

## Tesis de Posgrado

# Fumarasa de levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) : Purificación y propiedades

Cataldi, María Antonia

1963

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:**

Cataldi, María Antonia. (1963). Fumarasa de levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) : Purificación y propiedades. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1190\\_Cataldi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1190_Cataldi.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Cataldi, María Antonia. "Fumarasa de levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) : Purificación y propiedades". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1190\\_Cataldi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1190_Cataldi.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

---

**FUMARASA**  
**DE LEVADURA DE PANADERIA (Saccharomyces cerevisiae)**  
**Purificación y propiedades**

---

**María Antonia Cataldi**

---

**Resumen para optar al**  
**Título de Doctora en Ciencias Químicas**

*R de Tess 10 i*

1963

# FOYBAA

## RESUMEN

Por métodos clásicos de fraccionamiento de proteínas se consiguió la purificación de la enzima, fumarasa de levadura de panadería Saccharomyces cerevisiae, y se realizó el estudio de algunas de sus propiedades.

1º) La levadura, libre de almidón fue sometida a un tratamiento con acetona y eter, que permeabiliza la pared celular. Obtenido el polvo acetónico la enzima se extrajo del mismo, con solución de fosfato de potasio.

El extracto crudo fue clarificado por adsorción negativa en gel de fosfato, realizada "in situ" a pH 7.2.

Posteriormente se fraccionó con sulfato de amonio (droga sólida). La enzima precipita con una concentración de 45-62%. El precipitado se suspendió en buffer fosfato.

Para eliminar el sulfato de amonio remanente se sometió a una filtración en gel de Sephadex.

Se efectuó luego la eliminación de ácidos nucleicos usando sulfato de protamina.

Un fraccionamiento con acetona realizado a pH 7.0 entre 44-50% de saturación del solvente, permitió aumentar la pureza de la enzima, la cual se concentró luego por liofilización.

El extracto concentrado se cromatografió en columna de hidroxilapatita. La enzima fue eluida a pH 6.8 variando la fuerza iónica del buffer. Las fracciones de la columna con actividad específica máxima se juntaron y precipitaron con solución saturada de sulfato de amonio, hasta 75%. El precipitado obtenido de esta fracción contenía la enzima.

Se sometió a un análisis en ultracentrífuga y se comprobó que la muestra se resolvía en un solo componente proteico.

La actividad específica máxima obtenida fue 800-880 unid/mg.

Los extractos crudos se purificaron entre 400-600 veces, dependiendo del grado de pureza original.

2º) La enzima fue inactivada por los reactivos de grupos sulfhidrilos, especialmente por el p-cloromercuribenzoato. Se comprobó que ensayos realizados con extractos mas purificados, requerían mayor cantidad de reactivo para la inhibición. La cisteína reactivaba la enzima inactivada. Los sustratos y el fosfato la protegían.

3º) Se determinó la constante de equilibrio en distintas con-

# NOTA

diciones. Se comprobó que la misma era afectada por la fuerza iónica del medio pero no por el pH (dentro del ámbito de pH 5.8 -8.3).

Se estudió la curva de pH en función de actividad para los dos sustratos y se comprobó que el pH óptimo en la reacción de deshidratación del L-malato fue 7.3 mientras que en la hidratación del fumarato, la curva presentó una meseta con valores comprendidos entre 6.0 - 6.5.

Se probó la acción de distintos aniones sobre la actividad catalítica de la enzima. De los aniones monovalentes, el borato no influyó, el nitrato fue inhibitorio, los halógenos inhibían en relación creciente a sus números atómicos y el sulfocianuro fue de los aniones inhibitorios el más potente.

Los aniones bi o trivalentes ensayados, sulfato, arseniato y fosfato, resultaron ser activadores.

Se estudió la influencia del fosfato en la cinética de la enzima. Se experimentó con los dos sustratos. Se comprobó que para concentraciones comprendidas entre 5-50 mM de fosfato, este activa y que a mayores concentraciones del mismo inhibe en forma competitiva.

Se determinó el valor de la constante de Michaelis, en buffer Tris y se obtuvo un valor de 3.6 mM para los dos sustratos.

4º) Por estudios realizados de la variación de la constante de Michaelis con el pH, se observó que en la enzima existen grupos con una constante de ionización que puede corresponder al imidazol de la histidina.

*A. L. L. S.*

FOEA-BA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

FUMARASA

DE LEVADURA DE PANADERIA (Saccharomyces cerevisiae)

Purificación y propiedades

María Antonia Cataldi

TESIS: 1219

Tesis presentada para optar al  
título de Doctora en Química

1963

A NLS padres

Este trabajo de tesis se realizó en el Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Buenos Aires, bajo la dirección del Dr. A.O.M. Stoppani, quien propuso el tema. A él le agradezco la oportunidad brindada, su constante apoyo y estímulo durante la realización del mismo.

Asimismo agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por las becas otorgadas durante los años 1959, 1960, 1962 y 1963.

A la Universidad de Buenos Aires, la beca que me otorgara en el año 1961.

Al Dr. T.R. Selix del Instituto Nacional de Microbiología y al Dr. H. Isnardi de la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires, por haber autorizado al Sr. T. Giovambattista, quienes realizaron los estudios de ultracentrifugación.

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

La fumarasa es la enzima que cataliza, en forma reversible, la adición de una molécula de agua sobre la doble ligadura del ácido fumárico, para dar L-málico.

El hecho de que tanto la reacción directa como la inversa pueden ser estudiadas, y además la facilidad de tener un método espectrofotométrico para seguir la cinética de estas reacciones, hacen que la enzima sea de fácil estudio en lo que concierne a la naturaleza fundamental de la reacción catalítica.

La fumarasa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, pero la de corazón de cerdo, que fue la primera en ser altamente purificada, es al presente la mejor estudiada. Originalmente fue cristalizada por Massey (120, 121). El método consistía en la adsorción cuantitativa de la enzima en gel de fosfato de calcio, y posterior elusión de la misma, combinado con precipitaciones con sulfato de amonio.

Posteriormente Frieden (5) desarrolló otro método que difería sustancialmente del obtenido por Massey. La enzima del extracto crudo era precipitada acidificando el medio, operación que se realizaba a baja temperatura, y el extracto así obtenido se sometía a fraccionamientos con sulfato de amonio. La enzima obtenida por los dos métodos resultó tener igual comportamiento cinético.

La fumarasa de tórula (55) fue parcialmente purificada utilizando métodos electroforéticos en columna de celulosa, y cromatográficos con resinas de intercambio iónico (DEAE). Se obtuvieron dos formas moleculares que estudiadas son diferentes entre sí y distintas de la de cerdo.

Mello y Ayres, estudiaron la fumarasa aislada de Propionibacterium pentosaceum (54). El extracto crudo fue calentado a 50°C y luego, previa eliminación de ácidos nucleicos, se sometió a una adsorción con gel de fosfato de calcio. Posteriormente se cromatografió en resina celulósica (DEAE).

Los estudios realizados sobre el efecto de la concentración del sustrato, en la fumarasa de cerdo, (56) demostraron que para concentraciones suficientemente grandes del sustrato había inhibición. A valores más bajos de la concentración, la veloci-



dad inicial está dada por una ecuación del tipo

$$v = \frac{V_2 + V_1 K_2 / (1 - V_1 / V_2) (S)}{1 + K_2 / (1 - V_1 / V_2) (S) + K_1 K_2 / (1 - V_1 / V_2) (S)^2}$$

donde  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $K_1$ ,  $K_2$ , son constantes y  $(S)$  concentración del sustrato.

Si se sigue disminuyendo el valor de la concentración del sustrato, la ecuación se simplifica a la de Michaelis-Menten

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

Por estudios de parámetros cinéticos con el pH (30, 45), se obtuvieron datos de las constantes de ionización de los sitios enzimáticos de la enzima libre y del complejo ES. La constante de ionización de grupos de la enzima libre fue la misma para cualquiera de los dos sustratos, y de acuerdo a los valores obtenidos darían idea de que los grupos imidazoles estuvieran implicados en la catálisis.

La fumarasa de cerdo es inhibida por compuestos que están estructuralmente relacionados con el sustrato (52). Se realizaron determinaciones de la inhibición competitiva de varios compuestos en función del pH (52, 122). El inhibidor más potente de la fumarasa fue el meso-tartrato. La fumarasa de Proteus vulgaris (127), es inhibida competitivamente por el DL-fluoromalato, tanto en la reacción de hidratación como la inversa, siendo la constante de inhibición para los dos sustratos, la misma y el mismo valor a cualquier concentración de inhibidor.

Por otra parte, Gal (128) demostró que la fumarasa de corazón de cerdo no era inhibida por el fluoromalato.

La enzima de cerdo no es sensible a reactivos de grupos sulfhidrilos (52), mientras que las de P. pentosaceum (54) y la de S. cerevisiae (19), sí lo son. Nada se sabe al respecto de la de tórula.

El uso de  $D_2O$  en la hidratación enzimática del fumarato demostró que el L-malato formado contenía un átomo de deuterio de lo que se probó que la adición de dicho átomo es estereoespecífica y la hidratación se produce en forma trans. (124, 125, 126).

Thomson (129), estudió el efecto del  $D_2O$  en la velocidad de hidratación del fumarico, usando fumarasa de cerdo cristalizada. Los resultados obtenidos probaron que en presencia de 100% de  $D_2O$  la velocidad de hidratación se hallaba disminuída en un 45% con respecto a la obtenida en presencia de  $H_2O$ .

Por otra parte se estudió la actividad en función del pH, en presencia de  $H_2O$  y  $D_2O$  y se encontró un pequeño corrimiento del pH óptimo hacia el lado alcalino.

La constante de equilibrio determinada en presencia de 100% de  $D_2O$  disminuye en un 7%, dato que está de acuerdo con el dado por Jacobsohn (130), y el dado por Alberty (134).

La constante de Michaelis fue determinada para los dos sustratos, a distintas concentraciones de  $D_2O$ . Tanto para el fumarato, como para el malato, el  $K_m$  disminuyó con el aumento de la concentración de  $D_2O$ .

La titulación de la fumarasa de cerdo fue realizada por Shavit (132). El método de la titulación de una enzima permite verificar las constantes de ionización de los grupos del (o los) sitios enzimáticos, obtenidas científicamente.

Los datos cinéticos demostraron que existen dos grupos por sitio activo. Trabajando en 0.09 N ClNa y 0.01 N Tris-clorhídrico a 25°, el valor del pK de dicho grupo es 7.4 (133).

De la curva de titulación de la enzima se estimó el número de sitios enzimáticos por mol de fumarasa (134). Así se obtuvo, suponiendo el P.M. 220000, que existen 12 (2) grupos con pK 7.4. Como hay dos grupos por sitio activo, la molécula tiene 6 (1) sitios catalíticos.

La identificación de la reacción catalizada por la fumarasa de levadura de panadería Saccharomyces cerevisiae, el papel que desempeña en el metabolismo celular en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y posibles relaciones metabólicas inmediatas de los sustratos, han sido resumidas (23).

Es de interés realizar estudios comparativos de una enzima obtenida de distintos organismos, o aun del mismo pero de distintos tejidos.

Durante varios años se han realizados estudios para tratar de demostrar las analogías o diferencias entre enzimas funcionalmente similares. Para ello se desarrollaron variedades de métodos que comprenden análisis del tipo químico, físico inmunológico y cinético.

La determinación de la secuencia de aminoácidos en una cadena polipeptídica es tal vez uno de los ensayos de mayor interés y en especial en las moléculas enzimáticas en las cuales, variaciones estructurales en distintas especies podrían dar valiosa información en la ubicación del sitio activo.

Este tipo de experimento solo ha sido realizado, hasta el presente, con una <sup>soja</sup> enzima, la ribonucleasa pancreática de bovino, por Hirs y col. (57).

Un estudio comparativo de la composición de aminoácidos de la ribonucleasa pancreática de ovino, fue realizado por Anfinsen y col. (58), quienes encontraron dos diferencias en la secuencia de las ribonucleasa de las dos especies; una es la sustitución de treonina en la bovina, por serina en la ovina, y la otra, es lisina por glutámico. Van la posibilidad de una diferencia mas, pero la posición exacta no la han podido determinar.

La variación del grupo lisina por glutámico parecería estar en una región de la proteína nativa, que no es esencial en el sitio activo. Además la actividad específica de ambas enzimas es practicamente la misma. Esto corrobora el hecho de que la diferencia no se halle en el sitio activo.

El otro cambio existente es el par treonina, serina. Aquí la diferencia es un grupo metileno y eso tampoco influye en la actividad enzimática,

También se han hallado diferencias en estudios de polipéptidos y de otras proteínas, no enzimas.

En el estudio de la vasopresina de cerdo y bovina (59) se demostró que solo un aminoácido está alterado, una arginina en el polipéptido bovino, que es reemplazada por una lisina en el de cerdo

En la insulina (60), aislada de distintas especies se encontró que todas tenían igual actividad, pero presentaban diferencias estructurales, que no implicaban la parte activa. Las variaciones encontradas de una especie a otra eran tres aminoácidos que se encontraban en la cadena A del anillo determinado por los puentes disulfuros.

Así en:

ovino	Al	Ser	Val
cerdo	Treo	Ser	Ileu
oveja	Al	Gli	Val
caballo	Treo	Gli	Ileu
ballena	Treo	Ser	Ileu

Las técnicas inmunológicas son útiles para ver si las enzimas son iguales o no.

Los primeros intentos realizados en este campo fueron los de Kubowitz y Ott (61) quienes estudiaron enzimas de tejidos normales y de tumores de una misma especie y comprobaron que la láctico deshidrogenasa, aislada de músculo de rata y de sarcoma de Jensen, era igualmente inhibida por el antisuero de la enzima de músculo.

Herrion y Sutherlans (62) hicieron estudios con la fosforilasa. Inyectaron fosforilasa de corazón e hígado de perro, a gallos y los antisueros así obtenidos inhibían en forma mas intensa a las enzimas homólogas, por otra parte si se probaban enzimas de otras especies, la inhibición obtenida era mucho menor.

Estudios realizados con fosfatasa alcalina de intestino de perro (63) (64) demostraron que el antisuero precipita la enzima de intestino pero no la de otros órganos de perro.

En los trabajos de Nisselbaum y col. (65) realizados con fosfatasa alcalina humana de intestino y hueso, se probó la diferencia inmunológica de las mismas. Por otros trabajos de inhibición con ácidos biliares (66) y con aminoácidos (67), se habían obtenido datos que diferenciaban las dos enzimas.

No siempre un estudio inmunológico de identidad o diferenciación de proteínas puede ser aceptado categoricamente.

Yunis y Krebs (68) estudiaron la fosforilasa b de músculo de conejo y de músculo esquelético humano, y demostraron que inmunológicamente son distintas contrariamente a lo presentado anteriormente. (69).

Los ensayos primitivos que demostraron la identidad de las enzimas fueron realizados con antisuero de gallo preparado con una de las <sup>dos</sup> proteínas. Sin embargo cuando se produjo en conejo un antisuero de gallo altamente específico de fosforilasa de músculo de conejo, se demostró la diferencia de ambas enzimas

Las técnicas inmunológicas son útiles para identificar o diferenciar las enzimas. Sin embargo el hecho de que dos o mas de ellas sean inmunológicamente idénticas, no garantiza la identidad de las mismas desde el punto de vista estructural o cinética.

Estudios electroforéticos realizados en gel de almidón por Paul y Fottrell (70), demostraron la diferenciación electrofo-

rética de varias enzimas de distintas especies.

Realizaren ensayos con esterasa, fosfatasa, catalasa y peroxidasa de rata, paloma, rana, cobayo, humano y otros, comprobando que las diferencias existentes, lejos de ser excepción eran la regla y que por lo tanto existen muchas proteínas distintas con igual actividad enzimática.

Electroforéticamente pueden diferenciarse enzimas de distintas y aun del mismo tejido. Así la esterasa (72, 73) la tripsina (74) la málico deshidrogenasa (75, 76, 77) y la láctico deshidrogenasa (75, 76, 77, 78, 79, 80) se separaron por electroforesis en distintos tipos moleculares.

Markert (81) denomina a estas múltiples formas de una enzima, isozimas.

Por métodos cromatográficos con resinas de intercambio también se han separado isozimas entre ellas tenemos: la ribonucleasa (82, 83, 84), la lisozima (85, 86).

Por tratamientos térmicos Adunts (87, 88) realizó estudios de diferenciación de fosfatasa alcalina de hígado y riñón de rata y conejo.

Después de someter a un calentamiento de 50°C observaron que la actividad se hallaba disminuida en mayor o menor grado. Así la actividad de la fosfatasa de rata decaía en un 20%, mientras que la de conejo aumentaba considerablemente indicando que esta última era más termoestable que la de rata, y esto sería debido a probables diferencias de configuración estructurales.

El estudio del comportamiento cinético es otro método de comparación de enzimas homólogas.

La enolasa, ha sido estudiada de levadura (89, 90, 91, 92, 93) de papa (94, 95) y de músculo de conejo (96) (96a).

Wold hace un estudio comparativo de las enzimas.

Determinaciones preliminares de la comparación del contenido de aminoácidos dieron una diferenciación significativa y es la presencia de cisteína (o cistina).

En la enolasa de levadura estos se hallan ausentes, en cambio en la de músculo de conejo se ha encontrado cisteína. A pesar de la presencia de la misma <sup>1a</sup> enzima no es inhibida por el p-mercuribenzoato, de lo que se deduce que los mismos no se hallan comprometidos estructuralmente en el sitio activo de la enzima.

La enolasa de papa en cambio, tiene un gran contenido de cis-

tefina y es inhibida por varios reactivos de grupos sulfhidri-  
los.

La dependencia de la actividad enzimática con el pH mostró  
distinto comportamiento entre la enolasa de músculo y de le-  
vadura. El pH óptimo para la primera resultó ser menor en una u-  
nidad que en la levadura

La activación por metales,  $Zn^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Ni^{++}$ , y  $Mn^{++}$  es simi-  
lar en las enolasas de músculo y levadura.

Las aldolasas derivadas de distintas fuentes pueden ser di-  
vididas en dos grupos principales de acuerdo a que sean o no  
inhibidas por agentes quelantes (97).

Los primeros ensayos de diferenciación fueron realizados por  
Warburg y Cristian (98), quienes encontraron diferente compor-  
tamiento de la aldolasa de músculo y de la levadura.

La de levadura era fuertemente inhibida por cianidina y el  
2-piridilo, cisteína, pirofosfato y la inhibición era supri-  
mida por el agregado de iones divalentes Zn, Co, Cu, . Se compro-  
bó en una preparación altamente purificada que la enzima conte-  
nía Zn (99).

Por otra parte, la enzima de músculo no era afectada por la  
presencia de agentes quelantes (98) y no contenía cantidades  
significativas de ningún ion divalente (98, 100).

De acuerdo a esto<sup>a</sup> las aldolasa se las dividió en dos grupos  
uno se caracterizaba por no poseer metal, (tipo I, aldolasa de  
músculo) y el otro por poseer, (tipo II, aldolasa de levadura)

Ademas de las enzimas de músculo, estudiadas de rata y cone-  
jo, la enzima de hígado bovino, (101) y la de guisante(102)  
pueden considerarse en el tipo I.

Dentro del tipo II aparecen ubicadas la mayoría de la aldo-  
lasas estudiadas en sistemas microbiológicos. Por ejemplo la  
de varias especies de Aspergillus en especial de A. niger, con-  
tiene un mol de Zn por 50000 gr de proteína (103).

En Clostridium perfringens la actividad de la aldolasa es  
aumentada por Fe y Co, divalentes junto con cisteína (104).

También se agrupan en el tipo II la aldolasa de Escherichia  
coli, (105) Lactobacillus bifidus (106) Brucella suis (107) y  
Mycobacterium tuberculosis(108)

Las dos aldolasas mas estudiadas son la de músculo y la de  
levadura, y de esas dos Richards y Kutter (109) realizaron un  
estudio comparativo y los resultados obtenidos evidenciaron la

diferenciación de ambas enzimas, probablemente en sus centros activos.

Estudiaron el efecto de la temperatura sobre la actividad y obtuvieron resultados que demostraron que la aldolasa de levadura es considerablemente menos termoestable que la enzima de músculo.

El pH óptimo de las dos enzimas variaba; así la de levadura, en la reacción de síntesis del aldol, el pH óptimo era 7.0 a 7.5, en cambio en la de músculo la síntesis aldólica era prácticamente independiente del pH entre valores 6.5 a 9.0.

La actividad de la aldolasa de levadura era estimulada por la presencia de iones potasio. En cambio la de músculo no era influenciada.

Si se sometía a un tratamiento con carboxipeptidasa la actividad de ruptura del aldol disminuía entre 5 a 7% cuando se ensayaba la enzima de músculo, pero no afectaba a la de levadura,

Los pesos moleculares dados por las aldolasas son los siguientes: levadura 65-70000 (109), A. niger 50000 (103), músculo de conejo 159000 (119).

La identificación de dos málico deshidrogenasa de corazón bovino, fue realizada por Siegel y Angiard (110), quienes las denominaron S-MDH y M-MDH. La primera se encontró en la porción de la célula no particulada y se la extrajo de los corazones con una solución isotónica de sacarosa. La otra forma, de origen presumiblemente mitocondrial, fue purificada de extractos de polvo acetónico de corazón.

Se realizaron ensayos para determinar el contenido de aminoácido de ambas enzimas y se probó que no era similar. Así la S-MDH contenía más lisina, arginina, tirosina, metionina, aspártico y triptófano que la M-MDH y menos fenilalanina, glicina, prolina y treonina.

La sensibilidad de ambas enzimas hacia el p-mercuribenzoato era completamente distinta. Mientras la S-MDH no era inhibida por el reactivo, la M-MDH era inactivada.

Además, altas concentraciones de oxalacetato producía la pérdida de actividad en la M-MDH y no en la S-MDH. Como los compuestos con grupos carbonílicos reaccionan con grupos sulfhidrílicos para dar tiohemiacetales (111, 112), es muy probable que las dos diferencias estén relacionadas y la inhibición por el oxalacetato este relacionada a su combinación con los sulfhi-

drilos.

Estudios realizados con la plasmina humana (116), y bovina (117) dieron <sup>como</sup> resultados la identidad funcional de las mismas.

Se realizaron experimentos del tipo cinético, estudiándose la variación de la constante de Michaelis y la velocidad máxima, con la variación del pH.

Los datos obtenidos fueron interpretados de acuerdo con Dixon (32) y Laidler (118).

Con las dos enzimas se determinaron gráficos de Dixon para la enzima sola y de la enzima en presencia de cloruro de calcio y cloruro de níquel.

En las dos se encontró el mismo número de grupos participantes en la cinética y con el pK del mismo valor, dentro del error experimental.

Cuando se trabajó en presencia de calcio y níquel se notó el mismo corrimiento, hacia el lado alcalino, de los valores de los pK de los grupos ionizables, en las dos enzimas.

Estudios de dos ribonucleasas de orina y una de bazo humano, fueron realizados por Delaney (115) quien las comparó con la ribonucleasa pancreática bovina. A las enzimas aisladas de orina, que separó en columna de intercambio, las denominó P y U, y la ribonucleasa bovina A.

Determinó pesos moleculares y encontró el mismo orden de magnitud para la ribonucleasa A y P, en cambio el peso molecular de la de bazo, y de la ribonucleasa U, eran distintos a los de las anteriores y también diferían entre ellos.

El análisis de la composición de aminoácidos dió resultados similares entre la ribonucleasa U y la P. Los datos dados para la ribonucleasa U y la de bazo, fueron determinados una sola vez, y a pesar de la similitud de los mismos, el autor no los asegura.

La curva de actividad en función del pH es otro dato que corrobora la identidad de la A y la P mientras que las diferencia de las otras dos.

Las medidas de V y Km, realizadas por la hidrólisis del ácido ribonucleico, para la A y la P fueron  $1.2 \times 10^{-3}$  mg por ml-seg y 0.14 mg/ml, mientras que para la de bazo y la U fueron  $0.37 \times 10^{-3}$  mg/ml-seg y 0.51 mg/ml.

Inmunológicamente la P es capaz de combinarse con los anti-



cuerpos del antisuero producido para la A. La U y la de bazo, no reaccionaban, a pesar de que la cantidad de antisuero era 160 veces mayor que la usada con las otras dos enzimas.

Con esta serie de evidencias concluyen que la A y la P son similares entre si, pero distintas a la de bazo y ala Ue

En el presente trabajo se ha realizado la purificación de la fumarasa de Saccharomyces cerevisiae, y estudiando algunas propiedades de la misma, comparando los resultados con los datos obtenidos de fumarasa de otros orígenes.

## CAPITULO II

### PREPARACION DE LA ENZIMA

La enzima fue purificada por la combinación de los métodos de aislación de proteínas: precipitación salina, precipitación con solventes orgánicos y cromatografía en columna.

#### 1.- MATERIALES

- a. Levadura de panaderia (Saccharomyces cerevisiae), se utilizó el producto comercial, prensado y libre de almidón obtenido industrialmente por la Cia. Argentina de Levadura E.N.
- b. Acido fumárico: La droga de Pfanstiel Chemical Co. recristalizada de ácido clorhídrico 1 N de acuerdo con Blatt (1). PF. 295
- c. ACido L-málico. indistintamente de Pfanstiel Chemical Co. o de Eastman Kodak.
- d. Fosfato dipotásico. preferiblemente se usó de Mallinckrodt p.a. ya que dió mejores rendimientos en la extracción de la enzima
- f. Sulfato de amonio: se usó Mallinckrodt o Merck; este último no siempre dió resultados reproducibles.
- e. Sephadex: de Pharmacia " G25 coarse"
- g. Sulfato de protamina: Sigma Chemical Company.
- h. Hidroxilapatita: se preparó de acuerdo al método dado por Tiselius y col. (2). se usó para prepararla cloruro de calcio deshidratado de Merck p.a. y  $PO_4Na_2$  anhidro Analar de B.D.H.
- i. Buffer de fosfato: se prepararon con fosfato diácido de sodio Analar Hopkin y Williams Ltd. p.e.
- j. Etilendiamintetracetato: (EDTA) sal sódica Merck.
- k. Tris (hidroximetil)amino-metano: (Tris) de Sigma Chemical Co.

#### II METODOS

Todas las operaciones se realizaron en cámara fría a temperatura entre 0-5°C:

- a. Centrifugaciones en frío: Para estas operaciones se utilizó una centrifuga refrigerada de la International Equipment Co. modelo PR2 provista de rotor 840 a.
- b. Ultracentrifugaciones: se llevaron a cabo en una ultracentrifuga Spinco modelo E.
- c. Liofilizaciones: se llevaron a cabo con un liofilizador marca virtis.
- d. Medición de pH: por métodos potenciométricos con el aparato Beckman modelo H2 o con el Metrahm K 166. Las medidas de pH en extractos enzimáticos se realizaron con indicadores colorimétricos, comparando con la escala de Sorensen.
- e. Medición de la concentración protéica: se empleó el método es-

pectofotométrico de Cristian y Warburg (3) con la corrección por la presencia de ácidos nucleicos.

f.- Medidas espectrofotométricas: con un Beckman DU teniendo el compartimiento de las celdas termostático y con registrador Speedomax tipo Leeds & Northrup Co. con convertidor de densidades ópticas e inscriptor a tinta.

Para las medidas de rutina se utilizó un Beckman DU sin termostato

g.- Medición de la actividad enzimática: las medidas de actividad se hicieron espectrofotométricamente.

En el proceso de purificación se midió con fumarato como sustrato, usando el método y definición de la actividad de acuerdo con Massey (4) " 0.017 M de fumarato de sodio en 0.033 M de buffer fosfato pH 7.3 y enzima en un volumen total de 3 ml. Se lee la disminución de la densidad óptica a 300  $\mu$  en intervalos de 15 segundos. La unidad enzimática se define como la disminución de la densidad óptica de 0.01 en 1 minuto".

