

## Tesis de Posgrado

# Estudio de las alfa-(1 flecha 4) glucan fosfohidrolasas de semillas de maíz dulce

Tandecarz, Juana Sara

1977

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:**

Tandecarz, Juana Sara. (1977). Estudio de las alfa-(1 flecha 4) glucan fosfohidrolasas de semillas de maíz dulce. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1557\\_Tandecarz.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1557_Tandecarz.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Tandecarz, Juana Sara. "Estudio de las alfa-(1 flecha 4) glucan fosfohidrolasas de semillas de maíz dulce". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1977. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1557\\_Tandecarz.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1557_Tandecarz.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"ESTUDIO DE LAS  $\alpha$ -(1→4) GLUCAN FOSFOHIDROLASAS DE SEMILLAS  
DE MAIZ DULCE"

Autor: Juana Sara Tandecarz

Director: Dr. Carlos E. Cardini

Lugar de trabajos: Instituto de Investigaciones Bioquímicas-Fundación  
Campomar

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS  
ORIENTACION QUIMICA BIOLOGICA

1977

REC. N° 112

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Doctor Carlos E. Cardini por su dirección y constante interés. Fué él quien posibilitó mi ingreso al Instituto de Investigaciones Bioquímicas y con su ayuda, así como con sus valiosas sugerencias ha hecho posible la realización de este trabajo.

A la Doctora Nelly Lavintman, por su constante apoyo y afectuoso estímulo.

Al Doctor Juan M. Castagnino, por haber participado en mi formación en los comienzos de esta actividad.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por el apoyo material brindado.

Al Doctor Luis F. Leloir y a mis compañeros y amigos del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, por su colaboración y críticas.

A Soledad de Giménez y a Margarita Mazzardi, por su abnegada colaboración.

A MIS PADRES

A BORIS

INDICE

	<u>Página</u>
Abreviaturas	1
<u>INTRODUCCION</u>	
Consideraciones generales	3
Estructura del grano de almidón	6
Amilosa	7
Amilopectina	9
Fitoglucógeno	11
Biosíntesis del grano de almidón	12
Enzimas que intervienen	13
Fosforilasas	13
Almidón sintetasa	15
Enzima ramificante	16
Mecanismo de formación de aceptores glucosídicos	18
Polisacáridos de maíz	20
Objetivos de esta investigación	23
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	
I- <u>Reactivos y enzimas</u>	25
II- <u>Preparación de polisacáridos</u>	25
III- <u>Semilla de Zea mays</u>	27
Estructura	27

## IV

Germinación	28
IV- <u>Preparación de enzimas</u>	29
Aislamiento de isoenzimas de fosforilasa	29
A- Extracto crudo	29
B- Precipitación fraccionada con sulfato de amonio	31
Purificación parcial de la isoenzima de baja movilidad de semillas germinadas durante tres días	31
Preparación de fosforilasa <u>a</u> de músculo de conejo	32
V- <u>Ensayo de actividad de fosforilasa y de otras enzimas</u>	34
VI- <u>Electroforesis en gel de poliacrilamida</u>	35
VII- <u>Procedimientos analíticos</u>	37
<u>RESULTADOS</u>	
I- <u>Electroforesis en gel de poliacrilamida</u>	39
Extracto crudo: semilla inmadura	39
Extracto crudo: semilla madura germinada	39
Precipitación fraccionada con sulfato de amonio	41
Semilla inmadura	41
Semilla madura germinada	41
II- <u>Purificación parcial de la isoenzima de fosforilasa de embrión de semilla de maíz dulce de tres días de germinación</u>	47
III- <u>Propiedades de la enzima</u>	52

Requerimientos para la actividad enzimática	52
Modificadores enzimáticos	58
IV- <u>Cinética</u>	58
V- <u>Inhibidores</u>	76
VI- <u>Mecanismo de acción</u>	82
<u>DISCUSION</u>	
Electroforesis en gel de poliacrilamida	94
Purificación parcial de la isoenzima de fosforilasa de embrión de semilla germinada	97
Cinética	98
Inhibidores	99
Mecanismo de acción	100
<u>CONCLUSIONES</u>	101
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	103

ABREVIATURAS

AMP	adenosina 5' monofosfato
ADP	adenosina 5' difosfato
ATP	adenosina 5' trifosfato
AMP cíclico	3', 5' adenosina monofosfato cíclico
ADP-glucosa	adenosina difosfato glucosa
Bis-acrilamida	N, N' metilen-bis-acrilamida
DEAE	dietil-aminoetil-celulosa
dextrina $\beta$ -límite	dextrina límite de $\beta$ -amilasa: ramas exteriores de 2-3 residuos de D-glucosa
dextrina $\phi$ -límite	dextrina límite de fosforilasa: ramas exteriores de 3-4 residuos de D-glucosa
dextrina $\phi, \beta$	dextrina que resulta de la acción de la $\beta$ -amilasa sobre la dextrina $\phi$ -límite: ramas exteriores de 2 residuos de D-glucosa
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Glu-1-P	glucosa-1-fosfato
iso-M <sub>5</sub>	iso-maltopentaosa
M <sub>2</sub>	maltosa
M <sub>3</sub>	maltotriosa
M <sub>4</sub>	maltotetraosa
M <sub>7</sub>	maltoheptaosa



MES	ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico
μmoles	micromoles = $10^{-6}$ moles
nmoles	nanomoles = $10^{-9}$ moles
nm	nanometros = $10^{-9}$ metros
P <sub>i</sub>	fosfato inorgánico
PP <sub>i</sub>	pirofosfato inorgánico
"primer"	nombre dado originalmente a los aceptores de unidades de glucosa, oligo- o polisacáridos, a partir de los cuales se forman y alargan cadenas $\alpha$ -(1→4) glucosídicas. Por su significado muy preciso y su uso generalizado en publicaciones científicas se prefiere el empleo del nombre original sin modificaciones.
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N' tetrametil-etilendiamina
Tricina	N-Tris(Hidroximetil)metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometano
UMP	uridina 5' monofosfato
UDP	uridina 5' difosfato
UTP	uridina 5' trifosfato
UDP-glucosa	uridina difosfato glucosa

## INTRODUCCION

### Consideraciones generales

En todos los organismos vivientes, aun en los períodos de máximo reposo, permanecen en funcionamiento sistemas celulares que requieren un aporte continuo de material, tanto para cumplir funciones estructurales como para suplir necesidades energéticas. Este requerimiento acrece considerablemente en períodos de trabajo más o menos intenso, los que se presentan especialmente en los animales. En condiciones habituales de funcionamiento, el aporte externo de material nutritivo llena cuantitativamente estas necesidades, pero siempre existen períodos intermedios de ayuno en los cuales se debe, de alguna forma, suministrar este material y la energía necesarios. De allí, la presencia universal de sustancias de reserva, que en los casos más generales, por lo menos para el uso más inmediato, están constituidas por hidratos de carbono derivados de la glucosa, especialmente polímeros  $\alpha$ -(1→4) glucanos lineales o ramificados.

En el caso de los animales, caracterizados por un metabolismo activo, con períodos de intensa actividad metabólica y con aporte alimenticio discontinuo, con períodos de ayuno más o menos prolongados, la reserva inmediata más generalizada es el glucógeno, que aunque presente en proporciones no muy altas, es de fácil y rápida utilización y resíntesis. La gran reserva indirecta de glucosa la constituyen las proteí-

nas, que aunque cumplen siempre actividad estructural o enzimática, por el proceso fundamental de la gluconeogénesis originan con facilidad glucosa y glucógeno. Además, los animales tienen la fuente energética considerable de los tejidos grasos.

En los vegetales, cuyo metabolismo es más lento y regular, el problema es distinto: durante el período diurno, la fotosíntesis que tiene carácter compulsivo, acumula en las hojas grandes cantidades de elemento nutricional en forma de hidratos de carbono. Dada la cantidad de este material, su transporte inmediato sería imposible, por lo que se va acumulando en su mayor parte en forma de polisacárido insoluble, el almidón transitorio de las hojas y en menor cantidad, en sacarosa, que se puede translocar al resto del vegetal disuelta en la savia en proporción del 20-30 %.

Durante el período nocturno, el almidón transitorio se transforma en sacarosa, desapareciendo de las células de las hojas. La sacarosa que pasa a los tejidos se utiliza continuamente como fuente nutricional, se acumula en las vacuolas o en grandes cantidades en tejidos de reserva como la remolacha, etc., o se retransforma en almidón. Es probable que la sacarosa en las plantas cumpla el rol del glucógeno en los animales, es decir: material de reserva de utilización rápida inmediata. En cambio el almidón, cuyo mecanismo de degradación, a diferencia del glucógeno, es mucho más lento y complejo, formaría la reserva más considera-

ble, comparable con las grandes reservas de proteínas de los animales. Se acumula en grandes cantidades en muchos tejidos de reserva para el crecimiento de la planta, como en las semillas o en los tubérculos, y uno de los procesos metabólicos más importantes en las plantas y aún no completamente dilucidado es la transformación reversible entre estos dos hidratos de carbono: el almidón y la sacarosa. Así, por ejemplo, la sacarosa en las semillas, cuando éstas maduran, se transforma en almidón, y en las semillas maduras, cuando germinan, ocurre el proceso inverso. En el período invernal la sacarosa en los tallos se acumula en forma de almidón y pasa lo contrario cuando comienza la brotación primaveral. Los tubérculos de papa, a baja temperatura, transforman almidón en sacarosa, y aumentando la temperatura ocurre el proceso inverso.

Las características físicas del almidón son sin duda las ideales para constituir un material de reserva nutricional: es un compuesto insoluble en agua y jugos celulares, en donde puede permanecer inalterado por largo tiempo; es prácticamente anhidro y no interfiere con el metabolismo normal de las células. Puede acumularse en cantidades tales que prácticamente llena casi toda la célula. Además, salvo en los momentos en que se requiere su uso, es prácticamente inerte pareciéndose en este aspecto a las reservas grasas de los tejidos adiposos. Bastaría, por ejemplo, que sólo algunos granos se rompieran y quedaran libres sus

polisacáridos, fuertemente hidrofílicos, para que se destruyera la célula. La degradación del almidón en las células debe efectuarse, por lo tanto, sin que en ningún caso queden libres la amilosa o la amilopectina.

Veremos a continuación un resumen de los conocimientos actuales sobre la estructura del grano de almidón y cuáles son los hechos conocidos sobre su mecanismo de síntesis.

#### ESTRUCTURA DEL GRANO DE ALMIDON

El almidón constituye una unidad biológica y no un compuesto químico definido, aunque por costumbre se sigue utilizando el término almidón como refiriéndose a un polisacárido único. Está constituido principalmente por dos polisacáridos: la amilosa lineal y la amilopectina ramificada, con compuestos intermedios tanto en grado de polimerización (DP = degree of polymerization) como en ramificaciones. Además existe una fracción constante de lípidos complejos, especialmente del tipo de lisolecitina y esteroides libres o ésteres o glucósidos y proteínas de las cuales, por lo menos una parte tiene actividad enzimática principalmente de almidón sintetasa. Se ha demostrado la existencia de nucleótidos como el ADP-glucosa fijados al grano.

A pesar de ser el grano de almidón el polisacárido vegetal que con más facilidad puede ser obtenido al estado que podemos denominar puro,

su estructura completa ha resistido hasta ahora todos los métodos analíticos físicos, químicos y enzimáticos. Para poder estudiarlo, dada su completa insolubilidad y gran insensibilidad al ataque de las enzimas, es necesario destruir la estructura del grano para aislar sus componentes, y esta destrucción, sin duda, altera las propiedades de sus polisacáridos constituyentes, lo que explica los diversos resultados obtenidos por distintos autores. Es muy probable que ambos polisacáridos estén combinados covalentemente a proteínas, enzimas o no, en forma de proteoglicanos, pero dada la proporción tan baja de la fracción proteica es bastante difícil de demostrar su existencia. Se puede deducir esto porque parece demostrado que el primer aceptor en la biosíntesis de estos polisacáridos sería una proteína (Lavintman y col., 1974; Krisman y Barengo, 1975). Además, la enzima sintetizante, la almidón sintetasa según muchos indicios estaría unida covalentemente a la fracción polisacárida (Perdon y col., 1975; Resultados no publicados).

#### AMILOSA

Consiste esencialmente de cadenas lineales de residuos de D-glucosa en unión  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). Según el método de preparación, la amilosa puede tener un DP en el rango de 100-400 residuos de glucosa en algunas muestras comerciales hasta valores de DP de varios miles de residuos. La mayoría de los almidones tienen de 15-25 % de amilosa (Greenwood, C.T.,

1956). Una consecuencia de la estructura molecular y forma de la amilosa es que es inestable en solución acuosa y precipita espontáneamente (retrograda), debido a la tendencia de las moléculas lineales a alinearse por uniones de puente hidrógeno y formar agregados. Este cambio físico es irreversible y la amilosa retrogradada sólo puede redisolverse en solución alcalina.

Debido a la estructura esencialmente lineal que tiene la amilosa, es degradada por  $\beta$ -amilasa (French, D., 1960). Esta exo-enzima (E.C. 3.2.1.2) cataliza la hidrólisis gradual de uniones glucosídicas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) alternadas, liberando maltosa. La mayor parte de las muestras de amilosa dan 70-100 % de conversión a maltosa, o sea que tienen un valor de  $\beta$ -amilolisis del 70-100 %. Algunas muestras de amilosa que son hidrolizadas en forma incompleta por  $\beta$ -amilasa, deben poseer alguna característica estructural extra además de las uniones glucosídicas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) normales. Como el pretratamiento de amilosa con una enzima derramificante (E.C. 3.2.1.41), (o sea, una enzima capaz de hidrolizar selectivamente las uniones glucosídicas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) inter-cadena presentes en amilopectina) seguido por  $\beta$ -amilolisis, resulta en la conversión completa en maltosa, se deduce que algunas muestras de amilosa también contienen un número pequeño de uniones inter-cadena o puntos de ramificación (Kjolberg y Manners, 1963). La proporción de éstas es relativamente pequeña (quizá 0,1 %) y no invalida el hecho de que la

amilosa pueda considerarse como una estructura esencialmente lineal.

### AMILOPECTINA

La amilopectina, que está presente en la mayor parte de los granos de almidón en proporciones que van del 75 al 85 %, es un polisacárido de alto peso molecular aun cuando el mismo no se conoce con exactitud dado que varía de acuerdo a los métodos de extracción y purificación. Estudios por dispersión de la luz (light-scattering) le asignan un peso molecular del orden de  $10^7$ - $10^8$ , constituyendo así el polímero natural conocido de peso molecular más alto (Wilnauer y col., 1955). Trabajos posteriores de otros autores por otras técnicas (Banks y col., 1972) confirman su alto peso molecular que puede alcanzar a  $400$  ó  $500 \times 10^6$  y sugieren en base a sus propiedades hidrodinámicas, que las cadenas de la molécula pueden estar, en ciertas condiciones, en estructura de hélice. La amilopectina consiste de cadenas que contienen, en promedio, alrededor de 20-25 residuos de glucosa en unión  $\alpha$ -(1→4) con uniones inter-cadena formando una estructura ramificada. Las moléculas contienen, de esta forma, 4-5 % de uniones  $\alpha$ -(1→6)glucosídicas. La longitud promedio de cadena (CL = average chain length), que es un valor estadístico, se puede determinar mediante una variedad de métodos químicos o enzimáticos y las cadenas individuales pueden variar considerablemente en longitud. Algunas pueden contener sólo 6-8 residuos de glucosa,



mientras que otras pueden tener casi 100.

La naturaleza altamente ramificada de la amilopectina es responsable de varias diferencias en propiedades, si se la compara con la amilosa. Las soluciones acuosas son relativamente estables, ya que la ramificación de las moléculas impide la agregación lateral como en el caso de la amilosa. La afinidad por el yodo se encuentra disminuída, debido a la estructura ramificada, a valores mínimos y la coloración con yodo es púrpura con máximo de absorción a 540 nm. El máximo para amilosa es a 660 nm y da color azul con yodo.

La  $\beta$ -amilolisis de amilopectina es incompleta ya que la enzima es incapaz de hidrolizar las uniones inter-cadena más externas. La acción enzimática está limitada a las cadenas exteriores y se detiene a una distancia de 2-3 residuos de glucosa de una ramificación.

Aunque la amilopectina contiene generalmente sólo Dglucosa, hay alguna evidencia de que algunos almidones contienen pequeñas cantidades de fósforo unido covalentemente (aproximadamente 0,06 %), en forma de glucosa-6-fosfato (Parrish y Whelan, 1961). Estos residuos parecen estar restringidos a la amilopectina pero su localización exacta dentro de la molécula compleja no se conoce.

La Tabla I resume las propiedades distintivas de los dos componentes mayoritarios del almidón y del fitoglucógeno.

TABLA I- Propiedades de polisacáridos

Propiedad	Amilosa	Amilopectina	Fitoglucógeno
Estructura general	Esencialmente no ramificada	Ramificada	Altamente ramificada
Longitud promedio de cadena (CL)	$\sim 10^3$	20-25	10-14
Grado de polimerización (DP)	$\sim 10^3$	$10^4-10^5$	$\sim 10^5$
Color con iodo	Azul oscuro	Púrpura	Marrón
$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\sim 660$	530-550	430-450
Estabilidad en solución acuosa	Retrograda	Estable	Estable
Conversión a maltosa (%)			
(a) Con $\beta$ -amilasa	$\sim 70$	$\sim 55$	$\sim 45$
(b) Con enzima derramificante y luego $\beta$ -amilasa	$\sim 100$	$\sim 75$	—
(c) Con $\alpha$ -amilasa	$\sim 110$	$\sim 90$	$\sim 80$

FITOGLUCOGENO

El maíz dulce sintetiza además de almidón (Greenwood y Das Gupta, 1958a), un polisacárido del tipo del glucógeno, que se denomina fitoglucógeno (Peat y col., 1956). Se encuentra en el endosperma en forma soluble en el citoplasma y se asemeja al glucógeno típico de origen animal en lo que respecta al largo promedio de cadena (10-14), límite de  $\beta$ -amilolisis

(40-50 %) y en algunas propiedades físico-químicas, como la constante de sedimentación que es independiente de la concentración (Greenwood y Das Gupta, 1958b). Sin embargo, la afinidad por el yodo es 3-4 veces mayor que la del glucógeno animal. Esto podría estar relacionado con la evidencia de que el fitoglucógeno contiene una proporción de cadenas que son más largas que las que están presentes en el glucógeno de hígado de conejo (Gunja-Smith y col., 1970).

