos unidades de pH, una caída aproximadamente lineal de 60 % de la actividad máxima; si se extrapola hasta la actividad 0, la rama llega aproximadamente a pH 9.5, y tomando este resultado con las debidas reservas, el intervalo en que se desarrolla la rama alcalina de la actividad, ría de unas tres unidades de pH.

Esta curva es comparable a las obtenidas en otros dos trabajos: Mann y Woolf<sup>(24)</sup>, con células lavadas de *Escherichia coli*, llegaban a 37° a un máximo a pH 5.35, y su curva de campana se completaba perfectamente en ambas ramas entre pH 5 y 7.6. Massey<sup>(25)</sup>, utilizando enzima de cerdo cristalizada, en ausencia de sales y a 23°C tuvo un máximo de actividad no muy pronunciado a pH 5.6, y sobre todo la rama alcalina tenía una pendiente suave, cada vez menor: entre pH 4.8 - 7.0 la variación de actividades no sobrepasaba 30 % de la máxima.

Otra curva indicada en la bibliografía es la de Massey y Alberty<sup>(26)</sup>, obtenida también con enzima de cerdo, en la que las actividades en ausencia de sales se han extrapolado a partir de los resultados a 25°C de velocidades máximas (calculadas) en presencia de concentraciones decrecientes de fosfato, para diferentes pH. Esta curva, muy regular y de pendientes medianas, tiene su máximo en pH 6.5. No es enteramente comparable con las anteriores ni con la nuestra, debido a que en su cómputo se ha eliminado el efecto activador de los sustratos en concentraciones medianas y altas, efecto cuya correlación con el pH puede ser diferente a la de la actividad simple.

Entre las posibles causas de discrepancia entre nuestra curva y las obtenidas por otros autores, están además de las que hacen a la naturaleza de las diversas enzimas, dos de índole experimental: la presencia de fosfatos en concentración  $6 \times 10^{-5}$  M, que puede haber desplazado ligeramente el máximo de actividad hacia los pH más altos y sobre todo pueden haber levantado la rama alcalina, haciéndola menos empinada; y también el hecho de no medir velocidades iniciales con suficiente exactitud en condiciones en que la reacción inversa de deshidratación del L-malicato es despreciable, sino que se observan consumos de fumarato resultan

tas de la diferencia entre ambas reacciones, significativas en las condiciones de trabajo: con ello entran en juego las diferencias en las curvas de pH para ambos sustratos, que pueden modificar el dibujo de la curva original para velocidades iniciales con fumarato.

## 2- Influencia de diversos cationes y aniones.

Se ha estudiado la actividad hidratante de la fumarasa en presencia de una serie de cationes y aniones de importancia fisiológica. Experimentos comparativos preliminares indicaron que a pH 7 y a 30°C, en ausencia de otras sales las actividades frente al fumarato de sodio de anionio o de Tris, eran semejantes dentro del error experimental. Este resultado permitió usar, en todos los experimentos que siguieron, fumarato de Tris como sustrato con un buen poder buffer entre pH 6-8, y omitir todo otro componente con funciones de amortiguador del pH.

Utilizando ese sustrato se ha comparado la actividad en ausencia y en presencia de una serie de cloruros de cationes alcalinos y alcalinotérreos, y de sales alcalinas de varios aniones.

Los resultados de los experimentos en presencia de los cloruros de diversos cationes (Tabla III) nos indican una leve pero sostenida disminución de la actividad en presencia de los cloruros de litio, sodio y potasio 0.025 M y de calcio, bario, magnesio y manganeso 0.0125 M, disminución que en el caso del calcio y bario alcanza al 10 por ciento de la actividad en ausencia de sales, y que con los otros cloruros es intermedia. Estas diferencias de actividad son significativas, pues no obstante ser dadas por diferencias de "consumo" C que están apenas por encima de las desviaciones experimentales del dosaje, todas ellas están afectadas del mismo signo (cosa improbable en verdaderos errores accidentales). Las mismas nos indican que las sales antes mencionadas (todas en igual concentración final de cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) = 0.025 M) son ligeros inhibidores de la fumarasa.

Para determinar el efecto de diversas sales alcalinas sobre la actividad, a pH 7.0 y 30°C, se han realizado dos series de experiencias (Tabla IV) con dos preparaciones enzimáticas diferentes; sus re-

Tabla III

Actividad de la fumarasa en presencia de diversas sales:  
influencia de los cationes

La enzima (14.5 unidades,  $Q_{\text{fumarato}} = 4700$ ) se incubó a pH 7.0 y 30°C, durante 5 minutos, en un medio de 4 ml totales de fumarato de calcio 0.025 M, y el cloruro del catión indicado, en concentración equivalente ( $Cl^-$ ) = 25 mM. Se dosó la actividad como en la Tabla II. Experimentos por duplicado; se disponen testigos con enzima sin sales y controles sin enzima.

Sal presente	Concentración del catión, mM	Actividad observada, u	$\frac{\text{Activ. observada}}{\text{Activ. sin sales}} \%$
---	---	8.0	100
ClLi	25	7.3	91
ClNa	25	7.5	94
Cl <sup>o</sup>	25	7.8 <sup>o</sup>	97
Cl <sub>2</sub> Ca	12.5	7.2	90
Cl <sub>2</sub> Ba	12.5	7.2	90
Cl <sub>2</sub> Mg	12.5	7.5	94
Cl <sub>2</sub> Mn	12.5	7.3	91

<sup>o</sup> Resultado recalculado en base a una experiencia posterior.

Tabla IV

Actividad de la fumarasa en presencia de diversas sales:  
influencia de los aniones

La enzima (preparaciones A y B, 12.2 y 16.5 unidades totales, y  $Q_{fu}$  parato = 4100 y 5500 respectivamente) se incubó a pH 7.0 y 30°C, durante 5 minutos, en un medio de 4 ml de fumarato de Tris 0.025 M y la sal alcalina que se indica. Se dosó la actividad como en la Tabla III. Experimentos por duplicado; se disponen testigos con enzima sin sales, y controles sin enzima.

Sal presente	Concentración del anión, mM	Actividad observada, u	$\frac{\text{Activ. observada}}{\text{Activ. sin sales}} \%$
Preparación enzimática A			
---		6.2	100
ClK	100	5.0	81
BrK	100	5.3	85
$SO_4^{2-} (NH_4)_2$	100	12.0	194
$CO_3^{2-} (Na, H)_3$	100	8.2	132
$PO_4^{3-} (Na, K, H)_3$	100	12.2	197
Preparación enzimática B			
---		8.0	100
$NO_3^-$	100	6.8	85
$PO_4^{3-} (Na, K, H)_3$	100	16.8	206
$PO_4^{3-} (Na, K, H)_3$	50	13.5	232
PH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	100	8.0	100
$AsO_4^{3-} (Na, H)_3$	100	17.8	224
$PO_4^{3-} (Na, K, H)_3 + ENa$	50+50	17.5	218

sultados son comparables entre sí, por referencia a las respectivas actividades en ausencia de sales.

Se han estudiado los halogenuros fluoruro de sodio, cloruro y bromuro de potasio, <sup>el</sup> nitrato de potasio y las sales de ácidos polivalentes borato de sodio, sulfato de amonio, <sup>arseniato de sodio, y</sup> fosfato de sodio y potasio, todos 0.1 M en sus aniones; además se hicieron dos ensayos, uno con fosfato 0.05 M y otro con fosfato y fluoruro, ambos 0.5 M. No se pudo utilizar yoduro ni sulfocianuro de potasio por interferir con el método permanganométrico de titulación de fumarato.

De acuerdo con los resultados de activación relativa, las sales estudiadas pueden clasificarse en dos grupos: uno comprende al fluoruro, cloruro, bromuro y nitrato, sales todas que o no han tenido influencia en la actividad (como el fluoruro de sodio) o la han disminuido en un 15-20 % (las otras tres sales monovalentes). El otro grupo en cambio ha demostrado un neto efecto activador: para el borato se observa un aumento de actividad de 32%, y las otras sales doblan la actividad: el sulfato la aumenta 94%, el fosfato (promedio para 0.1 M) 101%, y el arseniato (el más potente activador entre los ensayados) 124%. Es interesante observar que el fosfato en concentraciones menores (0.05 M) es un activador todavía más eficaz, pues la actividad sube en presencia del mismo 132% (efecto ya encontrado con la enzima de conejo por Clutterbuck<sup>(27)</sup> y por Davydova<sup>(28)</sup> con la preparación de Laki y Laki<sup>(29)</sup>).

Sugerido por ciertos resultados obtenidos con la succinoxidasa (Slater y Bonner<sup>(30)</sup>, Stoppani y Brignone<sup>(31)</sup>) se ha ensayado el posible efecto sinérgico de los iones fosfato y fluoruro, actuando simultáneamente en concentración 0.05 M (cada uno). Se observa una activación ligeramente menor que para el fosfato 0.05 M solo, pero este efecto no es comparable a los obtenidos en el sistema enzimático citado.

De la comparación de los efectos observados con series de sales de un mismo anión (como el cloruro) o catión (sodio o potasio) se puede establecer el papel de las diferentes especies iónicas en las in

hibiciones y activaciones obtenidas.

Respecto del efecto de los cationes, en la Tabla III se ve que las diferencias en poder inhibitor de los diversos cloruros ensayados, son poco significativas, aún con cationes de carácter tan divergente como el  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  frente al  $\text{Hg}^{++}$  o  $\text{Pb}^{++}$ . Si se toma en cuenta que la concentración de  $\text{Cl}^-$  en todos los experimentos era la misma, ese efecto inhibitor se interpreta fácilmente atribuyéndolo al anión  $\text{Cl}^-$ . Esta interpretación se ve apoyada por una comparación con los resultados obtenidos en la Tabla IV con diversos halogenuros de sodio y potasio: mientras que el fluoruro de sodio 0.1 M no tiene efecto cinético sobre la reacción, los cloruros de sodio y de potasio 0.025 M (Tabla III) inhiben 6 y 3 %, y el cloruro de potasio 0.1 M (Tabla IV), 19 %, respectivamente. Aquí se ve que el efecto de la sal de sodio ha variado al tenerse como fluoruro (sin inhibición) o como cloruro (que en concentración cuatro veces menor, inhibe); y también que al aumentar la concentración de  $\text{Cl}^-$  de 0.025 M a 0.1 M las inhibiciones observadas en la Tabla III se cuadruplican, aproximadamente. Todo esto nos hace pensar que los cationes ensayados no influyen significativamente sobre la actividad hidratante de la enzima en las condiciones experimentales elegidas. (aún cuando se puede prever desplazamientos del equilibrio enzimático en presencia de los cationes alcalinotérreos, por formación de complejos con los sustratos, disociados en diferente grado<sup>(52)</sup>).

Aceptada la conclusión anterior, cabe admitir entonces que los efectos activadores o inhibidores observados, corresponden primordialmente a los aniones presentes. Esta interpretación coincide con las de investigadores que han trabajado con otras fumarasas: Mann y Woolf<sup>(24)</sup>, con células de *Escherichia coli*, Massey<sup>(25)</sup>, y Alberty y col.<sup>(32)</sup>, con enzima de cerdo.

Sobre su modo de acción, sólo tenemos un indicio que está de acuerdo con los resultados de los autores mencionados: la relación de actividades hidratantes medidas en presencia de fosfato 0.10 M a pH 6.0 y 7.0 (véase la Tabla II y el Gráfico I, Cap. II) es aproxima



damente 0.7, en ausencia de fosfato, para los mismos pH (Tabla II y Gráfico II de este capítulo) es aproximadamente 1.2. Esta inversión de la relación de velocidades respecto de la que se observa en ausencia de sales indica una activación mucho mayor a pH 7.0 que a 6.0. Podemos estimar el grado de activación por fosfato 0.1 M a pH 6.0 combinando estos resultados con el de la Tabla IV sobre activación por fosfato 0.1 M a pH 7.0: siendo A,6 y A,7 las actividades relativas a pH 6.0 y 7.0, en ausencia de fosfatos, y AP,6 y AP,7 las correspondientes actividades relativas en presencia de fosfato 0.1 M:

$$\frac{A,6}{A,7} = 1.2 \quad ; \quad \frac{AP,6}{AP,7} = 0.7 \quad ; \quad \frac{AP,7}{A,7} = 2.0 \quad \therefore \quad \frac{AP,6}{A,6} = 1.1 .$$

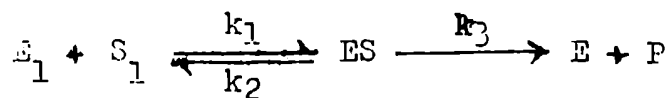
Resulta de este cálculo aproximado que la activación a pH 6.0 por fosfato 0.1 M sería de 1.1 veces, comparada con la que tiene lugar a pH 7.0, de 2 veces. En estudios de este tipo, Mann y Woolf<sup>(24)</sup> habían llegado con fosfato 0.2 M a 37°C a las relaciones de 1.05 y 3.1 veces, a pH 6 y 7; y Massey<sup>(25)</sup> observó con fosfato 0.067 M a 23°C, 1.9 y 3.1 veces, respectivamente. Para estas discrepancias son válidas las reservas hechas respecto de la curva de pH: nuestras medidas de actividad implican observar la resultante de la diferencia de dos procesos, la hidratación del fumarato y la reacción inversa, a expensas del producto formado; ambas reacciones son afectadas diferentemente por los cambios de pH y por el fosfato presente, y ello, debido a las diferentes condiciones experimentales, puede motivar, en parte, que nuestros resultados no sean totalmente comparables a los ya apuntados.

Sin embargo, éstos son en líneas generales semejantes a los ya descritos con otras fumarasas: además de la falta mencionada de efectos cinéticos de los cationes alcalinos y alcalinotérreos (excepto una activación por Mg<sup>++</sup> encontrada por Jacobsohn y Pereira<sup>(33)</sup>) se ha observado que los aniones fluoruro<sup>(34)</sup>, cloruro, bromuro, ioduro y sulfocianuro<sup>(25)</sup> son inhibidores, y que los aniones fosfato<sup>(24,25,27,28,32,33,35)</sup>, citrato<sup>(24,25)</sup>, sulfato<sup>(25,33)</sup>, arseniato, arsenito, borato y selenato<sup>(25)</sup> son activadores. La inhibición de los primeros se

produce disminuyendo la rama ácida de la curva de actividad vs. pH, lo que corre el óptimo de actividad (disminuida) hacia los pH más altos; los iones activadores también corren el pH óptimo al alcalino, pero exaltando la rama alcalina de la curva<sup>(24,25)</sup>. Nuestras observaciones sobre la activación por el fosfato ensamblan muy bien en este modo general de acción, por cuanto la activación a pH 6 (rama ácida) es mucho mayor que a pH 7.0 (rama alcalina).

