

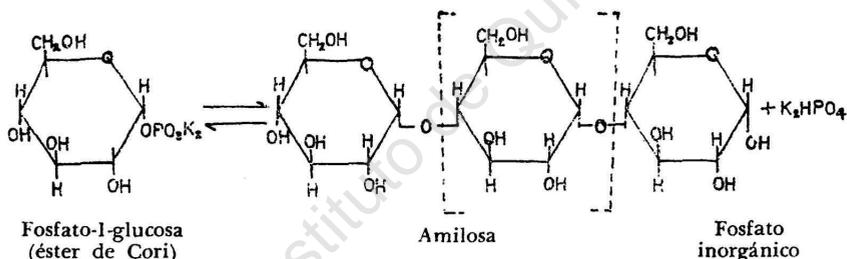
CINETICA DE LA FOSFORILASA DE LA PAPA

B. Arreguín, S. Miranda y R. Cetina.*

Contribución Nº 166 del Instituto de Química.

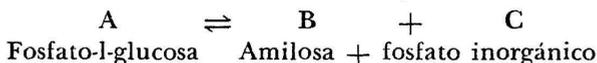
Recibido, octubre 4 de 1963.

Se entiende por fosforólisis a la degradación del almidón en presencia de fosfato inorgánico. El producto de esta reacción es el fosfato- α -glucosa producido por la fosforilasa (1, 2). La reacción catalizada por la fosforilasa de la papa (3) es reversible:



La fosforilasa de la papa ha sido separada en dos componentes (4): la enzima *P*, que cataliza la formación y degradación de la amilosa y la enzima *Q* que ramifica a la amilosa formando la amilopectina que es el componente principal del almidón.

La reacción enzimática estudiada se consideró de primer orden en un sentido y de segundo orden en el opuesto:



Al iniciarse la reacción las sustancias de la derecha se van formando a medida que transcurre la reacción y la velocidad en un sentido estará dada por:

* Tomado de una tesis presentada por S. Miranda a la Escuela Nacional de Ciencias Químicas para obtener el título de Químico.

$$\frac{dx}{dt} = k(a-x) - k_1 x \frac{x}{n} \quad [1]$$

en donde a es la concentración inicial de fosfato-1-glucosa, x la concentración de éste consumida en el tiempo t , $(a-x)$ la concentración del mismo después de ese tiempo t y x/n la concentración de amilosa al final del tiempo t , siendo n el número de residuos de la glucosa de que está formada la amilosa ($n = 1000$) (5) y k y k_1 las constantes de velocidad en uno y otro sentido.

En el estado de equilibrio las velocidades en ambas direcciones se igualan y, por lo tanto:

$$k(a-x_e) = k_1 x_e \frac{x_e}{n} \quad [2]$$

en donde x_e es ahora la concentración en el estado de equilibrio.

Haciendo las operaciones matemáticas necesarias, se llega a una ecuación de primer y segundo orden:

$$k = \frac{x_e}{t(2a-x_e)} \ln \frac{ax_e + x(a-x_e)}{a(x_e-x)} \quad [3]$$

Para poder hacer uso de los datos experimentales, se necesita utilizar tres ecuaciones más:

La de Arrhenius

$$\log k = \frac{-E}{2.303 RT} + \text{constante.} \quad [4]$$

la de Eyring (6)

$$\log \frac{k}{T} = \frac{-\Delta H^\ddagger}{2.303 RT} + \log \frac{K_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{2.303 R} \quad [5]$$

y la de Michaelis y Menten modificada por Briggs y Haldane.



de donde

$$v = \frac{k_3 e s}{s + \frac{k_2 + k_3}{k_1}} \text{ siendo } \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m \quad [7]$$

y finalmente

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_m}{s}}$$

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos y métodos:

Ester de Cori.—Se preparó siguiendo las indicaciones dadas en (7). A partir de 300 g de papa, se obtuvieron 7.8 g de fosfato-l-glucosa.

