

## Tesis de Posgrado

# Estudio de la almidón sintetasa de papa (UDP-glucosa-alfa-1-4 glucan-alfa-4-glucosiltransferasa)

Bryks, Rajzla

1962

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:**

Bryks, Rajzla. (1962). Estudio de la almidón sintetasa de papa (UDP-glucosa-alfa-1-4 glucan-alfa-4-glucosiltransferasa). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1116\\_Bryks.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1116_Bryks.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Bryks, Rajzla. "Estudio de la almidón sintetasa de papa (UDP-glucosa-alfa-1-4 glucan-alfa-4-glucosiltransferasa)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1962. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1116\\_Bryks.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1116_Bryks.pdf)

7. 20. 9  
FCEvH-BA.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

"ESTUDIO DE LA ALMIDON SINTETASA DE PAPA"

(UDP-glucosa- $\alpha$ -1-4 glucan- $\alpha$ -4-glucosiltransferasa)

RAJZLA BRYKS

Resumen presentado para optar al

Título de Doctor en Química

Orientación: Química Orgánica

Buenos Aires

1962

H. de Tassis 1110

Estudio de la almidón sintetasa de papa

## RESUMEN

Se estudió la enzima que cataliza la transferencia de la glucosa de los nucleótidos UDP-glucosa o ADP-glucosa al almidón o malto-oligosacáridos. La nueva unión que se forma es  $\alpha$ -1-4.

Dicha enzima se preparó a partir de tubérculos de la papa.

La actividad aumenta con la cantidad de complejo enzima-almidón y con el tiempo, aunque no en forma netamente lineal.

La  $K_m$  de la enzima respecto del UDP-glucosa resultó ser de  $3,8 \times 10^{-2}$  y se incorpora  $0,8 \mu\text{mol}$  de UDP-glucosa por miligrano de proteína por hora.

El pH óptimo de actividad de la enzima a  $37^\circ\text{C}$  fue de 8,2 usando buffer glicilglicina 0,5 M, EDTA 0,025 M, y entre 7,5 y 8,2 con buffer fosfato 0,5 M, EDTA 0,025 M.

Todos los intentos para separar la enzima del gránulo de almidón fracasaron.

Esta enzima se inactiva parcialmente por acción de la glucosa y la panosa, y totalmente por el p-cloro-mercuribenzoato.

Los malto-oligosacáridos inhiben competitivamente la incorporación de la glucosa del UDP-glucosa o ADP-glucosa al almidón. Estos oligosacáridos también actúan como sustratos. Los isomalto-oligosacáridos en cambio no tienen ningún efecto sobre la enzima ni pueden actuar como sustratos.

Los glucósidos fenólicos, lo mismo que sus agluconas inhiben apreciablemente la acción enzimática. No ocurre lo mismo con los metil-glucósidos. Ninguno de los glucósidos re-

sultó ser sustrato de la reacción.

Los nucleótidos adenílicos inhiben apreciablemente la reacción de síntesis de almidón o malto-oligosacáridos a partir del UDP-glucosa y bastante menos a partir de ADP-glucosa.

También se prepararon y estudiaron almidón sintetasas de otros vegetales, especialmente de la arveja arrugada y del maíz waxy. Se ha encontrado que en el caso de la enzima de este último los malto-oligosacáridos son sustratos mucho más efectivos que el almidón.

Se determinó que la incorporación de la glucosa del nucleótido-azúcar, se realiza tanto en la amilosa como en la amilopectina, aunque en mayor proporción en la primera.-

*Handwritten signature*

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

"ESTUDIO DE LA ALMIDON SINTETASA DE PAPA"

(UDP-glucosa- $\alpha$ -1-4 glucosiltransferasa)

RAJZLA BRYKS

Tesis presentada para optar al

Título de Doctor en Química

Orientación: Química Orgánica

Buenos Aires

1962

72600. 1110

A mis padres

Padrino de Tesis

DR. CARLOS E. CARDINI

## AGRADECIMIENTOS

Desco expresar mi agradecimiento al Dr. Carlos E. Cardini por su dirección, su constante interés y sus valiosos consejos.

Al Dr. Luis F. Leloir y demás miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas que han hecho posible la realización de este trabajo con sus interesantes sugerencias y su permanente ayuda.

A los Dres. E. Cabib, H. G. Pontis, J. M. Olavarría, I. D. Algranati y S. H. Goldenberg por sus valiosas críticas en la corrección del manuscrito.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme concedido una beca durante la realización de este trabajo.



## INTRODUCCION

Los hidratos de carbono son, cuantitativamente, los constituyentes más importantes de los vegetales, formando casi el 90% de la materia seca de la misma, ya sea como elementos estructurales (celulosa, hemicelulosa, etc.) o como reservas hidrocarbonadas (almidón, sacarosa).

Aunque la unidad básica universal de todos compuestos es, en su mayor parte la glucosa, ésta no existe prácticamente al estado libre. En la asimilación clorofiliana la glucosa se origina al estado fosforilado, se transporta al estado de sacarosa y se acumula en forma de este disacárido o de almidón.

En el caso de las hojas, la formación del almidón es transitoria y se origina en las horas de iluminación: probablemente la síntesis de glucosa sobrepase la capacidad de transporte y requiera esta acumulación; en la oscuridad desaparece y se moviliza como sacarosa a las demás partes del vegetal, para transformarse en algunos casos en almidón nuevamente en los tubérculos, como en la papa, en los cuales tiene un carácter de una reserva más permanente.

El almidón se encuentra en los vegetales al estado organizado, el gránulo. No se lo ha encontrado, hasta el momento, en forma disuelta. En algunos vegetales como el maíz, además al gránulo del almidón, existe en solución un polisacárido semejante al glucógeno, el fitoglucógeno.

El gránulo tiene características que parecen especiales para cumplir su función de reserva: es insoluble en agua y prácticamente anhidro, pudiendo acumularse dentro de la célula sin interferir ni intervenir mayormente, al parecer, en su metabolismo. En cierto sentido se asemeja a las grasas, que por su insolubilidad pueden acumularse también en grandes cantidades dentro de la célula.

A pesar de que el gránulo de almidón ha sido estudiado des-

de hace muchos años debido a la facilidad de poder observarse al microscopio y de su fácil aislamiento, su organización es poco conocida. Los productos que se originan al destruirlos: amilosa y amilopectina se conocen con bastante exactitud, pero, en qué forma están dentro del gránulo existen muchas teorías y muy pocos datos experimentales que arrojen luz sobre el problema.

Cada vegetal tiene un tipo de gránulo morfológicamente distinto; además el contenido en amilosa y amilopectina es característica de cada especie y depende de factores genéticos, pues pueden formarse variedades tales como el denominado "waxy" con casi sólo amilopectina y el "wrinkled" con casi sólo amilosa.

Si poco es conocida la estructura del gránulo, su metabolismo lo es aún menos. Las varias enzimas que son capaces de formar amilosa o amilopectina han sido aisladas en solución y, al parecer, no actúan sobre el gránulo de almidón más que muy lentamente. Si bien "in vitro" son capaces de originar almidón, en ningún caso se ha logrado obtener una estructura ni lejanamente parecida a la que existe en la célula. Si no se conoce cual es el mecanismo de formación, tampoco se sabe por qué en ciertos momentos comienza a disgregarse. In vitro la amilasa y fosforilasa parecen actuar muy poco sobre el gránulo entero y no se sabe si esto ocurre en la célula; no actúa más que en determinados momentos: así la papa, muy rica en fosforilasa, puede permanecer indefinidamente sin destruir el gránulo, salvo cuando comienza la germinación y con ella la movilización del almidón y su probable transformación en sacarosa, que es la forma de transporte de la glucosa más común en los vegetales.

El descubrimiento de un nuevo mecanismo de formación de uniones glucosídicas que utilizó UDP-glucosa en lugar de glucosa-1-P (1) llevó a estudiar su rol en los polisacáridos, encontrándose que intervienen en la formación del glucógeno (2),

callosa (3), celulosa (4). La búsqueda de un sistema similar en plantas que fuese capaz de sintetizar almidón llevó a demostrar que en el grano de almidón existe una enzima capaz de efectuar la transglucosidación alargando la cadena de amilosa y amilopectina (5,6). Esta enzima no se ha encontrado en solución en citoplasma como la fosforilasa.

Aún cuando se está lejos de resolver el problema de la formación del gránulo se tiene un primer indicio de uno de los mecanismos de agregación de la glucosa.

En este trabajo de Tesis se estudió este mecanismo en el gránulo de la papa y se hicieron diversas tratativas para estudiar el mecanismo de transglucosidación a través de inhibidores o activadores.

#### EL GRANULO DE ALMIDON

El almacenamiento del almidón en las plantas se produce, bajo la forma de gránulos, en la zona citoplasmática de la célula, más exactamente, en los amiloplastos.

Estos gránulos, sumergidos en agua, presentan un centro, denominado "hilum", alrededor del cual se disponen capas concéntricas. Las formas que puede tener el gránulo, lo mismo que su tamaño y disposición de las capas, varían de un vegetal a otro y son características para los almidones de distinto origen.

Los gránulos, observados con el microscopio de luz polarizante, presentan una birrefringencia (dan una cruz de interferencia), lo que hace suponer una estructura cristalina.

Los gránulos son insolubles en agua fría, si se rompen mecánicamente la capa exterior de los mismos, forman un gel; si en cambio, se sumergen en agua caliente, se hinchan presentando una estructura estratificada en forma de capas concéntricas.

Es interesante destacar que los gránulos, sumergidos en pentano (que no los hincha), no presentan la estructura con-

céntrica descrita (7) a pesar de tener este hidrocarburo igual índice de refracción que el agua. Esto plantea el interrogante si las capas existen naturalmente en el gránulo o se producen al sumergir el mismo en agua.

Una posibilidad es que esta disposición de las capas se deba a una deposición alternada del almidón de día y de noche, en el transcurso del crecimiento botánico del gránulo.

Composición química del gránulo - El almidón es una mezcla de dos polímeros naturales de elevado peso molecular, cuyo componente fundamental es un anhidrido de la D-glucosa.

Hasta el año 1940 se suponía que el almidón es químicamente homogéneo y de un peso molecular definido, pero trabajos posteriores demostraron, en cambio, que se trata de una mezcla de sustancias de distinta estructura y diferente peso molecular. Ya se había observado que el almidón podía separarse en dos fracciones de diferentes propiedades físicas y que fueron denominadas amilosa y amilopectina por Maquenne y Roux (8). Un adelanto muy grande en el estudio de los componentes del almidón lo constituyó la observación de Schoch (9) de que el butanol, al igual que otros alcoholes superiores, (10), precipita selectivamente a la amilosa, quedando la amilopectina en solución.

La existencia de dos componentes en el almidón es negada por algunos investigadores que sostienen que la amilosa y la amilopectina se producen durante la hidrólisis. Refutando esta hipótesis estaría el argumento, de origen metabólico, de la preexistencia de estas dos fracciones. Es bien conocido el hecho del crecimiento de los gránulos por aposición (11); esto significaría que las capas del gránulo se van depositando unas sobre otras a intervalos de tiempo irregulares y, como las cadenas existentes son de unión  $\alpha$  1-4, actuarían de sustrato para formar otras cadenas que se unirán en  $\alpha$  1-6, dando de esta manera lugar a una estructura ramificada.

Las investigaciones de Meyer (12) confirmaron los clásicos trabajos de Haworth (13) de que la amilosa consiste de macromo-

lécúlas lineales de  $\alpha$ -glucosas unidas a 1-4 y la amilopéctina de macromoléculas ramificadas de glucosas, que, aparte de las uniones ya mencionadas presentan uniones a 1-6 en los puntos de ramificación. La existencia de uniones a 1-3 en el almidón fue demostrada por Giri (14) y definitivamente confirmado por el aislamiento de nigerosa entre los productos de hidrólisis del almidón en condiciones en las que no pueden producirse reacciones secundarias (15,16).

Las macromoléculas del almidón están, probablemente, asociadas entre sí por puentes de hidrógeno, dando lugar a los gránulos (17) y el agua u otra sustancia de alta constante dieléctrica, que afecte la estabilidad de estos puentes hidrógeno dará lugar a la hinchazón del gránulo y a su gelatinización.

El descubrimiento de que el almidón contiene uniones sensibles a la oxidación (18,19) invalidaron muchos datos acerca de los pesos moleculares de la amilosa y amilopéctina; es evidente que éstos dependen de los métodos usados para aislar las distintas fracciones del almidón (ver Greenwood para una discusión exhaustiva del tema (20)). Los pesos moleculares de las fracciones de amilosa (21) y amilopéctina (22) varían con el origen del almidón. La longitud de una cadena ramificada (23) ha sido calculada en 21 unidades glucosa (promedio); las ramificaciones exteriores son siempre más largas que las interiores y están probablemente paralelas entre sí.

Entre las reacciones usadas para distinguir las moléculas lineales y ramificadas cabe destacar las coloraciones diferenciales que ambas macromoléculas dan con el yodo (amilosa: azul y la amilopéctina: violáceo).

Freudenberg (24) emitió la teoría que el color azul es debido a la configuración helicoidal de las moléculas de amilosa. Esta teoría, confirmada luego por numerosos trabajos (25,26) es hoy generalmente aceptada.

A pesar de ser la glucosa la unidad fundamental en la composición química del gránulo de almidón, existen otros carbohidratos en el mismo. Whelan y Roberts (27) encontraron fructosa en el almidón de maíz.

Merecen mencionarse los componentes del gránulo que no son hidratos de carbono y que son casi siempre: fósforo, ácidos grasos y proteínas. Schoch (28) demostró que ácidos grasos pueden ser extraídos del almidón sin degradación hidrolítica del mismo, con solventes acuosos del tipo del metanol y dioxano. Lehman (29) sostiene que los ácidos grasos están adsorbidos al almidón, pero según Mikus (30) los mismos están contenidos en la hélice de la amilosa, formando un complejo con la misma.