### 3- Las constantes cinéticas de la reacción de hidratación.

Desde el clásico trabajo de Michaelis y Menten<sup>(36)</sup>, se ha generalizado la interpretación de las características cinéticas de las reacciones enzimáticas en términos de un modelo que en su concepción original comprende la formación reversible de un complejo intermedio a partir de la enzima y el sustrato, el cual tiene la propiedad de descomponerse irreversiblemente en los productos de la reacción regenerando la enzima libre:



donde  $E_1$ , enzima libre;  $S_1$ , sustrato libre; ES, complejo intermedio; P, productos de la reacción total;  $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_3$ , velocidades específicas de las respectivas reacciones individuales. El desarrollo de este mecanismo nos lleva a la expresión de la velocidad inicial de reacción

$$v_i = \frac{V_m \cdot s}{s + K_M}$$

donde  $s$ , concentración total de sustrato;  $V_m = k_3 \cdot E_0$ , velocidad máxima o límite (a altas concentraciones de S), proporcional a la concentración de la enzima;  $E_0$ , concentración total de enzima;  $K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$  constante de Michaelis para el sustrato (en la interpretación de Briggs y Haldane<sup>(36a)</sup> para el estado de flujo estacionario), que dentro de amplios límites es independiente de la concentración de enzima.

Este mecanismo escueto ha sido objeto de modificaciones, agregados y ampliaciones que han permitido interpretar muchos resultados cinéticos con enzimas diversas (a este respecto es un buen ejemplo la fumarasa de corazón de cerdo<sup>(37)</sup>). Pero un primer ataque al problema

consiste en el estudio de la aplicabilidad de la relación de Michaelis-Menten a los resultados cinéticos experimentales.

Se suele para ello estudiar, para cantidades iguales de enzima, la relación entre las concentraciones iniciales de sustrato y las velocidades iniciales observadas, representando funciones adecuadas de las mismas. Así se ha sugerido, entre otros, los métodos de representación de Michaelis y Menten ( $v_i$  vs.  $s$ ), Lineweaver y Burk (38) ( $\frac{1}{v_i}$  vs.  $\frac{1}{s}$ ), y Steadie (39) y Hofstee (40) ( $\frac{v_i}{s}$  vs.  $v_i$ ), cada uno con propiedades especiales, que permiten observar si se cumple la hipótesis de los primeros, y computar sus constantes características  $K_M$  y  $V_M$ .

En nuestro caso hemos aplicado el método gráfico de Lineweaver y Burk, representando las inversas de ambas variables  $v_i$  y  $s$ ; la ecuación de Michaelis-Menten da en esta forma una recta cuya ordenada al origen es  $1/V_M$  y cuya abscisa al origen es  $-1/K_M$  (Dixon (41)).

Resultados: Hemos medido por el método espectrofotométrico de Racker (11) a pH 7.0 y temperatura ambiente (aprox. 20°C) las velocidades iniciales de hidratación de concentraciones variables de fumarato de sodio, por cantidades iguales de enzima, en presencia de fosfato 10 y 100 mM, los resultados obtenidos se agrupan en la Tabla V, y hemos representado sus inversas en el Gráfico III.

Se puede observar que el tipo de curva obtenida a baja y a alta concentración de fosfato es muy diferente. En tanto que la segunda nos da prácticamente una recta (curva C) tal como lo prevé la teoría de Michaelis-Menten, los puntos para fosfato 10 mM no se alinean sino que las dos ramas lineales A y B de la curva, a bajas y altas concentraciones de sustrato, respectivamente, se unen por un segmento de curva con un pronunciado cambio de dirección, entre 4.0 y 6.66 mM de concentración de fumarato. Considerada cada una de las tres rectas A, B, C, independientemente, las constantes cinéticas que las definen son

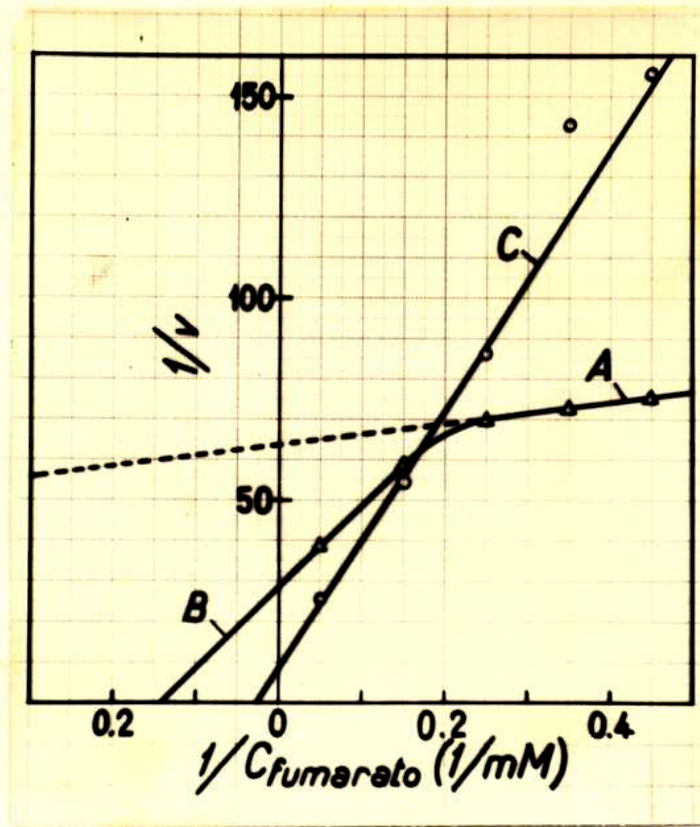
Tabla V

Constantes cinéticas del sistema fumarato-fumarasa:  
velocidades iniciales de hidratación

Se mide la variación de la densidad óptica del sistema reaccionante ( $\lambda=300$  micromicrones, camino óptico = 1 cm) en función del tiempo; se extrapola gráficamente la velocidad inicial  $v_i = dD/dt$ . enzima, 1 u/ml sustrato, fumarato de sodio; medio de reacción, fosfato 10 o 100 mM pH 7.0, a temperatura ambiente (aprox. 20°C).

Fosfato, concentración mM	Fumarato, concentración inicial, mM	Velocidad inicial $v_i$ $10^{-3} \text{ min}^{-1}$
10	20	26
	6.66	17
	4.0	14
	2.86	13.7
	2.22	13.2
100	20	39.2
	6.66	18.3
	4.0	11.6
	2.86	7.0
	2.22	6.4

Gráfico III



Obtención de las constantes cinéticas del sistema fumarato - fumarasa, en fosfato diluido y concentrado.

Representación según el método de Lineweaver y Burk<sup>(38)</sup>, de los resultados de velocidades iniciales de la Tabla V. Curvas A y B,  $\Delta$  : reacciones en fosfato 10 mM; curva C,  $\circ$  : reacciones en fosfato 100 mM; pH 7.0; temperatura, 20°C (aprox.).

	$K_M$ , mM	$V_m$ , $10^{-3} \text{min}^{-1}$
Recta A (fosfato 10 mM, entre 2.22-4.0 mM fumarato)	0.40	15.8
Recta B (fosfato 10 mM, entre 6.66-20 mM fumarato)	7.2	35.5
Recta C (fosfato 100 mM, entre 2.22-20 mM fumarato)	40	120

En estos resultados se observa una dependencia muy acentuada de las constantes cinéticas con las concentraciones de sustrato y de buffer, la que indica que en esta enzima opera un mecanismo de reacción más complejo que el supuesto por Michaelis y Menten, especialmente cuando la concentración de fosfato es baja; cuando ésta aumenta el mecanismo de Michaelis-Menten vuelve a operar, observándose la recta C correspondiente a su vigencia.

Con estas constantes se podría calcular, dentro de los ámbitos de validez respectivos, la velocidad inicial de hidratación para una dada concentración de fumarato, en las condiciones de la experiencia. En el intervalo de fumarato 4.0-6.66 mM para medios de fosfato 10 mM, las constantes serán intermedias entre las de las rectas A y B, y estarán dadas por la pendiente de la curva en cada punto.

De estas constantes sólo tienen valor absoluto las  $K_M$ , independientes de la concentración de enzima; las  $V_m$  sólo tienen valor relativo entre sí, puesto que en nuestros experimentos no conocemos la concentración molar  $E_0$  que permitiría obtener las constantes  $k_3$  (que sí tienen valor absoluto). Por lo tanto las  $K_M$  se prestan a ser comparadas con las obtenidas para otras fumarasas.

Las primeras estimaciones de la constante de Michaelis de la fumarasa fueron hechas por Jacobsohn<sup>(42)</sup> (a 37°C y pH neutro, sin buffer, con extracto de hígado, obtuvo  $K_M = 3$  mM) y por sus colaboradores Pereira y Da Cruz<sup>(43)</sup> (que en las condiciones anteriores tuvieron  $K_M = 3.5$  mM). Massey, trabajando con enzima de cerdo cristalizada, en ausencia o presencia de fosfato 0.06 M, a 23°C, determinó a pH 6.35  $K_M = 1.8$  mM<sup>(25)</sup>, y a pH 7.0 (en fosfato), 3.3 mM<sup>(22)</sup>, sin observar ningún efecto del sustrato sobre las constantes cinéticas en un intervalo de

concentraciones de fumarato 1.66-8.3 mM, tanto en ausencia de buffer como en presencia de fosfato.

Sin embargo, la fuerte dependencia de las constantes cinéticas con la concentración de fumarato y de fosfato, que ya hemos descrito para la enzima de levadura, ha sido hallada sin lugar a dudas para la fumarasa de cerdo, posteriormente al trabajo de Massey. Alberty y col.<sup>(32)</sup> encontraron que a 25°C. para una dada concentración de fosfato, se obtenían curvas de Lineweaver-Burk cuyas constantes cambiaban con la concentración de fumarato, tal como hemos visto con nuestra enzima, y el aumento de la concentración de fosfato causaba un correlativo aumento de ambas constantes cinéticas para bajas concentraciones de fumarato, y una disminución de la  $K_M$  a altas concentraciones de sustrato. Un detalle de interés es la coincidencia de sus resultados de  $K_M$  a 25°C para fosfato 5 y 15 mM con nuestras determinaciones de  $K_M$  para fosfato 10 mM:

Concentración de fosfato, mM		5	15	
$K_M$ , mM	pH 6.5 <sup>(32)</sup>	bajas $C_{\text{fumarato}}$	0.13	0.47
		altas $C_{\text{fumarato}}$	14.0	6.6
	pH 7.3 <sup>(44)</sup>	bajas $C_{\text{fumarato}}$	0.26	0.33

También es semejante la relación entre las  $V_m$  a alta y baja concentración de fumarato: a pH 6.5, para fosfato 5 y 15 mM obtienen respectivamente 2.4 y 1.6, nuestros resultados nos dan una relación de 2.25.

En cambio el efecto de altas concentraciones de fosfato (100 mM) es completamente diferente: nuestra recta, como los resultados de Alberty y col., muestran que el fosfato concentrado es capaz de suprimir los efectos de una concentración de fumarato creciente sobre la cinética de la reacción. Pero mientras que estos autores encuentran que sus  $K_M$  a altas y bajas concentraciones de sustrato convergen a un valor de 3.3-2.0 mM (pH 6.5-7.3) cuando la concentración de fosfato aumenta, nuestro resultado es más de diez veces mayor. Una cosa parecida ocurre con la  $V_m$ : en nuestro caso el fosfato concentrado

cuadruplica la velocidad obtenible a altas concentraciones de fumarato con fosfato diluido, y con la enzima de cerdo la activación es bastante menor.

Es interesante notar que con la enzima de levadura, al pasar de fosfato diluido al concentrado (10 a 100 mM) en tanto la velocidad límite crece unas 3.5 veces, la  $K_M$  ha aumentado en casi 6 veces su magnitud. Este efecto prevé que trabajando en concentraciones de sustrato no saturantes, la activación por aumento de la  $V_m$  no es tan intensa como la tendencia a una inhibición por aumento de la  $K_M$ , y que con aumentos adecuados de la concentración de fosfato, podríamos llegar a observar una disminución de la actividad hidratante de la enzima, cuya intensidad dependerá de la concentración de fumarato. Esta situación efectivamente se ha podido verificar experimentalmente: la actividad de la enzima frente al fumarato 0.025 M (concentración no saturante) en medios de fosfato 0.05 M (18.5 unidades) es 12% mayor que la observada en fosfato 0.10 M (16.5 unidades) (Tabla IV), lo que indica un efecto inhibitor del fosfato en altas concentraciones, que corrobora lo anterior. Esto implica la existencia de una concentración óptima de fosfato, intermedia, que en otras fumarasas (conejo, vacuno) es justamente 0.05-0.052 M<sup>(27,28)</sup>.

### iii) Acción de diversos inhibidores

Además de los aniones monovalentes ya vistos anteriormente, actúan como inhibidores de la fumarasa una serie de sustancias de muy diversa naturaleza, y cuyos mecanismos de acción son también muy diferentes. Junto con varios compuestos orgánicos sencillos, relacionados estructuralmente a los sustratos de la enzima<sup>(45)</sup>, y que son inhibidores competitivos de la fumarasa de cerdo<sup>(46)</sup>, se ha encontrado que otras sustancias como los metales pesados<sup>(47,48)</sup>, los colorantes ácidos y básicos<sup>(35)</sup> y sustancias tripanocidas<sup>(49)</sup>, y ciertos polielectrolitos naturales como la heparina<sup>(50)</sup>, decrecen la actividad de las distintas fumarasas. En ensayos hechos con los nitratos de cobre y plata (metales pesados), el agente quimioterápico tripanocida



urea simétrica del m-aminobenzoil-m-amino-p-metilbenzoil-l-naftilamino-4,6,8-trisulfónico (Bayer 205, Moranyl, Suramin, Antrypol, y en lo sucesivo abreviado como B205), y el ácido l-naftilamino-4,6,8-trisulfónico (en lo sucesivo NATS) que es parte de la molécula del anterior; se comprobó que estas sustancias inhiben la enzima de levadura, como a sus homólogas de otros orígenes.