#### BIOSÍNTESIS DEL GRANO DE ALMIDÓN

La biosíntesis del grano de almidón entraña en primer lugar los mecanismos de biosíntesis de sus componentes, y luego su ordenamiento dentro del grano en forma específica para cada tipo de grano de almidón.

La biosíntesis del grano tiene lugar dentro de organoides especializados del citoplasma, los proplástidos, que al madurar se transforman en amiloplastos que contienen el grano ya terminado. Es interesante señalar que la mayoría de las enzimas que actúan en la síntesis o degradación del grano no han sido encontradas más que al estado soluble en el citoplasma en donde por otra parte no existen, salvo alguna excepción, sustratos activos para esas enzimas. Por otra parte, el grano intacto no actúa como sustrato de las enzimas solubles. La única excepción es la almidón sintetasa que se encuentra incluida en el grano en unión covalente con los polisacáridos.

Limitándonos a los polisacáridos de grano se requieren en primer lugar sistemas enzimáticos capaces de agregar, a partir de dadores específicos de glucosa, unidades de este monosacárido en unión  $\alpha$ -(1→4) a glucanos de grado de polimerización típico para cada clase de almidón. Estas cadenas son características de la amilosa y, a través de un proceso de transposición interna, se ramifican en forma tal que constituyen la amilopectina de grado de polimerización y porcentaje de ramificación típicos para cada clase de grano.

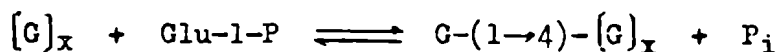
Los mecanismos enzimáticos de síntesis y degradación se conocen bastante bien, pero no cómo se van ensamblando los diversos componentes del grano para obtener una estructura que es típica para cada vegetal. En condiciones apropiadas, es posible sintetizar polisacáridos semejantes a amilosa y a amilopectina en casi todas sus propiedades, a partir de ciertas enzimas que catalizan la formación de uniones glucosídicas  $\alpha$ -(1→4) y  $\alpha$ -(1→6) con dadores de residuos de D-glucosa como UDP-glucosa, ADP-glucosa y Glu-1-P. Sin embargo, hasta el presente no ha sido posible producir un grano de almidón "in vitro" o describir completa y detalladamente el proceso "in vivo" (Manners, D.J., 1973).

#### ENZIMAS QUE INTERVIENEN

A. FOSFORILASAS ( $\alpha$ -(1→4) glucan: ortofosfato glucosiltransferasas)  
(E.C. 2.4.1.1)

Históricamente son las primeras enzimas de alargamiento de cadenas

preexistentes de hidratos de carbono implicadas en la síntesis del almidón (Whelan, W.J., 1958). Descubierta primero en animales (Cori y col., 1937), la fosforilasa en plantas fué descubierta en extractos de guisantes y de tubérculos de papa por Hanes, C.S. (1940) y cataliza la siguiente reacción:



donde  $[G]_x$  representa una cadena lineal de residuos de glucosa unidos por uniones glucosídicas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). La reacción es reversible. En presencia de exceso de Glu-1-P se forma un polisacárido que da color azul con iodo y se degrada completamente con  $\beta$ -amilasa. A partir de entonces, la enzima ha sido purificada de una amplia gama de tejidos vegetales que incluye: maíz, cebada, habas, guisantes y tubérculo de papa. La enzima de papa es la que fué más estudiada, Tiene un peso molecular de 207.000 y un número de recambio de 9.400 moles de Glu-1-P por mol de proteína por minuto a 30 °C y a pH 6.3 (Lee, Y.P., 1960).

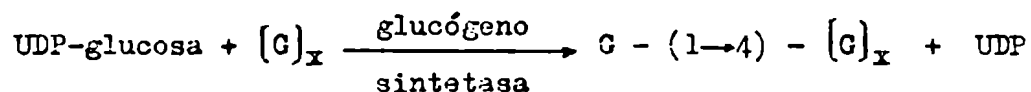
El rol de la fosforilasa en el metabolismo del almidón todavía es muy incierto. En condiciones "in vitro" y con la concentración de  $P_i$  que existe en la célula actuaría en forma degradativa. No se sabe si "in vivo" las condiciones son diferentes, por la posibilidad de existencia de compartimentalización.

La fosforilasa ha sido hallada en la mayoría de los casos sólo al estado soluble y en algunos vegetales, como en tubérculo de papa, en

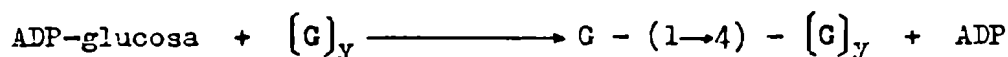
concentraciones muy altas. Es notable que salvo el caso de semillas de maíz que contienen fitoglucógeno, no existe en el citoplasma ningún sustrato para la enzima, y el grano de almidón entero no sólo no es atacado, sino que su degradación "in vivo" parece hacerse a través de las  $\alpha$ -amilasas (Evers y McDermott, 1970; Jones y Bean, 1972)

B. ALMIDON SINTETASA (ADP-glucosa: $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) glucan  $\alpha$ -4-glucosiltransferasa) (E.C. 2.4.1.11)

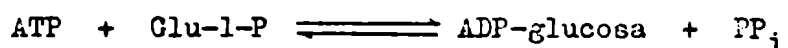
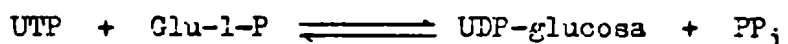
En 1957 se demostró que el alargamiento de las cadenas glucosídicas de glucógeno en los tejidos animales (Leloir y Cardini, 1957) se hace a través de la siguiente reacción:



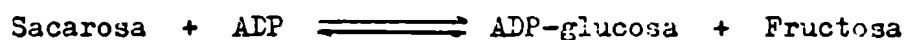
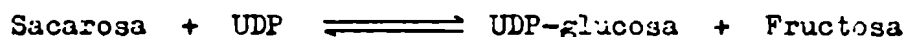
Se inició entonces la búsqueda de una enzima similar para la síntesis del almidón que llevó a demostrar que en los granos de almidón de arveja está presente en unión firme una enzima capaz de alargar las cadenas de amilosa y de amilopectina (Leloir y col., 1961). La enzima cataliza la transferencia de residuos de glucosa a partir de UDP-glucosa a estos dos polisacáridos, en los extremos no reductores de las moléculas. Luego se encontró que el ADP-glucosa reacciona unas 10 veces más rápido que el UDP-glucosa en el alargamiento de las cadenas (Recondo y Leloir, 1961) y la almidón sintetasa catalizaría la reacción:



El UDP-glucosa tendría una función en la síntesis del aceptor proteico (Lavintmany col., 1974). Ambos nucleótidos azúcar se forman en tejidos vegetales mediante pirofosforilasas específicas (E.C. 2.7.7.9) según:



o a partir de sacarosa por la reacción reversible de sacarosa sintetasa (E.C. 2.4.1.13):



La almidón sintetasa al estado soluble fué hallada posteriormente por Cardini y Frydman (1966) en plantas.

C. ENZIMA RAMIFICANTE ( $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)glucan:  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)glucan 6-glucosil-transferasa) (E.C. 2.4.1.18)

La síntesis de uniones glucosídicas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) en la amilopectina es llevada a cabo por acción de una enzima ramificante (Enzima Q) sobre cadenas lineales de residuos de glucosa en unión  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). La acción enzimática implica la transferencia de una cadena corta de residuos de glucosa de unión  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) a unión  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) (Figura 1). El proceso parece ser irreversible. Se desconoce el mecanismo responsable de la formación de las ramificaciones (0,1 %) en el caso de la amilosa.





tes que actúan sobre amilopectina nativa, hidrolizan las uniones intercadena introducidas por la enzima  $\alpha$  (Drummond y col., 1972).

Los extractos de semillas de maíz dulce contienen dos enzimas ramificantes, una que convierte la amilopectina en un polisacárido del tipo del glucógeno, mientras que la otra es activa con amilosa como sustrato (Lavintman, N., 1966).

#### MECANISMO DE FORMACION DE ACEPTORES GLUCOSIDICOS

Como vimos, el alargamiento "in vivo" de polisacáridos del tipo de la amilosa y de la amilopectina resulta de la acción de la almidón sintetasa o de la fosforilasa. La duda radica respecto al origen del "primer" (primer aceptor) "in vivo". Ambas enzimas, tanto la almidón sintetasa como las fosforilasas mostraron un requerimiento absoluto por un  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) glucano que sirva de aceptor de la glucosa del nucleósido difosfato glucosa o de la Glu-1-P, respectivamente (Cardini y Frydman, 1966; Lee, Y.P., 1960). Sin embargo, Green y Stumpf (1942) e Illingworth y col. (1961) encontraron que algunas fosforilasas de plantas y animales podían catalizar la síntesis de uniones glucosídicas en ausencia de "primer", y sugirieron que la misma enzima podría también servir de "primer", formando un tipo de glucoproteína. Posteriormente se encontraron formas solubles de almidón sintetasas (Ozbun y col., 1971; Hawker y col., 1972; Ozbun y col., 1972) y fosforilasas (Illingworth y col.,

1961; Slabnik y Frydman, 1970; Tsai y Nelson, 1969a; Fredrick, J.F., 1971) que actúan en ausencia de "primer". Además, ha sido descripta la formación de un posible intermediario de naturaleza glucoproteica en la iniciación de la síntesis de glucógeno hepático (Krisman, C.R., 1972). Trabajos más recientes (Lavintman y Cardini, 1972; Lavintman y Cardini, 1973; Lavintman y col., 1974) demostraron que una fracción sedimentable de tubérculo de papa que consistía principalmente de proplástidos libres de almidón, era capaz de transferir específicamente glucosa de UDP-glucosa a una proteína aceptora endógena para formar una glucoproteína. Esta glucoproteína puede servir de "primer" para la síntesis de un  $\alpha$ -(1→4) glucano con el mismo sistema enzimático sedimentable, usando ADP-glucosa, UDP-glucosa o Glu-1-P como sustratos dadores.

Se estudió también la fracción no sedimentable de tubérculo de papa y se demostró que era capaz de formar un  $\alpha$ -(1→4) glucano unido a una proteína por incubación de la preparación enzimática con concentraciones apropiadas de Glu-1-P en ausencia de "primer" exógeno (Tandecarz y col., 1975). Estos datos, junto con los de Krisman, C.R. (1972), Fredrick, J.F. (1971), Villemez y col. (1966) y Alam y Hemming (1973) apoyan la idea en favor de que la formación de un intermediario de naturaleza glucoproteico sería un mecanismo general para la síntesis de  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucanos. En el caso de los  $\alpha$ -(1→4) glucanos el inter-

mediario glucoproteico se formaría ya sea por Glu-1-P o por UDP-glucosa. Los métodos de aislamiento de polisacáridos así como los tiempos de incubación inadecuados usados para la reacción biosintética, pudieron haber enmascarado la existencia de tales glucoproteínas en el pasado.

### POLISACARIDOS DE MAIZ

Las semillas maduras de maíz (*Zea mays*) contienen normalmente un 2 % de sacarosa y un 65-70 % de almidón con un contenido en amilosa del 25 %. Sin embargo, un estudio detallado sobre genética de maíz llevó a la producción de mutantes que difieren apreciablemente en la naturaleza y contenido de los hidratos de carbono del endosperma. Así, la mutante "waxy" (wx) produce amilopectina con preferencia al almidón clásico de dos componentes. El maíz "amylose-extender" (ae) o "Amylo-maize" tiene un alto contenido en amilosa (Shannon y Creech, 1973). Ambas mutantes han sido desarrolladas con fines industriales. La mutante sugary-1 (su-1) tiene la propiedad única en vegetales de contener en el endosperma de su semilla dos polisacáridos ramificados: la amilopectina en estado insoluble en los granos de almidón y el fitoglucógeno, que como hemos señalado, es de estructura muy relacionada al glucógeno animal, en estado soluble (Tabla II).

Ciertas mutaciones genéticas específicas son responsables no sólo de producir grandes cambios en el contenido de hidratos de carbono del

endosperma, sino de alterar también los depósitos de almidón. Esto es particularmente cierto para la mutación su-1. Este genotipo tiene de 2 a 4 veces más sacarosa que el normal y una marcada reducción en el contenido de almidón (aproximadamente la mitad o menos), como se ilustra en la Tabla II.

TABLA II. Hidratos de carbono de reserva en mutantes de maíz

Genotipo	Contenido en almidón *	Contenido en amilosa, %	Contenido en fitoglucógeno *
Normal	69	25	0
wx	69	0	0
su-1	35	33	25
ae	63	60	0

Datos tomados de Shannon y Creech (1973)

\* Expresados en % de peso seco.

Los granos de almidón de su-1 son menores que los del maíz normal y forman agregados en racimos (Creech, R.G., 1965). La Tabla III resume valores comparativos con los del maíz normal.

Los genotipos de maíz más raros son aquellos tales como los su-1 que sintetizan almidón y fitoglucógeno.

TABLA III.

Genotipo	Número promedio de gránulos por $\mu\text{g}$ de almidón	Diámetro promedio, $\mu$
Normal	1.036,7	10,2
su-1	7.023,3	3,7

## OBJETIVOS DE ESTA INVESTIGACION

Los genotipos de maíz que sintetizan granos de almidón y fitoglucógeno simultáneamente nos llevaron a iniciar el estudio de las enzimas relacionadas con su síntesis por la posibilidad de que existan enzimas específicas para cada tipo de polisacárido. En el caso de las almidón sintetasas, ya se han estudiado anteriormente en el endosperma de maíz dulce al estado inmaduro las enzimas fijadas al grano (Frydman y Cardini, 1967) y las que están al estado soluble (Frydman y Cardini, 1965).

En cuanto a las enzimas ramificantes, Lavintman (1966) encontró la enzima ramificante que forma la amilopectina y otra enzima que es capaz de formar fitoglucógeno. La existencia de dos enzimas derramificantes diferentes se deducen de los resultados de Lee y col. (1971).

En lo que respecta a la fosforilasa, Tsai y Nelson (1968; 1969a) con endosperma de maíz normal (híbrido normal B37XB14) encuentran varias isoenzimas, algunas de las cuales no requieren agregado de "primer". En la mutante su-1 (Lavintman y col., 1972) estudiamos una de las isoenzimas del endosperma inmaduro, encontrando que la principal diferencia con la fosforilasa de tubérculo de papa radicaba en su mecanismo de alargamiento de las cadenas del fitoglucógeno, sugiriendo la existencia de dos sistemas enzimáticos, uno específico para el fitoglucógeno y otro para la amilopectina.

En base a estos resultados emprendimos el estudio de las isoenzimas

de la fosforilasa, su separación, propiedades y mecanismo de alargamiento. Debido a la diferente composición genética del embrión y del endosperma (generación esporofítica y gametofítica, respectivamente) y de las evidencias de la existencia de tipos de enzimas distintos en el embrión y en el endosperma (Akatsuka y Nelson, 1966; Tsai y Nelson, 1969b; Preiss y col., 1971; Salamini y col., 1972; Schiefer y col., 1973) referentes al metabolismo del almidón, hemos estudiado las fosforilasas de ambos tejidos en diferentes estadios del crecimiento, especialmente en aquellas etapas caracterizadas por una activa síntesis de proteínas en el embrión (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1963). De todas las isoenzimas se purifica una de ellas, característica del embrión en crecimiento y se estudian sus propiedades cinéticas y el mecanismo de alargamiento en presencia de distintos sustratos naturales como amilopectina y fitoglucógeno y los mismos sustratos con cadenas laterales acortadas por acción de enzimas apropiadas. Además se usan sustratos que aparentemente no existen en la célula, como los maltooligosacáridos, en un intento de comparar el comportamiento de cadenas libres de oligosacáridos con polisacáridos de cadenas laterales de largo similar, a fin de establecer si el núcleo del polisacárido al cual están unidas influyen en su capacidad aceptora. Esta distinta capacidad aceptora de la cadena del núcleo del polisacárido podría dar alguna explicación de la estructura asimétrica que ha sido señalada en la molécula de la amilopectina.

## MATERIALES Y METODOS

### I- Reactivos y enzimas

Los distintos materiales usados durante la realización de este trabajo se obtuvieron de:  $\beta$ -amilasa (tipo I-B), Glu-1-P (sal dipotásica),  $M_3$ ,  $M_7$ , ADP-glucosa, UDP-glucosa, AMP, ADP, ATP, AMP cíclico, UMP, UDP, UTP y buffer MES, de Sigma.

$M_4$ , de K & K Laboratories. Iso- $M_5$ , de Pierce Chemical.

Acrilamida, Bis-acrilamida, TEMED, de Eastman. DTT, de Calbiochem.

La  $M_2$ , de Nutritional Biochemicals Corp., fue purificada por cromatografía en butanol:piridina:agua (6:4:3) (Duncan y Manners, 1958) sobre papel de filtro Whatman N°4 previamente lavado.