La actividad específica, es la relación entre, la actividad por mililitro, sobre miligramos de proteína por mililitro.

En las reacciones cinéticas se usó l-malato como sustrato y se midió de acuerdo con Frieden (5) " 0.05 M de l-malato en 0.05 M de buffer fosfato pH 7.3 y enzima en un volumen total de 3 ml. Se lee aumento de densidad óptica a 250  $\mu$ . El número de unidades de actividad para una alícuota, se define como la velocidad de cambio en la densidad óptica en 10 segundos multiplicado por  $10^3$ , debido a la formación de fumarato".

La actividad específica es la relación de la actividad de una alícuota sobre la densidad a 250  $\mu$  de la misma alícuota en 3 ml de buffer fosfato 0.05 M pH 7.3.

h.- Aislación de la enzima: la levadura se somete al proceso de secado con solventes orgánicos, tratamiento que permeabiliza la pared celular y permite el pasaje de la enzima hacia el exterior.

Se trabaja de acuerdo con Stoppani (6). " La levadura libre de almidón se suspende en agua destilada con una licuadora se filtra por succión hasta obtener una torta seca. 400 gr de esa torta se suspenden en licuadora con 1000 ml de acetona a  $-26^{\circ}\text{C}$ . Se filtra con succión por un buchner frío, repitiendo el tratamiento dos veces más. La torta de la tercera filtración se lava con dos porciones de éter etílico libre de peróxidos (250 ml) a  $-25^{\circ}\text{C}$ . Se escurre bien por succión extendiéndose luego sobre un papel de filtro. A continuación se seca con una corriente de aire de ventilador, desparramando bien el material para

facilitar la eliminación de los restos de éter y acetona que pudieran quedar, Las operaciones deben hacerse lo mas rápido posible para evitar el aumento de la temperatura. El polvo blanco obtenido se guarda en un desecador al vacio con hidróxido de potasio como deshidratante y vaselina líquida para absorber la acetona remanente. El rendimiento es de 120 gr de polvo por 400 gr de torta de levadura.

La obtención de extractos acelulares se hace siguiendo el método de Favelukes (7) " 100 gr de polvo acetónico se suspenden en licuadora con 400 ml de solución de fosfato dipotásico 0,092 M (preferiblemente de la marca Mallincrodt).

Se deja una hora a temperatura ambiente y luego 4-5 dias en cámara fría agitando periodicamente, manteniendo el pH entre 6.5-7.5 Se corrige con hidroxido de amonio concentrado. Al termino de la extracción se centrifuga a 3500 r.p.m. durante 45 minutos. El sobrenadante que se obtiene es un líquido turbio que contiene la enzima y que puede ser conservado a  $-26^{\circ}\text{C}$  durante seis meses sin pérdida significativa de la actividad.

El rendimiento de la extracción fue variable. En los primeros ensayos se obtuvo mayor cantidad de la enzima que en los extractos finales del trabajo. La actividad específica varia entre los valores de 2.1-1.2. Entre las causas que mejoraban el proceso de extracción, se observó que la elección del fosfato dipotásico, era importante. Los mejores resultados se obtuvieron trabajando con la droga Mallincrodt.

Ademas puede haber variaciones en el pH durante la extracción; valores menores de 6.0 inactivan la enzima. Otra causa de las diferencias observadas podría ser atribuida a una mutación que haya sufrido la levadura.

#### 1.- Adsorción negativa en gel de fosfato de calcio trabajando

" in situ": el extracto crudo se somete a una adsorción negativa en gel de fosfato de calcio preparado "in situ".

La adsorción se hizo en la relación de 0.5 ml de fosfato 0.5 M por 230 mg de proteína. El acetato de calcio se agregó lentamente y con agitación en la relación de 0.5 ml de acetato 1 M por mililitro de fosfato. La operación se realizó a pH 7.2. Se dejó sin agitar durante 20-30 minutos; se centrifugó 15 minutos a 3500 r.p.m.

El precipitado se descartó; el sobrenadante, un líquido amarillento transparente, contenía la enzima.

Los redimientos de algunas preparaciones pueden ser vistos en

la tabla 1.

En algunos extractos la recuperación de la actividad fue total y en otros hubo pérdida de la actividad hasta valores de 25%. Es probable que se haya producido algo de adsorción de la enzima en el gel, a pesar de que la concentración de electrolitos es bastante alta, aproximadamente 0.1 M de fosfato.

**j.- Fraccionamientos con sulfato de amonio:** se ensayó precipitación salina en distintas etapas de la purificación. Según el volumen de muestra con que se trabajó, las precipitaciones se hicieron con droga sólida o solución saturada a 5%.  
El agregado del sulfato de amonio se hizo en forma lenta, agitando continuamente para evitar concentraciones locales del electrolito.

Para calcular la saturación alcanzada por el agregado de droga se utilizó el nomograma de Dixon (8). Este está calculado para 25°C, por lo tanto al expresar la saturación de acuerdo al nomograma se comete un error, pero como dato comparativo es posible usarlo.

Las precipitaciones se realizaron a un pH determinado. Por lo tanto se controló el pH, el cual se corrigió con amoníaco aproximadamente 4 M.

Las precipitaciones se realizaron a un pH determinado. Por lo tanto se controló el pH, el cual se corrigió con amoníaco aproximadamente 4 M.

Cuando se usó solución saturada se empleó la siguiente fórmula

$$V_a = V_s \frac{C_f - C_i}{100 - C_f}$$

donde  $V_a$  es el volumen de solución a agregar,

$V_s$  el volumen de extracto que se quiere precipitar,

$C_f$  concentración final que se quiere obtener,

$C_i$  concentración inicial del extracto.

La solución saturada se lleva a pH 7 con amoníaco. Una vez producida la precipitación se dejó entre dos horas y una noche y luego se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 45 minutos. Los precipitados fueron disueltos en buffer fosfato 0.01 M pH 7. En las primeras experiencias se dializó, pero se perdía mucha actividad ( ver tabla 3, extractos A, B, C, D).

Se probó <sup>que</sup> con sulfato de amonio, los extractos se podían guardar congelados a -25°C sin pérdida de actividad, durante cuatro meses.

TABLA I  
ADSORCION NEGATIVA EN GEL DE FOSFATO

---

Extracto	Rendimiento	Purificación
	( % )	( veces )
A	91	1.3
B	106	1.6
C	100	1.6
D	78	1.1
E	75	1.0
F	78	1.5

---

La presencia de sulfato no interfiere en las medidas de actividad. Se hicieron ensayos previos para ver en que condiciones de trabajo se obtenían mejores resultados. La calidad de la droga es un factor muy importante que hay que considerar. Aun trabajando con la misma marca, pero distinta partida se han obtenido resultados variables.

En la tabla 2 se ven datos de tres fraccionamientos A, B, C, en los que no se obtuvo ninguna purificación e incluso la actividad específica resultó ser menor que en el paso precedente.

Los otros tres extractos dan resultados de rutina. Las condiciones de trabajo fueron iguales en todas las experiencias, el sulfato de amonio usado era Merck pero de dos partidas distintas.

A extractos provenientes de la adsorción negativa en gel de fosfato, se los sometió a un fraccionamiento con sulfato de amonio. Se ensayó el pH y ámbito de saturación convenientes para la enzima.

Se observó que las mejores condiciones de trabajo se tuvieron, cuando se realizó a pH 7.8, entre 45-60% de saturación, ver tabla 3.

En las primeras experiencias se hicieron dos fraccionamientos sucesivos. El segundo se realizó a pH 8.0. La distribución de la enzima y la purificación pueden verse en la tabla 4.

Este paso fue eliminado cuando se suprimió la dialisis, ya que no era fácil controlar la cantidad de sulfato de amonio que quedaba en el extracto, proveniente de la precipitación anterior.

k.- Filtración en gel de Sephadex; Porath (9) presenta un método de separación de sales, cuando se hallan presentes en soluciones de proteínas.

El problema de la eliminación del sulfato de amonio, fue resuelto cuando se comenzó a usar Sephadex.

El método de separación llamado filtración en gel se funda en la propiedad que tiene el Sephadex de retener solutos de moléculas chicas y dejar pasar los de moléculas grandes.

El Sephadex es una sustancia hidrofílica, insoluble, hecha por cross-linking de la red del polisacarido dextrano. El grado de cross-linkage determina la porosidad de la red del polisacarido. Un alto grado de cross-linkage da baja porosidad y por lo tanto solutos de dimensiones moleculares relativamente grandes pasan sin ser retenidos. En cambio los electrolitos difunden en el interior de la red y son retenidos. La técnica de la filtración se realizó en columna.

TABLA 2

FRACCIONAMIENTOS HECHOS CON SULFATO DE AMONIO DE DISTINTA CALIDAD

Extracto	Purificación	Rendimiento
	(veces)	(% )
A	0.7	75
B	1.1	60
C	0.9	80
D	2.2	100
E	2.2	84
F	2.5	88



TABLA 3FRACCIONAMIENTOS CON SULFATO DE AMONIO REALIZADOS A DISTINTOS pH

Extracto	pH	Saturación salina (%)	Rendimiento (%)	Purificación (veces)
*A	7.0	45-60	36	1.2
*B	8.0	45-60	39	1.4
*C	8.0	45-65	62	1.0
*D	8.5	45-60	54	1.2
E	7.8	45-60	98	3.5
F	5.3	50-60	74	2.4

\* Los valores bajos obtenidos en estos resultados fueron debidos a la diálisis posterior a la precipitación

TABLA 4

FRACCIONAMIENTOS SUCESIVOS CON SULFATO DE AMONIO

Saturación salina (%)	Rendimiento (%)	Purificación (veces)
0-40	3.1	0.42
40-45	7.5	0.67
45-50	24.0	1.27
50-60	18-0	1.62

Fraccionamiento realizado en un extracto proveniente de una precipitación con sulfato de amonio entre 45-60% de saturación

El bajo rendimiento total obtenido, 53%, fue debido a la diálisis posterior.

-20-

El tamaño de la columna varió según el tipo de experiencia. En los ensayos pilotos se trabajó con columna de 1 cm de diámetro por 10 de largo. En la técnica de rutina la columna tenía 5 cm de diámetro por 25-30 cm de largo.

El armado de la columna se realizó del siguiente modo: el Sephadex se suspendió con el buffer de equilibrio, fosfato 0.001M pH 6.8. Cuando sedimentó el sobrenadante se decantó para eliminar las pequeñas partículas. nuevamente se agregó buffer y se evacuó con vacío, el aire ocluido en el gel.

La columna se llenó con el buffer y se agregó la suspensión del gel agitando continuamente. Cuando se formó una capa de 2-3 cm se abrió el orificio inferior de la columna y se reguló el flujo. Cuando se tuvo el largo de la columna deseado se puso en la parte superior un disco de papel de filtro para proteger la superficie de distorsiones.

Se probó el armado de la columna con una solución de citocromo c. Estas operaciones fueron hechas a temperatura ambiente.

Antes de introducir el extracto enzimático se llevó la columna a la cámara fría (5°C) y se dejó equilibrar con la temperatura.

La muestra se introdujo con pipeta. La elución se realizó con buffer fosfato 0.001 M pH 6.8.

Los extractos son amarillos y se comprobó que la enzima iba en todas las fracciones coloreadas. Una vez que dejaba de salir color aparecía en los eluidos el sulfato. Muchas veces sucedió que las últimas fracciones coloreadas tenían sulfato y entonces se las descartaba. De allí que el rendimiento no fuera siempre del 100%. Esto sucedía cuando las columnas habían sido usadas varias veces. Además cuando el gel era nuevo se vio que retenía nucleicos. La literatura indica que estas columnas pueden ser usadas ciento de veces, pero la experiencia indica que después de ser usada 10-12 veces la capacidad de separación se encuentra disminuida.

La eliminación de los electrolitos que queda retenidos en la red del gel se hizo con el mismo buffer que la elución de la enzima.

El proceso producía la dilución de los extractos en el orden de 2-3 veces pero esto no fue ningún inconveniente.

El tiempo empleado en una filtración de unos 300 ml de extracto fue aproximadamente 5 horas, mucho menor que el requerido para hacer una diálisis exhaustiva del mismo volumen.

En la tabla 5 pueden verse resultados de algunas experiencias.  
1.- Precipitación de ácidos nucleicos con sulfato de protamina: ante la posibilidad de realizar fraccionamientos con solventes orgánicos, fue necesario encarar el problema de eliminación de ácidos nucleicos ya que estos interfieren en la precipitación con solventes.

En los extractos crudos el porcentaje de nucleicos con relación a la proteína presente era de 10%, determinación hecha de acuerdo al método espectrofotométrico de Chistiam y Warburg (3).

Esta cantidad era reducida en los pasos siguientes a un valor de 3-4%. A estos extractos se los sometió a un tratamiento con sulfato de protamina.

Cuando se trabajó con extracto dializados de fraccionamientos con sulfato de amonio no hubo ningún inconveniente en la precipitación de los ácidos nucleicos con el sulfato de protamina.

Se trabajaba en las condiciones que se describiran más adelante y se obtenía un precipitado que se descartaba.

Cuando se eliminó la diálisis no se podían obtener los mismo resultados. El precipitado de los nucleicos no se formaba. Si se diluía el extracto en forma considerable aparecía un precipitado que se centrifugaba y se descartaba. En el sobrenadante los nucleicos habían disminuido.

Se resolvió hacer la operación agregando el sulfato de protamina requerido de acuerdo a los cálculos y luego diluir con buffer fosfato 0.01 M pH 7.0 hasta que se formaba el precipitado. Esta técnica tenía el inconveniente de que la muestra debía ser diluida 4-5 veces.

Como conclusión se dedujo que para que los ácidos nucleicos precipitaran con sulfato de protamina, era necesario que la fuerza iónica del medio fuera baja.

Se trabajó de este modo hasta que se introdujo el proceso de filtración en gel, en el cual, al eliminar la concentración de electrolitos, permitía que los nucleicos precipitaran con el sulfato de protamina.

El modo de operar fue el siguiente; los extractos se llevaron a pH 6.5 y se les agregaba con agitación solución de sulfato de protamina al 3% y se centrifugaba inmediatamente a 4000 r.p.m. durante 15 minutos.

La cantidad de protamina que era necesario para agregar se calculaba de acuerdo a la cantidad de ácido nucleico presente.

TABLA 5

RESULTADOS OBTENIDOS EN FILTRACION EN GEL DE SEPHADEX

Extracto	Actividad especifica (unid/mg)	Rendimiento (%)
A	2.2	-
	2.2	85
A	2.7	-
B	2.3	90
A	2.3	-
B	3.0	85

A representa el extracto proveniente de un fraccionamiento con sulfato de amonio

B el mismo extracto despues de ser tratado con gel de Sephadex.

Se hacía un ensayo piloto previo para ver cual era la mejor relación. Generalmente se encontraba que entre 140-150 mg de sulfato de protamina por cada 100 mg de nucleicos daba los mejores resultados.

El nucleico disminuía a valores entre 2-0.5%.

En la tabla 6 se ven resultados de distintos fraccionamientos. La recuperación de la actividad es casi total y en cuanto a la actividad específica en algunos casos disminuye por que el agregado de protamina se ha hecho en exceso.

m.- Fraccionamientos con solventes orgánicos: Para seguir adelante con la purificación de la enzima se probó fraccionar los extractos con solventes orgánicos.

Se sabe que las proteínas se desnaturalizan con los solventes orgánicos, pero trabajando a bajas temperaturas y en condiciones adecuadas se consigue disminuir la desnaturalización.

Askonas (12) hizo un estudio de las variables que intervienen en la precipitación de proteínas por el uso de solventes orgánicos. En nuestro trabajo hemos seguido el mismo método.

Entre las condiciones que se estudiaron primero se trató de resolver el solvente a usar.

En la tabla 7 se ven los resultados obtenidos trabajando con alcohol, pH 6.8 y en presencia de acetato de calcio al uno por mil

La tabla 8 resume un fraccionamiento con acetona realizado de acuerdo con Favelukes (7) a pH 7.0 con la diferencia que la fracción enzimática se obtuvo entre 44-50% de saturación y no entre 38-44% como figura en (7). Esta variación puede muy bien explicarse si se tiene en cuenta que en ninguna de las dos se conoce la fuerza iónica del extracto. Se sabe que para una mayor fuerza iónica se requiere una mayor concentración de solvente para precipitar la misma cantidad de proteína.

Se adoptó como solvente a usar, la acetona. Se hicieron experiencias trabajando a distintos pH.

Los resultados se ven en la tabla 9. A pH 6.8 se obtuvo mejor resultado. El bajo rendimiento en actividad, se explicaría como desnaturalización en parte por la presencia del solvente aumentado por la inactivación que ocasiona la diálisis.

La fuerza iónica de la solución no se determinó pero siempre se trabajó con extracto proveniente del fraccionamiento con sulfato de protamina, lo que igualaría las condiciones.

La concentración de acetona se expresó en volumen por ciento con

TABLA 6

PRECIPITACION DE ACIDOS NUCLEICOS CON SULFATO DE PROTAMINA

Extracto	Sulfato de pro- tamina agregado (mg/ nucl.)	Relación	Nucleico*	Rendi- miento	Actividad especifica
		$\frac{\beta_{280}}{\beta_{260}}$	(%)	(%)	(unid/mg)
A	-	0.9	4.7	-	2.9
B <sub>1</sub>	6.4	1.2	2.0	100	2.9
B <sub>2</sub>	1.6	1.2	2.0	100	3.9
B <sub>3</sub>	0.8	1.0	4.7	94	3.1
A	-	1.1	2.8	-	3.4
B	1.8	1.3	1.2	98	3.4
A	-	0.9	46	-	2.4
B	1.1	1.5	0.5	75	2.2

A. representa el extracto original

B. extracto después de haber sido procesado

\* Respecto a la proteína

TABLA 7

FRACCIONAMIENTO CON ALCOHOL

<u>Saturación alcoholica</u> <u>%(v/v)</u>	<u>Rendimiento</u> <u>(%)</u>	<u>Purificación</u> <u>(veces)</u>
0-10	3	0.3
10-40	7	0.7
20-30	23	2.0
30-40	0	-



TABLA 8  
FRACCIONAMIENTO CON ACETONA

<b>Saturación acetónica</b> % (v/v)	<b>Rendimiento</b> (%)	<b>Purificación</b> (veces)
0-38	0.4	-
38-44	0.8	-
44-50	49.0	2.7

TABLA 9

FRACCIONAMIENTO CON ACETONA A DISTINTOS pH

Extracto	pH	Saturación acetónica %(v/v)	Rendimiento (%)	Purificación (veces)
A	5.8	32-40	27	1.8
		40-47	24	1.0
B	6.8	44-49	48	3.6
C	7.8	44-50	38	2.6

respecto al volumen total de solución sin considerar la contracción de volumen durante la mezcla.

Se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Acetona \% (v/v)} = \frac{V_1 \times C_1 - V_2 \times 100}{V_1 - V_2}$$

donde  $V_1$  = volumen de la fracción a la que se agrega

$V_2$  = volumen de solvente agregado

$C_1$  = concentración de solvente en dicha fracción, expresada como % (v/v).

La concentración proteica de las soluciones fue de valores comprendidos entre 2.5-3%.

La temperatura a la que se trabajó dependió de la concentración del solvente; generalmente antes de hacer el fraccionamiento se hacía un ensayo piloto para ver entre que porcentaje de saturación de solvente caía la actividad de la enzima.

A continuación se describe la técnica que se siguió en los fraccionamientos de rutina.

Se trabajó en cámara de  $-4^{\circ}\text{C}$ . El extracto se llevó a pH 6.8 y luego se colocó en un baño de hielo y sal. Se dejaba que llegara a la temperatura mínima a la cual se podía mantener fundida  $0-1^{\circ}\text{C}$  y se comenzaba el agregado en forma lenta y con agitación continua; la acetona había sido previamente enfriada a  $-26^{\circ}\text{C}$ . Cuando se agregaba suficiente cantidad de solvente como para evitar que el extracto se congelara, la temperatura se bajaba hasta un valor de  $-5^{\circ}\text{C}$  que era al cual se llegaba cuando la concentración de acetona era de 38% (v/v). Se obtenía así una primera fracción que se centrifugaba a 3000 r.p.m. durante 15 minutos. El precipitado de esta fracción, como el de las siguientes, se disolvía en buffer fosfato 0.01 M pH 7. El sobrenadante se enfriaba a  $-7^{\circ}\text{C}$  y se agregaba acetona hasta una concentración final de 44% (v/v). En este precipitado se tenía la segunda fracción. El sobrenadante se llevaba a  $-9^{\circ}\text{C}$  y a una saturación de acetona de 49%

Obtenidas así las tres fracciones se dializaban con agitación contra buffer fosfato 0.01 M pH 7, durante tres horas.

Después de la diálisis se centrifugaba 15 minutos a 3000 r.p.m. para separar los restos de proteína desnaturalizada que pudiera haber presente.

Los extractos así obtenidos podían ser guardados en congeladora a  $-26^{\circ}\text{C}$  durante 15 días sin pérdida apreciable de la actividad.

En la tabla 10 se ven resultados de varios fraccionamientos. Los rendimientos en actividad no fueron nunca mayores del 50%, debido a la desnaturalización y a las diálisis que se debían hacer para eliminar la acetona.

La pureza de los extractos fue aumentada entre 2-4 veces.

n.- Concentración por liofilización: los extractos provenientes de la precipitación acetonica se concentraron por liofilización con el fin de reducir el volumen y después poder aplicar la muestra en columna de cromatografía.

La liofilización dió buenos resultados cuando el volumen se redujo hasta un décimo, con respecto a la muestra original.

Cuando se llevó a sequedad hubo pérdida considerable de actividad.

Se operó congelando volúmenes de muestra no mayores de 20 ml los que eran sometidos a un vacío de 50-250 micrones a  $-50^{\circ}\text{C}$  durante 4-5 horas.

En la tabla 11 se ven resultados de algunas experiencias.

o.- Columna de hidroxilapatita: Pavelukes (7) comprobó que la enzima era adsorbida en gel de fosfato de calcio y que al ser eluída, el extracto ganaba 1.5-2 veces en pureza. La técnica usada fue de adsorciones sucesivas por agregado de porciones de gel, y posterior elusión de los mismos. El gel usado era preparado según Keilin y Hartree (10).

Con el fin de aumentar la purificación se ensayó adsorción en gel de fosfato pero usando las técnicas cromatográficas.

Tiselius (2) presentó un método en el que usó hidroxilapatita,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ , modificación que se obtuvo por un tratamiento alcalino del gel brusquita y que presentaba la ventaja de ser más estable a pH neutro.

Para preparar la hidroxilapatita se siguió la técnica descrita por Tiselius.

Las columnas empleadas fueron simples tubos de vidrio que en la parte inferior tenían una placa filtrante o en su defecto se

**TABLA 10****RESULTADOS OBTENIDOS EN VARIOS FRACCIONAMIENTOS**

<b>Extracto</b>	<b>Saturación acética % (v/v)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Purificación (veces)</b>
<b>A</b>	<b>44-50</b>	<b>49</b>	<b>2.7</b>
<b>B</b>	<b>44-50</b>	<b>48</b>	<b>4.3</b>
<b>C</b>	<b>43.47</b>	<b>30</b>	<b>3.6</b>
<b>D</b>	<b>44-50</b>	<b>20</b>	<b>1.7</b>
<b>F</b>	<b>45-49</b>	<b>35</b>	<b>3.8</b>

TABLA 11

RESULTADOS DE DISTINTAS LIOPILIZACIONES

Volumen inicial (ml)	Volumen final (ml)	Rendimiento (%)
52	9.0	96
* 63	6.5	56
37	5.5	94
130	21.0	100

\* Este extracto dió tan bajo rendimiento porque se llevó a polvo.

Lo expresado como volumen final representa, en ese caso particular, el obtenido despues de suspender el polvo en buffer y centrifugar la proteína desnaturalizada.

ponía un tapón de lana de vidrio.

Las dimensiones de la columna fueron variables, dependiendo de la cantidad de extracto a cromatografiar. Generalmente se trató que la relación diámetro-largo fuera entre 1/5 a 1/20 según la pureza del extracto que se cromatografiaba.

El adsorbente era puesto al vacío para eliminar así el aire que pudiera tener y evitar la formación de burbujas.

Se introducía en la columna con agitación y se dejaba sedimentar. La superficie superior debía quedar lisa.

La velocidad del flujo variaba; en las columnas armadas con gel de 4-5 meses el flujo era más lento que cuando estaba recién preparado. Esto no siempre pasó ya que hubo veces que se trabajó con hidroxilapatita de 10 meses y el flujo era el mismo que cuando el gel estaba recién preparado. Las velocidades de flujo variaron entre 1 ml por hora hasta 40 ml por hora.

Normalmente se aplicó una presión hidrostática de aproximadamente  $0.1 \text{ Kg/cm}^2$ . Cuando la elución fue muy lenta se aumentó este valor.

Las columnas se dejaban durante la noche equilibrándose con buffer de fosfato 0.005 M pH 6.8.

El sembrado de la muestra se hacía con una pipeta Pasteur muy cuidadosamente para evitar la ruptura de la superficie. Se dejaba adsorber y luego se enjuagaba con una pequeña porción del buffer de equilibrio.

El tiempo de adsorción fue variable, normalmente se adsorbía en tres cuarto de hora a una hora. Hubo experiencias en la que tardó en adsorberse hasta cuatro horas.

La elución se hizo por pasos aumentando la fuerza iónica del buffer, manteniéndolo a pH constante. Todos los buffers tenían EDTA 0.1 mM.

Se probó eluir con gradiente lineal según (11), la muestra salió muy diluida pero la experiencia sirvió para dar idea de la fuerza iónica requerida para eluir la enzima.

Los volúmenes recogidos dependieron del tamaño de la columna. Se usó colector de fracciones cuando el flujo de la columna fue rápido.

En la fracciones se determinó proteína y actividad. Las muestras fueron debidamente diluidas cuando la densidad óptica fue mayor que 1.0.

Las fracciones con actividad específica del mismo orden se juntaban y precipitaban con soluciones saturada de sulfato de amonio hasta 75%. La precipitación se hacía agregando la solución

saturada.

El precipitado se dejaba durante toda la noche y luego se centrifugaba a 9000 r.p.m. durante 30 minutos. El precipitado se guardaba con el sobrenadante a  $-4^{\circ}\text{C}$  y la actividad se mantenía en estas condiciones durante un mes.

Cuando el resultado de una cromatografía no era el esperado, el precipitado que se obtenía de llevar a 75% de saturación con sulfato de amonio, se disolvía en buffer fosfato 0.005 M pH 6.8 0.1 M de EDTA, y se recromatografiaba.

Se hicieron experiencias pilotos con el fin de establecer las condiciones de trabajo a seguir.

En el gráfico se puede ver el diagrama de elusión de una cromatografía en la cual se ha ido aumentando la molaridad del buffer 0.08 se conseguía eliminar mucha proteína inerte y que al llevar la molaridad a un valor de 0.15 aparecía algo de la actividad pero con una pureza muy baja. Recién con buffer 0.20 M salía enzima purificada unas 9-10 veces con respecto al original pero con un rendimiento de actividad muy bajo. Con buffer 0.25 M ya no salía prácticamente más proteína.

El hecho de que la actividad apareciera repartida en dos picos fue interpretado de acuerdo con Tiselius (2) como interacciones mutuas de proteínas y que como consecuencia de las cuales una proteína que es fuertemente adsorbida ( caso de nuestra enzima) muestra una menor adsorción en presencia de otra menos adsorbible, siendo arrastrada parcialmente por esta última.

En nuevas experiencias se cambió la molaridad del buffer, trabajando con concentraciones de 0.13 M, como buffer que eliminara gran cantidad de proteína inactiva y 0.20 para eluir enzima.

En estas condiciones de trabajo se obtenía purificación del extracto enzimático, pero siempre los rendimientos en actividad resultaban muy bajos.

Se probó agregar sulfato de amonio al 5% con el fin de aumentar la fuerza iónica y se vio que la actividad se eluía así en forma casi total.

