

## Tesis de Posgrado

# Estudio de las propiedades de la sacarosa sintetasa de *Helianthus tuberosus*

Wolosiuk, Ricardo Alejandro

1973

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:**

Wolosiuk, Ricardo Alejandro. (1973). Estudio de las propiedades de la sacarosa sintetasa de *Helianthus tuberosus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1470\\_Wolosiuk.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1470_Wolosiuk.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Wolosiuk, Ricardo Alejandro. "Estudio de las propiedades de la sacarosa sintetasa de *Helianthus tuberosus*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1973. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1470\\_Wolosiuk.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1470_Wolosiuk.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE  
LA SACAROSA SINTETASA DE HELIANTHUS TUBEROSUS

AUTOR: RICARDO A. WOLOSIUK

DIRECTOR DE TESIS: HORACIO G. PONTIS

- 1470 -

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN QUIMICA

1973



A MIS PADRES

A AMALIA

## AGRADECIMIENTOS

- . Al Dr. Horacio G. Pontis por la dirección y el apoyo brindado durante la realización del presente trabajo.
- . Al Dr. Carlos E. Cardini del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, por su interés y las sugerencias recibidas en numerosas discusiones.
- . Al Dr. Juan Dellacha de la Fac. Farmacia y Bioquímica (U.N.B.A.) por haberme facilitado el aparato de electroenfocado.
- . Al Ing. Agr. Edgardo R. Montaldi de la Fac. Agronomía (U.N.La Plata) y al Dr. H.L. Maroder del INTA (Castelar) por el constante suministro de tubérculos de *H. tuberosus*.
- . A la Sra. Beatriz Bettinelli por la colaboración prestada a lo largo de todo el trabajo.
- . A las Stas. Leonor Plate y Mónica Moons por su ayuda en la redacción de este trabajo.
- . A todos mis compañeros, que pasaron o se encuentran en el Dto. de Biología de la Fundación Bariloche, por la cooperación suministrada no solamente en la faz bioquímica, sino también humana.

I N D I C E

	Pag.
ABREVIATURAS . . . . .	1.
INTRODUCCION . . . . .	3.
MATERIALES Y METODOS . . . . .	22.
PURIFICACION Y PROPIEDADES GENERALES . . . . .	31.
RESULTADOS . . . . .	48.
DISCUSION . . . . .	81.
REFERENCIAS . . . . .	102.

ABREVIATURAS

. Salvo que se indique específicamente las sales son sódicas.

ADP	:	adenosina 5'-difosfato
ADPG	:	adenosina 5'-difosfoglucosa
AE-celulosa	:	aminoetil-celulosa
ATP	:	adenosina 5'-trifosfato
CDP	:	citidina 5'-difosfato
CDPG	:	citidina 5'-difosfoglucosa
2,4-D	:	ácido 2,4 dicloro-fenóxiacético
DEAE-celulosa	:	dietilaminoetil-celulosa
DTT	:	ditiotreitól
EDTA	:	ácido etilendiamino-tetraacético
GA	:	ácido giberélico
GDP	:	guanosina 5'-difosfato
GDPG	:	guanosina 5'-difosfoglucosa
GTP	:	guanosina 5'-trifosfato
G <sub>u</sub> HCl	:	cloruro de guanidina
HEPES	:	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IAA	:	ácido indolacético
NAD <sup>+</sup> /NADH	:	nicotinamida adenina dinucleótido/su forma reducida
NADP <sup>+</sup> /NADPH	:	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato/su forma reducida
NDP	:	nucleósido 5'-difosfato
NDPG	:	nucleósido 5'-difosfoglucosa
NTP	:	nucleósido 5'-trifosfato

PCMB : p-cloromercuribenzoato  
Pi : ortofosfato  
PPi : pirofosfato  
TDPG : timidina 5'-difosfoglucoza  
tris : tris(hidroximetil)aminometano  
TEAE-celuloza : trietilaminoetil-celuloza  
UDP : uridina 5'-difosfato  
UDPG : uridina 5'-difosfoglucoza  
UMP : uridina 5'-monofosfato  
UTP : uridina 5'-trifosfato

I N T R O D U C C I O N



La sacarosa juega en las plantas superiores un papel importante, puesto que es uno de los productos de la fotosíntesis y constituye, además, el principal compuesto de traslocación, tanto desde las hojas hacia otros tejidos de la planta, como desde los órganos de reserva hacia las partes en formación del nuevo organismo. Por otra parte, en estudios in vitro, se ha observado que la variación de su concentración en el medio de incubación provoca drásticos cambios en los procesos metabólicos y en los esquemas de diferenciación. Por ello se hace necesario el estudio de su metabolismo, el de las enzimas involucradas en el mismo, así como también las modificaciones producidas en dicha actividad enzimática por la presencia de otros metabolitos.

#### ROL DE LA SACAROSA EN LAS PLANTAS SUPERIORES

##### Traslocación

Las plantas superiores son organismos autótrofos a los cuales la radiación solar provee la energía necesaria para la reducción del  $\text{CO}_2$  y la oxidación del  $\text{H}_2\text{O}$ , con la subsiguiente formación de los hidratos de carbono (fotosíntesis). El proceso antedicho es llevado a cabo en el mesófilo, el cual es un tejido especializado de las hojas que presenta la mayor cantidad de cloroplastos por célula (1). Cuando se estudia la incorporación fotosintética de  $^{14}\text{CO}_2$  al mesófilo, la mayor proporción de radiactividad, el 85-90%, se halla

como sacarosa-<sup>14</sup>C; sin embargo el disacárido constituye el 50-60% de los azúcares de la hoja. Por otra parte, en las cercanías de los haces de conducción, la sacarosa, tanto radiactiva como no marcada, representa un 85%. Este último valor es similar al obtenido en la incorporación fotosintética, lo cual sugiere que no todos los azúcares participan en el proceso de transporte de los hidratos de carbono desde las células del mesófilo hacia el floema, y que la sacarosa es el traslocada en mayor proporción (2).

La presencia de azúcares reductores en los haces de conducción, específicamente glucosa y fructosa, podría ser motivada por el método de extracción o por el metabolismo intrínseco de la sección estudiada. Por otra parte tanto el disacárido como las hexosas son compuestos traslocables, pero con diferentes velocidades de transporte, presentando el primero la mayor velocidad (3).

La infiltración de sacarosa-<sup>14</sup>C en hojas de tabaco muestra que este azúcar es traslocado independientemente del lugar donde se aplica. Por el contrario, cuando el material inyectado es glucosa-<sup>14</sup>C o fructosa-<sup>14</sup>C, el porcentaje de sacarosa en la vena principal de la hoja depende del lugar de aplicación de la hexosa; la glucosa y fructosa que se inyectan en el mesófilo, son utilizadas para la síntesis de la sacarosa, que constituye el producto traslocado, en tanto que la inyección de las mismas hexosas en la vena principal hace que sea estos compuestos los que se traslocan (4).

El pasaje de la sacarosa desde el mesófilo hacia el floema, es un transporte contra gradiente, y como tal tiene un requerimiento de energía, siendo el mismo influenciado por inhibidores de la respiración (5). Es por ello que la infiltración de ATP en hojas de remolacha, provoca un aumento de la concentración del disacárido en el floema. El efecto del nucleósido trifosfato es

dependiente de la etapa de crecimiento estudiada, por cuanto el incremento provocado en la traslocación de compuestos es mayor en hojas jóvenes que en las expandidas. (2).

Desde las hojas, la sacarosa es traslocada hacia las "partes nuevas" (brotes, hojas jóvenes) con el fin de mantener el crecimiento de las mismas, y también hacia los órganos de reserva (granos, tubérculos) para ser parte de los compuestos que mantendrán el crecimiento de futuros organismos. Este proceso de traslocación de sustancias desde un órgano hacia otro tiene lugar a través del floema, en el cual el rasgo fundamental es la presencia de estructuras especializadas: las células y los tubos cribosos (1). La composición en azúcares de los exudados de los tubos cribosos se determina mediante el análisis cromatográfico, el cual revela, en 25 especies, la presencia de azúcares no reductores de la serie rafinosa (rafinosa, estaquiosa, verbascosa), además de la sacarosa. Esta última es el azúcar predominante en todas ellas, aun cuando la velocidad de transporte y el origen de la misma parece ser diferente según el ritmo día-noche, puesto que durante el día la sacarosa se origina fundamentalmente en la fotosíntesis y tiene su mayor velocidad de traslocación, la cual decae durante la noche, produciéndose entonces el disacárido a partir de residuos insolubles, ácidos y fosfatos orgánicos (6).

La traslocación de sacarosa en vegetales sería el análogo de la circulación de la glucosa en animales, y esto lleva a preguntarse por qué el disacárido y no la hexosa es el compuesto de circulación en las plantas superiores. La única hipótesis aventurada es la de Arnold (7), el cual ante la falta de diferencias en las propiedades físicas (densidad, viscosidad, presión osmótica, coeficientes de difusión, etc.) de soluciones al 20% de glucosa y sacarosa,

postula que la segunda actúa como un derivado protegido de la primera; para ser un buen producto traslocable sería necesario un derivado no reductor de la glucosa y fácilmente hidrolizable.

#### Modificación de los esquemas de diferenciación

Si bien la sacarosa constituye el principal producto orgánico traslocable en las plantas superiores, se ha visto que produce modificaciones sustanciales sobre otras actividades, en las cuales su función parece no ser la de un simple compuesto que provee energía. Experimentos in vitro, muestran que la diferenciación del tejido vascular está relacionada con su concentración (8), habiéndose observado que la cantidad de xilema inducido en callos de *Parthenocissus tricuspidata* (9), y la variación en el número, tamaño y estructura de los vasos regenerados en callos de *Coleus*, está dada por su concentración en el medio de incubación (8); por otra parte en callos de *Syringa vulgaris*, bajas concentraciones (1,5-2,5%) del disacárido promueven la inducción del xilema, en tanto que mayores (4%) llevan a la inducción del floema (10). Las modificaciones observadas no pueden ser obtenidas reemplazando la sacarosa por otros azúcares, tales como glucosa y fructosa.

Además cuando se cultivan callos de zanahoria (cepa CRT 1), en un medio de Heller con sacarosa al 3%, se producen cambios en la estructura del cloroplasto, supresión de la síntesis de clorófila y disminución del ritmo fotosintético (11-13).

Todos estos resultados permiten sugerir que la sacarosa afecta los mecanismos de diferenciación.

ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN EL METABOLISMO DE LA SACAROSA

Síntesis

En *Pseudomonas saccharophila* se detectó la presencia de la sacarosa fosforilasa, que cataliza la siguiente reacción:



siendo ésta la primera enzima encontrada capaz de sintetizar sacarosa (14,15). Sin embargo la posibilidad de un mecanismo similar en plantas superiores es poco a poco abandonada ante la falta de datos respecto a su existencia. El descubrimiento posterior de los nucleótidos azúcares y su rol en la biosíntesis de la unión glucosídica, hace que se abandone definitivamente aquella posibilidad (16,17).

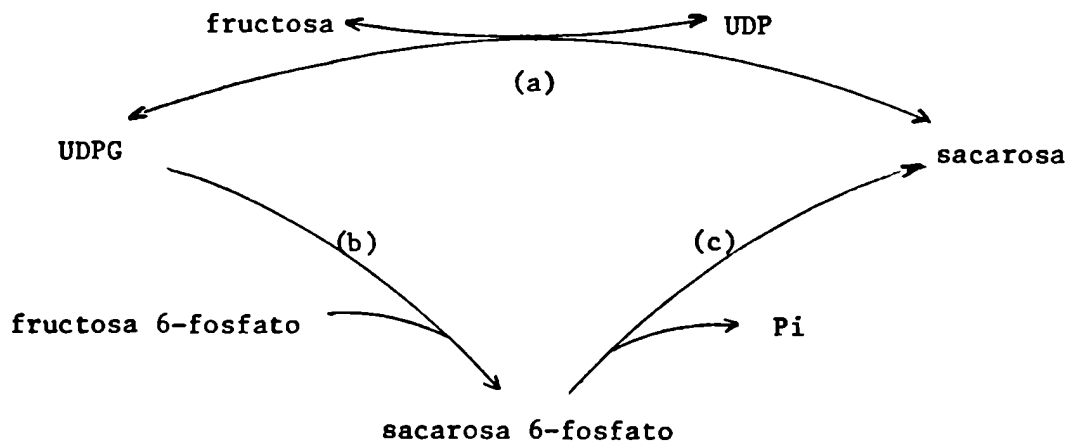
Buchanan (18), mediante la asimilación fotosintética de  $^{14}\text{CO}_2$  por hojas de remolacha, aísla un compuesto marcado, al que identifica como sacarosa 1-fosfato, y por ello emite la hipótesis que la síntesis de la sacarosa se efectúa a partir de UDPG y fructosa 1-fosfato. Por otra parte Cardini y Leloir (19-21) trabajando con germen de trigo obtienen preparaciones que catalizan la transferencia de la glucosa del UDPG a fructosa (sacarosa sintetasa) y a fructosa 6-fosfato (sacarosa 6-fosfato sintetasa) con la subsiguiente formación de sacarosa y sacarosa 6<sup>F</sup>-fosfato respectivamente. Salvando las diferencias que existen en los niveles de cada una de estas enzimas, acorde con el tejido y el estado de desarrollo estudiado, ambas son detectadas en las hojas, los tallos, los órganos de reserva y los cloroplastos aislados.

Es por ello y además debido a que no se obtiene una preparación que catalice

la transferencia sugerida por Buchanan, que la hipótesis del mismo no es considerada (21a).

La sacarosa 6-fosfato es escasamente detectable en tejidos vegetales, en tanto que la sacarosa es uno de los hidratos de carbono predominantes; por ello es sugerida la existencia de una fosfatasa que hidroliza el producto de la acción de la sacarosa 6-fosfato sintetasa. Numerosas fosfatasas inespecíficas provocan esta reacción, sin embargo Hawker y Hatch obtienen y parcialmente purifican a partir de caña de azúcar y zanahoria, una fosfatasa específica para sacarosa 6-fosfato (22).

Por lo tanto la síntesis de la sacarosa en plantas superiores se lograría por dos vías diferentes que involucran un mismo dador de glucosilos, el UDPG.



La reacción (a) es catalizada por la sacarosa sintetasa (UDPG: D-fructosa 2-glucosil transferasa E.C. 2.4.1.13) siendo el aceptor de glucosilos la fructosa. El otro camino se compone de 2 reacciones: la (b) catalizada por la sacarosa 6-fosfato sintetasa (UDPG: D-fructosa 6-fosfato 2-glucosil transferasa

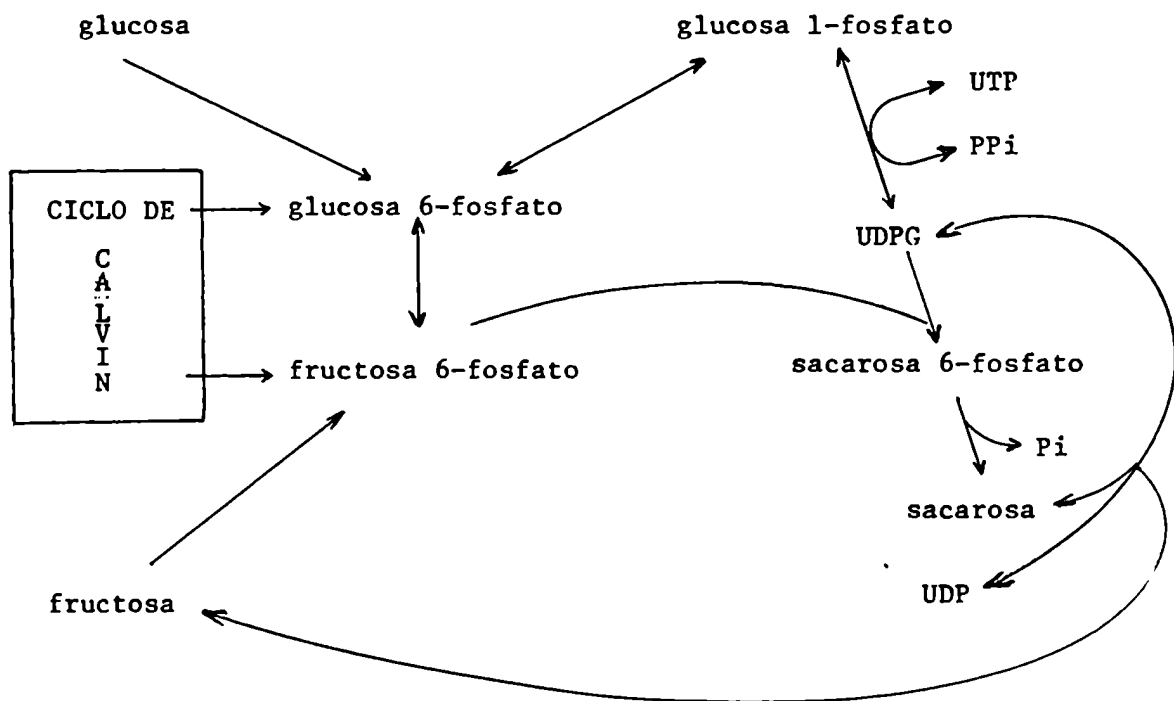
E.C. 2.4.1.14) donde fructosa 6-fosfato es el aceptor de glucosilos, para dar lugar a la formación de sacarosa 6-fosfato, la cual es hidrolizada, en la reacción (c), por una fosfatasa específica.

Ambas sintetetasas pueden ser separadas a partir de un mismo tejido (23,24) y las diferencias entre ellas son sustanciales. La reacción (a) es reversible ( $K_{eq} = 2-8$ ) y en la misma pueden actuar otros nucleótidos-glucosa como dadores de glucosilos, en tanto que la reacción (b) es prácticamente irreversible ( $K_{eq} = 3250$ ) y el UDPG es el único dador de glucosilos; además se presentan diferencias respecto a la susceptibilidad de ambas enzimas a diferentes inhibidores (25). Por otra parte no son reguladas por el mismo mecanismo, ya que el tratamiento de cortes de papa con 2,4-D, produce un aumento de la sacarosa sintetasa, en tanto no afecta a la sacarosa 6-fosfato sintetasa (26).

Cual de los dos caminos, o cual de las dos sintetetasas, es la que in vivo actúa en la síntesis de la sacarosa? La respuesta a esta pregunta puede obtenerse a partir de experimentos donde se estudia la distribución de la radioactividad incorporada a cada uno de los dos monosacáridos constituyentes de la sacarosa, así como también estudiando la distribución de ambas enzimas. La infiltración de glucosa- $^{14}C$  o fructosa- $^{14}C$  en hojas de *Canna indica* da como resultado la producción de sacarosa- $^{14}C$  marcada en ambos monosacáridos, independientemente de cual es el azúcar utilizado; si bien aparecen hexosas-fosfato marcadas, no ocurre lo mismo con los azúcares libres (27); un resultado similar se obtiene con plántulas de trigo incubadas con glucosa- $^{14}C$  (28). Además, efectuando la incorporación fotosintética de  $^{14}CO_2$  se detecta la formación de una sacarosa- $^{14}C$  uniformemente marcada (29).

Por otra parte estudiando la distribución de ambas enzimas en diferentes

tejidos vegetales se observa que la sacarosa 6-fosfato sintetasa muestra mayor actividad que la sacarosa sintetasa en tejidos fotosintéticos (30-32). Cloroplastos de hojas de tabaco, aislados en un medio no acuoso (hexano-Cl<sub>4</sub>C) presentan actividades de ambas enzimas, siendo más activa la sacarosa 6-fosfato sintetasa (30). Sin embargo en cloroplastos de *P. aureus* no se detecta actividad de sacarosa sintetasa, en tanto que la misma es la que existe en los tejidos no-fotosintéticos (raíces, hipocotilos de plantas etioladas) (31). En base a los experimentos anteriores el esquema propuesto para explicar la acción de ambas sintetatas es el siguiente:



De manera tal que la síntesis de la sacarosa se produciría por la acción conjunta de la sacarosa 6-fosfato sintetasa y la fosfatasa, permitiendo de



ese modo la acumulación del disacárido en tanto que la sacarosa sintetasa actuaría en el sentido de clivaje de la sacarosa provocando la formación de NDPG, aunque la  $K_{eq}$  de la reacción indica que la misma se desplaza hacia la síntesis del disacarido (31-33).

### Clivaje

El clivaje de la sacarosa presenta dos reacciones perfectamente diferenciadas. La primera, catalizada por la sacarosa sintetasa, es reversible y tiene como aceptor de la glucosa del disacárido un nucleósido difosfato; en tanto que la segunda, donde el aceptor de la glucosa es el  $H_2O$ , es irreversible, interviniendo en ella las invertasas. Estas últimas muestran dos actividades enzimáticas distintas, las cuales se diferencian debido al pH óptimo y a las constantes cinéticas: la invertasa ácida (pH óptimo 4,5-5,3) y la invertasa neutra (pH óptimo 7,0-8,0). La presencia de ambas sucrasas ha sido observada en tejidos vegetales (34-38,40).

La invertasa neutra es detectada en todos los casos como una enzima soluble que es inhibida por tris, siendo probable que este hecho haya tenido como consecuencia que cuando se ha comunicado la ausencia de sucrasas, se deba a la utilización de dicho buffer. (39). Su actividad puede ser separada parcialmente de la invertasa ácida por fraccionamiento con  $SO_4(NH_4)_2$ .

Los mayores niveles de invertasa ácida se observan en tejidos que crecen rápidamente, encontrándose en los mismos que la actividad enzimática se halla repartida tanto en la fracción soluble como insoluble, y ello lleva a postular su existencia en los tejidos en dos formas, una asociada a la

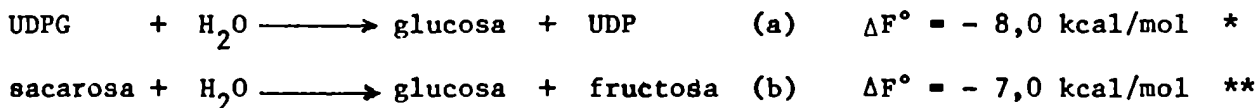
pared celular y la otra libre en el citoplasma . En caña de azúcar y en *P. vulgaris* ambas formas tienen propiedades diferentes, en tanto que en tejidos envejecidos de zanahoria, papa y remolacha la fracción soluble e insoluble presentan características similares (41-45). En estos resultados adquiere importancia el método preparativo utilizado por cuanto en raíz de zanahoria esa distribución es dependiente del pH al cual se efectúa la extracción (45); además se logra solubilizar invertasa ácida de uva usando compuestos que provocan la ruptura o impiden la formación del complejo tannino-proteína, aunque no se consigue hacerlo de cultivos envejecidos de zanahoria y coleoptilos de maíz (46).

### SACAROSA SINTETASA

#### Propiedades de la sacarosa sintetasa

a) Reversibilidad de la reacción: Es la única reacción donde una unión glucosídica sintetizada por un nucleótido-azúcar es formada de una manera reversible. Este hecho tendría su explicación en el alto contenido energético de la sacarosa, el cual es superior a otras uniones glucosídicas como se ve comparando, con fines operacionales, las variaciones de energía libre de hidrólisis correspondientes.

A pH 6,6 y 37°C (47)



\* El  $\Delta F^\circ$  de hidrólisis del UDPG es función del pH, por cuanto aparece un grupo fosfórico secundario. Al pasar de pH 6 a 8 el  $\Delta F^\circ$  sería de - 1,8 kcal/mol.

\*\* En este valor están incluidos - 0,8 kcal/mol correspondientes a la transformación fructosa (piranosa)  $\longleftrightarrow$  fructosa (furanosa)

Restando (b) de (a) se obtiene:



Si en lugar de la sacarosa en la reacción (b) se considerase la variación de energía libre de hidrólisis de otras uniones glucosídicas (48)

	$\Delta F^\circ_{\text{hidrolisis}}$ (kcal/mol)
sacarosa .....	- 6,6
glucógeno (glu $\alpha$ ,1 $\rightarrow$ 4 glu).....	- 4,3
dextrano (glu $\alpha$ ,1 $\rightarrow$ 6 glu).....	- 2,0

llevaría que al restar (b) de (a) en el  $\Delta F^\circ$  final será menor, en valor absoluto, en el caso de la sacarosa que en el de otras uniones glucosídicas.

De ahí que la reversibilidad esté determinada por el hecho de poseer la sacarosa un contenido energético mas cercano al UDPG que el de los restantes compuestos con unión glucosídica.

b) Variación en las bases de los nucleótidos-azúcar: Las enzimas que catalizan reacciones en las que actúan nucleótidos-azúcar muestran especificidad con respecto a la base. Ello se ha comprobado en los diferentes procesos en los cuales intervienen los mismos: modificación en el resto azúcar (epimerización, óxido-reducción) (49), síntesis-degradación de los nucleótidos-azúcar (pirofosforilasas) (50), biosíntesis de polisacáridos (33) y sacarosa 6-fosfato (25).

A diferencia de los casos anteriores la sacarosa sintetasa presenta la peculiaridad de poder actuar frente a distintos nucleótidos -glucosa, lo cual conduce a plantear la posibilidad de que la enzima pueda subdividirse en unidades, donde cada una cataliza la síntesis de sacarosa utilizando un solo nucleótido-azúcar; sin embargo Grimes y colaboradores (51) no pudieron lograr dicho propósito a pesar de utilizar varios métodos (sales, detergentes, solventes orgánicos, enzimas, calor). Los mismos autores hallan que la inhibición entre los diferentes nucleótidos-glucosa no corresponde a una simple inhibición competitiva; el UDPG es siempre el sustrato preferido frente a los otros nucleótidos-glucosa, y al mismo tiempo es el que presenta el menor  $K_i$  con respecto a otros NDPG que el que muestran estos cuando el UDPG es el sustrato.

En la tabla que sigue se presentan las constantes cinéticas de los distintos NDPG determinadas en diferentes tejidos.

Origen	UDPG		ADPG		TDPG		GDPG	
	$K_m$	$V_{m\max}$	$K_m$	$V_{m\max}$	$K_m$	$V_{m\max}$	$K_m$	$V_{m\max}$
P. aureus (51) *	0,21	140	1,8	350	1,7	170	2,5	41
Tapioca (52)**	8,3	6,16	6,7	6,16				
Papa (25)***	1,6	13,3	8,6	7,5	1,0	3,7	2,77	2,6
H.Tuberosus (39)	0,3		0,09					

$K_m$  esta expresada en mM

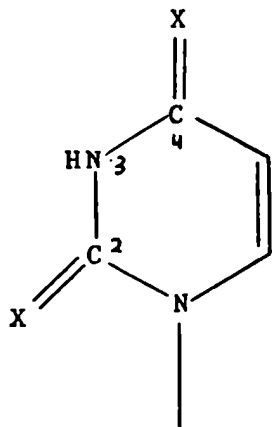
Unidades de  $V_{m\max}$

\* n moles/min/mg.prot.

\*\*  $\mu$  moles/min/mg.prot.

\*\*\*  $\mu$  moles/hr./ml .enz

Budowsky y colaboradores trabajando con análogos del UDPG establecieron que el grupo  $-C^2(X)-N^3H-C^4(X)$  en el resto pirimidina, donde  $X = S$  ó  $O$ , es esencial para la actividad enzimática (53).



Estos autores postulan una estructura secundaria para el UDPG, y las diferencias halladas entre el mismo y sus análogos (6-aza-UDPG y 5,6-dihidro-UDPG) en los cuales no está afectado el grupo reactivo mencionado anteriormente, están dadas por modificaciones en la estabili-

dad de dicha estructura secundaria.

Variaciones en el grupo  $-C^2(X)-N^3H-C^4(X)$  (3-N-metil-UDPG, CDPG e iso-UDPG) anulan la capacidad del compuesto para actuar como sustrato.

Por otra parte determinan que en el caso del ADPG es esencial el grupo  $-N^1-C^6(NH_2)$ , siendo también posible la reducción del C-2' en la ribosa del ADPG, sin perder por ello la capacidad de ser sustrato (54).