### II- Preparación de polisacáridos

Fitoglucógeno: fué preparado según el método de Meyer y Fuld (1949).

Amilosa y amilopectina: fueron preparados según el método de Gilbert y col., (1964) a partir de almidón de tubérculo de papa, aprovechando la propiedad de ciertos alcoholes como el butanol de formar complejos insolubles con la amilosa.

Dextrinas  $\beta$ -límite de amilopectina y fitoglucógeno: fueron preparadas según Whelan (1964). Para ello se incubó durante 24 horas a 30°C, 1,3g de amilopectina ó 1,3g de fitoglucógeno en buffer acetato 0,03M pH: 4,8, glutation reducido 0,0005M, albúmina cristalina 0,05 %,  $\beta$ -amilasa 2 mg/ml en un volumen final de 25 ml. En el caso de fitoglucógeno, el



volumen final es de 10 ml. La incubación se realiza en bolsa de diálisis, dializando contra el mismo buffer, con dos cambios del mismo. A las 24 horas, se agrega más  $\beta$ -amilasa en concentración final 0,02 mg/ml y se deja incubando otras 24 horas. Se determina el contenido de azúcar reductor en una alícuota incubando 1 hora con  $\beta$ -amilasa; no se registra diferencia respecto de un control incubado en las mismas condiciones, pero en ausencia de la enzima. Se calienta la preparación a 100°C durante 5 minutos para coagular proteínas. Se centrifuga y se descartan las proteínas desnaturalizadas. Se agrega al sobrenadante igual volumen de etanol para precipitar el polisacárido resultante y se lo separa por centrifugación. La dextrina límite correspondiente se purifica precipitándola varias veces con etanol. Se determina la concentración de ambas dextrinas  $\beta$ -límite, de amilopectina y de fitoglucógeno, por el método del fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956).

Dextrina límite de fosforilasa de fitoglucógeno: Se la obtiene haciendo actuar fosforilasa a de músculo de conejo sobre fitoglucógeno (Lee y col., 1970). La mezcla de incubación contiene: 100 mg de fitoglucógeno, 10 ml de buffer glicerofosfato 0,3 M pH: 6,8; 4 ml de cisteína neutra 0,075 M, fosforilasa a (cuya preparación se describe más adelante) de la 3a. etapa de purificación en cantidad correspondiente a 5 mg de proteína, en un volumen final de 20 ml. Se incuba a 30°C y se purifica igual que para la dextrina  $\beta$ -límite.

Dextrina  $\phi$ ,  $\beta$  de fitoglucógeno: Se preparó según Gunja-Smith y col., (1970), por tratamiento de la correspondiente dextrina límite de fosforilasa con  $\beta$ -amilasa en buffer acetato 0,01M pH: 5, durante 24 horas a 37°C. La maltosa se elimina por diálisis contra agua destilada.

### III- Semilla de Zea mays L.

Estructura: La semilla está formada por: a) el pericarpio con dos láminas: la testa y el tegmen; b) el endosperma y c) el embrión, que está constituido por un epicotilo, el cotiledón y el hipocotilo. El pericarpio cubre exteriormente a la semilla. Su espesor es variable y su función más importante es la de mantener el interior de las semillas con un cierto grado de humedad. Muchas semillas pierden su poder germinativo si el pericarpio está vulnerado, lo que motiva una rápida deshidratación. El endosperma es un tejido de reservas nutricionales que se mantienen durante un cierto tiempo en las semillas en período de desarrollo. El endosperma de los cereales contiene grandes cantidades de almidón que constituye el hidrato de carbono de reserva para los cambios fisiológicos y bioquímicos que tienen lugar durante la germinación. Las semillas de maíz, cuando están maduras, disponen de un endosperma perfectamente formado, e incluido en él o en su vecindad se encuentra el embrión. El embrión se presenta por lo común como una formación oblonga y cilíndrica, acompañada de un apéndice: el cotiledón o escutelo, que consiste enteramente de tejido parenquimatoso, con un epitelio que está en contacto con el endosperma durante el

proceso de germinación. Una de las partes del escutelo es el epicotilo o plúmula, que es el esbozo del futuro tallo. La porción del eje embrional situada debajo del escutelo se llama hipocotilo. El crecimiento de éste forma la raíz, que al iniciar su desarrollo recibe el nombre de radícula; el crecimiento del hipocotilo forma la raíz principal de la planta.

### Germinación

El proceso de la germinación puede dividirse en tres etapas: (1) imbibición de agua, que va acompañada de un no marcado agrandamiento de las células; (2) agrandamiento de las células por dilatación de las paredes celulares; y (3) formación y aumento de nuevas células en las regiones embrionarias. En los últimos períodos de la germinación, cuando el suministro de nutrientes del endosperma se va agotando, el escutelo se agranda y avanza dentro del endosperma. El hinchamiento de la semilla provoca la ruptura del pericarpio, con lo que el embrión puede emerger de la semilla. La primera formación que asoma de la semilla es el extremo del hipocotilo, que forma la raíz primaria. Esto constituye una ventaja para la planta en sus primeras fases de crecimiento pues a partir de este momento dispone de un aparato radicular que ancla a la plántula firmemente en el suelo y asegura un aporte de agua muy necesario para el vegetal. Después de la aparición del hipocotilo aparece el epicotilo o plúmula. Durante la germinación de la semilla, el almidón del endosperma es degradado a maltosa y glucosa mediante la acción de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasas. El

transporte de los azúcares solubles del endosperma a la plántula se facilita por el escutelo, que está entre el endosperma y el eje raíz-tallo. La glucosa del endosperma es absorbida por el escutelo y convertida a sacarosa, en cuya forma se transporta (Edelman y col., 1959). En la Figura 2 presentamos un esquema de la semilla de maíz y de la anatomía de la plántula.

#### IV- Preparación de enzimas

Aislamiento de isoenzimas de fosforilasa: Se usan semillas de maíz dulce su-1 (*Zea mays*, variedad Golden Bantam) maduras o germinadas. Para el estudio con semillas inmaduras, éstas se colectaron en la etapa de endosperma denominado lechoso por su aspecto. Para estudios con semillas germinadas, los granos maduros se imbibieron en agua durante 4 horas y al cabo de ese tiempo se dejaron germinar sobre papel de filtro húmedo a 25°C en la oscuridad por períodos variables de 1, 3, 4, 6, 8 y 11 días. En todos los casos se elimina el pericarpio y se preparan extractos según dos procedimientos A ó B que se describen más abajo, partiendo de: a) semillas enteras, b) embriones (escutelo con plúmula y radícula incluidas), y c) endospermas.

##### A- Extracto crudo

El material correspondiente se muele en mortero de vidrio, se filtra a través de una muselina y el filtrado se centrifuga a 2000 x g para separar el almidón. Todas las operaciones se llevan a cabo a temperaturas

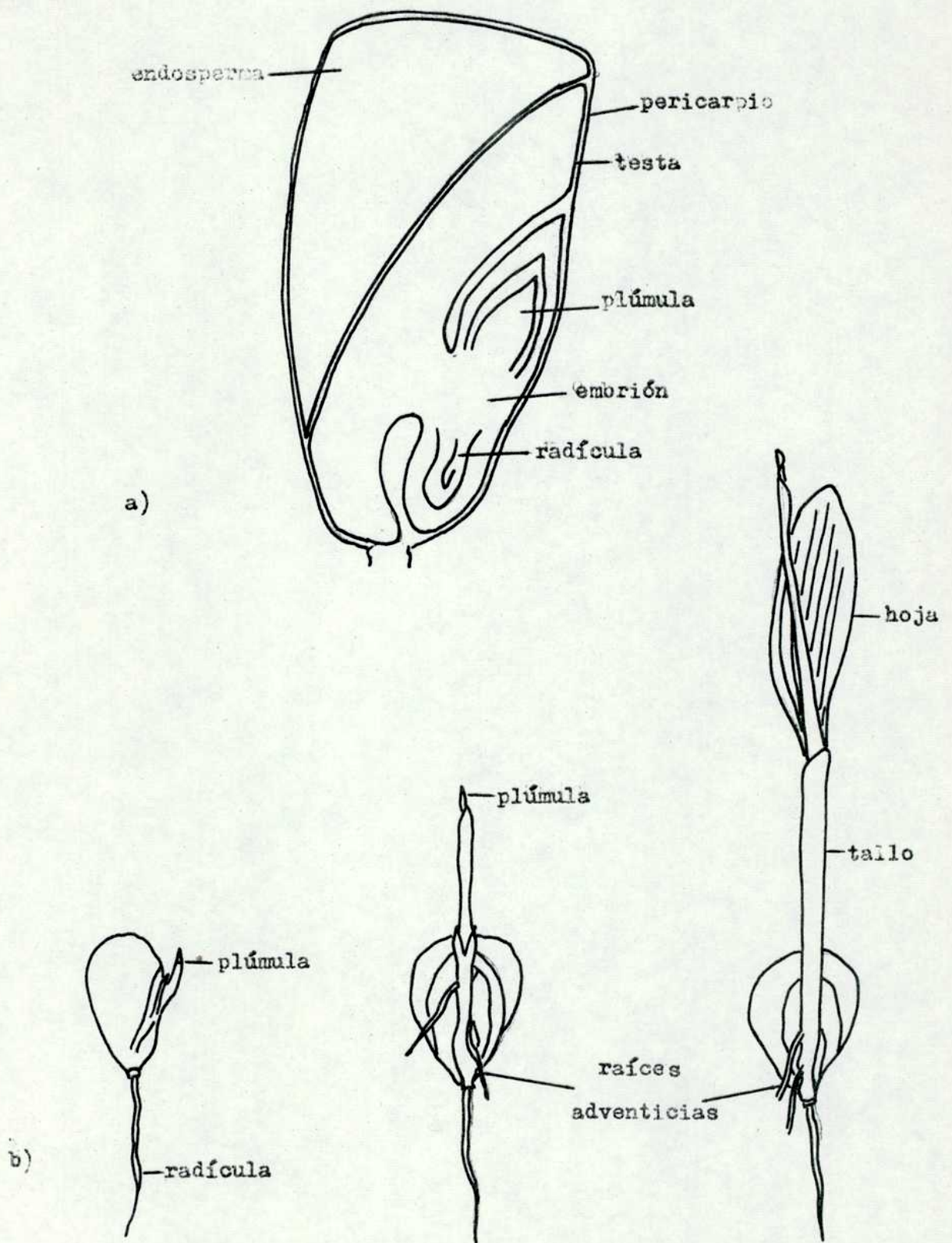


FIGURA 2- a) Sección de una semilla; b) anatomía de la plántula.

de 0 a 4°C. El sobrenadante se utiliza para ensayo de actividad de fosforilasa.

#### B- Precipitación fraccionada con sulfato de amonio

El material correspondiente se suspende en dos volúmenes de buffer Tris-maleato 0,01M pH: 7,4 que contiene 2-mercaptoetanol 0,02M y se homogeniza en una licuadora por 2 minutos; se filtra por muselina y se centrifuga a 25.000 x g durante 20 minutos. Se descarta el precipitado y se somete al sobrenadante a una precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Se reúnen las fracciones que precipitan entre 0,25 y 0,45 y entre 0,45 y 0,80 de saturación con sulfato de amonio. Artificios debidos a la acción del sulfato de amonio pueden descartarse ya que el pasaje de las muestras por columnas de Sephadex G-25 no altera los resultados. Todas las operaciones se llevan a cabo entre 0 y 4°C. Estas fracciones se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida.

#### Purificación parcial de la isoenzima de baja movilidad de semillas germinadas durante tres días

La purificación de la isoenzima de fosforilasa de embriones obtenidos de semillas germinadas durante tres días se lleva a cabo de la siguiente manera: se suspende la fracción que precipita entre 60 y 85 % de saturación con sulfato de amonio en buffer Tris-maleato 0,010M pH: 7,4 que contiene DTT 0,5mM y glicerol 15 %. Se pasa la suspensión por una columna (12 x 0,9 cm) de Sephadex G-25 que se equilibra con el mismo buffer. Las

fracciones enzimáticamente activas se aplican a una columna (15 x 1,5 cm) de DEAE-celulosa o DEAE-Sephadex A-50, previamente equilibrada con el mismo buffer. La actividad enzimática se encuentra en las fracciones que se eluyen primero. Este tratamiento da como resultado un aumento de unas 10 veces en la actividad específica, si se compara con la del material que se siembra en la columna. Las fracciones activas se ensayan para actividad de amilasa, fosfatasa, branching y D-onzima con resultados negativos y se mantienen entonces a 4°C.

#### Preparación de fosforilasa a de músculo de conejo

Para su preparación se siguió el método descrito por Cori y col., (1955). Se anestesia un conejo de 1-1,5 Kg de peso con una inyección intravenosa de 5 ml de pentobarbital sódico (80 mg/ml). Se sacrifica el animal por decapitación, dejándolo sangrar. Se elimina la piel, se extraen los músculos de las patas y del lomo, se pesan rápidamente y se lleva a 0-4°C, siendo ésta la temperatura a la que se llevan a cabo todas las operaciones posteriores.

la. etapa: se pasan los músculos dos veces por una picadora de carne y se suspende inmediatamente en un volumen de agua destilada fría. Se agita y se deja en reposo 10 minutos. Se filtra por una gasa y se recoge el filtrado en frío. Se resuspende el músculo en un volumen de agua fría y se deja nuevamente 10 minutos. Se vuelve a filtrar y se resuspende nuevamente en 1/2 volumen de agua. Se deja 5 minutos y se vuelve a filtrar.

Se juntan todos los filtrados y se lleva a pH: 5,2 con electrodo de vidrio, con ácido acético 1N. Se centrifuga inmediatamente a 7.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante claro se filtra a través de papel Whatman nº1 plegado; el filtrado se lleva a pH; 6,8 con  $\text{CO}_3\text{HK}$  sólido.

2a. etapa: La solución se precipita con 0,7 volúmenes de solución de sulfato de amonio saturada a temperatura ambiente, de pH: 6,8. Se deja sedimentar durante la noche en heladera. Se descarta el sobrenadante y el precipitado se centrifuga a 9.000 rpm durante 20 minutos.

3a. etapa: El precipitado que contiene la fosforilasa se pasa a una bolsa de diálisis, lavándose los tubos de centrifuga con su mismo volumen de agua. Se dializa contra 2 litros de agua destilada a la que se le agregan unos 2 ml de Tris-HCl 1M pH: 8,4 hasta que el pH final sea 7,4 y se deja dializar durante la noche. El dializado se lleva a 20mM 2-mercaptoetanol y 1mM EDTA y se lleva a pH: 8,8 con Tris base 2M. Se incuba durante 1 hora a 37°C y luego se neutraliza con ácido acético 1N hasta pH: 7. Se elimina el precipitado que se forma por centrifugación a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le agrega 0,01 de su volumen de AMP 0,1M (llevado a pH: 7 con HONa 10N) y 0,01 de su volumen de acetato de magnesio 1M y se deja cristalizar en frío hasta el día siguiente. Se recrystaliza 4 veces. Para ello se centrifuga 15 minutos a 14.000 rpm y se elimina el sobrenadante. Al precipitado se le agrega un volumen de buffer glicerofosfato 0,0025M pH: 6,8, 2-mercaptoetanol 0,01M y EDTA



0,0005 M igual al volumen del sobrenadante eliminado. Se calienta a 37°C para que se disuelva bien y luego se centrifuga a temperatura ambiente para descartar el sedimento que no se disolvió. Al sobrenadante se le agrega nuevamente 0,01 volúmenes de AMP 0,1 M y 0,01 volúmenes de acetato de magnesio 1 M y se repite el procedimiento ya descrito. Luego se centrifuga y el precipitado que está constituido por microcristales de la enzima, se disuelve en 4 ml de buffer glicerofosfato pH: 6,8, 2-mercapto-etanol 0,0025 M, EDTA 0,0005 M. Se agrega AMP y acetato de magnesio y se guarda en heladera en un recipiente con hielo y en atmósfera de tolueno. Se cambia el hielo del recipiente todos los días.

#### V- Ensayo de actividad de fosforilasa y de otras enzimas

##### 1- Ensayo de fosforilasa

La mezcla de incubación, salvo agregados específicos, está compuesta de la siguiente forma: 50 mM buffer MES, pH: 6,1; amilopectina 0,05 %; 10 mM Glu-1-P y 40 µl de enzima (0,1 mg de proteína) en un volumen final de 100 µl. Las mezclas de reacción se incuban durante 15 minutos a 37°C. La reacción se detiene por el agregado de 0,9 ml de TCA 5 %. Se centrifuga y se mide el P<sub>i</sub> liberado en el sobrenadante. Una unidad de actividad enzimática se considera igual a la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 µmol de P<sub>i</sub> en 1 minuto.

En algunos casos, cuando se mide la actividad de fosforilasa por incorporación de [<sup>14</sup>C]glucosa a amilopectina, se agrega [<sup>14</sup>C]Glu-1-P a la

misma mezcla de incubación. La reacción se detiene por el agregado de metanol y el precipitado se colecta por centrifugación, se lava varias veces con metanol y se suspende en 0,5 ml de agua. Se coloca en capsóletas de aluminio, se seca y se cuenta en un contador de flujo gaseoso (escalímetro).

#### 2- Amilasa

Se mide usando como sustrato amilosa-azur, según el método de Rinderknecht y col., (1967).

#### 3- Enzima ramificante

Se mide esta actividad enzimática por el método de iodo- $\text{Cl}_2\text{Ca}$  (Krisman, C.R., 1962b).

#### 4- D-Enzima

Se determina su actividad por incubación de la preparación enzimática con  $\text{M}_3$  y buffer MES (100 mM, pH: 6,1) a 30°C y determinación de la glucosa liberada (Somogyi, M., 1952).