En el gráfico 2 se puede ver un diagrama de elusión en el cual con 0.20 M de buffer se recuperaba muy poca actividad, pero al aumentar la fuerza iónica se eluyó prácticamente toda la actividad que se había sembrado, obteniéndose una purificación del extracto de aproximadamente 20 veces.



FIGURA 1

Cromatografía en columna de hidroxilapatita. Columna de 10 x 30mm  
Volumen de muestra 0.5 ml. Actividad específica del extracto ori-  
ginal 4.8 Actividad específica de las fracciones 8 al 10, aproxi-  
madamente 40 unid/mg. Purificación 8 veces. Rendimiento de la  
actividad 50%. Se recogieron fracciones de 3ml.  
Linea entera representa protefna.  
Linea punteada actividad.

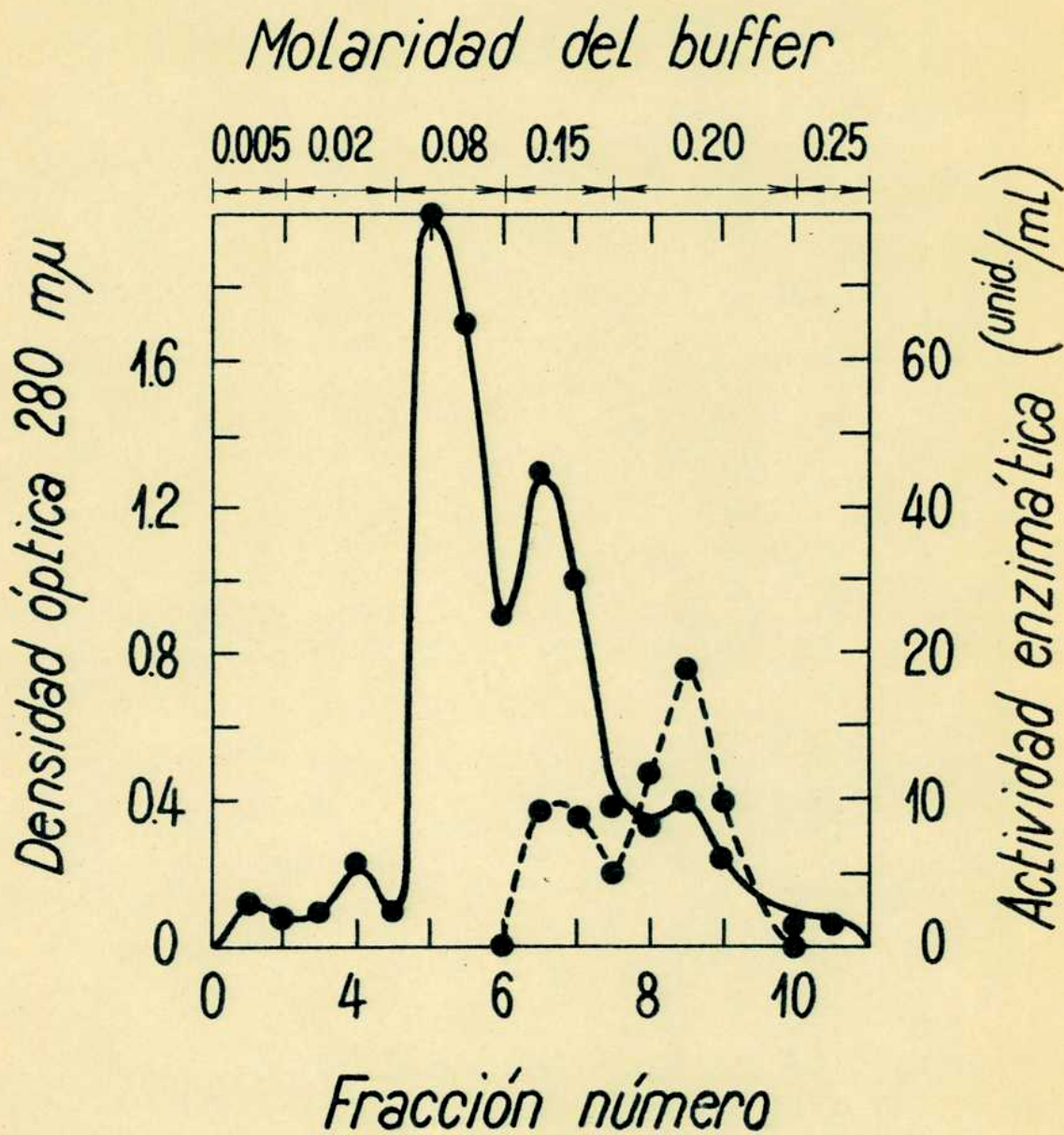


FIGURA 2

Cromatografía en columna de hidroxilapatita. Columna de 10 x 32 mm volumen de muestra 1 ml. Actividad específica del extracto original 48 unid/mg. Actividad específica de las fracciones 8-10 aproximadamente 170 unid/mg. purificación 3.5 veces. Rendimiento de la actividad 0.4%. Actividad espec. de las fracciones 11-13 aproximadamente 800 unid/mg. Purificación 16 veces. Rendimiento de la actividad 70%. Línea entera representa proteína, cortada activ.

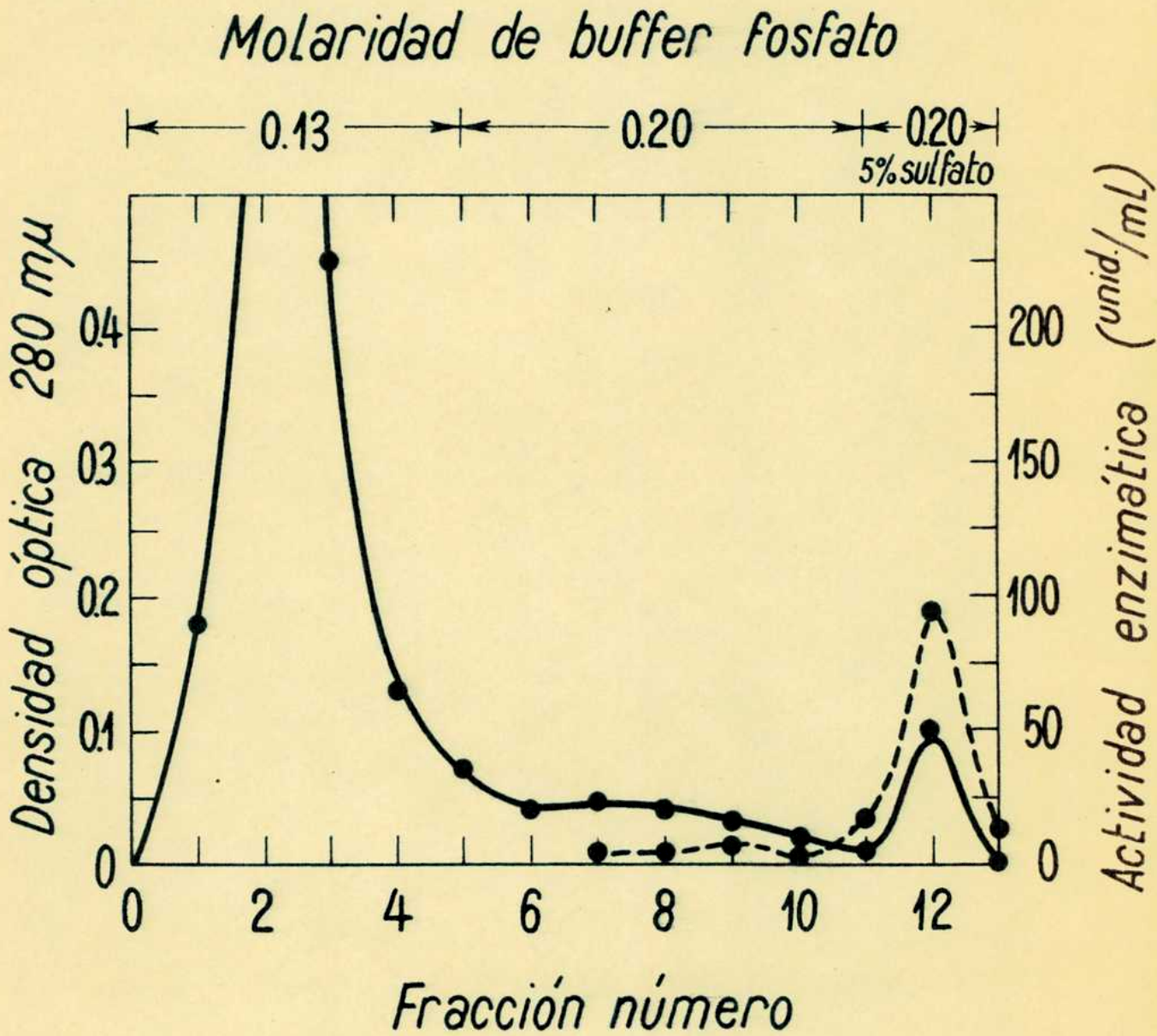
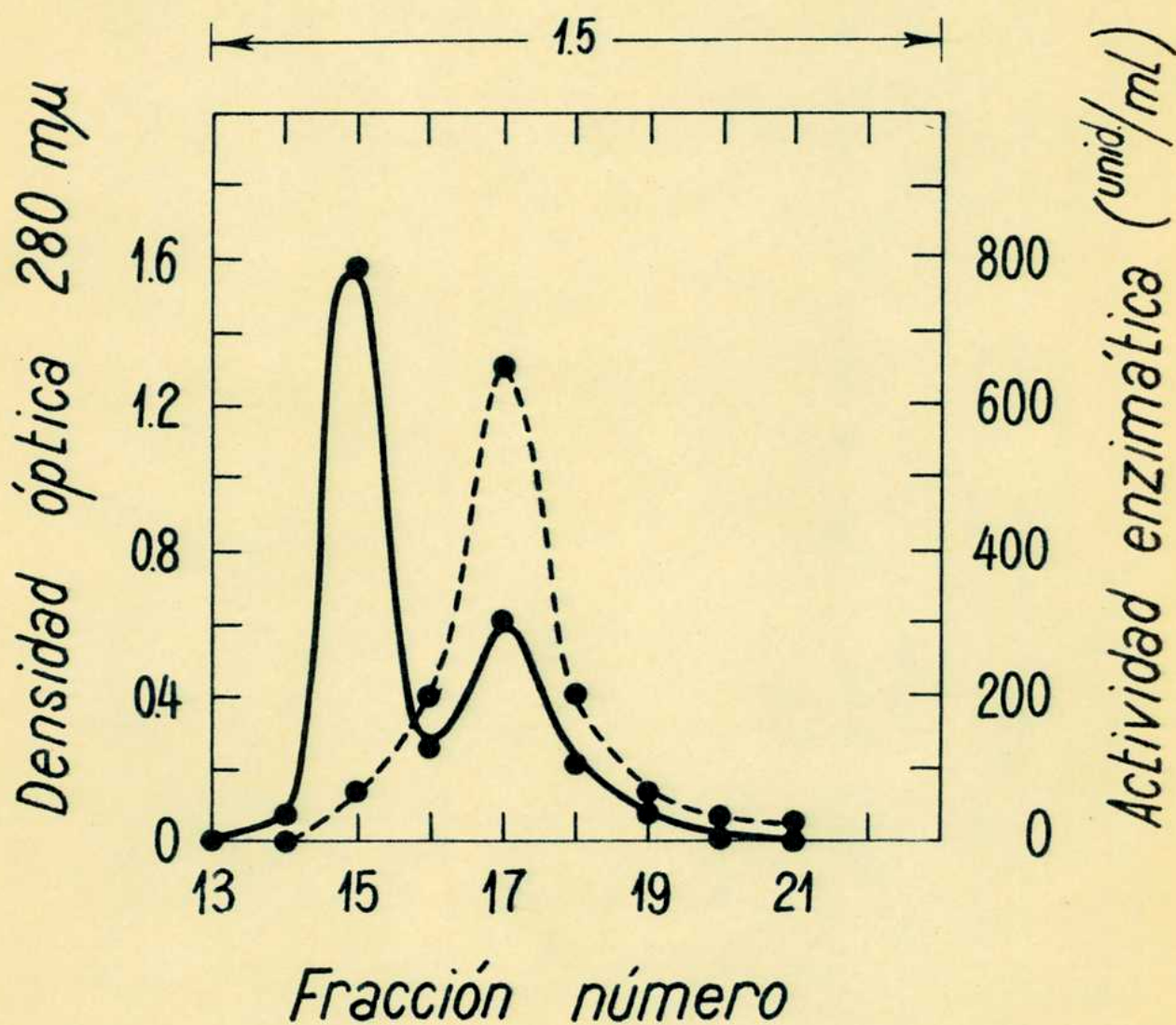


FIGURA 3

Cromatografía en columna de hidroxilapatita. Columna de 15 x 270mm  
Volumen de muestra 6 ml. Actividad específica del extracto original 14 unid/mg. Actividad específica de las fracciones 16-21 aproximadamente 870 unid/mg. Purificación 60 veces. Rendimiento de la actividad 90%. Se recogieron fracciones de 4 ml.  
Linea entera representa proteína.  
Linea cortada actividad.

*Fuerza iónica del buffer fosfato*



Después de haber realizado la experiencia correspondiente al gráfico 2 se comenzó a trabajar con mayor cantidad de extracto, para obtener así mayor cantidad de enzima.

Trabajando con mayores volúmenes se observó que el extracto enzimático que se cromatografiaba presentaba un color amarillo dado por un componente que se eluye con buffer 0.13 M. Casi toda la proteína sembrada salía en esta primera elución. Con todo algo de color siempre quedaba junto con la enzima. De la columna dependió la separación de la impureza.

En la figura 3 se representa una experiencia en la cual el componente amarillo que quedó junto con la enzima se separó muy bien.

En otras experiencias fue necesario recromatografiar el extracto para obtener un resultado similar al anterior.

Las figuras 4-5-6 son diagramas de elución obtenidos con un extracto que fue necesario cromatografiar tres veces para poder separar completamente el componente amarillo. Solo en la figura 6 se obtiene un pico proteico simétrico que corresponde a la enzima.

La fracción enzimática obtenida de la última cromatografía fue analizada por ultracentrifugación para comprobar su grado de pureza. El diagrama de ultracentrifugación demostró que en el extracto había un solo componente.

A continuación se enumeran los pasos que se realizaron en la preparación de la enzima.

- 1º- Obtención de extractos acelulares partiendo del polvo acetónico de levadura.
- 2º- Adsorción negativa en gel de fosfato de calcio preparado "in situ"
- 3º- Precipitación de la enzima con sulfato de amonio (sal sólida) entre 45-60% de saturación
- 4º- Filtración en gel de Sephadex para eliminar sulfato.
- 5º- precipitación de los nucleicos con sulfato de protamina.
- 6º- Precipitación de la enzima con acetona entre 44-50% de saturación.
- 7º- Liofilización del extracto anterior.
- 8º- Cromatografía del extracto en hidroxilapatita.
- 9º- Precipitación de la enzima con sulfato de amonio (solución saturada) entre 0-75% de saturación

En la tabla 12 se puede ver los resultados obtenidos en un tratamiento de la levadura hasta obtener la enzima pura. Puede verse que la enzima de actividad específica máxima se obtuvo

**TABLA 12**

**PURIFICACION DE LA FUMARASA**

Se partió de 980 gr de polvo acetónico de levadura, preparada a partir del producto comercial.

Proceso	Volumen (ml)	Actividad (unión/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (unión/mg)	Purificación (veces)	Actividad total (unión.10 <sup>3</sup> )	Rendimiento (%)
Extracto crudo	2820	70	49	1.4	-	197.4	100
Adsorción con gel de fosfato	2600	60	28	2.1	1.5	156.0	79
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	475	300	99	3.0	2.1	142.5	72
Filtración en gel de Sephadex	1460	80	30	2.9	2.0	116.8	59
Precipitación de nucleicos con protamina	1480	80	30	2.9	2.0	118.4	60
Fraccionamiento con acetona 45-49% sat.	130	370	33	11.0	7.9	41.1	21
Liofilización	21	2000	150	13.0	9.3	42.0	21
Cromat. en hidroxil.	3	5700	36	160.0	115.0	17.1	8.8
2° cromat. en hidroxil.	0.7	8500	22	390.0	280.0	6.0	3
3° cromat. en hidroxil.	0.4	9200	11	840.0	600.0	3.7	2

FIGURA 4

Cromatografía en columna de hidroxilapatita. Columna de 25x110mm volumen de muestra 13 ml. Actividad específica del extracto original 12 unid/mg. Actividad específica de las fracciones 29-39 aproximadamente 160 unid/mg. Purificación 13 veces. Rendimiento de la actividad de esas fracciones 78%. Se recogieron fracciones de 3 ml. Línea entera representa proteína, cortada actividad.

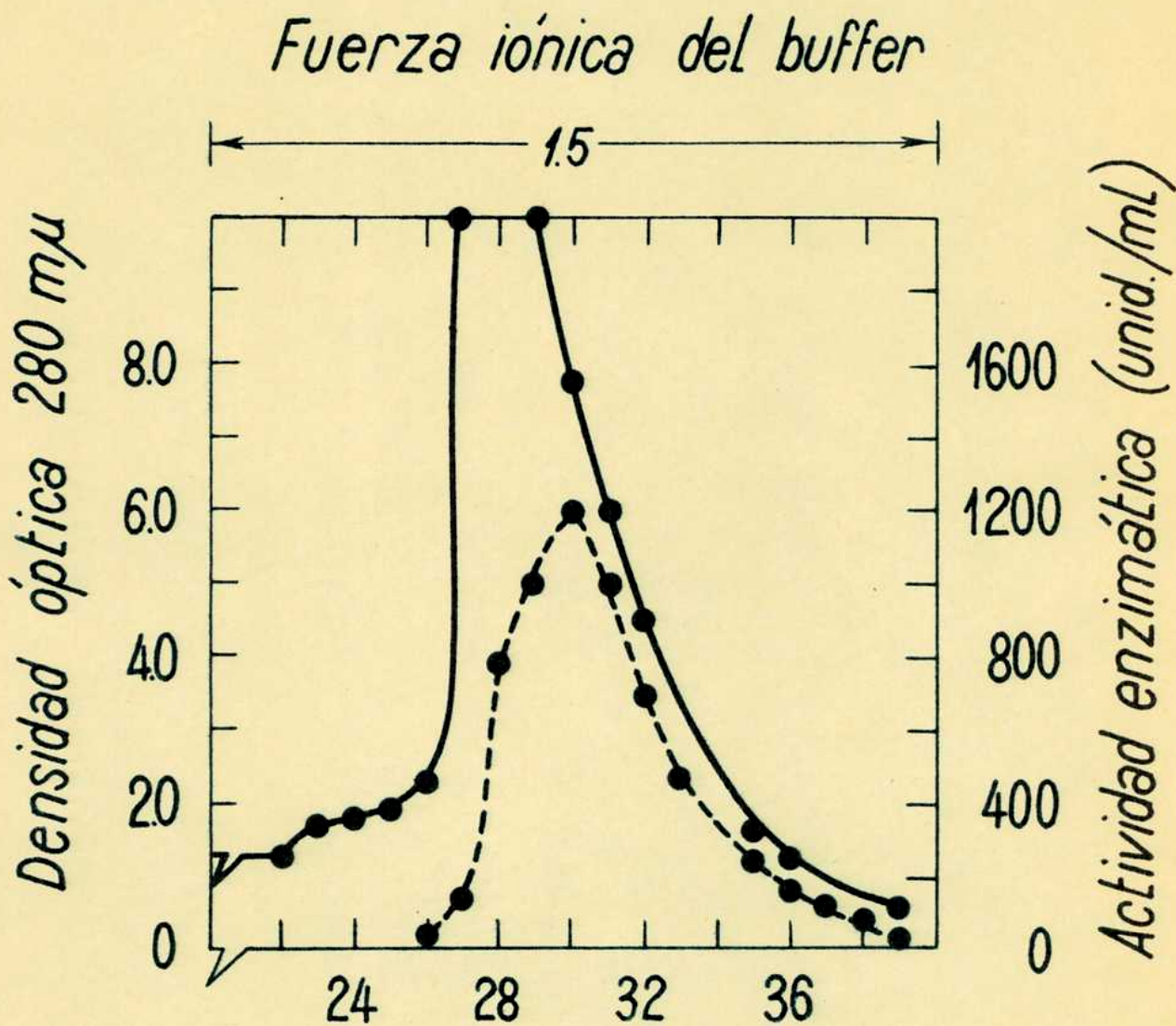


FIGURA 5

Cromatografía en columna de hidroxilapatita. Las fracciones 29 al 39 de la cromatografía del gráfico 4 fueron precipitadas a 75% de saturación con sulfato de amonio. El precipitado se suspendió en buffer fosfato 0.005 M 0.1 mM de verseno pH 6.8. Se obtuvieron 3 ml que se recromatografiaron en esta columna de 15 x 195 mm. Actividad específica del extracto original 160 unid/mg. Actividad específica de los tubos 24-28 aproximadamente 350 unid/mg. Purificación 2 veces. Rendimiento de la actividad en esas fracciones 50%. Se recogieron fracciones de 3 ml.

Línea entera representa proteína.

Línea cortada actividad.

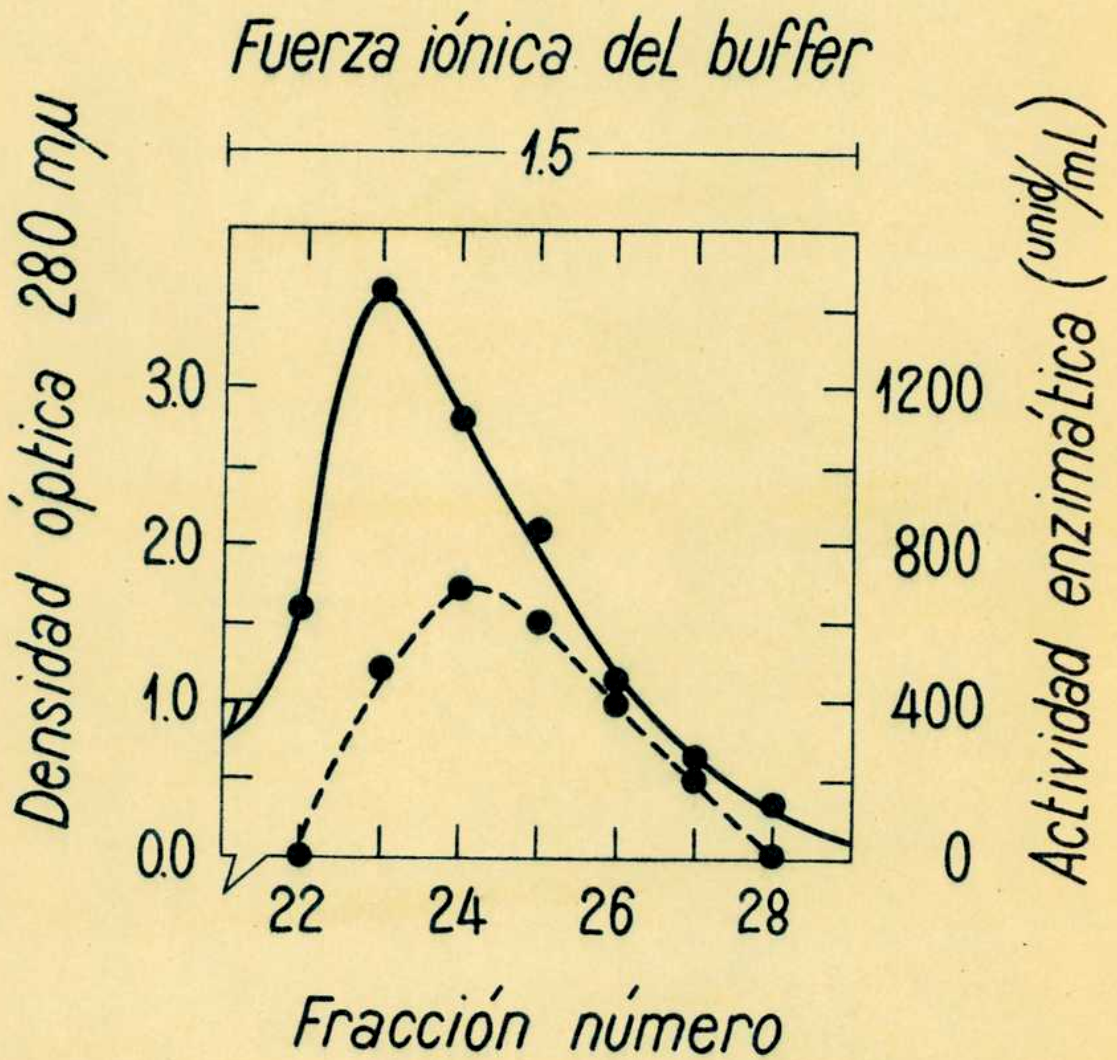
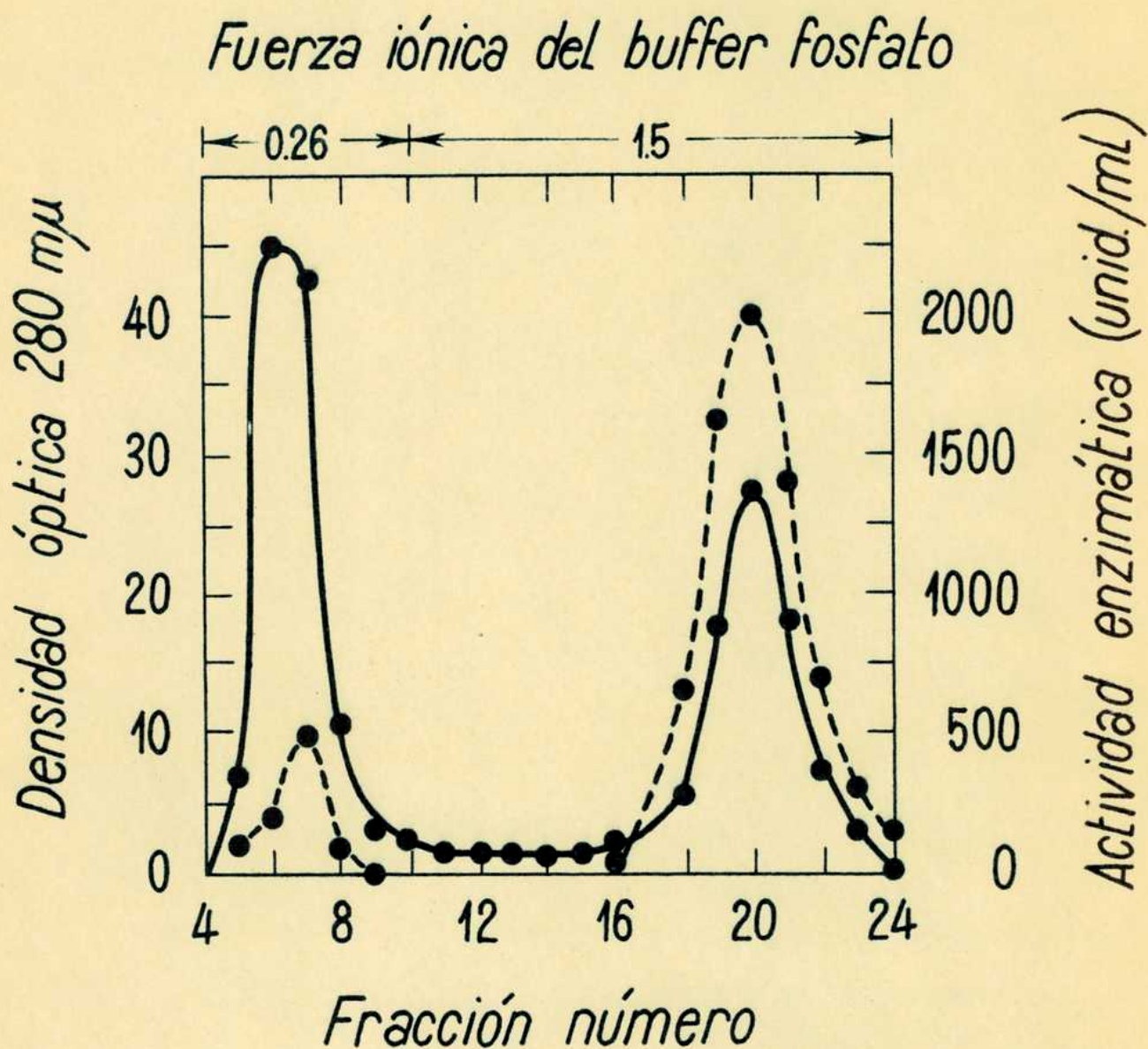


FIGURA 6

Cromatografía en columna de hidroxilapatita. Las fracciones 24 al 28 de la cromatografía del gráfico 5 fueron precipitadas a 75% de saturación con sulfato de amonio. El precipitado se suspendió en buffer fosfato 0.005 M 0.1 mM de verseno pH 6.8 Se obtuvieron 0.7 ml que se recromatografiaron en esta



columna de 15 x 55 mm. Actividad específica original 370 unid/mg  
 Actividad específica final aproximadamente 850. Purificación  
 2.3 veces. Rendimiento de la actividad de las fracciones 18-24  
 95%. Se recogieron fracciones de 1 ml.  
 Línea entera representa proteína, cortada actividad.



despues de cromatografiar el extracto tres veces.