Parte experimental: La preparación de enzima (precipitada entre 0.45 - 0.60 saturación de sulfato de amonio) se incubó en alícuotas iguales con los cuatro inhibidores, a pH 7.0 y 30°C, en ausencia de sales (fosfato residual,  $7 \times 10^{-5}$  M) durante 15 minutos. Inmediatamente se dosó la actividad con fumarato de Tris 0.025 M pH 7.0 (4 ml) en ausencia de fosfato. Medido el consumo de fumarato por permanganimetría, se calculó con el Gráfico I, Cap. II, la actividad remanente (en unidades enzimáticas). Se define la inhibición

$$I \% = 100 \frac{\text{Actividad con inhibidor}}{\text{Actividad sin inhibidor}}$$

Resultados: Como se indica en la Tabla VI, los cationes pesados Cu y Ag y el B205, en concentración 1 mM, inhiben totalmente la enzima; con NATS 5 mM se llega a una inhibición casi total, 86 %. Estos resultados son análogos a los obtenidos por Jacobsohn y col. (47,48) para la fumarasa de hígado de varios mamíferos tratada con cationes pesados ( $10^{-3}$  a  $10^{-2}$  M), y también se asemejan a los de Quastel (49) con diversos ureídos y sus ácidos sulfónicos constituyentes. Este último encontró que el B205 y una serie de ureídos de naftilaminodisulfónicos análogos, en concentración aproximada 0.2 mM, inhibían casi totalmente (para el B205 0.19 mM, I = 68 %) la fumarasa de cerebro de mamífero, y comprobó que los ácidos disulfónicos constitutivos eran inactivos en concentraciones cuatro veces mayores (0.8 mM).

Nuestros resultados, obtenidos con concentraciones de B205 y NATS 5 y 6 veces mayores que las respectivas en el trabajo de Quastel, demuestran con inhibiciones también mayores la diferencia de actividad inhibidora entre los ureídos complejos de alta afinidad por

Tabla VI

Inhibición de la hidratación enzimática del fumarato  
en presencia de diversas sustancias

Incubación de la enzima (14 unidades, 4.1 mg proteína) en fosfato  $7 \times 10^{-5}$  M pH 7.0 (3.5 ml totales) con varios inhibidores, durante 15 minutos. Dosaje de la actividad remanente con fumarato de Tris  $2.025 \times 10^{-5}$  M pH 7.0 (4 ml); temperatura, 30°C. Experiencias por duplicado.

Inhibidor	Concentración (4 ml) $10^{-3}$ M	Actividad remanente, u	Inhibición %
---	---	7.2	--
$(\text{NO}_3)_2\text{Cu}$	1.0	0	100
$\text{NO}_3\text{Ag}$	1.0	0	100
B205	1.0	0	100
NATS	5.0	1	86

la enzima, y sus ácidos sulfónicos libres.

No se puede establecer, en base a nuestros experimentos, la naturaleza de la acción inhibitoria del B205 y del NATS. Estudios realizados con la succinodeshidrogenasa<sup>(57)</sup> demostraron para ambos reactivos una inhibición competitiva. Con la fumarasa de levadura *Saastel* observó un efecto protector del fumarato frente a ureídos análogos del B205, lo que podría sugerir para este caso un mecanismo de inactivación no competitivo sino poco reversible, pero sus resultados, obtenidos a pH 7.4 y 45°C, son inseguros, por la posibilidad de efectos de inactivación térmica y su protección por el fumarato, difíciles de estimar (al respecto véase más adelante "Observaciones sobre la inactivación térmica de la fumarasa"). En cuanto a la inactivación por  $Ag^+$  y  $Hg^{++}$ , las altas concentraciones de reactivo usadas no permiten hasta ahí asignar significado específico a ese efecto. En la acción siguiente se demuestra que la fumarasa de levadura tiene tipos libres esenciales para su actividad catalítica; ello explica la inhibición por metales pesados, pero ésta también podría producirse por otros mecanismos que no involucren sulfhidrilos.

#### Estudios sobre sulfhidrilos esenciales para la actividad catalítica

Las teorías actuales sobre la actividad enzimática admiten que el poder catalítico que tienen ciertas proteínas sobre su sustrato está dado por la estructura particular de aquéllas, y dentro de este concepto general, por la existencia y configuración de ciertos grupos en las cadenas laterales de los aminoácidos constituyentes, primordiales para esa actividad catalítica.

La dilucidación de las estructuras de los "centros catalíticamente activos" exige previamente el conocimiento de la naturaleza de esos grupos laterales indispensables. En general, en una proteína se podrán encontrar las cadenas laterales correspondientes a la veintena de aminoácidos que se han identificado como sus constituyentes naturales. De estos restos de aminoácidos, varios tienen propiedades

especiales por su reactividad iónica: sus grupos guanidino, amino, oxhidrilo fenólico, sulfhidrilo, imidazol y carboxilo intervienen en equilibrios ácido-base regulados principalmente por el pH de la solución, y que obedecen a constantes termodinámicas características de cada grupo terminal ionizable. El estudio de la dependencia de la actividad biológica de una proteína respecto del pH y la temperatura ha permitido correlacionar los cambios de actividad con las variaciones en la ionización de ciertos grupos funcionales en la molécula, estableciendo así la participación directa o indirecta de los mismos en el proceso que se estudia. Este método ha sugerido los grupos funcionales responsables de la actividad catalítica de varias enzimas (37,53), entre ellas la fumarasa de corazón de cerdo (26,46).

Sin embargo los resultados están sujetos a críticas, porque la correlación con el pH o la temperatura se hace de acuerdo a un cierto modelo de mecanismo elegido para la interpretación de los datos experimentales, y además porque las constantes termodinámicas halladas pueden atribuirse a más de un grupo funcional, debido a la superposición de los intervalos de variación de las mismas en las diferentes proteínas.

Otra solución del problema consiste en el uso de reactivos específicos para los distintos grupos funcionales, que los modificarían de manera de no poder ejercer más su función catalítica o auxiliar. Se han desarrollado en este sentido procedimientos para bloquear diversos grupos (55), como los amino (acetilación, uso de formaldehído, formación de derivados guanidínicos), y también se han intentado métodos semejantes para grupos fenólicos, carboxilos, oxhidrilos alcohólicos, etc., pero la realización de estas reacciones exige a veces condiciones muy drásticas, que desnaturalizan o alteran totalmente la molécula proteica, perdiéndose su actividad por esta causa; además la posibilidad de bloquear paralelamente otros grupos de la proteína quita especificidad y significado a los resultados.

Los únicos grupos funcionales que ha sido posible atacar con reactivos de alta especificidad son los puentes disulfuro de los res

tos de cistina y los grupos sulfhidrilo de la cisteína, especialmente los últimos.

Esta condición ha permitido realizar numerosos estudios sobre la existencia y propiedades biológicas de estos grupos en proteínas de diferentes funciones: hormonas, antígenos, proteínas séricas, y enzimas<sup>(55,56)</sup>.

Los primeros estudios sobre sulfhidrilos enzimáticos esenciales establecieron que varias enzimas hidrolíticas eran enzimas tioles (entre ellas la urcasa y la papaína)<sup>(57)</sup>. En 1938 se incorporaron a esta categoría dos enzimas de los procesos redox, la succino-<sup>(58)</sup> y la triosafosfato deshidrogenasa<sup>(59)</sup>; la lista ha ido en aumento y en la actualidad se conocen numerosas enzimas que actúan en procesos hidrolíticos, redox, isomerizaciones, fosforilaciones, etc., y que requieren sulfhidrilos libres<sup>(60)</sup>.

Este requerimiento dió origen a la primitiva idea sobre la regulación de los procesos enzimáticos "in vivo", mediante los equilibrios  $-SH \longleftrightarrow -SS-$  a que están sometidos los sulfhidrilos del medio biológico (el glutatión entre ellos) y que en las enzimas tioles fijarían la proporción de las formas activa e inactiva respectivamente<sup>(57)</sup>.

Los descubrimientos de Hopkins y col.<sup>(61)</sup> sobre la protección de los tioles de la succinodeshidrogenasa por el sustrato, el producto y el inhibidor competitivo malonato, y de Rapkine<sup>(59)</sup> sobre una protección análoga de la triosafosfato deshidrogenasa por la coenzima respectiva, el DPN, iniciaron un nuevo rumbo en estos estudios que posteriormente llevó a otra concepción sobre el papel esencial y dinámico de los sulfhidrilos en el mecanismo íntimo de ciertas reacciones enzimáticas<sup>(63)</sup>; en éstas los grupos tioles actuarían uniendo la enzima a un componente fundamental de la reacción: el sustrato<sup>(64)</sup> o la coenzima<sup>(65)</sup> (ciertas deshidrogenasas), o el grupo prostético metálico (ciertas hidrolasas)<sup>(60)</sup>.

Con respecto a la naturaleza de enzima tiol de la fumarasa, las evidencias obtenidas con diferentes preparaciones han sido con-

tradietólicas. Jacobsohn y col. (47,66a,b) han obtenido inactivaciones completas de la enzima de hígado de conejo y de cerdo, utilizando  $\text{Ag}^+$  (reactivo no específico), y Laki<sup>(67)</sup> inactivaba 50 % su preparación de corazón de vacuno con ácido iodoacético (reactivo para tioles, de regular especificidad). En cambio la fumarasa cristalizada de corazón de cerdo no fué inactivada por una serie de potentes reactivos específicos para sulfhidrilos (Massey<sup>(46)</sup>).

Para establecer los requerimientos de tioles de la fumarasa de levadura, hemos empleado tres reactivos de sulfhidrilos, de alta especificidad: el arsenical trivalente monosustituido 3-melaminilfenilarsenóxido<sup>(60)</sup>, el mercurial p-cloromercuribenzoato de sodio<sup>(68)</sup> y el oxidante o-iodosobenzoato de sodio<sup>(69)</sup>. Los tres son capaces de reaccionar con los tioles libres, a pH 7, dando respectivamente las di- y monomercaptidos (As y Hg), y con bajas concentraciones del oxidante, el disulfuro correspondiente. Con estos reactivos hemos estudiado la inhibición de la enzima y su reactivación por la cisteína, y la protección por los sustratos y el fosfato.

Material y métodos experimentales: Se han empleado los siguientes reactivos para tioles: nitrato de plata purís., 3-melaminilfenilarsenóxido de Ray & Baker (en lo sucesivo designado como Melarsen), ácido o-iodosobenzoico, 99.5 % puro<sup>(70)</sup> (en adelante IOBz), y ácido p-cloromercuribenzoico preparado según Whitmore y Woodward<sup>(71)</sup> (que designamos como ClHgBz). El Melarsen se disolvió como clorhidrato, y los dos ácidos IOBz y ClHgBz como sales sódicas. Como reactivador se utilizó cisteína (clorhidrato) de British Drug Houses. El agua empleada fué siempre destilada sobre vidrio.

En todos los experimentos, realizados a pH 7.0 y 30°C, el inhibidor, neutralizado antes de su uso, se mezclaba con la enzima en un medio de reacción de la composición indicada, y agregando los reactivos en el orden que se especifica; se dejaba reaccionar un cierto tiempo, y se agregaba fumarato de Tris de pH 7.0 hasta una concentración de 0.025 M en 4 ml. Se incubaba durante 5 minutos (salvo in-

dicación en contrario), se interrumpía la reacción con ácido tricloroacético y se procedía a la determinación de la actividad remanente en la forma habitual. Para cada composición del líquido de dosaje se realizaban dosajes de actividad en que se excluía el inhibidor. En general las experiencias se hacían por duplicado. La inhibición I % observada en cada caso se calcula para pares de experimentos con y sin inhibidor, en igual medio de dosaje:

$$I \% = 100 \frac{\text{Actividad remanente en presencia del inhibidor}}{\text{Actividad observada en ausencia del inhibidor}}$$

El proceso de reactivación por cisteína se estudió con la enzima inhibida por cantidades crecientes de ClHgBz. A los 5 minutos de mezclar el inhibidor con la enzima se agregaba una misma cantidad de solución de cisteína (neutralizada y diluída inmediatamente antes), se incubaba otros 5 minutos y se dosaba la actividad remanente en la forma habitual. Paralelamente se hizo una serie de experimentos de control con inhibidor sin cisteína, y controles de actividad sin inhibidor. Se define la reactivación

$$R \% = 100 \left( 1 - \frac{\text{Inhibición (con reactivación) \%}}{\text{Inhibición (sin reactivación) \%}} \right).$$

Los experimentos de protección por los sustratos y otros iones se dispusieron de varias maneras: la protección por el fumarato frente al Melarsen y el IOBz (reactivos lentos) pudo ser observada utilizando pequeñas cantidades de enzima, a las que se agregaba el inhibidor, en ausencia o en presencia del sustrato (en este último caso el fumarato se agregaba inmediatamente antes). Para tener una inhibición razonable el tiempo de reacción con el inhibidor debió extenderse 11 minutos: en esta forma debió también prolongarse mucho (50 minutos) el tiempo de incubación con el sustrato, para que en la experiencia con protección el período inicial de 11 minutos en el que se desarrollaban paralelamente la actividad de la enzima y su reacción con el inhibidor, fuese relativamente pequeño respecto de toda la incubación con el sustrato. Por esta razón las cifras de actividades remanentes (calculadas con la curva para 5 minutos de incubación) sólo son cualitativamente válidas, pero dan una clara indica-

ción del grado de protección que otorga la presencia del sustrato. Frente al p-cloromercuribenzoato no fué necesario prolongar las incubaciones debido a la alta velocidad de la reacción de inhibición: el dosaje de la actividad residual se realizó en 5 minutos. Con este reactivo se estudió también la influencia de la concentración del sustrato en la protección obtenida.

Los ensayos de protección por el L-malato se hicieron agregando a la enzima este sustrato en concentración  $1 \times 10^{-3}$  M, inmediatamente antes de la mezcla con el inhibidor, por lo que se puede considerar que en el comienzo del experimento actuaba el L-malato en su mayor proporción como tal y no como fumarato, producto de la deshidratación de aquél. Para estimar el efecto de la presencia del L-malato sobre el posterior dosaje de actividad, hemos considerado que en el momento de iniciar éste, se había alcanzado el equilibrio de deshidratación: partiendo de  $2 \mu$  moles de L-malato se llegaba a aproximadamente  $1.6 \mu$  moles de L-malato y  $0.4 \mu$  moles de fumarato. En estas condiciones se agregaba para el dosaje  $100 \mu$  moles de fumarato; a los 5 minutos se titulaba el fumarato residual. Como se puede ver, la suma de L-malato y fumarato (para la protección), es el 2 % del sustrato utilizado en la medida de la actividad; el efecto puede ser considerado despreciable.

El buffer fosfato 0.1 M pH 7.0 y el CLK 0.44 M (de fuerza iónica doble del anterior) fueron ensajados como protectores; para cada uno de ellos se medía la actividad residual en presencia del mismo, comparando los resultados sin inhibidor, con inhibidor y posterior agregado del protector, y con inhibidor previo agregado del protector. Se estudió esta influencia protectora frente a tres reactivos de sulfhidrilos; en cada caso se dejó el tiempo de inhibición que la experiencia previa indicaba como satisfactorio.