#### 5- Fosfatasa

Se mide su actividad por incubación de la preparación enzimática con fenilfosfato disódico y buffer MES (100 mM, pH: 6,1) a 37°C y valoración del  $\text{P}_i$  liberado (Fiske y SubbaRow, 1925).

#### VI- Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se llevó a cabo sobre diferentes fracciones enzimáticas, siguiendo el procedimiento de Ornstein (1964) y Davis (1964), ligeramente modificado.

El tamaño del poro corresponde al de un gel que contiene 7 % de acrilamida. El buffer de los compartimientos anódico y catódico (Tris 0,042 M; EDTA 0,0017 M y ácido bórico 0,05 M pH: 8,2) se aplica cuidadosamente sobre la muestra llenando el resto de los tubos. La cantidad de fosforilasa que se aplica sobre el gel varía de 1 a 2 miliunidades. La corrida electroforética se desarrolla a 4°C con una corriente constante de 3 mA por tubo, durante 3 horas aproximadamente. Después de la separación electroforética, se sacan los geles de los tubos de vidrio y se colocan en una solución adecuada para coloración de proteínas o en una solución apropiada para el revelado de actividad enzimática.

Revelado de actividad fosforilásica y de proteínas en geles de poliacrilamida

Después de la electroforesis se incuba cada gel, durante la noche, en una mezcla que contiene buffer citrato 0,1 M pH: 5,1; Glu-1-P 19 mM y como "primers": fitoglucógeno 0,8 % o amilopectina 0,05 % o amilosa 0,1 %. Se realizan simultáneamente incubaciones control en las que se omite el éster fosfórico o el "primer" de la mezcla de incubación. Después de la incubación, los geles se lavan varias veces con agua destilada y se colorean con una solución de I<sub>2</sub>-IK en buffer acetato 0,2 M pH: 4,8 durante unos minutos. Se lavan luego varias veces con solución diluída de ácido acético.

Para el revelado de proteínas, los geles se sumergen en una solución de Amidoblack 10B en ácido acético 7 % durante 30 minutos y se lavan luego

hasta decoloración del fondo con ácido acético 7 %.

Los trazados densitométricos se llevan a cabo con un espectrodensitómetro ICC.

## VII- Procedimientos analíticos

- 1- Proteínas: se determinan de acuerdo al método de Lowry y col. (1951).
- 2- Fósforo inorgánico: según el método de Fiske-SubbaRow (1925), cuyo principio es el siguiente: el fosfato es convertido a ácido fosfomolibdico en presencia de molibdato de amonio y de ácido sulfúrico 0,5 N. El ácido fosfomolibdico formado es reducido subsiguientemente por el ácido 1-amino, 2-naftol, 4-sulfónico.
- 3- Azúcares totales: se valoran por el método de Dubois y col. (1956) que mide azúcares totales, tengan o no el grupo reductor libre, o sea que permite determinar azúcares simples, oligosacáridos y polisacáridos. Se basa en la medición del color producido por estas sustancias cuando se tratan con ácido sulfúrico y fenol.
- 4- Azúcar reductor: se determina por el método de Somogyi (1952). El método se basa en el poder reductor de los azúcares sobre las sales cúpricas dando compuestos cuprosos que reducen al ácido arsenomolibdico del reactivo de Nelson dando color azul.
- 5- Polisacáridos: se miden los espectros de los complejos iodo-polisacárido según el método de Krisman (1962a) en la región entre 400-700 nm. En general hay una correlación entre las características de ramificación

y el espectro de los complejos iodo-polisacárido. Cuando la molécula tiene una estructura más ramificada, el espectro del complejo tiene su longitud de onda máxima a una longitud de onda menor. Así, la amilosa tiene un máximo de absorción a 660 nm y muestra un intenso color azul con iodo. La amilopectina tiene el máximo de absorción a 530-550 nm y da color rosado con iodo. El glucógeno tiene el máximo a 420-490 nm y da color amarillo-marrón con el reactivo de iodo.

6- Cromatografía: para separación de azúcares se utiliza el papel Whatman N°1 en cromatografía descendente, utilizando como solvente la mezcla butanol:piridina:agua (4:3:4) (Leloir y col., 1971). Los azúcares se visualizan con nitrato de plata alcalino (Trevelyan y col., 1950).

## RESULTADOS

### I- Electroforesis en gel de poliacrilamida

La presencia de múltiples formas de fosforilasa en maíz dulce pudo demostrarse mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida. Con el objeto de identificar en forma precisa la porción de la semilla responsable de la actividad enzimática, se separó embrión de endosperma y se ensayó actividad de fosforilasa en extracto crudo y en fracciones de sulfato de amonio, como se describe en Materiales y Métodos.

#### Extracto crudo: semilla inmadura

Como se ve en la figura 3A, el zimograma correspondiente a semilla inmadura entera presenta cuatro bandas con actividad fosforilásica. La figura 3 ilustra además los perfiles electroforéticos correspondientes a embriones y a endospermas aislados. En el caso de embriones aislados aparece sólo una banda (Figura 3B), cuya velocidad de migración es similar a la de la banda más lenta del zimograma de semilla entera (Figura 3A).

Por otra parte, el gel correspondiente al endosperma aislado muestra tres bandas con movibilidades semejantes a las de las bandas más anódicas que aparecen en el zimograma de semilla entera (Figura 3C).

#### Extracto crudo: semilla madura germinada

Sólo se observa actividad de fosforilasa en preparaciones de embriones. No se encontraron bandas con actividad de fosforilasa en preparaciones de endosperma.

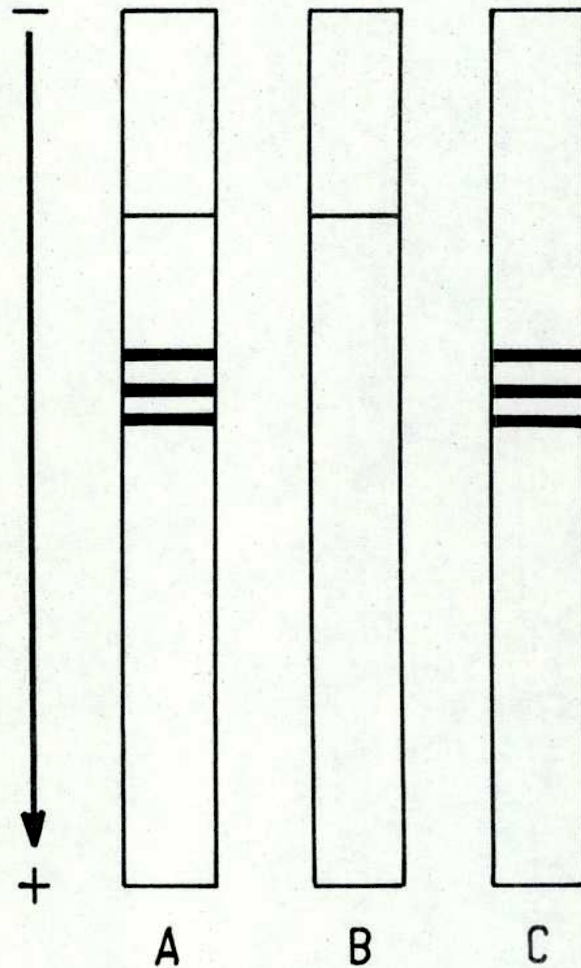


Figura 3 - Representación esquemática de los zimogramas de fosforilasa de semilla inmadura de maíz dulce (extracto crudo). A: Semilla entera; B: embrión aislado; C: endosperma aislado. Se usó amilopectina como "primer" en los tres casos. Se obtienen resultados similares cuando se usa fitoglucógeno como "primer". Los resultados obtenidos en gel de poli-acrilamida no varían si se incluye el "primer" en el gel durante la polimerización.

Los resultados obtenidos con extractos crudos de embriones durante distintos períodos de germinación se muestran diagramáticamente en la figura 4. Aparece una banda de muy baja movilidad, intensamente coloreada que alcanza un máximo de color tres días después del comienzo de la germinación y luego disminuye y tiende a desaparecer hacia el sexto día de germinación. En la mitad superior del gel puede observarse una banda adicional, cuya intensidad aumenta a medida que progresa la germinación (Figura 4).

#### Precipitación fraccionada con sulfato de amonio

##### Semilla inmadura

La figura 5A muestra el zimograma correspondiente a la fracción de extracto de semilla entera que precipita entre 25 y 45 % de saturación con sulfato de amonio. Tres bandas intensamente coloreadas, con velocidades de migración intermedias pueden apreciarse en el zimograma correspondiente.

Por otra parte, el número de bandas con actividad enzimática aumenta hasta siete en la fracción que precipita entre 45 y 80 % de saturación con sulfato de amonio. De este conjunto se destacan, por ser más intensamente coloreadas, las de los extremos: la más anódica y la más catódica. Las bandas restantes, en la zona intermedia, son más débiles (Figura 5B).

##### Semilla madura germinada



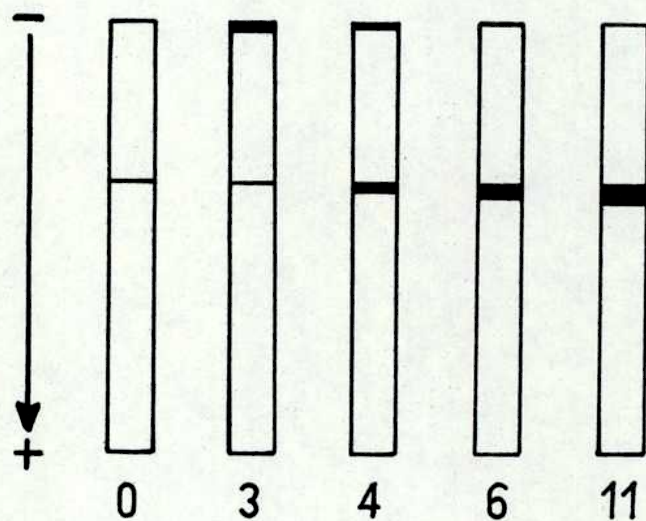
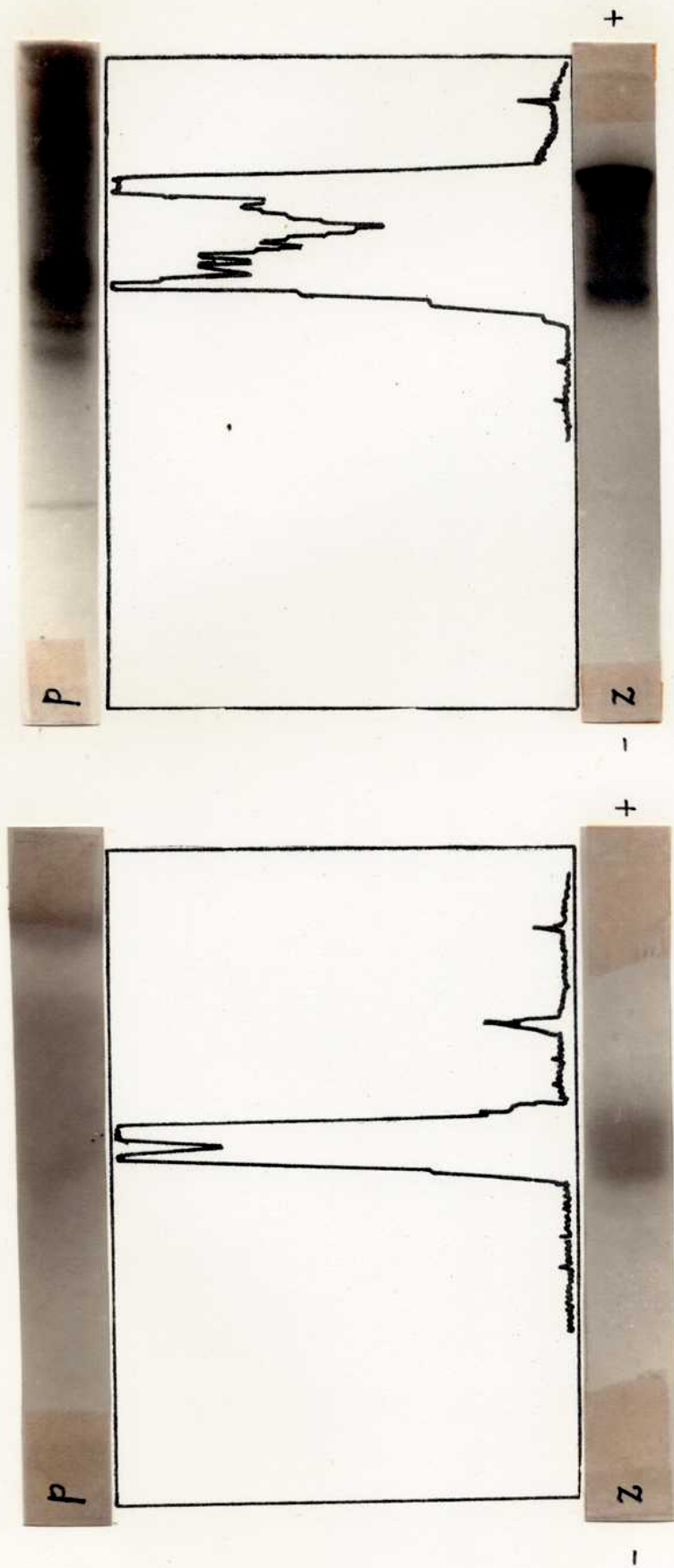


Figura 4 - Representación esquemática de zimogramas de fosforilasa de embrión de semilla madura germinada (extracto crudo). Los días de germinación se indican debajo de cada gel. "Primer": amilopectina, fitoglucógeno o amilosa.



A

B

Figura 5 - Proteínogramas, zimogramas y trazados densitométricos de las isoenzimas de fosforilasa en preparaciones de semilla inmadura entera. A: Fracción de sulfato de amonio que precipita entre 25 y 45 % de saturación. B: Fracción de sulfato de amonio que precipita entre 45 y 80 % de saturación. Fitoglucógeno fué usado como "primer" en ambos casos. Se obtienen idénticos resultados con amilopectina como "primer". p:proteínograma; z:zimograma.

Las figuras 6 y 7 muestran los resultados obtenidos mediante el fraccionamiento con sulfato de amonio del extracto crudo correspondiente a embriones de semilla germinada (No hay actividad en endosperma observable con nuestra metodología).

Encontramos una sola banda de fosforilasa en la fracción que precipita entre 25 y 45 % de saturación con sulfato de amonio, en todo el período de germinación estudiado, con cualquiera de los "primers" utilizados: fitoglucógeno, amilopectina o amilosa (Figura 6). La única diferencia que registramos se refiere al color de la banda. Con amilosa como "primer" el color de la banda es azul durante todo el período ensayado, mientras que cuando se usa fitoglucógeno o amilopectina como "primers", el color de la banda varía con el intervalo de germinación: de un azul claro al primer día cambia a una tonalidad marrón oscura hacia el tercer y cuarto día y pasa luego a un azul intenso hacia el octavo día (Figura 6).

Por el contrario, el diagrama de separación electroforética que se obtiene con la fracción que precipita entre 45 y 80 % de saturación con sulfato de amonio, varía significativamente con el tiempo de germinación. Alcanza un máximo de bandas (tres o cuatro) a los tres días de comenzada la germinación y luego disminuye el número de bandas observable en el zimograma. Al tercer día se visualizan dos bandas azules intensamente coloreadas, localizadas cerca del extremo catódico, ya sea utilizando amilopectina o fitoglucógeno como "primers" (Figura 7, 43). Estas bandas

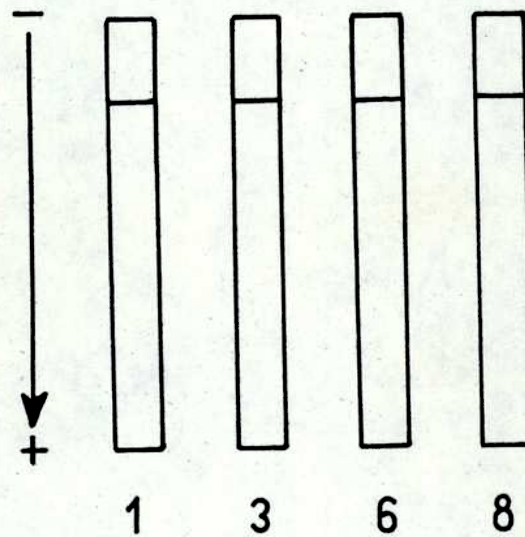


Figura 6 - Representación esquemática de los zimogramas de fosforilasa del embrión de semilla madura germinada (Fracción que precipita entre 25 y 45 % de saturación con sulfato de amonio). Los días de germinación se indican debajo de cada gel. "Primer": amilopectina, fitoglucógeno o amilosa

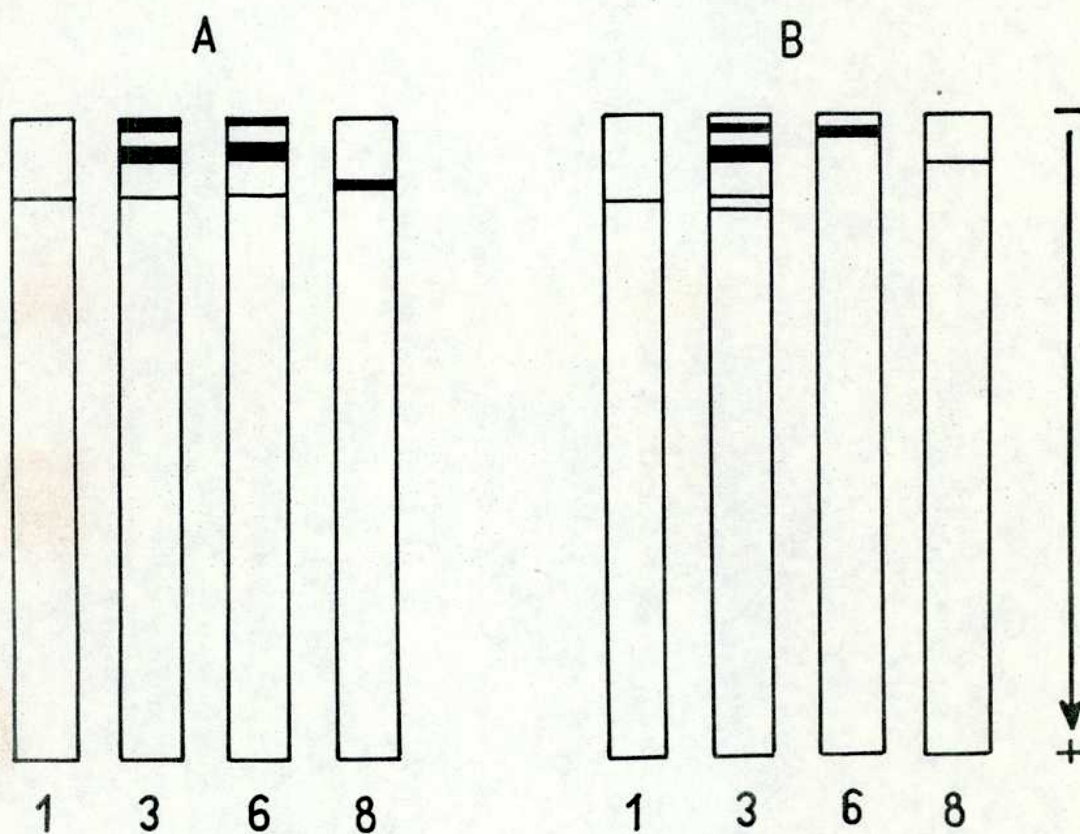


Figura 7 - Representación esquemática de zimogramas de la fosforilasa del embrión de semilla madura germinada (Fracción que precipita entre 45 y 80 % de saturación con sulfato de amonio). Los días de germinación se indican debajo de cada gel. "Primer" en A: amilopectina o fitoglucógeno; en B: amilosa.

disminuyen en intensidad a medida que se desarrolla el embrión y no se observan más hacia el octavo día (Figura 7, A1 y A8).