El fósforo existe en el gránulo en dos formas, una extraíble por solventes junto con los lípidos y otra que no se puede extraer. Esta última forma es típica para el fósforo del almidón de papa; y constituye el 0,09% del mismo. Probablemente está esterificado con el carbohidrato en la posición 6 de la glucosa, como lo indicaría el aislamiento de glucosa-6-P y maltotetraosa-6-P (31,32) entre los productos de hidrólisis del almidón de papa.

Las proteínas presentes dentro del gránulo del almidón están formando complejos con las moléculas ramificadas del mismo (33). En el caso del almidón de semillas de flavea lo mismo que en el almidón de trigo, las proteínas se hallan adsorbidas en la superficie del gránulo (34,35).

La presencia de proteínas no extraíbles en el gránulo se explica muy bien con la presencia dentro del mismo de enzimas que tienen alguna función en la biosíntesis del almidón (como en nuestro caso).

#### MECANISMO DE FORMACION DE UNIONES GLUCOSIDICAS

Los monosacáridos libres parecen tener poca importancia como metabolitos dentro de la célula viva, en cambio estos

compuestos fosforilados son los que las células utilizan para sus reacciones sintéticas, y es justamente al estado combinado como se encuentran generalmente en la naturaleza.

En las síntesis que involucran uniones glucosídicas, estas se producen a través del C<sup>1</sup> activado del azúcar. El método de activación puede ser químico o biológico. En el primero, la activación se produce por la combinación del C<sup>1</sup> con un halógeno como ser el bromo  $-\overset{\overset{1}{\text{C}}}{\text{Br}}$  (bromo derivados), y en el segundo por la unión del C<sup>1</sup> a un grupo P o PP. Esta última es la forma de activación que adopta la Naturaleza y de ahí la importancia de estos compuestos en la biosíntesis de los productos naturales y especialmente en la formación de sustancias con uniones glucosídicas.

Es justamente el descubrimiento de estas sustancias y su función en el metabolismo de los hidratos de carbono lo que marca una nueva etapa en el estudio de la formación de estos compuestos.

Los primeros trabajos sobre la síntesis enzimática de sacáridos datan del año 1898, en que Croft Hill (36) obtuvo un disacárido a partir de glucosa y la maltasa de levadura.

Posteriormente, y ya entrando en la etapa que podríamos denominar de los sustratos fosforilados, tenemos la síntesis enzimática del glucógeno a partir de glucosa-1-P (37), la formación de sacarosa a partir de glucosa-1-P y fructosa (38), siguiendo toda una serie de síntesis de sustancias glucosiladas a partir de compuestos fosforilados.

Un hecho de gran trascendencia en la dilucidación del mecanismo de formación de los hidratos de carbono en la naturaleza, lo constituyó el descubrimiento del UDP-glucosa (39) y otros nucleótido-azúcares y su función en la biosíntesis de polisacáridos (Leloir, Hassid, Glaser y otros), glucósidos (Cardini y col.) y sacáridos en general.

En el caso de estos ésteres pirofosfóricos la activación del  $C_1$  del azúcar es mayor que en el caso de los fosfóricos y además, las reacciones de síntesis en los que intervienen son, por lo general, irreversibles, a diferencia de lo que ocurre con los ésteres fosfóricos.

Con la ayuda de estos ésteres pirofosfóricos, se logró sintetizar enzimáticamente el glucógeno, la callosa, glucanos, otros poli y oligosacáridos y también el almidón (40,41). Es por lo tanto probable, que otros polisacáridos naturales como lo son el xilano, galactano, arabano y también otros polisacáridos constituidos por dos o más azúcares, se sintetizen enzimáticamente a partir de los nucleótido-azúcares.

#### MECANISMO DE ACCION DE LAS ENZIMAS SOLUBLES DE LA PAPA QUE INTERVIENEN EN EL METABOLISMO DEL ALMIDON

Junto con la celulosa y la sacarosa, el almidón es el más típico de los carbohidratos de las plantas superiores y existe siempre en la forma de gránulos organizados. Su síntesis y degradación ha sido estudiada en sistemas solubles y nunca, hasta el descubrimiento de la almidón sintetasa de la chaucha (Fetke y col., Leloir y col.) en el gránulo entero.

Su formación (en sistemas solubles) a partir del glucosa-1-P depende principalmente de dos enzimas: la fosforilasa y la enzima-Q cuya función específica y mecanismo de acción describiremos a continuación, lo mismo que el de las otras enzimas solubles que intervienen en el metabolismo del almidón.

Fosforilasa - La fosforilasa es una de las enzimas de mayor difusión en el reino vegetal, siendo la más estudiada la de papa. Fue aislada de dicho tubérculo por primera vez por Hanes (42) y cristalizada por Baum y Gilbert (43). Cataliza la síntesis y degradación de la amilosa. En el primer caso transfiere unidades glucosídicas de la  $\alpha$ -D-glucopiranososa-1-P a una cadena de unidades  $\alpha$ -1-4 glucopiranososa. La unión se hace por



el extremo no reductor de dicha cadena. En el segundo caso o sea en la degradación, rompe las uniones  $\alpha$ -1-4 de la cadena glucosídica, a partir del extremo no reductor formando glucosa-1-P y  $(\alpha$  1-4 glucosa)<sub>n-1</sub>.

Ahora, el hecho de que la fosforilasa catalice una u otra de las reacciones arriba mencionadas depende de la relación  $P_i$ /glucosa-1-P.

Los estudios del comportamiento de esta enzima llevaron a establecer que necesita, para actuar, la presencia de un aceptor que tenga como mínimo 3 unidades glucosídicas unidas según  $\alpha$  1-4. Aceptores mucho más efectivos son sin embargo los malto-oligosacáridos superiores (44).

Las enzimas-Q y  $\alpha$ -amilasa incrementan su acción pues aumentan los extremos reductores. La  $\alpha$ -amilasa y las dextrinas de Schardinger por lo contrario la inhiben. La fosforilasa de papa es inhibida por las sustancias que oxidan grupos SH o se combinan con ellos (45).

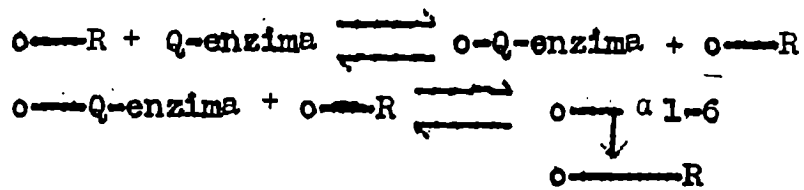
En el gránulo de almidón de papa, esta enzima se encuentra en muy pequeña proporción, inactivándose totalmente al lavar los gránulos con acetona a  $-15^{\circ}\text{C}$ .

El pH óptimo de la fosforilasa de origen vegetal oscila entre 5,9 y 6,1.

La dificultad de considerar esta enzima como la responsable de la síntesis de la amilosa ya fue señalada por Ewart y col. (46). Su función en el metabolismo del almidón parece ser más bien degradativa.

Q-enzima - Esta enzima ( $\alpha$ -glucan branching glucosil transferasa) interviene en la formación de la amilopectina, y fue aislada de la papa por Peat y col. (47,48).

Cataliza el desdoblamiento de una cadena del tipo de la amilosa (40 unidades glucosa como mínimo) en dos sustratos y transfiere el sustrato con el extremo reductor al aceptor, formando una unión  $\alpha$  1-6.

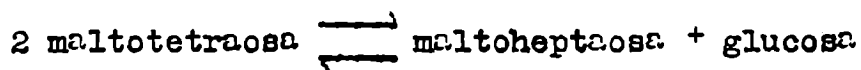


Peat y Larner (49,50) encontraron que, en presencia de oligosacáridos del tipo de la  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$ , iso $M_3$ , panosa, la Q-enzima de origen vegetal no actúa.

Esta enzima es activada por aniones como fosfato, citrato, sulfato de amonio, acetato e inhibida por el borato y el cloruro de magnesio.

No fue hallada en el gránulo de almidón. El pH óptimo de la enzima-Q de la papa es de 7 a 20°C.

D-enzima - Fue encontrada por primera vez en la papa por Peat y col. (51). Pertenece a la serie de las glucosil transferasas; transfiere segmentos de cadenas glucosídicas unidas según  $\alpha 1-4$  (la menor de las cuales puede ser  $M_3$ ) a la glucosa  $\alpha$ , maltosa, glucósidos u otras cadenas glucosídicas con uniones  $\alpha 1-4$  (52). La maltosa y la glucosa no son glucosil dadores. Un ejemplo típico de una reacción catalizada por la D-enzima es:



La acción de esta enzima da otra posibilidad para la síntesis de polisacáridos del tipo del almidón siempre que se agregue un sistema que elimine la glucosa formada; este sistema podría constituirlo el ATP más hexoquinasa.

La D-enzima no se ha hallado en el gránulo de almidón de papa. Su pH óptimo es 6,7.

T-enzima - Transfiere unidades glucosídicas de una cadena con uniones  $\alpha 1-4$  a malto-oligosacáridos mediante una unión  $\alpha 1-6$  (ecuación 1). Además transfiere unidades glucosídicas de cadenas  $\alpha 1-6$  a otras con las mismas uniones sin variar la misma (ecuaciones 2, 3 y 4). Estas últimas reacciones son reversibles, no así la (1):

- 1) 2 Maltosa  $\longrightarrow$  Glucosa + Panosa ( $\alpha$  glucosil 1-6  $\alpha$  - glucopiranosil-1-4  $\alpha$  -D-glucopirano sa)
- 2) 2 Panosa  $\rightleftharpoons$  6<sup>2</sup>- $\alpha$ -isomaltosil maltosa + glucosa
- 3) 2 Isomaltosa  $\rightleftharpoons$  Isomaltotriosa + glucosa
- 4) 2 Isomaltotriosa  $\rightleftharpoons$  Isomaltotetraosa + isomaltosa

Fue encontrada por primera vez en el Bacillus macerans por Norberg y French (53). Whelan y col. (54) han descrito el aislamiento de la misma enzima de la papa.

Es una enzima extra granular y su función en el metabolismo del almidón es desconocida hasta el momento.

R-enzima - Es una  $\alpha$  1-6 glucosidasa, y fue aislada de la papa y del broad bean (55). Hidroliza las uniones  $\alpha$ 1-6 de la amilopectina (no actúa sobre el glucógeno). La cadena de longitud mínima que puede actuar como sustrato de aquella que tiene como cadena lateral una maltopentosa unida por una unión  $\alpha$  1-6, a otra maltotriosa (56).

Fue aislada de la papa y del broad bean. El pH óptimo de esta enzima oscila entre 5,3 y 6 (57).

Z-enzima - Es una enzima que fue aislada por Peat y col. (58) del soy bean. Se trata de una  $\beta$ -glucosidasa que rompe las uniones  $\beta$ -glucosídicas que se hallan en pequeña proporción en la amilosa (59).

El pH óptimo de la acción de la Z-enzima sobre la amilosa es 6.

P A R T E   E X P E R I M E N T A L

TECNICAS GENERALES

Las técnicas usadas en la identificación de los productos de las reacciones fueron, por lo general, cromatografía y electroforesis en papel.

Para los cromatogramas se usó papel Whatman 1 y 4, en algunos casos en que se empleó otro papel, éste se especificó. El lavado de los papeles se hizo con ácido acético 1% y abundante agua. Los tiempos de corrida variaron entre 18 y 68 horas. Las mismas se hicieron según técnica descendente; el solvente usado fue, en casi todos los casos butanol:piridina:agua en la proporción de 6:4:3 respectivamente. Los otros solventes empleados fueron: propanol:acetato de etilo:agua (6:1:3), acetato de etilo:piridina:agua (10:4:3) y etanol:acetato de amonio 1 M (7:5:3) pH 3,8.

Los revelados de los cromatogramas se hicieron, en el caso de los azúcares y glucósidos, usando una solución acetónica de  $\text{NO}_3\text{Ag}$  e  $\text{OHNa}$  0,5 N en etanol (60).

En la electroforesis se empleó papel Whatman 1, el buffer empleado fue borato de potasio 0,05 M, pH 9,2; el tiempo de corrida fue de dos horas y la tensión aplicada de 800 volts (largo de papel 45 cm.).

Para las deionizaciones se empleó una mezcla de resina aniónica y catiónica, intercambiadora de iones (Amberlita en forma de acetato). Las columnitas usadas eran de 0,5 cm de diámetro x 5 cm. de longitud.

---

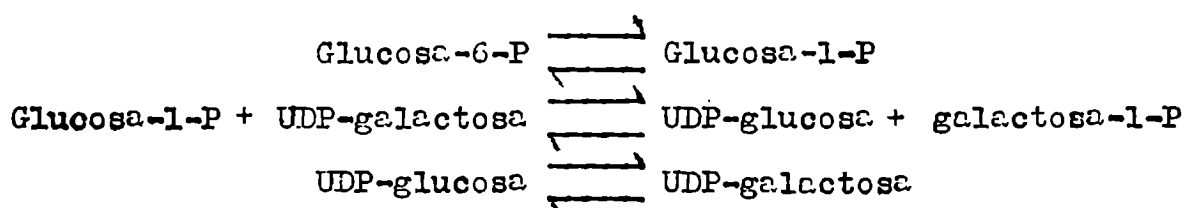
Abreviaturas usadas: P, fosfato;  $\text{P}_i$ , fosfato inorgánico; ADP, adenosina difosfato; AMP, adenosina monofosfato; ATP, adenosina trifosfato; CDP, citidina difosfato; GDP, guanosina difosfato; UDP, uridina difosfato; UTP, uridina trifosfato; EDTA, etilenedianina-tetraacetato; PP, pirofosfato;  $\text{M}_2$ , maltosa;  $\text{M}_3$ , maltotriosa;  $\text{M}_4$ , maltotetraosa;  $\text{M}_5$ , maltopentaosa;  $\text{M}_6$ , maltohexosa;  $\text{M}_7$ , maltoheptosa;  $\text{M}_8$ , malto-octosa.