En los experimentos con protectores se definió la protección

$$P \% = 100 \left( 1 - \frac{\text{Inhibición (con protector) \%}}{\text{Inhibición (sin protector) \%}} \right)$$



Resultados: La fumarasa de levadura es inhibida por los reactivos para sulfhidrilos: el agente oxidante IOBz (0.5 mM) y los formadores de mercaptidas ClHgBz (0.5 mM) y Melarsen (0.25 mM) deprimen la actividad en 100, 100, y 66 % respectivamente, y el nitrato de plata (iones  $Ag^+$ , reactivo no específico) 0.01 mM ha inhibido también la enzima en 100 % (Tabla VII).

a) La capacidad inhibitoria de los distintos reactivos:

En experimentos llevados a cabo para estudiar las mejores condiciones de inhibición con un mínimo de reactivo (Tabla VIII), se obtuvieron resultados que indican una muy diferente capacidad inhibitoria según el reactivo empleado. Si bien esa capacidad depende de la preparación enzimática estudiada, y también del tiempo de reacción con el inhibidor, se puede separar netamente a los agentes empleados en dos tipos de acuerdo a su acción sobre la enzima: los reactivos lentos y de baja potencia, y los rápidos y muy potentes.

El Melarsen y el IOBz forman la primera categoría: dada una cierta proporción inhibidor/proteína, se requiere un tiempo considerable, 30 a 60 minutos, para que a 30°C se desarrolle completamente la inhibición. En períodos de 30 minutos se han obtenido inhibiciones totales con proporciones de  $500 \times 10^{-9}$  moles/mg de proteína (Tablas VII, y VIII, Series I y II) aún cuando en otros experimentos (Tabla XV) ha resultado insuficiente esa cantidad de inhibidor.

El otro tipo de reactivos está dado por el ClHgBz y el ión  $Ag^+$ . Con el primero se requieren (según la preparación de enzima) 40, 20 y aún  $15 \times 10^{-9}$  moles/mg de proteína (Tablas VIII, XIV, y XI) para obtener inhibiciones totales; el segundo es aún más potente: resulta inhibidor total en concentraciones  $1 \times 10^{-5}$  M, y con  $8.5 \times 10^{-9}$  moles/mg de proteína (Tabla VII). El tiempo de reacción para el ClHgBz puede ser acortado (Tabla X-B, serie II) merced a la propiedad de los sustratos de proteger a la enzima contra los reactivos de sulfhidrilos (como se verá luego): la mezcla de enzima y ClHgBz, en proporción de  $20 \times 10^{-9}$  moles/mg proteína, que daba una inhibición límite de 87 %, se incubaba a 30°C, y al cabo de tiempos decrecientes se agregaba

Tabla VII

Inhibición por reactivos de sulfhidrilos: experiencias preliminares

Incubación de la enzima (12.5 unidades, 4.1 mg de proteína) en fosfato  $7 \times 10^{-5}$  M pH 7.0 (3.5 ml totales), con varios inhibidores; durante los tiempos indicados; dosaje de la actividad remanente con fumarato de Tris 0.025 M pH 7.0 (4 ml totales) en 5 minutos; temperatura 30°C.

Inhibidor	Concentración $10^{-6}$ M (3.5 ml)	Tiempo de inhibición minutos	Actividad remanente unidades	Inhibición %
Control sin inhibidor		--	6.2	--
Nelarben	250	60	2.1	66
IO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	500	45	0	100
ClH <sub>2</sub> Br	500	45	0	100
AgNO <sub>3</sub>	10	45	0	100

\* Se ha ensayado también el iodoacetato de sodio 0.01 M; el resultado de este experimento no pudo obtenerse por interferir el reactivo con la titulación permanganométrica del fumarato.

Tabla VIII

Inhibición por reactivos de sulfhidrilos: estequiometría del proceso

Incubación de la enzima en 3.5 ml totales con los inhibidores en las cantidades indicadas, durante 30 minutos (Series I y II) o 10 minutos (Series III, IV y V); dosaje de la actividad remanente con fumarato de Tris 0.025 M (en 4 ml totales), en 5 minutos; pH 7.0; temperatura 30°C. Experimentos por duplicado.

Series I y II, enzima (18.2 unidades, 4 mg proteína) en fosfato  $7 \times 10^{-5}$  M. Series III, IV y V, enzima (respectivamente), 18.2, 15 y 13 unidades, y proteína, 4 mg en las tres; fosfato  $7 \times 10^{-5}$  M y Tris 0.01 M (en 3.5 ml).

Serie	Inhibidor	Concentración (4 ml) $10^{-6}$ M	<u>Inhibidor</u> proteína $10^{-9}$ mol/mg	Actividad remanente unidades	Inhibición %
I y II	Control	sin inhibidor	---	9	---
I	Mclarsen	100	100	2.5	72
		250	250	0.4	95
		500	500	0	100
II	IOBz	50	50	5.3	41
		200	200	1.7	81
III	ClHgBz	sin inhibidor	---	9	---
		50	50	0	100
		200	200	0	100
IV	ClHgBz	sin inhibidor	---	7.5	---
		0.01	0.01	7	7
		0.1	0.1	8	-7
		1.0	1.0	7.8	-5
		10	10	5.5	27
V	ClHgBz	sin inhibidor	---	6.5	---
		5	5	6.1	6
		10	10	5.8	11
		20	20	0.9	86
		30	30	0.1	98.5
		40	40	0	100
		50	50	0	100

el fumarato para el dosaje de actividad; esto interrumpía la reacción de inhibición. Con períodos de 3 y 1 minutos se obtuvo 87 % de inhibición, y la disminución de ésta sólo se observó para períodos de 30 segundos, con  $I = 84$  % (la diferencia de efecto es insignificante), lo que demuestra que la reacción se completaba como máximo en ese tiempo.

Se ha podido estudiar la estequiometría de la inhibición por  $\text{ClHgBz}$  con tres preparaciones enzimáticas distintas tratadas con cantidades crecientes del mercurial (Tablas VIII-Serie V; IX-A, y XIV-Serie III). Aún cuando las cantidades de  $\text{ClHgBz}$  necesarias para obtener la inactivación total de 1 mg de preparación fueron diferentes para cada una de éstas, las formas de las curvas de inhibición resultaron análogas (véase por ejemplo el Gráfico IV, Curva A, para la experiencia de la Tabla IX-A). Se observa una primera zona en que el inhibidor no resulta muy eficaz, un segmento de la curva mucho más empinado en el que tiene lugar la inhibición de la mayor parte de la actividad presente, y una tercera zona con pendiente que tiende a 0, en que se completa la inhibición: las curvas tienen un trazado en S. Si para cada preparación referimos las cantidades de inhibidor usadas a la cantidad necesaria para obtener inactivación total, resulta que para obtener  $I = 10$  % se requiere 20-30 % del inhibidor total, y para  $I = 90$  % se debe agregar 60-80 % del total del inhibidor. Esto nos da 40-60 % del inhibidor para el 80 % de inhibición obtenida en la zona intermedia.

El significado de estos resultados es obvio si recordamos que junto a la enzima existen en la preparación gran cantidad de otras proteínas que presumiblemente tienen grupos sulfhidrilos capaces de reaccionar con el  $\text{ClHgBz}$ ; algunos de estos grupos tendrán una afinidad por el inhibidor mayor que la de la fumarasa, y por lo tanto fijarán en mayor proporción las primeras porciones del mercurial; la enzima y otros compuestos de afinidad semejante fijarán con mayor intensidad las porciones subsiguientes (que dan en la curva la zona local empinada) y cuando la cantidad de grupos libres de este tipo es

to cerca de agotarse, comenzarán otros compuestos a competir por el inhibidor, dando la tercera zona de la curva. Las diferencias observadas en la inhibición de las tres preparaciones provienen de la existencia de distintas cantidades y reactividades de los grupos sulfhidrilos de las mismas: a pesar de ser porciones de una solución enzimática de un solo origen, han sufrido procesos de desnaturalización (revelados por su distinto contenido en enzima) que liberan grupos sulfhidrilos en forma no controlada y variable según las condiciones de esos procesos.

b) La reactivación con cisteína:

Experimentos preliminares indicaron que la enzima parcialmente inhibida por el ClHgBz era reactivada en su totalidad por agregado de cisteínas: así la inhibición de 78 % obtenida con  $15 \times 10^{-9}$  moles de mercurial/mg de proteína, se anulaba totalmente por agregado de  $12.5 \times 10^{-9}$  moles de cisteína (relación cisteína : ClHgBz = 0.83). En experiencias posteriores el efecto reactivante de la cisteína se observó con relaciones mucho menores (Tabla IX): la enzima inactivada con cantidades crecientes de ClHgBz (desde 5 hasta  $37.5 \times 10^{-9}$  moles/mg de proteína, alcanzándose I = 100 % a  $17 \times 10^{-9}$  moles/mg) era reactivada significativamente por una cantidad constante de  $5 \times 10^{-9}$  moles de cisteína/mg de proteína, observándose recuperaciones de 70 - 90 % de la actividad inhibida previamente en 68.5 - 100 %, y aún en presencia de  $37.5 \times 10^{-9}$  moles de inhibidor (que dobla la cantidad necesaria para I = 100 %, y que da una relación cisteína : ClHgBz = 0.13) se tenía una recuperación de 47 %.

Las curvas de inhibición que nos dan estos experimentos (Gráfico IV, Curva A, inhibidor sin cisteína; B, reactivación por cisteína  $10 \mu\text{M}$ ) son muy divergentes: ambas presentan largas porciones lineales con pendiente mucho menor para la curva de reactivación. La falta de paralelismo de ambas curvas demuestra que la reacción del ClHgBz con los tioles de la preparación no es igualmente reversible para todos ellos, por agregado de cisteína; y parecería que la descomposición de la mercaptida de la enzima por la cisteína es más rá-

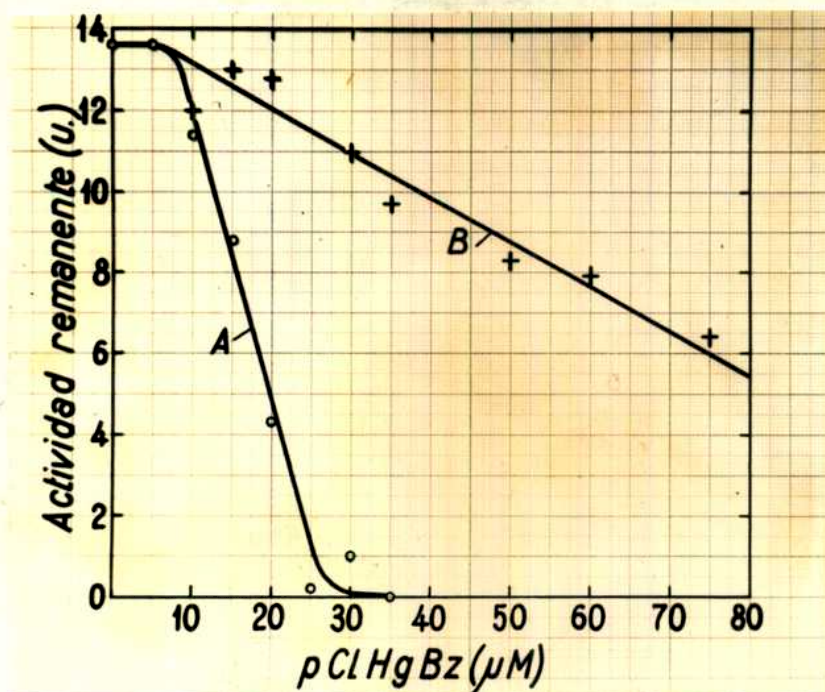
Tabla IX

Inhibición por p-cloromercuribenzoato: reactivación por cisteína

Inhibición de la enzima (13.6 unidades, 4 mg proteína) en 2 ml de Cl Tris 0.025 M pH 6.8, con cantidades crecientes de ClHgBz, durante 5 minutos (A-inhibición); inmediatamente se incubaba con cisteína (diluída antes de usar) durante otros 5 minutos (B-reativación). Dosaje de la actividad remanente de B, de otros experimentos con inhibición A únicamente, y de controles de actividad, con fumarato de Tris 0.025 y fosfato 0.05 M pH 7.0, en 4 ml, durante 5 minutos. Temperatura, 30°C. Los experimentos de reactivación B se comparan con los de inhibición A únicamente, por pares con igual cantidad de inhibidor. La relación inhibidor/proteína, en  $10^{-9}$  moles/mg, es en cada caso 0.5 veces la concentración ( $10^{-6}$  M) de inhibidor (en 2 ml).

Experimento	ClHgBz (2 ml) $10^{-6}$ M	Cisteína (2 ml) $10^{-6}$ M	Actividad remanente unidades	Inhibición %	Reactivación %
Control de actividad		---	13.6	---	---
A-inhibición	5	---	13.6	0	---
	10	---	11.4	16	---
	15	---	8.8	35	---
	20	---	4.3	68.5	---
	25	---	0.2	98.5	---
	30	---	1.0	92.5	---
	35	---	0	100	---
	50	---	0	100	---
B-reativación	10	10	12.0	12	25
	15	10	13.0	4	89
	20	10	12.8	6	91
	30	10	11.0	19	79
	35	10	9.7	29	71
	50	10	8.3	39	61
	60	10	7.9	42	58
	75	10	6.4	53	47

Gráfico IV



Reactivación con cisteína de la enzima inhibida por cantidades crecientes de p-cloromercuribenzoato

Resultados tomados de la Tabla IX. Curva A, inhibición de la enzima en 2 ml, con ClHgBz, durante 5 minutos. Curva B, como la anterior, con incubación posterior con cisteína 10 μM, durante 5 minutos.

pida (comparada con los otros compuestos tiólicicos presentes) que su formación durante la inhibición, por lo que una pequeña cantidad de cisteína la reactiva notablemente, en forma selectiva.

c) Protección de la enzima por los sustratos frente a los reactivos para sulfhidrilos:

El fumarato y el L-malato protegen a la fumarasa contra los reactivos de sulfhidrilos (Tablas X y XI): tanto con IOBz como con Melarsen y ClHgBz, cuando se los incubaba con la enzima en presencia de los sustratos, se observa una disminución muy marcada de su poder inhibitor, que llega a anularse totalmente para el primero. Para poder obtener este efecto protector, especialmente con ClHgBz, se debe trabajar con cantidades de inhibidor no mayores de las necesarias para obtener  $I = 100 \%$ . Sobrepasado mucho ese límite, el sustrato no alcanza a proteger la enzima (Tabla X-B, Serie I con ClHgBz). Una vez elegida la correcta proporción de ClHgBz, se ha podido ver la gran velocidad con que el fumarato actúa como protector (Tabla X-B, Serie II). Mezclando la enzima con la solución de sustrato e inhibidor se obtiene una protección instantánea de  $90 \%$ , semejante a la que se alcanza agregando primero el fumarato y luego separadamente el reactivo de sulfhidrilos.