En la tabla 13 se ven valores iniciales y finales de tres extractos. Se obtuvo purificaciones entre 400-600 veces dependiendo de la pureza de la enzima en el extracto original. La diferencia de valores finales del orden del 5% puede ser debida a errores en la medidas.

Comparando estos valores con los de Massey (13) vemos que los extractos originales de levadura son entre 6-10 veces mas ricos en enzima que los de corazón de cerdo. El valor de la actividad especifica final es aproximadamente el doble.

Si se compara la actividad especifica inicial con los valores de Frieden (5) se ve tambien que la pureza de la enzima es 9 veces mayor. El valor de la actividad especifica final no se puede comparar porque se carece del dato.

#### Métodos que se probaron pero se descartaron por no ser eficientes

Se probó adsorción de la enzima, en gel de fosfato de calcio, cuando la concentración iónica es baja, y trabajando segun Favell (7).

Se obtuvo poca purificación de la enzima y mucha pérdida de actividad, lo que hizo que el método no fuera útil.

Se probó cromatografía con resinas de intercambio iónico. Se usó dietilamino-etilcelulosa (EAE) y carboximetilcelulosa (CMC) Para que una proteína se adsorba en estas resinas es necesario que la concentración de electrolitos sea mínima. Esto implica una diálisis previa del extracto. Al hacer las experiencias se dializaba durante la noche contra buffer fosfato 0.001 M pH 6.8 0.1 mM de EDTA.

La enzima en estas condiciones no era adsorbida ni purificada.

Se hizo una segunda experiencia a pH 7.0 y se obtuvo el mismo resultado.

Se probó CMC en buffer fosfato 0.001 M pH 6.8 y tampoco se adsorbió.

No se buscaron otras condiciones pues para trabajar había que hacer la diálisis exhaustiva previa y se perdía mucha actividad. (Cuando se realizaron estas experiencias no se disponía de Sephadex).

Se probó electroforesis de zona en columna con el fin de aumentar la pureza de extractos provenientes de columna de hidroxilapatita que tenían una actividad especifica del orden de 100-140 unidades,

TABLA 13

PURIFICACIONES OBTENIDAS

<b>Extracto</b>	<b>Actividad específica inicial (unid/mg)</b>	<b>Actividad específica final (unid/mg)</b>	<b>Purificación (veces)</b>
<b>A</b>	<b>1.4</b>	<b>840</b>	<b>600</b>
<b>B</b>	<b>1.9</b>	<b>880</b>	<b>410</b>
<b>C</b>	<b>1.6</b>	<b>800</b>	<b>500</b>

por miligramo de proteína.

Se trabajó con la técnica descrita por Porath (14), como soporte se utilizó polvo de celulosa Whatman para cromatografía.

La columna utilizada tenía un diametro interno de 1 cm y la longitud era de aproximadamente 40 cm.

Se trabajó con volúmenes de 2-3 ml de muestra. Los extractos eran dializados durante 2 horas y con agitación contra el buffer con que se realizaba la experiencia.

Se hicieron ensayos previos para establecer las condiciones de trabajo: buffer, voltaje, duración de la corrida.

Se trabajó con buffer fosfato 0.05 M 0.1 mM de verseno pH 7.7. Se aplicó un voltaje de 250 V y un amperaje de 10-12 mA. La proteína con actividad enzimática migraba en cuatro horas aproximadamente.

Finalizada la electroforesis se hacía la elusión con el mismo buffer de la experiencia. Se recogían fracciones de 1 ml. Cuando se eluía aproximadamente un tercio del volumen de la columna, aparecía la actividad enzimática.

El gráfico 7 representa el diagrama de elusión de una experiencia en la cual el extracto después de ser sometido a la electroforesis tenía un valor de la actividad específica doble que el inicial.

El método no fue adoptado porque en las condiciones que se probó no dio resultados favorables.

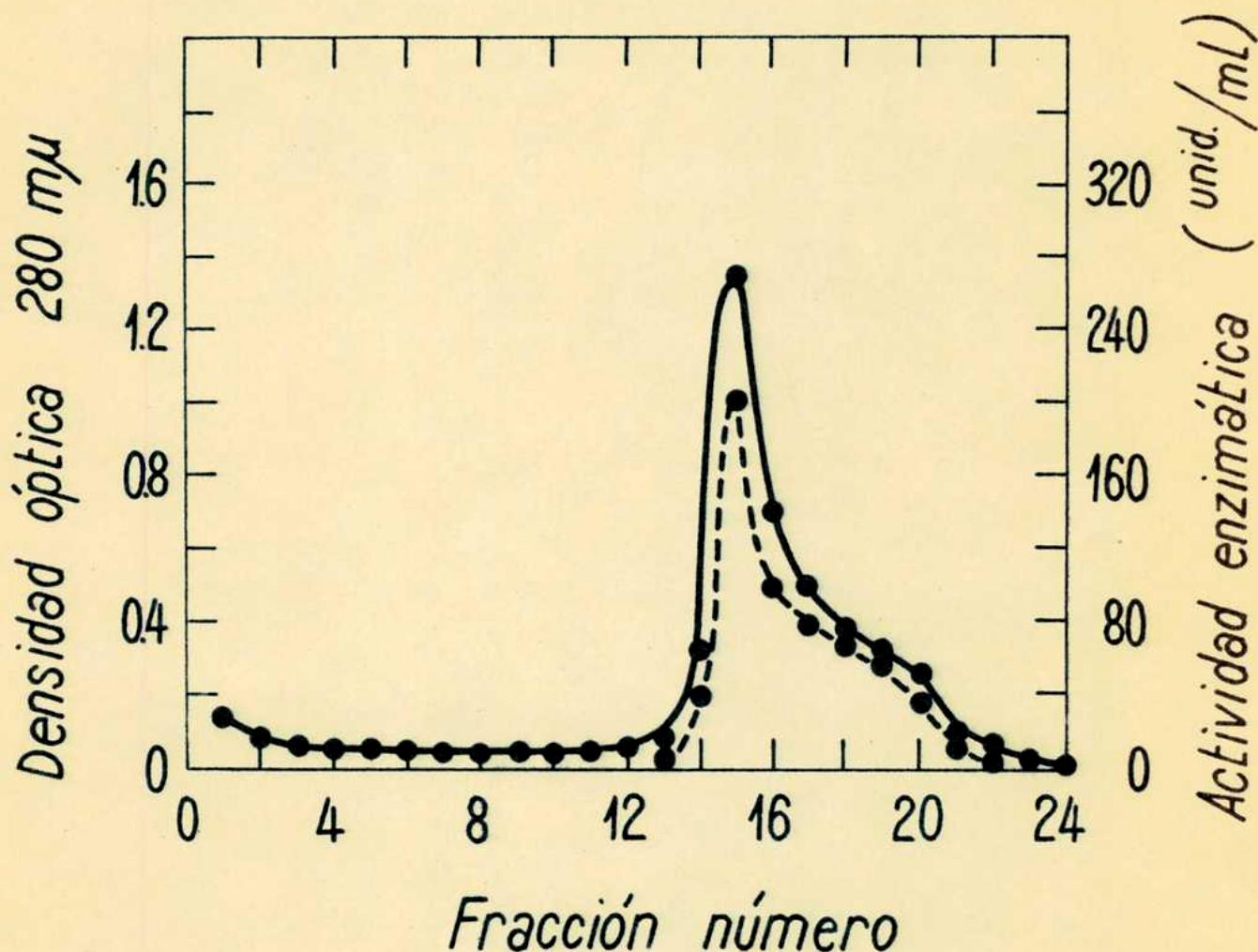
---

FIGURA 7

Electroforesis de zona en columna de celulosa. Columna de 10 x 400 mm. Volumen de la muestra 2 ml. Actividad específica 100 unid/mg. Se aplicó 250 V, 10 mA durante 4 horas. Buffer fosfato 0.05M, 0.1 mM verseno pH 6.8. Se recogieron fracciones de 1 ml. Actividad específica final 200 unid/mg. Rendimiento de la actividad 54%.

Linea entera representa protefna.

Linea cortada actividad.



ESTUDIOS EN ULTRACENTRIFUGA

La preparación obtenida en una columna de hidroxilapatita fue sometida al análisis de pureza en la ultracentrifuga.

Las fracciones de igual actividad específicas correspondientes a la experiencia del gráfico 6 fueron precipitadas a 75% de saturación de sulfato de amonio.

El precipitado se disolvió en buffer fosfato 0.005 M 0.1 mM de verseno pH 6.8.

No se dializó y se corrió en una Spinco modelo E. La velocidad del rotor fue 56.100r.p.m.

Las fotos fueron tomadas cada 8 minutos a partir del momento en que se alcanzó la velocidad máxima.

La temperatura del rotor fue 6-8°C

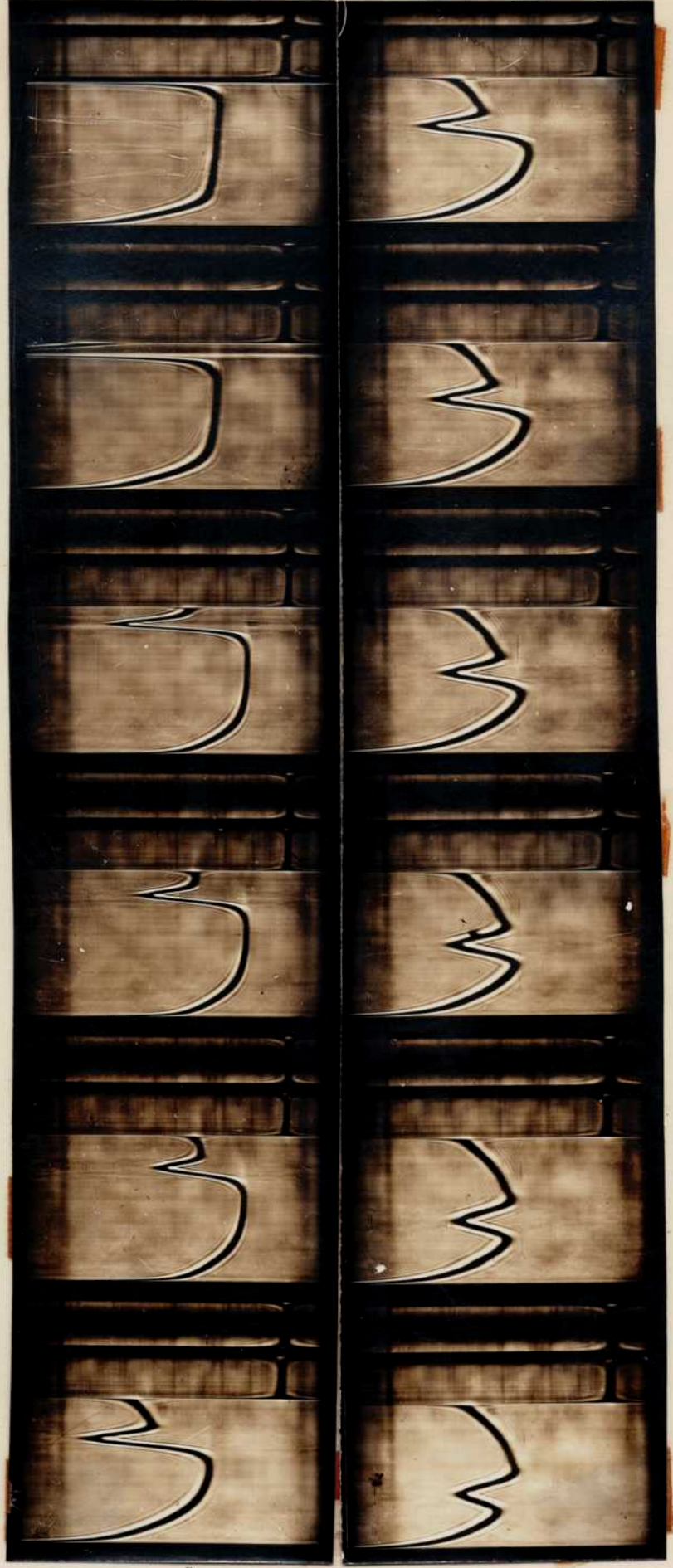
Se utilizó la celda de 0.8 ml. La concentración de la proteína fue de 5%. El ángulo con que fueron tomadas las cinco primeras fotos fue de 55°, las siete restantes con ángulo de 40°

---

FIGURA 8

COMPORTAMIENTO EN ULTRACENTRIFUGA DE LA FUMARASA DE LEVADURA DE PANADERIA

Concentración de proteína 5%. Actividad específica de la preparación enzimática: 850 unid/mg.  
Velocidad máxima 56100 r.p.m. La sedimentación procede de derecha a izquierda. Las fotos fueron tomadas cada 8 minutos.



## CAPITULO III

### ESTUDIOS DE LA DEPENDENCIA DE GRUPOS SULFIDRILOS EN LA ACTIVIDAD CATALITICA DE LA FUMARASA

Los grupos -SH de las proteínas, han sido objeto en los últimos años de numerosos estudios.

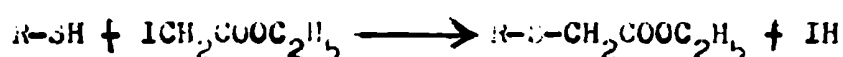
Barron (15) presentó una tabulación de enzimas cuya actividad catalítica depende de la presencia de los grupos -SH. Mas tarde Boyer (17) presenta una nueva lista de estas enzimas.

Sin embargo, a pesar de la cantidad de estudios realizados, al presente, es poco lo que se sabe acerca de como el grupo -SH actúa en la catálisis. Muchos de los postulados presentados no han podido ser probados. (17)

Los estudios de las posibles relaciones de los grupos -SH con la catálisis se limitan a informar sobre la inhibición por reactivos de grupos -SH; si hay inhibición, el modo de protegerlos por la presencia del sustrato y/o cofactor, y además informar si hay reactivación de la enzima inhibida, con compuestos de bajo peso molecular que contienen -SH.

Los reactivos usados en estas experiencias se clasifican de acuerdo a su modo de acción (15)

a.- Agentes alquilates: son compuestos que tienen un átomo de halógeno lábil, y actúan con el -SH de la enzima dando alqui-derivados.



No son agentes muy específicos. Se encuentran dentro de esta clasificación iodoacetato, iodoacetamida, cloroacetofenona y otros.

La inactivación con estos reactivos no es reversible.

b.- Agentes oxidantes: actúan sobre el -SH oxidándolo fácilmente. Existe una gran variedad de estos reactivos, pero no todos se los puede considerar específicos, ya que las enzimas tienen otros grupos oxidables además de los -SH. Helleman y Chinard (20) han estudiado ampliamente estas reacciones.

El agente oxidante mas específico para el -SH de enzimas es probablemente el glutatión oxidado.

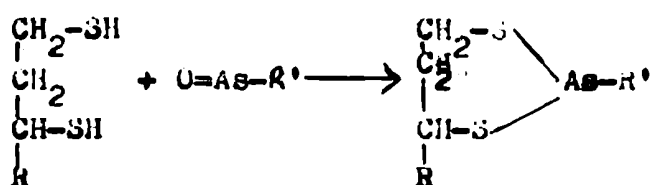
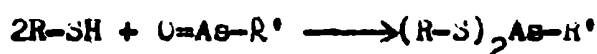
El iodosobenzoato tambien pertenece a este grupo, pero debe ser usado bajo condiciones apropiadas ya que pueden facilmente oxidar otros grupos.

c.- Reactivos que forman mercaptidas: son tal vez los mas específicos. Entre ellos tenemos los compuestos orgánicos de mercurio y los arsenicales trivalentes. El uso de los compuestos mercuriales en el estudio de enzima demuestra que no siempre actúan por reacción con los grupos -SH (21).

El p-cloromercuribenzoato es tal vez el mas específico de todos los reactivos, se lo usa inclusive para la estimación de los grupos -SH. En altas concentraciones sin embargo, puede actuar inhibiendo la enzima pero no por reaccionar con los -SH, sino por otras causas.

Los compuestos arsenicales, usados en inhibiciones enzimáticas han sido reseñados por Barron y col. (22,23). Entre ellos encontramos la dicloro-arsina (Lewisita) la mas potente y el clorhidrato de la 2-amino-4-arsenofenol conocida como Mefarsen, el 3-melaminil-fenil-arsenóxico (Melarsen).

Los arsenicales reaccionan con grupos -SH vecinos o con ditiolés dando con estos últimos compuestos cíclicos.



La inhibición producida por reactivos que forman mercaptidas es reversible por compuestos con grupos -SH de bajo peso molecular (cisteína).

Para reactivar los derivados cíclicos formados por los arsenicales es necesario la presencia de una sustancia ditiol como el BAL, segun Stöcken (24).

Las sales de metales pesados en bajas concentraciones, actúan sobre ciertas enzimas inhibiéndolas. El mecanismo de tal inhibición



no es conocido. Algunos autores suponen que la unión del metal se hace formando la mercaptida.

Los grupos -SH de la enzimas han sido designados de acuerdo a su reactividad en "libres", "perezosos" y "enmascarados" (15).

El aumento de la reactividad va acompañado con la desnaturalización de la enzima. Benesh (25) hace titulaciones argentimétricas de los -SH de la aldolasa, en presencia y ausencia de urea y comprueba la existencia de nueve -SH no reactivos y veinte reactivos

Medidas espectrofotométrica demostraron que los -SH de la aldolasa presenta una reactividad gradual; algunos reaccionan rápidamente, otros tienen un aumento continuo de la reactividad y otros aumentan con el aumento de la concentración de urea (26).

La explicación de esta distinta reactividad no es muy clara, se ha postulado que podría existir participación de las -SH en uniones covalentes. Otra explicación sería la participación de los -SH en uniones H, esto favorecería un acondicionamiento de la proteína, que disminuiría la reactividad del -SH

Una posibilidad mas general es la formación de tiazolidina.

El mantenimiento de la estructura proteica es un factor que podría estar relacionado con la reactividad de los grupos.

El papel de los -SH en la catálisis enzimática no tiene hasta el presente una teoría definida. Solamente en los estudios realizados con la gliceraldehido-3- fosfato deshidrogenasa, se tiene la evidencia del papel catalítico del -SH (17). En este caso se postula que el -SH actúa como un aceptador del grupo acilo.

Hay tres modos distintos en los cuales las reacciones químicas o modificaciones de los -SH pueden afectar la actividad catalítica (17): cambios estructurales, efectos de bloqueo estérico o químico del grupo que va unido al sustrato, y participación directa del -SH ya sea por posible formación de un radical libre (15) o por la unión del sustrato y/o cofactor formando un producto covalente de adición, o la participación del H del -SH en un puente H o por atracción electrostática entre un  $-S^-$  cargado negativamente y un centro positivo del sustrato.

#### MATERIALES Y METODOS.

Los materiales usados, además de los citados en capítulo. II, fueron los siguientes reactivos de grupos sulfhidri los

El arsenical trivalente monosustituido 3-melaminilfenil- arsenóxido (Melarsen) de May & Baker.

El oxidante o-iodozobenzoico (IOBz) 99.5% puro.

El mercurial p-cleromercuribenzoico (ClHgBz).

Nitrato de plata purísimo

Para la reactivación se utilizó cisteína de B.D.H.

El Melarsen se disolvió como clorhidrato y las otras como sales sódicas. Antes de ser usadas se neutralizaron.

Se incubó la enzima con el inhibidor en las condiciones y tiempo de acuerdo a la experiencia y en una alícuota de la mezcla de incubación se determinó actividad.

La medida de actividad se realizó en un tubo que contenía 3 ml de l-málico 0.05 M en buffer Tris pH 7.3 a 30°C.

La unidad de actividad enzimática se refirió a un minuto.

Los ensayos de reactivación con cisteína se realizaron de dos modos. Uno variando la concentración del inhibidor y reactivando en todos los casos con igual cantidad de cisteína. El otro modo de reactivar fue el siguiente: la inhibición causada por una cantidad de inhibidor se trató de reactivar con distintas concentraciones de cisteína.

Tanto en uno como en otro caso la enzima fue incubada durante tres minutos con el inhibidor. A ese tiempo se determina la actividad y luego se adiciona la cisteína. Se dejó transcurrir dos minutos más y se midió nuevamente la actividad.

Los ensayos de protección por los sustratos fueron realizados incubando la enzima con los reactivos, en el siguiente orden: al sustrato se le agregaba la enzima e inmediatamente el inhibidor. Transcurridos tres minutos de incubación se determinaba la actividad en una alícuota de la mezcla de incubación.

La acción protectora del fosfato y otros aniones se midió en forma análoga a la de los sustratos, es decir incubando la enzima con el ión y luego se agregaba el inhibidor.

Paralelamente se realizaron ensayos en los que se incubaba la enzima con el fosfato y en una alícuota se determinaba la actividad.

En las experiencias no se usó enzima pura. Se trabajó con extractos enzimáticos purificados entre 30-50 veces con respecto al extracto crudo. La enzima se hallaba suspendida en buffer Tris.

Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente 27-30°C.

#### RESULTADOS

Las experiencias que se han realizado han sido para corroborar los resultados obtenidos por Favelukes (19), quien trabajó con extractos enzimáticos muy poco purificados 2-3 veces con respecto al original.

Se probó la acción de algunos reactivos arsenicales, mercuriales, oxidantes y un metal pesado; la reactivación por cisteína, la acción protectora de los sustratos fosfatos y otros aniones que actúan como activadores de la enzima.

En la tabla 1 se ve la acción de los distintos reactivos estudiados, sobre la actividad enzimática.

El Melarsen en una relación inhibidor/proteína de  $1000 \times 10^{-9}$  moles/ug, después de 60 minutos inhibe un 27%, mientras que en los experimentos de Favelukes (19) con la mitad de ese valor consigue 100% de inhibición

Con IOBz se inhibe 28% de la actividad, trabajando con una relación inhibidor/proteína de  $2000 \times 10^{-9}$  moles/ug.

Como se ve estos reactivos actúan muy lentamente y con poca intensidad. La relación inhibidor/proteína es mucho mayor que la obtenida en (19).

Con el ClHgBz y el  $\text{NO}_3\text{Ag}$  se obtiene inhibición total casi instantáneamente. En la tabla 2 se ve la inhibición producida por cantidades crecientes de reactivos. Como para los reactivos lentos, la relación inhibidor/proteína es mayor en nuestro caso que en los experimentos realizados anteriormente (19).

La tabla 3 muestra ensayos de reactivación con cisteína. Con el ClHgBz se consigue un 100% de reactivación cuando la relación cisteína/inhibidor es 2.5. Este valor es aproximadamente 3 veces mayor que el determinado anteriormente. (19).

La protección de los sustratos frente a los inhibidores se puede ver en la tabla 4. Tanto el fumarato como el L-malato actúan protegiendo ante la inactivación, por ClHgBz. El fumarato protege de la inactivación por  $\text{NO}_3\text{Ag}$ . En cuanto al experimento realizado con el L-malato y  $\text{NO}_3\text{Ag}$  no se ve protección, hecho que concuerda con las observaciones de Favelukes (19), si bien en nuestro caso la inhibición producida por el  $\text{NO}_3\text{Ag}$  era total. En los otros experimentos de inhibición no se obtuvo eliminación de la actividad en un 100%, sino en proporciones menores.

Nuestros resultados concuerdan en general con los de Favelukes (19), la única diferencia es que mientras él consigue protección frente al ClHgBz con 0.1 mM de fumarato, en nuestro caso no protege una concentración de 0.9 mM

En cuanto a la acción protectora del fosfato se ve en la tabla 5 que para una inhibición de 78-80% producida por el mercurial, se consigue proteger la enzima de esa inhibición con el agregado

TABLA IACCION DE LOS REACTIVOS DE GRUPOS SULFIDRILOS SOBRE LA ACTIVIDAD CATALITICA DE LA FUMARASA

Se incubó 0.23 mg de proteína disueltos en buffer Tris 0.05 M pH 7.0, con solución de Melarsen, IOBz, ClHgBz y  $\text{NO}_3\text{Ag}$  previamente neutralizados, en las concentraciones y tiempos indicados. 0.005 ml de dichas soluciones se llevan a un tubo de medida. Paralelamente se hacen controles de la enzima en Tris.

Adiciones	Tiempo de incubación (minutos)	Inhibidor/ proteína ( $10^{-9}$ mol/mg)	Actividad ( $\frac{\Delta E_{250} \times 10^3}{\text{minuto}}$ )	Inhibición (%)
Ninguna	2	-	500	-
Melarsen 0.25 mM	2	1000	480	4
Ninguna	8		400	-
Melarsen 0.25 mM	8		360	10
Ninguna	14		400	-
Melarsen 0.25 mM	14		330	17
Ninguna	60		400	-
Melarsen 0.25 mM	60		290	27
Ninguna	8		400	-
Melarsen 1.0 mM	8	4000	360	33
Ninguna	2		490	-
IOBz 0.5 mM	2	2000	380	22
Ninguna	44		350	-
IOBz 0.5 mM	44		250	28
Ninguna	2		500	-
ClHgBz 0.5 mM	2	2000	0	100
Ninguna	2		500	-
$\text{NO}_3\text{Ag}$ 0.009 mM	2	40	40	92

TABLA 2

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA POR AGREGADO DE DISTINTAS  
CONCENTRACIONES DE REACTIVOS

Se incuban durante 5 minutos, 0.48 mg de proteína disuelta en buffer Tris 0.05 M pH 7.0, en soluciones de ClHgBz y NO<sub>3</sub>Ag previamente neutralizados. 0.005 ml de dichas soluciones se llevan a un tubo de medida. Paralelamente se hacen controles de la enzima incubada en Tris.