El perfil electroforético que se obtiene con amilosa como "primer" es algo distinto, difiriendo a partir del tercer día. La banda de baja movilidad es más débil en este caso y pueden observarse dos bandas adicionales muy débiles (Figura 7, B3).

En la figura 8 se comparan los zimogramas con los proteinogramas correspondientes a semillas inmaduras y a embriones de semillas germinadas durante tres días (fracciones de 25-45 % y 45-80 % de saturación con sulfato de amonio).

No se encontró actividad de fosforilasa en ninguna de las preparaciones ensayadas con maltosa pura como "primer" o en ausencia de "primer".

Resumiendo, en el embrión durante la germinación aparece una isoenzima de fosforilasa aparentemente específica, dado que no se encuentra ni en endosperma ni en embrión de semilla inmadura o de semilla sin germinar. En consecuencia, emprendimos el estudio de esta isoenzima típica del embrión en germinación.

## II- Purificación parcial de la isoenzima de fosforilasa de embrión de semilla de maíz dulce de tres días de germinación

En Materiales y Métodos describimos la técnica de purificación de la isoenzima de embrión de semillas germinadas durante tres días. Los datos obtenidos en las distintas etapas se indican a continuación.

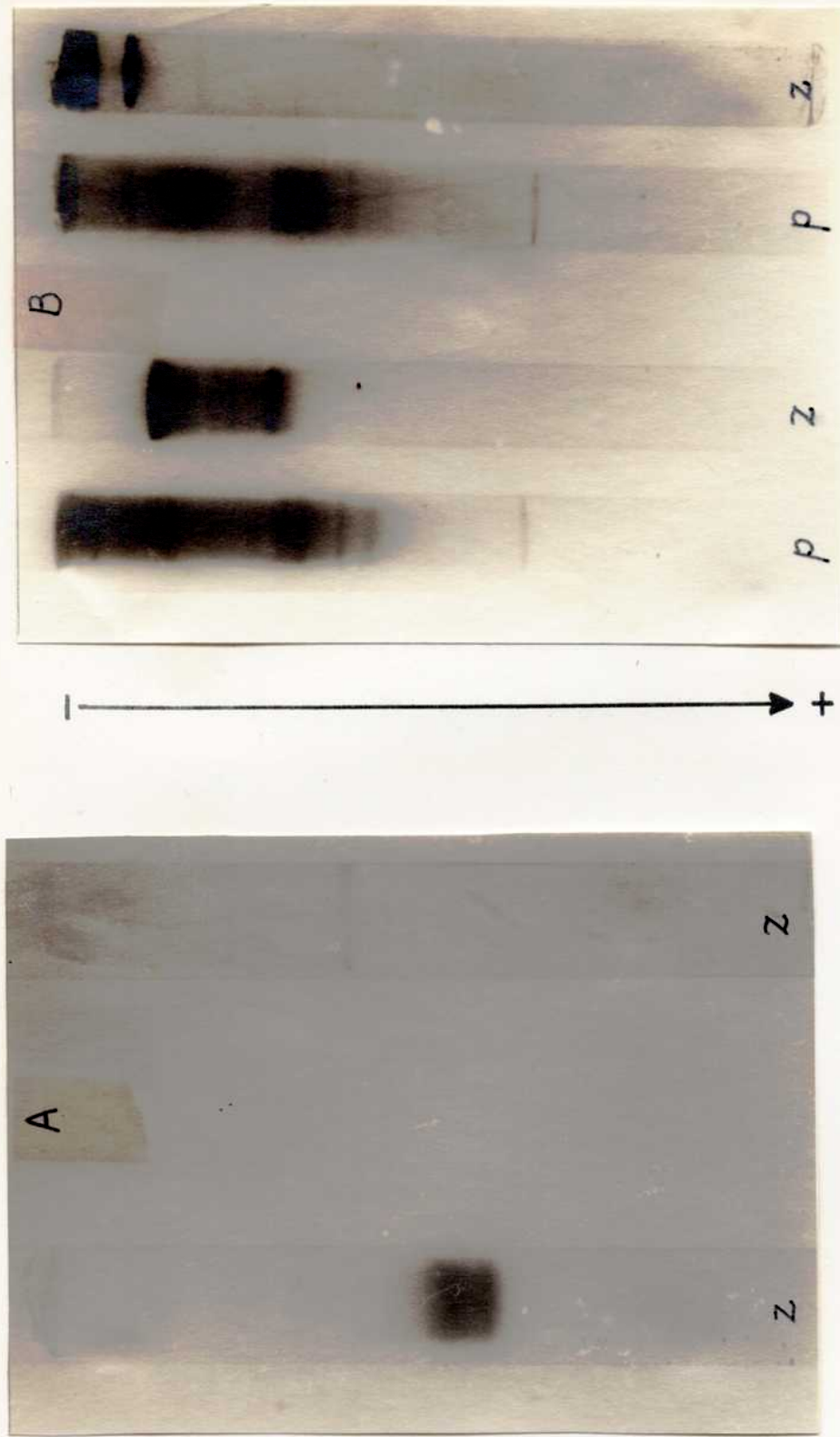


Figura 8 - Comparación entre los zimogramas y los proteínogramas de semilla inmadura y embrión aislado de semilla a los tres días de germinación. A: zimograma de semilla inmadura (izquierda) y de embrión de semilla a los tres días de germinación (derecha) (Fracción que precipita entre 25 y 45 % de saturación con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ); B: proteínogramas y zimogramas de semilla inmadura (izquierda) y de embrión de semilla a los tres días de germinación (derecha). (Fracción que precipita entre 45 y 60 % de saturación con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ). p: proteínograma; z: zimograma

Si tratamos una preparación de extracto crudo con sulfato de amonio, más del 80 % de la actividad de la isoenzima de embrión de semilla germinada pasa a la fracción que precipita entre 60 y 85 % de saturación. Este precipitado se disuelve en buffer Tris-maleato 10 mM, DTT 0,5 mM, glicerol 15 % pH: 7,4 y con una alícuota (aproximadamente 12 mg de proteína) se carga una columna de Sephadex G-25, equilibrada previamente con el mismo buffer, para eliminar el sulfato de amonio. Una alícuota del eluido de Sephadex G-25 (aproximadamente 10 mg de proteína) se siembra en una columna de DEAE-celulosa equilibrada previamente con el mismo buffer. La muestra sembrada se eluye con un gradiente lineal de ClNa (de 0 a 0.4 M) preparado con el mismo buffer, previo lavado de la columna con 20 ml de buffer. Se recogen fracciones de 2 ml, siendo el volumen total de elución de 120 ml. Bajo estas condiciones, la isoenzima de fosforilasa de embrión se eluye en las primeras fracciones, sin adsorberse (Figura 9). La actividad específica y total de la isoenzima de fosforilasa antes y después del pasaje a través de la columna de DEAE-celulosa, se resumen en la Tabla IV.

La enzima se eluye de la columna de DEAE-celulosa con una actividad específica máxima de 10 nmoles por minuto y por mg de proteína. Este valor es unas 15 veces mayor al correspondiente para la enzima que eluye de Sephadex G-25. Después de la etapa de DEAE-celulosa la enzima se vuelve muy inestable: al cabo de una semana a 4 °C pierde el 100 % de la actividad.



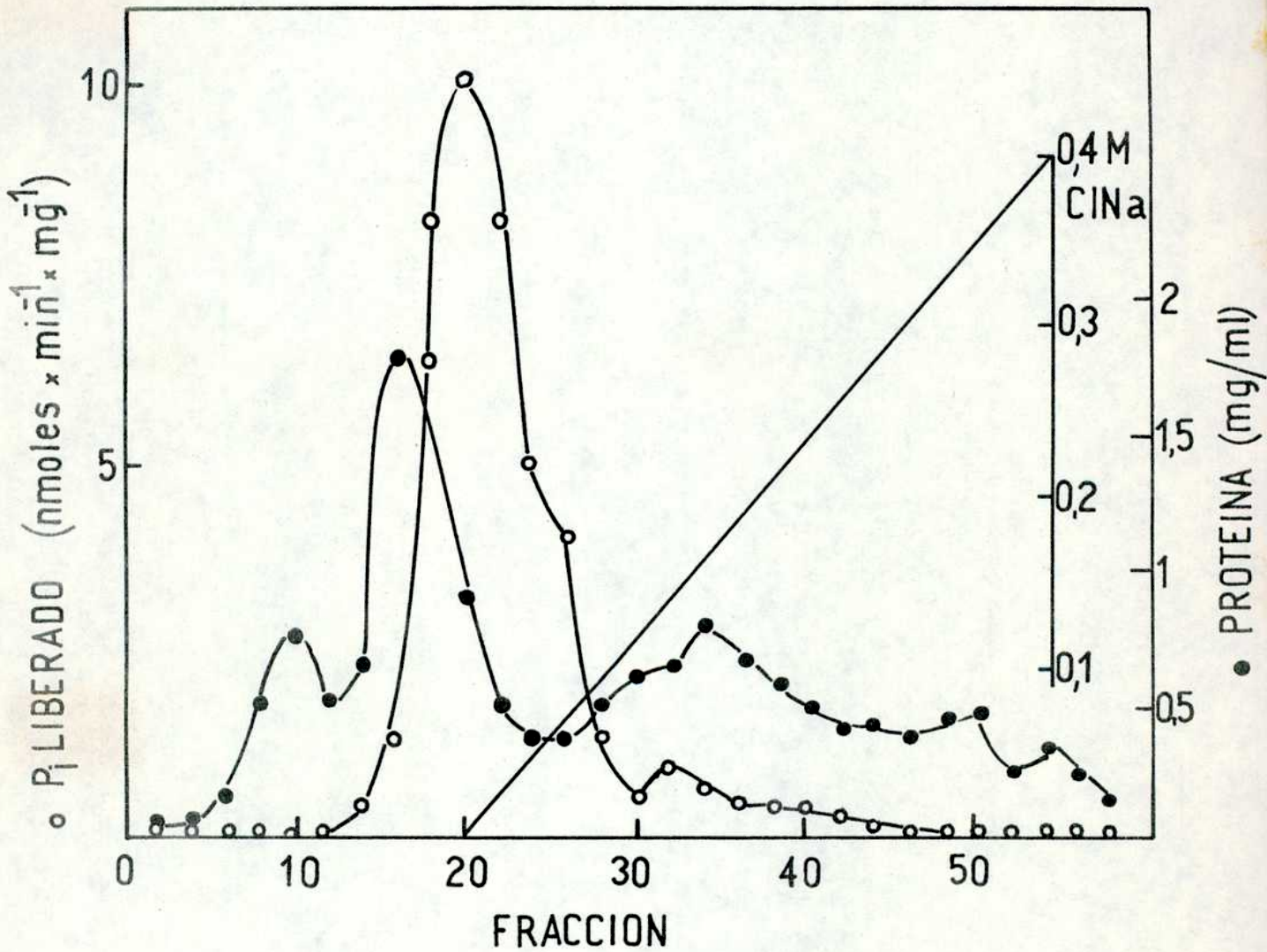


Figura 2 - Perfil de elución de la isoenzima de fosforilasa de embrión de semilla de maíz dulce germinada durante tres días, de una columna de cromatografía en DEAE-celulosa. -o-o-: actividad enzimática; -●-●-: proteína.

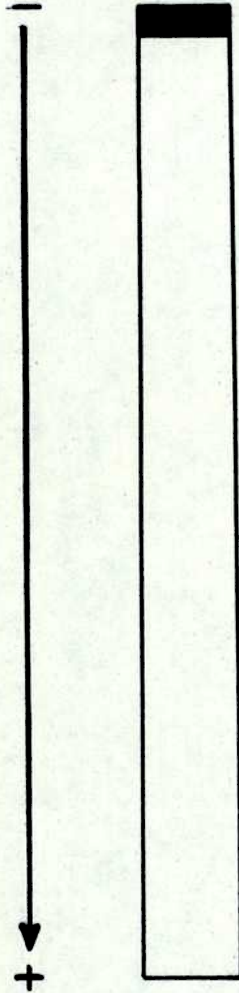


Figura 10 - Electroforesis en gel de poliacrilamida de la isoenzima de fosforilasa de embrión de semilla de maíz dulce, germinada durante tres días (etapa de DEAE-celulosa). Se revela actividad enzimática. Las condiciones de electroforesis y coloración se describen en Materiales y Métodos.

Si se congelan los eluidos activos de DEAE-celulosa, se pierde más del 90 % de la actividad en dos días.

Geles de poliacrilamida efectuados con la fracción activa de DEAE-celulosa dan una sólo banda de actividad de fosforilasa (Figura 10). La obtención de una fracción parcialmente purificada con una única actividad de fosforilasa (la correspondiente a la isoenzima de embrión de semilla germinada) nos permite estudiar sus propiedades cinéticas, así como su mecanismo de acción con diferentes "primers".

Tabla IV- Purificación parcial de la isoenzima de fosforilasa de embrión de semilla germinada de maíz dulce

Fracciones	Actividad específica nmoles/min/mg de proteína	Actividad total nmoles/min
Sephadex G-25	0,65	8,5
DEAE-celulosa	10	17,5

### III- Propiedades de la enzima

#### 1- Requerimientos para la actividad enzimática

Si medimos la actividad de la isoenzima de fosforilasa de embrión de semilla madura de tres días de germinación (etapa de DEAE-celulosa; figura 10) en la dirección de síntesis utilizando la mezcla de incubación

standard:

Glu-1-P	10 mM
Buffer MES pH: 6,1	50 mM
Amylopectina	0,05 g %
Proteína enzimática	0,1 mg

la cantidad de  $P_i$  liberada es proporcional al tiempo de incubación y a la concentración de proteína enzimática (Figuras 11 y 12).

La enzima no requiere cationes para su actividad. En la figura 13 graficamos actividad enzimática en función de distintos valores de pH en la mezcla de incubación. La actividad máxima se observa alrededor de pH: 6,1 con buffer MES. El buffer citrato usado en la medición de actividad de la mayoría de las fosforilasas conocidas de origen vegetal, tiene un efecto ligeramente inhibitorio (Figura 13). El pH óptimo encontrado para la enzima de embrión de semilla de maíz dulce germinada es algo menor que el encontrado para la fosforilasa de endosperma de semilla inmadura de maíz dulce, que está en el rango de 6,3-6,5 con buffer citrato (Laviatman y col., 1972). El valor que encontramos es también inferior al de los valores de pH óptimos para fosforilasas animales (Cori y col., 1943).

La estabilidad a varias temperaturas fué ensayada para la fosforilasa de embrión y los resultados se muestran en la figura 14. Por encima de 50°C la enzima retiene sólo un 50 % de la actividad.