La enzima P, preparada de acuerdo con el esquema I, se disolvió en 400 ml de una solución de citrato de sodio 0.2 M, pH 6.2 y se liofilizó. En estas condiciones la actividad enzimática se conserva íntegra (aproximadamente 100%), y el producto seco obtenido puede mantenerse durante meses sin pérdida apreciable de actividad.

Fosfatos.—Se cuantearon por el método de Fiske y Subbarow (8) con ácido amino naftol sulfónico como reductor.

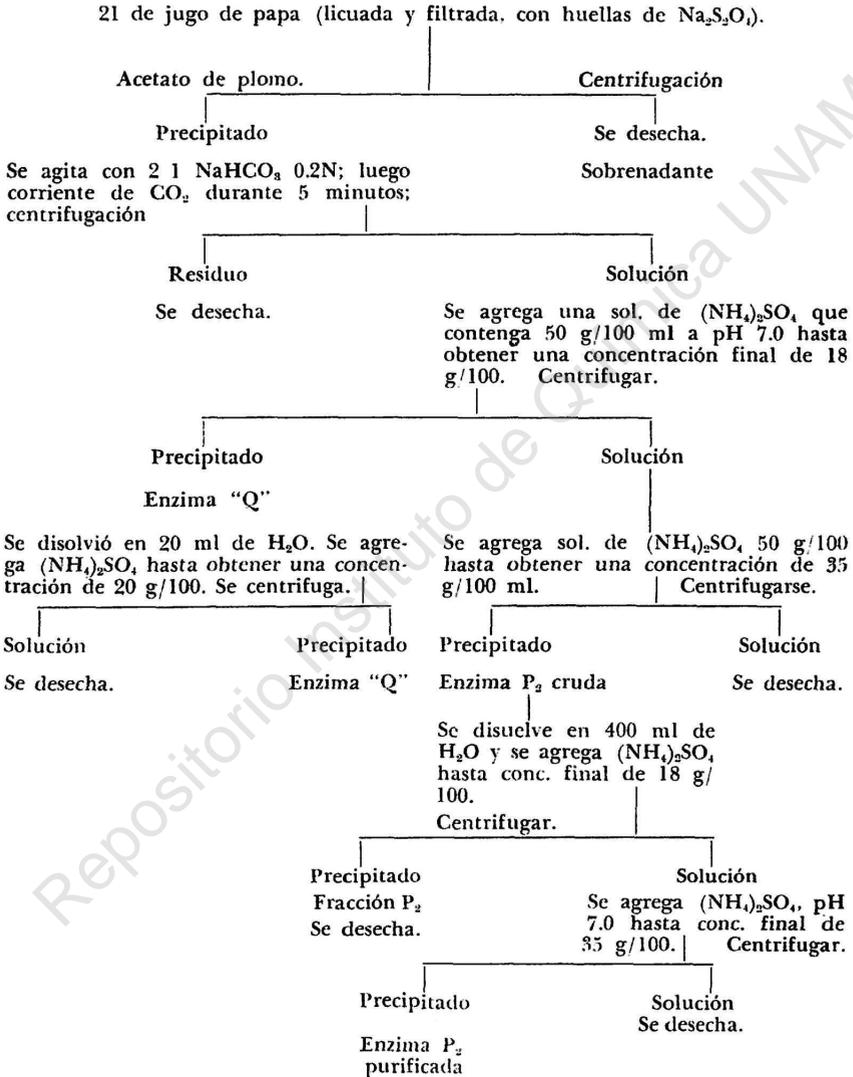
Incubaciones.—El procedimiento para seguir la reacción consiste en medir la cantidad de fosfato inorgánico liberado y la desaparición del éster de Cori.

Para preparar las diluciones de éster de Cori, se prepararon soluciones originales que contenían aproximadamente 733 mg en 4 ml (493×10^{-3} moles/l) y de ella se tomaban los volúmenes necesarios para obtener soluciones con concentraciones equivalentes a 121, 97, 72, 47 y 34×10^{-3} moles/l.

