

EFFECTOS DEL pH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA INACTIVACION DE UREASA POR ACIDO L-USNICO

por

B. CIFUENTES y C. VICENTE

Abstract. In a wide margin of both pH and temperature variation, the enzyme urease is inactivated by L-usnic acid for the alkaline pH, being this process independent of the temperature.

Resumen. En un amplio margen de variación del pH y la temperatura de incubación, el enzima ureasa es preferentemente inactivado por ácido L-úsico a pHs alcalinos en un proceso aparentemente independiente de la temperatura del sistema.

INTRODUCCIÓN

Se ha comprobado que, durante el proceso de inactivación de ureasa por ácido L-úsico, se forman enlaces L-alanil-L-usnato-L-prolil (VICENTE & al., 1974) que actúan como puentes de unión entre monómeros de peso molecular 16.000 (REITHEL & al., 1964) o alternativamente oligómeros de peso molecular 83.000 (SEKITA & MAMIYA, 1967) y el polímero nativo de peso molecular 480.000. El resultado de este proceso será la existencia de distintos polímeros cuyos pesos moleculares oscilan entre 500.0000 y 820.000, siempre inactivos.

El fenómeno es tal que se ha podido conseguir la formación de dichas uniones utilizando los aminoácidos libres en ausencia de estructura proteica. CLIMENT (1976) demuestra la formación de complejos L-alanil-L-usnato-L-prolil, con diversos grados de agregación, por incubación de ambos aminoácidos con ácido L-úsico. Tal complejo es disociable por hidrólisis ácida o por tratamiento con urea de 1 M, separando los aminoácidos liberados por cromatografía bidimensional en capa fina de celulosa MN 300. Es interesante resaltar que, mientras que el Rf de la L-prolina liberada del complejo no varía sustancialmente en relación al

Rf del aminoácido sin ningún tratamiento (0,49 y 0,50 respectivamente) el Rf de la L-alanina varía de una manera drástica (0,64 para el aminoácido liberado del complejo por acción de la urea, frente a 0,29 para el aminoácido no tratado). De estos datos podría deducirse que el enlace entre L-prolina y ácido L-úsnico sería de tipo covalente (WOOLFOLK & al., 1966), mientras que la unión entre la L-alanina y el inactivador podría ser un puente de hidrógeno.

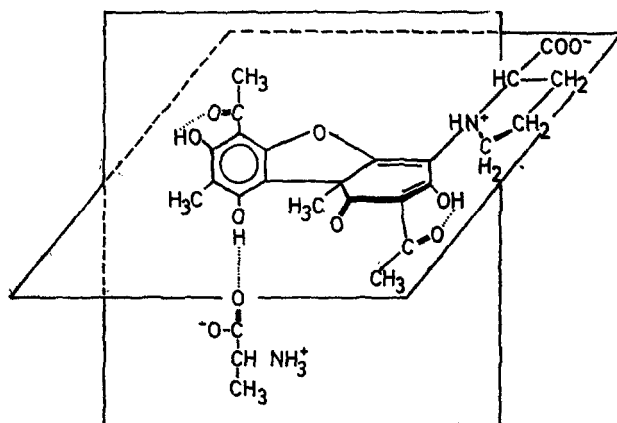


Fig. 1.—Estructura propuesta para el complejo L-alanil-L-uscinato-L-prolil.

En la figura 1 se muestra la estructura del complejo, según la hipótesis de Climent, entendiéndose que el enlace covalente sólo puede formarse con el carbono no sustituido del anillo B, especificado en la figura por analogía con otros tipos de enlaces covalentes entre aminoácidos y otros fenoles (BRIESKORN & MOSANDL, 1970), mientras que el puente de hidrógeno sólo podría formarse con el hidroxilo sustituyente en 5 del anillo A, dado que las demás posiciones estarían estabilizadas.

La formación de tales complejos se ve cuantitativamente favorecida por pHs alcalinos, de forma principal a pHs entre 8,3 y 8,5. En la figura 1 se han utilizado las formas iónicas favorecidas por tales pHs.

En el presente trabajo se trata de establecer si las condiciones de pH enunciadas se confirman para la estructura proteica.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente trabajo se ha utilizado ureasa cristalina, tipo III, de Sigma Chemical Co. La actividad ureásica ha sido valorada por el método de microdifusión de CONWAY (1957). Los pHs de las mezclas de incubación se lograron utilizando tampones citrato, para el intervalo 5,0 a 5,5; fosfato, entre 6,0 y 8,0; y tris-ClH, para el pH de 8,5, todos ellos 75 mM.