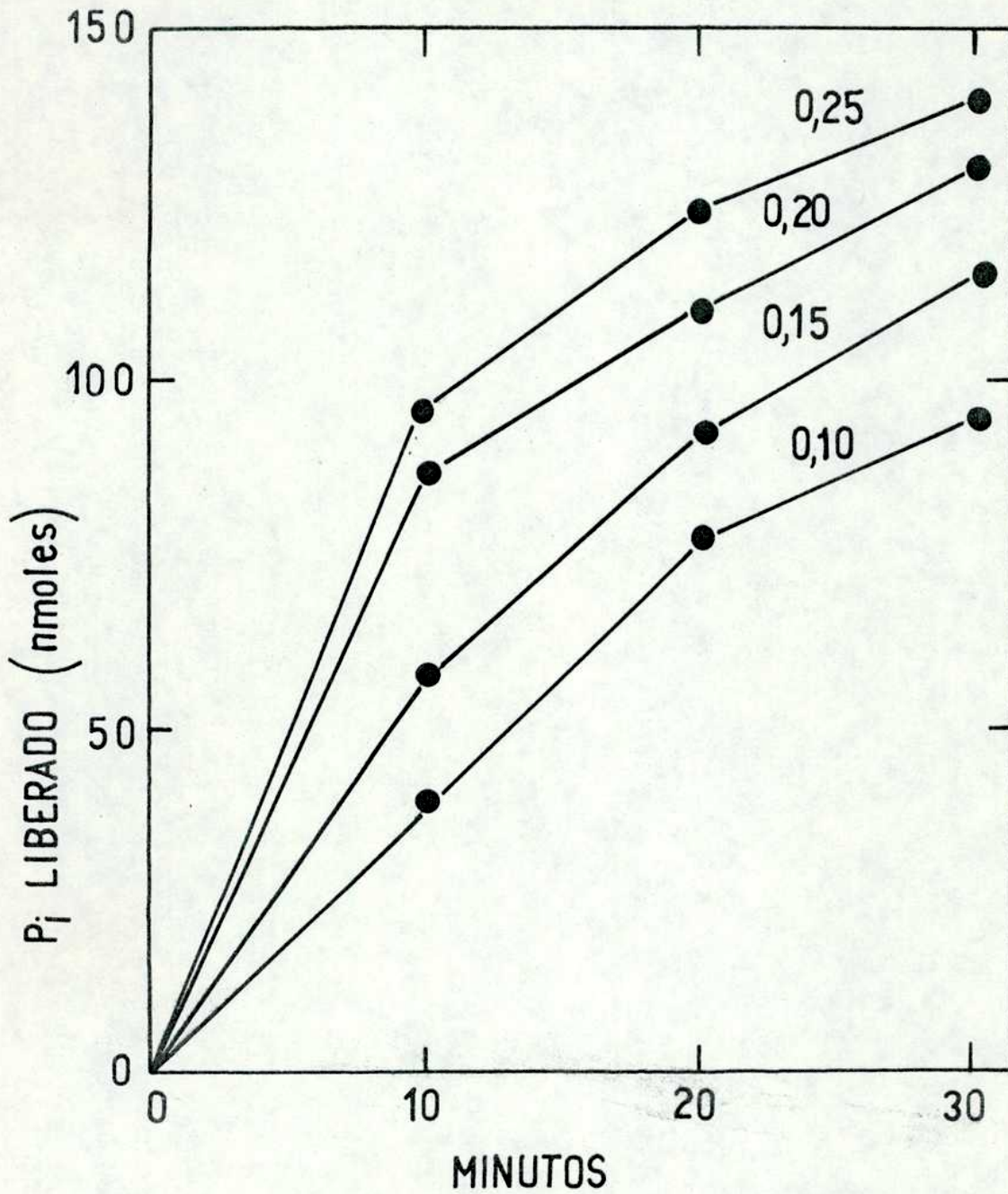


Figura 11 -  $P_i$  liberado en función del tiempo de incubación. La mezcla de reacción contiene los miligramos de proteína que se indican en cada caso. Las demás condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

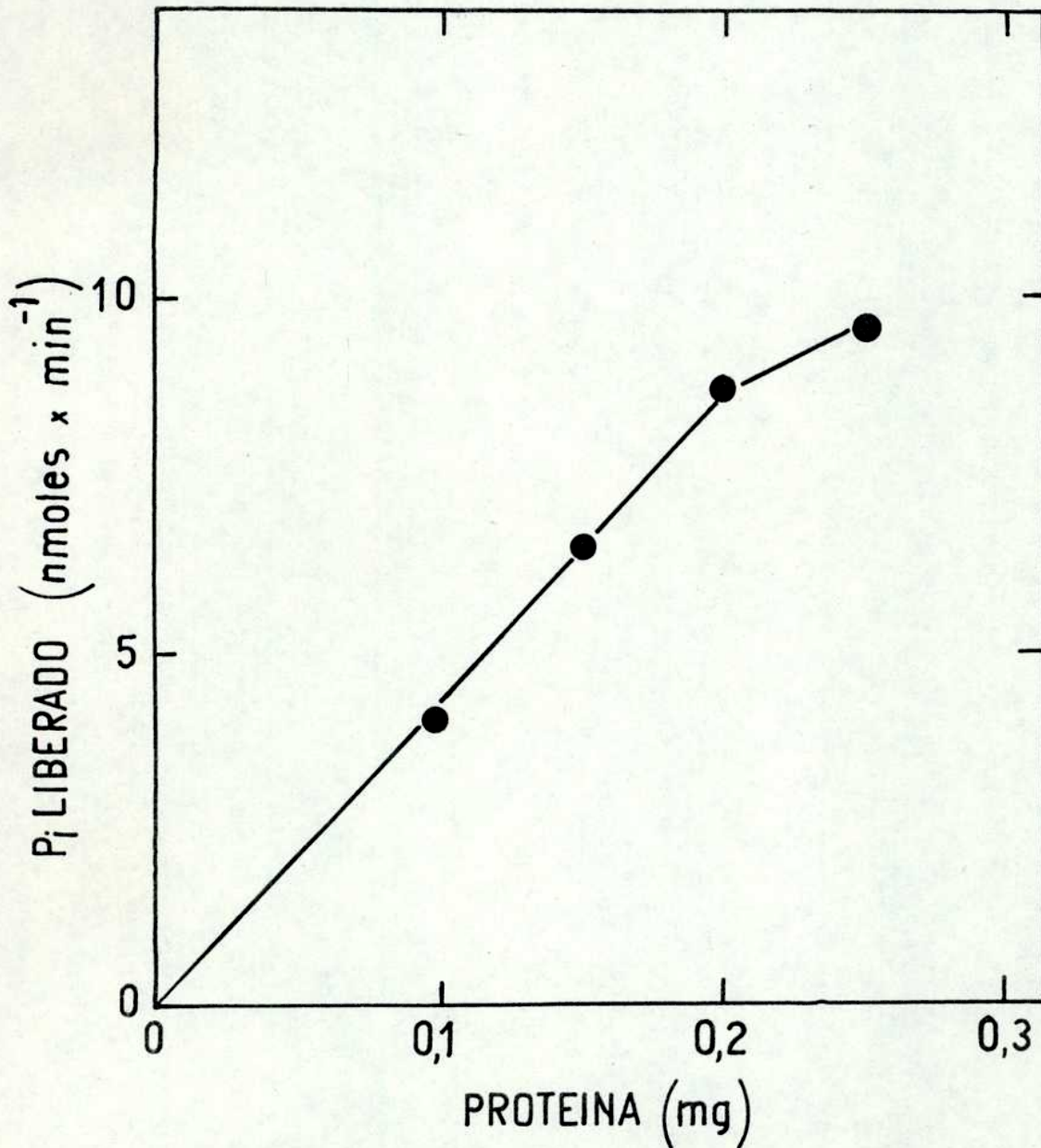


Figura 12 - Relación de la actividad enzimática con la concentración de proteína. Los nmoles de P<sub>i</sub> liberados por minuto de incubación (velocidades iniciales) se grafican en función de los miligramos de proteína en el ensayo. Las condiciones experimentales se especifican en Materiales y Métodos.

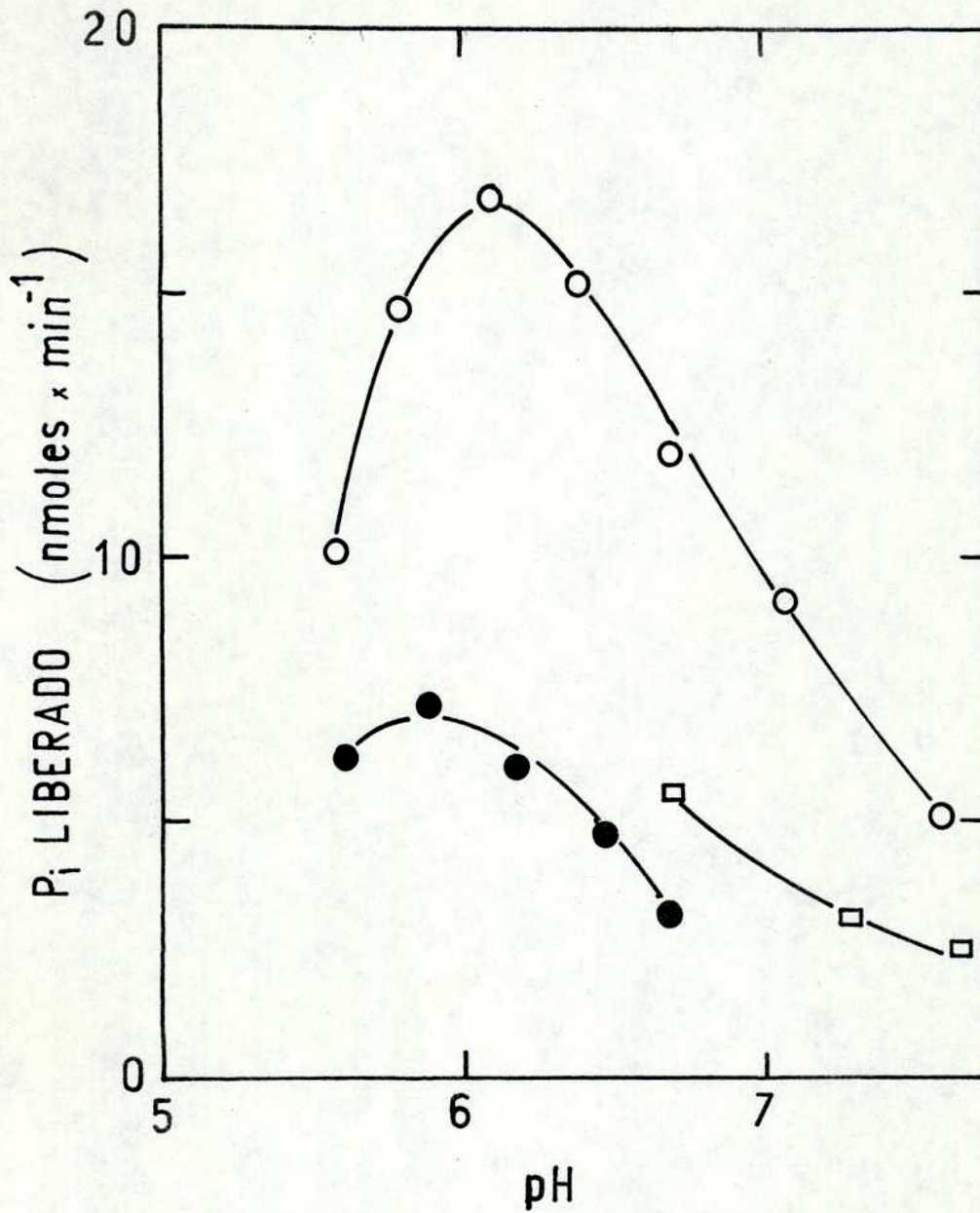


Figura 13 - Actividad de fosforilasa en función del pH. Se ensaya en presencia de buffer MES 50 mM (-O-O-) o buffer citrato 50 mM (-●-●-) o buffer tricina 50 mM (-□-□-) a los valores de pH indicados en el gráfico. Las demás condiciones se describen en Materiales y Métodos.

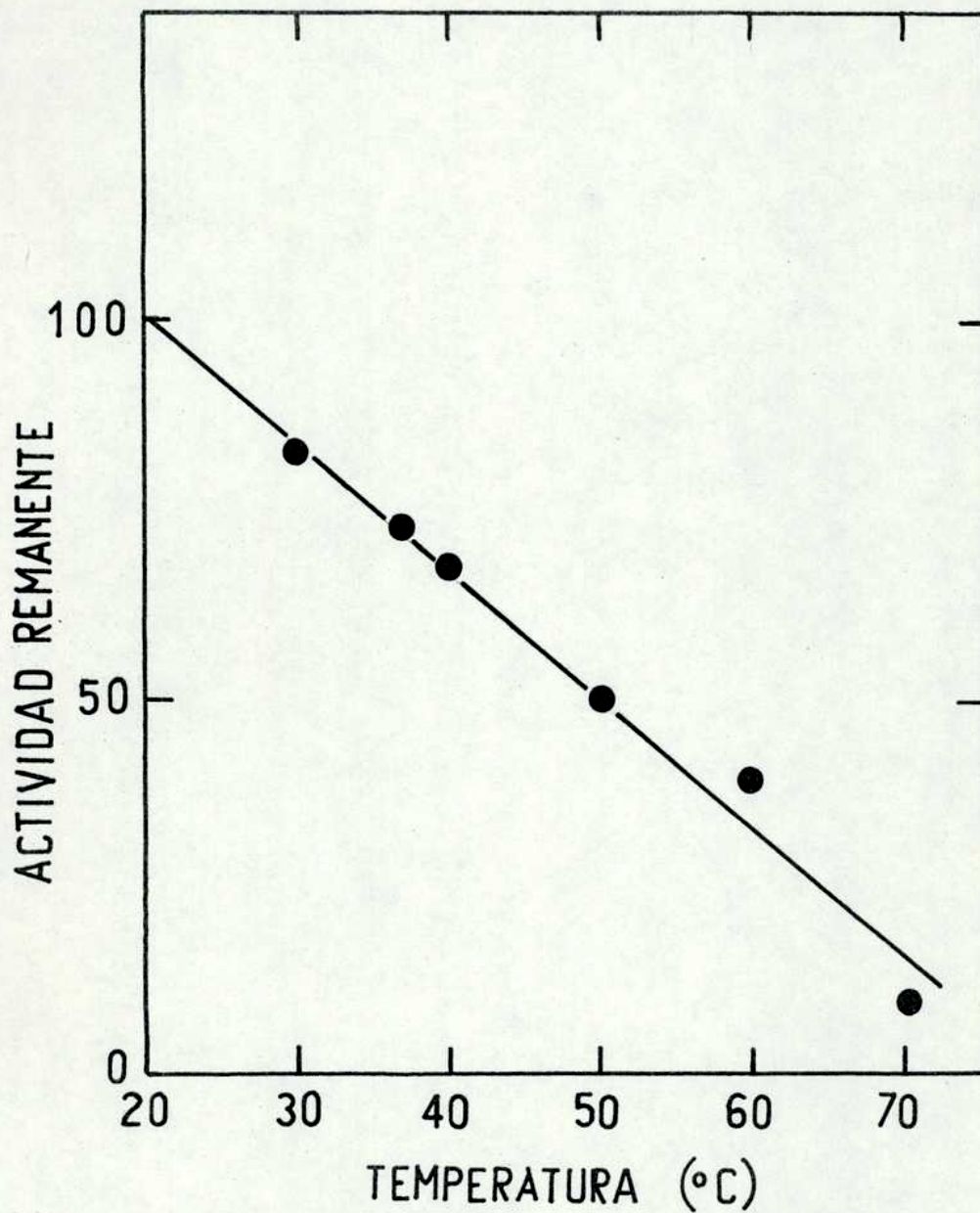


Figura 14 - Curva de inactivación por temperatura. Todos los componentes de la mezcla de reacción, excepto el Glu-1-P, se preincubaban durante 15 minutos a la temperatura indicada en abscisas y luego se agrega el Glu-1-P y se incubaba a 37 °C durante 15 minutos.



## 2- Modificadores enzimáticos

Se ensayaron numerosas sustancias con el propósito de encontrar algún compuesto activador de esta isoenzima de fosforilasa. Se midió actividad en presencia de: fluoruro de sodio, AMP cíclico y AMP. Algunas de estas sustancias son activadoras de fosforilasas de origen animal; sin embargo, no obtuvimos efecto con la enzima de maíz dulce.

## IV- Cinética

El efecto de la concentración de Glu-1-P sobre las velocidades de reacción (velocidades iniciales, ver figura 15) puede verse en la figura 16. Las figuras 17 y 18 ilustran el efecto de la concentración de amilopectina y fitoglucógeno, respectivamente, sobre las velocidades iniciales de reacción. En las figuras 16, 17 y 18 se representaron además los datos experimentales según Lineweaver y Burk (1934). De estos gráficos se desprende que en la síntesis de las uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), ambos sustratos: Glu-1-P y el "primer" (amilopectina o fitoglucógeno) se comportan como sustratos normales respecto a su combinación con la enzima. En las condiciones experimentales aplicadas, las constantes de Michaelis ( $K_m$ ) son, para la Glu-1-P:  $1,77 \times 10^{-3}$  M, para amilopectina:  $0,22 \times 10^{-5}$  M y para fitoglucógeno:  $14,9 \times 10^{-5}$  M. La molaridad de los valores de  $K_m$  para los polisacáridos está expresada en grupos finales, suponiendo un 9 % para fitoglucógeno y sus dextrinas y 4,5 % para amilopectina y su dextrina.