Cuando se considera el otro sustrato que interviene en la síntesis de la sacarosa, la fructosa, se observa que la  $K_m$  de la misma varía según el nucleósido difosfato glucosa considerado: 2,0 mM con UDPG, 23,0 mM con ADPG, 35,0 mM con TDPG, CDPG o GDPG. Cada uno de los

nucleótidos-glucosa afectaría la configuración de la enzima en forma diferente y por ende cambiaría la afinidad de la fructosa. De acuerdo con los datos anteriores TDPG, CDPG, y GDPG producirían una conformación similar a la enzima, la cual es distinta siendo el sustrato UDPG (51). Este resultado concordaría con los obtenidos en los estudios de inhibición mencionados anteriormente. Por el contrario, Shukla y Sanwal trabajando con tapioca no encuentran ninguna diferencia entre las Km de fructosa en presencia de UDPG y ADPG, siendo las mismas 2,6 y 2,5 mM respectivamente (52). Estudiando la reacción en el sentido de clivaje de la sacarosa, el UDP es siempre el mejor aceptor de glucosa como se observa en la tabla siguiente, en la cual figuran las Km para diferentes nucleótidos difosfato y sacarosa obtenidos por distintos autores.

Especie	UDP	ADP	sacarosa	
			c/UDP	c/ADP
Beta vulgaris (55) (remolacha)	0,061	0,094	110	
H. tuberosus (39) (topinambour)	0,32		33	
Manihot utilissima (52) (tapioca)	6,6	33,3	10	12,5
Ipomea batatas (56) (batata)	0,13	0,44	31	125
Solanum tuberosum (57) (papa)	1,7	1,3	130	
Phaseolus aureus (58)	0,19	0,19	17	29

Km. está expresada en mM.

Los nucleósidos difosfato que actúan como aceptores de glucosa adquieren importancia ante la posibilidad de la reacción de proveer los distintos nucleótidos-glucosa para la síntesis de polisacáridos (59,60); pero a pesar de las diferencias existentes en las Km del UDP, según los tejidos estudiados, éste es siempre el sustrato preferido sobre los otros nucleósidos difosfato.

c) pH óptimo: El pH óptimo de la actividad de la sacarosa sintetasa varía de acuerdo al sentido de reacción considerado.

	síntesis	clivaje
papa (25).....	7, 5-8,5	6, 5-7,5
remolacha (55).....	6, 0-7,5	6, 0-6,5
batata (56).....	7,5	6,0
tapioca(52).....	7,5	7,5
papa (57) .....	8,8	6,6

En términos generales el pH óptimo para la síntesis de la sacarosa se encuentra entre 7,5 y 9,0, en tanto que para el clivaje se halla entre 6,0 y 7,5.

d) Modificación de la actividad por iones bivalentes: El  $Cl_2Mn$  presenta, midiendo la reacción en el sentido de síntesis, un efecto dual sobre la sacarosa sintetasa de papa; a bajas concentraciones activa, revirtiéndose el efecto a medida que se aumenta la concentración, siendo finalmente inhibitorio. Estudiada en el sentido anterior, pero en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, la actividad sube hasta dos veces y luego declina sin producirse inhibición. Si el sentido de reacción es el clivaje de la sacarosa, en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, el  $Cl_2Mn$

presenta inhibición en todo momento (57). Estudios más precisos en batata muestran que las concentraciones activadoras de la sal antedicha provocan una disminución de la  $K_m$  de UDPG y fructosa, en tanto que la  $K_i$  de UDP, el cual es un inhibidor de la sacarosa sintetasa en el sentido de síntesis, no es afectada (56).

Además  $Cl_2Ca$ ,  $Cl_2Mg$  y  $Cl_2Ba$  son activadores en el sentido de formación de la sacarosa e inhibidores en la dirección inversa (25, 56, 57, 61).

e) Efecto de diferentes metabolitos: Cuando se estudia la modificación introducida por un compuesto sobre la actividad enzimática de la sacarosa sintetasa es necesario especificar el sentido de reacción, por cuanto el efecto del metabolito varía acorde con la dirección estudiada.

Síntesis: Los nucleósidos monofosfato, difosfato y trifosfato inhiben la formación de sacarosa (25, 52, 56, 61, 66). Otros inhibidores de la sacarosa sintetasa en el sentido en consideración son: clorogénico, shikímico, solanina, glucosa,  $\beta$ -fenilglucósidos y productos de la oxidación de los fenoles (25, 52, 61).

Clivaje: Los nucleósidos mono y trifosfato son inhibidores competitivos de la enzima de remolacha (55); idéntico efecto se observa en *P. aureus* con UTP pero en presencia del mismo y  $Cl_2Mg$  existe una activación(61). En este último material los azúcares fosfato no tienen ningún efecto y lo mismo ocurre con la glucosa en



remolacha (55-61); sin embargo en V. faba se encuentra que ambos inhiben cuando se incuban con sacarosa en concentraciones no saturantes (63). La modificación de la actividad enzimática por algunos metabolitos depende de iones bivalentes; en presencia de  $Cl_2Mg$  el PPI activa el clivaje, en tanto que la fructosa 1-fosfato lo inhibe, produciéndose una situación inversa cuando se mide la síntesis de sacarosa; ausente el  $Cl_2Mg$  no hay variaciones. Por otra parte existen compuestos cuyo efecto no depende de la presencia de iones bivalentes: IAA, GA,  $NAD^+$ ,  $NADP^+$ ; en este último caso la modificación parece depender del potencial redox por cuanto la actividad enzimática varía según la relación  $NADP^+/NADPH$  (61).

f) Modificación del contenido de sacarosa sintetasa en el tejido:

Los niveles de la sacarosa sintetasa en un tejido varían acorde con el tratamiento efectuado al mismo. El envejecimiento de cortes de papa produce un aumento de la actividad, que no es inhibido por cloranfenicol; el agregado de 2,4-D en ese sistema produce un aumento aún mayor en el nivel de la enzima, el cual es inhibido por cloranfenicol. Ello lleva a postular dos procesos; la activación de una enzima preexistente en el primer caso, y la síntesis de novo en el segundo (26). Idéntico efecto de las auxinas se ha observado en explantos de *H. tuberosus*, los cuales al ser tratados con 2,4-D presentan un aumento de la actividad enzimática proporcional a la concentración de la hormona en el medio de incubación (64). Otros tratamientos tales como radiaciones  $\gamma$  (65) y luz (31) también provocan cambios en los niveles de

enzima.

Por otra parte durante los procesos en los cuales se modifica el estado fisiológico de un organismo se producen variaciones en los niveles de sacarosa sintetasa (67-70). Considerando el desarrollo del tubérculo de papa, se halla que la actividad enzimática aumenta en el proceso de tuberización hasta alcanzar un máximo, el cual se mantiene constante hasta que el tubérculo adquiere un cierto grado de madurez, produciéndose entonces una disminución (70).

Precedentemente se han mencionado los aspectos de la sacarosa sintetasa, que muestran a ésta enzima como singular entre todas las que intervienen en la formación de una unión glucosídica: la fácil reversibilidad de la reacción y la variedad de NDPG y NDP que participan en ella. El primer punto representaría una manera de conservar la energía de la unión glucosídica de la sacarosa, la cual sería perdida si fuese una invertasa la enzima actuante; además la diversidad de NDP constituiría una forma de suministrar los diferentes NDPG que actúan en la síntesis de polisacáridos.

Por lo tanto, debido a la importancia que en plantas superiores, esta enzima tiene en el metabolismo de la sacarosa, el presente trabajo está dirigido hacia su purificación, así como también al estudio de sus propiedades.

MATERIALES Y METODOS

## PURIFICACION DE LA ENZIMA

### Tubérculos de Helianthus tuberosus

Fueron provistos por INTA (Castelar) y Fac. de Agronomía (La Plata). También se utilizó una partida proveniente de una granja cercana a Copenhague (Dinamarca), la que fué transportada por vía aérea a San Carlos de Bariloche. Una vez en el laboratorio se colocaban en arena húmeda y eran conservados a 0-4°C hasta su utilización.

### Preparación del homogenato

Todas las operaciones fueron llevadas a cabo a una temperatura de 0-4°C.

Método a: Los tubérculos de Helianthus tuberosus se pelaron y luego se rebanaron en fetas; éstas se homogenizaron en una licuadora con 2 volúmenes de buffer tris-ClH pH 8,0 0,1 M, EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM, CNK 5 mM, durante 1 minuto. Se filtró a través de 3 capas de muselina, descartándose el residuo, y el filtrado se centrifugó a 10.000 g por 10 minutos. Se desechó el precipitado.

Método b: Los tubérculos de H. tuberosus se pelaron y se rallaron en un rallador de vidrio con gotas de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se filtró a través de 3 capas de muselina y el filtrado se centrifugó a 10.000 g por 10 minutos. Se descartó el precipitado y se ajustó el pH del sobrenadante a 7,5 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 M.

### Fraccionamiento con sulfato de amonio

Al sobrenadante obtenido en la centrifugación de 10.000 g por 10 minutos, se

le agregó lentamente  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  sólido hasta 20% de saturación bajo constante agitación, la cual se mantuvo por 30 minutos luego de haber finalizado el agregado de sal. Se centrifugó a 20.000 g por 20 minutos, descartándose el precipitado. El sobrenadante se llevó a 65% de saturación con sulfato de amonio, manteniéndose el pH entre 7,2-7,5 mediante el agregado de  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 M. Se centrifugó a 20.000 g por 20 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en buffer tris-ClH pH 8,0 0,02 M, EDTA 0,1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM (buffer A) (el volumen de buffer agregado es 1/20 del volumen obtenido en la homogenización). Se lo dializó contra el mismo buffer, con dos cambios, durante toda la noche, y luego se centrifugó a 100.000 g por 1 hora, descartándose el precipitado.

#### Cromatografía en DEAE-celulosa

Veinticuatro ml del sobrenadante anterior se colocaron en una columna de DEAE-celulosa (2 x 18 cm) equilibrada con buffer A y se eluyó con un gradiente lineal de ClNa (440 ml de ClNa 0,05 M en buffer A - 440 ml de ClNa 0,5 M en buffer A). El flujo a través de la columna era de 72 ml/hr. y las fracciones obtenidas de 4 ml.

#### Electroenfocado preparativo

Las fracciones activas obtenidas en la cromatografía en DEAE-celulosa se juntaron y se dializaron contra buffer tris-Cl pH 8,0 2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM, durante toda la noche. En una columna Ampholine LKB 8102 de 440 ml.,

con un gradiente de sacarosa (5-40%) cuya concentración de anfolito (pH 5-8) era 1%, se distribuyeron 100-120 mg de proteína. La composición de las soluciones electródicas fueron las siguientes: anódica (+):  $\text{PO}_4\text{H}_3$  conc. 0,8 ml.,  $\text{H}_2\text{O}$  56 ml., sacarosa 48 gr.; catódica (-): 0,4 gr. de NaOH en 40 ml. de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se electroenfocó por 45 hrs. a 4°C (77).

Se eluyó, se analizó el pH de las fracciones, y las mismas se dializaron individualmente contra tris-maleato pH 7,0 0,02 M, EDTA 0,1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM, sacarosa 0,05 M, durante toda la noche con dos cambios de buffer, determinándose luego la actividad por el método b. La enzima fué conservada en el buffer antedicho hasta su utilización.

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

##### Sacarosa sintetasa

Método a: Es utilizado para medir la reacción en el sentido de la síntesis de la sacarosa; la cantidad de disácarido formada se determina mediante el reactivo del ácido tiobarbitúrico, luego de destruir la fructosa remanente con NaOH (71).

La mezcla de incubación, 50  $\mu\text{l}$ , contenía los siguientes componentes: UDPG 0,25  $\mu\text{moles}$ , fructosa 0,50  $\mu\text{moles}$ ; buffer tris-ClH pH 8,0 5  $\mu\text{moles}$ ; la enzima y los compuestos correspondientes cuando se estudió el efecto de los mismos sobre la actividad enzimática. Se incubó a 30°C por diferentes tiempos y la reacción se interrumpió por el agregado de 0,2 ml de NaOH 0,5 N; el

blanco era una mezcla de incubación que no contenía UDPG, el cual se agregó luego de haber añadido NaOH. Se calentó a baño maría durante 10 minutos y se enfrió rápidamente. Se añadió 0,6 ml del reactivo de ácido tiobarbitúrico y se calentó a 100°C por 7 minutos. Se enfrió y se leyó la densidad óptica a 432 m $\mu$ . El ácido tiobarbitúrico utilizado fué purificado de acuerdo al método de Waravdekar-Saslaw (80).

Método b: La determinación del poder reductor de la fructosa mediante el reactivo de Somogyi-Nelson, permite medir la actividad de la sacarosa sintetasa en el sentido de clivaje de la sacarosa (72).

Los componentes de la mezcla de incubación (50  $\mu$ l) fueron: UDP 0,25  $\mu$ moles; sacarosa 10  $\mu$ moles; buffer tris-maleato pH 6,5 5  $\mu$ moles; la enzima y los componentes cuya influencia se deseaba conocer. Se incubó a 30°C por distintos tiempos y se detuvo la reacción mediante el agregado del reactivo de Somogyi; el blanco de incubación estaba constituido por la mezcla anterior, pero sin UDP, el cual se añadió luego del reactivo de Somogyi. Se calentó a 100°C por 20 minutos, se agregó el reactivo de Nelson y se leyó la densidad óptica a 520 m $\mu$  o 660 m $\mu$ , según la cantidad de fructosa formada.

Método c: Si en el método a un compuesto cuyo efecto se deseaba estudiar, interfería en la determinación de sacarosa con el ácido tiobarbitúrico, entonces se utilizaba la medición de la sacarosa-<sup>14</sup>C formada a partir de UDPG-<sup>14</sup>C. La mezcla de incubación se componía de: UDPG-<sup>14</sup>C 0,25  $\mu$ moles (actividad específica variable); fructosa 0,50  $\mu$ moles; buffer tris-ClH pH 8,0 5  $\mu$ moles; la enzima y el metabolito cuyo efecto se iba a estudiar, siendo el volumen final de 50  $\mu$ l. Se incubó a 30°C por diferentes tiempos y se detuvo la

reacción calentando a 100°C por 1 minuto. El blanco era la mezcla anterior, sin el UDPG-<sup>14</sup>C, el cual se agregó luego de parar la reacción. Se añadió 0,5 µmoles de sacarosa y se sembró en un papel Whatman 3MM. Se corrió por 20 hrs. en cromatografía descendente con butanol: piridina: H<sub>2</sub>O (6:4:3). Se recortaron las zonas que coincidían con un patrón de sacarosa y se midió la radioactividad de las mismas en un líquido de centelleo cuya composición era 4 g PPO 0,3 g POPOP en 1 lt. de tolueno.

Método d: Si durante la determinación del clivaje de sacarosa existía interferencia en el método de Somogyi-Nelson, entonces se medía el UDPG-<sup>14</sup>C formado a partir de sacarosa-<sup>14</sup>C.

El medio de incubación 50µl. se componía de: UDP 0,25 µmoles; sacarosa-<sup>14</sup>C 10 µmoles (actividad específica variable) ; buffer tris-maleato pH 6,5 5 µmoles; la enzima y los componentes cuya influencia se deseaba determinar. Se incubó a 30°C por diferentes tiempos. Se paró la reacción calentando a 100°C por 1 minuto. El blanco de incubación fué la misma mezcla sin el UDP, el cual se añadió luego de hervir. Se agregó 0,25 µmoles de UDPG, se sembró en papel de Whatman 3MM y se corrió en cromatografía descendente por 20 hrs., utilizando como solvente etanol: NH<sub>4</sub>OH pH 3,9 1 M (7:3). Las zonas del papel que coincidieron con el UDPG patrón se recortaron y se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido con la mezcla mencionada en el método anterior.

#### Invertasa neutra

Durante el proceso de purificación de la sacarosa sintetasa de *H. tuberosus* se detectó la presencia de una invertasa neutra (pH óptimo 7,5) la cual es,



inhibida por tris.

Para determinar dicha actividad en los diferentes preparados, estos se dializaron previamente contra buffer fosfato de Na pH 7,0 20 mM, y luego se incubaron a 30°C por 15 minutos, en un medio que contenía: sacarosa 10  $\mu$ moles; buffer HEPES pH 7,6 5  $\mu$ moles y la enzima, siendo el volumen final de 50  $\mu$ l. Los azúcares reductores formados se determinaron por el método de Somogyi-Nelson.

### Fosfatasa

La presencia de fosfatasa en la preparación de la enzima interfiere hidrolizando el sustrato, el producto o el compuesto cuya influencia se quiere determinar. Por ello se midió la actividad de las mismas en una mezcla de incubación compuesta de: sustrato (azúcar fosfato, nucleósido di- o trifosfato) 0,5  $\mu$ moles, buffer tris-maleato pH 6,2 5  $\mu$ moles y la enzima, en un volumen final de 50  $\mu$ l. El Pi liberado se determinó por el método de Fiske-SubbaRow (73).

### DETERMINACION DE PROTEINAS

Método de Lowry (74): Se introdujo al mismo las modificaciones indicadas por Oyama y Eagle (75), utilizando como patrón una solución albúmina bovina cristalizada.

Método de Warburg y Christian (76): Se midió la densidad óptica a 260 m $\mu$  y 280 m $\mu$ .

### ELECTROENFOCADO

Método a: Se efectuó en una columna Ampholine LKB 8101 de 110 ml, utilizándose un gradiente lineal de glicerol (5-60%), con una concentración de anfólito (pH 3-10 ó 5-8) 1%. La proteína (20 mg), previamente dializada contra buffer tris-ClH 2 mM, mercaptoetanol 0,1 mM, se distribuyó en todo el gradiente y se sometió a electroenfocado por 45 hrs. a 4°C (77).

Método b: Se utilizó el aparato de electroenfocado en microescala diseñado por Godson (78). La proteína (0,1-0,5 mg) se distribuyó en un gradiente de glicerol (5-60%) con una concentración de anfólito (pH 5-8) 1%, y se aplicó al mismo 400 volt por 15 hrs. a 4°C.

En ambos métodos la solución anódica (+) estaba constituida por glicerol 80%,  $\text{PO}_4\text{H}_3$  0,09 M, y la solución catódica (-) por NaOH 0,25 N. Se eluyó, se analizó el pH de las fracciones y se determinó la actividad enzimática mediante el método a.

### DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

En una columna de Sepharose 6B (2 x 48 cm), equilibrada con buffer tris-ClH pH 7,4 0,05 M, se colocó 1 ml de una mezcla que contenía 2 mg de creatina quinasa, 2 mg de aldolasa, 2,5 mg de catalasa y 5 mg de tiroglobulina, eluyéndose con el buffer anterior a una velocidad de 10,2 ml/hr. y recogiendo fracciones de 1,02 ml. Se determinó  $\text{DO}_{230}$  en todos los casos, y catalasa fué verificada midiendo  $\text{DO}_{405}$ .

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis se realiza de acuerdo con las indicaciones efectuadas por Gabriel (79). En la parte superior de una columna vertical (0,66 x 7 cm), de gel de poliacrilamida al 5%, obtenida por fotopolimerización, se pusieron 100  $\mu$ l de una solución al 10% de sacarosa que contenía 1 mg de proteína, disueltos en el buffer superior, y 10  $\mu$ l de azul de bromotimol. A 4°C circuló una intensidad de 3 mA/tubo, durante 2 hrs.

Las proteínas se detectaron por teñido durante 1 hr. con una solución de Amido Schwarz al 1% en ácido acético al 7%. La eliminación del exceso de colorante se efectúa por lavado durante 33 hrs. (cambios cada 11 hrs.) con ácido acético al 7%.

PURIFICACION Y PROPIEDADES

---

GENERALES

En lo que sigue se describen las observaciones efectuadas mientras era llevada a cabo la purificación.

#### Evidencias de dos formas de la sacarosa sintetasa

En la fig. 1-a se observa que la elución de la sacarosa sintetasa, en columnas de DEAE-celulosa, no es una curva simétrica. Esta asimetría se mantuvo a pesar de modificarse el pH (7,0-7,4-8,0) y la fuerza iónica del buffer (0,05 M - 0,10 M - 0,20 M) en el medio de extracción, el gradiente de ClNa utilizado en la elución (0,05 M a 0,2 M - 0,05 M a 0,5 M - 0,05 M a 1,0 M), así como también el material soporte de la columna (AE- y TEAE-celulosa). Si la elución obtenida en la cromatografía en DEAE-celulosa resultase de la superposición de diferentes formas de sacarosa sintetasa, que poseen distintas movilidades, entonces la recorrida de una zona de elución, en idénticas condiciones, mantendrá su posición original. Para ello se escopieron 2 zonas, indicadas como A y B en el gráfico de la fig. 1-a las cuales se dializaron y se concentraron por diálisis con vacío en sacos de colodio, siendo luego recromatografiadas bajo las mismas condiciones que el original. Cada una de las zonas seleccionadas emergió en el efluente en una posición similar a la que le dió origen (fig. 1-b, 1-c)

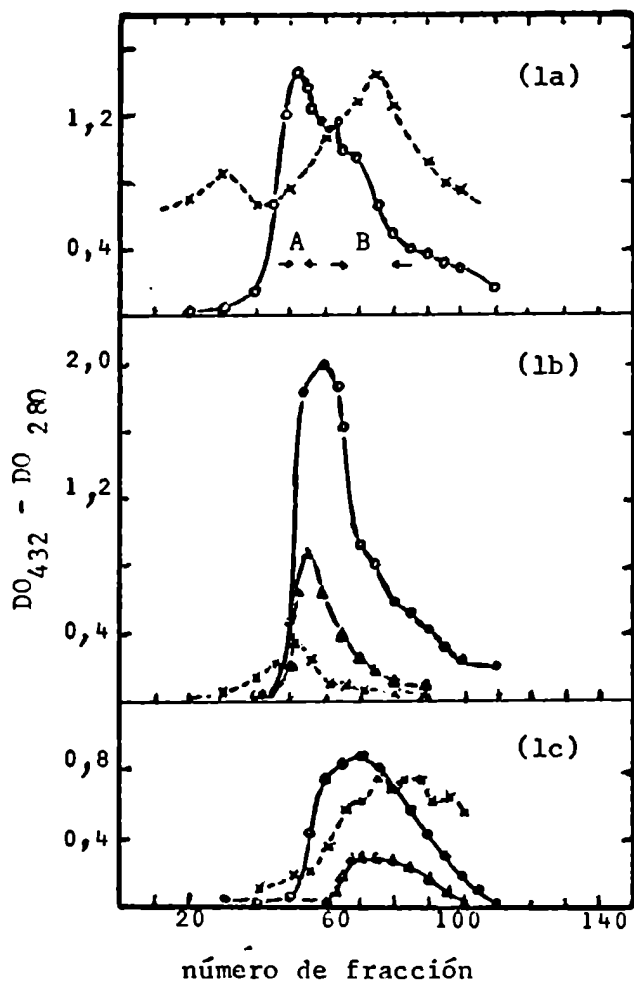


Fig. 1. Cromatografía de la fracción  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  en DEAE-celulosa. La cromatografía se efectuó de acuerdo a lo indicado en métodos y la actividad de las fracciones se determinó mediante el método a. ● Primera recromatografía; ▲ segunda recromatografía; x proteína ( $E_{280}$ )

En la fig. 2 se muestra la separación de las dos formas por electroenfocado. La fracción que precipita con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  entre 20-65% de saturación se sometió previamente a electroenfocado con un rango amplio de pH (3-10) determinándose el pI en el cual se encontraba la actividad de la sacarosa sintetasa; luego al acortarse el rango de pH del anfólito (5-8) aparecieron dos picos con actividad de sacarosa sintetasa cuyos pI eran 5,5 y 5,9.

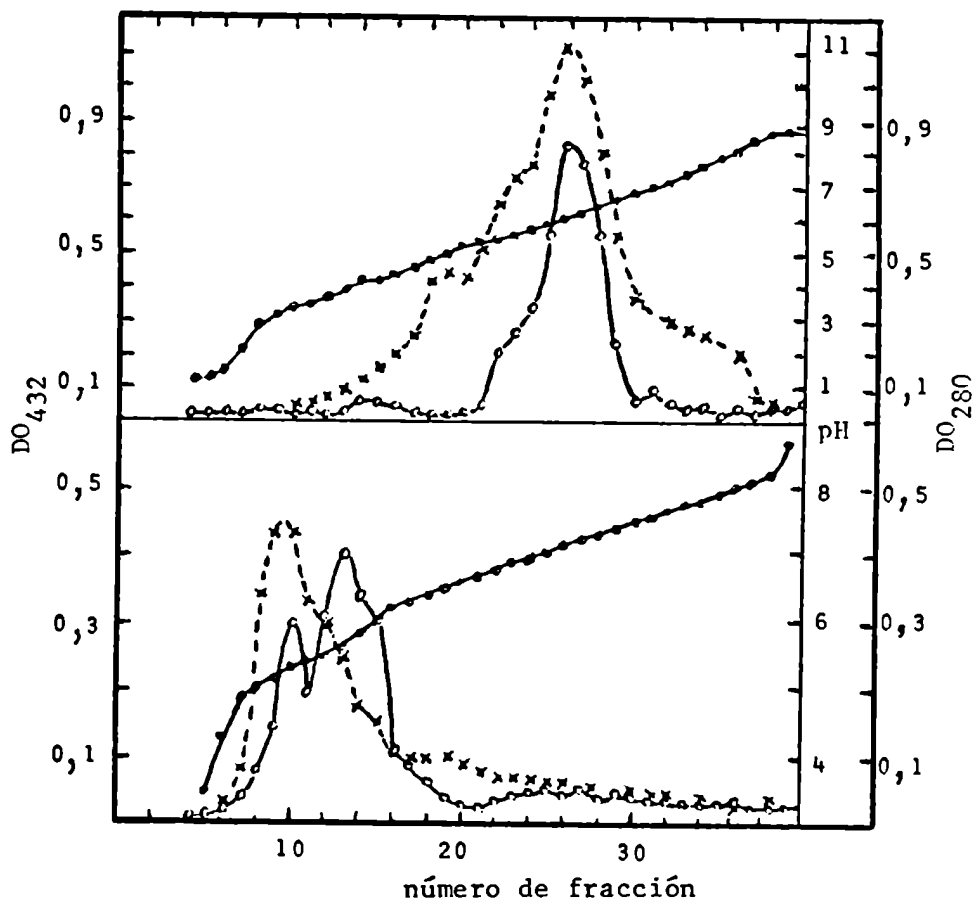


Fig. 2. Electroenfocado de la fracción de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ . El electroenfocado se efectuó de acuerdo al método a y se determinó la actividad (○) según el método a, el pH (●) y la densidad óptica a 280 nm (×)

Los gráficos de la fig. 3 demuestran que los resultados obtenidos en columnas de intercambio iónico concuerdan con los hallados por electroenfocado. Se efectuó una corrida en DEAE-celulosa, se escogieron las fracciones A y B y se las sometió por separado a electroenfocado. La fracción A dió un pico de actividad a pH 5,9, en tanto que la B presentó dos, uno a pH 5,5 y el otro a pH 6,0; la presencia de dos actividades en este último caso se debería al hecho de provenir de una zona de la columna de DEAE-celulosa en la cual el primer componente (pI 5,9) se hallaría como contaminante de la fracción escogida.