Adiciones	Actividad ( $\frac{\Delta E_{250} \times 10^3}{\text{minuto}}$ )	Inhibidor/proteína (10 <sup>-9</sup> mol/mg)	Inhibición (%)
Ninguna	100	-	-
ClHgBz 0.01 mM	90	20	10
ClHgBz 0.02 mM	70	40	30
ClHgBz 0.03 mM	80	60	20
ClHgBz 0.05 mM	20	100	80
ClHgBz 0.010 mM	0	200	100
Ninguna	100	-	-
NO <sub>3</sub> Ag 0.00025 mM	80	0.5	20
NO <sub>3</sub> Ag 0.0005 mM	80	1	20
NO <sub>3</sub> Ag 0.001 mM	60	2	40
NO <sub>3</sub> Ag 0.005 mM	60	10	40
NO <sub>3</sub> Ag 0.01 mM	40	20	60
NO <sub>3</sub> Ag 0.02 mM	0	40	100

TABLA 3REACTIVACION CON CISTEINA

Se incuban 0.09 mg de proteína disuelta en Tris, durante tres minutos con los reactivos de grupos sulfhidrilos indicados en cada caso. Se agrega cisteína y se incuba durante dos minutos mas. La actividad de la enzima se determina: experimento A con 0.05 ml de solución; experimento B 0.10 ml

Expto	Adiciones	Actividad	Inhibi-	Reac-
		$\left( \frac{\Delta E_{250} \times 10^3}{\text{minuto}} \right)$	ción (%)	tivación (%)
A	Ninguna	120	-	-
	Cisteína 0.1 mM	130	-	-
	ClHgBz 0.1 mM	0	100	-
	ClHgBz 0.1 mM + cisteína 0.1 mM	100	23	77
	ClHgBz 0.07 mM	0	100	-
	ClHgBz 0.07 mM + cisteína 0.1 mM	100	23	77
	ClHgBz 0.05 mM	0	100	-
	ClHgBz 0.05 mM + cisteína 0.1 mM	120	8	92
	ClHgBz 0.04 mM	0	100	-
	ClHgBz 0.04 mM + cisteína 0.1 mM	140	-8	108
B	Ninguna	200	-	-
	ClHgBz 0.1 mM	0	100	-
	ClHgBz 0.1 mM + cisteína 0.04 mM	120	40	60
	ClHgBz 0.1 mM + cisteína 0.06 mM	160	20	80

TABLA 4

ACCION PROTECTIVA DE LOS SUSTRATOS

Grzina disuelta en buffer Tris pH 7.0 se incuba en las condiciones indicadas. Experimento A, 0.27 mg de proteína se determina la actividad en 0.1 ml. Experimento B 0.23 mg de proteína, se determina la actividad en 0.05 ml.

Expt.	Adiciones	Actividad $\frac{\Delta_{250} \times 10^3}{\text{minuto}}$	Inhibi- cion (%)	Protec- cion (%)
A	Ninguna	270	-	-
	ClHGBz 0.01 mM	130	55	-
	ClHGBz 0.01 mM + fumarato 27 mM	200	9	84
	ClHGBz 0.01 mM + fumarato 18 mM	200	9	84
	ClHGBz 0.01 mM + fumarato 9 mM	160	27	50
	ClHGBz 0.01 mM + fumarato 0.9 mM	90	59	0
	Ninguna	140	-	-
	ClHGBz 0.01 mM	60	57	-
	ClHGBz 0.01 mM + L-malato 46 mM	150	0	100
	ClHGBz 0.01 mM + L-malato 9 mM	130	0	100
	ClHGBz 0.01 mM + L-malato 0.9 mM	40	75	0
	Ninguna	150	-	-
	NO <sub>3</sub> Ag 0.01 mM	0	100	-
	NO <sub>3</sub> Ag 0.01 mM + L-malato 6 mM	0	100	0
	IOBz 50 mM	50	67	-
IOBz 50 mM + L-malato 6 mM	100	34	50	
B	Ninguna	280	-	-
	NO <sub>3</sub> Ag 0.01 mM	110	59	-
	NO <sub>3</sub> Ag 0.01 mM + fumarato 10 mM	240	11	82

TABLA 5

ACCION PROTECTORA DEL FOSFATO A DISTINTAS CONCENTRACIONES

Se incuban 0.06 mg de protefna disuelta en buffer Tris pH 7.0 durante dos minutos en las condiciones indicadas. La actividad de la enzima se determina en 0.1 ml. Paralelamente se hacen controles de la enzima incubada en Tris.

Adiciones	Actividad $\frac{\Delta E_{250} \times 10^3}{\text{minuto}}$	Inhibici3n (%)	Protecci3n (%)
Ninguna	190	-	-
Fosfato 180 mM	180	-	-
ClHgbz 0.012 mM	40	78	-
Fosfato 180 mM + ClHgbz 0.012 mM	160	10	87
Fosfato 150 mM	180	-	-
Fosfato 150 mM + ClHgbz 0.012 mM	170	5	94
Fosfato 50 mM	200	-	-
ClHgbz 0.012 mM	40	80	-
Fosfato 50 mM + ClHgbz 0.012 mM	120	40	50
Fosfato 40 mM	200	-	-
ClHgbz 0.012 mM	40	80	-
Fosfato 40 mM + ClHgbz 0.012 mM	100	50	38
Fosfato 20 mM	200	-	-
Fosfato 20 mM + ClHgbz 0.012 mM	70	65	19
Fosfato 10 mM	190	-	-
Fosfato 10 mM + ClHgbz 0.012 mM	60	69	11



del fosfato.

El fosfato actúa como activador de la enzima hasta cierto valor y luego como inhibidor. En la tabla 5 se ve que cuando el fosfato es activador la protección no es tan grande como cuando actúa como inhibidor. Parecería que al actuar como inhibidor, lo haría en el mismo sitio que atacaría el ClHgBz y al bloquear ese sitio impediría la acción del ClHgBz.

Se ensayó la acción protectora del fosfato cuando actúa con el fumarato o con el L-malato. Se probaron concentraciones en que ninguno de los tres es protector, sin embargo al actuar conjuntamente uno de los sustratos con el fosfato la protección aumentó a un valor de 18%, tabla 6. Parecería como que la acción de los dos protectores se hubiesen sumado.

La protección de aniones que actúan como activadores es nula ante la inhibición del ClHgBz tabla 7, lo que haría suponer, que la acción activante de los aniones ensayados, sulfato y arseniato, no es ejercida en el mismo sitio que la inhibición por el ClHgBz.

En (19) se afirma que la enzima satisface los criterios de Barron (15) para establecer la naturaleza tiol de una enzima y que la inactivación se produce por un ataque específico a los -SH de la enzima.

Nuestros datos son algo similares, pero es necesario una mayor cantidad de reactivo de -SH para producir inhibiciones análogas. Además, la inhibición producida por el ClHgBz, es reactivada por cisteína pero cuando la relación de esta con el mercurial es mayor que uno.

En (19) se ve poco probable que la reacción del arsenical y el oxidante se produzca por la presencia de otro -SH cercano perteneciente a otra molécula. Con nuestros ensayos se podría aceptar este postulado ya que el extracto enzimático, mas puro con que se trabajó, podría ser la causa de la eliminación de -SH de otras moléculas y así se explicaría la reactividad casi nula ante estos reactivos.

Hay, sin embargo un punto, por el cual se puede establecer una función principal del -SH en la catálisis de la fumarasa, y es la acción protectora de los sustratos.

Se puede establecer una relación entre el efecto protector y cinético del sustrato. Con el fumarato se tiene un 50% de protección con una concentración 9 mM y con L-malato el 50% debe

TABLA 6

ACCION PROTECTORA DEL FOSFATO ACTUANDO JUNTO AL FUMARATO Y L-MALATO

Se incubó 0.07 mg de proteína disuelta en buffer Tris pH 7.0 durante dos minutos en las condiciones indicadas. La actividad de la enzima se determina en 0.1 ml de solución. Paralelamente se hacen determinaciones de la actividad de la enzima en buffer Tris.

Adiciones	Actividad $(\frac{\Delta E_{250} \times 10^3}{\text{minuto}})$	Inhibición (%)	Protección (%)
Ninguna	200	-	-
ClHgBz 0.012 mM	30	85	-
l-malato 4 mM + ClHgBz 0.012 mM	40	80	6
Fumarato 0.9 mM + ClHgBz 0.012 mM	40	80	6
Fosfato 0.05 mM + ClHgBz 0.012 mM	30	85	0
Fos 0.05mM + fum 0.9mM + ClHgBz 0.012mM	60	70	18
Fos 0.05mM + l-mal 4mM + ClHgBz 0.012mM	60	70	18

TABLA 7ACCION PROTECTORA DEL SULFATO Y ARSENIATO

Se incuban 0.07 mg de proteína disuelta en buffer Tris pH 7.0 durante dos minutos en las condiciones indicadas. La actividad se determina en 0.1 ml de la solución. Paralelamente se hacen controles de la enzima incubada en Tris.

Adiciones	Actividad ( $\frac{\Delta E_{250} \times 10^3}{\text{minuto}}$ )	Inhibición (%)	Protección (%)
Ninguna	200	-	-
Sulfato 100 mM	220	-	-
ClHgbz 0.012 mM	40	82	-
Sulfato 100 mM + ClHgbz 0.012 mM	20	91	0
Arseniato 100 mM	280	-	-
ClHgbz 0.012 mM	40	86	-
Arseniato 100 mM + ClHgbz 0.012 mM	60	79	8

debe estar entre valores de 9 mM y 0.9 mM; los  $K_m$  para el fumarato y el L-malato a pH 7.0 y en ausencia de fosfato son aproximadamente 4 mM. Esto estaría de acuerdo en que el -SH estaría en el área activa de la enzima en que el sustrato forma el complejo ES.

Por otra parte si se analizan los resultados del Cap. V en el cual se estudiaron los grupos ionizables de la enzima que intervienen en la catálisis, no se revela la presencia de -SH.

Tal comportamiento podría ser explicado como que el pK del -SH se halle influenciado por la acción de otros grupos vecinos que modifiquen su ionización, o bien que el papel de los -SH sea de mantener la estructura catalítica de la proteína.

## CAPITULO IV

### PROPIEDADES DE LA FUMARASA

#### I.- EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD DE LA FUMARASA

Los efectos de pH sobre la actividad enzimática, son debidos a cambios en el grado de ionización de los componentes del sistema, enzima, complejo enzima-sustrato o el sustrato mismo.

Michaelis y Davidson<sup>h</sup> (31) establecieron que la actividad de una enzima es debida a la disociación de dos grupos particulares ácido y básico, y por lo tanto las curvas de pH en función de la actividad estaran determinadas por las constantes de disociación de dichos grupos.

Los resultados experimentales no nos aseguran que un solo grupo ácido y uno alcalino, esten relacionados, ya que cualquier número de grupos con valores de pK próximos, darían el mismo efecto.

La variación de la actividad enzimática con el pH, para la fumarasa de levadura, fue realizada anteriormente por Ravelukes (28)

En el presente trabajo se ha repetido el ensayo con enzima más purificada, y las determinaciones se realizaron con los dos sustrato.

#### Materiales y métodos

El material usado fue el citado en Cap. II como así tambien los métodos de medida de la actividad y pH.

La enzima usada para determinar la acción hidratante fue purificada 10 veces con respecto al original. Cuando se midió la deshidratación del L-malato se usó enzima purificada unas 80 veces con respecto al original.

En la curva del fumarico se hicieron las determinaciones con 0.14 mg de proteína y la de L-málico con 0.04 mg.

En ambos casos la enzima suspendida en buffer Tris 0.0025 M pH 7.3 se dializó con agitación contra el mismo buffer. Los dos extractos provenían de precipitaciones con sulfato de amonio.

Los tubos de medida para la actividad fueron llevados a pH antes de realizar el experimento. Al finalizar el mismo, se controló nuevamente el pH. Cuando se trabajó con fumarico se obser-

vó variaciones en el pH del orden del centésimo, en cambio en los experimentos con L-málico hubo variaciones de 0.2-0.3 unidades de pH.

Los sustratos se llevaron a pH con solución de Tris.

### Resultados.

En el gráfico 1 se puede ver la influencia del pH en la actividad hidratante y deshidratante de la enzima.

La curva del fumárico presenta una meseta en la zona de pH 6.0-6.5 y la caída de la actividad hacia el lado ácido es mas pronunciada que hacia el lado alcalino. No se observa un máximo bien definido.

Los valores de la meseta comprenden el dato dado anteriormente por Favelukes (28) quien encuentra un máximo a pH 6.3.

En cuanto a la acción del pH sobre la actividad de la fumarasa usando L-málico como sustrato se obtiene una curva mas simétrica y con un pH máximo mas definido, 7.3, dato que estaría de acuerdo con el dado por Massey (30).

El dato de pH óptimo para el L-málico coincide con el valor de un grupo ionizable correspondiente a la enzima, y obtenido por el estudio de la variación de la constante de Michaelis en función del pH, como se verá mas adelante.

### 11.- ACCION DE VARIOS ANIONES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FUMARASA

Se midió la acción de distintos aniones sobre la actividad de la fumarasa.

Se incubó la enzima con las soluciones de los aniones indicados en cada caso. En una alícuota de las misma se midió la actividad deshidratante de la fumarasa.

En el tubo de medida la concentración del L-malato era de 0.05 M en buffer Tris pH 7.3. La longitud de onda a la que se realizaron los experimentos fue de 270 m $\mu$

La concentración de los aniones investigados fue de 0.066 M.

Se trabajó con 0.1 mg de preteína de un extracto purificado aproximadamente 20 veces. Previamente se lo dializó contra buffer Tris.

Todos los cationes son sodio con excepción de la sal del nitrato que lleva potasio.

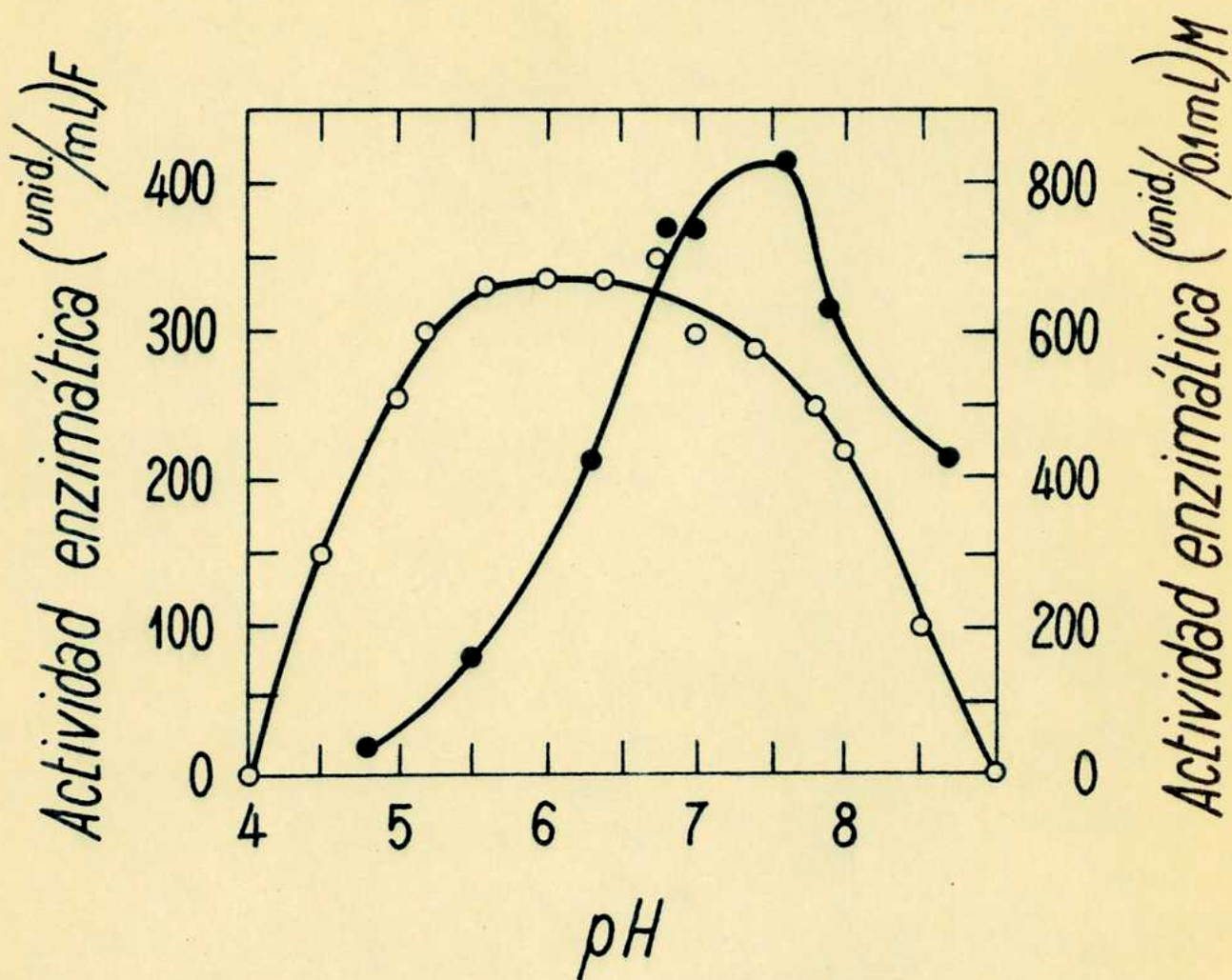
Los resultados obtenidos pueden ser vistos en la tabla 1.

Como se puede ver los halógenos producen una inactivación creciente con el aumento del peso molecular del anión.

El sulfocianuro es de los aniones ensayados el que produce

FIGURA 1

CURVAS DE ACTIVIDAD EN FUNCION DEL pH



---●--- usando l-malato como sustrato

---○--- usando fumarato.

mayor inhibición. El nitrato reduce la actividad prácticamente a la mitad. El borato no influye. El sulfato, fosfato y arseniato producen aumento.

Los resultados obtenidos son en general, mas bajos que los dados en (28).

La interpretación de cómo los distintos aniones actúan sobre la proteína, podría ser explicada como una unión entre el anión y un grupo básico cercano al centro activo. Esto influiría en la mayor o menor facilidad del sitio activo para disociarse de lo cual resultaría un aumento o disminución de la actividad.

El hecho de que los aniones monovalentes sean en general inhibidores y los divo trivalentes activantes, daría una idea de que actúan sobre distintos grupos cercanos al sitio activo.

### III.- DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE EQUILIBRIO

La constante de equilibrio de la reacción catalizada por la fumarasa de levadura de panadería, ha sido determinada anteriormente por Jacobson (27) y Favelukes (28).

En el presente trabajo se realizaron medidas de dicha constante usando método espectrofotométrico de medida, con una enzima mas pura que la usada en determinaciones anteriores, y realizando los estudios en función del pH y de la fuerza iónica del medio.

La constante de equilibrio se define:

$$K_{ap} = \frac{[M]_t}{[F]_t} = \frac{[S]_0 - [F]_t}{[F]_t} \quad (1)$$

donde  $[M]_t$  y  $[F]_t$  son las concentraciones de L-malato y fumarato en el equilibrio y  $[S]_0$  es la concentración inicial del L-malato o fumarato (29).

En una cubeta de 1 cm, la densidad óptica en el equilibrio es

$$D_{eq} = [F]_t \xi F + ([S]_0 - [F]_t) \xi M \quad (2)$$

donde  $\xi F$  y  $\xi M$  son los coeficientes de extinción molar para el fumarico y el L-málico respectivamente. La contribución del L-málico a la densidad óptica se consideró despreciable, luego en el equilibrio la  $K_{ap}$  se puede calcular

$$K_{ap} = \frac{[S]_0 \xi F - D_{eq}}{D_{eq}} \quad (3)$$



TABLA IACCION DE DIVERSOS ANIONES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FUMARASA

0.1 mg de protefna disueltos en buffer Tris pH 7.3 se tratan con los aniones que se indican. La concentraci3n de los mismo es 66 mM. Se hacen controles de la enzima sin adiciones.

Adiciones	Actividad observada $\left( \frac{\Delta E_{270} \cdot 10^3}{\text{minuto}} \right)$	$\frac{\text{Actividad observada}}{\text{Actividad sin sales}} \times 100$ (%)
Ninguna	200	100
FNa	190	91
ClNa	150	71
BrNa	110	52
INa	80	38
SCNNa	50	24
NO <sub>3</sub> K	120	57
BO <sub>3</sub> Na	210	100
SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	240	114
PO <sub>4</sub> Na <sub>3</sub>	280	132
AsO <sub>4</sub> Na <sub>3</sub>	300	143

### Materiales y métodos.

Las drogas usadas fueron las mismas indicadas en el Cap. II. Los primeros ensayos realizados fueron determinaciones de la constante de equilibrio en ausencia de sales. Para ellos se prepararon soluciones de fumarato de Tris de concentración final de fumarato 2 mM pH 7.3. Los experimentos se realizaron a 28°C.

A 3 ml de la solución se le agregaba 0.002 ml de extracto enzimático purificado alrededor de 500 veces con respecto al original. La cantidad de proteína de los 0.002 ml fue de 0.009 mg. La densidad óptica se determinó a 270 m $\mu$ . Se incubó durante una hora. Se hicieron determinaciones de la adsorción de la proteína en Tris., valor que se restó de las densidades ópticas al equilibrio.

Las determinaciones de la  $K_{ap}$ , en función del pH se determinaron en fumarato de Tris, pero de una fuerza iónica final de 0.5 que se consiguió por el agregado de ClNa.

La variación de la  $K_{ap}$  con la concentración de fosfato se determinó a pH 7.3. Cuando se realizaron a fuerza iónica constante esta se alcanzó con el agregado de ClNa. En estos experimentos se trabajó con 0.02 ml, de un extracto purificado unas 30 veces con respecto al original, que tenían 0.14 mg de proteína.

### Resultados.

La  $K_{ap}$  determinada en ausencia de sales dió un valor de 3.8, igual que el obtenido por Favelukes y que está dentro del orden de las determinaciones realizadas para otras fumarasas (28).

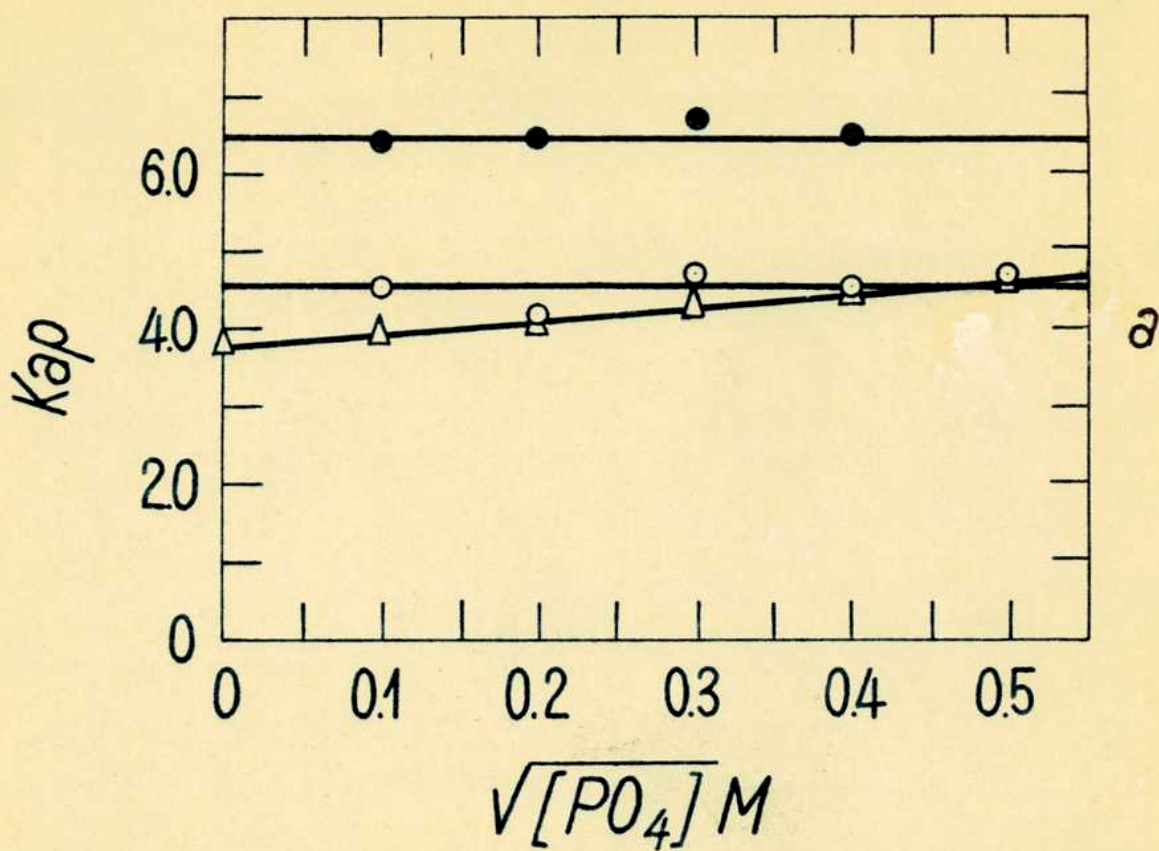
Los resultados de la variación de la  $K_{ap}$  con la raíz cuadrada de la concentración de fosfato se ven en el gráfico 2 (a).

Si la fuerza iónica se mantiene constante la  $K_{ap}$  es independiente de la concentración de fosfato. En el mismo gráfico están las determinaciones realizadas a una fuerza iónica de 0.9 y 0.5. Los valores de la  $K_{ap}$  son 6.5 y 4.5 ( $\pm 0.2$ ) respectivamente.

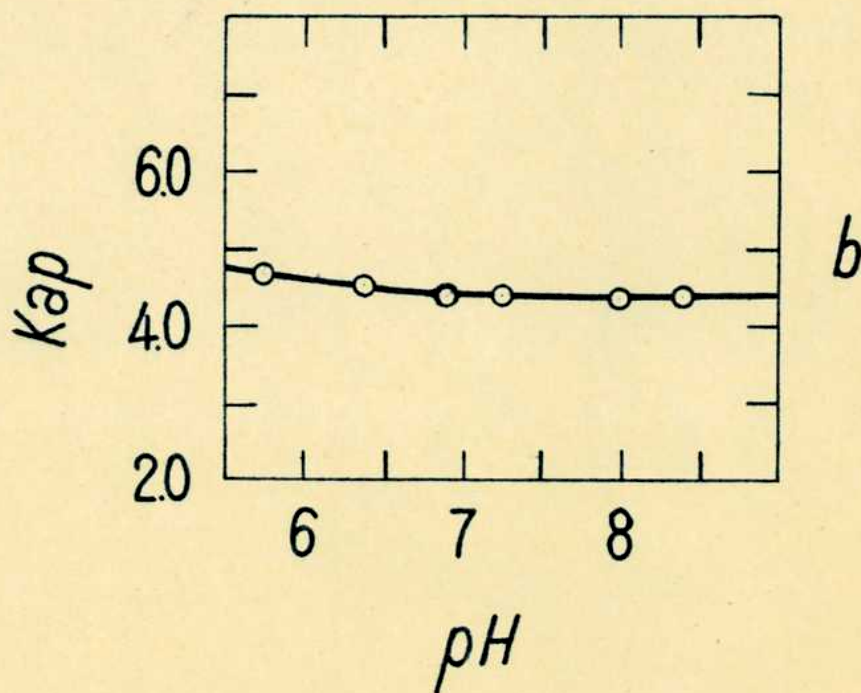
El valor de  $K_{ap}$  para una fuerza iónica de 0.5 trabajando a pH 7.3 encontrado por Böck (29) fue de 4.8, como se ve las diferencias de los datos son de orden experimental.

La variación de la  $K_{ap}$  con el pH se interpreta en términos de constante de ionización de los sustratos. Al definir la  $K_{ap}$  con la ecuación (1) se considera  $[M]$  y  $[F]$  las concentraciones de l-malato y fumarato sin tener en cuenta sus formas iónicas.

FIGURA 2



a) Variación de  $K_{ap}$  con la  $\sqrt{[PO_4]}$   
- $\Delta$ - $\Delta$ -  $\mu$  variable; -o-o-  $\mu$  0.5; -•-•-  $\mu$  0.9.



b) Variación de  $K_{ap}$  con el pH.

En el rango de pH que se hicieron las determinaciones no se puede considerar que haya habido variación de la  $K_{ap}$ .

En el gráfico 2 (b) se hallan los resultados.

Los valores de la  $K_{ap}$  a pH menores de 6.8 tienen una desviación de (+ 0.2) con respecto a los valores obtenidos a pH mayores. Esta variación podría decirse que es de orden experimental y no causada por variaciones de formas iónicas del sustrato, ya que a los pH investigados los sustratos se hallan completamente ionizados. Hock (29) da los valores de las segundas constantes de ionización para el fumárico y el L-málico determinadas en 0.1 M de cloruro de sodio y a 25°C  $K''_F = 10^{-4.18}$  y  $K''_M = 10^{-4.73}$ .