Como iniciador se empleó una solución de almidón que en 0.2 ml contenía 1 mg. La solución de fosforilasa se hizo inmediatamente antes de su empleo, pesándose 300 mg del polvo liofilizado (P₂) y disolviéndose en 1.4 de H₂O destilada.

ESQUEMA 1

SEPARACION DE LAS ENZIMAS P y Q



Se mezclaron las alícuotas de solución madre de éster de Cori, 0.2 ml del iniciador y se completó el volumen a 0.7 ml con agua. Se colocó en un baño a temperatura constante. En otro tubo se colocó la solución de enzima, para que adquiriese la temperatura del baño. Después de un minuto se puso en el primer tubo 1.3 ml de solución de enzima (equivalente a 8.02 mg de proteína por biuret), conteniendo la enzima P₂ en citrato y con un equivalente de 278.6 mg de sólidos. Del volumen total de 2.0 ml, se tomaron alícuotas de 0.1 a 0.2 ml en diversos tiempos.

Las temperaturas seleccionadas fueron 300, 303, 306 y 309° K (27, 30, 33 y 36° C., respectivamente). Las alícuotas se pasaron a tubos de centrifuga conteniendo un volumen igual de ácido tricloroacético al 18%. Se centrifugó y las proteínas precipitadas se lavaron 3 veces con volúmenes pequeños de agua destilada. Los sobrenadantes junto con sus correspondientes lavados se pasaron a matraces aforados de 10 ó 25 ml, tratando de que una alícuota de dicha solución contuviera entre 4 y 40 µg de fosfato. Esta alícuota se mezcló con 1 ml de H₂SO₄ 10N, 0.8 ml de solución de molibdato de amonio al 2.5% y 0.4 ml de solución reductora de Fiske y Subbarow (8). El volumen se llevó a 10 ml con agua destilada y el color desarrollado en 10 minutos a temperatura ambiente se midió a 660 mµ en un espectrofotómetro Beckman DU.

RESULTADOS

Constantes de velocidad.

Tomando los datos experimentales de la cantidad de fósforo orgánico e inorgánico obtenido a las distintas temperaturas al usar una concentración de sustrato de 121×10^{-3} moles/l, y substituyéndolos en la ecuación (de primero-segundo orden) [3] se obtienen líneas rectas (Fig. 1)*, lo cual equivale a tener un valor constante de la velocidad específica para cada temperatura.

Sustituyendo en la ecuación de Lineweaver-Burke (9) los datos

* Los valores de esta expresión fueron obtenidos en el centro electrónico de cálculo de la U.N.A.M.