Ambos sustratos parecen ser muy buenos protectores frente al IOBz y al ClHgBz, y menos frente al Melarsen. El L-malato ensayado frente al ión  $Ag^+$  (que en proporción de  $1.5 \times 10^{-9}$  moles/mg proteína daba  $I = 24 \%$ ) no proporcionó ninguna protección.

Los resultados descritos se obtuvieron con concentraciones de fumarato 25 mM, o L-malato 1.0 mM. Se consideró de interés observar el límite de concentración en el que desaparece el efecto protector: para ello en presencia de fumarato - L-malato de concentraciones decrecientes (y presumiblemente en equilibrio, por el tiempo de incubación previa), se incubó la enzima con una cantidad de ClHgBz capaz de dar  $I = 71 \%$ , sin protector (Tabla XII). Hasta 1.0 mM se observó protección  $P = 87 \%$ , a 0.1 mM,  $P = 50 \%$ ; y con concentraciones de 0.01, 0.001, y 0.0001 mM la protección observada era sólo de aproxi-



Tabla X

Inhibición por reactivos de sulfhidrilos:  
protección por el sustrato fumarato

A - Protección frente al Melarsen y al o-iodosobenzoato.

Incubación de la enzima, en un medio de Cl Tris, con el inhibidor, 1-en ausencia del sustrato (inhibición durante 11 minutos en 3.5 ml totales, o incubación inmediata con el sustrato durante 60 minutos, en 4 ml totales), o 2-en presencia del mismo (protección, agregado del fumarato de Tris inmediatamente antes del inhibidor; incubación durante 60 minutos, en 4 ml totales). Se determina los "consumos" C de ambos experimentos y de controles sin inhibidor; se obtiene la actividad remanente en el Gráfico I, Cap. II. Enzima, 4.5 unidades, 1 mg proteína; concentraciones en 4 ml totales: inhibidor,  $500 \times 10^{-6}M$ ; fumarato de Tris, 0.025 M; Cl Tris, 0.01 M; pH 7.0; temperatura, 30° C. Experimentos por duplicado.

Inhibidor	Experimento	"Consumo" C, $\mu$ moles	Actividad remanente unidades $\bullet$	Inhibición % $\bullet$	Protección % $\bullet$
Control	sin inhibidor	48	18.5	--	--
Melarsen	1-inhibición	40	14	24	--
	2-protección	46.5	17.5	5	79
IOBz	1-inhibición	31.5	9.7	48	--
	2-protección	49	19.2	0	100

$\bullet$  Los resultados de actividades, y las magnitudes derivadas (inhibición y protección) sólo tienen valor comparativo y semicuantitativo, pues se ha aplicado a los "consumos" C en 60 minutos, el Gráfico I, Cap. II, construido para "consumos" en 5 minutos.

(continúa la Tabla X)

Tabla X (continuación)

B - Protección frente al p-cloromercuribenzoato.

Serie I: incubación de la enzima con el inhibidor, 1-en ausencia (inhibición en 3.5 ml totales, 2 minutos de reacción, e inmediata incubación con el sustrato en 4 ml totales durante 20 minutos), o 2-en presencia de fumarato de Tris agregado inmediatamente antes (protección, 4 ml totales, 20 minutos de incubación). Enzima, 9 unidades, 2 mg proteína; ClHgBz,  $200 \times 10^{-6}$  M (4 ml), inhibidor/proteína,  $400 \times 10^{-9}$  moles/mg; fumarato de Tris 0.025 M (4ml); pH 7.0; temperatura, 30°C. Las actividades se determinan como en A -; rige para ellas la misma observación <sup>9</sup> sobre su valor comparativo.

Experimento	Actividad remanente unidades	Inhibición %	Protección %
Control sin inhibidor	18.2	--	--
1-inhibición	0	100	--
2-protección	0	100	0

Serie II: incubación de la enzima en Cl Tris, con el inhibidor y el sustrato en el orden y tiempo indicados; incubación total del fumarato de Tris, 5 minutos.

Experimentos: 1-control de actividad sin inhibidor.

2 al 4-incubación de la enzima con ClHgBz (3.5 ml totales) y agregado del sustrato al tiempo indicado (4 ml).

5-incubación de la enzima, durante 5 minutos, con el inhibidor y el sustrato previamente mezclados (4 ml).

6-mezcla del sustrato y enzima e inmediata incubación con el inhibidor durante 5 minutos (4 ml).

Enzima, 13 unidades, 4 mg proteína; concentraciones en 4 ml: Cl Tris 0.01 M, ClHgBz  $20 \times 10^{-6}$  M, ClHgBz/proteína,  $20 \times 10^{-9}$  moles/mg; fumarato de Tris 0.025 M; pH 7.0; temperatura, 30°C. Experimentos por duplicado.

Experimento	Tiempo de inhibición minutos	Actividad remanente unidades	Inhibición %	Protección %
1-control	---	6.4	--	--
2-inhibición	3	0.8	87	--
3-inhibición	1	0.8	87	--
4-inhibición	1/2	1.0	84	--
5-inhibidor y sustrato	0	5.8	9	90
6-protección	---	6.0	6	93

Tabla XI

Inhibición por reactivos de sulfhidrilos:

protección por el sustrato L-malato

Incubación de la enzima (12.5 unidades, 4 mg proteína) en Cl Tris 0.005 M, con el inhibidor solo (inhibición) o en presencia de L-malato de Tris 0.001 M agregado inmediatamente antes (protección), en un volumen total de 2 ml y durante el tiempo indicado. Dosaje de la actividad remanente con fumarato de Tris 0.025 M (4 ml), en 5 minutos. Inhibidores,  $10^{-6}$  M (en 2 ml): ClHgBz, 30; AgNO<sub>3</sub>, 3.0; IOBz, 500; Melarsen, 500. pH 7.0; temperatura, 30°C. Experimentos por duplicado.

Inhibidor	Tiempo de inhibición minutos	Experimento	Actividad remanente unidades	Inhibición %	Protección %
---	---	Control de actividad	6.2	--	--
ClHgBz	5	Inhibición	0	100	--
	5	Protección	3.2	48	52
AgNO <sub>3</sub>	5	Inhibición	4.7	24	--
	5	Protección	4.7	24	0
IOBz	30	Inhibición	2.4	61	--
	30	Protección	4.7	24	61
Melarsen	60	Inhibición	1.8	71	--
	60	Protección	3.8	39	45

madamente 10 %. La concentración en que se observó protección de 50 % es del orden de magnitud de la constante de Michaelis del fumarato para bajas concentraciones de éste y de fosfato (a 20°, en fosfato 0.01 M pH 7.0,  $K_M = 0.4$  mM, y en ausencia de buffer será aún menor), la que no difiere grandemente de la constante del L-malato, al menos en la fumarasa de cerdo<sup>(23)</sup>; esa coincidencia de efectos protector y cinético no debe ser fortuita puesto que la  $K_M$  nos da la concentración de sustrato que corresponde a la existencia de la mitad de la enzima presente como complejo ES, y justamente con este orden de concentración de los sustratos se observa que el efecto inhibitor del ClHgBz disminuye al medio. Todo esto hace suponer que el efecto protector del sustrato se tiene cuando éste forma el complejo ES correspondiente a las bajas concentraciones de sustrato.

d) Protección de la enzima por el fosfato:

El fosfato ha resultado también un protector de la fumarasa (Tablas XIII y XIV) muy eficaz frente al IOBz y al Melarsen (P = 95 y 87 % respectivamente, para inhibiciones de 81 y 95 %) pero mucho menos activo frente al ClHgBz. Cuando se eligió relaciones ClHgBz : proteína que inhibían parcialmente la enzima (Tabla XIV) se pudo observar protecciones bajas (17 y 23 % para inhibiciones de 96 y 48% respectivamente) con concentraciones de fosfato 0.1 M.

Para establecer hasta qué punto el efecto protector no es una consecuencia de la alta fuerza iónica del medio, se comparó la protección por fosfato 0.21 M,  $\mu = 0.465$ , y por cloruro de potasio 0.93 M,  $\mu = 0.93$ , ambos a pH 7.0 en presencia de cloruro de Tris 0.02 M como buffer (Tabla XV). Tanto frente al IOBz como al Melarsen, el efecto protector del fosfato (de 100 y 85 % respectivamente) fué varias veces mayor que el del cloruro de potasio de fuerza iónica doble. Esto demuestra un efecto específico por parte del fosfato, que no es de extrañar dada su influencia sobre la velocidad de la reacción enzimática; pero ello no implica que el efecto del cloruro de potasio sea debido a la fuerza iónica muy alta: también puede haber en este caso un efecto específico, de la misma manera que lo hay al actuar el clo.

Tabla XIII

Inhibición por reactivos de sulfhidrilos:

protección por el fosfato

Incubación de la enzima (18.2 unidades, 4 mg proteína) con el inhibidor, en un volumen de 3.5 ml, durante 30 minutos, en ausencia (inhibición) o en presencia (protección) de fosfato 0.115 M. Dosaje de la actividad remanente con fumarato de Tris 0.025 M (en 4 ml) durante 5 minutos, en ausencia (experimentos 1) o en presencia (experimentos 2) de fosfato 0.10 M, se comparan las actividades de experimentos con igual contenido de fosfato. Inhibidores Melarsen, IOBz y ClHgBz, en concentraciones ( $10^{-6}$  M en 4 ml) 250, 200 y 200 respectivamente; pH 7.0, temperatura, 30°C. Experimentos por duplicado.

Inhibidor	Experimento	Actividad remanente, u	Inhibición %	Protección %
---	1 - Control sin fosfato	9	--	--
---	2 - Control con fosfato	18.2	--	--
Melarsen	1-Inhibición sin fosfato	0.4	95	--
	2-Protección con fosfato	16	12	87
IOBz	1-Inhibición sin fosfato	1.7	81	--
	2-Protección con fosfato	17.5	4	95
ClHgBz <sup>a</sup>	1-Inhibición sin fosfato	0	100	--
	2-Protección con fosfato	0	100	0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> En la Tabla XIV se estudia la protección por fosfato para concentraciones menores de ClHgBz.

Tabla XIV

Inhibición por p-cloromercuribenzoato: efecto protector del fosfato

Incubación de la enzima con el inhibidor en 2 ml de Cl Tris 0.0025 M y en ausencia (1-inhibición) o en presencia (2-protección) de fosfato 0.10 M. Dosaje de actividad remanente con fumarato de Tris 0.025 M en fosfato 0.1 M pH 7.0 (volumen total 4 ml). Series I, II y III (respectivamente): enzima, 13, 14 y 12 unidades totales; proteína (las tres) 4 mg totales.

Serie	Experimento	ClHgBz (2 ml) 10 <sup>-6</sup> M	<u>Inhibidor</u> proteína 10 <sup>-9</sup> mol/mg	Actividad remanente unidades	<u>Inhibi</u> <u>ción</u> %	<u>Protec</u> <u>ción</u> %
I	Control sin inhibidor	--	---	13	--	--
	1-Inhibición	60	30	0	100	--
	2-Protección	60	30	0	100	0
II	Control sin inhibidor	--	---	14	--	--
	1-Inhibición	40	20	0	100	--
	2-Protección	40	20	0	100	0
	1-Inhibición	30	15	0.6	96	--
	2-Protección	30	15	1.6	89	7
III	Control sin inhibidor	--	---	12	--	--
	1-Inhibición	30	15	0.5	96	--
	2-Protección	30	15	2.4	80	17
	1-Inhibición	20	10	6.2	48	--
	2-Protección	20	10	7.6	37	23
	1-Inhibición	10	5	10	17	--
2-Protección	10	5	11.3	6	65	

Tabla XV

Protección por el fosfato frente al Melarsen y al o-iodosobenzoato:  
efectos específicos y de la fuerza iónica

Incubación de la enzima (15.5 unidades, 4 mg proteína) en Cl Tris 0.02 M, con el inhibidor  $1.05 \times 10^{-3}$  M (en proporción inhibidor/proteína =  $500 \times 10^{-9}$  moles/mg), en ausencia (1-inhibición) o en presencia (2-protección) de fosfato 0.21 M,  $\mu = 0.465$ , o de ClK 0.93 M,  $\mu = 0.93$  (volumen y tiempo de reacción, 1.9 ml y 30 minutos, respectivamente). Dosaje de actividad en 4 ml y 5 minutos, con fumarato de Tris 0.025 M en ausencia o en presencia de fosfato 0.10 M o ClK 0.44 M, se comparan actividades de experimentos con iguales componentes, excepto el inhibidor. pH 7.0; temperatura, 30°C. Experimentos por duplicado.

Inhibidor	Experimento y protector	Sal presente en el dosaje	Actividad remanente unidades	Inhibición %	Protección %
---	control	--	8	--	--
---	control	PO <sub>4</sub>	15.5	--	--
---	control	ClK	5.8	--	--
Melarsen	1-inhibición	--	3.5	56	--
	1-inhibición	PO <sub>4</sub>	7.2	53	--
	1-inhibición	ClK	3.2	45	--
	2-protección por PO <sub>4</sub>	PO <sub>4</sub>	14.3	8	85
	2-protección por ClK	ClK	3.7	36	20
IOBz	1-inhibición	--	0.6	92.5	--
	1-inhibición	PO <sub>4</sub>	1.0	93.5	--
	1-inhibición	ClK	0.8	86	--
	2-protección por PO <sub>4</sub>	PO <sub>4</sub>	15.8	0	100
	2-protección por ClK	ClK	2.8	52	40

ruro como inhibidor de la enzima.

c) Inhibición de la enzima por los iones  $Ag^+$ :

En dos experiencias hemos obtenido inhibiciones por los iones  $Ag^+$ , en niveles de concentración muy bajos: con  $8.5 \times 10^{-9}$  moles/mg proteína ( $1 \times 10^{-5}$  M) teníamos inactivación total (Tabla VII) y con  $1.5 \times 10^{-9}$  moles/mg ( $3 \times 10^{-6}$  M) la inhibición era de 24 % (Tabla XI). Este gran poder inhibidor (2 a 3 veces mayor que para el  $ClHgBz$ ) tiene características diferentes a las de los otros reactivos, pues no se observa frente a la  $Ag^+$  protección por el L-malato. Esto parece descartar la unión con el sulfhidrilo y sugiere que la inactivación de la enzima se produce por unión de los iones  $Ag^+$  con algún grupo complejante en la enzima, que al igual que el sulfhidrilo sea esencial para la actividad catalítica.