### PREPARACION DE LOS SUSTRATOS

UDP-glucosa - Se prepara según el método de Pontis y col. (61) autolizando levadura con tolueno tibio (36°C). La mezcla se incubó 40 minutos a 37°C después de lo cual se agregó etanol 95% y se calentó con agitación hasta ebullición; se dejó una noche en la heladera, se filtró a través de celita y se ajustó el pH a 7. El extracto así obtenido se cromatografió en una columna de Dowex-1-X4 (200-400 mesh), forma cloruro. La elución se hizo con un gradiente de ClNa 0,02 a 0,1 N en un medio ácido (ClH 0,01 N).

Los picos de extinción obtenidos se llevaron a pH 6,5 y se concentraron en columnas de carbón celita, las cuales se lavaron posteriormente con EDTA 0,01 M pH 7 para facilitar la posterior elución de los nucleótidos con etanol 50%. El pico correspondiente al UDP-glucosa se eluyó, se concentró y se purificó por cromatografía en papel.

UDP-glucosa-C<sup>14</sup> - La obtención del UDP-glucosa-C<sup>14</sup> se hizo por el método enzimático basándose en las siguientes transformaciones catalizadas por un extracto bruto de Saccharomyces fragilis (62,63);



Como el extracto crudo de Saccharomyces fragilis contiene fosfoglucomutasa la preparación del UDP-glucosa-C<sup>14</sup> puede hacerse partiendo de la glucosa-6-P-C<sup>14</sup>. Este compuesto se obtiene incubando glucosa uniformemente marcada con ATP y hexoquinasa.

El Saccharomyces se cultivó en superficie en agar, extracto de levadura con 2% de lactosa (64). Se cosechó la levadura, se secó al aire y se extrajo con una solución de fosfato diamónico 2,2% (1 parte de levadura y 3 partes de fosfato diamónico); se dejó una hora a temperatura ambiente y una

noche en la heladera, se centrifugó a alta velocidad y en el sobrenadante se encuentran las enzimas que catalizan las reacciones arriba detalladas.

El extracto de Saccharomyces fragilis así obtenido se incubó con UDP-glucosa, glucosa-6-P-C<sup>14</sup> y glucosa-1,6-diP durante 30 minutos a 37°C, se detuvo la reacción por el agregado de ácido tricloroacético 7% concentración final a 0°C, el precipitado se volvió a lavar con el mismo ácido. Los sobrenadantes se lavaron con éter sulfúrico hasta extraer totalmente el ácido, se ajustó el pH a 6 y se agregó etanol hasta llevar la solución a 50% de concentración final; se dejó una noche en la heladera y el sobrenadante se concentró y purificó por cromatografía (Papel usado: Whatman 17, solvente: etanol:acetato de amonio, pH 3,8).

Otros nucleótidos - El UDP-glucurónico fue una muestra comercial de los laboratorios Pabst (U.S.A.).

El ADP-glucosa, ADP-glucosa-C<sup>14</sup>, ADP-galactosa, UDP-galactosa, CDP-glucosa, gentilmente cedidos por el Dr. E. Recondo, fueron preparados modificando en parte las técnicas desarrolladas por Khorana (65,66).

Malto-oligosacáridos - Los malto-oligosacáridos se obtuvieron por hidrólisis de la amilosa (67) y se separaron en una columna de carbón-celita (68). Los detalles de la técnica se mencionan a continuación: 2 g. de amilosa se hidrolizaron a 100°C con ácido sulfúrico 0,4 N (800 ml.) durante una hora, el hidrolizado se neutralizó con (OH)<sub>2</sub>Ba, se filtró y concentró; el concentrado se adsorbió sobre una columna de carbón-celita (de 30x5,17 cm.). Esta columna se preparó mezclando cantidades iguales de carbón Darco-60 y celita (high flow super cell) que fue previamente suspendida en agua y sedimentada 15 minutos para eliminar las partículas muy finas. La columna se eluyó con gradiente de alcohol-agua, las fracciones se dosaron por el método del fenol-sulfúrico (69).

Los picos correspondientes fueron identificados por cromatografía en papel.

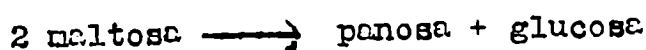
Isonalto-oligosacáridos - Los isonalto-oligosacáridos (oligosacáridos de la serie  $\alpha$  1-6 de la glucosa) se obtuvieron por hidrólisis del dextrano; la técnica empleada fue muy semejante a la detallada para los malto-oligosacáridos. La identificación de los oligosacáridos de los picos eluidos se hizo por cromatografía y electroforesis según técnicas ya descriptas.

Malto-oligosacáridos- $C^{14}$  - Los malto-oligosacáridos marcados con  $C^{14}$  en la glucosa se obtuvieron por incubación de la D-enzima con glucosa- $C^{14}$  y almidón soluble (70) (ver: acción de la D-enzima).

La D-enzima se preparó según el método de Peat y col. (67): se desintegraron papas peladas en una licuadora, el licuado se mezcló con carbón (300 g. papa-10 g. carbón) y se filtró. Al jugo filtrado se le agregó  $SO_4Cu$  (1 g./540 ml. de líquido) y una solución de  $SO_4(NH_4)_2$  pH 7 hasta llevar la solución a 23% de concentración en sal amónica, se dejó 24 horas a  $2^\circ C$ , el precipitado se separó por centrifugación y se redisolvió en buffer citrato 0,01 M pH 7. Estos procedimientos se repitieron 3 veces haciéndose la redisolución final en citrato 0,2 M. La enzima así obtenida estaba libre de las enzimas  $\alpha$  y fosforilasa, y es la que se incubó con glucosa- $C^{14}$  y almidón soluble durante 17 horas en atmósfera de tolueno. La reacción se paró por calor y las maltodextrinas formadas se adsorbieron sobre una columna de carbón-celita y se eluyeron con etanol:agua (1:1), los eluidos se concentraron a presión reducida y se separaron por cromatografía en papel lavado (Whatman N° 3MM; solvente: propanol:acetato de etilo:agua).

Obtención de la panosa (O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1-6)-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1-4)-3-D-glucopiranosid) - La obtención de

la panosa a partir de la maltosa y un extracto de papa se basa en que dicho extracto contiene una transglucosidasa, la T-enzima (54), que cataliza la siguiente reacción:



Como enzima se utiliza un extracto bruto de papa, el que se obtuvo en la forma que se detalla a continuación: se cortaron papas peladas y se dejaron 15 minutos en una solución de hidrosulfito 7%, se rallaron, pasaron por una muselina y centrifugaron a 25.000 x g; el sobrenadante, dializado contra agua:glutación (unos mg. en 4 litros de agua) se utilizó como enzima.

La preparación de la panosa se realizó en la forma detallada a continuación: 1 ml. de extracto de papa (20 mg. de proteína/ml.), 1 ml. de maltosa al 20% y 0,5 ml. de buffer pH 6 se incubaron 2 días a temperatura ambiente y en atmósfera de tolueno; la reacción se detuvo por calor y la mezcla incubada se deionizó, se concentró y cromatografió en papel Whatman N° 1 lavado; solvente usado: acetato de etilo:piridina:agua (71). La panosa ( $R_{\text{glucosa}}: 0,20$ ) se separa bien de la maltosa ( $R_{\text{glucosa}}: 0,59$ ) y de los oligosacáridos:  $M_3$  ( $R_{\text{glucosa}}: 0,39$ ) y  $M_4$  ( $R_{\text{glucosa}}: 0,25$ ).

$\beta$ -glucósidos - Los glucósidos empleados fueron, en parte, productos comerciales y en parte, preparados por fusión de los monofenoles con glucosa pentaacetilada en presencia del ácido p-toluensulfónico (72). En algunos casos se empleó el método de Zémplen (73) modificado por Robertson (74). La condensación del O-tetraacetyl-bromoglucósido y el O-amino-benzoil-fenol se hizo en presencia de  $OAg_2$  y quinolina anhidra.

Los  $\beta$ -glucósidos así obtenidos se desacetilaron con metilato de sodio o con metanol anhidro y  $NH_3$  gaseoso (74), la identificación de los productos se hizo por cromatografía y punto de fusión.

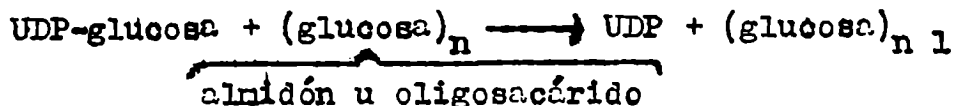
Las agluconas utilizadas fueron productos comerciales.

La arbutina- $C^{14}$  fue gentilmente cedida por el Dr. Juan C. Trivelloni.



### VALORACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Para estudiar la reacción enzimática pueden utilizarse varios métodos. Si se tiene en cuenta la ecuación de la misma:

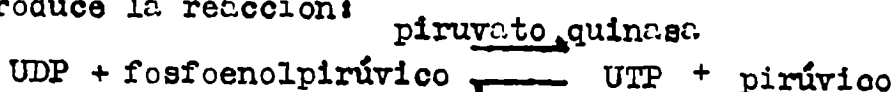


se puede seguir la reacción por desaparición de UDP-glucosa, por la formación de UDP o por el aumento de la glucosa incorporada al polisacárido.

Cualquiera de los métodos arriba mencionados, es utilizable, dado que en el grano de almidón, no parecen existir enzimas que destruyan al UDP-glucosa o UDP, ni hidrolicen al almidón o a los oligosacáridos en grado apreciable durante el tiempo y las condiciones de incubación.

Los métodos elegidos fueron: la valoración de UDP y la incorporación de la glucosa en el polisacárido, cuando se usa UDP-glucosa-C<sup>14</sup>. Los resultados de ambos métodos, son comparables (ver resultados).

La valoración del UDP se hace según el método descrito por Cabib y Leloir (75) modificado (76). Se basa en agregar al sistema fosfoenolpirúvico y piruvato quinasa, con los que se produce la reacción:



El pirúvico formado se dosa con dinitrofenil hidrazina. La mezcla de incubación tipo contiene: 4 mg. de grano de almidón, 0,25 mol de UDP-glucosa, 3,3 moles de glicina y 0,082 moles de EDTA pH 8,6. Volumen final 0,013 ml., tiempo de incubación 180 minutos, temperatura 37°C. Se prepara un blanco con los mismos reactivos, pero omitiendo el UDP-glucosa. Al finalizar la incubación se agrega el UDP-glucosa al blanco y se lleva el volumen a 0,05 ml. con agua. Luego se agrega 0,025 ml. de una solución de fosfoenol pirúvico 0,01 M en CLK 0,4 M y 0,025 ml. de pirúvico quinasa diluida con SO<sub>4</sub>Mg 0,1 M según se determinó en ensayos previos.

Se incubó 15 minutos a 37°C y se valoró el pirúvico formado con 0,15 ml. de una solución de 2-4 dinitrofenil hidracina (1% en ClH 2 N). Después de esperar 5 minutos se añaden 0,2 ml. de OHNa 10 N y 1,1 ml. de etanol 96%. La intensidad del color desarrollado se mide en un espectrofotómetro Coleman a 520 m .

#### VALORACION DE LA GLUCOSA INCORPORADA.

En el almidón - La valoración química es poco factible en el caso del almidón, dada la gran cantidad de aceptor que existe en el gránulo en comparación con la glucosa que se incorpora. El uso del UDP-glucosa-C<sup>14</sup> en cambio, hace la determinación sumamente fácil dado que el grano de almidón es insoluble y puede separarse por centrifugación; y por simple lavado con etanol 50% se elimina todo el UDP-glucosa-C<sup>14</sup> no utilizado.

La técnica utilizada es la siguiente: al finalizar la incubación se agregó a la mezcla 0,5 ml. de etanol 50%, se suspendió el almidón y se centrifugó. Se separó el sobrenadante y el precipitado se lavó 6 veces en idénticas condiciones; finalmente se resuspendió en 0,05 ml. de agua, se colocó sobre plaquitas de aluminio, se secó y midió la radioactividad en un contador a flujo (marca Tracerlab).

En los oligosacáridos - Los oligosacáridos son solubles en agua, y se recuperan totalmente después del pasaje por resinas. Por estas razones se juntaron los líquidos de lavado de los gránulos de almidón y se pasaron varias veces por una columna de resina mixta de Amberlita. El eluido se concentró y evaporó en chapitas de acero o vidrio. Se midió la radioactividad y luego de retomadas en agua se cromatografiaron. También pueden cromatografiarse directamente.

Al mismo tiempo se corrieron oligosacáridos conocidos que fueron revelados.

La medición de la radioactividad se hizo directamente sobre el papel con un registrador automático de radioactividad (Nuclear Chicago modelo D-47 gas flow counter, adicionado a un C-100 Actigraph II, abertura 1/2"), cortándolo en tiritas de 1x2 cu. que se contaron en el contador de flujo o bien se eluyeron y contaron sobre plaquitas.

Los dos métodos en los que se cuenta el papel directamente dan el 30% de aquel en que se eluye la mancha radioactiva.

#### DETERMINACION DE FOSFORILASA

Se utilizó el método de Green y Stumpf (77). El sistema completo contenía: 4 mg. de gránulo de almidón o 0,020 ml. de una suspensión de los mismos, 2,86  $\mu$ moles de citrato pH 6,1 y 0,5  $\mu$ mol de glucosa-1-P. El volumen final fue de 0,04 ml. Se incubó 180 minutos a 37°C. El fósforo inorgánico se dosó por el método de Fiske-Subbarow (78).

#### DETERMINACION DE PROTEINAS

Las proteínas del complejo almidón-enzima se determinaron por el método de Lowry (79) con la siguiente variante: El almidón se suspendió en agua (0,1 ml. de agua/mg. de almidón), se calentó 10 minutos a 100°C, valorándose luego las proteínas.