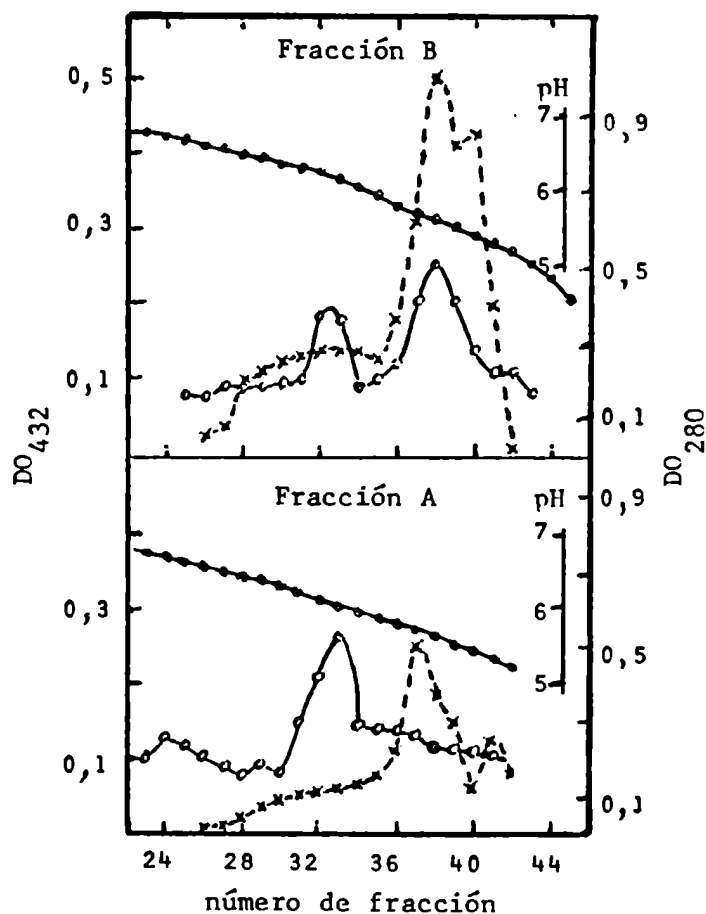


Fig. 3. Electroenfocado de las fracciones A y B. Se utilizó el método b de electroenfocado. Se recogieron fracciones de 0,25 ml y la actividad se determinó por el método a. • pH; ○ actividad enzimática; ×  $DO_{280}$



Los resultados anteriores sirvieron de base al método que fué utilizado para preparar las 2 formas de la sacarosa sintetasa con el objeto de estudiar las propiedades estructurales y cinéticas, así como también la acción de diferentes metabolitos. Se siguió, de acuerdo a lo indicado en métodos, el siguiente esquema de purificación: Las proteínas que precipitan entre 20-65% de saturación con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  se las sometió a cromatografía en DEAE-celulosa, se separaron las zonas A y B indicadas anteriormente, y cada una de ellas fué sometida a electroenfocado 2 veces, escogiéndose en el primer caso la actividad enzimática que se encontraba en pI 5,9 y en el segundo la que se hallaba en pI 5,5. (fig. 4)

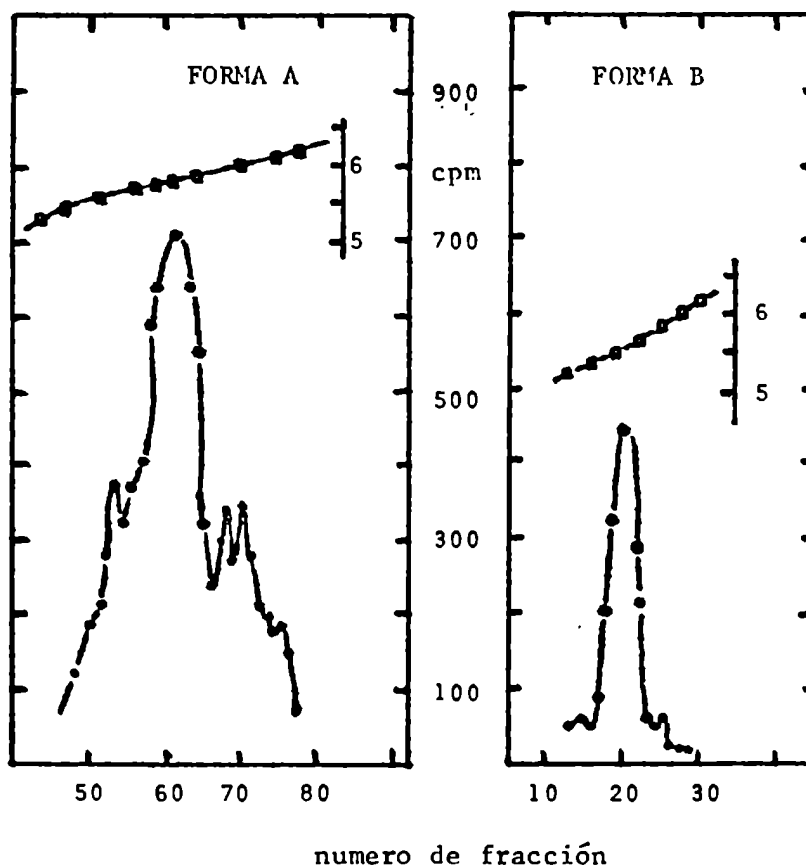


Fig. 4. Electroenfocado de las fracciones A y B. El electroenfocado se realizó de acuerdo al método preparativo. Se midió el pH ( $\square$ ) de las fracciones y la actividad de las mismas ( $\bullet$ ) se determinó por el método d.

De esta manera se logró una purificación de 150 veces para la forma A y de 120 veces para la forma B, encontrándose ambas libres de fosfatasa e invertasa.

Constantes cinéticas de las formas A y B

Las constantes de Michaelis para cada una de las formas de la sacarosa sintetasa se indican en la tabla I, habiendo sido determinadas, en ambos sentidos de la reacción, mediante el método de Lineweaver-Burk (81).

TABLA I

CONSTANTES DE MICHAELIS DE AMBAS FORMAS DE LA SACAROSA SINTETASA

Sustrato variable	Km (mM)	
	A	B
UDP	0,9	0,3
UDPG	1,0	0,4
fructosa	4,7	2,5
sacarosa	56,0	200.0

Propiedades de las formas A y B

El efecto que sobre ambas formas de la sacarosa sintetasa tienen reactivos que afectan la estructura proteica se ve en la tabla II. De acuerdo a ello la desnaturalización por urea y la alteración de los grupos -SH provoca cambios sobre las formas A y B que cuantitativamente son distintos.

TABLA II

EFEECTO DE UREA Y PCMB SOBRE LAS FORMAS A Y B DE LA SACAROSA SINTETASA

REACTIVO	Inhibición %	
	A	B
Urea 4 M	69,5	95,1
PCMB 0,46 mM	52,5	76,6

Ambas formas (0,1 mg de proteína) fueron preincubadas con el correspondiente reactivo a 30°C por 5 minutos. Luego se ensayó actividad según el método a.

Con el objeto de observar si entre ambas formas de sacarosa sintetasa existen diferencias en la susceptibilidad a diversos metabolitos, se ensayaron los siguientes en el rango 2-20 mM: nucleótidos-azúcar (ADPG, GDPG, UDP-xilosa, UDP-glucurónico, UDP-N-acetilglucosamina), nucleósidos-trifosfato (UTP, ATP, GTP), azúcares (glucosa, fructosa, manosa, galactosa, rafinosa), azúcares fosfato (glucosa 1-fosfato, glucosa 6-fosfato, fructosa 6-fosfato, fructosa 1,6 difosfato), glucósidos (arbutina, salicina,  $\beta$ -fenilglucósido), aminoácidos (histidina, serina, alanina, lisina, treonina, glutámico, glutamina, aspártico).

En ningún caso se detectaron diferencias significativas.

Tampoco hubo diferencias en el pH óptimo, tanto en el sentido de síntesis como en el de clivaje de la sacarosa, ni existieron modificaciones en la actividad de una forma por la presencia de la otra.

Las diferencias entre ambas formas de la sacarosa sintetasa estuvieron dadas por las constantes cinéticas y la susceptibilidad a reactivos que afectan la estructura proteica, en tanto que frente a distintos metabolitos se vió que ambas formas se comportaban de manera similar.

El hecho que la forma A fuese la que se obtiene en mayor cantidad (unidades y mg. de proteina), así como también que una forma no influyese sobre la otra hizo que se continuase el estudio de la sacarosa sintetasa con la forma A.

En lo que sigue toda vez que se menciona a la sacarosa sintetasa nos estaremos refiriendo a la forma A.

#### PURIFICACION Y PROPIEDADES GENERALES DE LA ENZIMA

El esquema de purificación señalado en métodos fué utilizado para la sacarosa sintetasa, siendo la forma A separada de la B por electroenfocado, de acuerdo con las indicaciones precedentes (tabla III)

TABLA III

PURIFICACION DE LA ENZIMA

Procedimiento	Volumen (ml)	Unidades / ml	Total de Unidades	Proteina (mg / ml)	Unidades/ mg prot.	Rendimiento %	Purificación
homogenato dializado	305	38,4	11.712	9,45	4.08	100	1
sobrenadante							
20.000g x 20 minutos	300	45,6	13.680	7,20	6,30	117	1,5
1) $\text{SO}_4(\text{NH}_4)$ 20-65%							
2) sobrenadante de $10^5$ g x 60 minutos	57,0	223,2	12.720	27,9	8.04	108	2,0
DEAE-celulosa (fracción A)	140	21,0	2.940	0,32	66	25	16.1
electroenfocado pH 5-8	19	99,6	1.890	0,16	624	16,2	153

Unidad:  $\mu\text{mol}$  fructosa formada/hr.

La preparación obtenida mantiene constante su actividad específica luego de ser sometida a filtración por gel y DEAE-celulosa, y muestra una sola banda en electroenfocado en gel de poliacrilamida. Por el contrario la electroforesis en gel de poliacrilamida, revelado por Amido Schwarz, mostró la presencia de dos bandas (fig. 5)

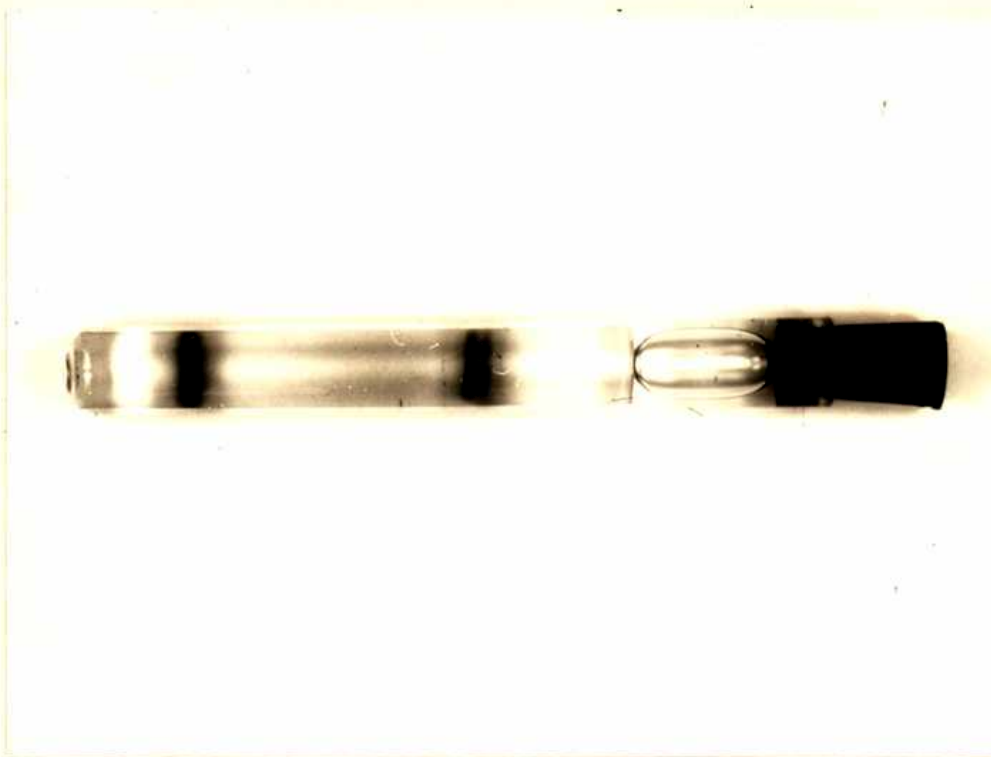


Fig. 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Se efectuó la misma de acuerdo a lo indicado en métodos.

### Estabilidad

La enzima conservada a 0-4°C en tris-maleato pH 7,0 0,02 M, β-mercaptoetanol 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, sacarosa 0,05 M perdió un 30% de su actividad en el término de 8 meses. En el medio mencionado anteriormente pudo ser liofilizada reteniendo su actividad, pero ésta disminuyó un 75% cuando fué congelada y des- congelada.

### Determinación del peso molecular

Los resultados de la fig. 6 muestran que la sacarosa sintetasa posee un peso molecular de 420.000. El mismo fué obtenido por cromatografía a través de una columna de Sepharose 6B. A tal efecto se utilizaron como patrones de comparación: creatina quinasa (P.M. 80.000), aldolasa (P.M. 150.000), catalasa (P.M. 240.000), y tiroglobulina (P.M. 660.000).

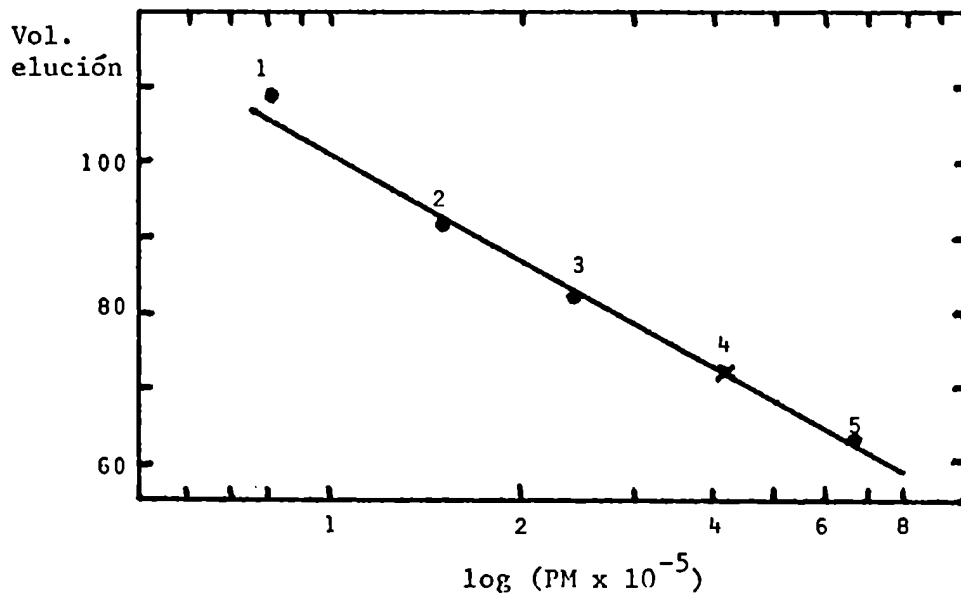


Fig. 6. Determinación del peso molecular. Se efectuó de acuerdo con las condiciones descritas en métodos; 1 creatina quinasa; 2 aldolasa; 3 catalasa; 4 sacarosa sintetasa; 5 tiroglobulina

### Cinética

En todos los casos que se indica la actividad enzimática, esta fué proporcional a la cantidad de enzima y al tiempo de incubación, habiendo sido medida la misma, tanto en el sentido de clivaje como en el de la síntesis de la sacarosa, al respectivo pH óptimo.

### pH óptimo

De acuerdo a lo que se observa en la fig. 7 el pH óptimo depende del sentido de reacción considerado. Cuando se analizó el clivaje de la sacarosa, el pH óptimo de la enzima fué 6,0-6,5, en tanto que en la síntesis lo fué de 7,5-8,0

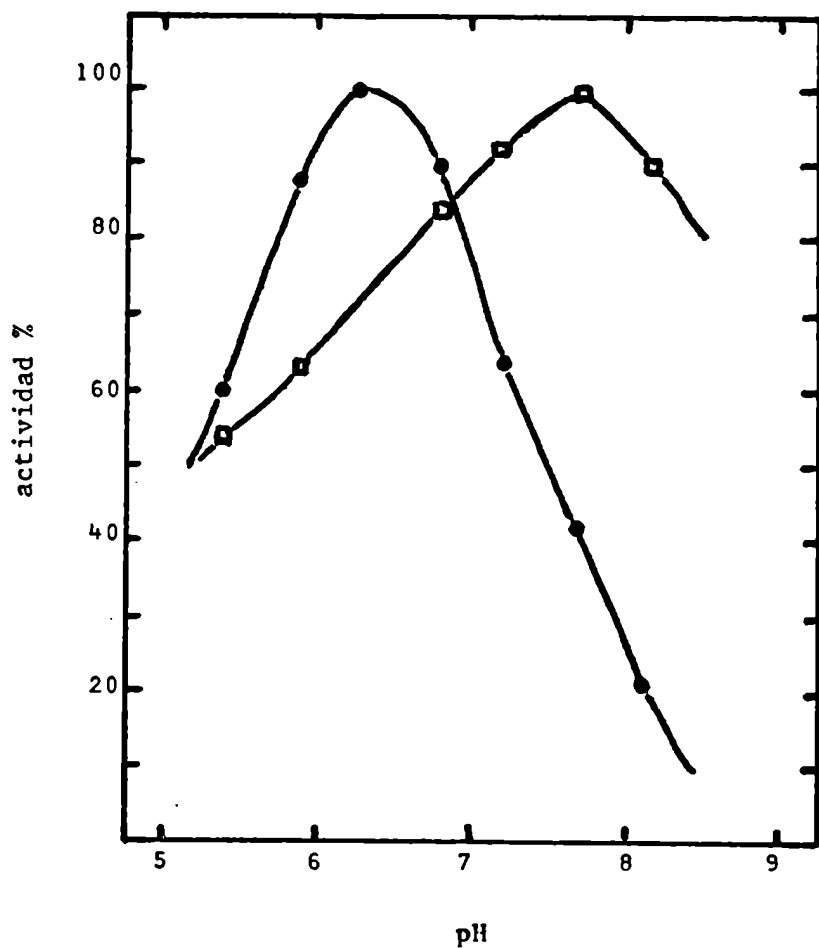


Fig. 7. pH óptimo. La actividad se determinó según los métodos a y b reemplazando los buffer indicados en los mismos por tris-maleato, a diferentes pH, con una concentración final de 0,1 M. • clivaje; □ síntesis.



Acción de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima

En la fig. 9 está representada la actividad remanente luego que la enzima fue-  
ra sometida a diferentes temperaturas.  $T_{1/2}$  (temperatura a la cual la activi-  
dad enzimática cae al 50% del valor máximo) osciló entre 48-52°C, cualquiera  
fuese el sentido de reacción estudiado.

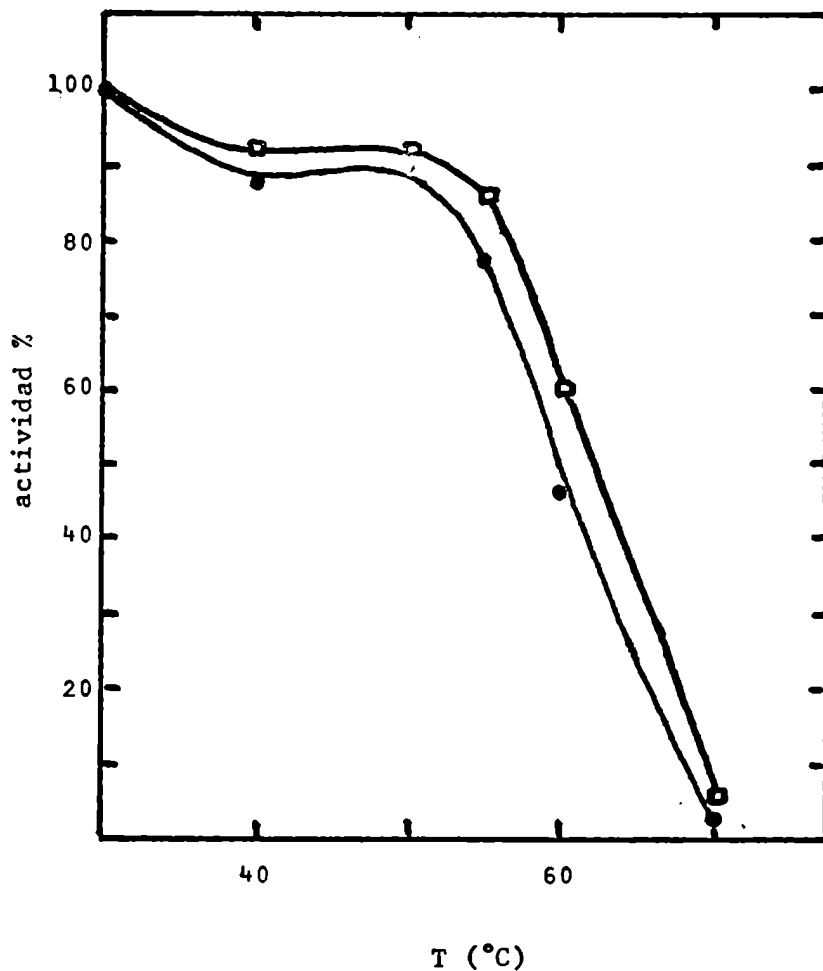


Fig. 9. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad. La enzima se dializó durante toda la noche contra buffer tris-maleato pH 7,0 20 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM, EDTA 0,1 mM. Se sometió por 5 minutos a las temperaturas indicadas, se enfrió rápidamente y se determinó la actividad por los métodos a y b. • clivaje; □ síntesis.

### Efecto del ClNa

La presencia del ClNa en el medio de incubación modificó la actividad enzimática de la sacarosa sintetasa. En la fig. 8 se observa que una concentración 1 M en el medio de incubación produjo una disminución del 50% de la actividad. Por el contrario, cuando se preincubó la enzima con ClNa 1 M (conc. final) y luego se dializó contra buffer tris-ClH pH 8,0 0,02 M, se recuperó totalmente la actividad.

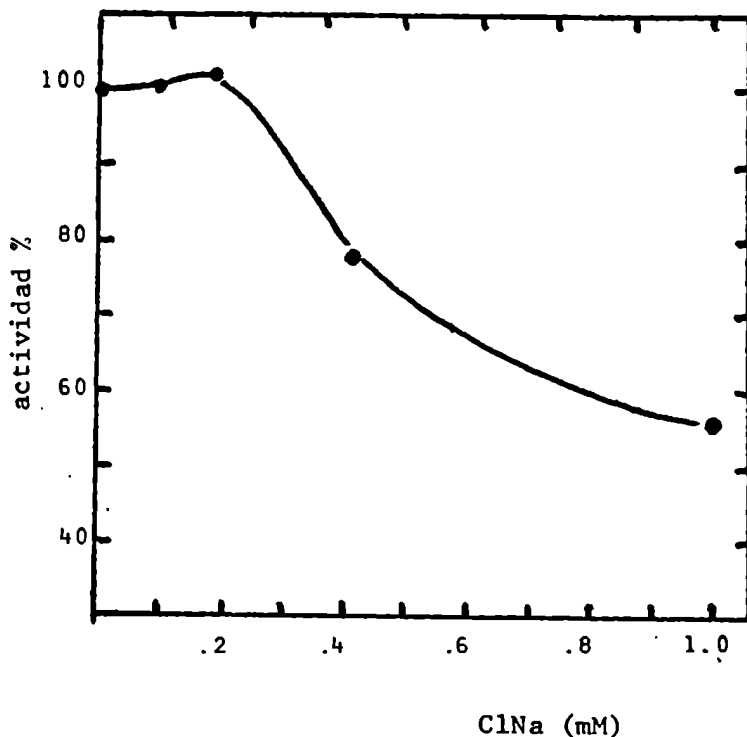
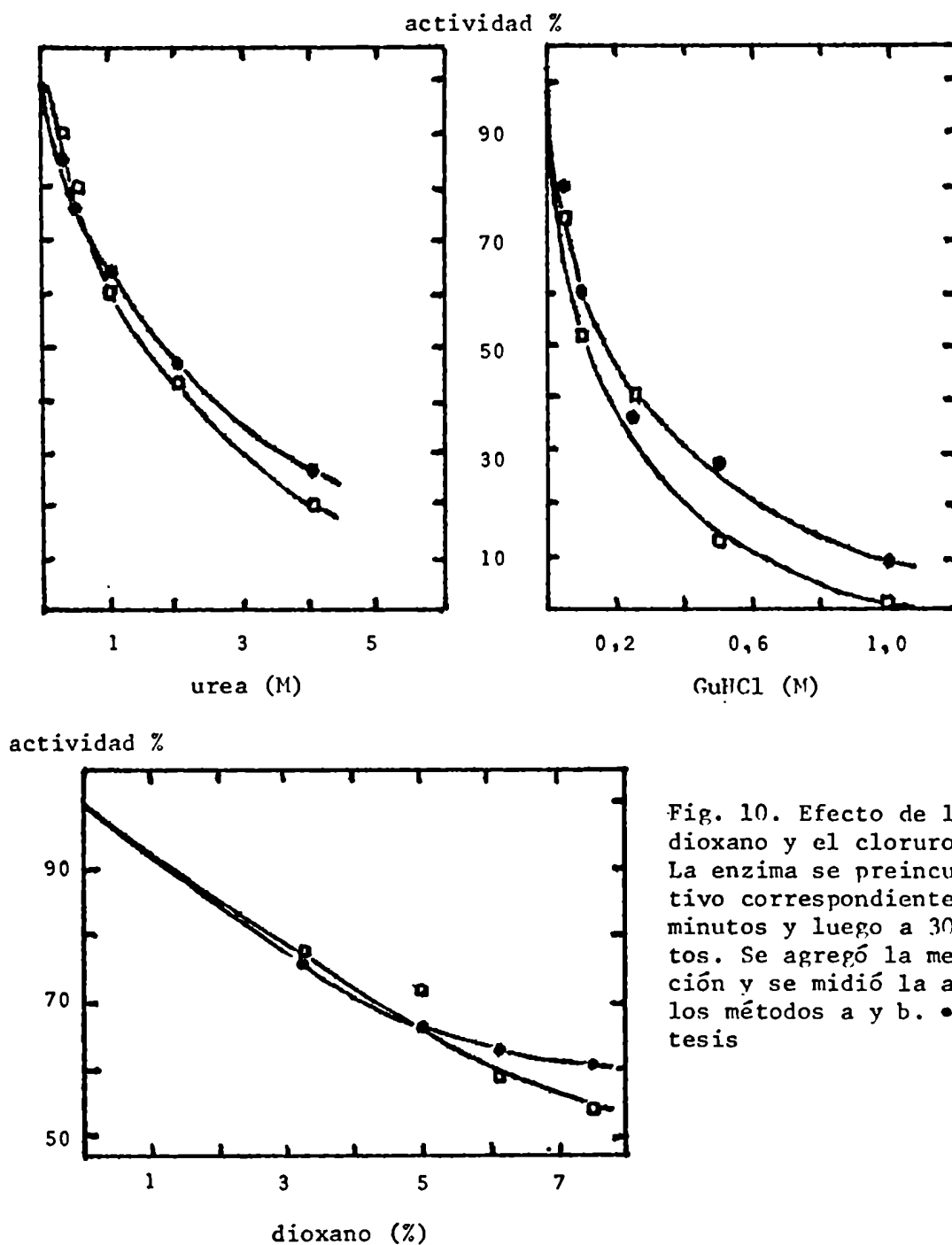


Fig. 8. Efecto del ClNa. Se determinó según el método a.

Efecto de la urea, el dioxano y el cloruro de guanidina

La urea, el dioxano y el cloruro de guanidina cuya acción altera la estructura de la enzima nativa, provocaron modificaciones que condujeron a una disminución de la actividad, cualesquiera fuese el sentido de reacción estudiado (fig. 10)



Efecto del p-cloromercuribenzoato (PCMB)

Sobre ambos sentidos de la reacción el PCMB provocó la disminución de la actividad enzimática (fig. 11); luego la misma depende de grupos -SH, por cuanto fue sensible a compuestos que reaccionan con dichos grupos.