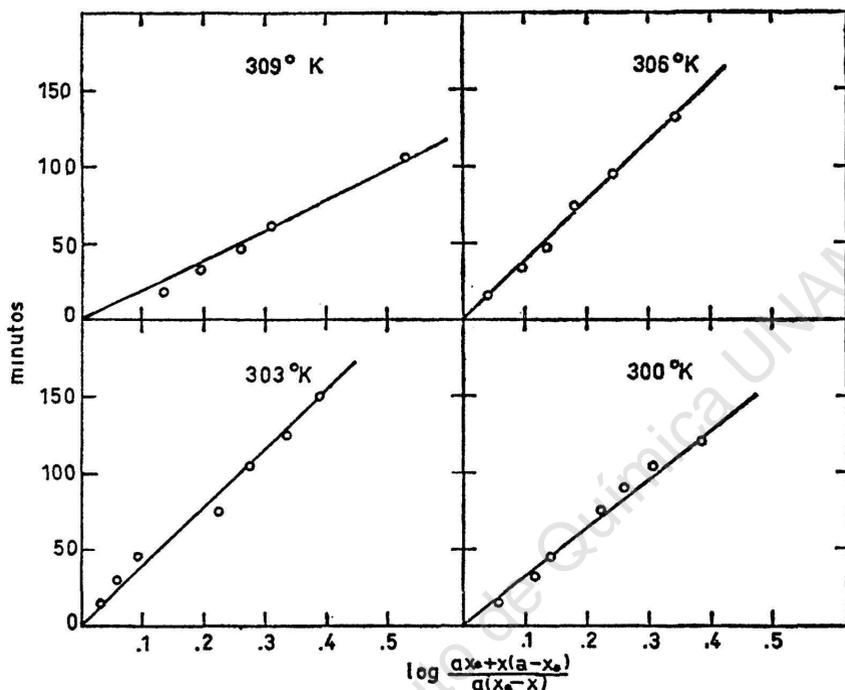


Fig. 1.—Gráficas de tipo obtenidas al substituir los datos experimentales de la acción de la fosforilasa de la papa en la ecuación de primero-segundo orden.

obtenidos con varias concentraciones de sustrato a distintas temperaturas, se determinaron las constantes de Michaelis. En la tabla I se encuentran los valores de las constantes a distintas temperaturas.

TABLA 1*

T	$K \times 10^3$	$K \times 10^5$	$K_m \times 10^2$	$\frac{1}{K_m}$	$V \times 10^4$
309	10.8218	2.41732	11.856	8.4200	20.80
306	5.4642	1.63252	8.435	11.8553	12.05
303	5.0278	1.20699	6.600	15.1515	8.98
300	4.9504	0.75827	5.202	19.2233	6.67

* Estos datos representan el promedio de no menos de 4 experimentos para cada temperatura y cada una de las concentraciones mencionadas en el texto.

Aplicación de los datos experimentales en las ecuaciones de Arrhenius y de Eyring.

Para obtener E, que es la energía que deben alcanzar las moléculas para que reaccionen, se sustituyeron los datos de la tabla I en la ecuación de Arrhenius [4] trazando los resultados en una gráfica, se obtiene la Fig. 2, cuya pendiente m está dada por $\frac{-E}{2.303 R}$, y de donde $E = 2.97 \text{ Kcal}$.

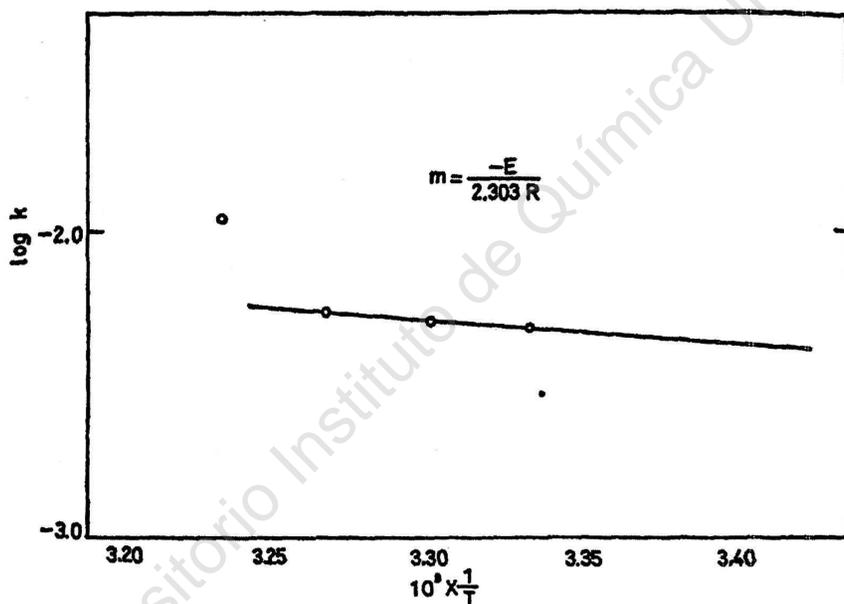


Fig. 2.—Substitución de los valores promedios de las constantes de velocidad obtenidas a varias temperaturas en la ecuación de Arrhenius.