#### INCUBACION CON $\beta$ -AMILASA

Para el tratamiento del almidón radioactivo con la  $\beta$ -amilasa, se suspendieron 5 mg. de almidón- $C^{14}$  en 0,2 ml. de agua, se agregaron 0,02 ml. de una solución de la enzima (10 mg. enzima/ml.) y 0,01 ml. de formiato de amonio 0,4 M pH 6,2. La incubación se hizo en atmósfera de tolueno durante 20 horas a 37°C. La reacción se paró con 1,6 ml. de metanol y se hicieron 4 lavados más del insoluble con metanol:agua 3:1 (0,3 ml. cada vez); se juntó el sobrenadante con los líquidos de lavado, se evaporó en chapitas de acero, se midió la radioactividad cromatografiándose posteriormente.

## SEPARACION DE LOS COMPONENTES DEL ALMIDON

La separación de ambos componentes del almidón en forma cuantitativa no es un problema resuelto completamente, pero las técnicas que se describen a continuación permiten una separación bastante satisfactoria y reproducible. El problema más difícil es conseguir una solubilización completa del gránulo.

La separación de los componentes del almidón- $C^{14}$  se hizo según el método de Cowie y Greenwood (80) que se basa en el descubrimiento de Schoch (28) de que ciertos alcoholes como el butanol o el timol son capaces formar complejos de asociación insolubles con la molécula lineal de amilosa. El complejo formado puede separarse por centrifugación. 4 mg. de almidón- $C^{14}$  se lavaron con 1 ml. de metanol caliente (3 veces) para desengrasar los gránulos, se suspendieron luego en 1 ml. de agua y se homogeneizaron en un homogeneizador de vidrio muy pequeño y bien ajustado. Quedó un pequeño residuo que se separa por centrifugación y que no tiene radioactividad. Al líquido se le agrega 0,01 ml. de una solución de timol en etanol (100 mg./ml.) y se deja 3 días a temperatura ambiente. En estos 3 días se forma un precipitado (fracción amilósica) que se separa por centrifugación del sobrenadante (amilopectina). En cada una de estas fracciones se determinó la actividad específica.

Otro método utilizado para la separación de los componentes del almidón- $C^{12}$  fue el de Montgomery y Senti (81): 15 mg. de almidón se digirieron en 0,3 ml. de glicerol 70% en peso, previo pasaje de una corriente de  $N_2$ . Se calentó elevando lentamente la temperatura, en el intervalo de una hora de 30 a 89°C, dejándolo una hora a esta temperatura, agregándose luego 4 volúmenes de etanol 96%, el precipitado se separó por centrifugación, y se resuspendió en 0,75 ml. de agua a 98°C y 0,01

ml. de buffer  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  (5 mg./ml.) a  $98^\circ\text{C}$  y se agitó mecánicamente durante 15 minutos manteniendo la temperatura a  $70^\circ$ , se enfrió rápidamente y se centrifugó 30 minutos a 25.000xg. Este procedimiento se repitió 2 veces. La fracción amilósica se halló en los sobrenadantes mientras que la amilopectina lo fue en el precipitado. Ambas fracciones se dosaron por el método del fenol-sulfúrico.

## R E S U L T A D O S

### PREPARACION Y PROPIEDADES DE LA ENZIMA

Aislamiento del complejo "amilidón-enzima" - En un rallador de vidrio se rallaron tubérculos jóvenes y frescos de papa; al preparado así obtenido se le agregó mercaptoetanol (0,1 ml. por cada 25 ml.); la suspensión se filtró a través de una muselina y el filtrado opalescente se centrifugó 10 minutos a  $0^\circ\text{C}$  y 1.000 rev./minuto. Se decantó el sobrenadante y el amilidón así obtenido se lavó suspendiéndolo en agua a  $0^\circ\text{C}$  y se centrifugó a 1.200 rev./minuto; esta operación se repitió tres veces. El precipitado se lavó con acetona a  $-15^\circ\text{C}$  y se centrifugó 3 minutos a  $-5^\circ\text{C}$  y a 1.500 rev./minuto. El polvo acetónico así obtenido se secó en desecador al vacío sobre  $\text{OHNa}$ ; la enzima se guardó en la congeladora sobre  $\text{Et}_2\text{Ca}$ .

Propiedades de la enzima - La preparación enzimática seca se guardó durante dos años a  $-15^\circ\text{C}$  sin que perdiera nada de su actividad; tampoco hubo disminución de la actividad cuando se dejó la enzima varias horas a temperatura ambiente.

La ruptura mecánica de los gránulos del amilidón en seco o suspendidos en una solución de buffer, dió lugar a una pérdida total de actividad.

La actividad enzimática aumenta con la cantidad del complejo "amilidón-enzima", aunque no en forma totalmente lineal (Fig. 1), también aumenta con el tiempo a  $37^\circ\text{C}$  según puede

verse en la Fig. 2.

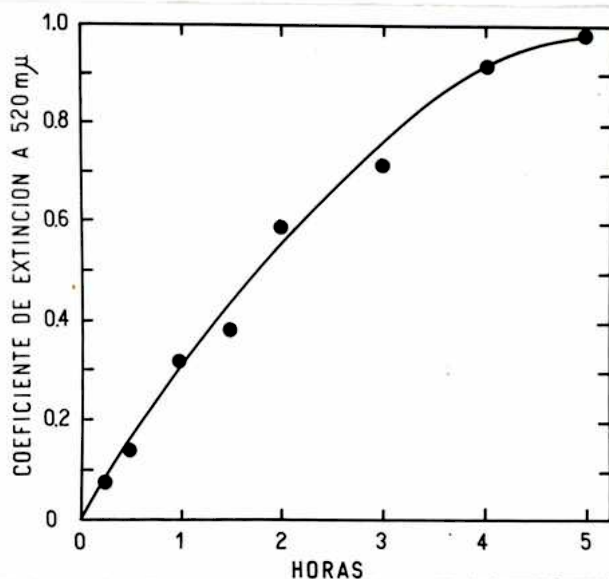
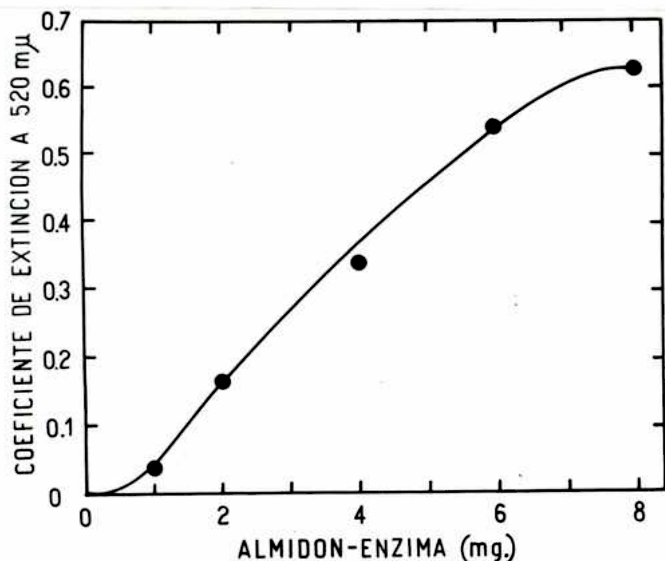


Fig. N° 1 - Relación entre la actividad y la cantidad de enzima.- Las cantidades del complejo almidón-enzima indicadas se incubaron 90 minutos a 37°C. La mezcla de reacción fue la standard. El UDP se dosó en la forma usual.

Fig. N° 2 - Relación entre la actividad enzimática y el tiempo de incubación.- La mezcla y las condiciones de incubación fueron las standard. Los tiempos fueron los indicados en la figura.

El pH óptimo de actividad de la enzima fue de 8,2 en buffer glicil-glicina 0,5 M, EDTA 0,025 M y entre 7,5 y 8,2 en buffer fosfato 0,5 M, EDTA 0,025 M (Fig. 3).

Se encontró que el Km para el UDP-glucosa es de  $3,8 \times 10^{-2}$  (Fig. 4) y que la enzima transforma 0,8 μmol de UDP-glucosa por miligramo de proteína por hora.

Este complejo "almidón-enzima" contiene 1,5 granos de proteína por miligramo. Se encontró la misma cantidad de proteína calentando el almidón con OHNa en lugar de agua.

Acción de la enzima - Esta enzima cataliza la transferencia de la glucosa del UDP-glucosa y ADP-glucosa al aceptor que en nuestro caso es el almidón.

Esto se comprobó incubando la enzima con UDP-glucosa marcado en la glucosa con  $C^{14}$ . En un experimento tipo se obtuvieron los siguientes resultados: El sistema completo incorporó 600 impulsos/minuto o sea un 6% y al que se le agregó el UDP-glucosa- $C^{14}$  al final de la reacción no incorporó nada (5 im-



pulsos/minuto).

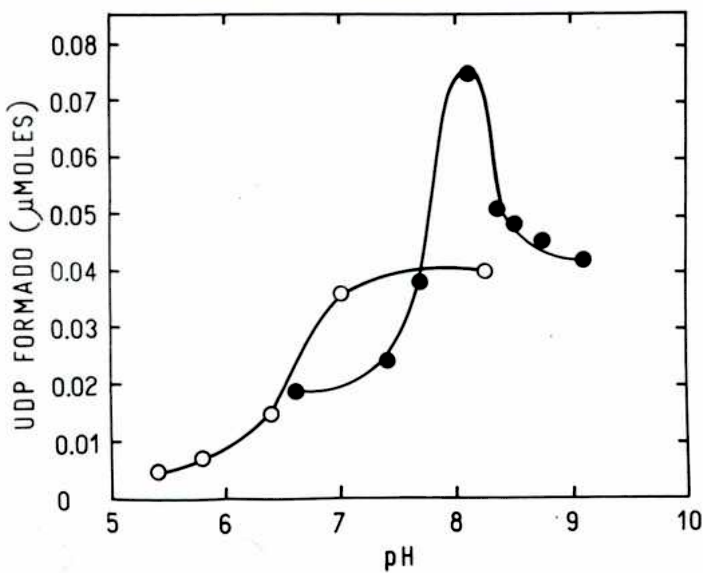


Fig. N° 3 - pH óptimo.-

○—○ buffer fosfato 0,5 M;  
 ●—● buffer glicil-glicina. Se incubaron 4 mg. de enzima-almidón con 0,34 μmol de UDP-glucosa, 0,075 μmol de EDTA y 1,5 μmol del buffer indicado. Volumen final: 0,013 ml. Tiempo de incubación: 180 minutos. Antes de dosar el UDP formado se ajustó en todos los tubos el pH a 7 para que los diferentes pH no afecten la reacción con la piruvato quinasa.

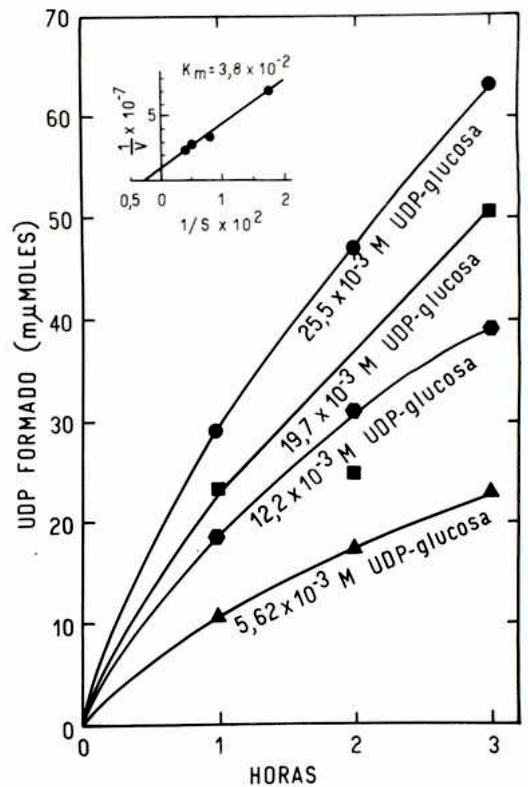


Fig. N° 4 - Velocidad de reacción para concentraciones variables del UDP-glucosa.- El sistema y las condiciones de incubación son las standard.

El precipitado radioactivo se incubó con -amilasa, recuperándose la radioactividad casi totalmente en el sobrenadante, el cual se cromatógrafió. El cromatograma se pasó por el registrador automático de radioactividad coincidiendo la zona radioactiva con la de la maltosa puesta como control. Esta zona se eluyó y corrió en electroforesis, el ng de la mancha radioactiva coincidió con el de la maltosa standard.

#### ALMIDON SINTETASA DE DIVERSAS PARTES DE LA PAPA

Almidón de los brotes de papa - La técnica usada para preparar la enzima de los brotes fue la misma que en el caso de los tubérculos. El preparado presenta propiedades idénticas a los descriptas anteriormente. Da una mayor incorporación con el ADP-glucosa que con el UDP-glucosa (25% y un 3% respectiva-

mente), también transfiere unidades glucosídicas a los malto-oligosacáridos a partir del nucleótido azúcar.

Almidón interno y externo de la papa - Se prepararon extractos enzimáticos de la parte interna y externa de tubérculos muy jóvenes y recién cosechados. El ensayo de actividad se hizo en la forma usual.

En el sistema incubado con el almidón interno se formaron 10,8  $\mu$ moles de UDP y en el con el externo 1  $\mu$ mol.

#### ENSAYOS DE SEPARACION DE LA ENZIMA DEL GRANULO

Uno de los primeros ensayos hechos en este sentido consistió en moler los gránulos en un mortero y extraer este polvo con buffer o solución de oligosacárido a 0°C, las mismas extracciones se hicieron pero de los gránulos sin moler los resultados fueron negativos en todos los casos.

Se intentó también preincubar la enzima con buffer a 37°C durante una hora y separar luego el sobrenadante, a éste se le agregó sustrato y aceptor incubándose nuevamente en las condiciones standard; no se obtuvo actividad enzimática.