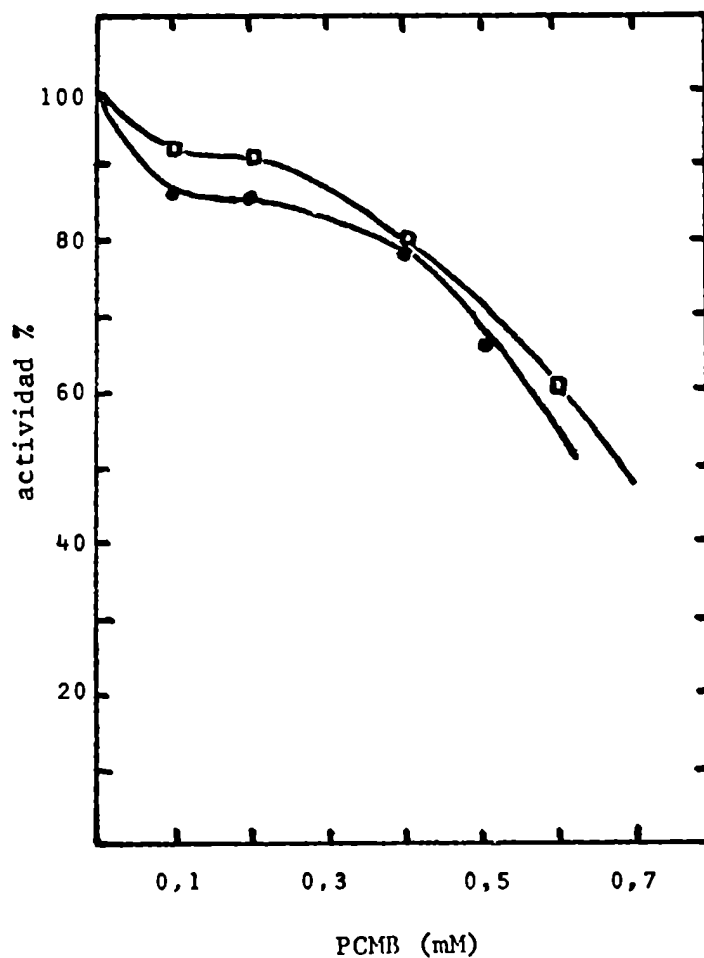


Fig. 11. Efecto del p-cloromercuribenzoato. La enzima fué preincubada con diferentes concentraciones de PCMB a 30°C por 5 minutos y luego se determinó su actividad con los métodos a y b. • clivaje; □ síntesis

RESULTADOS

## MODIFICACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

### A) ENZIMAS PROTEOLITICAS

#### Acción de la tripsina sobre la sacarosa sintetasa

En la fig. 12 se muestra la acción de la tripsina sobre la actividad enzimática de la sacarosa sintetasa medida en los sentidos de síntesis y clivaje de la sacarosa. La proteólisis provocó, luego de una incubación de 15 minutos, una reducción del 30% de la velocidad medida en el sentido de síntesis y de un 70% en la del sentido de clivaje.

A los efectos de poder comparar las modificaciones producidas por la acción de la tripsina sobre la sacarosa sintetasa respecto a la enzima no tratada, se definió un coeficiente que relacionaba las actividades enzimáticas de la sacarosa sintetasa en un sentido y en el otro. SSAR = velocidad de la sacarosa sintetasa en el sentido de clivaje/velocidad de la sacarosa sintetasa en el sentido de síntesis. En el gráfico inserto en la fig. 12 se observan las variaciones del SSAR por el efecto de la tripsina.

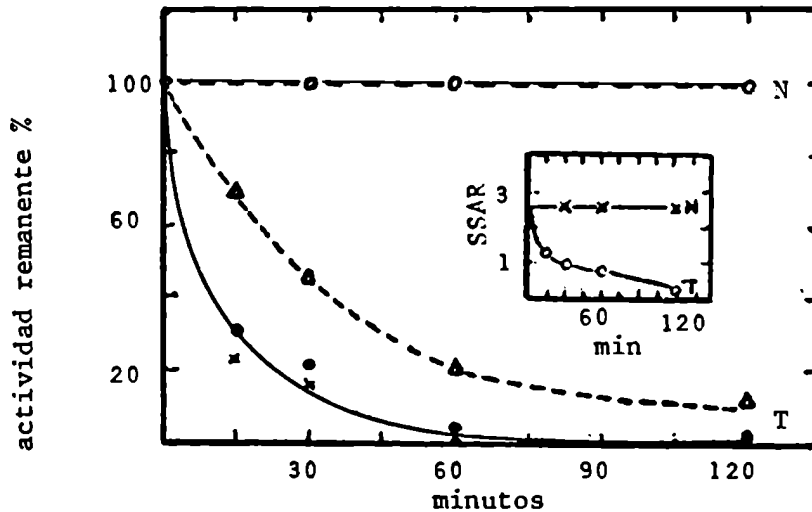


Fig. 12. Acción proteolítica de la tripsina sobre la sacarosa sintetasa. Se incubó a 30°C 0,2 ml de enzima (2 mg proteína) con 0,2 ml de buffer HEPES pH 7.1 0,2 M que contenía 0,16 mg de tripsina. A los tiempos indicados se extrajeron alícuotas y se determinó la actividad por los métodos a (Δ), b (•) y c (x) en presencia de 0,5 mg de inhibidor de tripsina de soja; N enzima nativa; T enzima tratada con tripsina

La presencia de los sustratos durante la digestión trípica no modificó el esquema indicado en la fig. 12, siendo el producto obtenido estable a 0°C durante 15 días (el SSAR no se alteró).

Este efecto es peculiar de la tripsina por cuanto la acción de otras enzimas proteolíticas no produjo el efecto diferencial sobre las velocidades directa e inversa de la sacarosa sintetasa, ya que la utilización de quimotripsina y papaína no provocó ninguna diferencia en la velocidad de inactivación (fig. 13)

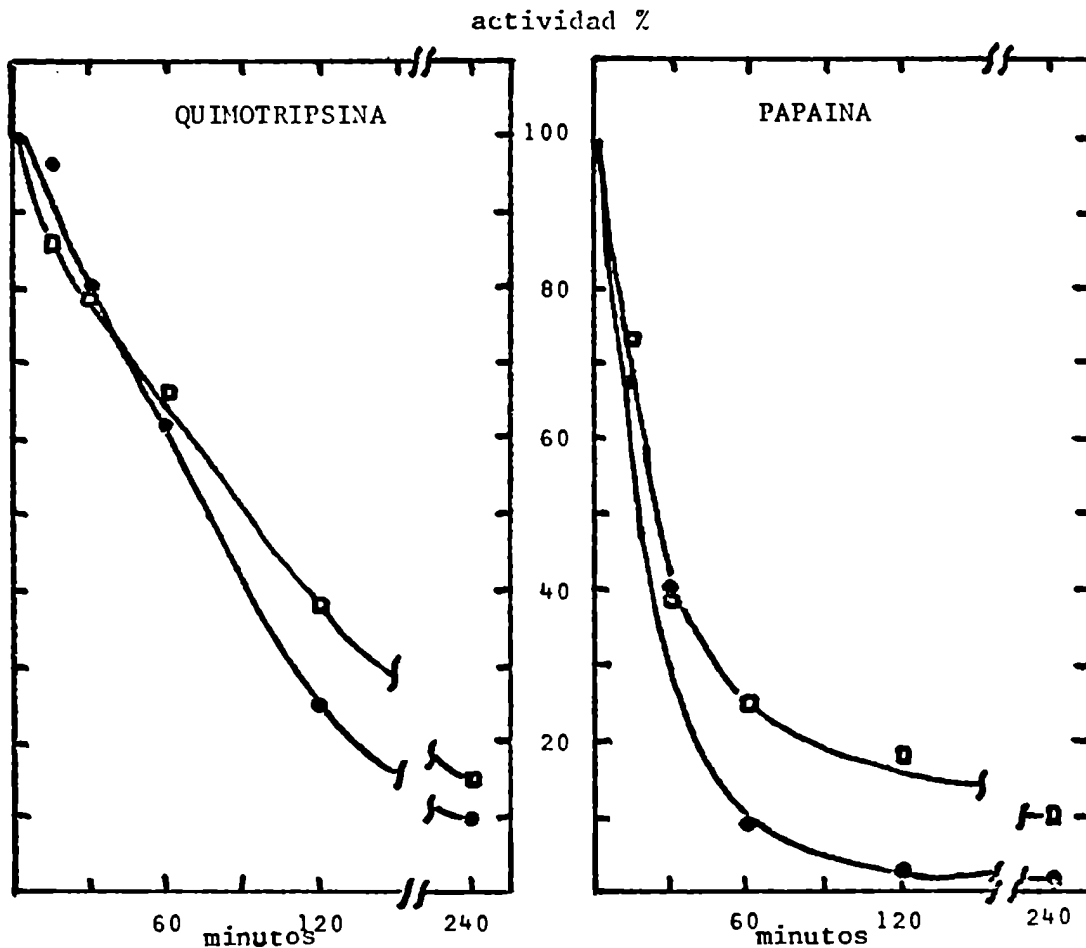


Fig. 13. Efecto de la quimotripsina y la papaína. Se incubó a 30°C 0,2 ml de enzima (2 mg de proteína) con 0,2 ml de buffer HEPES pH 7,1 0,2 M que contenía 0,16 mg de quimotripsina en un caso y 0,05 mg de papaína en el otro. A los tiempos indicados se extrajeron alícuotas y se midió la actividad por los métodos a y b en presencia de 0,1 mg de inhibidor de tripsina de soja.  
• clivaje; □ síntesis

El tratamiento de la enzima con tripsina se efectuó también sobre las fracciones precipitadas con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , en el rango de 20-65% de saturación de *Phaseolus aureus* y *Pisum sativum*. Los resultados expuestos en la tabla IV indican que la acción de la tripsina sobre las velocidades de las 2 especies fué similar a la de *H. tuberosus*.

TABLA IV

EFFECTO DE LA TRIPSINA SOBRE LA SACAROSA SINTETASA DE VARIAS ESPECIES

Espece	Enzima	SSAR
H. tuberosus (tubérculos)	Nativa	2,60
	Tratada con tripsina	0,93
P. aureus (plántulas de 5 días)	Nativa	0,74
	Tratada con tripsina	0,42
P. sativum (semillas inmaduras)	Nativa	1,03
	Tratada con tripsina	0,31

Las enzimas se extrajeron de acuerdo al método a de preparación del homogenato. Se fraccionó entre 20-65% de saturación con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ . A 30°C por 15 minutos se incubó: 0,2 ml de enzima y 0,2 ml de buffer HEPES pH 7,1 0,2 M que contenía 0,16 mg de tripsina. Se determinó actividad por los métodos a y b en presencia de 0,1 mg de inhibidor de tripsina de soja.



Sometido el digerido triptico de *H. tuberosus* a una cromatografía en columna de Bio-Gel P300, se vió (fig.14) que el esquema obtenido difería de la enzima no tratada, apareciendo un pico que migraba detrás de la enzima nativa cuya actividad de clivaje se encontraba reducida.

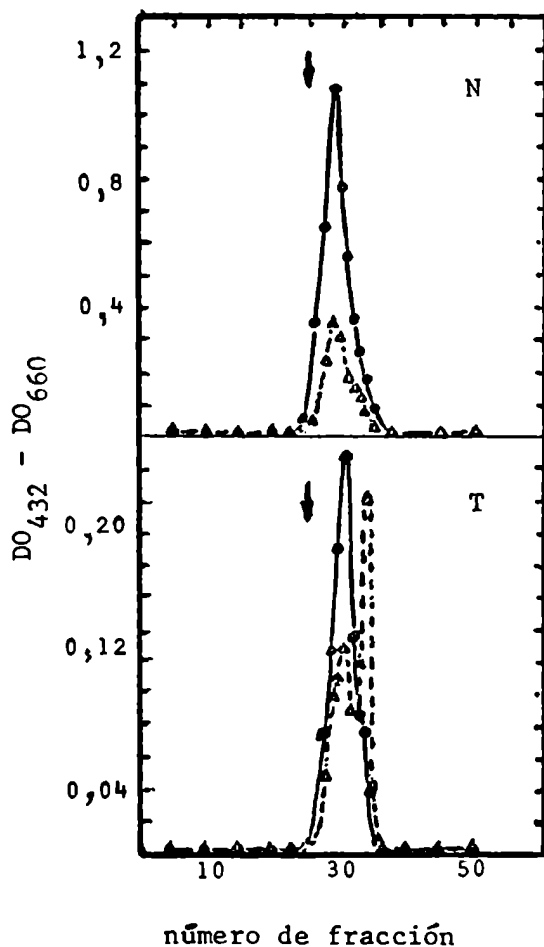


Fig. 14. Filtración por gel de la enzima nativa y la tratada con tripsina. La sacarosa sintetasa fué digerida con tripsina durante 15 minutos. Iguales cantidades de enzima original (2 mg de proteína) se colocaron en una columna de Bio-Gel P-300 (2 x 45 cm.) equilibrada con buffer Tris-ClH pH 7,4 0,05 M, EDTA 1 mM, eluyéndose con el mismo buffer y recogiendo fracciones de 1,15 ml, siendo el flujo 0,1 ml/min. La figura superior (N) representa el perfil de elución de la enzima nativa, en tanto que la inferior (T) es la tratada con tripsina. La flecha indica la fracción donde comienza a eluirse el azul dextrano. • actividad de clivaje determinada por el método b; Δ actividad de síntesis medida por el método a.

La actividad en función del tiempo, de la enzima no tratada con respecto al digerido trípico, fué diferente según el sentido de reacción estudiado (fig. 15). La variación fué igual para ambas formas cuando la actividad era medida en el sentido de la síntesis de sacarosa, pero el digerido trípico presentó menor velocidad respecto a la enzima no tratada cuando se estudió el clivaje de la sacarosa.

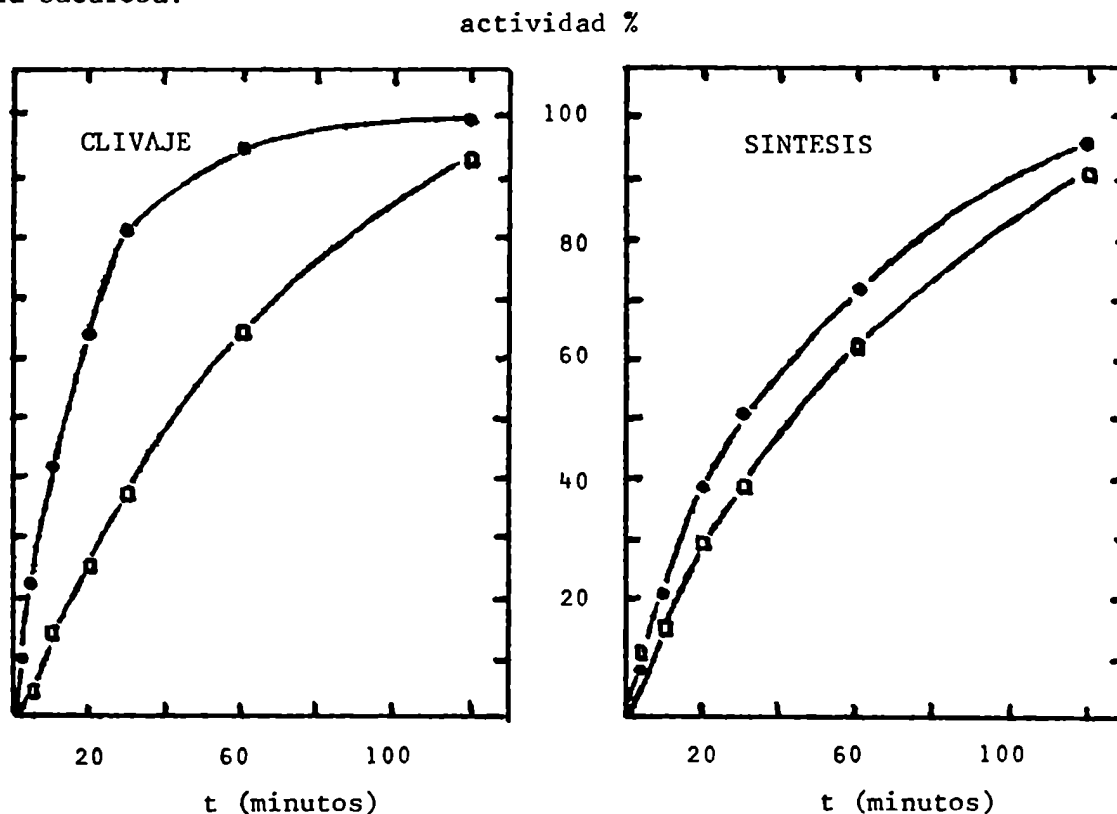


Fig. 15. Curva de tiempo del digerido trípico. Preparación del digerido trípico: Se incubó a 30°C, 1 ml de enzima, 0,5 ml de tripsina (1 mg/ml) y 0,1 ml de buffer HEPES pH 7,1 1,0 M. Al cabo de 5 minutos se detuvo la acción de la tripsina por el agregado de 0,4 ml de inhibidor de tripsina de soja (10 mg/ml). Determinación de la actividad: Clivaje: la mezcla de incubación contenía en un volumen final de 0,4 ml : 80  $\mu$ moles de sacarosa, 2  $\mu$ moles de UDP, 40  $\mu$ moles de buffer tris-maleato pH 6,5 y 0,04 ml de enzima nativa o 0,08 ml del digerido trípico. Se incubó a 30°C y a los tiempos indicados se extrajo 0,05 ml de la mezcla y se determinó la fructosa formada por el método de Somogyi-Nelson. Síntesis: Se incubó a 30°C, en un volumen final de 0,4 ml una mezcla que contenía: 2  $\mu$ moles de UDPG, 4  $\mu$ moles de fructosa, 40  $\mu$ moles de buffer tris-ClH y 0,04 ml de enzima nativa o 0,08 ml del digerido trípico. A los tiempos indicados se extrajeron 0,05 ml de la mezcla y se midió la sacarosa formada con el reactivo de ácido tiobarbitúrico. ● enzima nativa; □ enzima tratada con tripsina.

De los experimentos anteriores se desprende que la acción de la tripsina se produce fundamentalmente sobre la actividad de clivaje, lo que lleva a determinar de que manera dicho efecto modifica las constantes cinéticas en la dirección mencionada. Así se vió que no existe diferencia en la  $K_m$  de UDP entre la enzima nativa y el digerido trípico, en cambio se encontraba alterada la forma hiperbólica de la curva velocidad vs. sustrato, pasando la  $K_m$  de 56 mM para la enzima nativa a 200 mM para el producto de la digestión trípica (fig. 16)

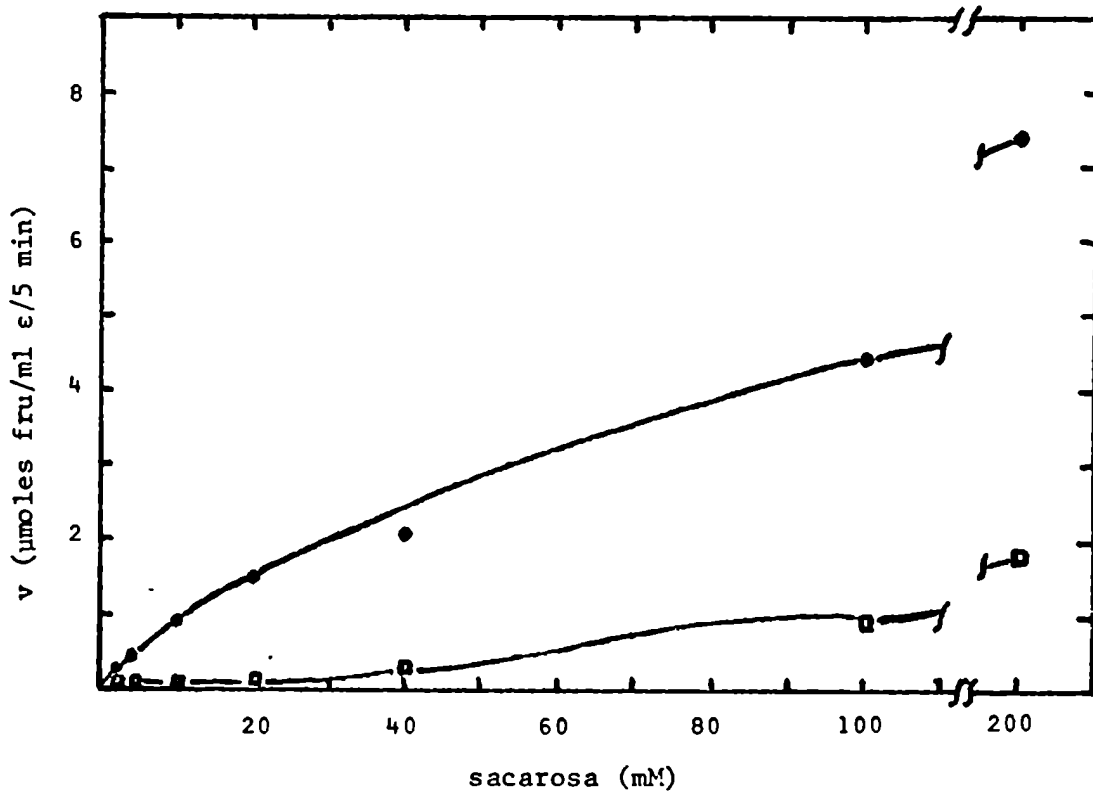


Fig. 16. Comparación de las  $K_m$  de la enzima nativa y la tratada con tripsina. • enzima nativa; □ enzima tratada

B) EFFECTO DE DIFERENTES COMPUESTOS

Acción de los nucleósidos di- y trifosfato

Los nucleósidos difosfato pueden, mediante la sacarosa sintetasa, formar nucleótidos-glucosa a partir de sacarosa, siendo el UDP siempre el sustrato preferido, siguiéndole luego en orden de importancia, el ADP y finalmente con actividades escasamente detectables el GDP y el CDP (tabla V)

TABLA V

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE CLIVAJE DE LA SACAROSA  
CON DIFERENTES NUCLEOSIDOS DIFOSFATO

Nucleósido difosfato	% actividad
UDP	100
ADP	15
GDP	3
CDP	0,8

En el método b se utilizaron los NDP indicados en la tabla, siendo la concentración final de los mismos 5 mM.

La diferencia entre el UDP y el ADP no varió a pesar de efectuar la incubación en presencia de numerosos compuestos (piridoxal fosfato, ácido fosfoglicérico, intermediarios del ciclo de Krebs, amino ácidos, azúcares fosfato) o por diferentes tratamientos efectuados a la enzima (urea, sales, dioxano) (tabla VI)

TABLA VI

EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON DIOXANO

Condición	Actividad enzimática ( $\mu$ moles fructosa/ml $\epsilon$ /hr)	
	UDP	ADP
enzima nativa	138 (100)	30 (100)
enzima preincubada con dioxano	90 (65)	18 (60)

La enzima se preincuba en buffer tris-maleato pH 6,5 0,1 M, sacarosa 0,2 M, dioxano 8%, primero durante 30 minutos a 0°C y luego por 5 minutos a 30°C. La reacción se inició por el agregado del NDP, y se determinó la actividad por el método b. Entre paréntesis figura la actividad porcentual.

A diferencia de los anteriores que constituyen sustratos, los nucleósidos trifosfato inhibieron la actividad de clivaje de la sacarosa sintetasa. Nuevamente aquel en el cual la base fué uridina presentó el mayor efecto sobre la enzima (fig 17)

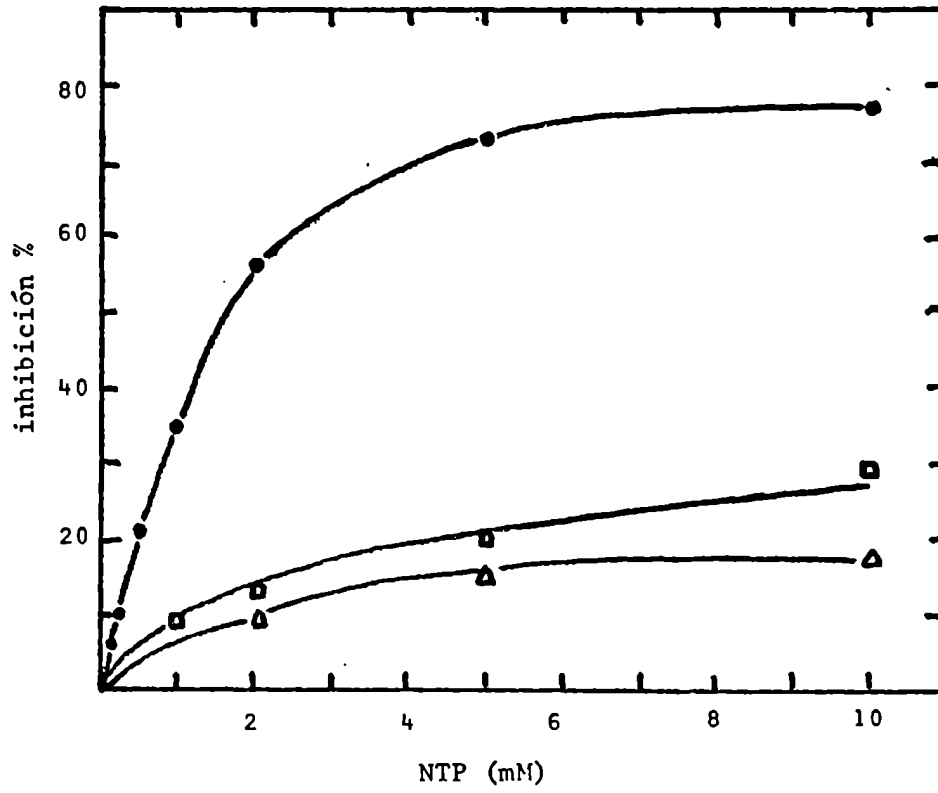


Fig. 17. Efecto de los nucleósidos trifosfato. Se determinó la actividad por el método b. • UTP; □ ATP; △ GTP

Efecto de los iones bivalentes

Los iones bivalentes modifican la actividad de la sacarosa sintetasa, favoreciendo la síntesis de sacarosa e inhibiendo el clivaje (25,56,57)

Con la enzima obtenida de *H. tuberosus* la adición de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  al medio de incubación provocó un aumento de la síntesis de sacarosa (fig. 18); por otra parte también produjo una ligera disminución (8-10% a 20 mM) de su clivaje.

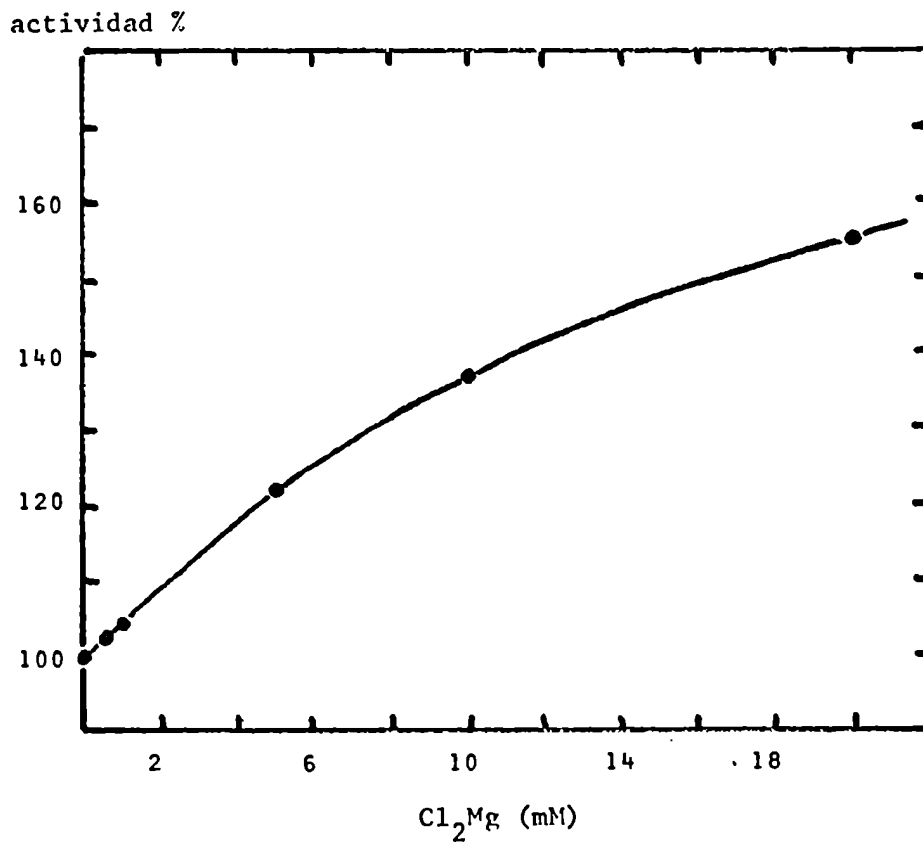


Fig. 18. Efecto del  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  sobre la actividad. La actividad fué determinada de acuerdo al método a.