Por sustitución de los valores de k en la ecuación de Eyring [5] y trazando $\log k/T$ contra $1/T$, se obtuvo una recta (Fig. 3), cuya pendiente es ahora $\frac{-\Delta H^\ddagger}{2.303 R}$, de la que se obtiene un valor de 2.288 Kcal para ΔH^\ddagger . De la misma gráfica (Fig. 3) se obtiene $\Delta s^\ddagger = -61 \text{ cal}$.

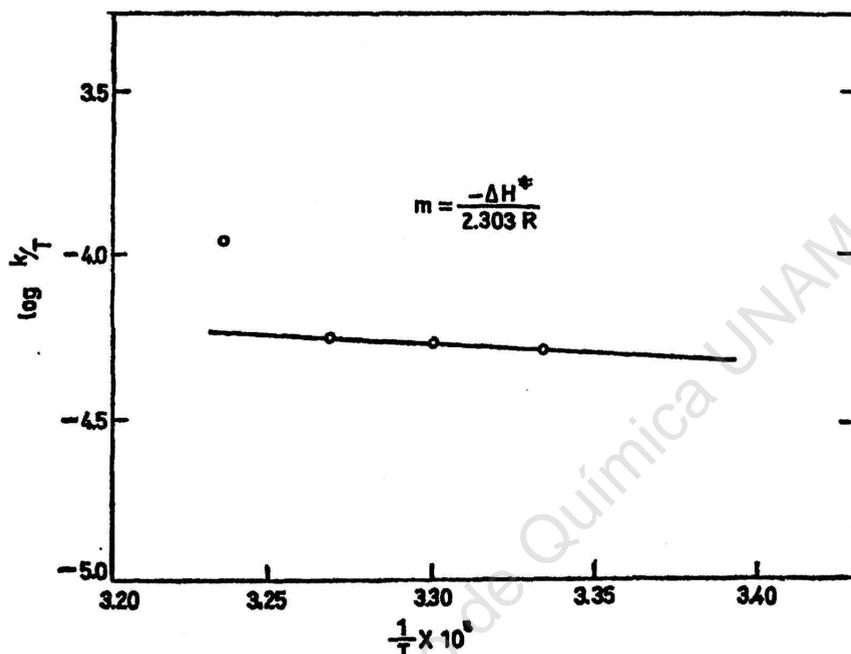


Fig. 3.—Aplicación de la ecuación de Eyring para obtener ΔH^\ddagger .

Si en la ecuación

$$\Delta H^\ddagger = E - RT$$

se sustituye el valor de E y se considera 298° K como temperatura, se obtiene un valor para ΔH^\ddagger de 2.37 Kcal que concuerda con el valor obtenido directamente por la ecuación de Eyring.

Constante de equilibrio.—Considerando que el equilibrio de la reacción es

$$K = \frac{[\text{Amilosa}] [\text{Fosfato}]}{[\text{Fosfato-1-glucosa}]} = \frac{[x_0/1000 x_0]}{[a - x_0]} = \frac{x_0^2}{1000 (a - x_0)}$$

y si en la ecuación de Van't Hoff integrada se sustituyen los valores experimentales obtenidos para $\ln K$ y T,

$$\ln K = \frac{-\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \text{constante}$$

se obtiene una línea recta en el que la pendiente es $\frac{-\Delta H}{R}$ y que da un valor ΔH de 23.0 Kcal (Fig. 4).