RESULTADOS

La dependencia que la actividad ureásica muestra del pH se representa en la figura 2. En ella se observa que el pH óptimo es neutro, mientras que los pHs ácidos o alcalinos disminuyen la actividad específica. En la misma gráfica se observa que una preincubación del enzima con ácido L-úsico durante cinco minutos inactiva parcialmente el enzima, siendo la inactivación tanto más acentuada cuanto más alcalino es el pH. La variación de la temperatura de preincubación, desde 4° a 50° C no altera los porcentajes de inactivación. Por ello, en un proceso simple de inactivación, se confirma exactamente la dependencia del pH alcalino demostrada para el complejo L-alanil-L-usnato-L-prolil en ausencia de estructura proteica.

Utilizando el polímero 820.000 de peso molecular, VICENTE & CIFUENTES (1979) demostraron que si la formación del polímero se lleva a cabo en presencia de L-cisteína, aquél no es completamente inactivo, pensándose en términos de una recuperación de actividad. Por esto se intentó demostrar si la presencia de L-cisteína en las mezclas de incubación modificaba o no el efecto del pH sobre el proceso de inactivación.

Los resultados obtenidos fueron más complejos de lo que se esperaba. En efecto, la L-cisteína no sólo altera el proceso de inactivación sino que también modifica la actividad del enzima sin tratar con el inactivador. En la figura 3 puede observarse que una preparación de ureasa, sin ningún tratamiento previo, va modificando su máximo de actividad como respuesta al tratamiento conjunto de temperatura y pH. Así, el máximo de actividad específica se va desplazando hacia los pH neutros conforme la temperatura de la preincubación aumenta de los 4° a los 37°. En presencia del inactivador, incluyendo L-cisteína en la mez-

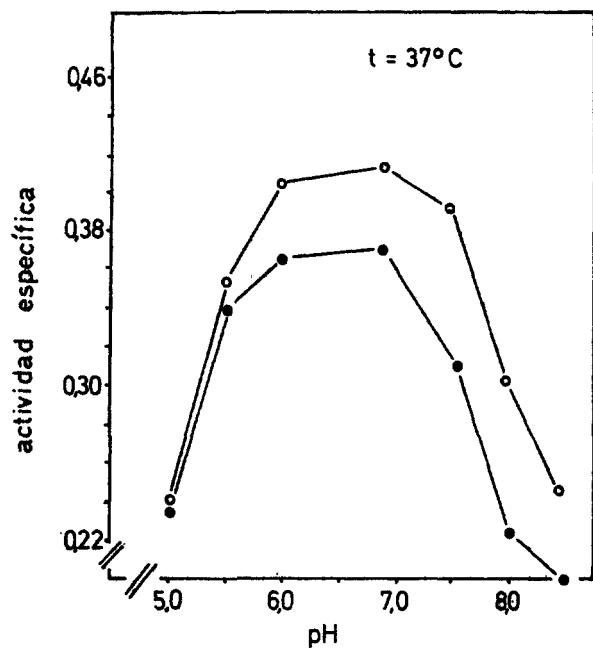


Fig. 2.—Influencia del pH, a temperatura constante, en la actividad ureásica (O) y en la inactivación de ureasa por ácido L-úsico (●). En un volumen final de 3,0 ml se preincuban 0,5 mg de ureasa a los distintos pHs, en presencia o ausencia de 85 μg de ácido L-úsico, durante cinco minutos, al cabo de los cuales se valora la actividad enzimática.

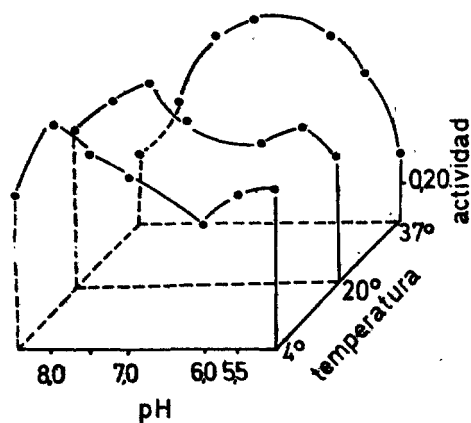


Fig. 3.—Influencia de la variación del pH y temperatura sobre la actividad de una muestra de 0,5 mg de ureasa en un volumen de 3,0 ml de los diferentes tampones, preincubada durante cinco minutos.

cla de incubación, se mantiene un máximo de retención de actividad a pH 6,0 para cualquiera de las temperaturas utilizadas, mientras que el grado de inactivación en la zona de los pHs alcalinos aparece muy atenuada, sin poder precisar un efecto particular de la temperatura (Fig. 4).