Se trató de atacar el almidón del gránulo con  $\alpha$ -amilasa y ver si de esta forma se liberaba la enzima. Se incubaron durante 1 hora a 37°C 20 mg. de almidón con 0,010 ml. de amilasa, 0,080 ml. de buffer fosfato 0,025 M pH 7,4, 0,010 ml. de  $\text{CaCl}_2$   $10^{-2}$  M y 0,010 ml. de albúmina, volumen final: 0,100 ml.

Luego se centrifugó, se separó el sobrenadante del cual se tomó una alícuota (0,020 ml.) la cual se incubó según el sistema standard. En ninguno de los casos en que se repitió el experimento se obtuvieron resultados satisfactorios.

#### ACTIVADORES E INHIBIDORES

Se ensayó el efecto de la cisteína, glutatión, Mg en una concentración de  $10^{-3}$  M. No tuvieron ninguna acción so-



bre la enzima, tampoco la tuvieron las sustancias como: glucógeno (0,8 y 1,6 mg.), sacarosa (1  $\mu$ mol) y glucosa-6-P (0,2  $\mu$ mol).

La glucosa y la sacarosa inhiben en parte la acción de la enzima (aproximadamente en un 30% cada una). El p-cloromercuribenzoato inhibió totalmente la acción de la almidón sintetasa.

#### OTRAS ENZIMAS EN EL GRÁNULO

Se ensayó la presencia de otras enzimas relacionadas con la biosíntesis y degradación del almidón en dichos gránulos. Se comprobó la ausencia de la D-enzima incubando estos gránulos con glucosa- $C^{14}$  en las condiciones ya detalladas en "preparación de sustratos", sin obtenerse malto-oligosacáridos radioactivos; por otra parte, en los experimentos con malto-oligosacáridos marcados con  $C^{14}$  no hay formación de otros superiores e inferiores en ausencia de UDP-glucosa.

Se ensayó la presencia de fosforilasa según el método de Green y Stumpf (77); las pruebas fueron hechas con glucosa-1-P- $C^{14}$  y glucosa-1-P- $C^{12}$ ; no se pudo detectar acción fosforilásica en dicho preparado enzimático, tampoco tenía acción fosforilásica el extracto enzimático obtenido de los brotes de papa. En cambio se obtuvo actividad fosforilásica cuando en la preparación del complejo "almidón-enzima" de la papa se omitieron los lavados con acetona. El ATP inhibió la acción fosforilásica (Tabla 1), en cambio los malto-oligosacáridos lo activaron (Tabla 2).

La acción del ATP se ensayó por la posible presencia de una enzima que forme ADP-glucosa en forma similar a la que forma UDP-glucosa,

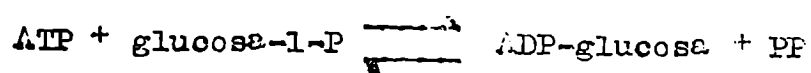


TABLA N° 1

Acción fosforilásica del gránulo de almidón

(no tratado con acetona)

El sistema completo es el detallado en la parte de "métodos". La cantidad de ATP agregada fue de 0,5  $\mu$ mol, volumen final 0,040 ml., tiempo de incubación 180 minutos. Glucosa-1-P-C<sup>14</sup> agregado 9.000 cuentas/minuto.

Sistema	Incorporación en almidón cuentas/minuto
Completo	150
Sin ATP	310
Sin glucosa-1-P-C <sup>14</sup> t=0	3

TABLA N° 2

Acción de los malto-oligosacáridos sobre la fosforilasa del gránulo de almidón

A la mezcla de incubación descrita en "métodos" se le agregaron 0,5  $\mu$ mol de oligosacáridos. Se incubó 120 minutos. La reacción se detuvo con tricloroacético 5%.

Malto-oligosacárido	P <sub>i</sub> formado nmoles
-	20
M <sub>3</sub>	20
M <sub>4</sub>	85
M <sub>5</sub>	55

REACCIONES DE LA ENZIMA CON LOS MALTO-OLIGOSACÁRIDOS

El preparado enzimático del almidón transfiere la glucosa del UDP-glucosa a los malto-oligosacáridos, los cuales inhiben la incorporación de la unidad glucosídica del nucleótido azúcar al almidón (Tabla 3).

TABLA N° 3

Efecto de los malto-oligosacáridos sobre la transferencia de la glucosa del UDP-glucosa-C<sup>14</sup> al almidón

Al sistema de incubación standard se le agregó 1  $\mu$ mol de oligosacárido y 0,2  $\mu$ mol de UDP-glucosa-C<sup>14</sup> (9.000 cuentas/minuto). Las condiciones de la incubación son las descriptas en la parte de "métodos". En los sistemas donde figura "sin oligosacárido" éste se agregó al final de la incubación.

Los experimentos con cada uno de los oligosacáridos fueron hechos independientemente. Como 100% se tomó la incorporación al almidón en ausencia del oligosacárido.

Sistema	Incorporación en el almidón Impulsos/minuto	Inhibición %
Completo Sin M <sub>2</sub>	205 453	45
Completo Sin M <sub>4</sub>	290 480	40
Completo Sin M <sub>5</sub>	340 500	30
Completo Sin M <sub>6</sub>	413 500	20
Completo Sin M <sub>7</sub>	445 406	--

La acción de los malto-oligosacáridos sobre la formación del UDP puede verse en la tabla 4 y fig. N° 5.

TABLA N<sup>o</sup> 4

Acción de los oligosacáridos sobre la formación del UDP

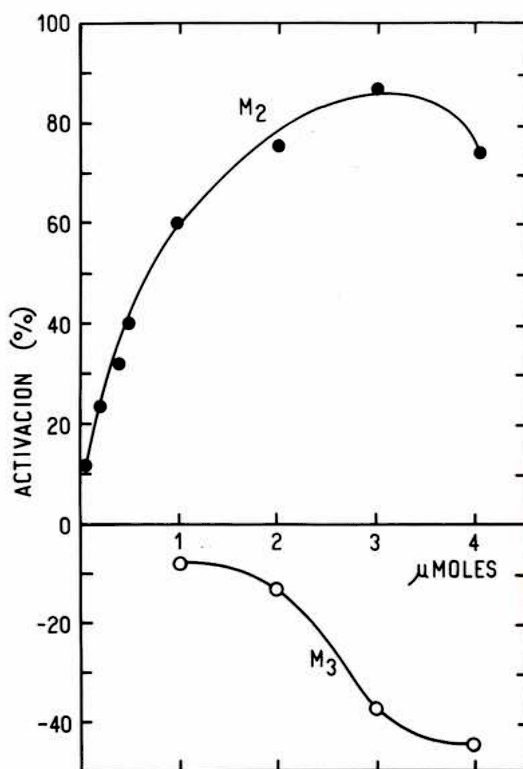
A la mezcla de incubación standard se el agregó 1 mol de oligosacárido. Las condiciones de la reacción fueron las ya descriptas en "métodos".

Oligosacárido	UDP formado mmoles	Activación %	Inhibición %
-	34,4	-	-
Maltosa	54	57	
M <sub>3</sub>	29,6	-	13,7
M <sub>4</sub>	32,4	-	6
M <sub>5</sub>	27	-	21,5

Fig. N<sup>o</sup> 5 - Acción de la M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> sobre la actividad enzimática.

El sistema de incubación fue el standard más el agregado de M<sub>2</sub> o M<sub>3</sub>. Volumen final 0,13 ml.

Se toma como % de activación a la actividad del sistema sin el malto-oligosacárido.



En los experimentos realizados para evidenciar la transferencia de la glucosa del UDP-glucosa a los malto-oligosacáridos inferiores para formar los respectivos superiores se empleó UDP-glucosa- $C^{14}$  y malto-oligosacáridos- $C^{12}$  y también UDP-glucosa- $C^{12}$  y malto-oligosacáridos- $C^{14}$ . Los resultados figuran en los gráficos N° 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

Fig. N° 6 - UDP-glucosa- $C^{12}$  y  $M_2-C^{14}$ .

A la mezcla de reacción standard se le agregaron  $M_2-C^{14}$  (12.000 cuentas/minuto). En el sistema donde figura  $t=0$  la  $M_2-C^{14}$  se agregó al final de la reacción. Después de cromatografiar, se eluyó y contó en el contador de flujo.

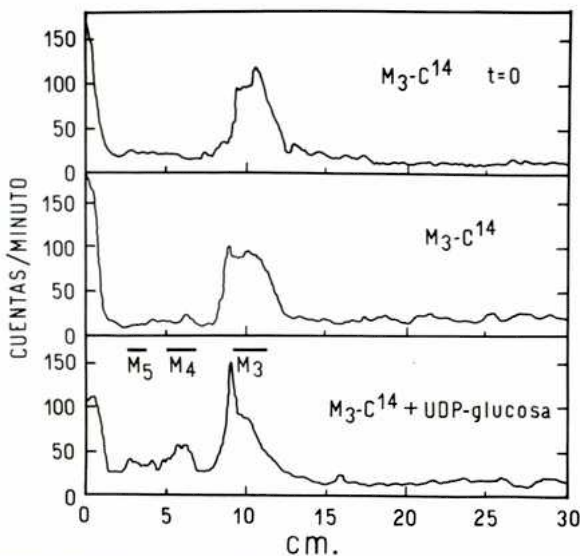
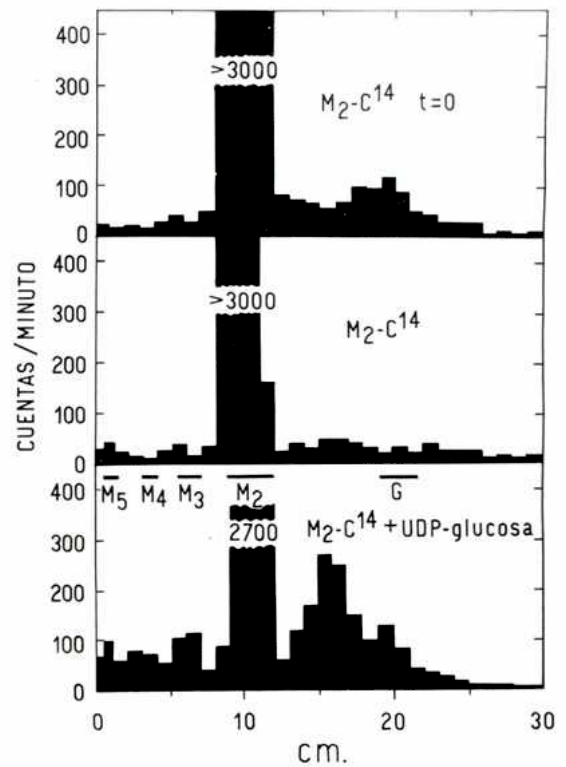


Fig. N° 7 - UDP-glucosa- $C^{12}$  y  $M_3-C^{14}$ . - La mezcla y las condiciones de incubación fueron idénticas a las de la fig. 6.  $M_3-C^{14}$  (5.800 cuentas/minuto). Los cromatogramas se pasaron directamente por el registrador automático de radioactividad.

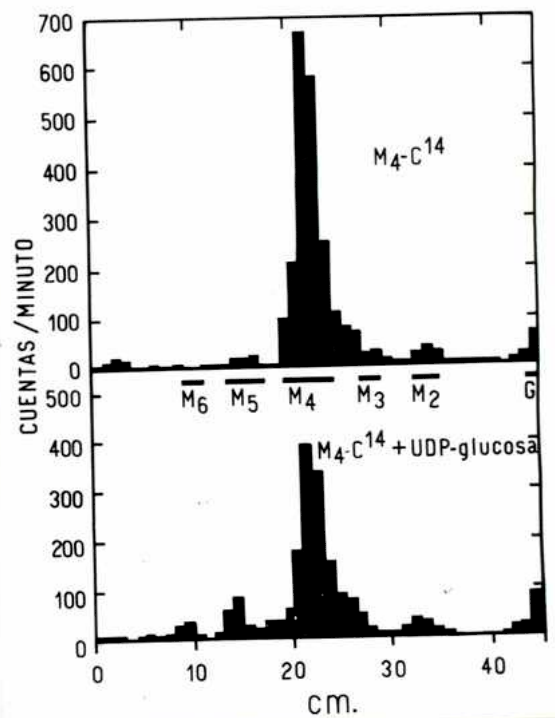


Fig. N° 8 -  $M_4-C^{14}$  y UDP-glucosa- $C^{12}$ . El sistema de incubación es el ya descrito anteriormente.  $M_4-C^{14}$  (3.000 cuentas/minuto). Los cromatogramas se eluyeron y contaron en el contador de flujo.