Diversos autores (55,56) han mostrado que el UDP inhibe la formación de sacarosa catalizada por la sacarosa sintetasa. Esta inhibición fué revertida por el  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (fig. 19). Estando presente en el medio de incubación solamente el UDP, cuya concentración era de 10 mM, inhibió a la sacarosa sintetasa un 25%; agregando  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , pero manteniendo la concentración de UDP en un exceso de 10 mM sobre la de Mg, la inhibición se modificó levemente (21%). Sin embargo cuando la concentración de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  igualaba o era mayor que la de UDP, se conseguía superar en parte a la inhibición del nucleósido difosfato, acercando la actividad de la enzima a valores normales o sea aquellos en los cuales no existía ningún efector (fig. 19)

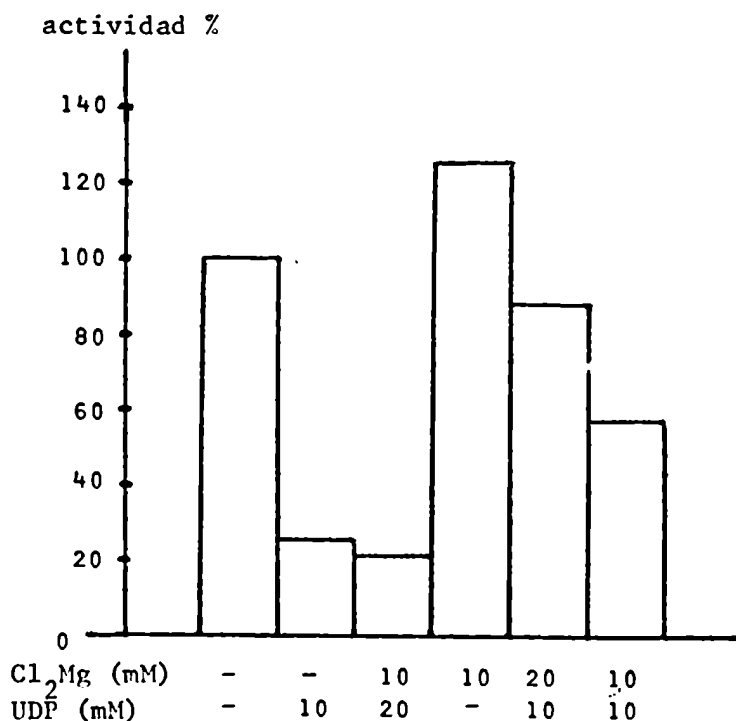


Fig. 19. Efecto del  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  sobre la inhibición provocada por UDP. La actividad fué determinada por el método a



Conservando la relación Mg/UDP constante, 2:1, la actividad de la sacarosa sintetasa, dentro de las concentraciones consideradas, permaneció constante a pesar de variar los valores absolutos de las concentraciones de cada uno de los compuestos (fig. 20)

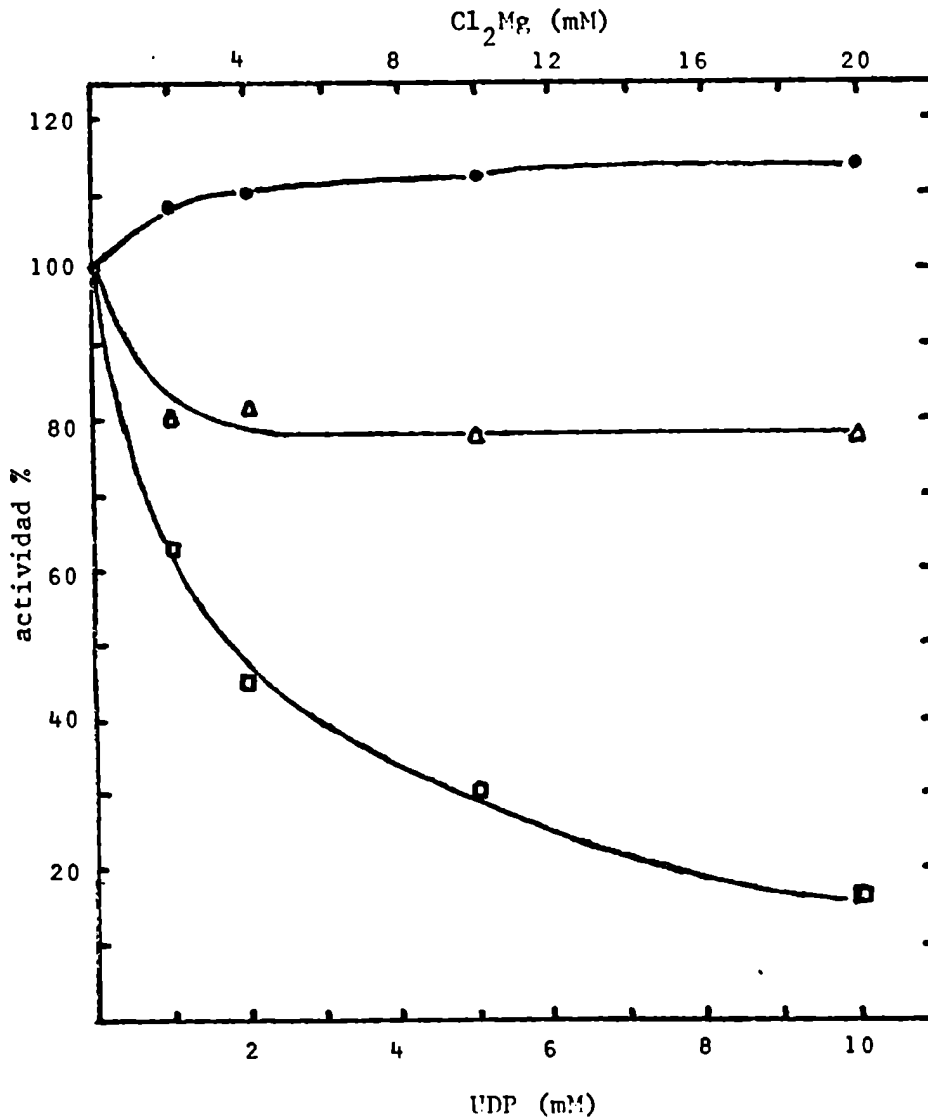


Fig. 20. Efecto de una relación constante Mg/UDP  
La actividad se determinó de acuerdo al método a.  
Δ Cl<sub>2</sub>Mg/UDP 2:1; □ UDP solo; • Cl<sub>2</sub>Mg solo

El UDP es un inhibidor no competitivo en relación a la fructosa; estudiando su efecto sobre dicho sustrato en presencia de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , se observó la modificación de las constantes cinéticas de la fructosa (fig. 21)

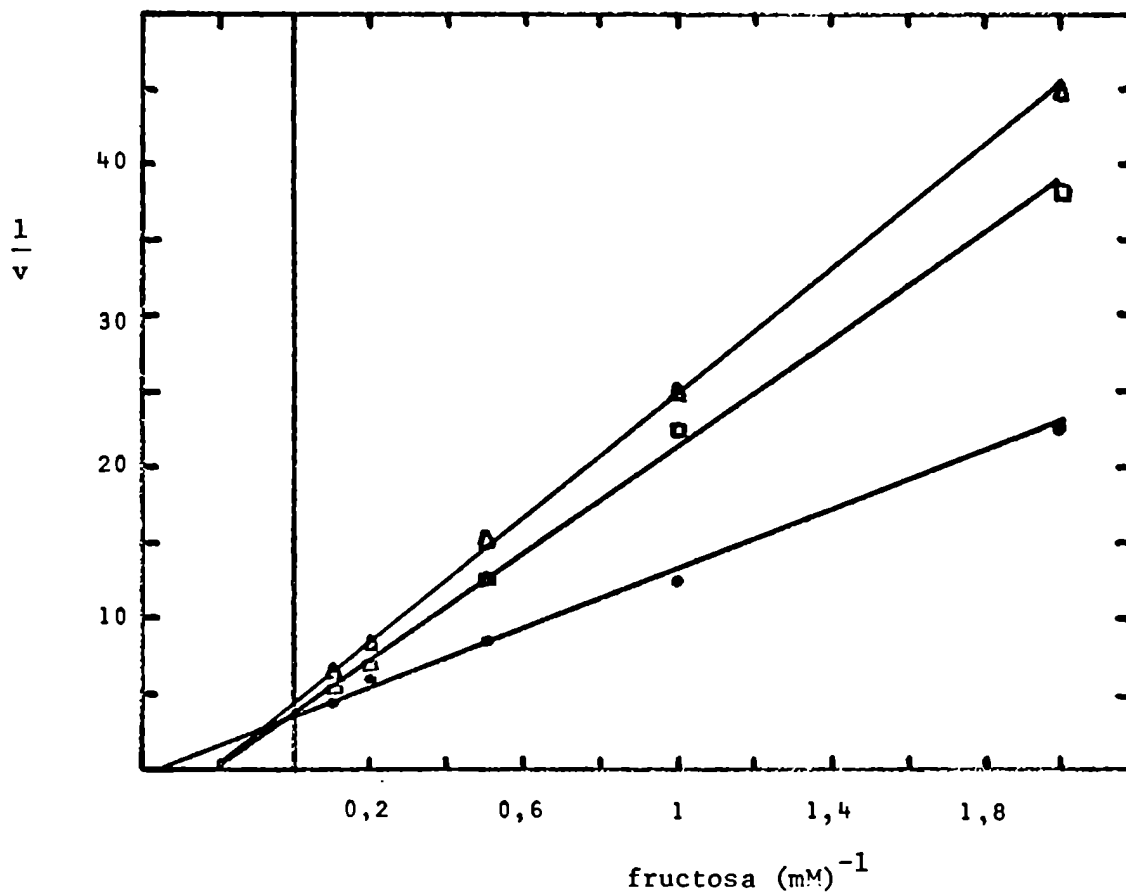


Fig. 21. Se determinó la actividad de acuerdo al método a  $\Delta$  UDP 0,5 mM;  $\bullet$  UDP 5 mM,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  20 mM;  $\square$  sin agregados

El agregado de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  al medio de incubación, al igual que el  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , permite superar la inhibición producida por el UDP (fig. 22)

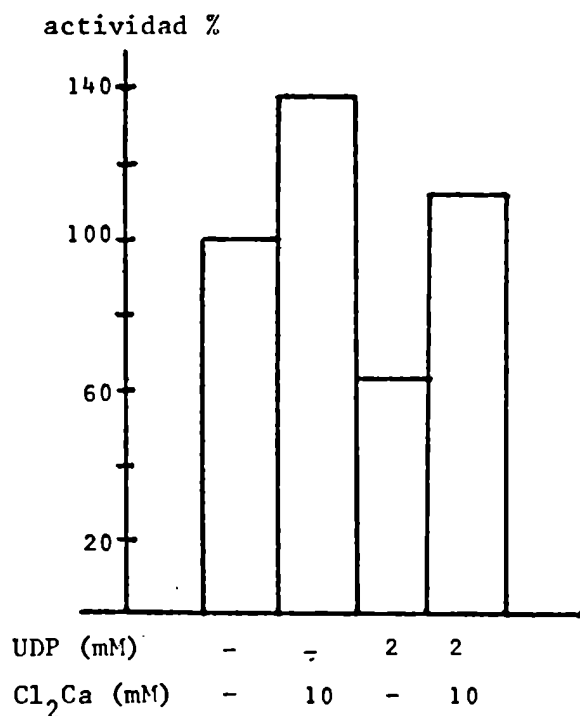


Fig. 22. Efecto del  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  sobre la inhibición por UDP. La actividad fué determinada por el método a

Por otra parte el  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , agregado al medio de incubación, provocó una disminución de la actividad de clivaje, siendo este efecto revertido por EDTA. Sin embargo, si se preincubaba un extracto crudo de *H. tuberosus* en presencia de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  la actividad enzimática disminuía (tabla VII), a pesar de ser medida en presencia de EDTA.

TABLA VII  
EFECTO DEL  $Cl_2Ca$  SOBRE LA SACAROSA SINTETASA

Preincubación	agregado a la incubación	actividad remanente %	
		síntesis	Clivaje
Homogenato + $Cl_2Ca$	EDTA	22	10
Homogenato + EDTA	$Cl_2Ca$	116	113
Homogenato	$Cl_2Ca$ + EDTA	112	105
Homogenato	----	100	100

Se utilizó el método b de preparación del homogenato. Se precipitó entre 0-80% de saturación con  $SO_4(NH_4)_2$  y se cromatografió en Sephadex G-75. La fracción proteica que sale en el frente se preincubó por 17 hrs. a 30°C en tris-ClH pH 7,4 50 mM, con el agregado de  $Cl_2Ca$  o EDTA según corresponda cuya concentración final era de 10 mM. La actividad enzimática se midió por los métodos a y b, previa incorporación de los agregados correspondientes.

#### Acción de los $\beta$ -fenilglucósidos

Slabnik y col. (25) han mostrado que los  $\beta$ -fenilglucósidos inhiben la síntesis de sacarosa catalizada por la sacarosa sintetasa. Dicho resultado fue confirmado en el presente estudio y el mismo efecto fue observado en el otro sentido de la reacción (tabla VIII). La modificación en cada uno de los restos

susceptible de variación (el azúcar, la aglicona y la unión entre ambos) permite determinar los requerimientos estructurales que debe poseer el compuesto para provocar la inhibición.

TABLA VIII

Experimento	Compuesto	Inhibición %	
		Síntesis	Clivaje
1	-----	--	--
	$\alpha$ -metilglucósido (20 mM)	0	0
	$\beta$ -metilglucósido (20 mM)	5	11
	$\alpha$ -fenilglucósido (20 mM)	0	0
	$\beta$ -fenilglucósido ( 2 mM)	27	88
	$\beta$ -fenilgalactósido (10 mM)	0	0
	salicina ( 5 mM)	10	55
	arbutina ( 5 mM)	46	90
	amigdalina (10 mM)	0	0
hidroquinona ( 5 mM)	0	0	
2 *	-----	--	--
	$\beta$ -fenilglucósido ( 2 mM)	20	81
	esculina ( 5 mM)	7,5	0
	rutina ( 5 mM)	5	0
	hesperidina (10 mM)	0	0
umbeliferona ( 5 mM)	1	7	

\* Los compuestos ensayados fueron disueltos en DMSO 10%

De acuerdo con los resultados de la tabla VIII, los únicos que tuvieron efecto inhibitorio sobre la sacarosa sintetasa fueron los  $\beta$ -fenilglucósidos y en menor grado el  $\beta$ -metilglucósido. Las modificaciones en el azúcar (amigdalina,  $\beta$ -fenilgalactósido), en la aglicona (esculina) o en la unión ( $\alpha$ -metilglucósido,  $\alpha$ -fenilglucósido) provocaron la pérdida del carácter de inhibidor; tampoco otros glicósidos corrientes en el reino vegetal (hesperidina, rutina) produjeron efecto alguno sobre la sacarosa sintetasa.

Los tres  $\beta$ -fenilglucósidos estudiados presentaron el mismo esquema, por el cual porcentualmente el clivaje de la sacarosa fué inhibido más fuertemente que la síntesis de la misma, en las condiciones del ensayo (fig. 23). Si bien las reacciones han sido medidas a los respectivos pH óptimos, dicha característica también se verifica a un pH común (fig. 23, gráfico inserto)

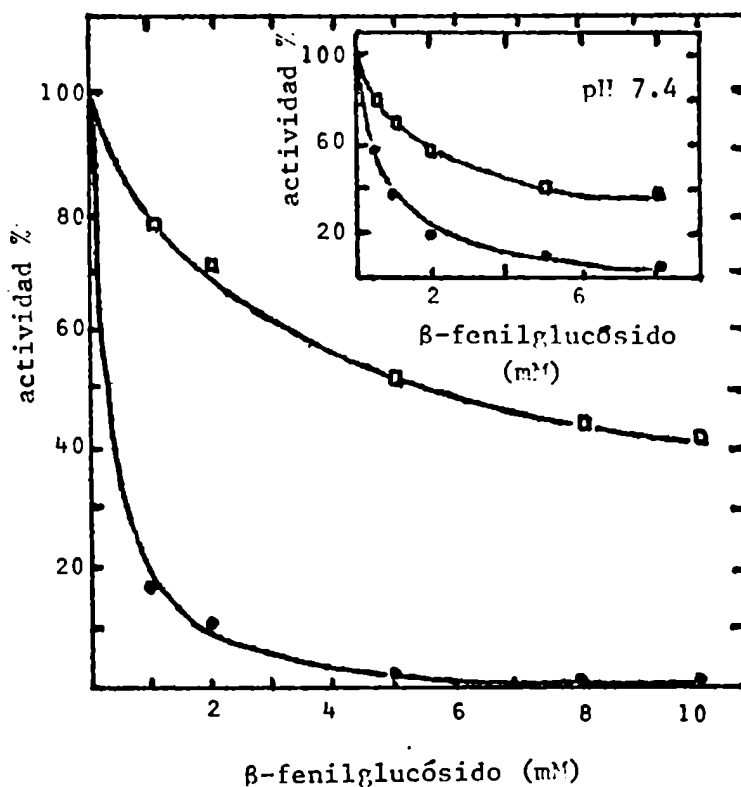


Fig. 23. Inhibición de la actividad por  $\beta$ -fenilglucósido. La actividad se determinó de acuerdo a los métodos a y b, a los pH óptimos y a pH 7,4 (gráfico inserto). ● clivaje; □ síntesis.

Influencia de los azúcares fosfato

Los azúcares fosfato inhibieron la actividad enzimática, en el sentido de clivaje, cuando se midió a bajos niveles de sacarosa (20 mM) (tabla IX); en tanto que las diferencias fueron escasas cuando se incubó con niveles saturantes (0,2 M)

TABLA IX

INFLUENCIA DE LOS AZUCARES FOSFATO

Azúcar fosfato	mM	inhibición %
glucosa 1-fosfato	1	9,4
glucosa 1-fosfato	10	29,0
glucosa 6-fosfato	5	11,7
fructosa 6-fosfato	5	7,0
fructosa 1,6-difosfato	10	20,0

La actividad fué determinada mediante los métodos b y d, en los cuales la cantidad de sacarosa en la incubación era de 1  $\mu$ mol.

Por otra parte al determinar la reacción en el sentido de síntesis de la sacarosa, el efecto de los azúcares fosfato fué nulo.

Inhibición de la actividad de clivaje por azúcares

El efecto que los hidratos de carbono tienen sobre la actividad, medida en el sentido de clivaje, se muestra en la tabla X.

TABLA X

Azúcar (10 mM)	Actividad %
-----	100
5-cetofructosa	103
L-sorbosa	82
fructosa	77
tagatosa	95
glucosa	76
$\beta$ -D-tioglucona	66
glucosamina	40
glucónico	78
$\delta$ -gluconolactona	0
N-acetilglucosamina	98
2-deoxiglucosa	97
manosa	97
galactosa	94
sorbitol	106
glucurónico	96
ramnosa	95
xilosa	91
arabinosa	99
ribosa	94
trealosa	101
lactosa	103
gentiobiosa	97
maltosa	98
palatinosa	90
turanosa	95
celobiosa	94
rafinosa	101
melezitosa	97
estaquiosa	98

La actividad se determinó de acuerdo al método d



La glucosa inhibió el clivaje de la sacarosa catalizado por la sacarosa sintetasa. Cuando se modificó el -OH en el C-2, sea por reducción (2-deoxiglucosa) o por epimerización (manosa), los compuestos resultaron inefectivos. Sin embargo el reemplazo del mismo por  $-NH_2$  (glucosamina) llevó a un aumento de la inhibición, la cual nuevamente desaparecía si dicho grupo era acetilado (N-acetilglucosamina). Las modificaciones en el -OH de C-4 de la glucosa, sea por epimerización (galactosa) o por combinación con otro residuo glucosa en unión  $\alpha$ - (maltosa) o  $\beta$ - (celobiosa), fueron inefectivas como inhibidores. Idéntico resultado se obtuvo cuando las alteraciones se verificaron en C-6 (ac. glucurónico gentiobiosa). En cambio reemplazando en C-1 el -OH por -SH ( $\beta$ -tioglucosa), o introduciendo un sustituyente fenólico en posición anomérica  $\beta$  aumenta la inhibición. De igual manera la oxidación en el C-1 mantiene el efecto mencionado precedentemente, el cual es notablemente alto cuando se retiene la forma piranosa en el mismo ( $\delta$ - gluconolactona). Por el contrario otras sustituciones en  $\alpha$ - (maltosa, gentiobiosa) o en  $\beta$ - (celobiosa) no provocan inhibición. Han resultado inefectivos los isómeros de la sacarosa (palatinosa, turanosa) y aquellos compuestos en los cuales existe una porción sacarosa (melezitosa, rafinosa, estaquiosa).

En la serie de compuestos relacionados a la fructosa, solamente la L-sorbosa (epimerización en C-5) produjo inhibición, en tanto que la tagatosa (epimerización en C-4) no tuvo efecto al igual que la oxidación del -OH del C-5 (5-cetofrufructosa). Las pentosas tampoco provocaron modificación de la actividad.

ESTUDIOS CINETICOS

Velocidad inicial: El gráfico de Lineweaver-Burk (81), donde se estudió la velocidad inicial de la síntesis de sacarosa, a varios niveles de UDPG, siendo la fructosa el sustrato variable, estaba constituido por una familia de líneas, cuya intersección se encontraba a la izquierda del eje de las ordenadas y debajo del eje de las abscisas (fig. 24)

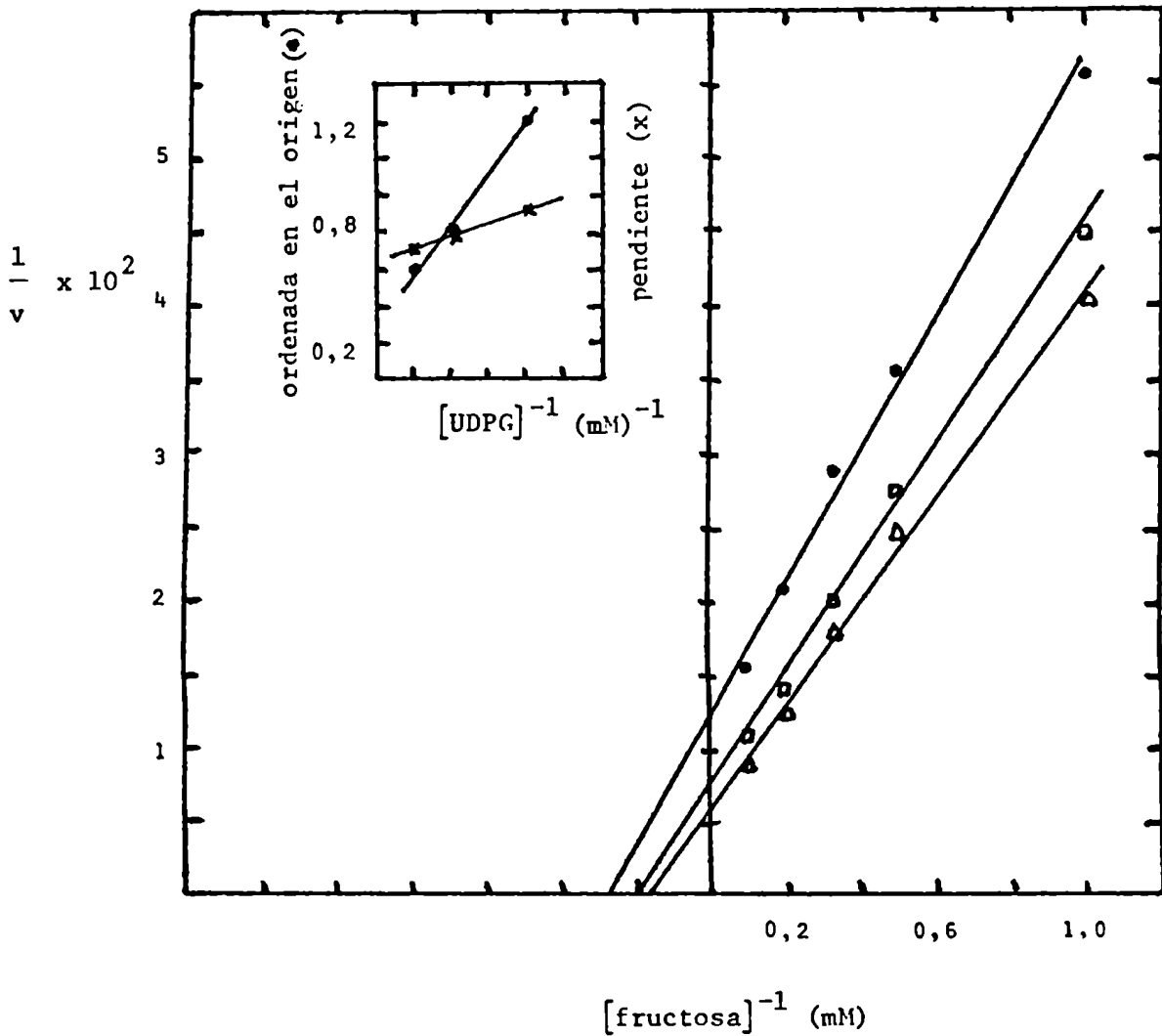


Fig. 24. Efecto de concentraciones variables de fructosa sobre la velocidad inicial, a varios niveles de UDPG. La actividad fué medida por el método a, siendo las concentraciones del UDPG: ● 0,5 mM; □ 1 mM; ▲ 2 mM

El gráfico inserto en la figura anterior, muestra que tanto las pendientes, como las ordenadas en el origen, son funciones lineales de la inversa del parámetro UDPG.