#### IV-INFLUENCIA DEL FOSFATO EN LA CONSTANTE DE MICHAELIS PARA LOS DOS SUSTRATOS

Al comprobar que la fumarasa es afectada por el fosfato resultó de interés el estudio de las constantes cinéticas en función de la concentración del mismo.

Se realizaron ensayos con la reacción de hidratación del fumárico y la inversa.

Se hicieron grupos de experimentos en los cuales se determinó la velocidad inicial a distintas concentraciones de fosfato a pH 7.3 y a un rango de concentraciones de sustratos (tanto para el L-málico como para el fumárico) comprendido entre 2 y 40 mM.

La enzima utilizada no fue pura, sino que provenía de distintos pasos de la purificación. Los valores de las actividades específicas eran de 45-100 veces mayores que la enzima en el extracto crudo.

La constante de Michaelis se determinó por gráficos de Lineweaver Burk, (51) en los cuales se representa.

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

donde  $v$  es la velocidad inicial a una concentración  $S$  de sustrato y  $V$  la velocidad máxima del sistema.

De los gráficos de  $1/v$  en función de  $1/S$  se obtiene una recta que corta el eje de las  $x$  en un punto cuyo valor es  $-1/K_M$ .

El punto en que la recta corta el eje vertical da  $1/V$ .

En la tabla 2 se dan los valores de las velocidades iniciales obtenidas cuando se trabajó con L-málico como sustrato. En la

TABLA 2

DEPENDENCIA DE LA VELOCIDAD INICIAL DE DESHIDRATACION DEL  
L-MALATO CON LA CONCENTRACION DEL BUFFER FOSFATO A pH 7.3

M (mM)	Velocidad inicial en concentración de fosfato				
	(5mM)	(50mM)	(75mM)	(133mM)	(200mM)
2.7		25	19	10	8
3.2	55	30	24	15	
4.8	64	40	33	20	12
10.0	89	61	50	39	
20.0	97	80	70		32
40.0	116	100	95	90	55

Las determinaciones fueron realizadas con 0.1 mg de proteína

M = concentración de L-malato

FIGURA 3

INFLUENCIA DEL FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA, CUANDO CUANDO ACTUA L-MALATO COMO SUSTRATO

Las curvas estan trazadas a concentraciones crecientes de fosfato. A 5 mM, B 50 mM, C 75 mM, D 133 mM, E 150 mM, F 200 mM.

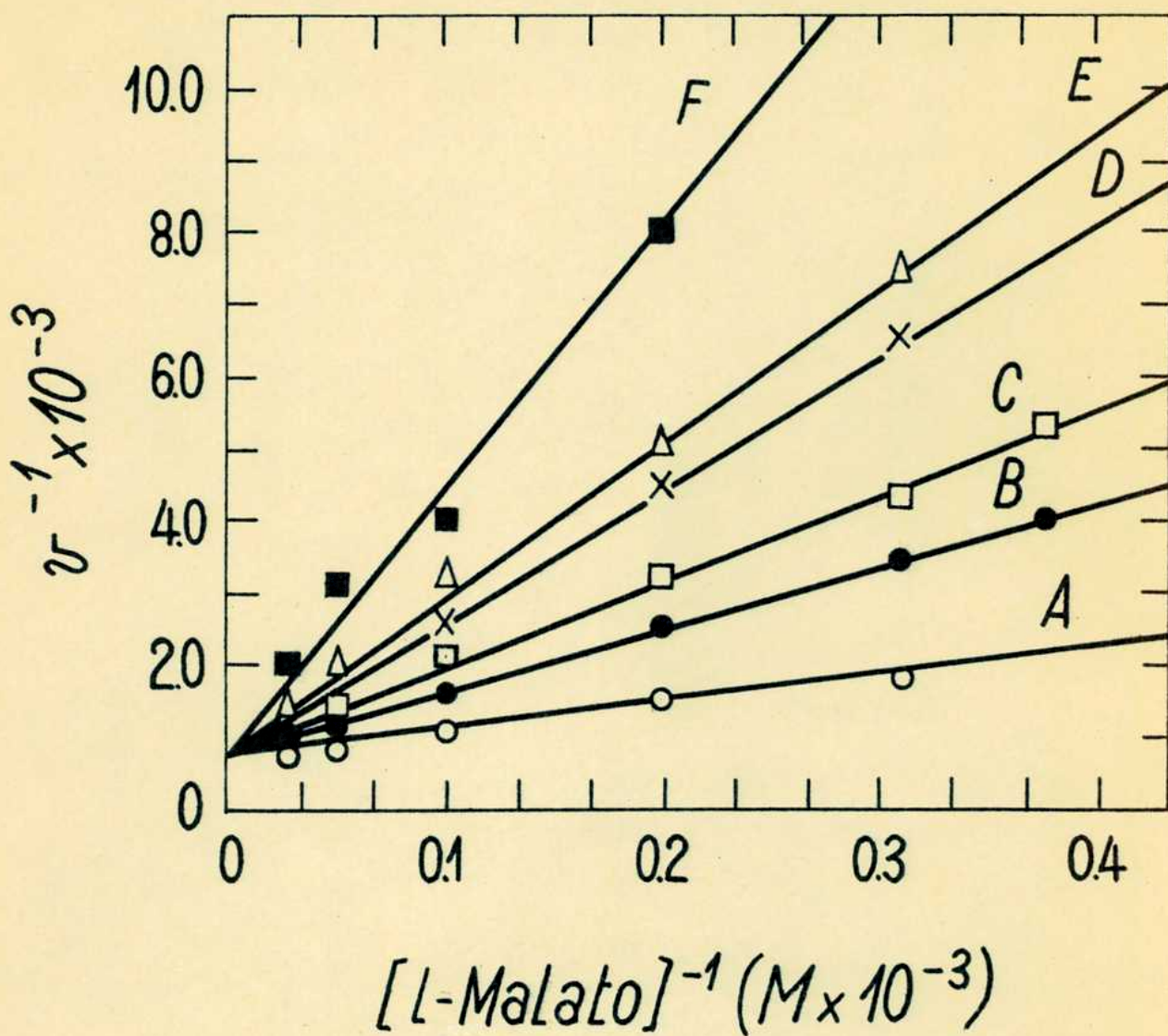


figura 3 se representan esos datos en gráficos de Lineweaver-Burk (51), para las distintas concentraciones de fosfato.

A medida que la concentración de fosfato aumenta el  $K_m$  se hace mayor. En cuanto a la velocidad máxima tiene un mismo valor para todas las concentraciones de fosfato investigadas. Esto sugiere que el fosfato actúa como <sup>un</sup>inhibidor competitivo cuando se halla frente al l-malato.

Los resultados obtenidos con fumarato se pueden ver en las tablas 3 y 4. Los primeros corresponden a concentraciones de fosfato comprendidas entre 5-50 mM. Se realizaron con un extracto enzimático que tenía una actividad específica de 200 unid/mg.

Las determinaciones de la velocidad inicial se realizaron con 0.09 mg de proteína y la longitud de onda a la que se midió fue de 300 m $\mu$ .

En la tabla 4 están los experimentos que se realizaron con fosfato en concentraciones comprendidas entre 100-200 mM. La enzima usada tenía una actividad específica de 96 unid/mg, y las medidas se realizaron con 0.09 mg de proteína.

Debido a la baja actividad del extracto se trató de aumentar la sensibilidad del método, disminuyendo la longitud de onda a la cual se medía la disminución de fumarato, Alberty y col (56). Los valores dados en la tabla 4 corresponden a una longitud de onda de 290 m $\mu$ .

La representación de los valores de las tablas 3 y 4 se hallan en los gráficos 4 y 5 respectivamente.

Debido a las desviaciones obtenidas a concentraciones de fumarato del orden de 2 mM, se aplicó a los datos el tratamiento de los cuadrados mínimos para ver si tales desviaciones eran significativas. En las tablas 3 y 4, bajo la denominación de  $v_{CM}$  se hallan los valores recalculados, y la representación de los mismo se encuentra en las figuras 6 y 7. De ellas se obtuvo el  $K_m$ .

Los valores del  $K_m$  obtenidos por los dos métodos pueden ser vistos en la tabla 5.

Las diferencias de los valores no son estadísticamente significativos, ya que aplicando la fórmula de Bessel se comprobó que las desviaciones de los puntos estaban dentro del orden experimental (51a).

Alberty y col. (56), observaron que con la fumarasa de cerdo se obtenían desviaciones de la ecuación de Michaelis-Menten, de-

TABLA 3

DEPENDENCIA DE LA VELOCIDAD INICIAL DE HIDRATACION DEL FUMARATO  
CON CONCENTRACIONES DE FOSFATO 5, 10 y 50 mM pH 7.3

F (mM)	5mM de fosfato		10 mM de fosfato		50 mM de fosfato	
	$v_{exp}$	$v_{CM}$	$v_{exp}$	$v_{CM}$	$v_{exp}$	$v_{CM}$
2.0	320	376	400	400	440	430
4.0	570	560	600	600	667	680
8.0	720	750	800	805	950	960
20.0	960	925	1060	1010	1260	1260
40.0	1040	1090	1200	1120	1480	1430

Las medidas se realizaron con 0.06 mg de proteína de actividad específica 200 unid/mg.

$v_{exp}$  = velocidad inicial determinada experimentalmente.

$v_{CM}$  = dato obtenido después de aplicar cuadrados mínimos.



**TABLA 4**

**DEPENDENCIA DE LA VELOCIDAD INICIAL DE HIDRATACION DEL FUMARATO  
CON CONCENTRACIONES DE FOSFATO 100, 150 y 200 mM pH 7.3**

F (mM)	100 mM de fosfato		150 mM de fosfato		200 mM de fosfato	
	$v_{exp}$	$v_{CM}$	$v_{exp}$	$v_{CM}$	$v_{exp}$	$v_{CM}$
2.7	440	500	365	375		
3.2	550	560	470	456	300	320
4.8	800	770	650	610	525	475
10.0	1190	1170	1000	960	770	825
20.0	1500	1600	1440	1350	1250	1300
40.0			1800	1700	1800	1850

Las determinaciones se realizaron con 0.09 mg de proteína.  
Las lecturas están referidas a una longitud de onda de 290 m $\mu$ .  
 $v_{exp}$  = velocidad inicial determinada experimentalmente.  
 $v_{CM}$  = dato obtenido después de aplicar cuadrados mínimos.

FIGURA 4

INFLUENCIA DEL FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA,  
CUANDO ACTUA EL FUMARATO COMO SUSTRATO

Las curvas estan dadas por distintas concentraciones de fosfato: A, 5 mM, B 10mM, C 50 mM.

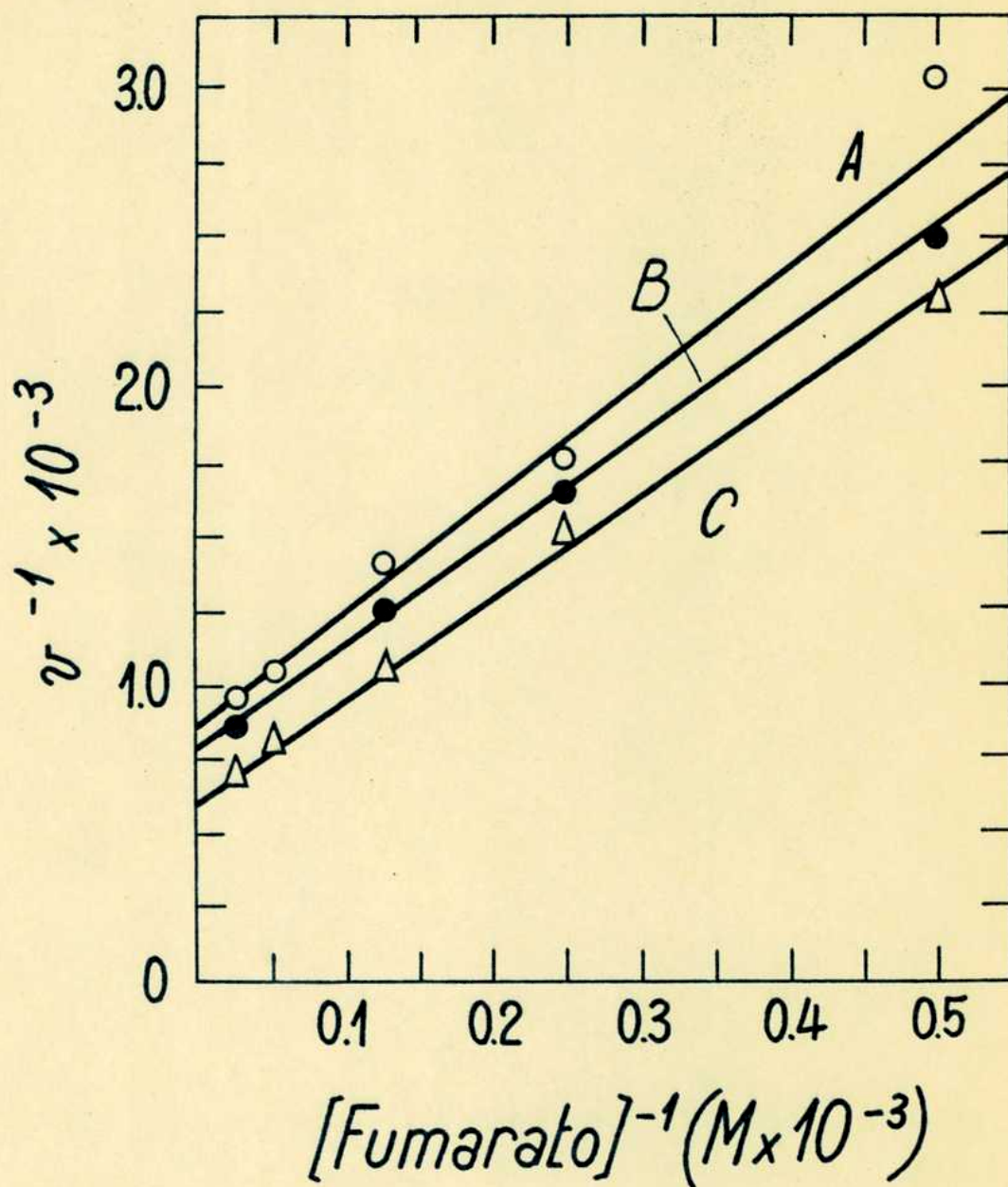


FIGURA 5

INFLUENCIA DEL FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA,  
CUANDO ACTUA EL FUMARATO COMO SUSTRATO

Las curvas fueron trazadas despues de aplicar cuadrados mínimos, en los datos experimentales. Las concentraciones de fosfato fueron las siguientes: A 5 mM, B 10 mM, C 50 mM.

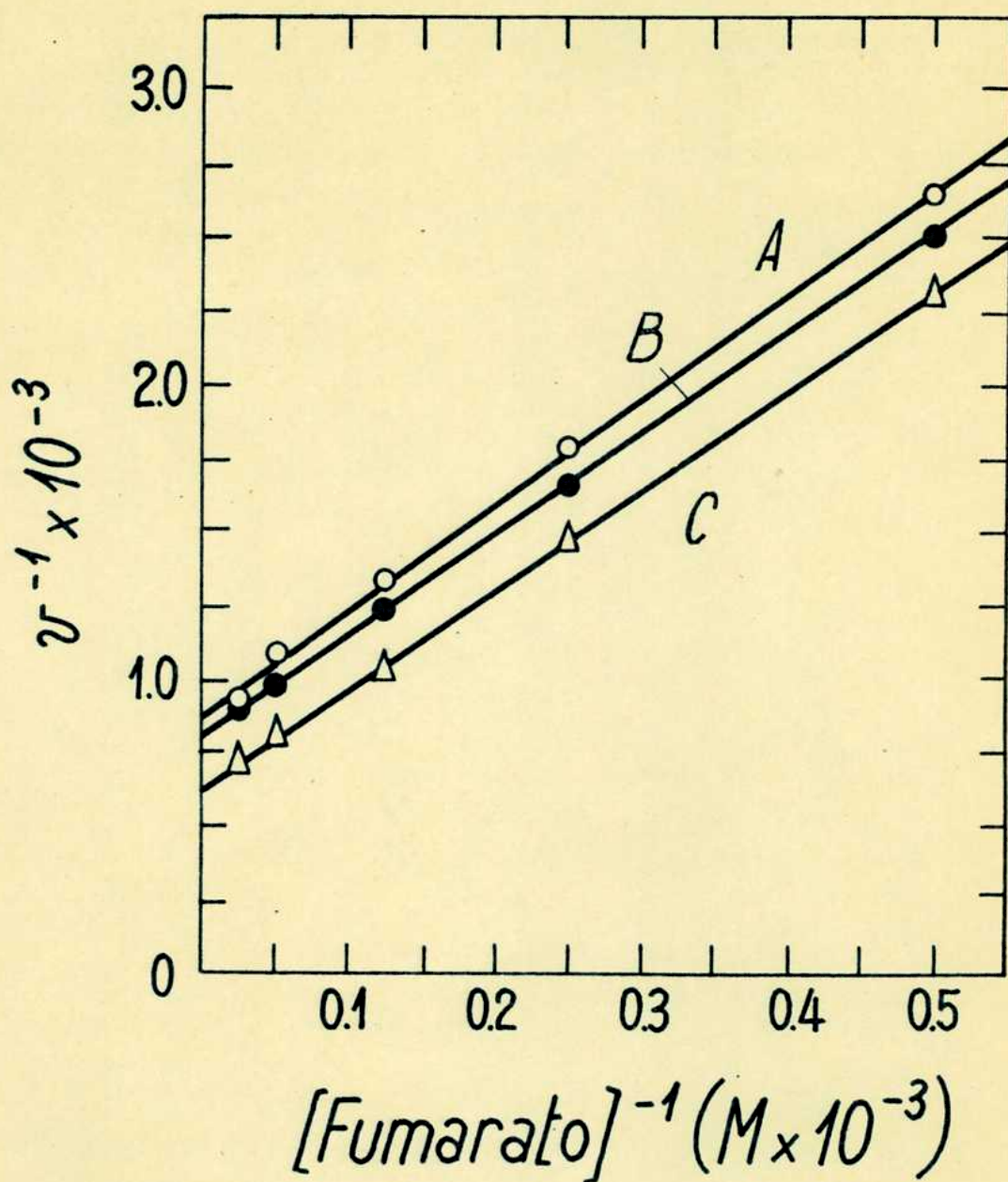


FIGURA 6

INFLUENCIA DEL FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA,  
CUANDO ACTUA EL FUMARATO COMO SUSTRATO

Las curvas estan dadas por distintas concentraciones de fosfato: A 100 mM, B 150 mM, C 200 mM.

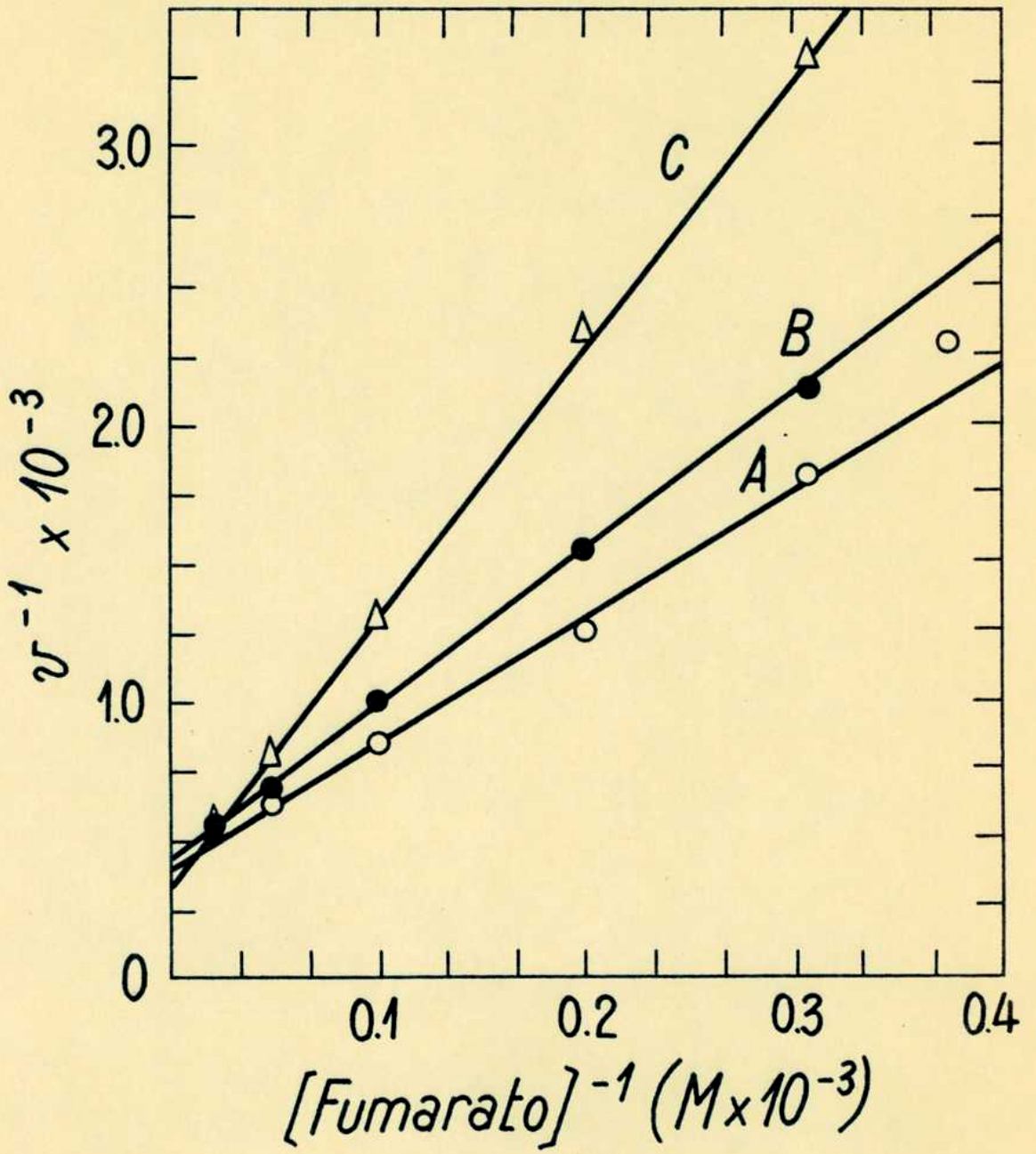


FIGURA 7

INFLUENCIA DEL FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA,  
CUANDO ADECUA EL FUMARATO COMO SUSTRATO

Las curvas fueron trazadas despues de aplicar cuadrados mínimos, en los datos experimentales. Las concentraciones de fosfato fueron las siguientes: A 100 mM, B 150 mM, C 200 mM.

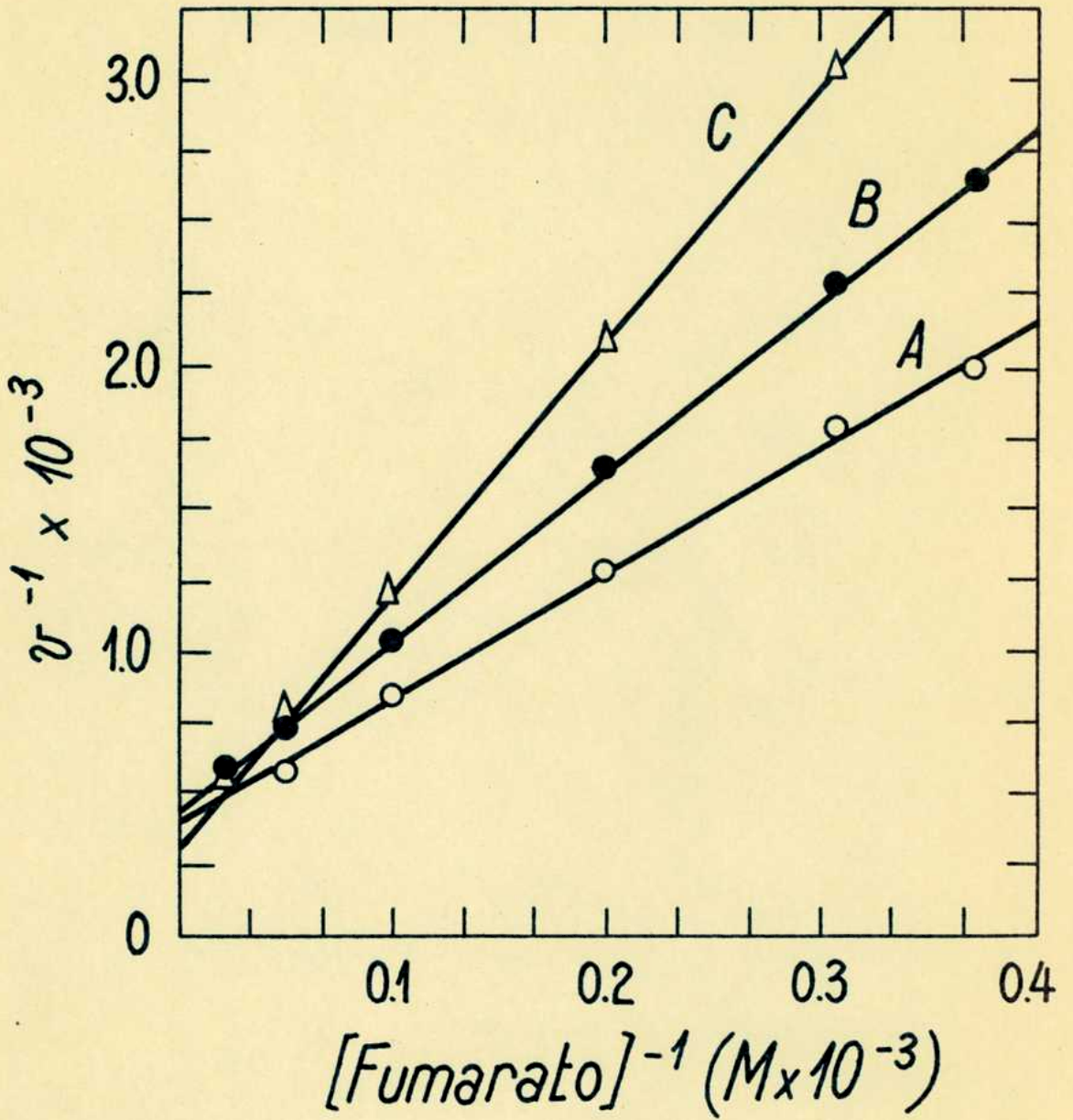


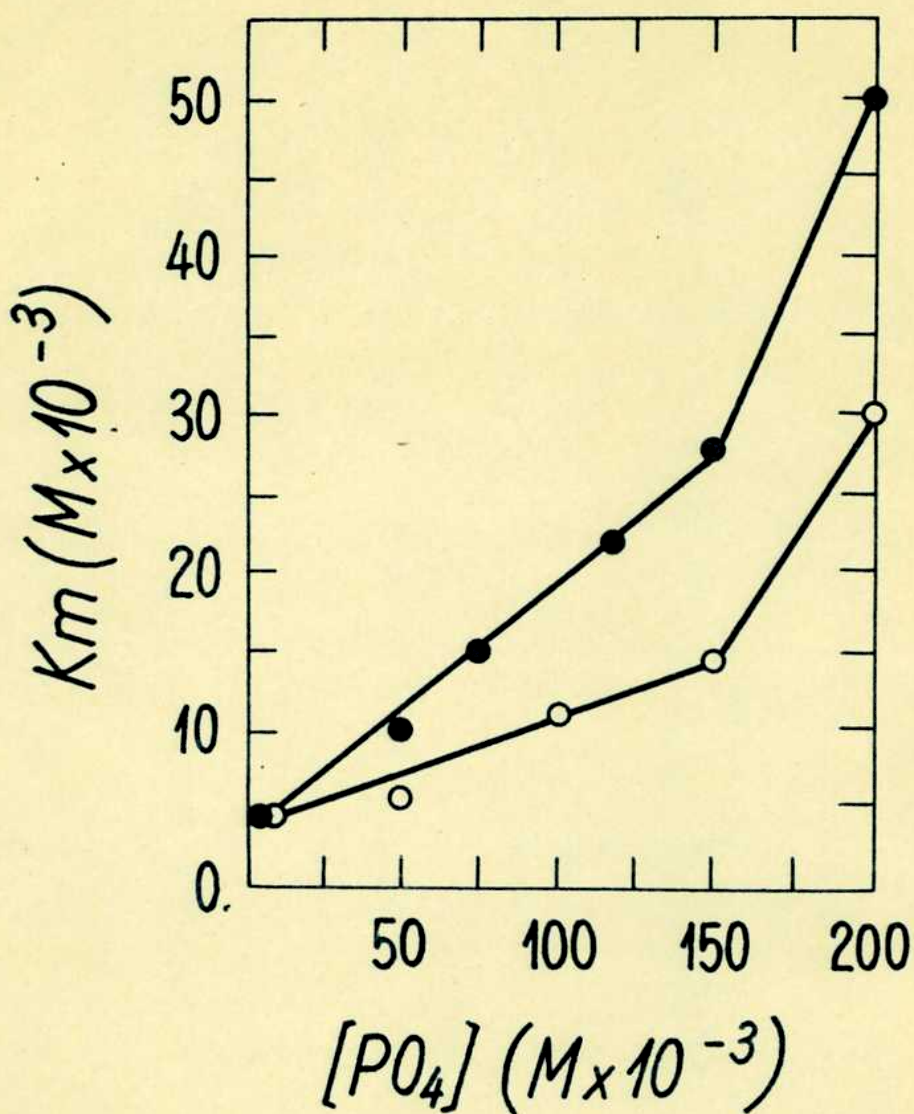
TABLA 5

VALORES DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS PARA LOS DOS SUSTRATOS EN  
DISTINTAS CONCENTRACIONES DE BUFFER FOSFATO

Concentración de fosfato (mM)	$K_M$ (mM)	$K_P$	
		Método gráfico (mM)	Cuadrados mínimos (mM)
5	4.3	4.4	4.1 ±0.2
10		4.4	4.3 ±0.1
50	10.0	5.5	5.8 ±0.03
75	14.9		
100		11.5	11.0 ±0.1
<del>100</del>	22.0		
150	28.0	14.0	13.7 ±0.1
200	50.0	30.0	30.0 ±0.2
Tris	3.6	3.6	

FIGURA 8

DEPENDENCIA DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS CON LA CONCENTRACION DE FOSFATO



Curva -o-o-o- corresponde al fumarato.