Observaciones sobre la inactivación térmica  
de la fumarasa

Los resultados de protección de sulfhidrilos de la enzima por los sustratos y el fosfato nos han sugerido una posible acción protectora de los mismos frente a la inactivación térmica. Este efecto protector de los sustratos se ha observado con numerosas enzimas, y se ha aprovechado en la purificación de varias de ellas (láctico deshidrogenasa de levadura<sup>(72)</sup>, L-aminoácido oxidasa de veneno de serpientes<sup>(73)</sup>, fosfoenolpirúvico carboxilasa de hígado de pollo<sup>(74)</sup>, etc.). Jacobsohn y Pereira<sup>(75)</sup>, en estudios sobre la desnaturalización térmica de la fumarasa de hígado de mamífero, obtuvieron muy marcada protección en presencia de DL-malato. Nosotros hemos realizado algunos ensayos de inactivación térmica en medios con fumarato, fosfato o cloruro, y también hemos intentado proteger la enzima bloqueando sus sulfhidrilos con  $ClHgBz$ , y reactivándola con cisteína luego del calentamiento en presencia de cloruro.

Parte experimental y resultados: a) influencia del medio iónico: la protección por el fumarato. La preparación de enzima (análoga a la



empleada en el precedente estudio sobre sulfhidrilos) se calentaba a pH 7.0 durante 5 minutos, ya sea en un medio de cloruro de Tris 0.1 M (anión inhibidor) o bien en fosfato 0.1 M (activador) o fumarato de Tris 0.01 M en cloruro de Tris 0.1 M (protector); en el sobrenadante claro se medía luego la actividad remanente.

En esta forma se observó (Tabla XVI) que tanto a 38°C como a 40°C ya tiene lugar una inactivación de 5 - 9 % en el medio con cloruro, y que en presencia de fumarato, o en un medio con fosfato solamente, no hay pérdida de actividad, significativa. Se han obtenido resultados bien diferenciados a 47.5°C: en tanto que con cloruro de Tris se observa una inactivación de 61 %, el experimento con fosfato ha dado 14 % de pérdida, y en presencia de fumarato - cloruro sólo se pierden 6 % de actividad. Estos experimentos demuestran concluyentemente que el fumarato protege a la enzima contra la desnaturalización térmica, muy pronunciada en presencia de cloruros.

b) el bloqueo de los sulfhidrilos y la inactivación térmica: La preparación enzimática, en un medio de cloruro de Tris 0.1 M pH 7.0, fué tratada con ClHgBz (que la inhibía 47 %) y posteriormente calentada a 45.5°C durante 10 minutos, enfriada y adicionada de cisteína; se hicieron controles de inhibición y reactivación en frío (I = 47 y 20 % respectivamente) y calentamiento sin y con cisteína.

Tanto la inactivación térmica en ausencia de cisteína, como con agregado de ésta antes o después del calentamiento, daban la misma pérdida de actividad: 75 - 76 % (Tabla XVII). El bloqueo por el ClHgBz de los sulfhidrilos de la mitad de la enzima presente, no la protegió, pues una vez agregada la cisteína (después del calentamiento) para su reactivación, la inactivación observada (87%) fué aún mayor que la obtenida por un simple calentamiento.

Apéndices: La sensibilidad de la fumarasa de corazón de cerdo cristalizada, frente al p-cloromercuribenzoato

La existencia comprobada de sulfhidrilos esenciales en la fumarasa de levadura nos movió a repetir los experimentos con reactivos

Tabla XVI.

Inactivación térmica de la enzima: influencia  
del sustrato y el medio iónico

La enzima (56 unidades, 16 mg proteína) se calienta a pH 7.0 durante 5 minutos en 1.0 ml del medio de composición y temperatura indicados; se enfría, centrifuga y dosa en el sobrenadante la actividad y proteína remanentes. Medios de reacción: A - Cl Tris 0.1 M; B - fosfato de sodio y potasio 0.1 M; C - fumarato de sodio y Tris 0.01 M en Cl Tris 0.1 M.

Temperatura de inactivación	Medio de reacción	Actividad remanente unidades	Actividad recuperada %	Proteína remanente mg	Q <sub>fumarato</sub>
2. ambiente (control)	A-ClTris	56	100	16.3	4650
38°C	A-ClTris	51	91	15.2	4500
	B- PO <sub>4</sub>	55	98	15.8	4700
	C-fumarato y ClTris	55.5	99	16.5	4500
40°C	A-ClTris	53.5	95	15.3	4700
	B- PO <sub>4</sub>	55	98	14.7	5050
	C-fumarato y ClTris	57	102	16.9	4500
47.5°C	A-ClTris	22	39	13.4	2200
	B- PO <sub>4</sub>	48	86	15.7	4100
	C-fumarato y ClTris	52.5	94	15.5	4550

Tabla XVII

Inactivación térmica de la enzima, a pH 7.0 y 45.5°C:  
efecto de la cisteína y del p-cloromercuribenzoato

La enzima (24.7 unidades, 8 mg proteína) es calentada a 45.5°C durante 10 minutos, en un medio de 2.0 ml de Cl Tris 0.10 M pH 7.0, que contiene los reactivos indicados; se enfría, se agrega o no cisteína, y se dosa la actividad remanente con fumarato de Tris 0.025 M en fosfato 0.05 M pH 7.0 (4 ml), en 5 minutos, a 30°C. Se hacen experimentos de control en los mismos medios, a temperatura ambiente.

Reactivos: p-cloromercuribenzoato de sodio (ClHgBz),  $50 \times 10^{-6}$  M (en 2 ml), ClHgBz/proteína =  $12.5 \times 10^{-9}$  mol/mg; cisteína,  $50 \times 10^{-6}$  M (en 2 ml), cisteína/ClHgBz = 1 mol/mol. Experiencias por duplicado.

Experimento	Reactivo inicial	Calentamiento	Agregado posterior	Actividad remanente unidades	Inactivación %
Control	--	no	--	24.7	--
Control-cisteína	cisteína	no	--	23.7	8
Inhibición-ClHgBz	ClHgBz	no	--	13.0	47
Reactivación-cisteína	ClHgBz	no	cisteína	19.8	20
Calentamiento-control	--	sí	--	6.2	75
Calentamiento-cisteína	cisteína	sí	--	6.0	76
Calentamiento react. cist.	--	sí	cisteína	6.0	76
Calentamiento con ClHgBz- react. cist.	ClHgBz	sí	cisteína	3.2	87

para tioles realizados por Massey<sup>(46)</sup> con la enzima de cerdo cristalizada. Hemos preparado para ello cristales de fumarasa de cerdo según el método de Frieden, Book y Alberty<sup>(76)</sup>, siguiendo la marcha de la purificación por el dosaje espectrofotométrico de la actividad y de la proteína, según Massey<sup>(10)</sup>; con una sola cristalización se logró una pureza de 610, en unidades espectrofotométricas (Tabla XVIII).

Esta preparación, disuelta en fosfato 0.01 M pH 7.3, fué utilizada en experimentos de inhibición con ClHgBz. La enzima (4.9 unidades Massey, 0.25 mg de proteína) se incubó durante 5 minutos con 0.2 micromoles de ClHgBz ( $1 \times 10^{-4}$  M) en 2 ml de Cl Tris 0.01 M pH 7.3 (fosfato residual,  $2.5 \times 10^{-4}$  M), a temperatura ambiente; se dosó la actividad según el método de Massey, agregando 1 ml de fumarato de sodio 0.05 M en fosfato 0.1 M pH 7.3. Los experimentos, por duplicado, dieron estos resultados.

	Actividad observada	Inhibición
control sin inhibidor	97	--
inhibición	80	20 %

La inhibición no es muy significativa. La relación ClHgBz : proteína, de  $300 \times 10^{-9}$  moles/mg, es 40 veces mayor que la necesaria para inhibir totalmente las preparaciones de levadura, unas cien veces más impuras, la baja concentración de fosfato presente no permite pensar en un efecto protector de éste. Estas consideraciones harían descartar la presencia de un sulfhidrilo esencial en la enzima de cerdo, atribuyendo la inhibición observada a algún efecto inespecífico del tipo de los observados en la catalasa con nitrato de fenilmercurio (Sohler y col.<sup>(77)</sup>). Sin embargo, estos experimentos, incompletos, no descartan la posibilidad de una reacción lenta del mercurial con el hipotético sulfhidrilo de la enzima, que en 5 minutos habría alcanzado a producirse solamente con 1/5 de las moléculas de fumarasa presentes. Un efecto parecido ha sido encontrado en otra enzima cristalizada de corazón, la láctico deshidrogenasa, que por largo tiempo se tuvo por no tior debido a la escasa reactividad de sus sulfhidrilos esenciales<sup>(78)</sup>, y que recientemente se demostró que se

Tabla XVIII

Preparación de la fumarosa de corazón de cerdo cristalizada (76)

Etapa	Actividad u/ml <sup>‡</sup>	Recuperación %	Pureza <sup>‡</sup>
Extracción-sobrenadante	7.65	100	1.9
Precipitación a pH 5.9- sobrenadante	6.50	---	6.0
Precipitación a pH 5.2- precipitado	102.5	48	14.2
1er. fraccionamiento- 0.35-0.65 sat. SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	77	39	50
3er. fraccionamiento-0.50 sat. SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -cristales	107.5	10.4	610

<sup>‡</sup> La actividad y actividad específica (pureza) se miden en las unidades espectrofotométricas definidas por Massey<sup>(10)</sup>.

una con cuatro moléculas<sup>(79)</sup> de ClHgBz con inhibición total, completándose la reacción en unos 60 minutos. La dilucidación de los requerimientos de tioles esenciales por la fumarasa de cerdo exigirá nuevos estudios, con tiempos de inhibición más prolongados, y quizás el uso de otros mercuriales de diferente reactividad<sup>(80)</sup>.

### DISCUSION

Cotejando las propiedades de la enzima de levadura con las de las otras fumarasas ya estudiadas, se puede comprobar una serie grande de puntos coincidentes en cuanto a sus características catalíticas, y una discrepancia sobresaliente en su requerimiento de sulfhidrilos esenciales, respecto de la enzima de cerdo.

a) Comenzaremos por señalar que la constante de equilibrio que es dable encontrar para una misma reacción reversible catalizada por enzimas de diversos orígenes, debe ser, por razones termodinámicas, igual en todos los casos, a igualdad de condiciones experimentales. Sólo se pueden esperar discrepancias cuando la relación de concentraciones de los sustratos y la enzima se hace pequeña, con lo que crece la relativa importancia de la proporción de complejos ES presentes, que agregan una nueva especie al equilibrio, y lo pueden desplazar diferentemente según la naturaleza de la enzima que forma ES. No ha sido éste nuestro caso (solución medianamente concentrada de sustratos, y muy diluida en enzima) por lo que las pequeñas diferencias con otras determinaciones de la constante de equilibrio deben provenir de errores experimentales.

b) Los estudios sobre la acción de la enzima han mostrado las siguientes propiedades catalíticas, semejantes a las de las fumarasas de *E. coli*<sup>(24)</sup> y de corazón de cerdo<sup>(25,32)</sup>: una curva de actividad (en ausencia de sales) vs. pH, con un máximo a pH 6.3, y dos ramas, ácida y alcalina, de las que esta última, mejor conocida, se extiende en un amplio intervalo de pH; la inhibición no muy marcada por aniones monovalentes, en general del tipo de los halogenuros; la acción activadora a pH 7 de varios aniones, todos ellos de oxiácidos, que, salvo el

borato, son polivalentes, en el caso del fosfato, una activación más potente a pH 7.0 que a pH 6.0, activación que se reduce al pasar de medios 0.05 M a 0.1 M. Por último, los estudios cinéticos demuestran en bajas concentraciones de fosfato un efecto activador por el fumarato en concentraciones superiores a 4 mM, por el que se observan velocidades de reacción mayores de las calculadas con las constantes cinéticas a altas diluciones, y que se traduce en un aumento de esas constantes, esta misma consecuencia (especialmente para  $K_M$ ) se obtiene elevando la concentración de fosfato a 0.1 M, medio en el que no se observa variación de  $K_M$  y  $V_m$  al crecer la concentración de fumarato.

Estos hechos admiten la interpretación desarrollada por Alberty y sus colaboradores (26, 32, 37, 44) para la fumarasa de cerdo: la enzima es activa cuando dos de sus grupos laterales ionizables, responsables de la actividad catalítica, están el uno en su forma ácida y el otro como base (según la nomenclatura de Brönsted): la actividad relativa de la enzima está dada por la proporción de moléculas de enzima con esa configuración especial (proporción condicionada por el pH del medio y los pK de los grupos mencionados) y la variación del pH nos da una curva de actividad en forma de campana, en que sus dos ramas representan parcialmente las curvas de titulación de ambos grupos. Los pK de esos grupos dependen de la naturaleza de su entorno: en la enzima libre tienen valores más o menos característicos que permiten la identificación de los grupos; pero cuando a la enzima se unen moléculas o iones diversos, esas constantes pueden modificarse, con lo que se corren las ramas de la curva en el sentido de la variación de sus respectivos pK.

La enzima tiene dos tipos de lugares vinculados a su actividad, a los cuales se pueden unir las moléculas o iones mencionados anteriormente: uno es el sitio activo en el que se forma el complejo enzima - sustrato ES catalíticamente activo; el otro es un sitio capaz de modificar las propiedades catalíticas del primero, y al que se puede unir también el sustrato, dando el complejo SE (que no

es capaz de descomponerse en enzima y productos); a su vez otros iones (del buffer, como por ejemplo fosfato) se pueden unir a ambos sitios, dando EB y BE. Los complejos SE y BE pueden formar SES y BES, que junto con ES son los tres complejos activos (capaces de sufrir la descomposición para dar el producto de reacción); el complejo EB es incapaz de intervenir en el proceso catalítico, y origina una inhibición competitiva por el fosfato.

La formación de estos complejos activos e inactivos se rige por los mecanismos de Michaelis y Menten<sup>(36)</sup> o de Briggs y Haldane<sup>(36a)</sup>, siendo descrita por las constantes de Michaelis correspondientes; la descomposición de cada uno tiene su propia velocidad límite  $V_m$ , que será mayor en los complejos con activador (SES y, con fosfato, BES). En una reacción en condiciones no límites (concentraciones de buffer y sustrato medianas) se tendrá como reacción total la suma de las correspondientes a los tres complejos activos, en sus proporciones respectivas; y la cinética de esa reacción se puede describir según una expresión de Michaelis-Menten, con "constantes" variables que dependerán de la composición del medio.