Inhibición por productos: Estudiando la reacción en el sentido de la síntesis de la sacarosa, el UDP fué un inhibidor competitivo con respecto al UDPG (fructosa a nivel saturante) y no competitivo en relación a la fructosa. En el primer caso se utilizó el gráfico de Dixon(117), en el cual se ve que la inhibición fué competitiva lineal. Como control que la inhibición fué realmente competitiva, se usó el gráfico inserto, en el cual las pendientes vs.  $1/[\text{UDPG}]$ , dieron una línea recta que pasa por el origen (fig. 25)

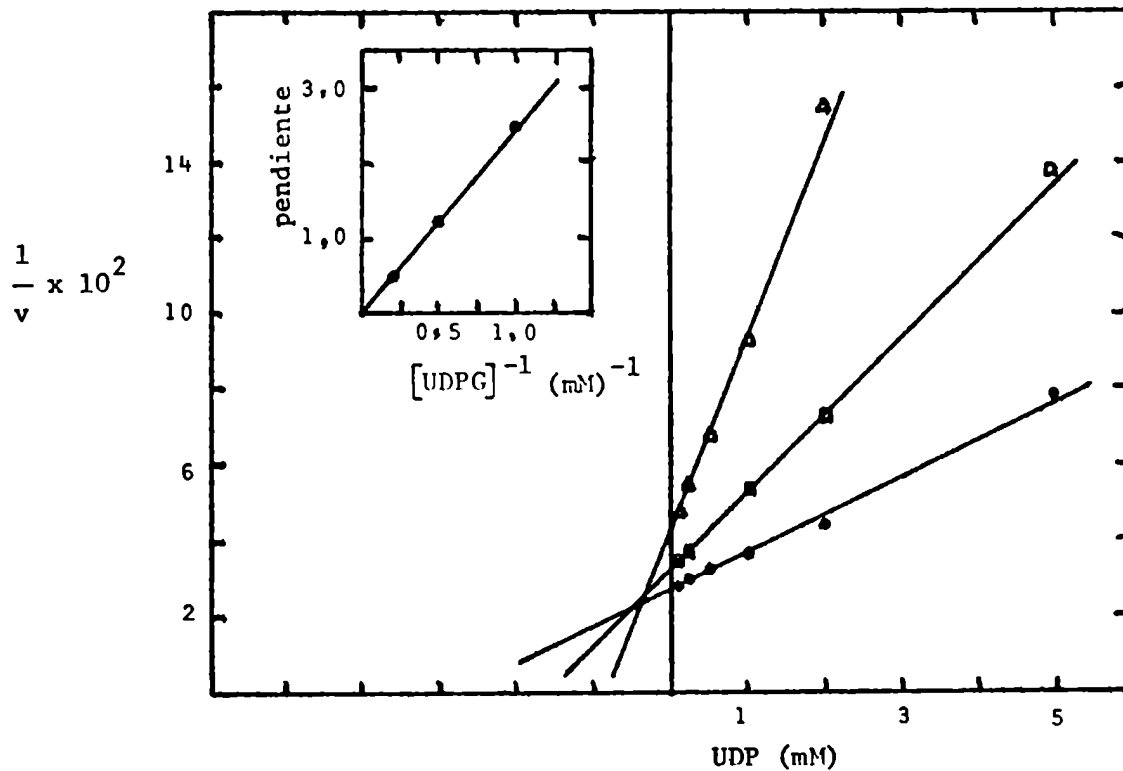


Fig. 25. Efecto de concentraciones variables de UDP sobre la velocidad inicial a diferentes niveles de UDPG:  $\Delta$  1 mM;  $\square$  2 mM;  $\bullet$  5 mM; siendo la concentración de fructosa 10 mM. Se determinó la actividad por el método a

Cuando la fructosa fué el sustrato sobre el cual se quiso determinar la influencia del UDP, se observó que la inhibición era no competitiva, siendo las ordenadas en el origen, así como las pendientes, funciones lineales de la concentración del inhibidor UDP (fig. 26)

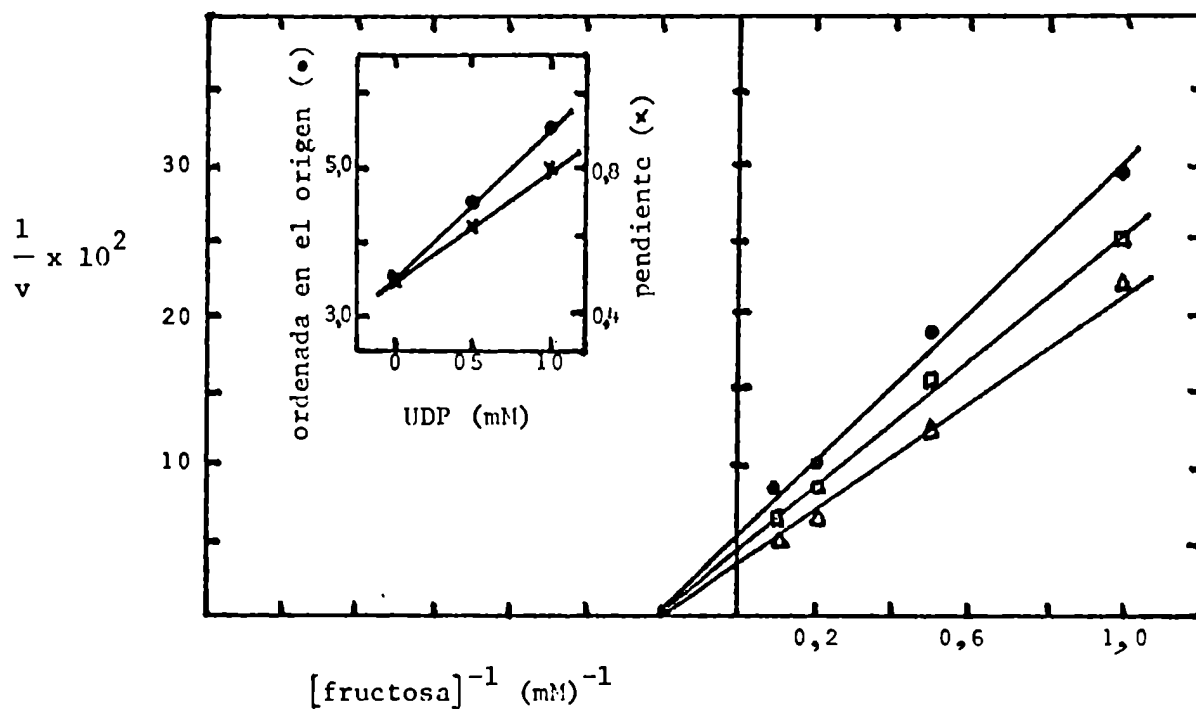


Fig. 26. Efecto de concentraciones variables de fructosa sobre la velocidad inicial, a varios niveles de UDP:  $\Delta$  0 mM;  $\square$  0,5 mM;  $\bullet$  1 mM; siendo la concentración de UDPG 5 mM. La actividad se determinó por el método a.

Al estudiarse, en el otro sentido de la reacción, el efecto del UDPG, este fué un inhibidor competitivo lineal en relación al UDP (fig. 27)

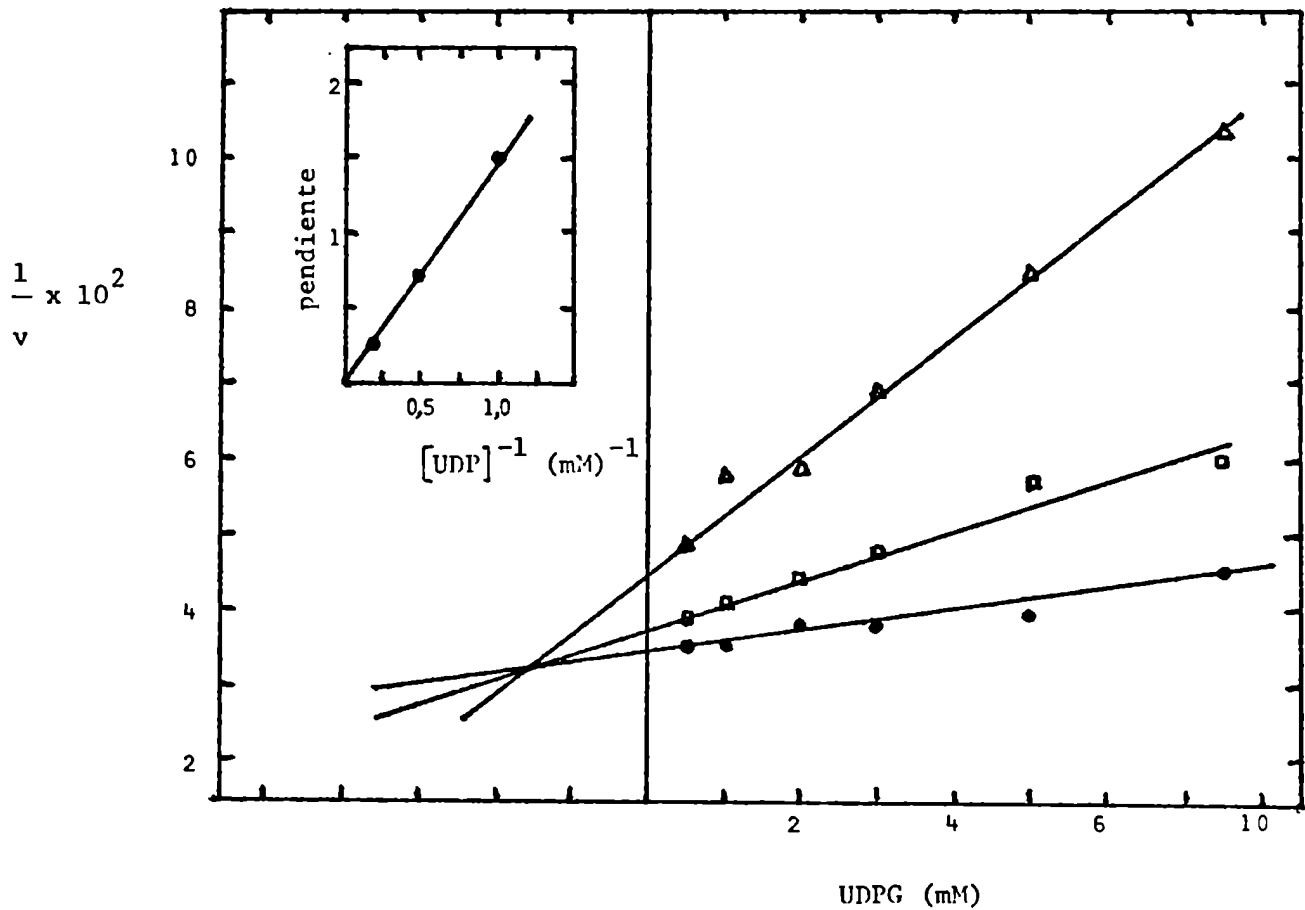


Fig. 27. Efecto de concentraciones variables de UDPG sobre la velocidad inicial a varios niveles de UDP:  $\Delta$  1 mM;  $\square$  2 mM;  $\bullet$  5 mM; siendo la concentración de sacarosa 0,2 M. La actividad fue medida por el método b.

En el mismo sentido de reacción considerado anteriormente, se estudiaron los esquemas de inhibición, producidos por el otro producto, la fructosa.

La inhibición provocada por la misma, cuando la sacarosa fue el sustrato variable, siendo constante y saturante la concentración del UDP, fué no competitiva (fig. 28)

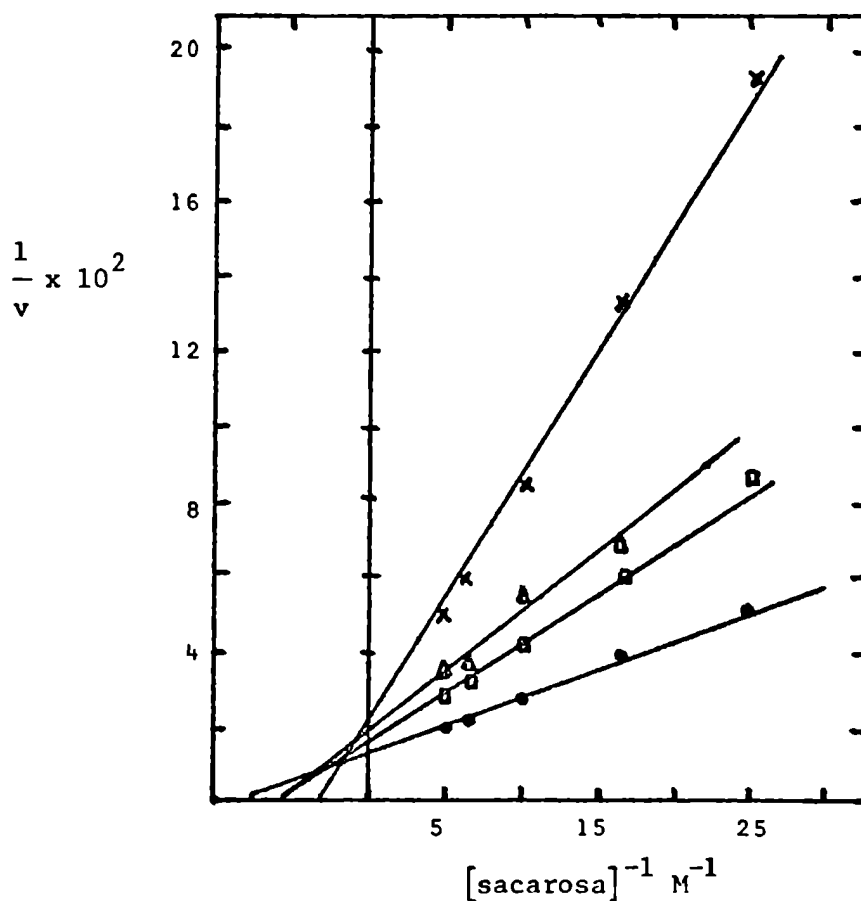


Fig. 28. Efecto de concentraciones variables de sacarosa sobre la velocidad inicial, a varios niveles de fructosa: • 0 mM; □ 5 mM; △ 10 mM; × 20 mM; siendo la concentración de UDP 5 mM. La actividad se determinó por el método d.

Siendo la concentración de UDP variable, y manteniendo la concentración de sacarosa constante y a nivel saturante, entonces la inhibición producida por la fructosa era de tipo incompetitivo (fig. 29). En el gráfico inserto las ordenadas en el origen vs. la concentración de fructosa muestran que la inhibición era lineal.

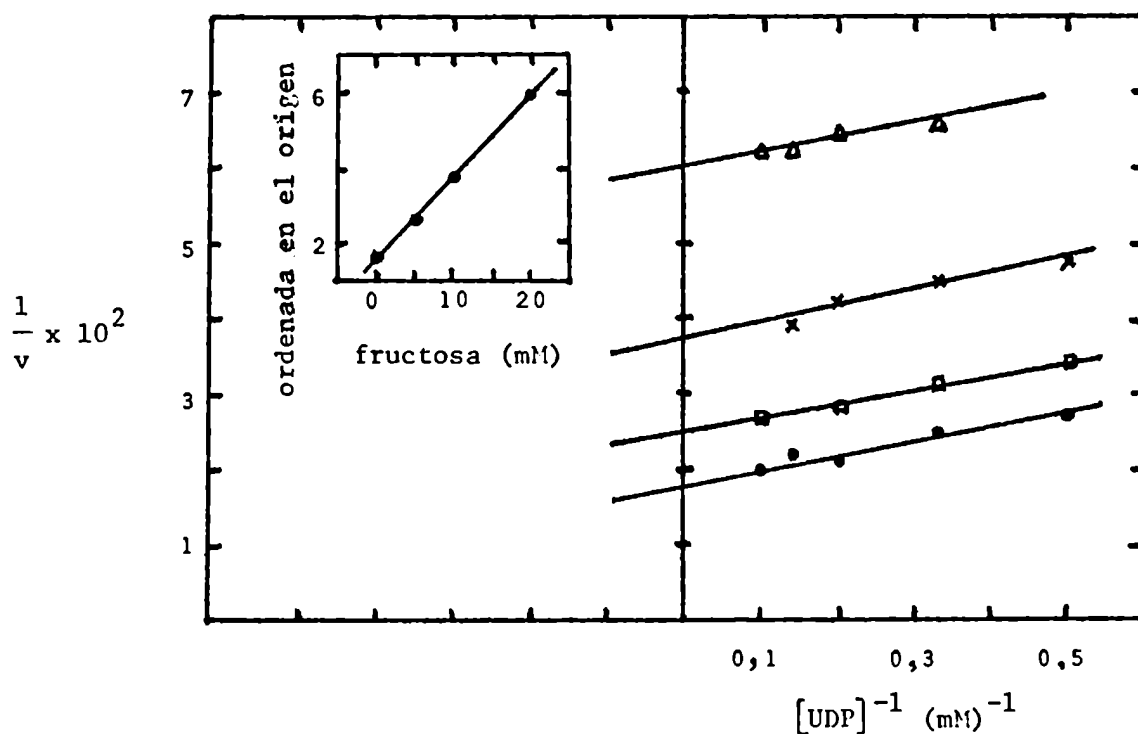


Fig. 29. Efecto de concentraciones variables de UDP sobre la velocidad inicial, a varios niveles de fructosa: • 0 mM; □ 5 mM; × 10 mM; △ 20 mM; siendo la concentración de sacarosa 0,2 M. La actividad se determinó de acuerdo con el método d.

## Cinética de la inhibición por $\beta$ -fenilglucósidos

Con el fin de conocer cual era el efecto de los  $\beta$ -fenilglucósidos sobre la sacarosa sintetasa, en el sentido de clivaje, se observó la acción de la salicina y el  $\beta$ -fenilglucósido sobre la velocidad inicial.

El gráfico de Dixon, a diferentes concentraciones de sustrato, que muestra la figura 30, indica que la salicina fué un inhibidor competitivo lineal de la sacarosa. La comprobación que la inhibición fué realmente competitiva en la fig. antes mencionada, está dada por el gráfico inserto, en el cual las pendientes en función de la inversa de la concentración del sustrato se encuentran sobre una línea recta que pasa por el origen. El caracter lineal resulta del hecho que las curvas obtenidas en la fig. 30 fueron rectas.

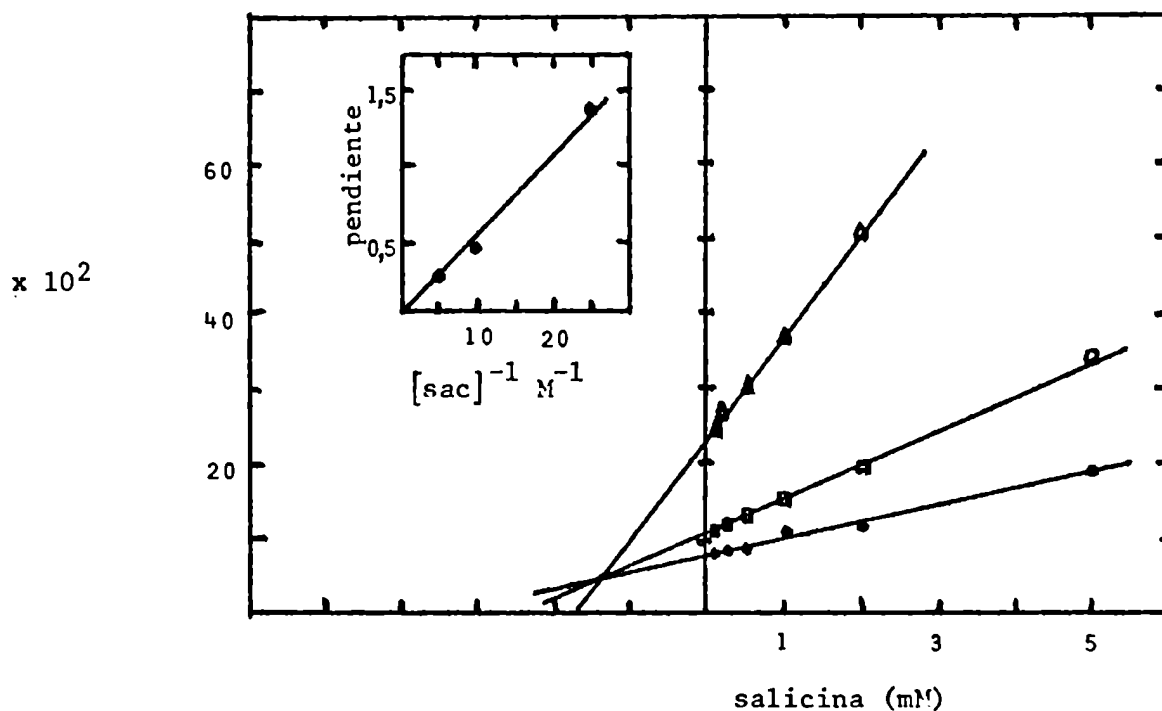


Fig. 30. Efecto de concentraciones variables de salicina sobre la velocidad inicial a varios niveles de sacarosa:  $\Delta$  0,04 M;  $\square$  0,1 M;  $\bullet$  0,2 M; siendo la concentración de UDP 5 mM. La actividad se determinó por el método b.



Considerando el mismo sentido de la reacción se estudió el efecto que la salicina presenta con respecto al otro sustrato, el UDP; resultando entonces que una inhibición incompetitiva (fig. 31)

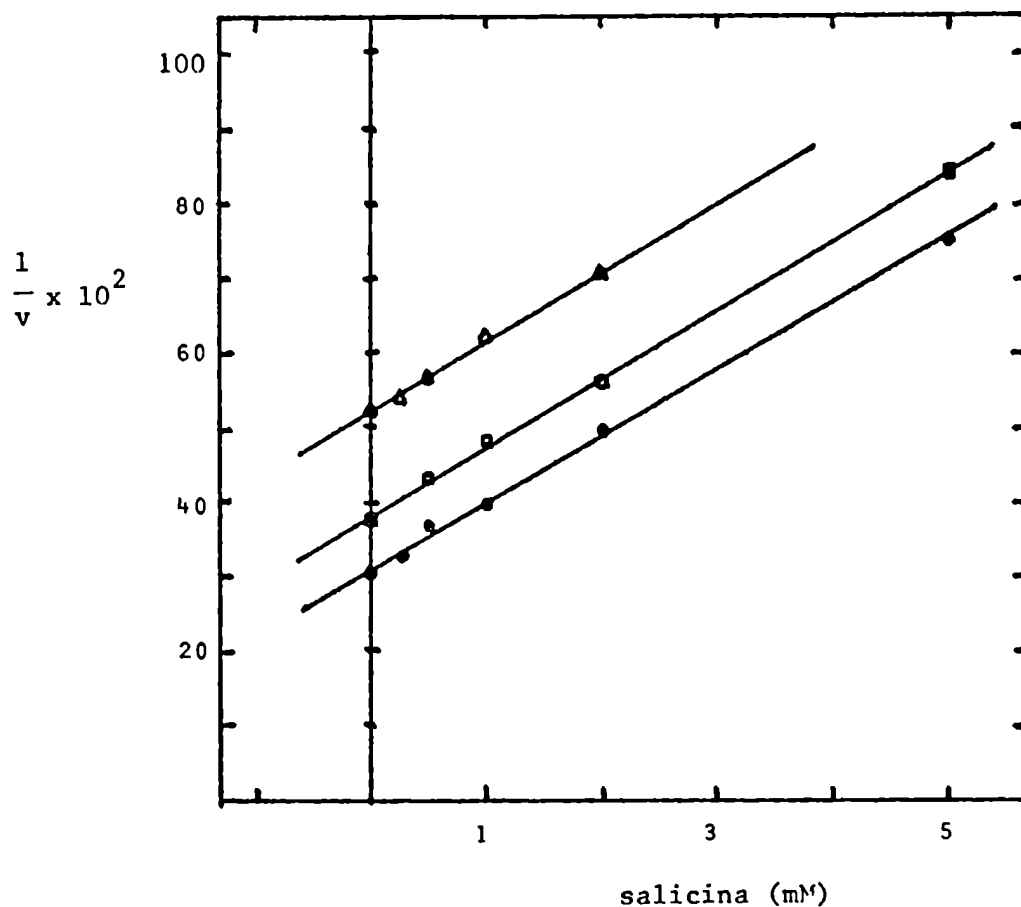


Fig. 31. Efecto de concentraciones variables de salicina sobre la velocidad inicial, a varios niveles de UDP:  $\Delta$  0,5 mM;  $\square$  1 mM;  $\bullet$  2 mM siendo la concentración de sacarosa 0,2 M. La actividad fué medida según el método b.

Cuando el  $\beta$ -fenilglucósido fué el compuesto cuyo efecto se estudió, sobre la velocidad inicial, se observó que tanto con respecto al UDP, como a la sacarosa se comportó como un inhibidor no competitivo (fig. 32, 33)

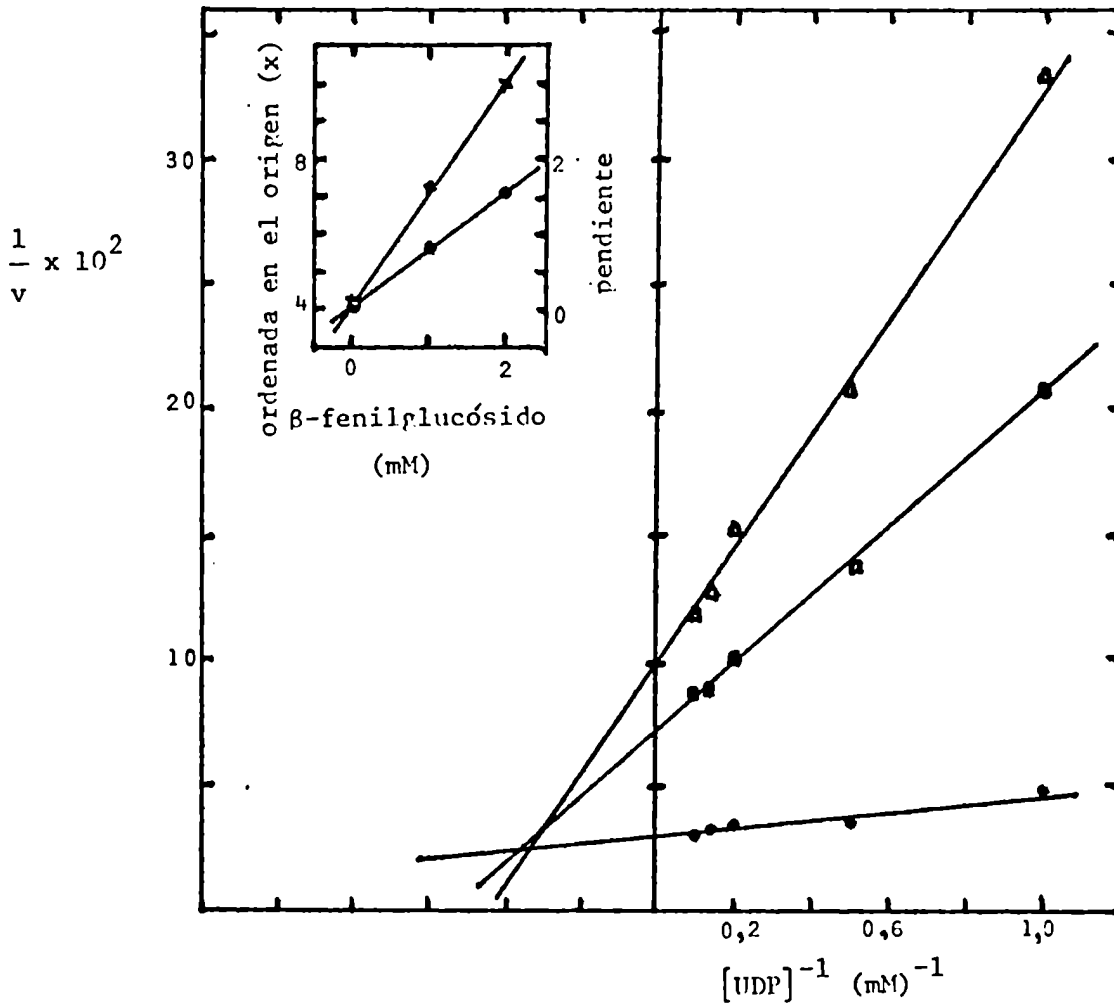


Fig. 32. Efecto de concentraciones variables de UDP sobre la velocidad inicial, a varios niveles de  $\beta$ -fenilglucósido: • 0 mM; □ 1 mM; △ 2 mM; siendo la concentración de sacarosa 0,2 M. La actividad fué determinada según el método b.

El gráfico inserto en la fig. 33 muestra que las pendientes vs.  $1/\text{sacarosa}$ , es una línea recta que no pasa por el origen, de donde se infiere que la inhibición es no competitiva.