Curva -●-●-●- corresponde al L-malato.

bido a activaciones por sustrato, entre valores de fumarato mayores de 1mM. Nuestrs experimentos se hicieron a concentraciones mayores que ese valor, y no se sabe cual es el comportamiento a concentraciones mas bajas de sustrato.

Si se representa la constante de Michaelis de los dos sustratos, en función de la concentración de fosfato, gráfico 8, se ve que la misma aumenta en forma proporcional, tanto para el L-malato como para el fumarato. Esto indicaría que el fosfato actuaría como un inhibidor del tipo competitivo, cosa que también se observa de los datos del gráfico 3.

Cuando el fosfato actúa frente al fumarato y a bajas concentraciones del primero se nota un efecto activador. En el gráfico 4 los valores de  $1/v$  disminuyen.

En la figura 9 se han representado en gráficos de Lineweaver-Burk, los datos de velocidades iniciales obtenidas en ausencia de buffer fosfato. El buffer de medida fue Tris-clorhidrico.

El valor obtenido para los dos sustratos es el mismo, 3.6mM. El rango de concentraciones de fumarato fue entre 2-40 mM. No se investigó a concentraciones mas bajas.

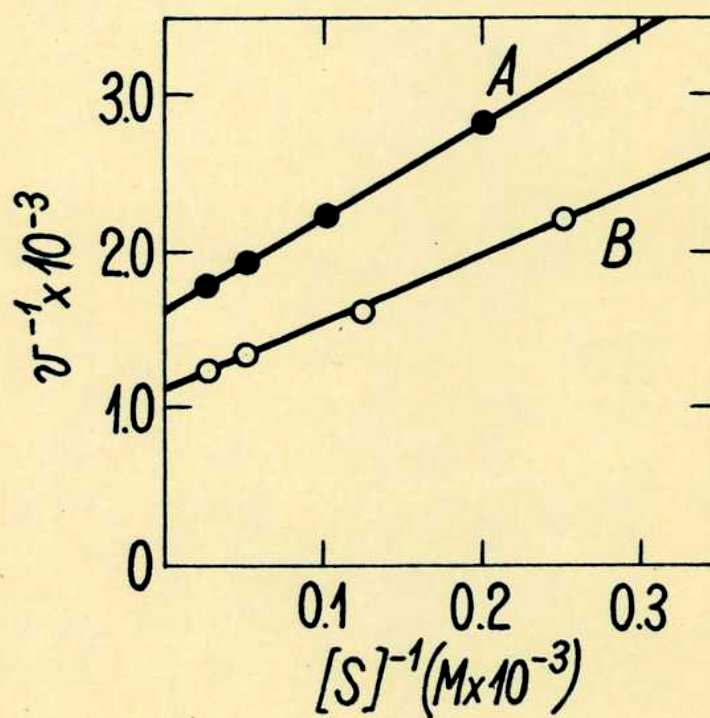


FIGURA 9

DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS EN AUSENCIA DE  
POBFRATO

La curva A fue la obtenida cuando el sustrato es el I-ma-  
lato, y la B para fumarato.

La enzima empleada en los dos experimentos fue distinta.

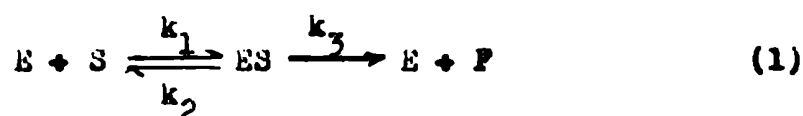


## CAPITULO V

### ESTUDIO DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE LA FUMARASA EN FUNCIÓN DEL pH

La dependencia de la actividad enzimática con el pH se debe principalmente a la ionización de grupos en el sitio enzimático por lo tanto, el estudio de los efectos del pH en las reacciones enzimáticas ofrece un modo de dilucidar los grupos que están ligados a la función catalítica.

Dixon (32), estudió el efecto del pH en la afinidad de la enzima con el sustrato. Basándose en estudios realizados anteriormente sobre otros equilibrios de importancia bioquímica, ácido-base, óxido-reducción, fosforilación, (33) encontró interpretaciones similares para el equilibrio de la formación del complejo de Michaelis, vale decir, combinación de la enzima con el sustrato.



El tratamiento teórico está referido a la constante  $K_s$  que representa el equilibrio entre el complejo ES, con la enzima libre y el sustrato. Si se supone que  $k_3$  es despreciable con respecto a  $k_2$ , el sistema reúne las condiciones de Michaelis.

$K_s$  está expresada en términos de concentración total de los componentes. Si se consideran las formas no ionizadas tendremos

$$K_s = \frac{E_t S_t}{ES_t} = \frac{[E][S] f_e(\text{pH}) f_s(\text{pH})}{[ES] f_{es}(\text{pH})} \quad (2)$$

$$K_s = K_s' \frac{f_e(\text{pH}) f_s(\text{pH})}{f_{es}(\text{pH})} \quad (3)$$

$K_s'$  representa la constante de las formas no ionizadas y  $f(\text{pH})$  son funciones de pH de Michaelis (34).

Escribiendo la (3) en forma logarítmica se tiene

$$pK_s = pK_s' + \log f_{ES}^p(pH) - \log f_E^p(pH) - \log f_S^p(pH) \quad (4)$$

Esta fórmula nos dice cómo la  $K_s$  varí. con el pH.

Si se representa  $pK_s$  en función de pH se obtienen curvas a las cuales se les aplica una serie de reglas que se interpretan con la fórmula (4) donde se ve que si se desprecia el primer término que es una constante, los términos  $p$  para la enzima libre y el sustrato tienen un significado que es opuesto al término de la  $p$  correspondiente al complejo.

Con este tratamiento Dixon enuncia lo siguiente:

- a.- El gráfico de  $pK_s$  será secciones de líneas rectas unidas por pequeñas partes curvas. Las partes rectas cubrirán un rango de pH en el cual uno de los términos en  $f(pH)$  es grande con respecto a los otros.
- b./ Las curvas del gráfico representan  $pK$  de un grupo ionizable.
- c.- Cada sección tendrá una pendiente de cero, una o dos unidades positivas o negativas.
- d.- Cada  $pK$  produce un cambio de una unidad de pendiente.
- e.- Si el  $pK$  está en el complejo ES la curva aparece hacia arriba. Si el  $pK$  corresponde al sustrato o a la enzima libre, la curva es hacia abajo. Los  $pK$  de los sustratos se pueden, en general, determinar fácilmente, así que no hay confusión con los  $pK$  de la enzima libre.
- f.- La pendiente de cualquier porción recta del gráfico es numéricamente igual al cambio de carga que ocurre en la disociación del complejo en enzima y sustrato, dentro del pH investigado.

Por ejemplo, si a un pH la enzima  $E^n$ , y el complejo ES, tienen ambos una carga negativa "n" y el sustrato libre está presente en la forma ionizada, la disociación será



entonces no habrá cambio de carga y la pendiente será cero. Si el complejo tiene "n-1" y la enzima "n" cargas



el cambio será -1, luego la pendiente de la recta ten-

dría un valor de -1.

En resumen la pendiente de la recta estaría determinada por la carga de los componentes que predominan a un pH determinado.

Con este método se revelan solo grupos cuyo grado de ionización se altera cuando la enzima se combina con el sustrato, es decir, grupos que forman parte del centro activo o que están lo suficientemente cerca como para ser afectados, cuando se combinan con el sustrato.

Así es posible obtener de los gráficos, solo información de los pH correspondientes a los centros activos y no de otros grupos ionizables de la proteína. Puede suceder que la unión del sustrato con la enzima no se produzca por un grupo ionizable, entonces no se obtendrá discontinuidad en la curva y quedará un sitio activo sin revelar.

Los datos obtenidos no dan idea de cual de las formas del sustrato es lo que realmente se combina con la enzima. Da el cambio total de cargas que se produce en la combinación, y el resultado es el mismo si la enzima se combina primero con el ion del sustrato, o si se combina con el sustrato no cargado y luego de la unión, se ioniza.

Toda esta teoría es válida cuando se estudia el efecto del pH sobre el  $K_s$ . Para ser aplicado al  $K_m$  depende de que  $K_m$  sea igual a  $K_s$  o diverja por efectos cinéticos.

En la ecuación (1) se ve claro que si  $k_3$  es chica con respecto a  $k_1$  y  $k_2$  el complejo  $KS$  estará en todo momento en equilibrio con  $K$  y con  $S$ . En esta condición  $K_s$  sería igual a  $K_m$  y la teoría puede ser perfectamente aplicada.

En los casos en que  $k_3$  no es relativamente chica Briggs y Haldane (35) demostraron que

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (7)$$

en este caso  $K_m$  no es igual a  $K_s$  y sería erróneo aplicar la teoría. Sin embargo podría ser que el error se cometa solo en una pequeña zona, en las proximidades del óptimo de pH donde  $k_3$  es grande.

El tratamiento cinético del problema se simplifica si se recuerda que en la ecuación (1)  $k_1$  depende del estado de ionización

de la enzima y el sustrato y no del complejo, mientras que  $k_2$  y  $k_3$  dependen solo del estado de ionización del complejo.

La constante  $k_3$  es la constante de velocidad con respecto a la cantidad total del complejo y varía con el pH. Esta variación es debido al hecho que una sola forma iónica del complejo se disocia y esta fracción varía con el pH.

Así  $k_3$  tiene dos partes, la constante de velocidad de ruptura de esta forma particular, que es independiente del pH y que la denominaremos  $k_3'$  y la función de pH que determina la concentración de esa forma a cualquier pH

$$k_3 = \frac{k_3'}{f_{ES}(pH)} \quad (8)$$

Un tratamiento similar se hace con  $k_2$  suponiendo que la misma forma del ES intervendría en la reacción de  $k_2$  luego

$$k_2 = \frac{k_2'}{f_{ES}(pH)} \quad (9)$$

Para la reacción de  $k_1$  hay que considerar la enzima libre y el sustrato

$$k_1 = \frac{k_1'}{f_e(pH) f_s(pH)} \quad (10)$$

Sustituyendo en (7)

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{k_2' + k_3'}{k_1'} \times \frac{f_s(pH) f_{ES}(pH)}{f_e(pH)} \quad (11)$$

Así el efecto del pH sobre  $K_m$  resulta igual que sobre  $K_s$ , ecuación (3), ya que  $k_1'$ ,  $k_2'$ ,  $k_3'$  no dependen del pH porque se refieren a una forma iónica particular.

La teoría del pH es también válida para este caso. Dixon (36) Con este método se tiene la posibilidad de determinar los pK

TABLA IVALORES DE pK DE GRUPOS PRESENTES EN LAS PROTEINAS

Grupo	pK (25°)
Carboxilo ( $\alpha$ )	3.0 - 3.2
Carboxilo (aspartil)	3.0 - 4.7
Carboxilo (glutamil)	4.4
Hidroxilo fenólico (tirosina)	9.8 -10.4
Sulfhidrilo (')	8.3 - 8.6
Imidazol (histidina)	5.6 - 7.0
Amonio( $\alpha$ )	7.6 - 8.4
Amonio ( $\epsilon$ cisteina)	6.5 - 8.5
Amonio ( $\epsilon$ lisina)	9.4 -10.4
Guanidino (arginina)	11.6 -12.6

(') Dato tomado de Benesch (38)

de grupos ionizables situados en el centro activo de la enzima lo que da una idea de su naturaleza química.

Sin embargo es necesario tener en cuenta el hecho que un grupo de una proteína puede no tener el mismo valor de pK que cuando esta es un aminoácido o en otra molécula pequeña, ya que pueden existir influencias de otros grupos vecinos de la proteína.

En la tabla 1 se dan rangos de pK de varios grupos presentes en las proteínas, los datos fueron tomados de Edsall (37)

Morton (39), interpretó las variaciones del  $K_m$  en función del pH, con los diagramas de Dixon (32) para la fosfatasa alcalina de la mucosa intestinal de ternero y de leche de vaca.

Trabajó con fenilfosfato como sustrato y encontró para la enzima que a pH mayor de 9.4 la curva de Dixon tenía una pendiente de -1. Esto resultó análogo a datos obtenidos por Roche y Sarles (40), con las fosfatasas aisladas de intestino de perro, riñón e hígado, quienes trabajaron en presencia de glicerofosfato como sustrato

La discontinuidad que presenta la curva y de acuerdo a las reglas de Dixon, correspondería al sustrato o a la enzima libre.

El hecho de que con distintos sustratos diera la misma discontinuidad indicaría que la misma sería independiente del sustrato y correspondería a un pK de la enzima.

El valor de ese pK es 9.2 y de acuerdo a Cohn y Edsall (37) correspondería a un hidroxilo fenólico, un  $\epsilon$ -amino de la lisina o a un sulfhidrilo de la cisteína. Por estudios de inhibición Barron (41) comprobó que la enzima no era sensible a reactivos, de grupos sulfhidrilos, pero era inhibida por iodo y yoduro de potasio, Morton (42). Con esto se eliminó la posibilidad del sulfhidrilo y acepta la del hidroxilo fenólico pero sin descartar la del grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina.

Otros resultados interesantes obtenidos del estudio de los gráficos de Dixon son los referentes a la arilsulfatasa, Dodgson (43) trabajó en presencia de tres sustratos distintos: nitrocatecol sulfato, p-nitrofenilsulfato y p-acetilfenilsulfato.

Las curvas presentan dos inflexiones correspondientes a la enzima libre. una con un pK de aproximadamente 8.2 y la otra 9.4 cuando trabajó con nitrocatecol-sulfato, la curva le dio una nueva inflexión a pH 6.5 que correspondió a la enzima libre o al sustrato. La primera posibilidad se descartó, pues trabajando con

los otros sustratos no aparecía tal pK. Además la curva de titulación del nitrocatecol sulfato dió un pK de 6.5.

La identificación de los grupos de la enzima responsables de los pK no está muy aclarada. El pK 8.2 no se sabe a que grupo atribuible y el pK 9.4 sería de un sulfhidrilo, un  $\alpha$  o  $\epsilon$  amino o un hidroxilo fenólico. El sulfhidrilo se descartó porque la enzima fue inhibida 49% por p-cloromercuribenzoato pero no era reactivada por la cisteína ni el glutatión.

Se tuvo evidencias de que el grupo fuera un  $\alpha$  o  $\epsilon$  amino, ya que la enzima fue inhibida con anhídrido acético en el tratamiento que según Fraenkel y Conrat (44) dicen específico para dicho grupo.

En el diagrama se observó también una inflexión correspondiente al complejo ES con un pK que varía entre 7.5 y 7.8 según el sustrato.

Hinkson y Mahler (43) estudiaron la l(+)-lactato deshidrogenasa de levadura y encontraron un pK para la enzima libre de 6.5 y 7.0

Así como Dixon desarrolló la teoría de la variación de la constante de Michaelis y la inhibición con el pH, Alberty y Massey (45), dan una interpretación de la variación de la velocidad máxima con el pH. Al trabajar con velocidades máximas obtenidas por extrapolación (46) a una concentración infinita de sustrato, evitan los posibles efectos de activación e inhibición que pudieran existir si se trabajara con la velocidad dada por una concentración particular de sustrato.

Si la velocidad máxima varía con el pH, esto indica que el complejo ES se ioniza, o que su descomposición está sujeta a una catálisis ácida o básica.

El tratamiento teórico se funda en la existencia de dos grupos en el sitio activo responsable de los efectos cinéticos. Dichos grupos pueden ser del tipo ácido o básico. Del mecanismo propuesto se llega a una expresión de la velocidad máxima y el de la constante de Michaelis dadas por las fórmulas

$$V_m = \frac{k_3 (E)_0}{1 + (H^+)/K_{a_{ES}} + K_{b_{ES}} / (H^+)} \quad (12)$$



$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \frac{1 + (H^+)/K_{a_E} + K_{b_E}/(H^+)}{1 + (H^+)/K_{a_{ES}} + K_{b_{ES}}/(H^+)} \quad (13)$$

donde (E) es la concentración molar total de los sitios activos,  $K_{a_E}$  y  $K_{b_E}$  son las constantes de ionización de dos grupos ionizables de cualquier tipo, y  $K_{a_{ES}}$  y  $K_{b_{ES}}$  las de los respectivos complejos. La (13) es equivalente a la (11) obtenida por Dixon (32).

Numerosos estudios se han realizado con distintas enzimas.

Frieden (49), estudió la NADH-citocromo c reductasa de corazón de cerdo y encontró que en la reacción intervenían tres grupos ionizables con pK 7.7, 8.5 y 7.4 respectivamente. Los dos primeros correspondían a la enzima libre y el tercero no se pudo establecer por los métodos cinéticos si correspondía a la enzima libre o al citocromo c, ya que esta sustancia tiene grupos ionizables en el rango de pH 7-9 dentro del cual fueron realizados los experimentos.

Raval y Wolfe (50) estudiaron la málico deshidrogenasa de corazón de cerdo y encontraron dos pK correspondientes a la enzima, con valores de 6.7 y 9.2.

Los trabajos realizados con la fumarasa de levadura Saccharomyces se describen a continuación.

Se usaron las siguientes abreviaturas:

$K_M$  y  $K_F$  = constantes de Michaelis para el L-malato y fumarato respectivamente.

$pK_M$  y  $pK_F$  = pK de la enzima libre frente a los dos sustratos.

$pK_{EM}$  y  $pK_{EF}$  = pK de los respectivos complejos.

Las drogas y aparatos utilizados fueron los citados anteriormente en el Cap. II

Se trabajó con las dos reacciones, vale decir la hidratación del fumarato y la deshidratación del L-malato.

Se prepararon soluciones madres de fumarato, L-malato y Tris.

Las soluciones madres de los sustratos se diluyen hasta el valor de la concentración final deseada, y se llevaban a pH con el agregado de Tris.

Los pH se controlaban antes y después de efectuadas las reacciones.

FIGURA 1

GRAFICOS DE DIXON PARA LA FUMARASA

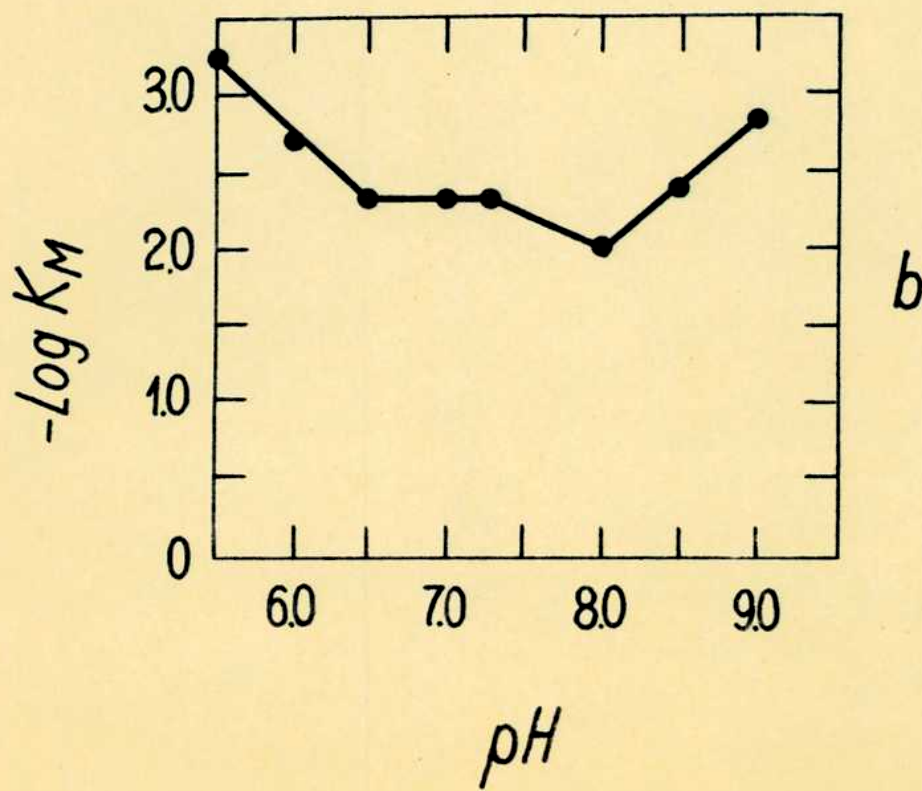
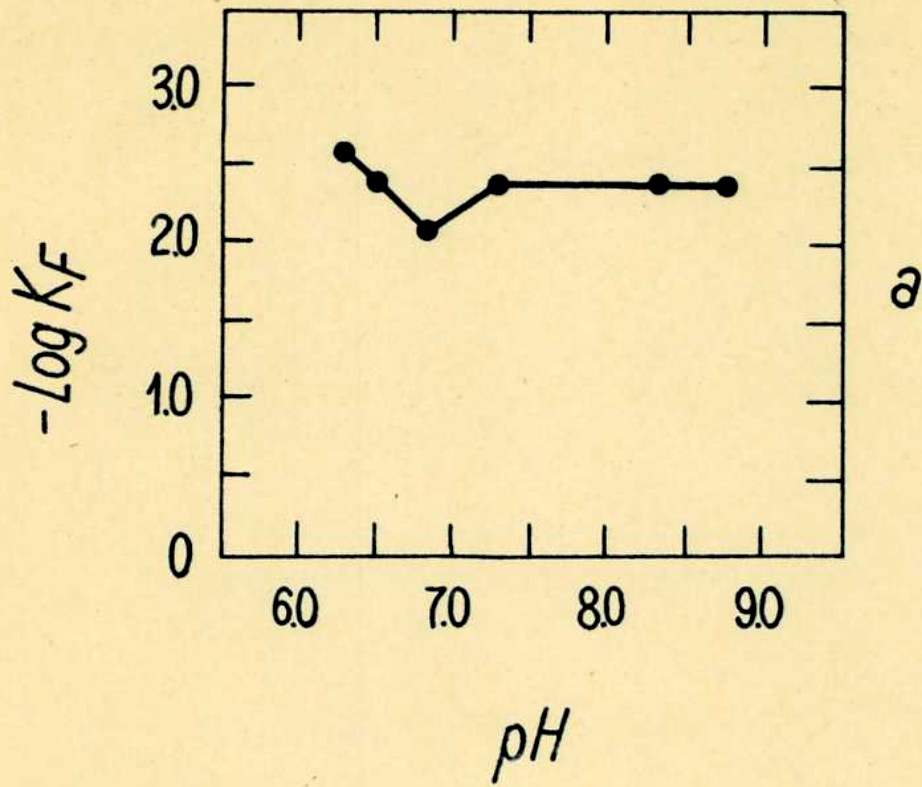


TABLA 2VALORES DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS PARA LOS DOS SUSTRATOSA DISTINTOS pH

<u>pH</u>	<u><math>K_p</math></u> <u>(Mx10<sup>-3</sup>)</u>	<u>-log <math>K_F</math></u>	<u><math>K_M</math></u> <u>(Mx10<sup>-3</sup>)</u>	<u>-log <math>K_M</math></u>
5.5			2.1	3.3
6.0			0.85	2.7
6.3	2.4	2.6		
6.5	4.0	2.4	2.6	2.4
6.9	8.0	2.1		
7.0			3.3	7.4
7.3	3.7	2.4	3.6	2.4
8.0			8.8	2.0
8.3	4.0	2.4		
8.5			5.1	2.4
8.7	4.1	2.4		
9.0			1.4	2.9

TABLA 3

VALORES DE LOS PK DE LOS GRUPOS IONIZABLES DE LA ENZIMA Y  
COMPLEJOS ENZIMA-SUSTRATOS DE LA FUMARASAS DE DISTINTOS ORIGENES

Origen de la fumarasa	$pK_P$	$pK_M$	$pK_{EM}$	$pK_{EP}$	Buffer usado
S(x)	7.3	7.3	6.5-8.0	6.9	Tris
C(x)	6.5	7.5	6.3-8.0	6.9	fosfato
P <sub>P</sub> (x)		6.5-7.3	7.0-7.7	7.0	Tris fosfato
C(')	6.2-6.8	6.2-6.8	6.6-8.4	5.3-7.3	acetato
T(') A B	5.9-5.7	5.9-5.7	7.4-8.7 7.1-8.6		acetato

S = Saccharomyces

C = corazón de cerdo

P<sub>P</sub> = Propionibacterium pentosaneum

T = Tórua

(x) Valores determinados por el estudio de los diagramas de Dixon (32)

(') Valores determinados por la variación de la velocidad máxima con el pH Albery (45).

Se realizaron controles de la enzima. Estos se hacían en condiciones de rutina pero en ausencia de fosfato.

La enzima se hallaba suspendida en buffer Tris pH 7.3 y durante los experimentos se mantenía en un baño a 0°C.

Los ensayos no se hicieron con enzima pura. A medida que se disponía de un extracto relativamente purificado se efectuaban los distintos ensayos. De allí que solo se pueden tener datos de la variación de la constante de Michaelis con el pH, ya que es un valor independiente de la concentración de la enzima.

No pasa lo mismo con la velocidad máxima, la cual depende de la concentración enzimática.

Las medidas de la velocidad inicial para cada concentración de sustrato se realizaron por duplicado.

La determinación de la constante de Michaelis se realizaron de acuerdo al método gráfico de Lineweaver y Burk (51).

Las concentraciones de los dos sustratos fueron las siguientes: con L-malato, se trabajó con valores comprendido entre 2.7 y 40 mM, y con fumarato entre 4 y 40 mM.