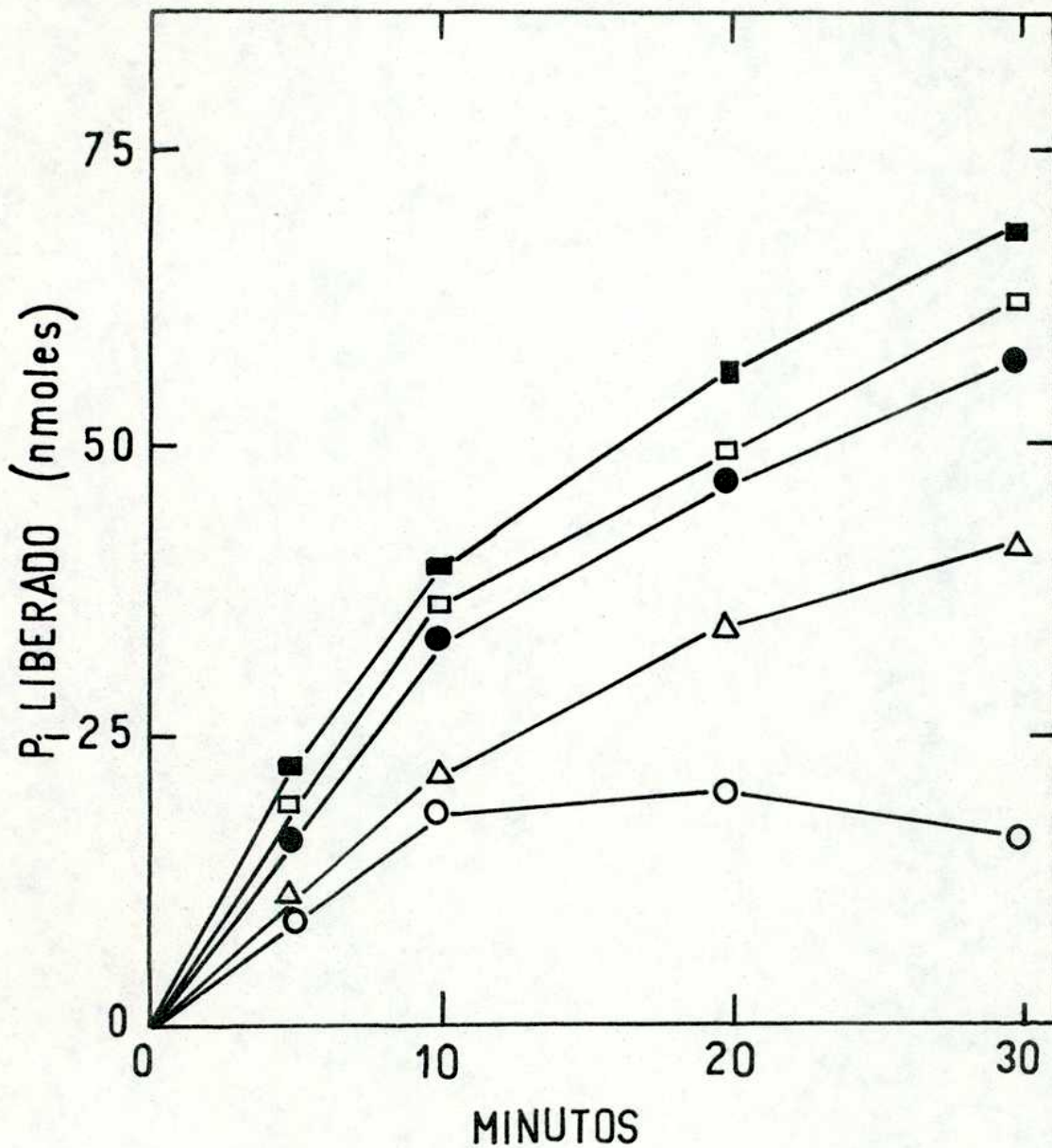


Figura 15 -  $P_i$  liberado en función del tiempo de incubación para diferentes concentraciones de Glu-1-P en la mezcla de reacción. ○-○: 0,6 mM; △-△: 1,5 mM; ●-●: 3 mM; □-□: 6 mM; ■-■: 9 mM.

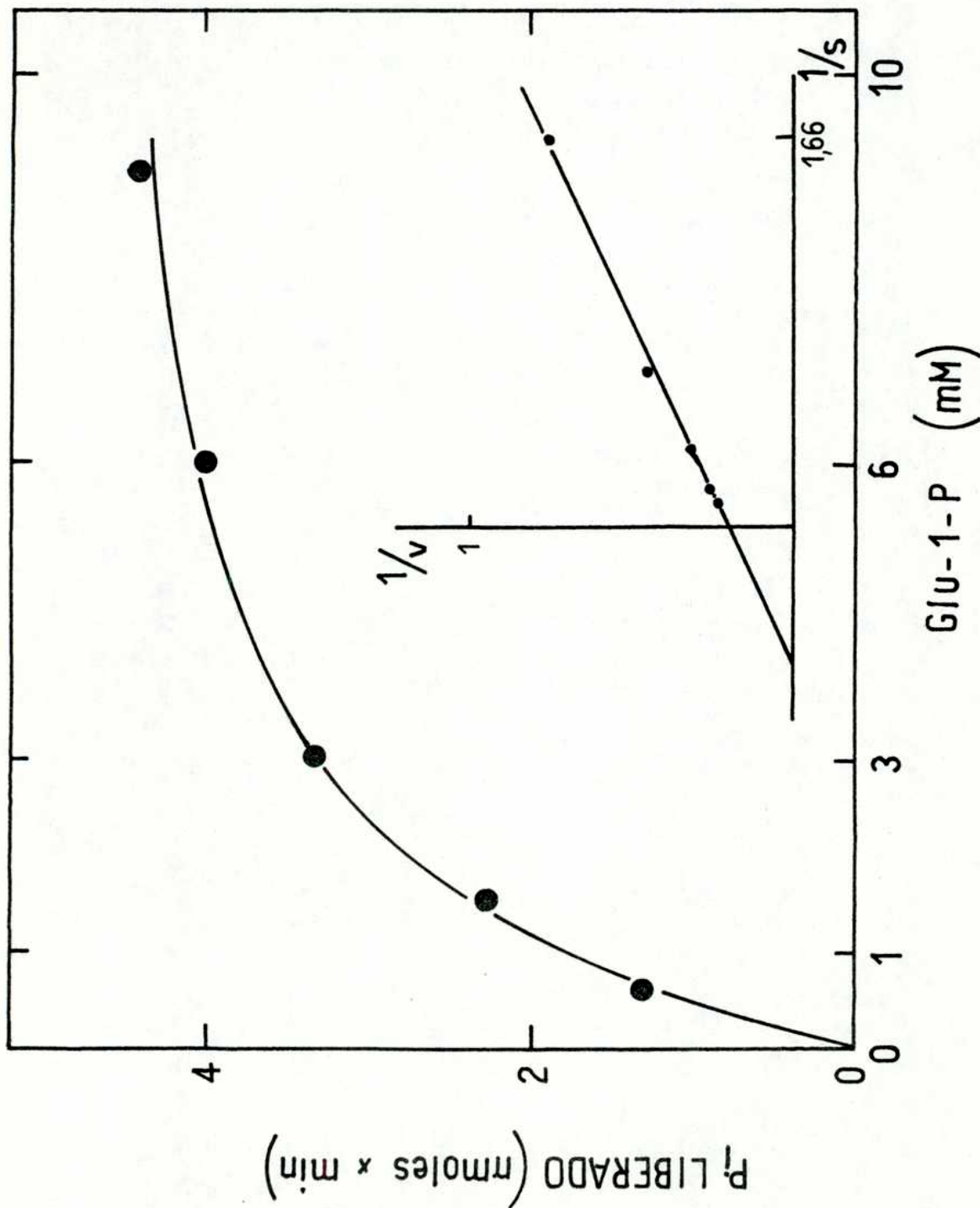


Figura 16 -  $P_i$  liberado por minuto de incubación (velocidad inicial) en función de la concentración de Glu-1-P. En el extremo inferior derecho se inserta la representación de los datos experimentales según Lineweaver-Burk (1934).

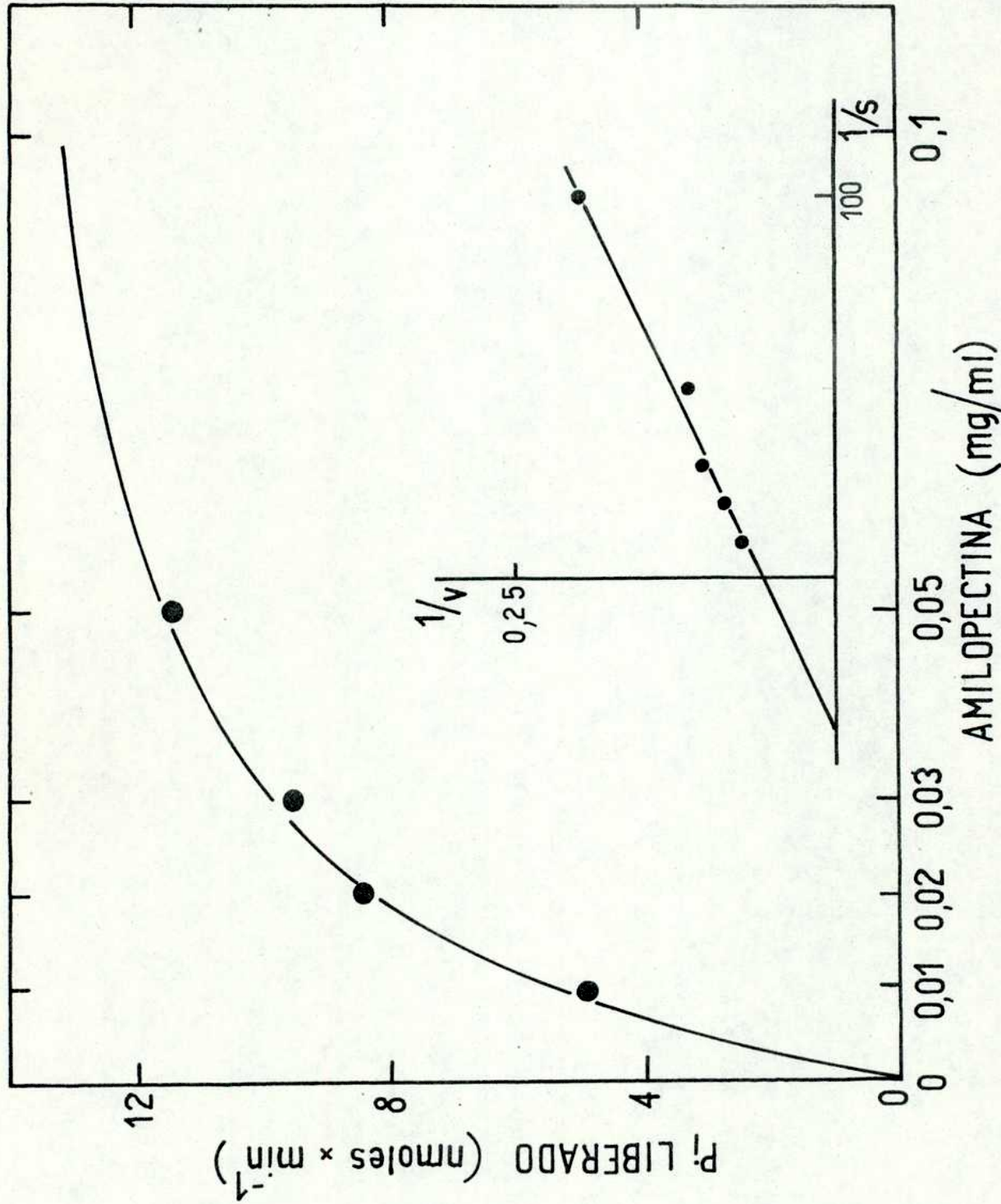


Figura 17 - Efecto de la concentración de la amilopectina sobre la velocidad inicial de reacción. En el extremo inferior derecho se inserta la representación de los datos experimentales según Lineweaver-Burk (1934).

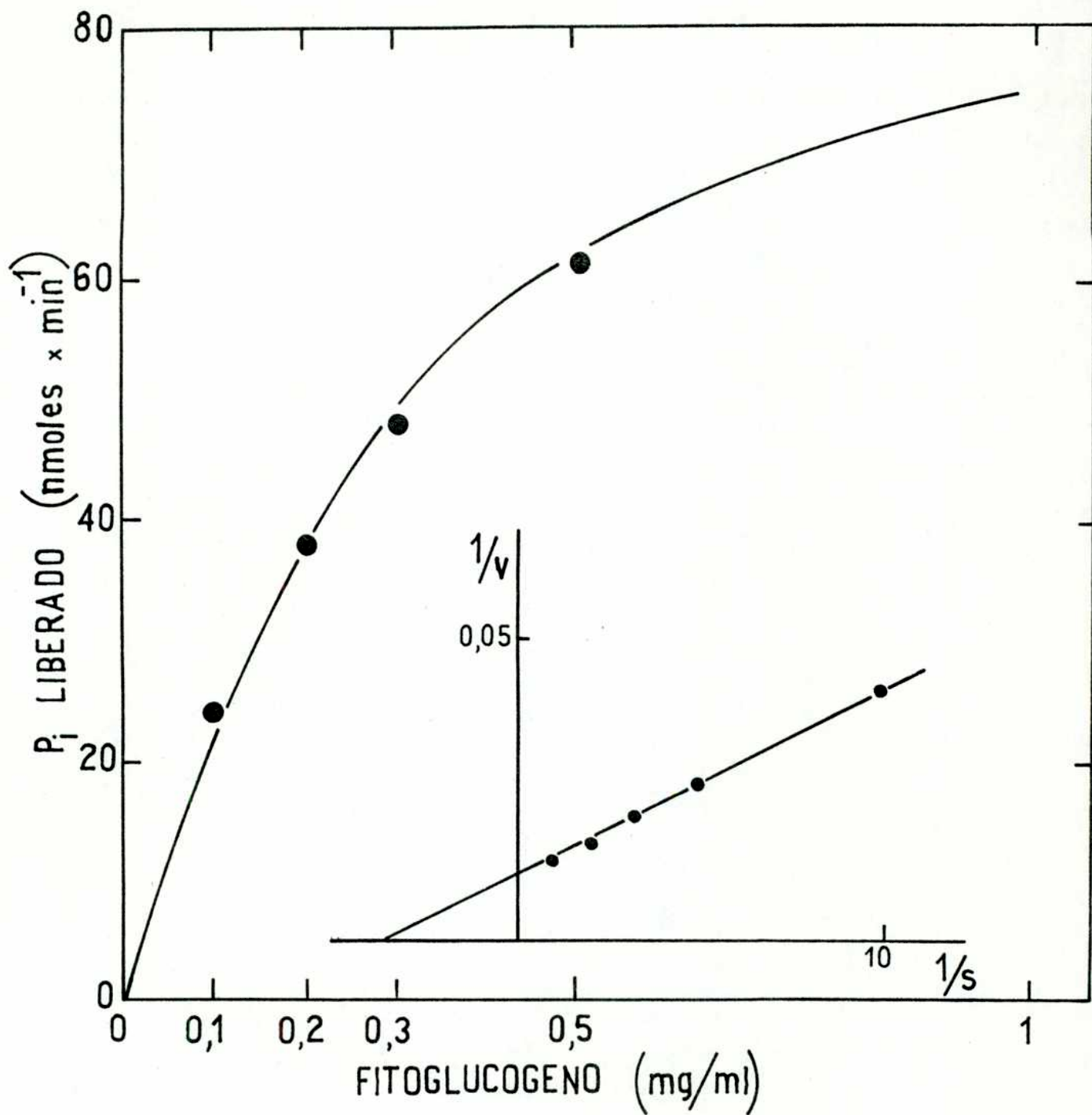


Figura 18 - Efecto de la concentración de fitoglucógeno sobre la velocidad inicial de reacción. En el extremo inferior derecho se inserta la representación de los datos experimentales según Lineweaver-Burk (1934).

El valor del  $K_m$  hallado para la Glu-1-P es menor que los publicados para fosforilasa de endosperma de semilla inmadura (Lavintman y col., 1972), tubérculo de papa (Lee, Y.F., 1960; Brown y Cori, 1961), hígado y músculo (Brown y Cori, 1961).

Como se ve en la Tabla V, a igual concentración en peso, el fitoglucógeno es el mejor aceptor, debido presumiblemente a la mayor proporción de grupos terminales no reductores. Cuando la actividad con fitoglucógeno se considera arbitrariamente como 100, la velocidad de la reacción con amilopectina es de 76 % y la de amilosa, 42 %. La dextrina  $\phi$ -límite de fitoglucógeno es el aceptor más eficiente entre las dextrinas de fitoglucógeno ensayadas. Su actividad es de 78 % mientras que la dextrina  $\beta$ -límite y la dextrina  $\phi, \beta$  tienen velocidades de reacción relativamente menores.

Como sucede con otras fosforilasas (Lavintman y col., 1972), la maltosa pura no sirve como "primer". Las muestras comerciales contienen suficiente  $M_3$  como para ser activas (Lehrfeld, J., 1971). Sin embargo, cuando las ramas externas del fitoglucógeno se reducen a dos residuos de glucosa como en la dextrina  $\phi, \beta$  de fitoglucógeno, pueden actuar como sustratos aceptores.

La  $M_3$  es el maltooligosacárido más corto que sirve como aceptor de glucosa de la Glu-1-P (Bailey y col., 1950; French y Wild, 1953; Whelan y Bailey, 1954). Las velocidades de reacción con oligosacáridos aumentan

TABLA V- Actividad de fosforilasa de embrión de semilla germinada de maíz dulce

Sustrato "primer"	Concentración mg/ml	Por ciento de la velocidad observada con fitoglucógeno
Fitoglucógeno	0,5	100
Amilopectina	0,5	76
Amilosa	0,5	42
Dextrina $\beta$ -límite de fitoglucógeno	0,5	46
Dextrina $\phi$ -límite de fitoglucógeno	0,5	78
Dextrina $\phi, \beta$ de fitoglucógeno	0,5	58
Maltotriosa	0,22	26
Maltotetraosa	0,31	42
Maltoheptaosa	0,60	48
iso-Maltopentaosa	0,37	26

Las condiciones experimentales son las del ensayo standard descrito en Materiales y Métodos, excepto la concentración del "primer", como se indica en cada caso.

con el aumento del largo de cadena desde  $M_3$  a  $M_7$  (Whelan y Bailey, 1954).