Este mecanismo predice cualitativamente los efectos que hemos observado. Respecto de las constantes cinéticas: en medios con baja concentración de fosfato (0.01 M, en que la proporción de complejos con el buffer es pequeña -véase más adelante) el fumarato en solución diluida, menor de 4 mM, se une a la enzima con gran afinidad ( $K_M = 0.4$  mM) para dar ES: la velocidad de hidratación de este complejo es relativamente baja (no hay activación). Cuando se aumenta la concentración de fumarato comienza a ser significativa la formación de complejos SE y SES, paralelamente a ES, y de los cuales el segundo, catalíticamente activo, se descompone más rápidamente que el último (efecto activador del fumarato). Esto aumenta la velocidad límite  $V_m$  obtenible con concentraciones intermedias de fumarato, y al extrapolar a altas concentraciones de sustrato se llega a la velocidad máxima, con toda la enzima en la forma SES. Concurrentemente ha aumentado a un valor límite la "constante"  $K_M$  (determinada, como  $V_m$ , en un gráfico de



Lineweaver-Burk) debido a que ésta es una función<sup>(32)</sup> de las  $K$  particulares de los complejos ES, SE y SES (de las que presumiblemente la primera es menor que las otras).

No hemos considerado en este análisis la formación de los complejos BE y BES (susceptibles de actividad) y BEB y EB (no activos) por cuanto carecemos de datos sobre el comportamiento cinético de la fumarasa en ausencia de fosfatos, datos que nos habrían permitido evaluar la importancia de esos complejos en el medio de fosfato 0.01 M, pero presuminos que su concentración es relativamente pequeña, por lo que no los hemos tomado en cuenta.

En cambio, en medios con alta concentración de fosfato (0.1 M) la casi totalidad de la enzima está como complejo BE (y una parte como BEB, no activo); el agregado de fumarato tanto en concentraciones pequeñas como altas (se ha llegado hasta 0.02 M, relativamente baja comparada con la concentración del buffer) conduce al único complejo activo de concentración significativa en esas circunstancias: el BES. La reacción se desarrolla como una inhibición competitiva en la que el sustrato y el fosfato compiten por el sitio activo de la única especie enzimática presente, BE; por lo tanto la velocidad límite  $V_m$  será igual a la obtenible sin efecto inhibitor, y la  $K_M$  estará aumentada en  $1 + I/K_I$  ( $I$ , concentración, y  $K_I$ , constante de Michaelis del inhibidor, en este caso el fosfato) respecto de la  $K_M$  hipotéticamente observable en fosfato 0.1 M si ni hubiese inhibición. Ya hemos hecho referencia en los Resultados a la existencia de un efecto inactivador del fosfato 0.1 M respecto de 0.05 M, cuando se mide la actividad con fumarato 0.025 M. Esta observación corrobora lo anterior: se ha podido obtener este efecto debido a las condiciones elegidas para la reacción, una concentración de sustrato que, aunque alta, no es saturante para la enzima (recuérdese que  $K_M = 0.04$  M en fosfato 0.1 M). Incidentalmente, esto nos muestra también que las condiciones experimentales elegidas para el dosaje de enzima, aunque nos dan velocidades iniciales proporcionales a la cantidad de fumarasa presente, no nos indican la velocidad máxima obtenible con la en-

zima, por la falta de saturación de ésta con el sustrato.

Nuestros resultados indican que la velocidad límite del complejo SES es menor que la de BES ( $V_m$  es 35.5 y 120 para fosfato diluido y concentrado respectivamente). El mecanismo desarrollado prevé un efecto no observado experimentalmente: por aumento de la concentración de fumarato, en fosfato concentrado, podría llegarse a observar una curvatura en los gráficos de Lineweaver-Burk que tendiese a velocidades límites menores, como consecuencia de la competencia del fosfato y el sustrato por los sitios activadores y el gradual reemplazo de BES por SES. Quizás elevando la concentración de fumarato por encima de 0.02 M sea dable observar ese efecto; pero debe tenerse presente la posibilidad de inhibiciones paralelas no específicas como la obtenida por Jacobsohn<sup>(43)</sup>.

El efecto del pH: El esquema propuesto explica la curva de pH que hemos obtenido: la existencia de dos ramas, ácida y alcalina, y el máximo observado. El desarrollo teórico de Alberty y Massey<sup>(81)</sup> para la curva de la velocidad límite en función del pH, conduce, para el caso de un complejo enzima - sustrato con dos grupos ionizables, a una serie de curvas, según los pK admitidos para dichos grupos. Estas curvas, en forma de campana, difieren de la nuestra en el intervalo de pH en que se desarrollan sus ramas, bastante más estrecho que el de la rama alcalina que hemos obtenido. Esto puede provenir de que en nuestras condiciones experimentales: concentración de fumarato (0.025 M) medianamente alta, se forman con la enzima dos complejos activos: ES y SES, cada uno de los cuales tiene pK diferentes para sus grupos ionizables; de esta manera la curva de pH sería la suma de dos curvas, una para cada complejo, con lo que aquélla puede extenderse y suavizarse su pendiente. Esto además sugiere que el pH óptimo encontrado no es el correspondiente a ES, sino también es intermedio entre éste y el de SES, y que con concentraciones menores de sustrato obtendríamos curvas más empinadas y con su máximo desplazado. Con respecto a la dirección de este desplazamiento, se puede esperar que ocurra en el sentido de los pH menores; se puede inferir esto del efec

to del fosfato, que se comporta como activador análogamente al fumarato, y que traduce su acción activadora en un corrimiento del máximo de la curva de pH hacia el alcalino, como se verá más adelante. De resultar cierta esta especulación, la curva límite de pH de la enzima de levadura, a bajas concentraciones de fumarato, se desplazaría hacia pH menores (aunque siempre quedaría en pic como dificultad experimental para su realización, la sensibilidad de la enzima a los pH bajos). Este corrimiento no significaría asemejarse a la curva de la fumarasa de cerdo obtenida por Massey<sup>(25)</sup>, con pH óptimo 5.6, por haber sido observado éste con fumarato 0.017 M, que da un considerable efecto activador.

La acción de las sales: Hemos estudiado en detalle el mecanismo del efecto activador del fosfato. Los resultados experimentales a pH 7 indican que varios aniones se comportan análogamente a éste, que otros son inhibidores, y que los cationes alcalinos y alcalinotérreos no tienen influencia en la reacción. Por analogía con los resultados de Mann y Woolf<sup>(24)</sup> y de Massey<sup>(25)</sup> pensamos que el efecto activador tiene lugar por el corrimiento de las ramas alcalinas de las curvas de pH hacia pH más altos; esta suposición está justificada en el caso del fosfato, pues hemos encontrado una activación mucho mayor a pH 7 que a pH 6, tanto en valor absoluto como relativo, lo que implica haber corrido el óptimo hacia pH mayores cuando se pasa de un medio libre de sales a uno con fosfato 0.1 M. Este corrimiento opera por formación de los complejos anión - enzima - sustrato del tipo BES ya referido anteriormente, los cuales modifican los equilibrios de ionización de los grupos responsables de la actividad catalítica, obteniéndose constantes pK diferentes de las de la enzima libre y del complejo ES; en el caso particular de estos aniones activadores, se observa tanto en *E. coli* como en el cerdo que la constante afectada en la enzima es la del grupo responsable de la rama alcalina, es decir, el grupo que en su forma activa es un ácido.

Con respecto a los efectos de los aniones inhibidores  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  y  $\text{NO}_3^-$ , es conveniente considerarlos conjuntamente con los resul-

tados de la inactivación térmica de la enzima en presencia de cloruro, cloruro y fumarato, y fosfato. Tanto en la cinética de la hidratación del fumarato como en esa desnaturalización, aquellos aniones desempeñan un papel opuesto al de los sustratos, fosfatos y aniones relacionados: unos inhiben y favorecen la desnaturalización, y los otros activan la enzima y la protegen. Esa división de los aniones en dos grupos de opuestas propiedades ya se había observado en la desnaturalización térmica de proteínas (la serie de aniones de Hofmeister) y en la liberación de sulfhidrilos durante la desnaturalización de la ovoalbúmina y otras proteínas por sales de guanidina y por urea<sup>(83a)</sup>; y también en ciertas reacciones enzimáticas en que un grupo de iones es activador y otro no (como en la amilasa de la saliva<sup>(83b)</sup>).

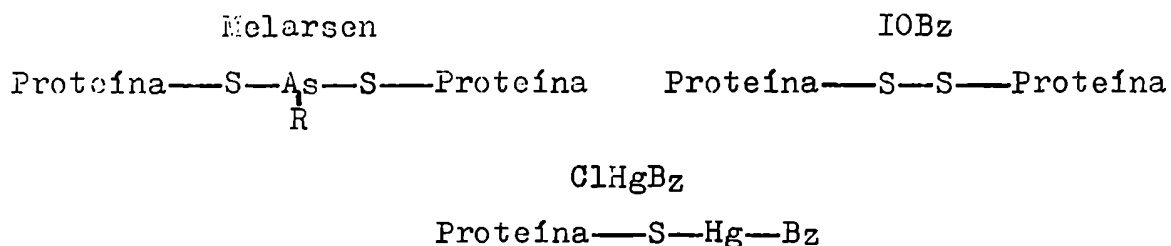
Los resultados con la fumarasa de cerdo apuntan también en ese sentido: el grupo de aniones  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$  y  $\text{SCN}^-$  actúan como inhibidores no competitivos<sup>(25,26)</sup> deprimiendo la actividad especialmente en la rana ácida de la curva de  $\text{pH}^{(25)}$ ; y el  $\text{SCN}^-$ , el inhibidor más potente de los cuatro, induce en la enzima<sup>(82)</sup> una transformación intramolecular rápida y reversible (inhibición no competitiva) que es seguida por un proceso irreversible de disociación en subunidades proteicas (inactivación semejante a la desnaturalización térmica); este último proceso, rápido a  $\text{pH}$  6.3, no tiene lugar en presencia de fumarato, a diferencia del fosfato que no lo impide.

Entre estos resultados y las inactivaciones térmicas de la enzima de levadura hay una analogía evidente; el  $\text{Cl}^-$  (inhibidor emparejado al  $\text{SCN}^-$ ) sería capaz de llevar la enzima a un estado catalíticamente inactivo y térmicamente lábil, que por encima de  $40^\circ\text{C}$  sufre una rápida desnaturalización irreversible; el fumarato, aunque no impide la primera transformación reversible al estado inactivo, estabiliza a esta nueva configuración evitando su desnaturalización térmica. Respecto de la participación de los sulfhidrilos de la enzima en estos procesos, parece que no debe ser importante: la cisteína no altera el curso de la desnaturalización, y la presencia de  $\text{ClHgBz}$  au-

menta aún más la labilidad de la enzima.

ç) Los sulfhidrilos esenciales de la fumarasa de levadura: nuestros resultados de inhibición de la fumarasa por los reactivos para sulfhidrilos, y la reactivación por la cisteína frente al ClHgBz, satisfacen los más importantes criterios de Barrón<sup>(60)</sup> para establecer la naturaleza tiol de una enzima. Las condiciones experimentales elegidas - muy bajas concentraciones de reactivos, especialmente el mercurial, y una pequeña cantidad de cisteína que reactiva la enzima frente a concentraciones mayores de ClHgBz - hacen descartar todo mecanismo como la formación de complejos, o desnaturalizaciones irreversibles, y permiten afirmar que la inactivación observada se produce por un ataque específico a los sulfhidrilos de la enzima.

La reactividad de estos sulfhidrilos es frente al Melarsen y el IOBz, del mismo orden de magnitud, y mucho menor que frente al ClHgBz. Aún cuando esto puede indicar que los tioles esenciales son grupos "lentos" (Hellerman y col.<sup>(68)</sup>, Barron<sup>(60)</sup>) es decir, de reactividad disminuída (lo que puede ser causado por la arquitectura de la molécula en derredor de esos grupos, que dificulta el acceso al tiol de algunos reactivos e impide el de otros), también puede deberse al modo de acción del arsenical y del IOBz, que requieren la proximidad de dos grupos sulfhidrilos para formar respectivamente el ditio arsenical<sup>(60)</sup> y un disulfuro<sup>(69)</sup>, a diferencia del mercurial, que requiere un solo grupo -SH<sup>(68)</sup>:



Si la fumarasa no tiene además del sulfhidrilo esencial, otro grupo -SH cercano a éste, capaces de unirse ambos ya sea al arsenical o por el puente disulfuro, la posibilidad de estas reacciones quedará supeditada al acercamiento de otro sulfhidrilo, ya sea de una zona alejada de la misma molécula o de otra molécula del medio. Ambas alternati

vas son poco probables, la primera por estar asociada a una reorientación o distorsión favorable de la molécula de enzima, y la segunda por exigir una colisión orientada de dos macromoléculas (a más del reactivo de tioles), y ambos procesos conducen a una reacción lenta, como la observada.

Los experimentos de protección por los sustratos y el fosfato pueden integrarse en el mecanismo de la acción de la enzima que hemos desarrollado antes. Ellos demuestran que el sulfhidrilo esencial está en el área activa de la enzima, en que el sustrato forma el complejo primario ES, en efecto, para un amplio rango de concentraciones de sustrato, la proporción de complejo ES existente, calculada con la constante  $K_p$  del fumarato a bajas concentraciones, coincide aproximadamente con la proporción de moléculas de enzima protegidas. La posibilidad que sea el complejo activador SF la forma protegida de la enzima, queda descartada por cuanto la protección casi total se observa en concentraciones de sustrato (1 mM) en que no hay efecto alguno de activación. La protección por el fosfato frente al ClHgBz, poco considerable a pesar de su alta concentración (0.1 M), estaría dada por su capacidad para formar con la enzima complejos inactivos EB (es decir, en el sitio activo) dando la inhibición competitiva que ya habíamos mencionado; en esos complejos, el fosfato, que reemplaza al sustrato, protegería al sulfhidrilo en la misma forma que éste. La poca eficacia de la protección se debería a la baja afinidad de los fosfatos por el sitio activo (que también se refleja en la alta concentración necesaria para lograr el efecto de inhibición); la misma hace poco probable que sea el complejo activador BE el causante de la protección, porque la mayor afinidad del fosfato por este complejo haría prever una protección mucho más eficaz que la observada.

Tanto la consideración de la protección por los sustratos como por el fosfato, nos ha llevado independientemente a postular que el sulfhidrilo esencial está localizado en el área activa de la enzima. En realidad, lo que estrictamente surge de estos experimentos es

que en la enzima existe un sulfhidrilo - o varios - cuya integridad es esencial para la actividad catalítica, y que está en un sitio de la superficie de la enzima capaz de unir a los sustratos y al fosfato, a los primeros con una constante de disociación semejante a la de Michaelis del fumarato, y al segundo con baja afinidad; y estimamos que ese sitio debe ser el sitio activo, por la coincidencia - difícilmente fortuita - en las características de la formación de los complejos con el sustrato y el fosfato, tanto para la protección como para la actividad enzimática.