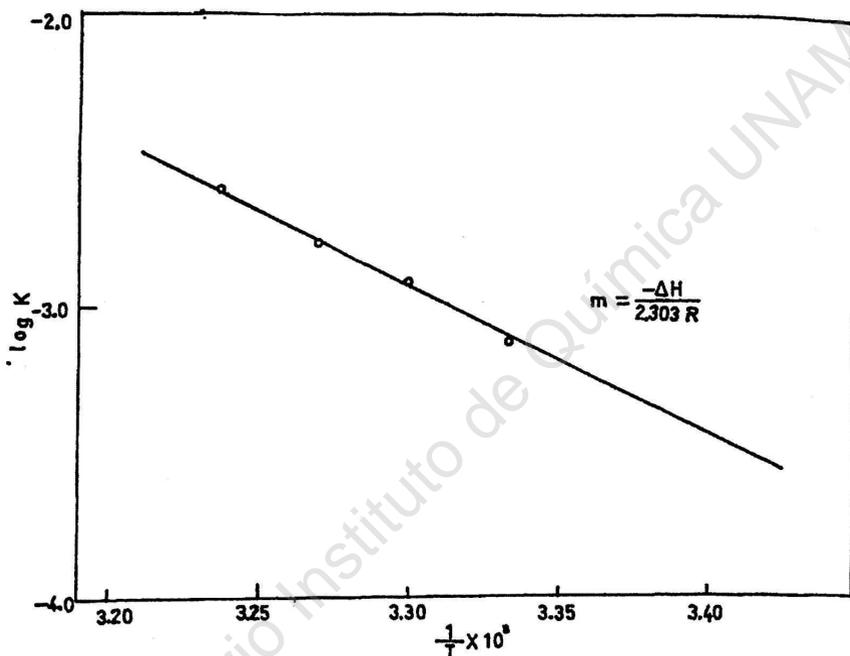


Fig. 4.—Substitución de los valores promedio de las constantes de equilibrio en ecuación de Van't Hoff.

Ya que $\Delta F^\circ = -RT \ln K$, haciendo las operaciones y sustituyendo, se tiene $\Delta F^\circ = \Delta H^\circ - RT$ constante.

Por otro lado, $\Delta F^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ y por lo tanto, $\Delta S^\circ = R$ constante y $\Delta S^\circ = 64$ ue.

Puede decirse que existe analogía entre las teorías de velocidades absolutas de reacción (Eyring) [5] y de Michaelis y Menten [6] elaborada para reacciones enzimáticas (9); ambas suponen la formación y descomposición de un complejo que está en equilibrio con los

reactivos originales. El complejo ES (enzima-sustrato) de Michaelis y el complejo activo de Eyring ($E + S$)*, son estados completamente diferentes: el primero no está activado y requiere activación para que pueda reaccionar.

Se puede suponer que durante la combinación de E y S se forma un complejo activado previo a la formación de ES, y que da origen a este último (10).

De acuerdo con este tratamiento para el cual ya existen datos como los de la fumarasa (11), se trazó $\log K_m$ contra $1/T$ (Fig. 5) con lo que se obtuvo ΔH_m igual -15.2 Kcal que es el calor necesario para la formación del complejo ES de Michaelis, y que es distinto a ΔH° de la reacción total. De ello se deduce que la k obtenida al