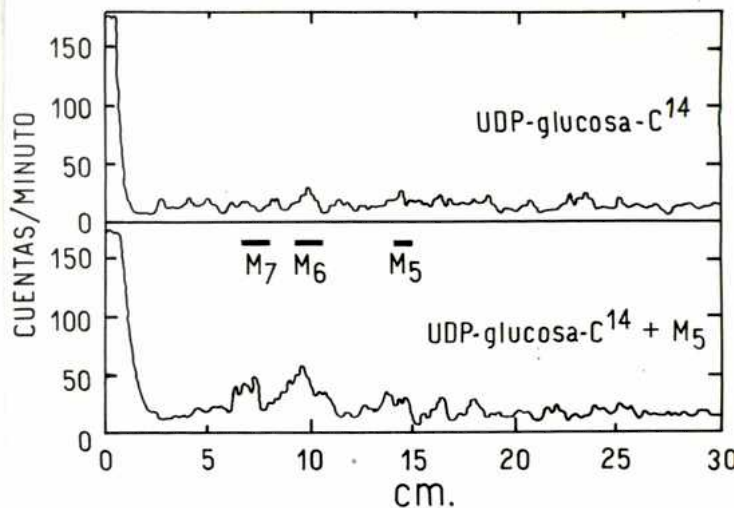
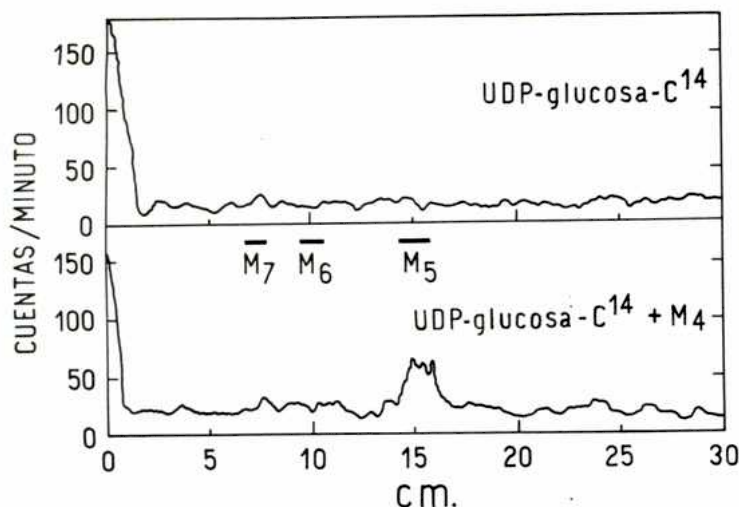


Fig. N° 9 - UDP-glucosa-C<sup>14</sup> y M<sub>4</sub>-C<sup>12</sup>.-- El sistema de incubación conteniendo 4 mg. de enzima, 0,25 μmol de UDP-glucosa-C<sup>14</sup> (9.000 impulsos/minuto), 1 μmol de M<sub>4</sub> y buffer glicina 3,3 μmoles, 0,082 μmol de EDTA pH 8,6. Los cromatogramas se pasaron por el contador de flujo.

Fig. N° 10 - UDP-glucosa-C<sup>14</sup> y M<sub>5</sub>-C<sup>12</sup>.-- El sistema fue el standard. M<sub>5</sub> agregada 1 μmol. El cromatograma se pasó por el registrador automático de radioactividad.

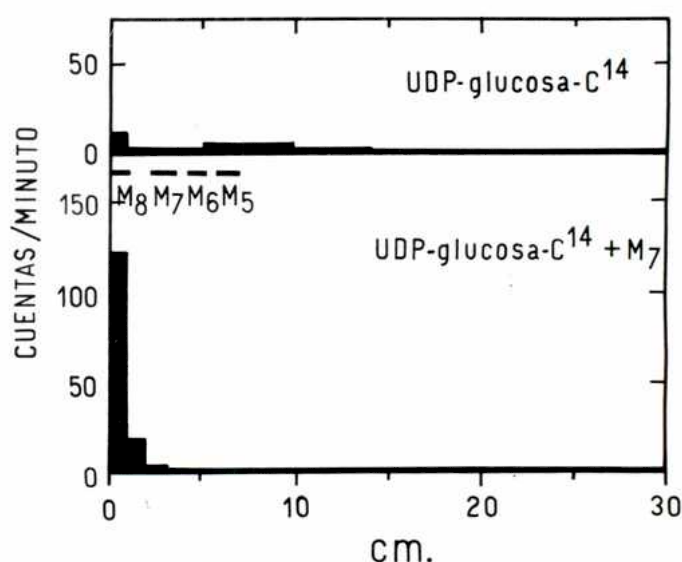
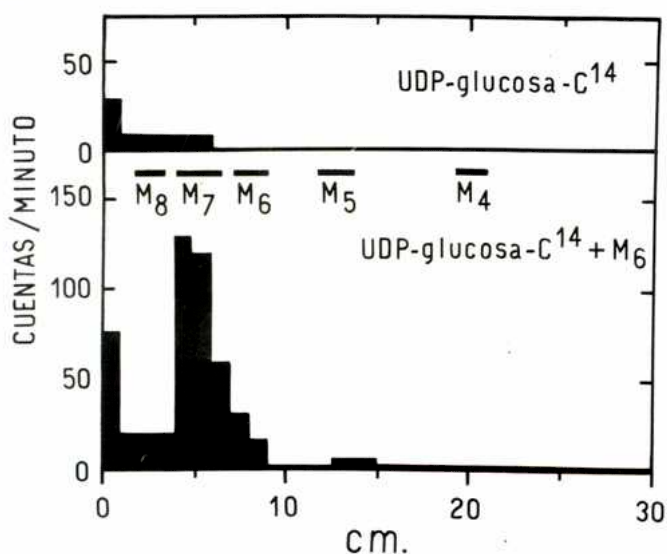


Fig. N° 11 y 12 - UDP-glucosa-C<sup>14</sup> y malto-oligosacáridos-C<sup>12</sup> (M<sub>6</sub> y M<sub>7</sub>).-- El sistema fue el usual. Se agregó 1 μmol del malto-oligosacárido. Los cromatogramas se eluyeron y contaron en un contador de flujo.

El oligosacárido que se formó fue, en casi todos los casos el inmediato superior, en algunos casos se formaron los dos inmediatos superiores (caso de la maltosa y M<sub>5</sub>).

La evidencia de que estos malto-oligosacáridos superio-

res formados provenían de la cesión de la glucosa del UDP-glucosa a los malto-oligosacáridos presentes y no del almidón es su formación a partir de oligosacáridos- $C^{14}$  inferiores y UDP-glucosa- $C^{12}$ , y la no aparición de los mismos en ausencia de UDP-glucosa- $C^{12}$  (los gráficos anteriormente mencionados).

Queda también descartada la posibilidad de que los oligosacáridos actúen de intermediarios en la transferencia de la glucosa- $C^{14}$  del UDP-glucosa al almidón, o que se incorporen al almidón como una sola unidad, ya que, al incubar el complejo "almidón-enzima" con UDP-glucosa y oligosacáridos- $C^{14}$ , no hay incorporación al almidón (Tabla 5).

TABLA N° 5

Acción de los malto-oligosacáridos- $C^{14}$

El sistema completo contiene la mezcla de incubación standard más los malto-oligosacáridos detallados en la tabla. Los experimentos fueron hechos independientemente, la radioactividad se leyó en el contador de flujo.

Oligosacáridos- $C^{14}$	Cuentas/minuto agregadas	Sistema	Incorporación en el almidón cuentas/minuto
$M_2$	12.000	Completo	34
		Sin UDP-glucosa	13
		Sin $M_2$	13
$M_3$	5.800	Completo	60
		Sin UDP-glucosa	20
		Sin $M_3$	20
$M_4$	3.000	Completo	57
		Sin UDP-glucosa	30
		Sin $M_4$	30
Mezcla de malto-oligosacáridos ( $M_5$ y superiores)	1.500	Completo	20
		Sin oligosacáridos	10

Los isomalto-oligosacáridos, exceptuando la isoM<sub>3</sub>, no tenían ninguna acción sobre la formación del UDP. En el caso de la isoM<sub>3</sub> la inhibición se comprobó con UDP-glucosa-C<sup>14</sup>; en este experimento la inhibición fue de un 47%.

Estos oligosacáridos no actúan de aceptores de la glucosa en la reacción catalizada por la enzima.

#### ACCION DE LOS MALTO-OLIGOSACARIDOS SOBRE EL ALMIDON INTERNO Y EXTERNO DE LA PAPA.

No hubo ninguna acción sobre el almidón externo, la acción sobre el almidón interno puede verse en la tabla 6.

TABLA N° 6

#### Acción de los malto-oligosacáridos sobre el almidón interno

A la mezcla de incubación standard se agregó 0,2 mol de malto-oligosacárido. Las condiciones de la incubación fueron las mismas que las indicadas en la parte de "métodos".

Oligosacárido agregado	UDP formado µmoles	Activación %
-	17,5	4
M <sub>2</sub>	23,6	30
M <sub>3</sub>	36,5	110
M <sub>5</sub>	37,8	115

#### FORMACION DE MALTO-OLIGOSACARIDOS CATALIZADA POR EL ALMIDON INTERNO

La reacción entre los oligosacáridos α-1-4 de la glucosa y el UDP-glucosa catalizada por la enzima del almidón interno origina malto-oligosacáridos superiores sin inhibir la incorporación al almidón (Tabla 7 y fig. 13).



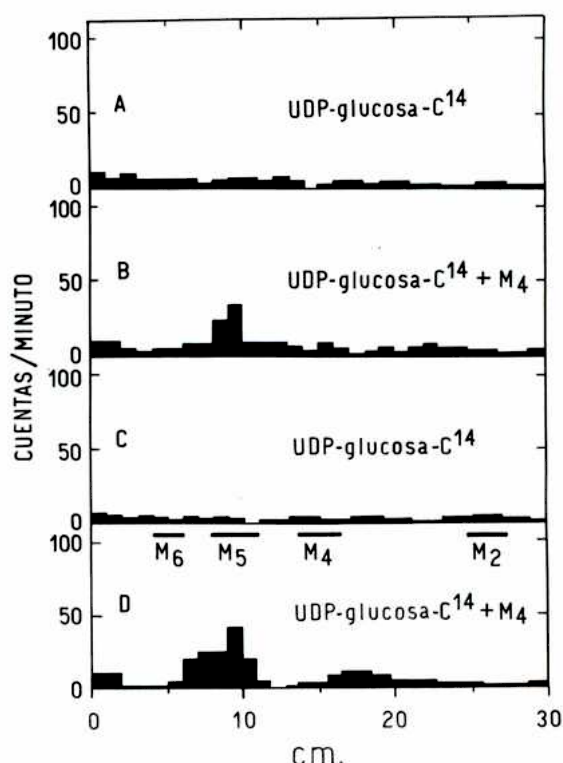
TABLA N° 7

Efecto de la maltotetraosa sobre la incorporación del UDP-glucosa-C<sup>14</sup> al almidón de papa entera y al almidón interno de papa

La mezcla y las condiciones de incubación son las usuales, la cantidad de M<sub>4</sub> agregada fue de 0,2 μmol.

Almidón	Sistema	Incorporación impulsos/minuto
Papa	Completo	240
	Sin M <sub>4</sub>	450
Interno papa	Completo	155
	Sin M <sub>4</sub>	150

Fig. N° 13 - UDP-glucosa-C<sup>14</sup> y M<sub>4</sub>-C<sup>12</sup>. Formación de malto-oligosacáridos catalizada por la enzima de la papa entera y por la del almidón interno de papa. El sistema y las condiciones de la incubación fueron las usuales.  
A y B: Almidón de papa entera.  
C y D: Almidón interno de la papa.  
Los cromatogramas se cortaron y leyeron directamente en el contador de flujo.



ACCION DE LOS GLUCOSIDOS

Se encontró que los glucósidos fenólicos y sus respectivas agluconas presentan un efecto inhibitorio muy marcado sobre la almidón sintetasa (Tabla 8), efecto que parece ser común a los extractos enzimáticos de distinto origen (Tabla 9).

TABLA. N° 8

Acción de los glucósidos

A la mezcla de incubación standard se agregó 1 mol. de glucósido o aglucona. Las condiciones de incubación fueron las ya descritas.

Sustancia agregada	UDP formado µmoles	Inhibición %
-	67,5	-
p-OCH <sub>3</sub> -β-fenilglucósido	21,1	70
m-OCH <sub>3</sub> -β-fenilglucósido	14,9	80
β-fenilglucósido	26,3	60
α-fenilglucósido	26,0	60
arbutina	21,1	70
hidroquinona	13,5	80
salicina	33,8	50
saligenina	5,4	92
floridzina	47,3	30
1-naftol-glucósido	21,0	70
fenol	4,5	94
gencioibósido	59,0	13
esculina	10,0	85
α-CH <sub>3</sub> -glucósido	67,5	-
β-CH <sub>3</sub> -glucósido	67,5	-

La posibilidad de que la acción inhibitoria de los glucósidos sea debida a que actuen de sustratos fue descartada, ya que las agluconas tienen un efecto inhibitorio aún más marcado y además, en los experimentos utilizando arbutina con glucosa-C<sup>14</sup>, no se obtuvo nunca almidón marcado con C<sup>14</sup> (Tabla 10). Tampoco se pudo comprobar que fueran aceptores de

la glucosa del UDP-glucosa pues no se detectó ningún glucósido disacárido.

TABLA N<sup>o</sup> 9

Acción de los glucósidos sobre el almidón de trigo

La mezcla y las condiciones de la incubación fueron las usuales.

Glucósido agregado	UDP formado µmoles	Inhibición %
-	21,1	-
Arbutina (1 µmol)	1,35	93
Glucósido del trigo (0,5 µmoles)	2,7	90

TABLA N<sup>o</sup> 10

Ensayo con arbutina-C<sup>14</sup>

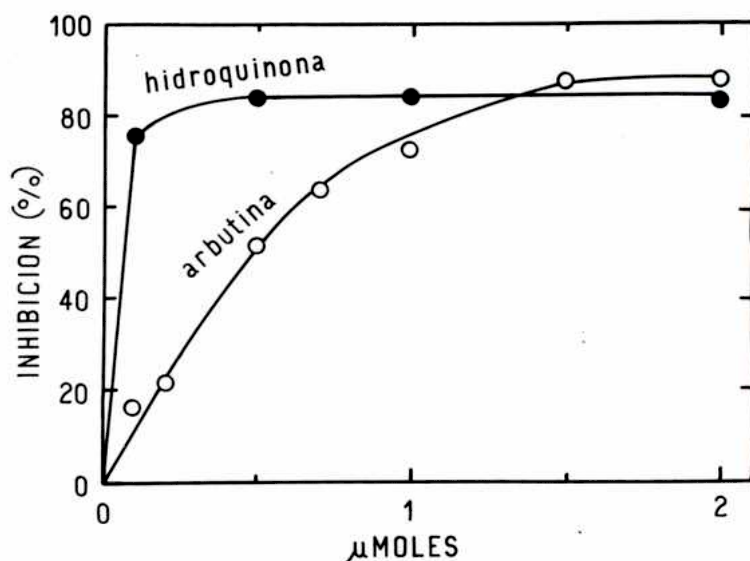
La mezcla y las condiciones de la incubación fueron las usuales.