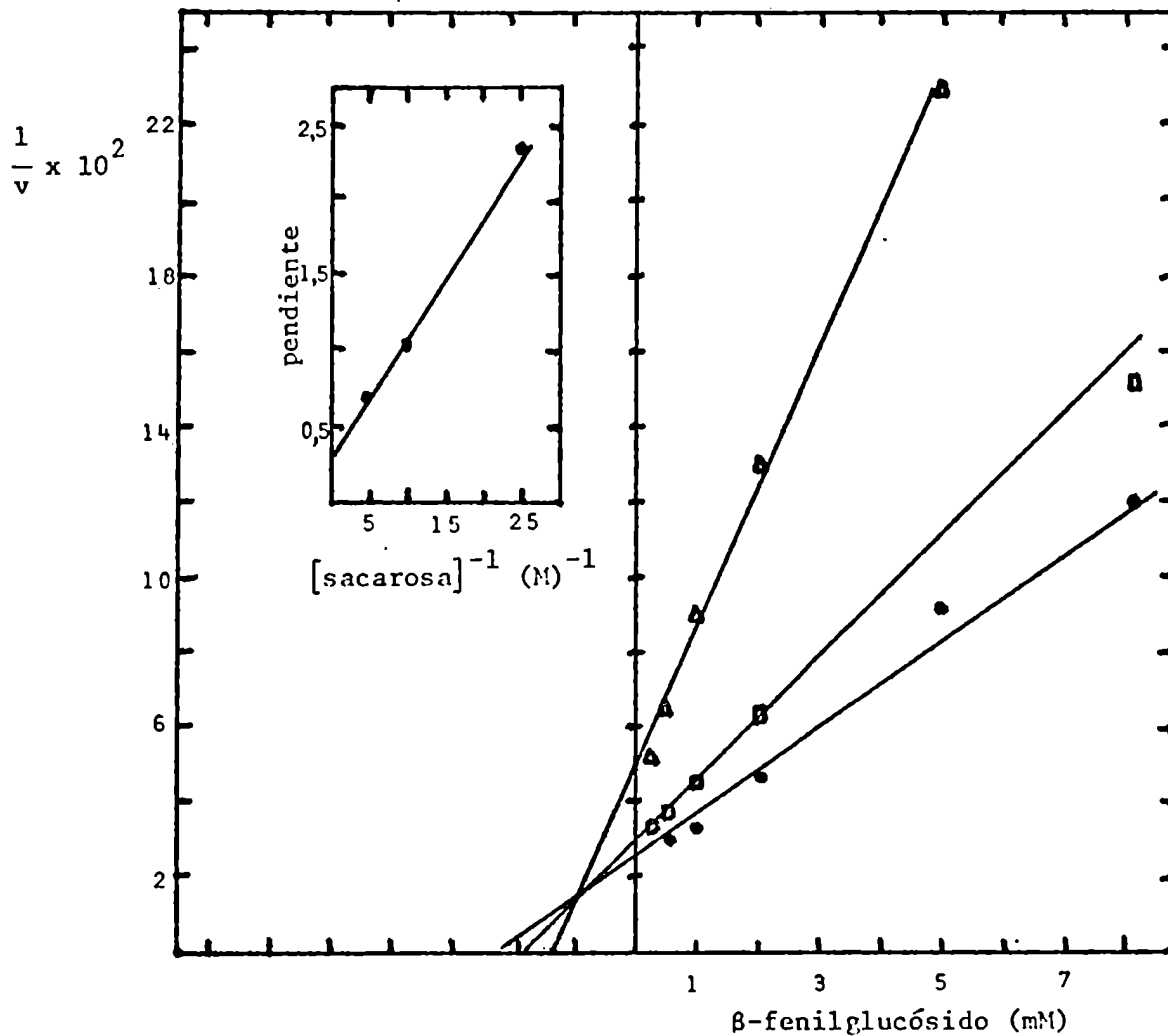


Fig. 33. Efecto de concentraciones variables de  $\beta$ -fenilglucósido sobre la velocidad inicial, a varios niveles de sacarosa:  $\Delta$  0,04 M;  $\square$  0,1 M;  $\bullet$  0,2 M; siendo la concentración de UDP 5 mM. La actividad se determinó por el método b

El efecto del  $\beta$ -fenilglucósido también fué estudiado en el sentido de síntesis; así se vió que el mismo es un inhibidor competitivo lineal con respecto al UDPG (fig. 34)

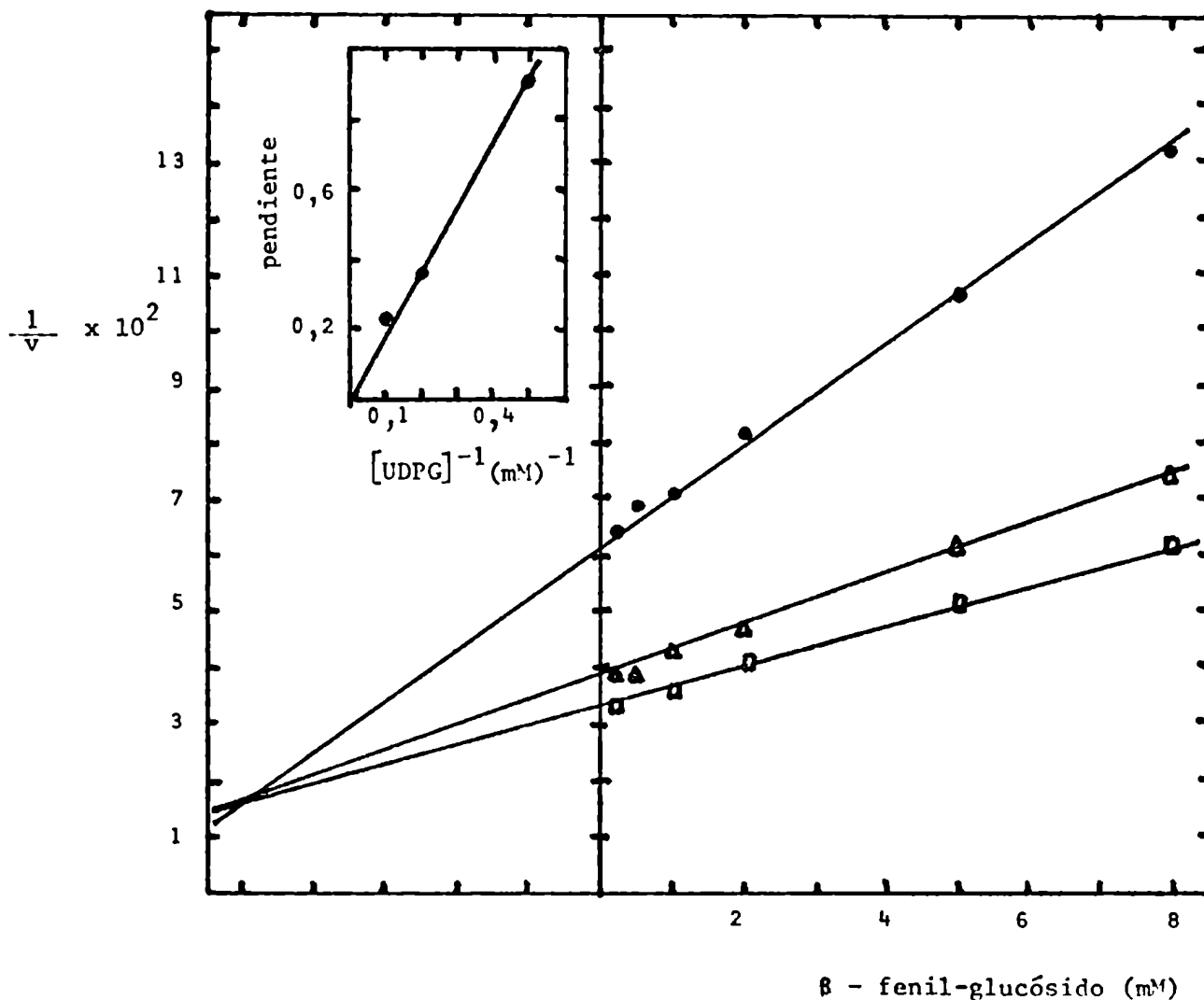


Fig. 34. Efecto de la concentración variable de  $\beta$ -fenil-glucósido sobre la velocidad inicial a varios niveles de UDPG:  $\bullet$  2 mM;  $\triangle$  5 mM;  $\square$  10 mM; siendo la concentración de fructosa 10 mM. La actividad se determinó según el método a.

Estudiando la acción del  $\beta$ -fenilglucósido en relación al otro sustrato, la fructosa, la inhibición fué no competitiva, siendo una función lineal del inhibidor tanto las pendientes como las ordenadas en el origen (fig.35).

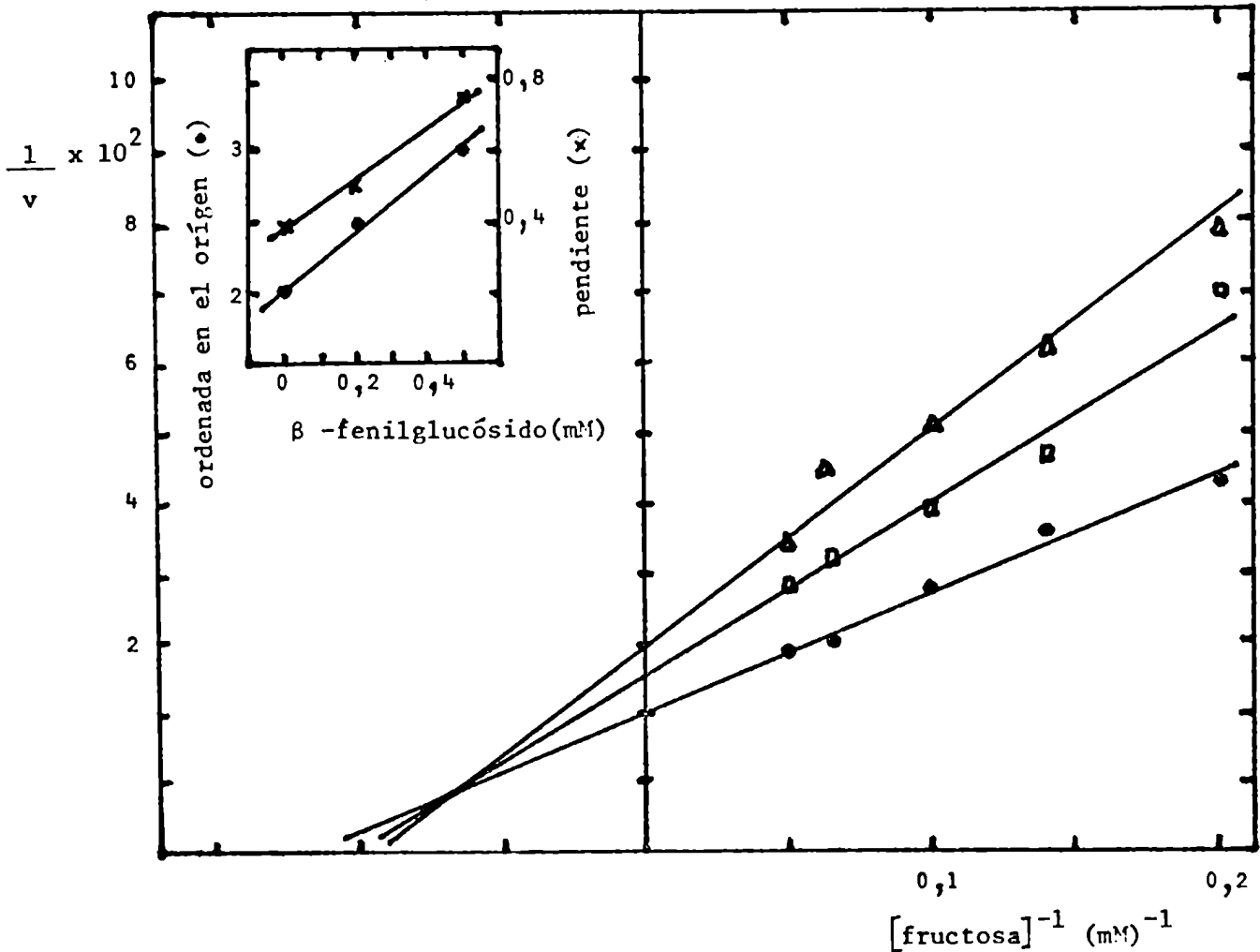


Fig. 35. Efecto de las concentraciones variables de fructosa, a varios niveles de  $\beta$ -fenilglucósido:  $\circ$  0 mM;  $\square$  0,2 mM;  $\Delta$  0,5 mM; siendo la concentración de UDPG 5 mM. La actividad fué determinada según el método a.

DISCUSSION

### Purificación de la sacarosa sintetasa

El hallazgo en germen de trigo (19) de una preparación que catalizaba la transferencia de la glucosa del UDPG a la fructosa produciendo la síntesis de la sacarosa condujo a obtener la misma de diferentes vegetales (20, 82-84), mostrando así que la sacarosa sintetasa se encuentra ampliamente diseminada en las plantas superiores. Desde entonces varios han sido los métodos utilizados en la purificación de la enzima involucrando la mayor parte de ellos un fraccionamiento con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  y posterior elución en columnas de intercambio iónico (52, 56, 58, 85, 86). En el presente trabajo, partiendo de tubérculos de *H. tuberosus*, se utilizan las técnicas antedichas y se continúa luego con electroenfocado, ya que se detecta la presencia de dos formas de la enzima, las cuales son separables en base a su pI. La susceptibilidad a la urea y PCMB, y los pI de ambas formas de la sacarosa sintetasa permiten sugerir que son proteínas diferentes, las cuales poseen constantes cinéticas disímiles. Sin embargo la respuesta de las mismas a los compuestos del metabolismo intermedio es similar, no existiendo tampoco diferencias en cuanto a los sustratos utilizados, ni influencia de una forma sobre la otra. La variedad de los métodos de extracción permitiría descartar la posibilidad que ambas formas se deban a la técnica utilizada, siendo luego probable que ellas fuesen isoenzimas. Al respecto es de tener en cuenta que se ha informado la existencia de isoenzimas de la sacarosa sintetasa en plántulas de arveja (87), si bien su rol fisiológico, así como también en nuestro caso, permanece oscuro. Por otra parte los resultados obtenidos en el presente trabajo con tripsina y el efecto que sobre la enzima tiene la pre-

incubación de la misma con Ca, podrían dar base a la posibilidad de la acción de una proteasa, la que al actuar sobre la enzima nativa, conduciría a la producción de diferentes formas de enzima.

Debido a que la forma A representa la mayor proporción de la sacarosa sintetasa del tejido, tanto en unidades de enzima como en mg. de proteína, el estudio de las propiedades se continúa en dicha forma.

La purificación de la sacarosa sintetasa lograda a partir del tubérculo de *H. tuberosus* es de 153 veces siendo su actividad específica (sentido de clivaje) de 624  $\mu$ moles fructosa/mg. prot./hr. Esta preparación presenta una actividad específica similar a la obtenida con la enzima extraída de arroz (85) que fué purificada 11 veces y superior a la de *P. aureus* cuya purificación fué de 252 veces (58), aunque en éste último caso su autora advierte que la determinación de actividad se efectuó en condiciones de sustrato no saturante. Ello implica que el número de unidades por mg. de proteína obtenido en el presente trabajo es uno de los mayores logrados hasta el momento.

Dicha actividad específica se mantiene constante por filtración por gel (Sepharose 6B), columna de intercambio iónico (DEAE-celulosa) y por electroenfocado (en columna y en gel de poliacrilamida), lo cual permitiría suponer que la preparación es homogénea; sin embargo, en contradicción con dichos resultados la electroforesis en gel de poliacrilamida a pH 8,3, muestra por teñido con Amido Schwarz, dos bandas.

Esta preparación de la enzima es conservada a 0-4°C, en buffer con sacarosa, reteniendo de este modo un 70% de la actividad original luego de 8 meses, pero al igual que preparaciones de otras fuentes la misma decae cuando es congelada y descongelada (25,39). En el agregado del disa-



cárido estaría la diferencia con la enzima *P. aureus*, la cual pierde un 50% de su actividad en el término de 1 mes (58). Dos aspectos de la sacarosa permitirían explicar este resultado, puesto que por un lado es sustrato (o producto) de la sacarosa sintetasa, y se ha observado en numerosas enzimas que la estabilidad de las mismas es modificada por la presencia de los compuestos que intervienen en la reacción por ellas catalizada; y por otra parte se ha sugerido que altera la estructura proteica al reducir las uniones hidrofílicas intramoleculares, simulando una "deshidratación" (88). Es decir que la presencia de la sacarosa facilitaría o induciría alteraciones en la conformación de la proteína, la que así aumentaría su estabilidad en solución.

El peso molecular de la sacarosa sintetasa de *H. tuberosus* determinado en columnas de Sepharose 6B es  $4,2 \times 10^5$ ; este resultado coincide con los obtenidos por otros autores que han utilizado para la determinación del mismo la filtración por gel (56-58,85), y difiere del logrado por Grimes y col. (51) quienes sugieren que la enzima de *P. aureus* es una partícula cuyo peso molecular es  $10^6$ ; sin embargo, en este último caso cuando se ha trabajado con una preparación purificada se logró un valor de  $4,05 \times 10^5$  y  $3,75 \times 10^5$  mediante la filtración por gel y sedimentación en equilibrio respectivamente (58).

El pH óptimo de la enzima medido en el sentido de clivaje (6,2-6,5) difiere del obtenido cuando la reacción es determinada en el sentido de síntesis (8,0), y dicho resultado coincide en el logrado en preparaciones de otros orígenes (25, 55-57). Este comportamiento no es particular de la enzima aquí considerada por cuanto otras también lo exhiben (89,

90); ello es interpretado suponiendo que el sitio activo presenta dos grupos ionizables los cuales poseen diferentes constantes de ionización según se encuentren libres o combinados al sustrato (o producto) (91).

#### Efecto de iones metálicos di-y monovalentes

Los iones metálicos divalentes modifican la velocidad de la sacarosa sintetasa, aumentando la síntesis de sacarosa e inhibiendo el clivaje de la misma (25,56,57). Con la enzima de *H. tuberosus* tanto el  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  como el  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  provocan los efectos mencionados anteriormente, pero su acción no se limita a alterar solamente la velocidad puesto que también modifican la acción de otros metabolitos. Así se ve que cuando se estudia el UDP en el sentido de la síntesis, la inhibición de este es revertida por el aumento de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  o  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  en el medio de incubación. La reversión depende, en el caso del  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , de la relación  $\text{Mg}/\text{UDP}$ , ya que si se mantiene constante la misma, permanece inalterada la actividad, a pesar de variar las concentraciones absolutas de cada uno de los compuestos. El efecto del  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  sobre la actividad puede manifestarse bajo dos aspectos: la formación del complejo nucleótido-metal y la interacción metal-proteína. Respecto al primer punto, es de destacar que el valor de la constante de estabilidad del complejo ADP-metal,  $K(\text{ADP-Mg}) = 2,5 \times 10^4$ , es considerado generalmente cercano al de los complejos en los cuales intervienen otros nucleótidos (93), y con ello será similar la proporción entre las diferentes formas en que se distribuye el nucleósido difosfato. Tomando como base lo antedicho la alternativa

que surge es que la forma inhibitoria sea el  $\text{UDP}^{3-}$ , ya que la misma, al aumentar diez veces las concentraciones del  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  y el UDP manteniendo la relación 2:1, modifica su concentración levemente (menor de 0,1 mM), por lo que la actividad se mantendrá prácticamente constante. Por otra parte el  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  produce un cambio de las constantes cinéticas, ya que la  $K_m$  aparente de la fructosa es modificada, por lo que el efecto de la sal no se reduciría solamente a la formación de un complejo con UDP, sino también existiría interacción de la misma con la enzima. En ese sentido se ha observado que el  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  produce la modificación de la  $K_m$  de UDPG y fructosa, mientras que permanece invariable la  $K_i$  del UDP (56). De acuerdo a lo anterior la acción de los metales divalentes puede considerarse en dos aspectos: sobre la reacción y sobre la proteína; en cambio el efecto de los metales monovalentes se verifica sobre la estructura proteica.

El aumento de la concentración del  $\text{ClNa}$ , produce una disminución de la actividad enzimática obtenida de papa (25), resultado éste que coincide con el obtenido en preparaciones de *H. tuberosus*; además en este último caso el efecto es reversible por cuanto eliminando la sal del medio de incubación se recupera totalmente la actividad. Es sabido que las sales inorgánicas modifican las propiedades físicas de las proteínas, debido a que estas sufren por la presencia de aquellas la transición de una configuración espacial a otra (94,95). Además en estructuras proteicas que están compuestas de varias unidades, el cambio de la fuerza iónica provoca la disociación en subunidades (96,97), hecho este en el que podría estar involucrada la sacarosa sintetasa, por cuanto ha sido mostrada en preparaciones de *P. aureus* y arroz que la enzima se compone de

cuatro subunidades cuyo peso molecular es  $9-10 \times 10^4$ . Luego tanto uno como otro efecto conducirían a que la pérdida de la actividad por la presencia del ClNa sería el resultado de una modificación estructural de la proteína.

Reversibilidad de la reacción y variación en las bases de los nucleótidos-glucosa y nucleósidos difosfato.

La sacarosa sintetasa, en una reacción reversible, utiliza diferentes NDPG (síntesis) y NDP (clivaje), a diferencia de otras enzimas que actúan en reacciones en las que intervienen nucleótidos-azúcares, las cuales muestran especificidad tanto por el azúcar como por la base (25,33,49, 50). Luego sería dable esperar que los reactivos que modifiquen su estructura podrían alterar la afinidad por los sustratos antes mencionados o modificar la actividad en una dirección en forma distinta a la otra. Con ese propósito se utilizaron el PCMB, la urea, el GuHCl, el dioxano y el tratamiento a diferentes temperaturas. La sacarosa sintetasa de *H. tuberosus* al igual que la enzima obtenida de diversas fuentes es sensible a los compuestos que actúan sobre grupos -SH. En preparaciones obtenidas de distintos orígenes la actividad medida en el sentido de la síntesis, es inhibida por PCMB, PHMB y p-benzoquinona, siendo revertido dicho efecto por la presencia en el medio de incubación de cisteína, DTT y  $\beta$ -mercaptoetanol (25,57,62). Considerando el efecto del PCMB sobre ambos sentidos de la reacción, se concluiría que idéntico número de grupos -SH estarían involucrados en la síntesis y en el clivaje de la sacarosa, por cuanto la inhibición es similar cualesquiera sea la dirección estudiada. La urea, el GuHCl y el dioxano son compuestos am-

pliamente utilizados en los estudios de desnaturalización de proteínas. Los dos primeros producen modificaciones en la estructura proteica provocando la transición de una forma ordenada a otra en la cual el arrollamiento es al azar (94,95); en tanto el tercero altera las propiedades del solvente, reduciendo su constante dieléctrica con lo que la proteína desnaturalizada de tal forma presenta una configuración ordenada la cual es diferente de la nativa (94,95). Por efecto de estos reactivos, la enzima presenta una disminución de la actividad, la cual decrece de igual manera tanto en el sentido de síntesis como en el de clivaje, y además con los mismos no se consigue alterar la mayor afinidad de la sacarosa sintetasa por el UDP respecto a los otros nucleósidos difosfato, así como tampoco la del UDPG en relación al ADPG. Idénticos resultados son obtenidos en el tratamiento a diferentes temperaturas. Al respecto Grimes y col. (51) intentaron separar la enzima en subunidades que fueran activas con cada uno de los NDPG solamente, pero a pesar de la variedad de ensayos el resultado fué negativo. Es decir que en este trabajo se confirman dichos experimentos y además se los amplía haciéndolos extensivos a ambos sentidos de la reacción, puesto que los tratamientos efectuados a la enzima no modifican, en ningún caso, la mayor afinidad de la misma tanto por el UDPG (síntesis) como por el UDP (clivaje).

A todo lo anterior se suman los datos cinéticos, los cuales muestran que el UDPG es el sustrato preferente en la incorporación de glucosa a fructosa, puesto que si bien otros NDPG pueden actuar como dadores de glucosilos, su actividad es inhibida por UMP, UDP, y UTP más fuertemente que cuando el UDPG es el sustrato (66). Además la  $K_i$  del UDPG, cuando el ADPG es el sustrato, es menor que la  $K_i$  del ADPG cuando el UDPG es el sustrato ; siendo la  $K_m$  del UDPG menor diez veces que la  $K_m$  del ADPG (51). Por otra parte,

Budowsky y col (53) hallaron que la enzima posee mayor afinidad por el UDPG que por sus análogos en los cuales se ha modificado el núcleo pirimidina, observándose idéntica situación cuando se compara UDPG con ADPG y análogos de éste último.

Considerada la reacción en el sentido de clivaje de la sacarosa, el UDP es mejor aceptor de glucosilos que el ADP, resultado este que coincide con los obtenidos en tapioca (52); siendo además el UTP un inhibidor más potente que el ATP y el GTP. A ello debe agregarse que la Km de sacarosa es menor cuando el sustrato es UDP que cuando es ADP (56,58).

Todos estos datos contribuyen a sugerir que la uridina es la base preferida en los NDPG y NDP que intervienen en los procesos catalizados por la sacarosa sintetasa, ya que esta situación persiste a pesar de los intentos de modificarla por la presencia de metabolitos en el medio de incubación o por diferentes tratamientos efectuados a la proteína.

#### Acción proteolítica sobre la sacarosa sintetasa

La acción de las enzimas proteolíticas sobre la sacarosa sintetasa presenta resultados distintos, ya que si bien quimotripsina y papaína no alteran substancialmente el valor de SSAR (velocidad de la sacarosa sintetasa en el sentido de clivaje/velocidad de la sacarosa sintetasa en el sentido de síntesis) de lo cual se desprende que no modifican una velocidad preferencialmente respecto a la otra, la tripsina tiene un efecto diferente. En este último caso el valor del SSAR es alterado como resultado de una velocidad de inactivación mayor del clivaje con respecto a la síntesis, no siendo esta modificación particular de la enzima de H.

tuberosus por cuanto la misma también se verifica con preparaciones de *P. aureus* y *P. sativum*. El estudio de las constantes cinéticas revela que el efecto de la tripsina no provoca variación en la  $K_m$  de UDP, y sí lo hace sobre la  $K_m$  de sacarosa, lo cual indica que la acción trípica produce la modificación del centro activo de la enzima, de modo tal que afecta la unión de la sacarosa a la misma.

Estos resultados conducen a tratar de correlacionar a los mismos con el rol fisiológico que dicho efecto pueda cumplir. Al respecto es conocido que la presencia de  $Ca^{2+}$  en soluciones de tripsina produce un retardo de la autólisis, debido a un cambio conformacional que origina una estructura más compacta (98); de igual modo el Ca estabiliza otras enzimas proteolíticas impidiendo su autodigestión (99,100). En el presente trabajo cuando homogenatos de *H. tuberosus* son preincubados en presencia del ion antedicho se produce una inactivación de la sacarosa sintetasa, que no es revertida por EDTA. Este hecho, además de los anteriores, presenta la probabilidad de la existencia de una proteasa que actuaría sobre la enzima, si bien la especificidad y el rol fisiológico de la misma requieren un mayor estudio.

#### Inhibición por azúcares.

La glucosa es un inhibidor del clivaje de la sacarosa catalizada por la sacarosa sintetasa, siendo necesaria la integridad de su estructura para ejercer dicho efecto, por cuanto la modificación en los C-2 (salvo glucosamina), C-4 y C-6 produce la desaparición del poder inhibitorio. En lo que atañe al C-1 solamente aquellos en los cuales el susti-

tuyente se halla en posición anomérica  $\beta$  retienen la capacidad de inhibición, siendo máximo el efecto cuando la aglicona está constituida por un núcleo benceno.

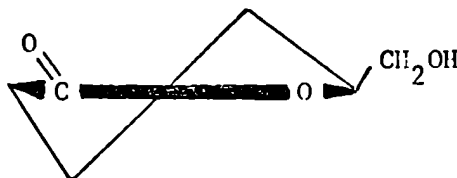
Aquellos azúcares, que inhiben a la enzima, cuando se encuentran en solución acuosa presentan una mayor proporción de la forma piranosa, aunque las conformaciones que adquiere dicho anillo son diferentes según el compuesto en cuestión; de acuerdo a la nomenclatura utilizada por Bentley (101) ellas son:

Compuesto	Conformación	Anoméro
a) glucosa, $\beta$ -fenilglucósido, $\beta$ -tioglucosa	silla ( ${}^4C_1$ )	$\beta$
b) glucosamina	silla ( ${}^4C_1$ )	$\alpha$
c) fructosa, L-sorbosa	silla ( ${}^1C_4$ )	$\beta$
d) $\delta$ -gluconolactona	media silla (H)	-

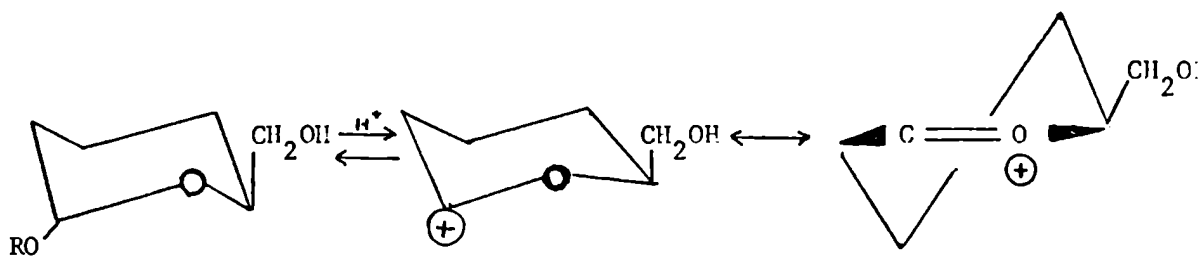
Los resultados de inhibición permiten especular respecto al mecanismo por el cual se produce el paso de la glucosa de la sacarosa al UDPG. En ambos compuestos la configuración anomérica de la glucosa es  $\alpha$  y por ello se descarta la posibilidad de un desplazamiento simple ya que ello conduce a una inversión en el producto. Entonces uno de los mecanismos probables es el doble desplazamiento, vale decir, producida la ruptura de la glucosa ( $\alpha$ ), esta se une a la enzima invirtiendo su configuración anomérica; el complejo E-glucosa ( $\beta$ ) reacciona con el otro sustrato y se produce un compuesto con glucosa ( $\alpha$ ). Por lo tanto se producen dos inversiones de Walden que resultan en la retención de la configuración del producto final. A este mecanismo responde la sacarosa fosforilasa (102).