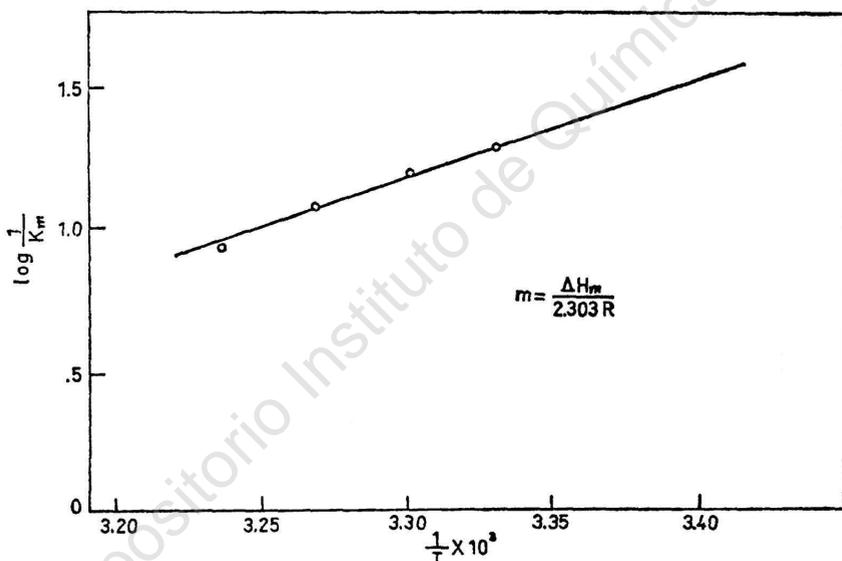


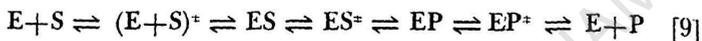
Fig. 5.—Trazo de $\log 1/K_m$ contra $1/T$ para obtener ΔH_m .

aplicar [3] no es la velocidad de formación del complejo de Michaelis sino posiblemente la de descomposición de este complejo, o de algún paso posterior, que es el que determinaría la velocidad de la reacción en cuestión.

Al considerar a K_m como una constante de equilibrio, implica que $k_3 \ll k_1$ o k_2 en la ecuación [7] lo cual se reduce a tener

$$K_m = \frac{k_2}{k_1} = K_{eq}$$

Se desprende que la ΔH^\ddagger de 2.37 Kcal obtenida de la ecuación de Eyring corresponde a la formación del complejo activado $(ES)^\ddagger$ y por lo tanto, en similitud con lo propuesto por Gibson (10), se puede suponer que la reacción enzimática transcurre a través de intermediarios activados y no activados como sigue:



Como la cantidad de sustrato empleado es muy grande, se puede suponer que ES es constante y al sustituir los valores en la ecuación (10)

$$\frac{\delta (\ln V)}{\delta 1/T} = \frac{\delta (\ln K_3)}{\delta 1/T} = - \frac{E_v}{R}$$

se obtiene un valor para E_v de 18.4 Kcal (Fig. (6)).

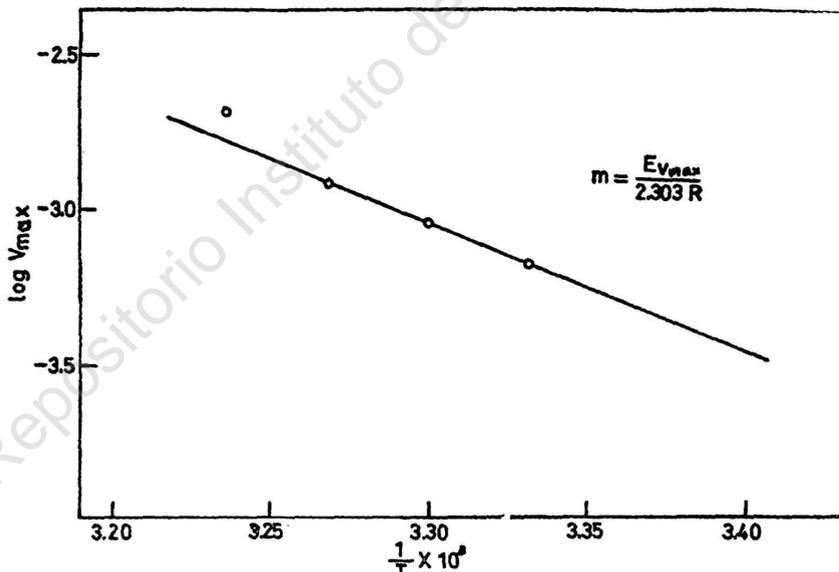


Fig. 6.—Trazo de log de la velocidad máxima V_{max} contra el recíproco de la temperatura absoluta.

Si trazamos en una gráfica los valores de energía obtenidos en este trabajo contra la coordenada de reacción, se obtiene la (Fig. 7).