Sistema	Sustancia marcada con C-14	Incorporación en el almidón Impulsos/minuto	Inhibición %
Completo	UDP-glucosa	120	-
Arbutina t=0	(9.000 imp./min.)	330	64
Completo	Arbutina	5	-
UDP-glucosa t=0	(3.550 imp./min.)	5	-
Arbutina t=0		4	-

La acción inhibitoria de los glucósidos depende mucho de su concentración. Este efecto de concentración no es tan notorio en el caso de las agluconas (Fig. 14).

**Fig. N° 14** - Inhibición de la actividad enzimática por los glucósidos.-

A la mezcla de incubación standard se le agregaron arbutina o hidroquinona en las cantidades que figuran. Volumen final 0,013 ml. Como inhibición 0 se tomó la actividad del sistema en ausencia de arbutina o hidroquinona.



#### ACCION DE LOS NUCLEOTIDOS

Se encontró que ciertos nucleótidos como el ATP, ADP, AMP, UDP inhiben la reacción almidón-enzima-UDP-glucosa (Tabla 11) siendo esta acción menor notoria en el caso de usar como sustrato el ADP-glucosa (Tabla 12).

Los experimentos hechos con sacarosa-C<sup>14</sup> y sacarosa-C<sup>14</sup> más nucleótidos (ATP, ADP, UDP, UDP-glucosa) no dieron nunca como resultado incorporación al almidón ni la formación de nucleótido azúcares marcados o sin marcar.

Además del UDP-glucosa se probaron otros nucleótido-azúcares y también azúcares como sustratos. Las sustancias ensayadas fueron glucosa-C<sup>14</sup>, la ya mencionada sacarosa-C<sup>14</sup>, UDP-glucurónico, UDP-galactosa, CDP-glucosa, ADP-galactosa y ADP-glucosa. Exceptuando este último, ninguna de las sustancias mencionadas tuvo acción. El ADP-glucosa en cambio resultó un sustrato mucho más efectivo que el UDP-glucosa dando un 60% de incorporación al almidón (respecto de un 6% con el UDP-glucosa).

La competición del ADP-glucosa y UDP-glucosa puede verse en la Tabla 13.

TABLA N° 11

Adición de los nucleótidos

La mezcla y las condiciones de incubación fueron las usuales, se usaron 0,25  $\mu$ mol de UDP-glucosa- $^{14}C$  (9.000 impulsos/minuto), 0,25  $\mu$ mol de ADP, 0,45  $\mu$ mol de GDP, 0,45  $\mu$ mol de UDP y 1  $\mu$ mol de AMP.

Nucleótido agregado	Sistema	Incorporación Impulsos/minuto	Inhibición %
ATP	Completo	100	
	Sin ATP	350	80
	Sin UDP-glucosa- $^{14}C$ t=0	10	
ADP	Completo	150	
	Sin ADP t=0	460	65
UDP	Completo	330	
	Sin UDP	460	30
GDP	Completo	457	
	Sin GDP	450	
AMP	Completo	90	
	Sin AMP	265	65
Adenosina	Completo	130	
	Sin adenosina	265	50

Los experimentos con AMP y adenosina no se hicieron junto con los anteriores, se usó otro preparado enzimático y el volumen final de incubación fue de 0,018 ml. AMP y adenosina agregada: 0,5  $\mu$ mol.



TABLA N° 12

Acción de los nucleótidos

El sistema de incubación y las condiciones fueron las usuales, las únicas variaciones fueron que el sustrato fue el ADP-glucosa (0,2  $\mu$ mol, 1.000 impulsos/minuto), volumen final: 0,023 ml.; ATP 1  $\mu$ mol, ADP, AMP, UDP, UTP y adenosina 0,5  $\mu$ mol.

Nucleótido	Incorporación Impulsos/minuto	Inhibición %
-	660	
ATP	520	22
ADP	490	27
AMP	500	24
Adenosina	550	19
UDP	750	
UTP	730	

TABLA N° 13

Competición del ADP-glucosa y el UDP-glucosa

Se incubaron 4 ng. de almidón-enzima de papa, 3,3  $\mu$ moles de buffer glicina, 0,082  $\mu$ mol de EDTA pH 8,6, nucleótido-azúcares en la siguiente cantidad: 0,22  $\mu$ mol de ADP-glucosa-C<sup>14</sup> (1.350 impulsos/minuto), 0,2  $\mu$ mol ADP-glucosa-C<sup>12</sup>, 0,25  $\mu$ moles UDP-glucosa-C<sup>14</sup> (9.000 impulsos/minuto) y 0,25  $\mu$ mol de UDP-glucosa-C<sup>12</sup>. El volumen final de la incubación: 0,023 ml. Las condiciones de la incubación fueron las usuales.

Sistema	Incorporación al almidón Impulsos/minuto	Inhibición %
ADP-glucosa-C <sup>14</sup>	660	
ADP-glucosa-C <sup>14</sup> UDP-glucosa-C <sup>12</sup>	670	
UDP-glucosa-C <sup>14</sup>	500	
UDP-glucosa-C <sup>14</sup> ADP-glucosa-C <sup>12</sup>	170	66

#### ENSAYOS CON OTROS TIPOS DE ALMIDONES

La adición de restos glucosa sobre el grano se efectúa tanto sobre la amilosa como sobre la amilopectina aunque en menor proporción. No pudo comprobarse en forma definitiva la presencia o ausencia de la  $\alpha$ -enzima y de allí que exista la posibilidad de que la amilosa sea el único aceptor dando luego amilopectina o lo sean ambas como en el caso de la fosforilasa.

El problema es difícil de resolver mientras la enzima esté pegada al gránulo, pero se realizaron algunos experimentos aprovechando la existencia de tipos especiales de almidón como ser: el del poroto arrugado (wrinkled pea) formado casi exclusivamente por amilosa y el del maíz céreo (waxy maize) formado casi exclusivamente por amilopectina. Los resultados se ven a continuación.

Actividades de los diferentes almidones - Se midieron por dosaje del UDP formado y por la incorporación de la glucosa-C<sup>14</sup> al almidón (Tablas 14 y 15).

TABLA N° 14

Incorporación de la glucosa-C<sup>14</sup>

La mezcla y las condiciones de incubación fueron las usuales, se usó un UDP-glucosa-C<sup>14</sup> de 40.000 impulsos/ $\mu$ mol y 23 moles/ml. (se usaron 0,0047 ml.).

Origen del almidón	Incorporación Impulsos/minuto	Incorporación %
Maíz waxy	34	0,8
Wrinkled pea	616	15
Maíz blanco	900	22
Maíz rojo	816	20

TABLA N° 15

UDP formado

Las condiciones y la mezcla de incubación fueron las usuales.

Origen del almidón	UDP formado mpmoles	UDP formado %
Maíz waxy	1,00	0,4
Wrinkled pea	71,00	28
Maíz blanco	144,00	57
Maíz rojo	152	60

TABLA N° 16

Separación de los almidones en sus componentes

La separación se hizo según el método de Montgomery y Santi detallado en la parte de "métodos".



Origen del almidón	Anilosa %	Anilopectina %
Maíz waxy	4	96,2
Wrinkled pea	80	6
Maíz rojo	20	66
Maíz blanco	10,8	74

También fue hecha la separación de los almidones radioactivos del wrinkled pea y de la papa por el método de Cowie y Greenwood. Los resultados pueden verse en la Tabla 17.

TABLA N° 17

Separación de los componentes del almidón-C<sup>14</sup>

1 mg. de almidón de arveja arrugada o 4 mg. de almidón de papa se incubaron en las condiciones y con los reactivos usuales, la única variante fue que se usó 0,2 mol de ADP-glucosa (1.000 impulsos/minuto). Los tiempos de incubación son los que se indican en la tabla. En el almidón-C<sup>14</sup> así obtenido los componentes se separaron por el método de Cowie y Greenwood ya mencionado.

Almidón	Tiempo de incubación minutos	Anilosa %	Anilopectina %	Incorporación Impulsos/minuto	
				Anilosa	Anilopectina
Arveja arrugada	15	99	7,7	126	22
	30	99	4,3	198	26
	60	95	8	252	45
Papa	15	18	78	310	128
	30	18	78	440	275
	60	21	72	360	165

TABLA N° 18

Determinación de proteínas

Se hizo por el método de Lowry. Se usaron 4 ng. de almidón-enzima.

Origen del almidón	ng. proteína/ ng. almidón	Actividad específica impulsos/minuto/ng. proteína por hora
Maíz waxy	0,0023	1,470
Wrinkled pea	0,0087	7,090
Maíz rojo	0,0030	30,000
Maíz blanco	0,0030	27,000
Papa	0,0015	30,600

Almidón del maíz waxy - De los datos anteriormente expuestos se ve que el maíz waxy casi no cataliza la incorporación de glucosa al almidón a partir de UDP-glucosa. Tampoco se obtuvieron mejores resultados usando como sustrato ADP-glucosa y deoxi-ADP-glucosa (entre 3 y 4% de incorporación). Se probaron entonces algunos compuestos que pudiesen activar a la enzima: glucosa-6-P, almidón soluble, glucógeno, el koch-saft del maíz waxy y glucósidos, sin obtener ningún aumento en la incorporación.

También se ensayó la presencia de fosforilasa en dicho extracto. En todos los casos el resultado fue negativo.

El agregado de malto-oligosacáridos a este almidón, lo mismo que en el caso del almidón interno de papa, aumenta la formación de UDP (Tabla 19).

Ensayos hechos con  $M_3$  y UDP-glucosa- $C^{14}$  y ADP-glucosa- $C^{14}$  demuestran que el aumento del UDP se debe a la formación de los malto-oligosacáridos inmediatos superiores que fueron identificados por cromatografía. Cuando se usó como sustrato UDP-glucosa- $C^{14}$  se identificaron un 1% de  $M_5$  y un 3% de  $M_4$ ; con

ADP-glucosa- $C^{14}$  se formó un 8% de  $M_5$  y un 25% de  $M_4$ .

TABLA N° 19

Acción de malto-oligosacáridos

La mezcla y las condiciones de incubación fueron las usuales. Los malto-oligosacáridos agregados son los indicados en la tabla.

Malto-oligosacárido	UDP formado
µmoles	µmoles
-	0,00135
$M_2$ (1,00)	0,005
$M_3$ (0,67)	0,0195
$M_4$ (0,5)	0,0142
$M_5$ (0,64)	0,023

CONCLUSIONES

La almidón sintetasa, a diferencia de las otras enzimas vegetales que intervienen de una u otra manera en la formación del almidón y que fueron estudiadas hasta el momento, es una enzima "insoluble" íntimamente ligada al gránulo y que tiene su máxima actividad a un pH alcalino.

Esto podría ser un indicio de que el mecanismo de síntesis del almidón "in vivo" sea diferente al considerado hasta el momento para los sistemas solubles "in vitro", ya que es muy poco probable que la almidón sintetasa funcione simultáneamente con las otras enzimas (por ej. la fosforilasa) dada la diferencia de los pH óptimos.

La alta constante de Michaelis encontrada para la almidón sintetasa es, tal vez, debida al hecho de que ella está adsor-

bida al gránulo de almidón y por consiguiente en equilibrio heterogéneo con el sustrato.

Los resultados obtenidos en las reacciones con los malto-oligosacáridos indicarían que ellos y el almidón son sustratos competitivos de la enzima, la cual tendría en algunos casos mayor afinidad por los oligosacáridos (enzima del maíz waxy). Otra posibilidad, aunque menos probable, es que existan dos enzimas distintas, una para cada reacción.

Los resultados obtenidos con la enzima del almidón interno de la papa son distintos de los anteriores (aumento de la formación de UDP por agregado de oligosacáridos) y podrían explicarse por el hecho de que este almidón se obtuvo de tubérculos muy poco desarrollados y posiblemente las condiciones de la síntesis sean en ellos diferentes a los de la papa madura.

El efecto de los glucósidos fue ensayado dado que parecen tener alguna relación con la transglucosidación (82,83). Además su síntesis se realiza por un mecanismo similar al del almidón y la sacarosa y podría existir alguna reacción de competición por los nucleótido-azúcares que sirvan para regular la síntesis de estas tres sustancias. Además en un caso, de la callosa (3), se ha demostrado que los glucósidos actúan como activadores no específicos, y en el caso del glucógeno por lo contrario como inhibidores (84). Fue por lo tanto lógico sospechar alguna acción de estos compuestos sobre la formación del almidón. Como en el caso del glucógeno, ellos tienen una acción marcadamente inhibitoria sobre la síntesis del polisacárido.

En un principio se consideró que una posible causa de esta inhibición fuese la formación de un compuesto de inclusión entre el sustrato (espiral amilósica) y el inhibidor. Esta hipótesis fue descartada debido a que la misma inhibición se en-

cuentra en la formación de los oligosacáridos superiores a partir de los inferiores (aún en el caso de la  $M_3$ ) y es bien sabido que la forma espiralada se presenta en los oligosacáridos superiores a  $M_6$ .

Otra posibilidad sería la inactivación de la enzima por estos compuestos fenólicos.

En la síntesis del almidón así como de los oligosacáridos el ADP-glucosa resultó ser un sustrato mucho más efectivo que el UDP-glucosa, o sea que la enzima parecería tener una afinidad mayor por el grupo adenílico, hecho que se confirmaría con los resultados obtenidos de la competición del ADP-glucosa y UDP-glucosa (Tabla 13). Esta mayor afinidad se confirmó en los ensayos realizados con otros nucleótidos. Los de la adenina inhiben mucho la acción de la almidón sintetasa con el UDP-glucosa y poco con el ADP-glucosa, y los de la uridina poco en el caso del UDP-glucosa y nada con el del ADP-glucosa. Una mayor afinidad por la enzima del núcleo adenílico con respecto al uridílico podría ser la causa de este efecto.