Por otra parte las  $\beta$ -glucosidasas y la glucógeno fosforilasa (103,104), que también actúan con retención de la configuración, son inhibidas por la  $\delta$ -gluconolactona. Debido a que este último compuesto adopta una conformación media silla (105),



la cual es similar a la del hipotético ion carbonio formado en la catálisis ácida de un glucósido (106)



ello induce a suponer que la  $\delta$ -gluconolactona al tomar la estructura media silla que presenta el antedicho ion actuaría inhibiendo la formación del mismo (107)

En el caso de la sacarosa sintetasa la inhibición por  $\delta$ -gluconolactona hace presumir que la reacción discurre a través del ion carbonio, aunque otras posibilidades no pueden excluirse debido a la variedad en la conformación de los azúcares que actúan como inhibidores.

### Mecanismo de acción - Estudios cinéticos

De acuerdo con la nomenclatura propuesta por Cleland (108) la sacarosa sintetasa cataliza una reacción bi-bi, es decir dos sustratos se combinan generando dos productos; el  $H^+$  no es considerado como sustrato (o producto) debido a que en todo momento el pH es constante. En ellas los estudios de velocidad inicial, inhibición por productos y por inhibidores que no generan productos han mostrado ser métodos eficaces en la determinación del mecanismo mediante el cual se efectúa la adición de los sustratos y la liberación de los productos (109-111).

El gráfico de la velocidad inicial obtenido en el presente trabajo muestra una familia de rectas cuyo punto de intersección se halla a la izquierda del eje de las ordenadas y debajo del eje de las abscisas; luego, la reacción es secuencial, vale decir deben adicionarse ambos sustratos a la enzima para que se produzca la liberación del primer producto. Ello corrobora el experimento efectuado por Avigad (39), quien no encontró intercambio isotópico entre sacarosa- $^{14}C$  y fructosa en presencia de la enzima y en ausencia de nucleósido difosfato o nucleótido-azúcar. De esta manera ambos resultados permiten descartar la posibilidad de un mecanismo ping-pong (entrada del primer sustrato, liberación del primer producto, combinación del segundo sustrato, liberación del segundo producto). Los experimentos anteriores no indican si un sustrato precede obligatoriamente al otro en la combinación con la sacarosa sintetasa (mecanismo ordenado), o si el mismo se une a la enzima encontrándose esta combinada con el sustrato o no (mecanismo al azar). Para poder establecer si existe o no, un ordenamiento en la combinación de los sustratos con la enzima, y en caso afirmativo determinar cual es el mismo, se hace necesario el estudio de la inhibición por productos.

Varios autores han mostrado (52,56) que en el sentido de síntesis de la sa-

carosa el UDP es un inhibidor competitivo con respecto al UDPG. Este resultado fué confirmado en el presente trabajo, observándose que la inhibición es lineal, es decir que ambos compuestos compiten por la misma forma de enzima o por formas separadas de caminos libremente reversibles. Dicho nucleósido difosfato es, por otra parte, inhibidor no competitivo con respecto a la fructosa, siendo lineales la variación de las pendientes y las ordenadas en el origen en función del UDP, lo cual implica que el UDP reacciona con una sola forma de enzima.

El efecto de los productos sobre la velocidad inicial cuando la reacción se considera en el sentido de clivaje no se había efectuado hasta el momento.

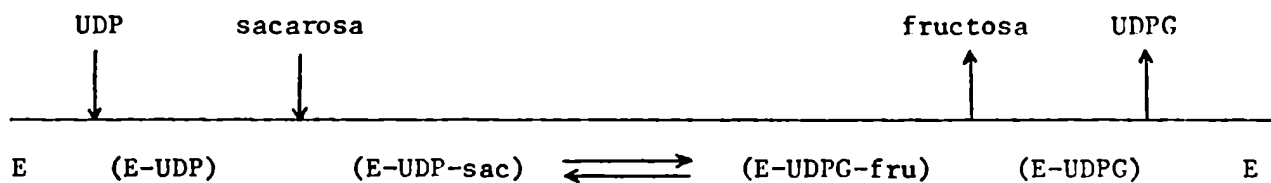
En dicho sentido el UDPG es un inhibidor competitivo lineal con respecto al UDP. Además, la fructosa, el otro producto de la reacción, presenta inhibición no competitiva con respecto a sacarosa, en tanto que al ser estudiado su efecto siendo UDP el sustrato variable, se obtiene una inhibición incompetitiva mostrando este último resultado que las ordenadas en el origen son funciones lineales del inhibidor, o sea que la fructosa se combina a una sola forma de enzima la cual es diferente de la que reacciona con el UDP.

De estos datos se desprende que un solo par (UDPG-UDP) presenta inhibición competitiva, no así el otro (fructosa-sacarosa). Estos resultados descartan la posibilidad de un mecanismo al azar, y además coinciden con las inhibiciones propuestas por Cleland (108) para un mecanismo biordenado.

sustrato variable producto	UDPG		sacarosa	
	teórico	experimental	teórico	experimental
UDPG	C	C		
fructosa	IC	IC	NC	NC

inhibición: C: competitiva NC: no competitiva IC: incompetitiva

en el cual, considerado el sentido de clivaje de la sacarosa, UDP es el primer sustrato que se combina con la enzima y UDPG el último producto liberado



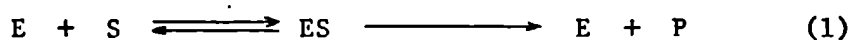
Si este mecanismo fuese el correcto entonces sería de esperar que un inhibidor que no genere productos y que reaccione con la forma E-UDP produzca una inhibición competitiva con respecto a sacarosa e incompetitiva en relación al UDP. Este comportamiento se observa con la salicina.

Por el contrario el  $\beta$ -fenilglucósido presenta inhibiciones no competitivas lineales frente a ambos sustratos. Este hecho tiene explicación dentro del mecanismo propuesto si la combinación del  $\beta$ -fenilglucósido se efectuase a dos formas de enzima, E y E-UDP, en cuyo caso el comportamiento seguiría siendo lineal, ya que dicho carácter desaparece cuando son dos las moléculas de un inhibidor que se unen a una forma de enzima, por lo cual, aparecen multiplicados por  $\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)^2$  algunos términos de la velocidad, y al ser expresados en función de I no se obtendrá una línea recta (109).

Estos resultados discrepan con los mecanismos propuestos por otros autores (58, 87). Se ha sugerido un mecanismo ping-pong para las enzimas obtenidas de plántulas de arveja (87), hallándose este resultado en contradicción con los obtenidos en *H. tuberosus*, puesto que Avigad mostró que en presencia de la enzima no existe intercambio isotópico entre fructosa y sacarosa- $^{14}\text{C}$  (39), y además en el presente trabajo se observa que el gráfico de velocidad inicial está constituido por líneas que presentan un punto de intersección y no paralelas como sería dable esperar en un mecanismo ping-pong.

Por otra parte Delmer ha sugerido para la enzima de *P. aureus* un mecanismo al azar (58). Si el mismo fuese al azar con equilibrio rápido (el paso limitante es la transformación del complejo ternario) entonces existirían dos pares de inhibición competitiva, y en nuestro caso solo hay uno (UDPG-UDP). Dicha autora extrae sus conclusiones a partir de los siguientes resultados: a) la  $K_m$  para UDP es independiente de la concentración de sacarosa; b) las constantes cinéticas determinadas responden a la ecuación de Haldane. Respecto al primer ítem es de destacar que el punto de intersección, en un gráfico  $1/v$  vs.  $1/UDP$ , a varios niveles de sacarosa, depende de las constantes cinéticas en juego más que del mecanismo en sí; en el caso de un mecanismo ordenado dicho punto dependerá de la relación  $K_{ia}/K_a$  (111). Por otra parte la ecuación de Haldane no es muy sensible a los errores involucrados en la determinación de las constantes cinéticas (112) y es preferible utilizarla para tratar de confirmar un mecanismo más que para demostrar el mismo (111). Durante el estudio cinético precedente se emplea el gráfico de Dixon cuando las inhibiciones son competitivas. Ello ha sido objetado por Purich y Fromm por cuanto en el mismo no pueden diferenciarse una inhibición competitiva de una mixta (113).

Utilizando las ecuaciones de los autores mencionados previamente



donde E, S, I, P representan la enzima, el sustrato, el inhibidor y el producto respectivamente.

La expresión de la velocidad será:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left[ 1 + \frac{(I)}{K_{ii}} \right] + \frac{K_m}{V(S)} \left[ 1 + \frac{(I)}{K_i} \right] \quad (4)$$

donde:

v : velocidad inicial de la reacción

V : velocidad máxima

K<sub>m</sub> : constante de Michaelis

S : concentración del sustrato

I : concentración del inhibidor

K<sub>i</sub> : constante de disociación de la reacción (2)

K<sub>ii</sub> : constante de disociación de la reacción (3)

La ecuación (4) puede ser reordenada de la siguiente manera:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left[ 1 + \frac{K_m}{(S)} \right] + \frac{1}{V} \left[ \frac{1}{K_{ii}} + \frac{K_m}{K_i (S)} \right] (I) \quad (5)$$

La pendiente de las curvas obtenidas según la ecuación (5) será:

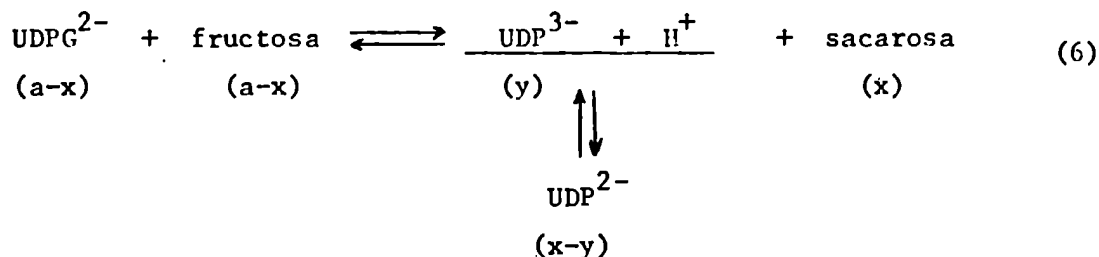
$$\frac{1}{V} \left[ \frac{1}{K_{ii}} + \frac{K_m}{K_i (S)} \right]$$

es decir que representando las pendientes obtenidas en el gráfico de Dixon vs. 1/S se tendrán dos esquemas: a) si  $K_{ii} \approx K_i$ , entonces la ordenada en el origen será un valor finito  $(V K_{ii})^{-1}$ ; b) si  $K_{ii} \gg K_i$ , lo cual equivale prácticamente a una inhibición competitiva, se obtendrá una línea recta que pasa por el origen.

Esta verificación es utilizada en todos los gráficos de Dixon realizados en el presente trabajo (111).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la sacarosa sintetasa cataliza la transferencia de la glucosa mediante un mecanismo biordenado, el cual posiblemente involucra la participación de un ión carbonio como intermediario. En dicha reacción el UDPG y el UDP son los compuestos preferentes de la misma frente a los otros NDPG y NDP, ya que la modificación de la actividad tanto por reactivos que alteran la proteína, como por metabolitos no cambian en ningún caso esta situación.

El otro punto importante es la reversibilidad de la reacción, lo cual plantea ciertos problemas con respecto a su rol fisiológico, puesto que los valores de Keq obtenidos (20,39,55,58) indicarían que el sentido de la síntesis es el facilitado, pero la formación de sacarosa 6-fosfato con una Keq muy alta sería la que presenta mayor probabilidad de actuar en la producción de sacarosa (23); por ello se ha sugerido que in vivo la sacarosa sintetasa actúa en el sentido de clivaje (31,59,60,63). Al respecto es necesario tener en cuenta cual es la localización celular de esta enzima, y por ende el pH de su microambiente, por cuanto el mismo no solamente afecta las características cinéticas sino también el equilibrio de la reacción, ya que en ella interviene un ion  $H^+$

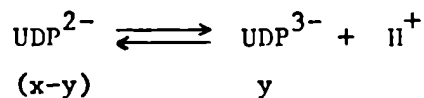


$$K_{eq} = \frac{(\text{sacarosa}) \cdot (H^+) \cdot (UDP^{3-})}{(UDPG^{2-}) \cdot (\text{fructosa})} \quad (7)$$

En la ecuación (6) se considera que a son las concentraciones iniciales de UDPG y fructosa, y x la concentración de productos obtenidos cuando se alcanza el equilibrio ( $t = \infty$ ); además es necesario considerar que a los pH a los cuales se mide la actividad, el  $UDP^{3-}$  está en equilibrio con su ácido conjugado el  $UDP^{2-}$  ya que el pKa del fosfato secundario es 6,5 (92). Por lo tanto reordenando (7) se tendrá:

$$K_{eq} = \frac{x}{(a-x)^2} \cdot y \cdot (H^+)$$

El valor de  $y$  se obtiene considerando el equilibrio entre  $UDP^{2-}$  y  $UDP^{3-}$ :



$$K_a = \frac{y \cdot (H^+)}{(x-y)}$$

$$y = x \cdot \frac{K_a}{(H^+) + K_a}$$

$$K_{eq} = \frac{x}{(a-x)^2} \cdot x \cdot \frac{K_a}{(H^+) + K_a} \cdot (H^+)$$

$$K_{eq} = \frac{x^2}{(a-x)^2} \cdot (H^+) \cdot \frac{K_a}{(H^+) + K_a}$$

Es decir que la constante aparente de equilibrio de la reacción será función del ion  $H^+$ , ya que en su ecuación la concentración del mismo intervie-



ne a) como sustrato (o producto), b) por la ionización del fosfato secundario del UDP. Por otra parte aunque la  $K_{eq}$  no sea favorable, la sacarosa sintetasa puede estar fisiológicamente dirigida a catalizar el clivaje, puesto que de acuerdo a la ecuación de Haldane

$$K_{eq} = \frac{V_s}{V_c} \cdot \frac{K(UDP) \cdot K(sac)}{K(UDPG) \cdot K(fru)} \quad (8)$$

donde:

$V_s$  : velocidad máxima en el sentido de síntesis

$V_c$  : velocidad máxima en el sentido de clivaje

$K(UDP)$  : constante de Michaelis o de inhibición (111) de UDP

$K(UDPG)$ : ídem de UDPG

$K(sac)$  : ídem de sacarosa

$K(fru)$  : ídem de fructosa

para que la enzima esté destinada a catalizar el clivaje tendría que estar aumentada  $V_c$  sobre  $V_s$ , con lo que el producto  $K(UDP) \cdot K(sac)$  tendría que ser mayor que  $K(UDPG) \cdot K(fru)$  para cumplir (8). Observando los valores obtenidos (tabla I) se ve que todas estas condiciones se cumplen. Ejemplos similares al anterior se han observado con otras enzimas (111, 115, 116) en las cuales la  $K_{eq}$  es aún más baja.

La fácil reversibilidad de la enzima discutida precedentemente presenta otro aspecto. Frieden (116) basándose en la ecuación de Haldane para una reacción Uni Uni (un sustrato genera un producto) analiza una serie de posibilidades por las cuales una reacción reversible puede ser modificada en sus constantes cinéticas, siendo el resultado final la alteración diferencial de la velocidad en un sentido con respecto al otro. Ello se ha comprobado con

la enzima extraída de *P. aureus* (61).

En nuestro caso el efecto del  $\beta$ -fenilglucósido se encontraría dentro de dicha alternativa ya que el mismo muestra inhibición competitiva con respecto a UDPG en el sentido de síntesis, lo cual implica que en la ecuación (8)  $V_s$  mantendrá su valor, en tanto que  $K(\text{UDPG})$  se hallará afectada por un factor  $1 + I/K_i$  (en relación a la fructosa el glucósido es un inhibidor no competitivo, pero la inhibición es superada si se utiliza concentraciones de UDPG saturantes). Cuando se analiza el sentido inverso ambas inhibiciones son no competitivas, por lo cual la velocidad máxima será  $\frac{V_c}{1 + \frac{I}{K_{ii}}}$  en tanto que  $K(\text{UDPG})$  como  $K(\text{sac})$  estarán multiplicadas por un factor  $1 + I/K_i$ , manteniéndose en todo momento constante en la ecuación (8)  $K_{eq}$ , por cuanto el mismo es un valor inherente a la reacción en sí.

Luego por la presencia de un metabolito se ha logrado que una velocidad máxima sea modificada (clivaje), en tanto que la otra permanezca inalterada (síntesis).

REFERENCIAS

1. ESAU K., Plant Anatomy, J. Wiley, New York (1967)
2. KURSANOV A. L., Advances in Botanical Research, vol 1, p.209,  
(R.D. Preston, Ed.) Academic Press, London (1963)
3. SWANSON C.A., Plant Physiology, vol II, p. 481, (F.C.Steward Ed.)  
Academic Press, New York (1959)
4. YAMAMOTO T., SEKIGUCHI S., NOGUCHI M., Plant Cell Physiol. 11 (1970)  
367
5. MILTHORPE F.L., MOORBY J., Ann. Rev. Plant Physiol. 20 (1969) 117
6. HARTT C. E., KORTSCHAK H.P., Plant Physiol. 42 (1967) 89
7. ARNOLD W.N., J. Theoret. Biol. 21 (1968) 13
8. BESLOW D.T., RIER J.P., Plant Cell Physio. 10 (1969) 69
9. RIER J.P., BESLOW D.T., Bot. Gaz. 128 (1967) 73
10. WETHMORE R.H., RIER J.P., Amer. J. Bot. 50 (1963) 418
11. EDELMAN J., HANSON A.D., Planta 98 (1971) 150
12. EDELMAN J., JANSON A.D., Planta 101 (1971) 122
13. HANSON A.D., EDELMAN J., Planta 102 (1972) 11
14. HASSID W.Z., DOUDOROFF M., Advanc. Enzym. 10 (1950) 123
15. HASSID W.Z., DOUDOROFF M., Advanc. Carbohyd. Chem 5 (1950) 29
16. CAPUTTO R., LELOIR L.F., CARDINI C.E., PALADINI A.C., J. Biol Chem.  
184 (1950) 333
17. NIKAIDO H., HASSID W.Z., Advan. Carbohyd. Chem. 26 (1971) 351
18. BUCHANAN J.G., Arch. Biochem. Biophys. 44 (1953) 140
19. LELOIR L.F., CARDINI C.E., J. Amer. Chem. Soc. 75 (1953) 6084
20. CARDINI C.E., LELOIR L.F., CHIRIBOGA J., J. Biol. Chem 214 (1955)  
149
- 21a. BUCHANAN J.G., Sugar (Yudkin J., Fdelman J., Hough L., Ed.)  
London Butterworths (1971)

21. LELOIR L.F., CARDINI C.E., J.Biol.Chem. 214 (1955) 157
22. HAWKER J.S., HATCH M.D., Biochem.J. 99 (1966) 102
23. MENDICINO N., J. Biol. Chem 235 (1960) 3347
24. DE FEKETE M.A.R., Europ. J. Biochem. 19 (1971) 73
25. SLABNIK E., FRYDMAN R.B., CARDINI C.E., Plant Physiol. 43 (1968)  
1063
26. LAVINTMAN N., CARDINI C.E., Plant Physiol. 43 (1968) 434
27. PUTMAN E.W., HASSID W.Z., J. Biol. Chem 207 (1954) 885
28. EDELMAN J., GINSBURG V., HASSID W.Z., J. Biol. Chem. 213 (1955) 841
29. BEAN R.C., BARR B.K., WELCH H.V., PORTER G.G., Arch. Biochem. Biophys  
96 (1962) 524
30. BIRD I.F., PORTER H.K., STOCKING C.R., Biochim.Biophys. Acta 100  
(1965) 366
31. DELMER D.P., ALBERSHEIM P., Plant Physiol. 45 (1970) 782
32. HAQ S., HASSID W.Z., Plant Physiol. 40 (1965) 591
33. HASSID W.Z., Ann.Rev.Plant Physiol. 18 (1967) 253
34. HATCH M.D., SACHER J.A., GLASZIOU K.T., Plant Physiol. 38 (1963) 33
35. HATCH M.D., GLASZIOU K.T., Plant Physiol. 38 (1963) 344
36. SACHER J.A., HATCH M.D., GLASZIOU K.T., Plant Physiol. 38 (1963) 34
37. COOPER R.A., GREENSHIELDS R.N., Biochem J. 92 (1964) 357
38. LYNE R.L., AP REES T., Phytochemistry 10 (1971) 2593
39. AVIGAD G., J. Biol. Chem 239 (1964) 3613
40. SASAKI T., TADOKORO K., SUZUKI S., Phytochemistry 10 (1971) 2047
41. SACHER J.A., Plant Physiol 41 (1966) 181
42. HATCH M.D., HAWKER J.S., Physiol.Plantarum 18 (1965) 444

43. ARNOLD W.N., Biochim. Biophys. Acta 128 (1966) 196
44. VAUGHAN D., MAC DONALD Plant Physiol. 42 (1967) 456
45. RICARDO C. P.P., AP RESS T., Phytochemistry 9 (1970) 239
46. HAWKER J.S., Phytochemistry 8 (1969) 337
47. NEUFELD E.F., HASSID, W.Z., Advan. Carbohydr. Chem. 18 (1963) 309
48. LELOIR L.F., CARDINI C.E., CABIB E., Comparative Biochemistry, Vol I  
p. 97 (M. Florkin, H.S. Mason, ed.) Academic Press, New York (1960)
49. SALO W.L., NORDIN J.H., PETERSON D.R., BEVILL R.D., KIPKWOOD S.,  
Biochim. Biophys. Acta 151 (1968) 484
50. FURLONG C E., PREISS J., J. Biol. Chem 244 (1969) 2539
51. GRIMES W.L., JONES B.L., ALBERSHEIM P., J. Biol. Chem. 245 (1970)  
188
52. SHUKLA R.N., SANWAL G.G., Arch. Biochem. Biophys. 142 (1971) 303
53. BUDOWSKY E.I., DRUSHININA T.N., ELISEEVA G.I., GABRIELIAN N.D.  
KOCHEKOV N.K., NOVIKOVA M.A., SHIBAEV V.N., ZHDANOV G. I. ,  
Biochim. Biophys. Acta 122 (1966) 213
54. GABRIELIAN N.D., LAPINA E.B., SPIRIDONOVA S.M., SHIBAEV V.N.,  
BUDOWSKI E.I., KOCHEKOV N.K., Biochim. Biophys. Acta 185  
(1969) 478
55. AVIGAD G., MILNER Y., Methods in Enzymology, vol 8, p.341,  
(E.F. Neufeld, V. Ginsburg, ed), Academic Press, New York, (1966)
56. MURATA T., Agr. Biol. Chem. 35 (1971) 1441
57. PRESSEY R., Plant Physiol. 44 (1969) 759
58. DELMER D.P. J. Biol. Chem. 247 (1972) 3822

59. DE FEKETE M.A.R., CARDINI C.E., Arch.Biochem.Biophys. 104 (1964) 173
60. MURATA T., SUGIYAMA T., MINAMIKAWA T., AKAZAWA T., Arch.Biochem.  
Biophys. 113 (1966) 34
61. DELMER D.P., Plant.Physiol. 50 (1972) 469
62. SLACK C.R., Phytochemistry 5 (1966) 397
63. DE FEKETE M.A.R., Planta 87 (1969) 311
64. PONTIS H.G., Physiol. Plantarum 23 (1970) 1089
65. JAARMA M., Acta Chemica Scand 20 (1966) 594
66. CARDINI C.E., RECONDO E., Plant. Cell Physiol. 3 (1962) 313
67. MACLACHLAN G.A., DATKO A.G., ROLLIT J., STOKES E., Phytochemistry  
9 (1970) 1023
68. HAWKER J.S., Phytochemistry 10 (1971) 2313
69. PRIDHAM J.B., WALTER M.W., WORTH H.G.J., J.Exptl.Bot. 20 (1969) 31
70. SOWOKINOS J.R., Amer Potato J. 48 (1971) 37
71. PERCHERON F., Comp. Rend. Ac.Sc. 255 (1962) 2521
72. ASHWELL G., Methods in Enzymology, vol 3, p. 73 (S.P. Colowick, N.  
O. Kaplan, Ed.) Academic Press, New York (1957)
73. FISKE C.G., SUBBAROW Y., J.Biol.Chem. 66 (1925) 375
74. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., J.Biol. Chem.  
193 (1951) 265
75. OYAMA V.I., EAGLE H., Proc.Soc.Exptl.Bio.Med. 91 (1956) 305
76. WARBURG O., CHRISTIAN W., Biochem. Z. 310 (1941) 380
77. Manual de instrucciones LKB 8100 AMPHOLINE
78. GODSON G.N., Anal.Biochem. 35 (1970) 66

79. GABRIEL O., Methods in Enzymology, vol 22, p. 565, (W.B. Jakoby Ed.)  
(Academic Press, New York (1971))
80. WARAWDEKAR V.S., SASLAW L.D., J.Biol.Chem. 234 (1959) 1945
81. LINEWEAVER H., BURK D.J., J.Amer.Chem.Soc. 56 (1934) 658
82. ROREM E.S., WALKER H.G., MC CREADY R.M. Plant Physiol. 35 (1960) 26
83. NAKAMURA M., Bull.Agric.Chem.Soc.Japan 23 (1959) 398
84. SCHWIMMER S., ROREM E.S., Nature 187 (1960) 1113
85. NOMURA T., AKAZAWA T., Arch.Biochem.Biophys. 156 (1973) 644
86. MURATA T., Agr.Biol.Chem. 10 (1972) 1815
87. HISIEN-YI SUNG, JONG-CHING SU, Abstracts of the 9th International  
Congress of Biochemistry, Stockholm, 1-7 July 1973
88. NEUCERE N.J., ST.ANGELO A.J., Anal.Biochem 47 (1972) 80
89. CHI-FAI CHEUNG A., Arch.Biochem.Biophys 154 (1973) 19
90. RAVAL D. , WOLFE R.G., Biochemistry 1 (1962) 1118
91. FRIEDEN C., ALBERTY R.A., J.Biol.Chem. 212 (1955) 859
92. Data for Biochemical Research (Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliot W.H  
Jones K.M., Ed.) Oxford at Clarendon Press (1969)
93. WALAAS E., Acta.Chem.Scand. 12 (1958) 528
94. TANFORD C., Advan.Protein.Chem. 23 (1968) 121
95. TANFORD C., Advan.Protein.Chem. 24 (1970) 1
96. THOMAS J.O., EDELSTEIN S.J., J.Biol.Chem. 248 (1973) 2901
97. ROSSI FANELLI A., ANTONINI E., CAPUTO A., Advan.Protein.Chem. 19  
(1964) 74
98. LAZDUNSKI M., DELAAGE M., Biochim.Biophys.Acta 105 (1965) 541
99. CHERVENKA C.H., Biochim.Biophys. Acta 31 (1959) 85
100. CHERVENKA C.H., J.Biol.Chem. 237 (1962) 2105



101. BENTLEY R., Ann.Rev.Biochem. 41 (1972) 953
102. VOET J.G., ABELES R.H. J.Biol.Chem. 245 (1970) 1020
103. LEVY G.A., SNAITH S.M., Advan.Enzymol. 36 (1972) 151
104. TU J., JACOBSON G.R., GRAVES D.J., Biochemistry 10 (1971) 1229
105. REESE E.T., PARRISH F.W. ETTLINGER M., Carbohydrate Res. 18 (1971)  
381
106. BE MILLER J.N., Advan Carbohydrate Chem. 22 (1967) 25
107. LEABACK D.H., Biochem.Biophys. Res. Commun 32 (1968) 161
108. CLELAND W.W., Biochim.Biophys. Acta 67 (1963) 104
109. CLELAND W.W., Biochim.Biophys. Acta 67 (1963) 173
110. CLELAND W.W., Biochim.Biophys. Acta 67 (1963) 188
111. CLELAND W.W., Ann.Rev. Biochem 36 (1967) 77
112. KUBY S.A., NOLTMANN E.A., The Enzymes, vol 6, p.515, (Boyer P.D.,  
Lardy H., Myrbäck K., Ed.) Academic Press New York, (1962)
113. PURICH D.L., FROMM J.J., Biochim.Biophys. Acta 268 (1972) 1
114. CLELAND W.W., THOMPSON V.W., Federation Proc. 24 (1965) 228
115. RAVAL D., WOLFE R.G., Biochemistry 1 (1962) 1112
116. FRIEDEN C., J.Biol.Chem. 239 (1964) 3522
117. DIXON M., Biochem.J. 55 (1953) 170