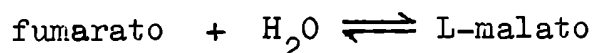
d) El requerimiento de tioles libres en una serie de enzimas que en forma reversible fijan sobre una doble ligadura una molécula de agua o un grupo amino (aconitasa<sup>(84)</sup>, crotonasa<sup>(85)</sup>, 5-dehidroquinasa<sup>(6)</sup>, aspartasa<sup>(86)</sup>, y fumarasa de vacuno<sup>(67)</sup> y de levadura) sugiere que los grupos -SH pueden tener un papel en ese tipo de reacciones, ya sea en la unión del sustrato a la enzima, o en la activación del complejo intermedio; algunas posibilidades de su acción se darían por las siguientes características de su reactividad: pueden unirse a dobles ligaduras<sup>(87)</sup> formando un tioéter (estructura propuesta para el complejo activo Crotonasa-S-crotonil-CoA<sup>(85)</sup>); pueden actuar como grupos ácidos disociables con un pK intermedio entre 8 y 10<sup>(88)</sup> y además se les reconoce capacidad para intervenir en uniones hidrógeno<sup>(89)</sup>, que podrían formarse con el sustrato, o con otros grupos de la enzima, estabilizando a las configuraciones proteicas catalíticamente activas.

Señalaremos por último que la fumarasa de levadura difiere profundamente de la de cerdo en dos aspectos: su sensibilidad a los reactivos tioles, y su labilidad en medios ácidos. Ambos traducen diferencias estructurales y quizás en el mecanismo intrínseco de la reacción. Por otra parte, se plantea el significado de las características catalíticas y de la estabilidad de la enzima, aparentemente preparada para actuar óptimamente en un medio de fosfato a pH 7, y que está en una célula cuyo pH medio es de 5.8<sup>(90)</sup>. Queda siempre la posibilidad que en el interior de las mitocondrias en que estaría en

cerrada la fumarasa, la composición del medio sea más favorable a su acción.

### CONCLUSIONES

La fumarasa de levadura cataliza la reacción



Establece un equilibrio entre ambos reactivos, independiente del origen de la preparación enzimática, que a 30°C se rige por la constante aparente de equilibrio  $K_{ap} = 3.8$ .

Las características cinéticas de la reacción de hidratación son semejantes a las de las enzimas de *Escherichia coli* y de corazón de cerdo. La curva de actividad vs. pH, la activación por el fosfato y otros aniones semejantes, y los efectos del sustrato y del fosfato sobre las constantes cinéticas, concuerdan con el mecanismo propuesto para la enzima de corazón de cerdo.

La acción de los aniones inhibidores (halogenuros y nitrato) tanto sobre la actividad catalítica como (el cloruro) en la inactivación térmica de la enzima, sugieren un mecanismo ya observado en la enzima de cerdo en presencia de sulfocianuro, que conduciría a transformaciones intramoleculares reversibles y a descomposiciones irreversibles, estas últimas impedidas por la presencia del sustrato.

La fumarasa de levadura tiene grupos sulfhidrilos esenciales para la actividad catalítica, protegidos por los sustratos y el fosfato, frente a los reactivos para tioles p-cloromercuribenzoato, o-iodosobenzoato, y un arsenical trivalente, el Melarsen. Las características de la acción de esos protectores, coincidentes con sus propiedades cinéticas, permiten interpretar la protección con el mecanismo propuesto para la reacción enzimática, e indican que muy probablemente los sulfhidrilos esenciales están situados en el área activa de la enzima.

No se estableció concluyentemente el carácter no tóxico de la enzima de cerdo: queda en pie la posibilidad de una reacción lenta con p-cloromercuribenzoato; pero la sensibilidad de la enzima de levadura para los reactivos tioles es de todas maneras mucho mayor.



Capítulo V - Referencias bibliográficas

- (1) Pressman, D. y Lucas, H. J., J.Am.Chem.Soc., 61, 2271 (1939);  
J.Am.Chem.Soc., 64, 1953 (1942).  
Lucas, G. R. y Hammett, L. P., J.Am.Chem.Soc., 64, 1938 (1942).  
Pressman, D., Brewer, L. y Lucas, H. J., J.Am.Chem.Soc., 64,  
1122 (1942).
- (2) Ciapetta, F. G. y Kilpatrick, M., J.Am.Chem.Soc., 70, 639 (1948).
- (3) Taft, R. W., J.Am.Chem.Soc., 74, 5372 (1952).  
Taft, R. W., Purlee, E. L., Riesz, P. y De Fazio, Ch. A., J.Am.  
Chem.Soc., 77, 1584 (1955).
- (4a) Martius, C., Z.physiol.Chem., 247, 104 (1937).
- (4b) Breusch, F. L., Z.physiol.Chem., 250, 262 (1937).
- (5a) Stern, J. R. y del Campillo, A., J.Am.Chem.Soc., 75, 2277 (1953).
- (5b) Stern, J. R., del Campillo, A. y Raw, I., J.Biol.Chem., 218,  
971 (1956).
- (6) Mitsuhashi, S. y Davis, B. D., Biochim.Biophys.Acta, 15, 54 (1954)
- (7) Woolf, B., Biochem.J., 23, 472 (1929).
- (8) Ratner, S., Anslow, W. P. y Petrack, B., J.Biol.Chem., 204, 115  
(1953).
- (9) Carter, Ch. E. y Cohen, L. H., J.Am.Chem.Soc., 77, 499 (1955).
- (10) Massey, V., Biochem.J., 51, 490 (1952).
- (11) Racker, E., Biochim.Biophys.Acta, 4, 211 (1950).
- (12) Benson, A. A., Bassham, J.A., Calvin, M., Goodale, T. C., Haas,  
V. A., y Stepka, W., J.Am.Chem.Soc., 72, 1710 (1950).
- (13) Krebs, H. A. y Eggleston, L. V., Biochem.J., 37, 334 (1943).
- (14) Battelli, F. y Stern, L., Compt.Rend.Soc.Biol., 84, 305 (1921-I)
- (15) Dakin, H. D., J.Biol.Chem., 52, 183 (1922).
- (16) Einbeck, H., Biochem.Z., 95, 296 (1919).
- (17) Jacobsohn, K. P., Biochem.Z., 234, 401 (1931).
- (18) Jacobsohn, K. P., Pereira, F. B. y Tapadinhas, J., Biochem.Z.,  
254, 112 (1932).
- (19) Fiske, C. H. y Subbarow, Y., J.Biol.Chem., 66, 375 (1925).
- (20) Krebs, H. A., Smyth, D. H. y Evans, E. A., Biochem.J., 34, 1041  
(1940).
- (21) Scott, E. H. y Powell, R., J.Am.Chem.Soc., 70, 1104 (1948).
- (22) Massey, V., Biochem.J., 53, 72 (1953).

- (23) Bock, R. M. y Alberty, R. A., *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 1921 (1953).
- (24) Mann, Ph. J. G. y Woolf, B., *Biochem. J.*, 24, 427 (1930).
- (25) Massey, V., *Biochem. J.*, 53, 67 (1953).
- (26) Massey, V. y Alberty, R. A., *Biochim. Biophys. Acta*, 13, 354 (1954)
- (27) Clutterbuck, P. W., *Biochem. J.*, 22, 1193 (1928).
- (28) Davydova, S. Ya., *Biokhimiya*, 12, 135 (1947); *Chem. Abs.*
- (29) Laki, E. y Laki, K., *Enzymologia*, 9, 139 (1941).
- (30) Slater, E. G. y Bonner, W. D., *Biochem. J.*, 52, 185 (1952).
- (31) Stoppani, A. O. M. y Brignone, J. A., *An. Asoc. Quím. Arg.*, 44, 19 (1956).
- (32) Alberty, R. A., Massey, V., Frieden, G. y Fuhlbrigge, A. R., *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 2485 (1954).
- (33) Jacobsohn, K. P. y Pereira, F. B., *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 114, 858 (1933); *ibid.*, 116, 169 (1934).
- (34) Jacobsohn, K. P. y Tapadinhas, J., *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 118, 1110 (1935).
- (35) Quastel, J. H., *Biochem. J.*, 25, 898 (1931).
- (36) Michaelis, L. y Menten, M. L., *Biochem. Z.*, 49, 333 (1913).
- (36a) Briggs, G. E. y Haldane, J. B. S., *Biochem. J.*, 19, 383 (1925).
- (37) Alberty, R. A., *Adv. Enzymology*, 17, 1 (1956).
- (38) Lineweaver, H. y Burk, D., *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658 (1934).
- (39) Eadie, G. S., *J. Biol. Chem.*, 146, 85 (1942).
- (40) Hofstee, B. H. J., *Science*, 116, 329 (1952).
- (41) Dixon, M., *Biochem. J.*, 55, 170 (1953).
- (42) Jacobsohn, K. P., *Arch. port. Sci. biol.*, 3, 296 (1933), citado en (43).
- (43) Pereira, F. B. y da Cruz, A., *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 117, 723 (1934).
- (44) Alberty, R. A. y Bock, R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 39, 895 (1953).
- (45) Jacobsohn, K. P., *Enzymologia*, 16, 113 (1953).
- (46) Massey, V., *Biochem. J.*, 55, 172 (1953).
- (47) Jacobsohn, K. P., Tapadinhas, J. y Pereira, F. B., *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 113, 749 (1933).
- (48) Jacobsohn, K. P. y Pereira, F. B., *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 113, 752 (1933).

- (49) Quastel, J. H., *Biochem.J.*, 25, 1121 (1931).
- (50) Fischer, A. y Herrmann, H., *Enzymologia*, 3, 180 (1937).
- (51) Stoppani, A. O. M. y Brignone, J. A., *Rev.Soc.Arg.Biol.*, 31, 21 (1955).
- (52) Davies, C. W., *Endeavour*, 4, 114 (1945).
- (53) Dixon, M., *Biochem.J.*, 55, 161 (1953).
- (54) Neurath, H. y Bailey, E., "The proteins" (1953), Academic Press.
- (55) Putnam, F. W., en <sup>(54)</sup>, Vol. I B, Cap. 10, pág. 904.
- (56) Porter, R. R., en <sup>(54)</sup>, Vol. I B, Cap. 11, pág. 988.
- (57) Helleman, L., *Physiol.Revs.*, 17, 454 (1937).
- (58) Hopkins, F. G. y Morgan, E. J., *Biochem.J.*, 32, 611 (1938).
- (59) Rapkine, L., *Biochem.J.*, 32, 1729 (1938).
- (60) Barrón, J. S. G., *Adv.Enzymology*, 11, 201 (1951).
- (61) Hopkins, F. G., Morgan, E. J. y Lutwak-Mann, C., *Biochem.J.*, 32, 1829 (1938).
- (62) Colowick, S. y otros (editores), "Glutathione (a Symposium)", Academic Press (1954).
- (63) Helleman, L., en <sup>(62)</sup>, pág. 224.
- (64) Segal, H. L. y Boyer, P. D., *J.Biol.Chem.*, 204, 265 (1953).
- (65) Racker, E., en <sup>(62)</sup>, pág. 179.
- (66a) Da Cruz, A., *Compt.Rend.Soc.Biol.*, 118, 1113 (1935).
- (66b) Jacobsohn, K. P. y Tapadinhas, J., *Compt.Rend.Soc.Biol.*, 120, 36 (1935).
- (67) Laki, I., *Enzymologia*, 2, 141 (1941).
- (68) Helleman, L., Chinard, F. P. y Deitz, V. R., *J.Biol.Chem.*, 147, 443 (1943).
- (69) Helleman, L., Chinard, F. P. y Roesdell, P. A., *J.Gen.Chem.Soc.*, 63, 2551 (1941).
- (70) Stoppani, A. O. M., Deferrari, J. O. y González, E. L., *Anasoc. Quím.Arg.*, 41, 49 (1953).
- (71) Stoppani, A. O. M., Actis, A. S. y Deferrari, J. O., *An.Asoc. Quím.Arg.*, 40, 206 (1952).
- (72) Bach, S. J., Dixon, M. y Zorfas, L. G., *Biochem.J.*, 40, 229 (1946).
- (73) Singer, F. P. y Kearney, E. B., *Arch.Biochem.*, 29, 190 (1950).
- (74) Utter, M. F. y Kurahashi, K., *J.Biol.Chem.*, 207, 787, 803, 821 (1954).

- (75) Jacobsohn, K.P. y Pereira, F. B., Bull.Soc.Chim.Biol., 16, 550 (1934).
- (76) Frieden, C., Bock, R. M. y Alberty, R. A., J.Am.Chem.Soc., 76, 2482 (1954).
- (77) Sohler, E. R., Seibert, M. A., Kreke, C. W. y Cook, E. S., J. Biol.Chem., 198, 281 (1952).
- (78) Neilands, J. B., J.Biol.Chem., 208, 225 (1954).
- (79) Takenaka, Y. y Schwert, G. W., J.Biol.Chem., 223, 157 (1956).
- (80) Halsey, Y. D., J.Biol.Chem., 214, 589 (1955).
- (81) Alberty, R. A. y Massey, V., Biochim.Biophys.Acta, 13, 347 (1954)
- (82) Johnson, P. y Massey, V., Biochim.Biophys.Acta, 23, 544 (1957).
- (83a) Greenstein, J. P., J.Biol.Chem., 130, 519 (1939).  
Burk, N. F., J.Phys.Chem., 47, 104 (1943).
- (83b) Michaelis, L. y Pechstein, H., Biochem.Z., 59, 77 (1914).
- (84) Grisolia, S., Rev.españ.fisiol., 6, 219 (1950); Chem.Abs.  
Speyer, J. F. y Dickman, S. R., J.Biol.Chem., 220, 193 (1956).
- (85) Stern, J.R. y del Campillo, A., J.Biol.Chem., 218, 985 (1956).
- (86) Ellfolk, N., Acta Chem.Scand., 7, 1155 (1953).
- (87) Morgan, E. J. y Friedmann, E., Biochem.J., 32, 733 (1938).  
Pine, L. y Peacock, C. L., J.Am.Chem.Soc., 77, 3153 (1955).
- (88) Benesch, R. E. y Benesch, R., J.Am.Chem.Soc., 77, 5877 (1955).
- (89) Benesch, R., Benesch, R. E. y Rogers, W. I., en <sup>(62)</sup>, pág 31.
- (90) Conway, E. J. y Downey, M., Biochem.J., 47, 355 (1950).