Los resultados obtenidos con la fumarasa de levadura pueden ser interpretados del gráfico 1.

En el se ven los diagramas de Dixon para los dos sustratos. la tabla 2 da los valores.

Del análisis de  $-\log K_p$  en función del pH del gráfico 1 (a) se obtienen inflexiones en la curva que revelarían la existencia de dos pK, uno para el complejo enzima-sustrato y el otro para la enzima libre, o el sustrato.

La curva presenta entre pH 6.3 y 6.9 una pendiente de aproximadamente una unidad negativa. A 6.9 esta cambia a una unidad positiva y a pH 7.3, el valor de la pendiente se hace cero.

Esto se interpretaría como que a pH 6.9 el complejo tiene dos grupos, ya que el valor de la pendiente pasa de una unidad negativa a una positiva. A pH 7.3 el pK puede atribuirse a la enzima, pues la posibilidad de que sea del sustrato queda descartada, ya que el fumárico no tiene ningún pK a ese valor.

En el caso del L-malato se observa, gráfico 1 (b), que entre pH 5.5 y 6.5 hay una pendiente negativa. Entre 6.5 y 7.3  $-\log K_M$  es independiente con la variación del pH; a pH 7.3 cambia nuevamente en aproximadamente una unidad negativa y a pH 8.0 la pendiente es positiva.

Esto daría como resultado la presencia de un pK correspondien-

te a la enzima libre con un valor de 7.3.

Al complejo enzima-sustrato un pK cuyo valor es 8.0 correspondiente a dos grupos, y un pK 6.5, correspondiente a otro grupo del complejo.

El pK de la enzima libre tiene idéntico valor en las dos curvas. De ello se deduciría que el mismo sitio activo de la enzima intervendría en la unión con el fumarato o el malato.

El valor del pK de 7.3 podría ser atribuido al grupo imidazol de la histidina (37), lo que estaría de acuerdo con lo que se sabe de la fumarasa de cerdo en la cual se supone que dos restos histidina estarían presente en el sitio activo (53).

En la tabla 3 se ven los grupos ionizables de la enzima libre y de los complejos.

Los valores obtenidos con la levadura Saccharomyces son muy semejantes a los dados por Massey (52) quien también obtuvo los pK por el método de Dixon. La única diferencia es que Massey trabajó en presencia de fosfato 66 mM y con la fumarasa de levadura, el buffer usado fue Tris.

Los datos dados por Mello Ayres y Lara (54) con la fumarasa de Propionibacterium pentosaceum, están dentro del orden hallado para las otras fumarasas.

En el trabajo realizado con la fumarasa de levadura no aparece el pK 6.5 de la enzima libre que se observa en las otras dos fumarasas.

En las columnas 4 y 5 de la tabla 3 se dan los valores de las constantes de ionización de las fumarasas de cerdo y tórcula (de esta última de las dos formas activas de la enzima)(47.55).

Estos valores fueron obtenidos de acuerdo a la teoría propuesta por Alberty (45)

En general existen diferencias en el comportamiento cinético de las distintas fumarasas pero en todas se obtienen evidencias de que la histidina estaría en o los sitios activos.

La información obtenida de estas técnicas, a pesar de no ser muy específica da una idea que de otro modo estaría inalcanzable.

## CAPITULO VI

### DISCUSION

La aislación de la fumarasa de Saccharomyces cereviceae, ha sido realizada por métodos que difieren de los utilizados para purificar fumarasas de otros orígenes. Hay que tener en cuenta la naturaleza de las distintas fuentes y sus diferencias en composición.

La fumarasa de levadura, tanto la de Saccharomyces como la de tórula, se obtuvieron por extracción del polvo acetónico, mientras que, la de corazón de cerdo, se halló en el sobrenadante del homogenato del tejido.

Esto explica que la fumarasa de levadura se halla en presencia de mayor cantidad de sustancias contaminantes y de allí que su purificación sea mas engorrosa.

En los extractos de levadura, y microorganismos bacterianos en general, se hallan gran cantidad de ácidos nucleicos, cuya presencia interfiere, principalmente en la precipitación con solventes orgánicos de las proteínas, ya que precipitan en forma conjunta. Los extractos de músculo cardíaco no presentan tal inconveniente pues la concentración de ácidos nucleicos es mucho menor, que la presente en levadura.

Massey realizó como primer paso en el fraccionamiento de la enzima de corazón, una precipitación ácida de la misma, (120, 121). Dicho tratamiento no resultó eficaz para la fumarasa de levadura (7).

La adsorción cuantitativa de la enzima en gel de fosfato de calcio, y elusión de la misma con buffer de alta fuerza iónica, fue realizado con la fumarasa de cerdo y con la de levadura.

Con esta última se realizó un fraccionamiento en columna de hidroxilapatita, a la cual se adsorbe en forma tal, que para, eluirla es necesario aumentar la fuerza iónica mas de 10 veces con respecto a la necesaria para que se adsorba.

La desnaturalización térmica del extracto crudo fue realizada cuando se precipitó la fumarasa de P.pentosacuum (54). Dicho tratamiento fue de resultado negativo cuando se aplicó a la fumarasa de S. cereviceae (7).

El comportamiento de las fumarasas frente a resinas de in-

tercambio iónico DEAE fue completamente distinto, la levadura no se fijó a la resina cuando se encontró en un medio de fosfato 0.001 M pH 7.0, mientras que a ese pH y a 0.02 M de fosfato la fumarasa de P.pentosaceum se adsorbe y las dos formas de tórrula la hacen a pH mayor.

El máximo valor de la actividad específica obtenida con la fumarasa de levadura, es casi el doble del dado por Massey para la fumarasa de cerdo recristalizada (21), considerando las mismas unidades de medida.

La fumarasa de levadura, lo mismo que la de P.pentosaceum es sensible a los reactivos de grupos sulfhidrilos. Esta reactividad no se observó en la fumarasa de cerdo.

En la serie de experimentos realizados se comprobó que el ClHgBz y la Ag son los reactivos que causan mayor inhibición y los ensayos de protección por sustratos y buffer fosfato, fueron realizados ante la inhibición producida por dichos reactivos.

El fumarato es protector de la enzima ante la inactivación del ClHgBz y la Ag, en cambio el L-malato protege solamente ante el primero de los reactivos.

Con la fumarasa de P.pentosaceum el fumarato protege ante la inhibición de ClHgBz, mientras que el L-malato no.

El fosfato protege frente al ClHgBz, tanto en la enzima de levadura se explica tal protección ya que el fosfato actúa como inhibidor competitivo. Por el mismo motivo, cuando actúan en forma simultánea uno de los sustratos y el fosfato, en concentraciones que por sí solas no dan protección, al actuar en forma conjunta, se nota una disminución de la inhibición.

Al hacer el estudio de los grupos que intervendrían en el sitio activo, por medio de los gráficos de Dixon, no se reveló la presencia de sulfhidrilos, ya que los pK encontrados en la enzima libre corresponderían mejor a un grupo imidazol. Suponiendo que los sulfhidrilos no intervendrían directamente en el sitio activo, la inhibición de la enzima por el ClHgBz podría ser interpretada como un ataque hacia grupos sulfhidrilos que son necesarios en el mantenimiento de la estructura activa de la enzima, como fue demostrado por Fasella y Hannes para la hexoquinasa (135).

Estos mecanismo podrían ser aclarados cuando se realicen experimentos más completos de los grupos sulfhidrilos y con la enzima pura.

Los datos dados en el presente trabajo fueron realizados con



una enzima parcialmente purificada.

De la curvas de actividad en función del p.H para los dos sustratos se puede ver que existe una similitud con los resultados obtenidos para la fumarasa de cerdo, el pH óptimo para el L-malato es mayor que el encontrado para el fumarato. Además en el lado alcalino las curvas están más juntas que en el lado ácido. Esto se explicaría como que los sustratos influirían en la constante de ionización del grupo (s) responsable de la actividad enzimática. Por otra parte la determinación de los mismos con el método de los gráficos de Dixon dió ciertas analogías con el comportamiento de la enzima de cerdo y de P.pentosaceum.

De los experimentos realizados con distintos aniones para ver su acción sobre la actividad de la enzima, solo se puede establecer que los que actúan en forma activante lo harían por unión a un grupo básico de la preteína cercano al centro (s) activo, modificando así la ionización del (o los) mismos. Igual explicación se daría para el caso de los aniones inhibidores.

Estos resultados fueron encontrados también con la fumarasa de cerdo. Los resultados del efecto del fosfato en la cinética de la enzima pueden ser comparados con los de la fumarasa de cerdo. Así cuando se realizaron los experimentos en presencia de L-malato se obtuvieron curvas de Lineaweaver-Burk en las que es bien marcado el efecto de inhibidor competitivo que tiene el fosfato con el L-malato.

Los valores de la constante de Michaelis para el L-malato de la fumarasa de cerdo determinados por Alberty (56), son más bajos que los resultados hallados para la fumarasa de levadura de donde se deduce que el L-malato (y también el fumarato) se unen más fuertemente a la enzima de cerdo que a la de levadura.

Así:

Concentración de fosfato (mM)	$K_M$ (cerdo) (mM)	$K_M$ (levadura) (mM)
5	0.22	4.3
50	1.5	10.0
133	6.7	22.0

En los experimentos realizados con fumarato se observó un efecto activador del fosfato cuando se trabajó con concentraciones bajas del mismo, como se puede ver en el gráfico 5. Tal comportamiento se explicaría como la unión del fosfato a un sitio de la enzima que no es el catalítico pero que actúa modificándolo.

Al ir aumentando la concentración del fosfato este comienza a actuar como inhibidor competitivo, vale decir que una vez ocupado el sitio no catalítico comienza a competir con el sustrato por el sitio activo.

En las condiciones en que se realizaron los experimentos, no se notó efecto activador del fumarato, contrariamente a lo obtenido por Favelukes (28), quien también trabajó con concentraciones de fumarato iguales a las empleadas en nuestros experimentos.

La fumarasa de cerdo es activada por el fumarato. Las condiciones en que se determinaron las velocidades iniciales de hidratación se realizaron en una amplitud de concentraciones de fumarato de 1 a 3000 veces, mientras que con levadura solo se investigó en un rango de 1 a 40 veces.

Con la fumarasa de tórula, tampoco se encontró efecto activador del sustrato, en las condiciones que se realizaron los experimentos. Con esta enzima trabajaron con concentraciones de sustratos entre 1/5 y 5 veces el valor de la constante de Michaelis dado para la fumarasa de cerdo.

Sin embargo, el hecho de que los sustratos actúen formando el complejo SE no se descarta totalmente, pues hay evidencias activadoras de los sustratos en las curvas de actividad enzimática en función del pH.

El efecto de la activación por sustratos y la corrección de la ecuación de Michaelis-Menten para interpretar tal comportamiento, fue realizado con las esterasas de caballo y cerdo, las que fueron estudiadas por Kistiakowsky (136). Para la primera se cumple la ecuación de Michaelis-Menten, para la segunda, no.

De la serie de propiedades cotejadas con las distintas fumarasas, es algo difícil establecer que grado de identidad existe entre las mismas.

Ademas con los experimentos realizados con la fumarasa de levadura, no es posible establecer el mecanismo de la enzima.

Al disponer de la enzima pura queda abierto un campo para realizar un estudio integral de la misma.



BIBLIOGRAFIA

- 1) Blatt, A.H. ; "Organic Syntheses "Coll Vol II, John Wiley and Sons inc. New York, N.Y. 1943 pag. 302.
- 2) Tiselius, H. ,Hjerten, S. y Levin, O. ; Arch. Biochem, And Biophys. 65, 132 (1956).
- 2<sup>a</sup>) Favelukes , G. Tesis de Dr. en quimica, Facultad de Ciencias Exactas Bs. As.
- 3) Christian, W y Warburg,O. Biochem. Z. 310, 384 (1941).
- 4) Massey, V. Bichen. J. 51, 490 (1952).
- 5) Frieden, C. , Bock, R. y Alberty, R. A. ; Am Chem. Soc. 76, 2482 (1954).
- 6) Stoppani, O.A.M. y Milstein, C. ; Biochem. J. 67, 406 (1957).
- 7) Favelukes, G. y Stoppani, A.O.M. ; Rev. Soc Arg. Biol. 34, 82 (1958) .
- 8) Dixon, M. ; Biochem. J. 54, 457 (1953).
- 9) Porath, J. , Flodin, P. ; Nature 183, 1657 (1959)
- 10) Keilin, D. y Hartree, E.F. ; Proc. Royal Soc. London, B124, 397 (1938).
- 11) Bock, R. Nan Sing Ling; Anal. Chem. 26, 1543 (1954).
- 12) Askonas, B. Biochem. J. 48, 42 (1951).
- 13) Massey, V. ; Colowick-Kaplan, "Methods an Enzymology" New York (1955) Vol. I, pag. 732.
- 14) Porath, J. ; Biochem. Biophys. Acta 22, 151 (1956).
- 15) Barron, E.S.G. ; Advances in Enzymology, 11, 201 (1951).
- 16) Putnam, F.W. en "The proteins", Neurath, H. Biley, K. (Eds) (Academic Press Inc. N.Y.) (1953) vol. I pag. 807.
- 17) Boyer, P.D. ; The Enzymes, (Academic Press Inc. N.Y.) (1959) Vol. I pag. 511.
- 18) Benesh, K.E. ; " A Symposium on Sulfur in Proteins" (1959).
- 19) Favelukes, G. ; Stoppani, A.O.M. ; An Asoc. Quim. Arg. 46, 237 (1958).
- 20) Chinard, F.P. Hellerman, L. Methods of Biochem. Anal. 1, 1 (1954).
- 21) Senalt, M.A. , Kreke, C.W. y Cook, K.S. ; J. Biol. Chem 224, 999 (1957)
- 22) Barron, E.S.G. , Singer, T.R. ; J. Biol. Chem. 157, 221 (1945)
- 23) Brren, E.S.G. , Miller, L.B. , Bartlet, G.K., Meyer, J. y Singer, T.R. ; Biochem. J. 41, 69 (1947)
- 24) Stocken, L.A. y Thompson, K.S.H. , physio. rev. 29, 168 (1949).

- 25) Benesch, R.E. , Lardy, H.A. y Benesch, R. ; J. Biol. Chem. 216, 663 (1955).
- 26) Swense, A.D. y Boyer, P.D. ; J. Am Chem. Soc. 79, 2174 (1957).
- 27) Jacobsohn, K.P. ; Pereira, E.P. y Tapadinhas, J. ; Biochem. Z. 254, 112 (1932).
- 28) Favelukes, G, Stoppani, A.O.M. ; An. Asoc. Quim. Arg. 46, 221 (1958).
- 29) Bock, R.M. y Alberty, R.A. ; J. Am. Chem. Soc. 75, 1921 (1953).
- 30) Massey, V ; Biochem J 53, 67 (1953).
- 31) Michaelis, L. y Davidsohn, H. ; Biochem. Z. 35 386 (1911)
- 32) Dixon, M. ; Biochem. J. 55, 161 (1953).
- 33) Dixon, M. ; Multi-enzymes systems. Cambridge University Press. (1949).
- 34) Michaelis, L. ; Die Wasserstoffionen konzentration. (Springer Verlag, Berlin) (1922).
- 35) Briggs, G.H. y Haldane, J.B.S. Biochem. J. 19 338 (1925)
- 36) Dixon, M. ; Webb, M.C. ; "Enzymes". Longmans, Green, London (1958) pag. 145.
- 37) Cohn, E.J. y Edsall, J.T. "Proteins, Amino Acids and peptides" (Reinhold Publishin Corp. n:Y:) (1943) pog 445.
- 38) Benesch, R.E. y Benesch, R. ; J. Am. Chem. Soc. 77, 5877 (1955)
- 39) Morton, K.K. ; Biochem.J. 65, 684 (1957).
- 40) Roche, J. y Sarles, H ; Bull. Soc. Chim. biol.; Paris 36, 491 (1954).
- 41) Barron, E.S.G. ; Singer, T.P.; J. Biol. Chem. 157, 221 (1945).
- 42) Morton, K.K. ; Biochem. J. 61, 232 (1955).
- 43) Dodgson, A.S. , Spéncer, D. y Williams, K. ; Biochem. J. 61, 374 (1955).
- 44) Fraenkel y Conrat, H. y Fraenkel y Conrat, S. ; Biochem. Biophy. Acta 5, 98 (1950).
- 45) Alberty, R.A. y Massey, V. ; Biochem. et Bioph. Acta 13, 347 (1954).
- 46) Lineveaver, H. y Burk, D. ; J. Am Chem. Soc. 56, 658 (1934).
- 47) Frieden, C. y Alberty, R.A. ; J.Biol. Chem. 212, 879 (1955).
- 48) Hinkson, L.W. y Mahaler, H.K. Biochemistry 2, 216 (1963).
- 49) Frieden, C. Biochem. et Bioph. Acta 24, 241 (1957).
- 50) Raval, D.N. y Wolfe, K.G. ; Biochemistry 1, 1118 (1962).
- 51) Lineveaver, H. y Burk, D.J. Am. Chem.<sup>OC</sup> 56, 658 (1934).

- 51a) Crumpler T.B. y Yoe, J.H. ; Chemical Computations and errors  
John Wiley y Sons Inc. London.
- 52) Massey, V ; Biochem. J 55 172 (1953).
- 53) Linderstrom Lang, K.V. y Schellman, J.A. "The Enzymes" Vol I  
pag 471 (Academic Press) (1959).
- 54) Mello Ayres, G.C. y Lara, F.J.S. ; Bioche Bioph. Acta 62,435  
(1962).
- 55) Hayman, S. y Alberty, R. ; Ann. N.Y. Acad. Sci. 94, 813 (1961)
- 56) Alberty, R.A. Massey, V. , Frieden, C. y Fuhlbridge, A.R. ;  
J. Am. Chem. Soc. 76, 2485 (1954).
- 57) Hier, C.H.N. , Stein, W.H. y moore, S. ; J. Biol. Chem. ; 221,  
151 (1956).
- 58) Anfinsen, C.B. , Aqvist, S.E.G. , Cooke, J.R. , Jonsson, B.  
J. Biol. Chem. 234, 1118 (1959).
- 59) Popenoe, E.A. Lawler; H.C. y du Vigneaud, V. ; J. Am. Chem.  
Soc. 74, 3713 (1952).
- 60) Sanger, F. Sci. 129, 1340 (1959).
- 61) Kubowitz, F y Utt, R. ; Biochem. Z. 314, 94 (1943).
- 62) Herrion, W.F. y Sutherland, E.W.J. Biol Chem. 224, 477 (1957)
- 63) Schlamowitz, M.J. Biol. Chem. 206, 369 (1954).
- 64) Schlamowitz, M. ; Ann. N.Y. Acad. Sci 75, (1) 373 (1958).
- 65) Nisselbaum, J.S. , Schlamowyz, M. , Bodansky, O. ; Ann. N.Y.  
Acad. Sci. 94, 970 (1961).
- 66) Bodansky, O. ; J. Biol. Chem. 18, 341 (1937).
- 67) Bodansky, O. ; J. Biol. Chem. 174, 465 (1948).
- 68) Yunis, A.A. , Krebs, E.G. ; J. Biol Chem. 237, 34 (1962).
- 69) Yunis, A.A. , Fisher, E.H. y Krebs, E.G. ; J.Biol. Chem.  
235, 3163 (1960).
- 70) Paul, J. y Fottrell, R.F. ; Ann. N.Y. Acad. Sci. 94, 668  
(1960).
- 71) Markert, C.L. , Moller, F. ; Proc, Natl. Acad. Sci. U.S.  
45, 753 (1959).
- 72) Hunter, R.L. y Markert, C.L. ; Sci. 125, 1294 (1957).
- 73) Markert, C.L. y Hunter, R.L. ; J. Histochem, y Cytochem  
7, 42 (1959).
- 74) Timasheff, S.W. , Sturtevant, J.M. , Bier, M. ; Archiv. Biochem.  
Biophy 63, 243 (1956).
- 75) Hess, B. ; Ann. N.Y. Acad. Sci 75, 292 (1958).
- 76) Vessell, E.S. , Bearn, A.G. ; Ann N.Y. Acad. Sci. 75, 286  
(1958).

- 77) Vessell, E.S., Bearn, A.G. ; J.Clin. Invest. 37, 672 (1958).
- 78) Wieland, T y Pfleider, G. ; Biochem. Z. 329, 112 (1957).
- 79) Pfleider, G. y Jukel, D. ; Biochem. Z. 329, 370 (1957).
- 80) Houpt, T y Giersberg, H. ; Naturwissenschaften 47, 268 (1958).
- 81) Markert, C.L. y Moller, F. ; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 45, 753 (1959).
- 82) Hirs, C.H.W., Stein, W.H. ; Moore, S. ; J. Am. Chem. Soc. 73, 1893 (1953).
- 83) Martin, A.P.J. , Porter, R.R. ; Biochem. J. 49, 215 (1951).
- 84) Hirs, C.H.W. , Moore. S. y Stein, W.H. ; J. Biol. Chem. 200, 493 (1953).
- 85) Tallan, H.H. , Stein<sup>W,H</sup> ; J. Am. Chem. Soc. 73, 2976(1951).
- 86) Tallan, H.H. , Stein W.H. ; J. Biol. Chem. 200, 507 (1953)
- 87) Adunts, G.T. ; Tr 1-oi (Pervoi) Bioklin. Konf. Pribaltusk resp. i Belo russii Posvyashch if Letiyn Latv. Lit. Est. SSR, Tartu 1960. 88, CA: 58 N<sup>o</sup>5 (1963) 4769a.
- 88) Adunts, G.T. ; Biol. Nauki. 15, 41 (1962) CA. 57, N<sup>o</sup>2 (1962)
- 89) Warburg, O. y Christian, W. ; Biochem. Z. 310, 384 (1942).
- 90) Wold, F. y Balloou, C.E. ; J. Biol. 227, 313 (1957)
- 91) Malmström, B.G. ; Arch. Biochem. Biophys. 70, 58 (1957).
- 92) Malmström, B.G. ; Arch. Biochem. Biophys. 58, 381 (1955).
- 93) Malmström, B.G. ; J. Biol. Chem. 234, 1108 (1959).
- 94) Boser, H.Z. Physiol. Chem. 315, 163 (1959).
- 95) Czok, R. y Bucher, T. "Advances in protein chemistry" C.B. Anfinsen Jr (editor) Vol 15, Academic Press, Inc. New York 1960 p. 315.
- 96) Holt, A. y Wold, F. ; J. Biol. Chem. 236, 3227 (1961).
- 96a) Malmström, B.G. ; Arch. Biochem: Biophys. Suplemento I, 247 (1962).
- 97) Rutter, W.J. en "The Enzymes" Boyer, P.D. , Lardy. H.A. Myrback,K. (Editores) Academic Press. Inc. New York. 1960, pag. 361.
- 98) Warburg, o. y Christian, W. Biochem. Z. 314, 149 (1943).
- 99) Warburg, O. y Gaivehn, K.Z. Naturforsch 9b, 206 (1954).
- 100) Rutter, W.J. y Ling K.H. ; Biochem et Biophys. Acta 30, 71 (1958).
- 101) Peanasky, R.J. y Lardy, H.A. ; J. Biol. Chem. 233, 365 (1958).
- 102) Stumpf, P.K. ; J. Biol. Chem. 176, 233 (1948).

- 103) Jaganathan, V. , Sinh, K. y Damodaran , M. Biochem. J. 63, 94 (1956).
- 104) Bard, R.C. y Gunsalus, I.C. ; J. Bacterio. 59, 387 (1950):
- 105) Knox, W.E. , Stumpf, P.K. , Green, D.E. , Auerbach, V.H. J. Bacteriol. 55, 451 (1948).
- 106) Kuhn, K. y Tiedemann, H. ; Z. Naturforsch. 8b, 428 (1953).
- 107) Gary, N.E. , Kupferberg, L.L. y Graf, L.H. ; J. Bacteriol. 69, 478 (1955).
- 108) Su, T.C. y Ling, A.H. ; J. Formosa Med. Assoc. 55, 18 (1956).
- 109) Richards, O.C. y Kutter, W.J. ; J. Biol. Chem. 236, 3185 (1961).
- 110) Siegel, L. y England, E. ; Biochem. Biophys. Acta. 64, 101 (1962).
- 111) Schubert, M.R. ; J. Biol Chem. 114, 341 (1936).
- 112) Sophianopoulos, A.S. y Vestling, C.S. Biochem. Biophys. Acta. 45, 400 (1960):
- 113) Delbruck, A. , Zebe, E. y Bucher, T. ; Biochem. z. 331, 273 (1959).
- 114) Delbruck, A. , Schimassek, M. , Bartch, A. y Bucher, T. ; Biochem. z. 331, 297 (1959).
- 115) Delaney, R.S. ; Biochemistry 2, 438 (1963).
- 116) Ronwin, E. ; Can. J. of Biochem. Physiol. 40, 57 (1962).
- 117) Ronwin, E. ; Biochem. Biophys. Acta 38, 258 (1960).
- 118) Laidler, K.J. ; Trans. Faraday Soc. 51, 528, 540, 550 (1955).
- 119) Taylor, J.F. y Lowry, O. ; Biochem. Biophys. Acta. 20, 109 (1956).
- 120) Massey, V. ; Nature 167, 769 (1951).
- 121) Massey, V. Biochem. J. 51, 490 (1952).
- 122) Wigler, R.W. y Alberty, R.A. ; J. Am Chem. Soc. 82, 5482 (1960).
- 123) Fisher, N. Frieden, C. , Mc. Kinley McKee, J.S. y Alberty, R.A. ; J. Am Chem. Soc. 77, 4436 (1955).
- 124) Gawron, O. Fondy, L.L. . J. Am. Chem. Soc. 81, 6333 (1959).
- 125) Gawron, O. ; J. Am. Chem. Soc. 82, 994 (1960).
- 126) Alberty, R.A. y Bender, P. ; J. Am. Chem. Soc. 80, 542 (1959).
- 127) Krasna, A.I. ; J. Biol Chem. 236, 749 (1961).
- 128) Gal, E.M. Archiv. Biochem. Biophys. 90, 278 (1960).

- 129) Thomson, J.F. ; *Archiv. Biochem. Biophys.* 90, I (1960).
- 130) Jacobsen, K.F. , Tapadinhas, J. y Soares M.; *Arch. Port. Sci. Biol.* 4, 111 (1938).
- 131) Alberty, R.A. , Miller, W.G. y Fisher, H.F. ; *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3973 (1957).
- 132) Shavit, N , Wolfe, R.G. , Alberty, R.A. ; *J. Biol. Chem.* 233, 1382 (1958).
- 133) Frieden, C. , Wolf, R.G. y Alberty, R.A. ; *J. Am. Chem. Soc.* 79, 1523 (1957).
- 134) Cohn, E.J. y Edsall, J.T. ; "Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions". Reinhold Publishing Corporation, New York 1943 p.462.
- 135) Fasella P. y Hammes, G.G. ; *Archiv. Biochem. Biophys.* 100, 295 (1963).
- 136) Adler, A.J. , Kistiakowsky, G.B. ; *J. Am. Chem. Soc.* 84, 695 (1962).



# FOYBIA

INDICE.

	<u>Pag.</u>	
Introducción.....	1	
Preparación de la enzima		
I - Materiales.....	11	
II - Métodos.....	11	
III - Estudios en ultracentrífuga.....	46	
Estudio de la dependencia de grupos sulfhidrilos en la actividad catalítica de la fumarasa.....		48
Propiedades de la fumarasa		
I - Efecto del pH en la actividad de la fumarasa.....	62	
II - Acción de varios aniones sobre la fumarasa.....	63	
III - Determinación de la constante de equilibrio.....	65	
IV - Influencia del fosfato en la constante de Michaelis, para los dos sustratos.....	69	
Estudio de las constantes cinéticas de la fumarasa en función del pH.....		83
Discusión.....	96	
Bibliografía.....	100	