El valor de ES^{\ddagger} está constituido por 15.2 Kcal (ΔH de formación del complejo ES, + 2.3 Kcal de ΔH^{\ddagger} de ES^{\ddagger} y 0.6 Kcal que provienen de RT. Lo que da un total de 18.1 Kcal que coincide con el valor obtenido de 18.4 Kcal. Esto quiere decir que el paso que determina la velocidad de la reacción es la formación complejo ES^{\ddagger} .

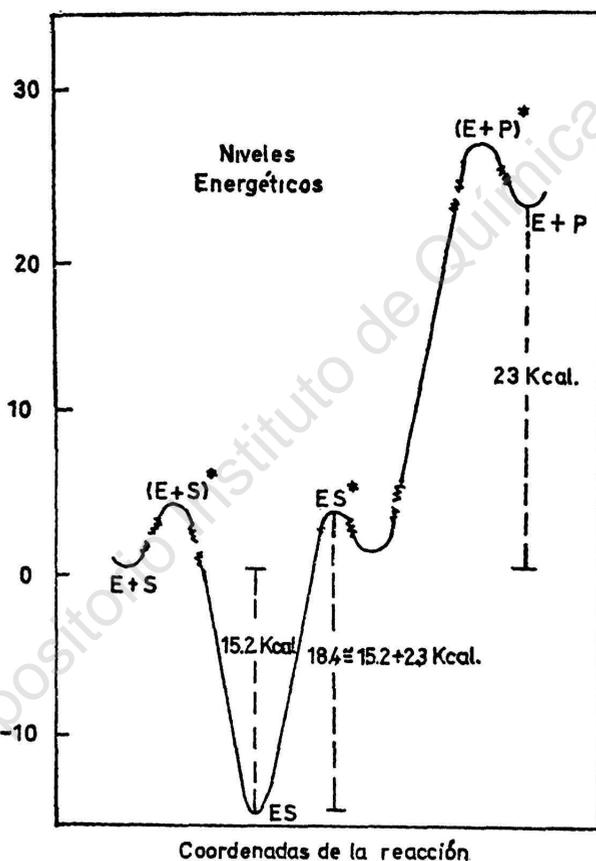
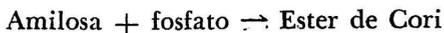


Fig. 7.—Diagrama que representa los cambios de calor de la reacción de la fosforilasa, empleando fosfato 1-glucosa como sustrato, y a pH 6.2

Si fuese posible medir con exactitud la acción de la fosforilasa en el sentido inverso:



se podrían postular etapas semejantes, es decir, tres complejos activados y dos estados de transición. Ya que la conversión de amilosa en éster de Cori es de solamente 10%, no fue posible determinar suficientes puntos intermedios, porque las diferencias entre ellos son del mismo orden que el error experimental del método de cuanteo del fosfato.

BIBLIOGRAFIA

1. The Enzymes 5, 179 (1961). Editado por P. D. Boyer, H. Lardy y K. Myrbäck. Academic Press. N. Y.
2. C. F. Cori y G. T. Cori, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 34, 702 (1936).
3. C. S. Hanes, Proc. Roy Soc. B 129, 174 (1940).
4. S. A. Barker, E. J. Bourne y S. Peat. J. Chem. Soc. 1705 (1949).
5. J. Bonner. Plant Biochemistry, 50, 1950. Academic Press, N. Y.
6. K. J. Laidler. Chemical Kinetics 62 y 69 (1950). McGraw Book Co. Inc. N. Y.
7. Biochemical Preparations 4, 63 (1955). John Wiley and Son, Inc. Londres.
8. G. H. Fiske y Y. Subbarow. J. Biol. Chem. 66, 375 (1925).
9. M. Dixon y E. C. Webb. Enzymes. Longmans and Green, 1953.
10. K. D. Gibson. Biochem. Biophys. Acta 10, 221 (1953).
11. V. Massey. Biochem. J. 53, 72 (1953).