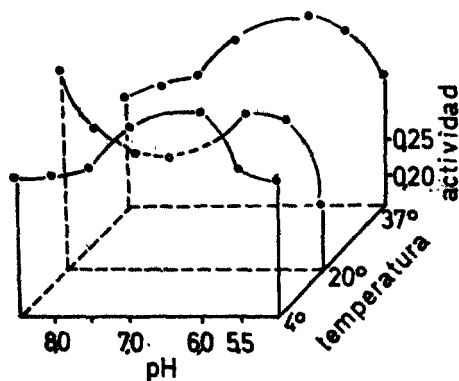


Fig. 4.—Influencia de la variación del pH y temperatura en la actividad ureásica de una mezcla que, en un volumen final de 8,0 ml, contiene 0,5 mg. de enzima, 35 μ g de ácido L-úsnico y 50 μ moles de L-cisteína, preincubada durante cinco minutos.

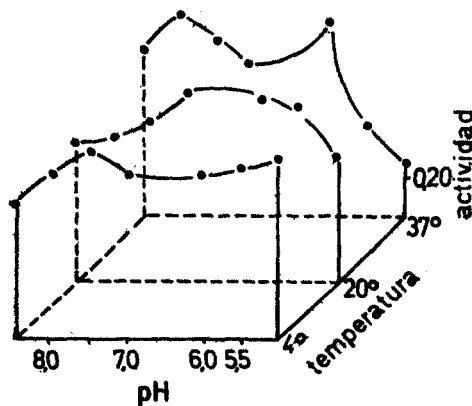


Fig. 5.—Influencia de la variación del pH y temperatura en la actividad ureásica de una mezcla, en un volumen de 8,0 ml, de 0,5 mg de enzima y 50 μ moles de L-cisteína, preincubada durante cinco minutos.

Si el grado de agregación de monómeros u oligómeros sobre el polímero activo, y consecuentemente el grado de inactivación, se ve favorecido por pHs alcalinos, el efecto aquí encontrado corroboraría el descrito por VICENTE & CIFUENTES (1979) sobre la recuperación de actividad por parte del polímero 820.000.

La L-cisteína, por sí misma, también muestra una estabilización del enzima en ausencia del inactivador, como se muestra en la figura 5. En ella se observa que las bajas actividades para pHs ácidos o alcalinos, para cualquier temperatura, son moderadamente revertidas por la presencia de L-cisteína.

DISCUSIÓN

El proceso de inactivación de ureasa por ácido L-úsnico implica, como se ha descrito previamente, estado de agregación entre oligómeros que conducen a un polímero cuyo peso molecular es muy superior al de la α -ureasa nativa, estimado en 480.000. Una inactivación trivial de este tipo se ha mostrado en la figura 2, encontrándose que los pHs alcalinos favorecen enormemente el proceso de inactivación. Tal dependencia parece mantenerse para diversas temperaturas, ya que esta variación, por sí misma, no manifiesta ninguna acción sobre el proceso de inactivación en márgenes que oscilan entre los 4° y los 50° C.

Tal afirmación puede ser hecha aun en contra de lo que, aparentemente, muestran las figuras 3, 4 y 5. De ellas podría deducirse que las bajas temperaturas protegen de la inactivación a los pHs alcalinos. Este efecto no es real. La realidad consiste en que el máximo de actividad para el enzima sin ningún tratamiento se desplaza hacia los pHs alcalinos: cuanto más baja sea la temperatura de incubación, como aparece en la figura 3. Comparando estos resultados con los valores obtenidos en presencia del inactivador en la figura 4, se concluiría que para estos pHs el grado de inactivación es máximo por comparación con la actividad real para cada una de las temperaturas ensayadas. Por tanto, los datos de agregación obtenidos en ausencia de estructura proteica son perfectamente extrapolables al proceso de agregación/inactivación del enzima.

BIBLIOGRAFÍA

- Brieskorn, C. A. & Mosandl, A. — 1970 — *Tetrahedron Letters*, 1: 109.
- Climent, M. — 1976 — Tesina de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Complutense. Inédita.
- Conway, E. J. — 1957 — *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error* — Crosby Lockwood, London.
- Reithel, F. J., Robbins, J. E. & Gorin, G. — 1964 — *Arch. Biochem. Biophys.*, 108: 409.
- Sekita, K. & Mamiya, G. — 1967 — *Proc. 7th Intern. Congr., Biochem., Abstract*, IV: 761, Tokyo.
- Vicente, C. & Cifuentes, B. — 1979 — *Plant Science Letters*. En prensa.
- Vicente, C., Guerra, H. & Valle, M. T. — 1974 — *Rev. Esp. Fisiol.*, 30: 1.
- Woolfolk, C. A., Shapiro, R. & Stadman, E. R. — 1966 — *Arch. Biochem. Biophys.*, 116: 177

Cátedra de Fisiología Vegetal
Facultad de Biología
Universidad Complutense
Madrid