La función de la sacarosa en el metabolismo de los sacáridos y polisacáridos es de gran importancia en el reino vegetal. Se sabe que interviene en la formación del almidón, pero la forma en que lo hace queda hasta el momento muy poco clara. La posibilidad de que este disacárido intervenga en la síntesis del almidón como sustrato o como dador de glucosa a los nucleótidos según la reacción sacarosa  $UDP \rightleftharpoons UDP\text{-glucosa} + \text{fructosa}$ , formando los nucleótido-azúcares, ha sido descartada por lo menos en los gránulos del almidón, (85).

La glucosa-6-P, a diferencia de lo que ocurre en el caso del glucógeno (76,86) no aumenta la velocidad de síntesis del almidón.

No se tienen resultados concretos sobre cual de los dos componentes del almidón sintetiza esta enzima. Los datos parecen indicar que la incorporación se produce tanto en la amilosa como en la amilopectina, si bien en mayor proporción en la primera.

Las cantidades relativas de amilosa y amilopectina que contienen los almidones de distinto origen no parecen tener influencia sobre la actividad de la almidón sintetasa de los mismos, excepto en el caso del almidón de maíz céreo.

*Rafael Ángel*

BIBLIOGRAFIA

- (1) L. F. Leloir y E. Cabib, J. Am. Chem. Soc. 75 (1953) 5445.
- (2) L. F. Leloir y C. E. Cardini, J. Am. Chem. Soc. 79 (1957) 6340.
- (3) D. S. Feingold, E. F. Neufeld y W. Z. Hassid, J. Biol. Chem. 233 (1958) 783.
- (4) L. Glaser, J. Biol. Chem. 232 (1958) 627.
- (5) M. A. R. de Fekete, L. F. Leloir y C. E. Cardini, Nature 187 (1960) 918.
- (6) L. F. Leloir, M. A. R. de Fekete y C. E. Cardini, J. Biol. Chem. 236 (1961) 636.
- (7) E. Hansen, E. Dodt y E. G. Niemann, Colloid Z. 130 (1953) 19.
- (8) Maquenne y Roux, Compt. rend. 140 (1905) 1303.  
Maquenne, Bull. soc. chim. France 33 (1905) 723; Compt. rend. 146 (1908) 542; 142 (1906) 95.
- (9) T. J. Schoch, J. Am. Chem. Soc. 64 (1942) 2957.
- (10) T. J. Schoch, Adv. Carbohydrate Chem. 1 (1945) 247.
- (11) N. P. Badenhuizen y R. W. Dutton, Protoplasma 47 (1956) 156.
- (12) K. H. Meyer, Experientia 8 (1952) 405.
- (13) Haworth, "The constitution of sugars" (1929).
- (14) K. V. Giri, "Enzymic synthesis of starch", Symposium on starch and amylases, Osaka, p. 25.
- (15) S. Peat, J. R. Turvey y M. J. Ewans, Nature 179 (1957) 261.
- (16) M. L. Wolfrom y A. Thomson, J. Am. Chem. Soc. 78 (1956) 4116; 79 (1957) 4212.
- (17) Bawn, Hirst y Yound, Trans. Faraday Soc. 36 (1940) 880.
- (18) R. T. Bottle, G. A. Gilbert, C. T. Greenwood y K. W. Saad, Chem. & Ind. (1953) 541.
- (19) H. A. Baum y G. A. Gilbert, Chem. & Ind. (1954) 489.
- (20) C. T. Greenwood, Adv. Carbohydrate Chem. 11 (1956) 335.
- (21) J. F. Foster y D. Zucker, J. Phys. Chem. 56 (1952) 170.

- (22) L. P. Wittrauer, F. R. Senti y M. D. Stern, J. Chem. Phys. 20 (1952) 9178.
- (23) D. M. W. Anderson y C. T. Greenwood, J. Chem. Soc. (1955) 3016.
- (24) Freudenberg, Schaaf, Dumont y Bloetz, Naturwiss. 27 (1939) 850.
- (25) Rundle y Baldwin, J. Am. Chem. Soc. 65 (1943) 554;  
Rundle y French, Idem 65 (1943) 558; 65 (1943) 1707;  
Rundle y Edwards, Idem 65 (1943) 2200; Baldwin, Bear y Rundle, Idem 66 (1944) 111.
- (26) Bear, J. Am. Chem. Soc. 64 (1942) 1388.
- (27) W. J. Whelan y P. J. Roberts, Nature 170 (1952) 748.
- (28) T. J. Schoch, J. Am. Chem. Soc. 64 (1942) 2954.
- (29) Lehrman, J. Am. Chem. Soc. 64 (1942) 2144.
- (30) Mikus, Hixen y Rundle, J. Am. Chem. Soc. 68 (1946) 1115.
- (31) Posternak, Helv. Chim. Acta 18 (1935) 1351.
- (32) F. W. Parfisch y W. J. Whelan, Conferencia The Biochemical Society, Londres, 27 de marzo de 1961.
- (33) E. L. Rozenfeld, y E. G. Physchenskaya, Chem. Abstr. 48 (1954) 9423h.
- (34) C. T. Greenwood y J. S. Robertson, J. Chem. Soc. (1954) 3769.
- (35) K. H. Hess, E. Mahl, Gütter y E. Dodt, Mikroskopie 10 (1955) 6.
- (36) Croft Hill, J. Chem. Soc. (1898) 634.
- (37) C. F. Cori, G. Schmidt y G. T. Cori, Scienza 89 (1959) 464.
- (38) W. Z. Hassid y M. Doudoroff, Adv. Carbohydrate Chem. 5 (1950) 29.
- (39) C. E. Cardini, A. C. Paladini, R. Caputto y L. F. Leloir, Nature 165 (1950) 191.
- (40) L. F. Leloir, The Harvey Lecture, 20 de octubre de 1960.



- (41) L. F. Leloir, C. E. Cardini y E. Cabib, Comparative Biochemistry, Vol. II, Academic Press Inc., Nueva York, (1960) p. 97.
- (42) C. S. Hanes, Proc. Roy. Soc. London Ser. B. 129 (1940) 174.
- (43) H. Baum y G. A. Gilbert, Nature 171 (1953) 933.
- (44) W. J. Whelan y J. M. Bailey, Biochem. J. 58 (1954) 560.
- (45) Y. P. Lee, Biochim. et Biophys. Acta 43 (1960) 13.
- (46) M. H. Ewart, D. Simionovitch y D. R. Briggs, Plant Physiol. 29 (1954) 407.
- (47) S. A. Barker, E. J. Bourne, I. A. Wilkinson y S. Peat, J. Chem. Soc. (1950) 93.
- (48) G. A. Gilbert y A. D. Patrick, Biochem. J. 51 (1952) 181.
- (49) J. Larner y D. N. Uweh, J. Am. Chem. Soc. 78 (1956) 3647.
- (50)
- (51) S. Peat, W. J. Whelan y W. R. Rees, Nature 172 (1953) 158.
- (52) S. Peat, W. J. Whelan y G. W. F. Kroll, J. Chem. Soc. (1956) 53.
- (53) Norberg y French, J. Am. Chem. Soc. 72 (1950)
- (54) M. Abdullah y W. J. Whelan, Biochem. J. 75 (1960) 12P.
- (55) P. N. Hobson, W. J. Whelan y S. Peat, Biochem. J. 47 (1950) XXXIX.
- (56) W. J. Whelan, "The enzymic breakdown of starch", Biochem. Soc. Symp. 11 (1953) 17, Cambridge University Press.
- (57) McWilliam y Harris, Arch. Biochem. Biophys. 84 (1959) 442.
- (58) S. Peat, G. J. Thomas y W. J. Whelan, J. Chem. Soc. (1952) 722.
- (59) R. H. Hopkins y R. Bird, Nature 172 (1953) 492.
- (60) W. E. Trevelyan, D. P. Procter y J. S. Harrison, Nature 166 (1950) 444.

- (61) H. G. Pontis, E. Cabib y L. F. Leloir, Biochim. et Biophys. Acta 26 (1957) 146.
- (62) L. F. Leloir, Arch. Biochem. Biophys. 33 (1951) 186.
- (63) R. E. Trucco, Nature 174 (1954) 1103.
- (64) C. E. Cardini y L. F. Leloir, Arch. Biochem. Biophys. 45 (1953) 55.
- (65) E. Recondo y L. F. Leloir, Biochem. Biophys. Res. Comm. 6 (1961) 85.
- (66) S. Roseman, J. S. Distler, S. G. Moffatt y H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc. 83 (1961) 659.
- (67) S. Peat, W. J. Whelan y G. Jones, J. Chem. Soc. (1957) 2490.
- (68) R. S. Alm, Acta Chem. Scand. 6 (1952) 1186.
- (69) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers y F. Smith, Anal. Chem. 28 (1956) 350.
- (70) G. J. Walker y W. J. Whelan, Biochem. J. 67 (1957) 548.
- (71) W. A. M. Duncan y D. J. Manners, Biochem. J. 69 (1958) 343.
- (72) B. Helferich, E. Smitz-Hillebrecht, Ber. Deut. Chem. Ges. 66 (1933) 378.
- (73) Zemplen y Müller, Ber. Deut. Chem. Ges. 62 (1929) 2107.
- (74) A. Robertson y R. B. Waters, J. Chem. Soc. (1930) 2729.
- (75) E. Cabib y L. F. Leloir, J. Biol. Chem. 231 (1958) 259.
- (76) L. F. Leloir y S. H. Goldemberg, J. Biol. Chem. 235 (1960) 919.
- (77) D. E. Green y P. K. Stumpf, J. Biol. Chem. 142 (1942) 355.
- (78) C. H. Fiske y Y. Subbarow, J. Biol. Chem. 66 (1925) 375.
- (79) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall, J. Biol. Chem. 193 (1951) 265.
- (80) J. M. Cowie y C. T. Greenwood, J. Chem. Soc. (1957) 2862.
- (81) E. Montgomery y E. R. Senti, J. Polymer Sci. 28 (1958) 1.

- (82) J. D. Anderson, L. Hough y J. B. Pridham,, Biochem. J.  
77 (1960) 564.
- (83) J. E. Courtois, F. Petek y T. Dong, Bull. soc. chim. biol.  
43 (1961) 1189.
- (84) L. F. Leloir, Olavarría, J. M., S. H. Goldenberg y H.  
Carminatti, Arch. Biochem. Biophys. 81 (1959) 508.
- (85) L. F. Leloir y C. E. Cardini, J. Am. Chem. Soc. 75 (1953)  
6084.
- (86) I. D. Algranati y E. Cabib, J. Biol. Chem. en prensa.

## INDICE

INTRODUCCION . . . . .	1
EL GRANULO DE ALMIDON . . . . .	3
Composición química del gránulo . . . . .	4
MECANISMO DE FORMACION DE UNIONES GLUCOSIDICAS . . . . .	6
MECANISMO DE ACCION DE LAS ENZIMAS SOLUBLES DE LA PAPA QUE INTERVIENEN EN EL METABOLISMO DEL ALMIDON . . . . .	8
Fosforilasa . . . . .	8
Q-enzima . . . . .	9
D-enzima . . . . .	10
T-enzima . . . . .	10
R-enzima . . . . .	11
Z-enzima . . . . .	11
PARTE EXPERIMENTAL . . . . .	12
TECNICAS GENERALES . . . . .	12
PREPARACION DE LOS SUSTRATOS . . . . .	13
UDP-glucosa . . . . .	13
UDP-glucosa-C <sup>14</sup> . . . . .	13
Otros nucleótidos . . . . .	14
Malto-oligosacáridos . . . . .	14
Isomalto-oligosacáridos . . . . .	15
Malto-oligosacáridos-C <sup>14</sup> . . . . .	15
Obtención de la panosa . . . . .	15
-glucósidos . . . . .	16
VALORACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA . . . . .	17
VALORACION DE LA GLUCOSA INCORPORADA . . . . .	18
En el almidón . . . . .	18
En los oligosacáridos . . . . .	18
DETERMINACION DE FOSFORILASA . . . . .	19
DETERMINACION DE PROTEINAS . . . . .	19
INCUBACION CON $\alpha$ -AMILASA . . . . .	19
SEPARACION DE LOS COMPONENTES DEL ALMIDON . . . . .	20

# FOENBA

RESULTADOS . . . . .	21
PREPARACION Y PROPIEDADES DE LA ENZIMA . . . . .	21
Aislamiento del complejo "almidón-enzima" . . . . .	21
Propiedades de la enzima . . . . .	21
Acción de la enzima . . . . .	22
ALMIDON SINTETASA DE DIVERSAS PARTES DE LA PAPA . . . . .	23
Almidón de los brotes de papa . . . . .	23
Almidón interno y externo de la papa . . . . .	24
ENSAYOS DE SEPARACION DE LA ENZIMA DEL GRANULO . . . . .	24
ACTIVADORES E INHIBIDORES . . . . .	24
OTRAS ENZIMAS EN EL GRANULO . . . . .	25
REACCIONES DE LA ENZIMA CON LOS MALTO-OLIGOSACARIDOS . . . . .	27
ACCION DE LOS MALTO-OLIGOSACARIDOS SOBRE EL ALMIDON INTERNO Y EXTERNO DE LA PAPA . . . . .	32
FORMACION DE MALTO-OLIGOSACARIDOS CATALIZADA POR EL ALMIDON INTERNO . . . . .	32
ACCION DE LOS GLUCOSIDOS . . . . .	33
ACCION DE LOS NUCLEOTIDOS . . . . .	36
ENSAYOS CON OTROS TIPOS DE ALMIDONES . . . . .	39
Actividades de los diferentes almidones . . . . .	39
Almidón del maíz waxy . . . . .	42
CONCLUSIONES . . . . .	43
BIBLIOGRAFIA . . . . .	49