En las figuras 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 representamos actividad enzimática en función de la concentración de los distintos "primers", manteniendo constante la concentración del sustrato dador de glucosa, la Glu-1-P. Las curvas que se obtienen son hiperbólicas en todos los casos, clásicas de los sistemas michaelianos. Los datos experimentales obtenidos en cada caso fueron graficados según Lineweaver y Burk (1934) e insertados en cada una de las figuras, respectivamente. Los parámetros cinéticos obtenidos de estos gráficos para los diferentes "primers" ensayados se resumen en la Tabla VI. De los datos expuestos en la Tabla es evidente que la enzima tiene buena afinidad por amilopectina y su dextrina  $\beta$ -límite, una afinidad menor por fitoglucógeno y una menor aún por las dextrinas  $\phi$ -límite y  $\beta$ -límite de fitoglucógeno.

Es interesante comparar las afinidades por los malto-oligosacáridos y por fitoglucógeno, amilopectina y dextrinas derivadas, con ramas externas de longitud similar. El  $K_m$  por  $M_3$  es unas 6 veces menor que para la dextrina  $\beta$ -límite de fitoglucógeno (largo de cadenas exteriores de 2-3 unidades de glucosa). Relacionados en forma similar están los valores de  $K_m$  de  $M_4$  y de la dextrina  $\phi$ -límite de fitoglucógeno (largo de cadenas exteriores de 4 unidades de glucosa). La afinidad de la enzima por cadenas de 7 residuos de glucosa ( $M_7$ ) es mayor que la observada para el fitoglucógeno (largo de cadenas exteriores de 7-9 unidades de glucosa). La



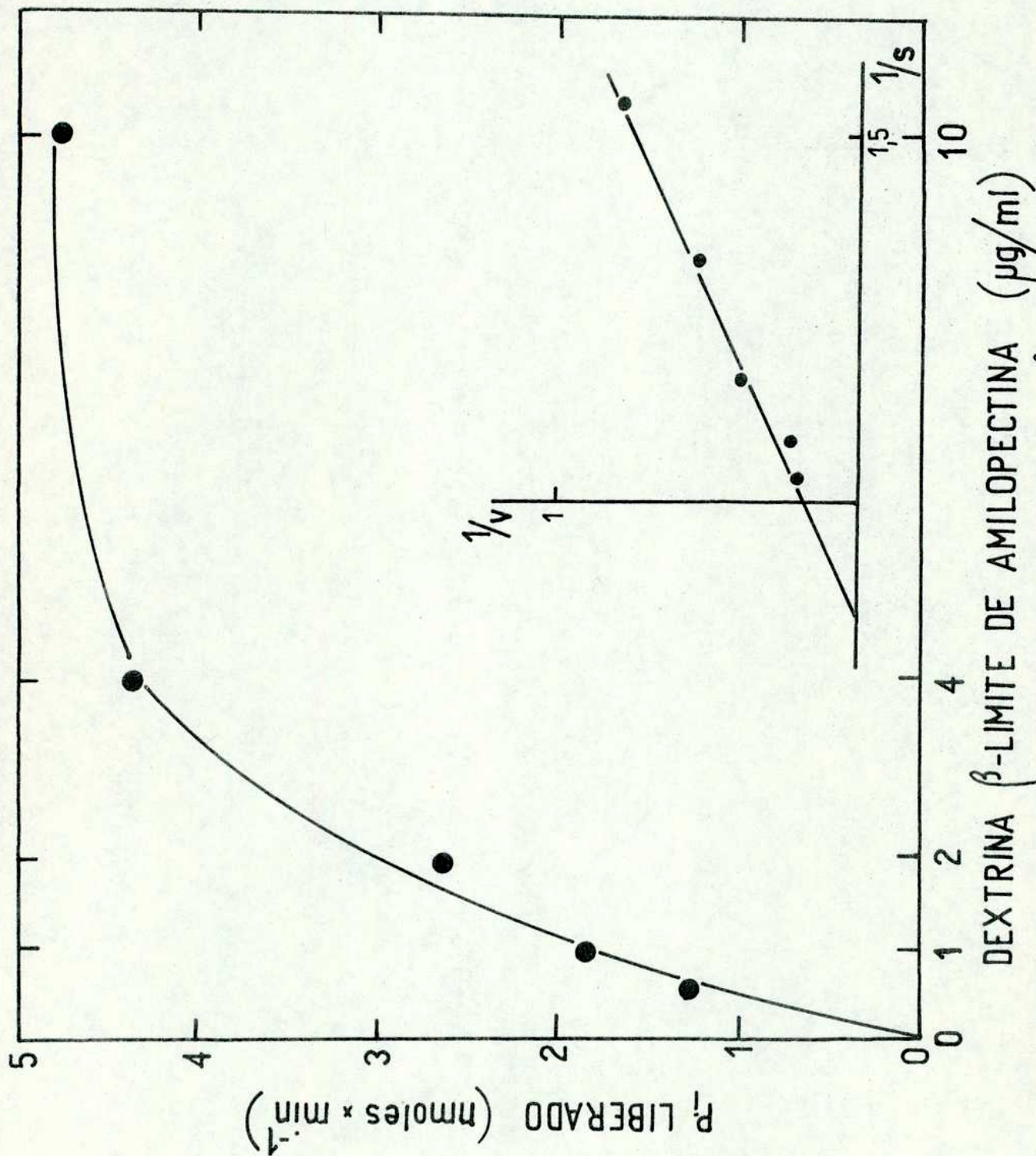


Figura 12 - Efecto de la concentración de la dextrina  $\beta$ -límite de amilopectina sobre la velocidad inicial de reacción. En el extremo inferior derecho se inserta la representación de los datos experimentales según Lineweaver-Burk (1934).

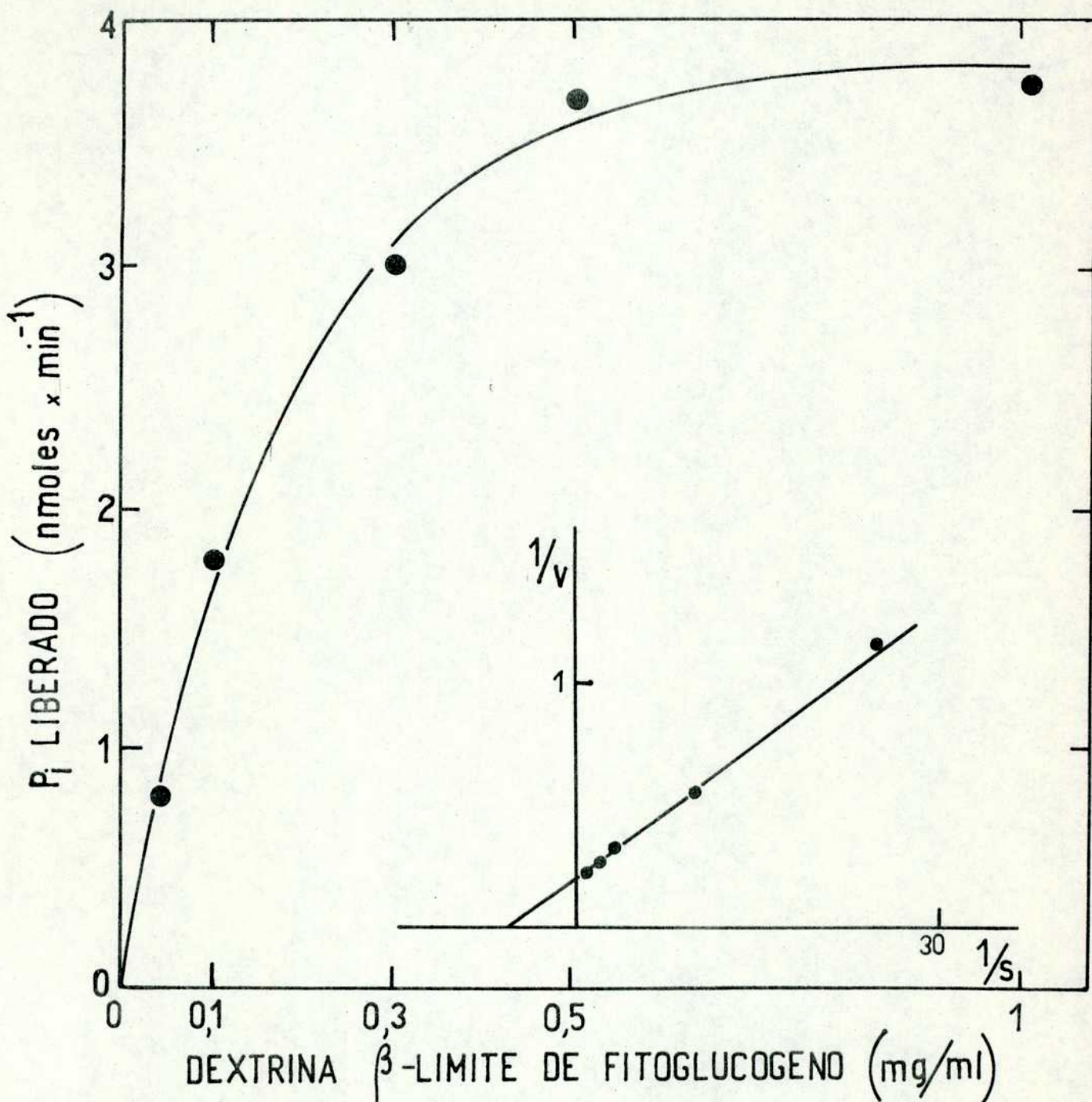


Figura 20 - Efecto de la concentración de la dextrina  $\beta$ -límite de fitoglucógeno sobre la velocidad inicial de reacción. En el extremo inferior derecho se inserta la representación de los datos experimentales según Lineweaver-Burk (1934).

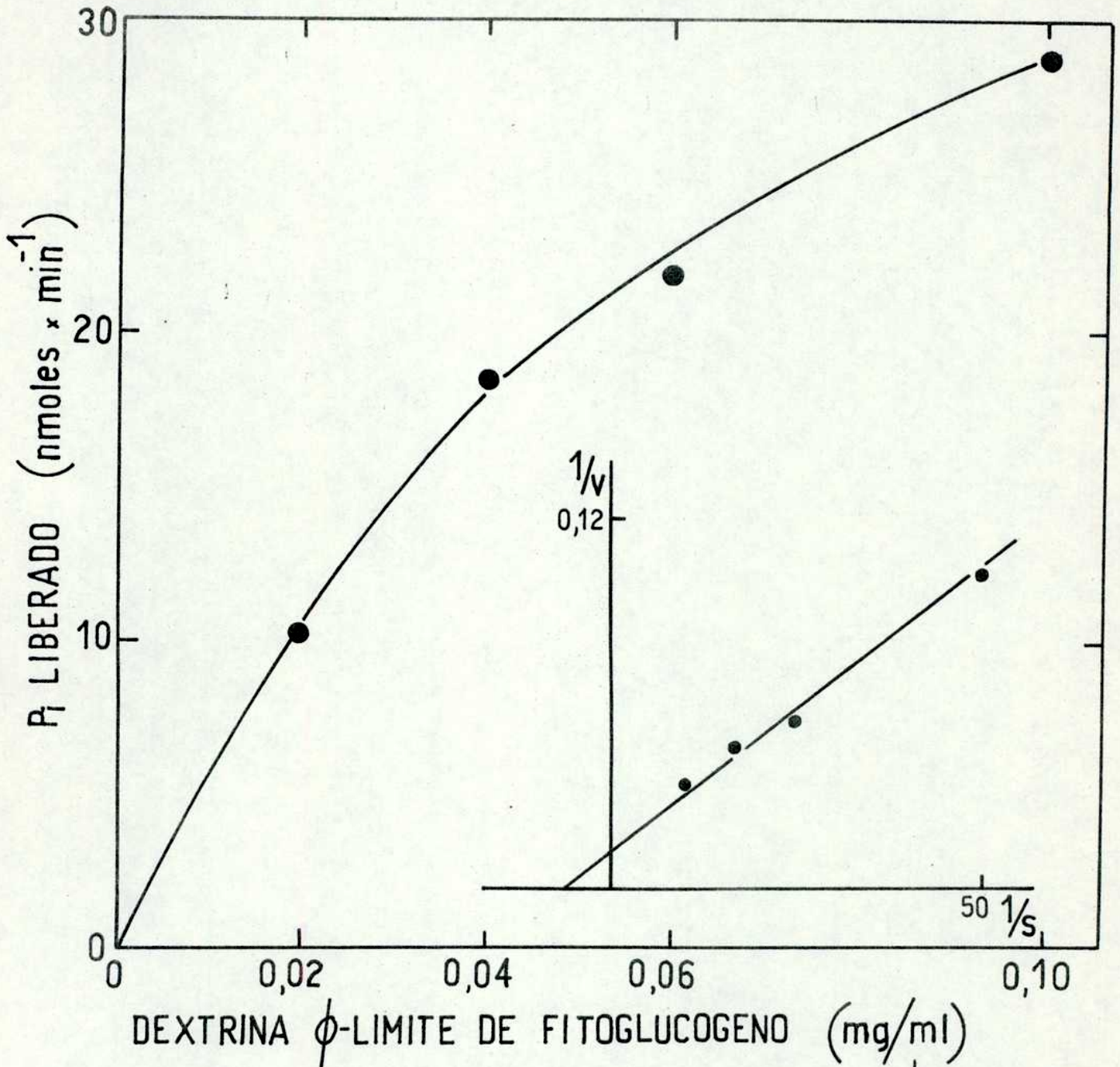


Figura 21 - Efecto de la concentración de la dextrina  $\phi$ -límite de fitoglucógeno sobre la velocidad inicial de reacción. En el extremo inferior derecho se inserta la representación de los datos experimentales según Lineweaver-Burk (1934).

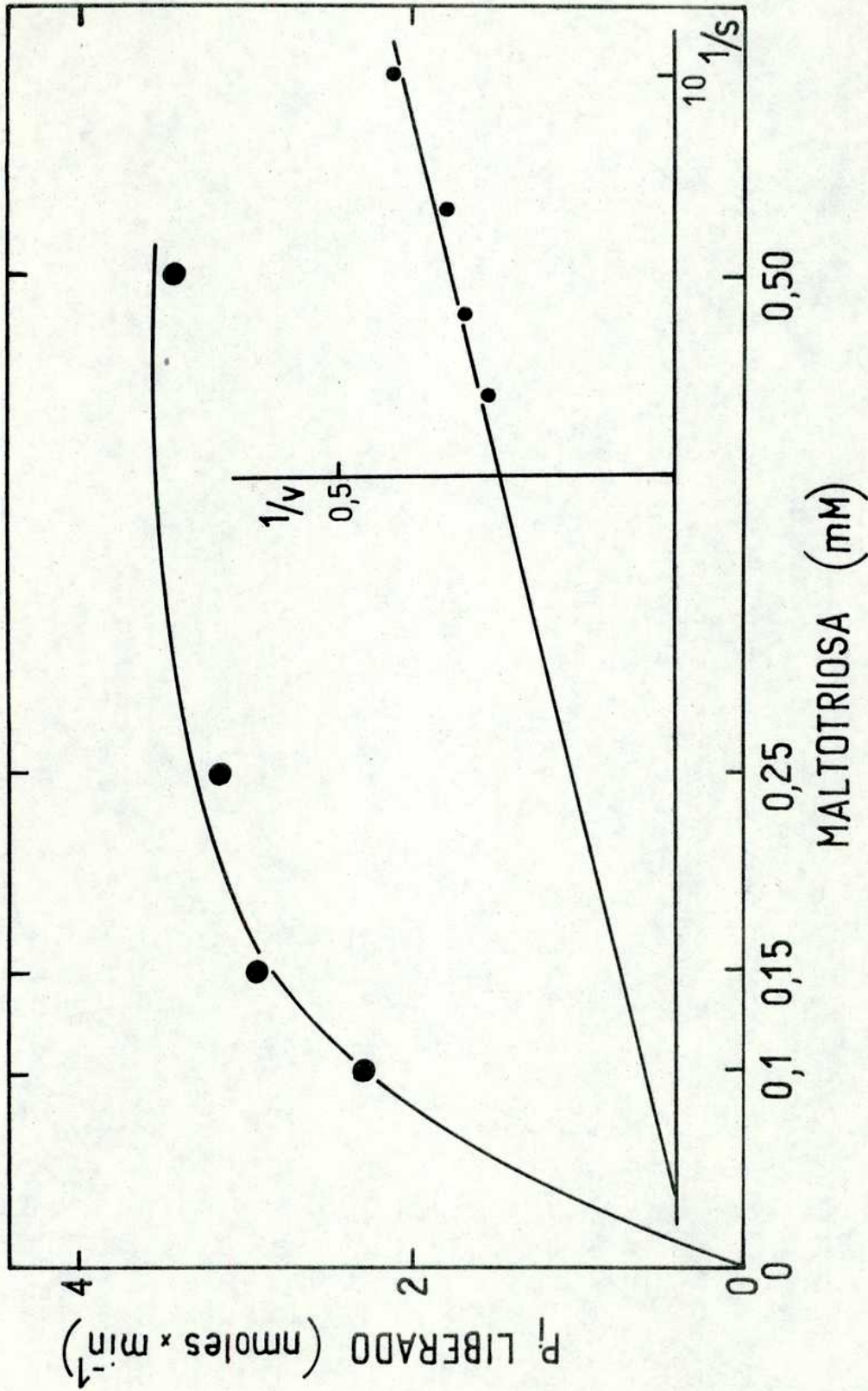


Figura 22 - Efecto de la concentración de  $M_3$  sobre la velocidad inicial de reacción.

En el extremo inferior derecho se inserta la representación de los datos experimentales

según Lineweaver-Burk (1934).

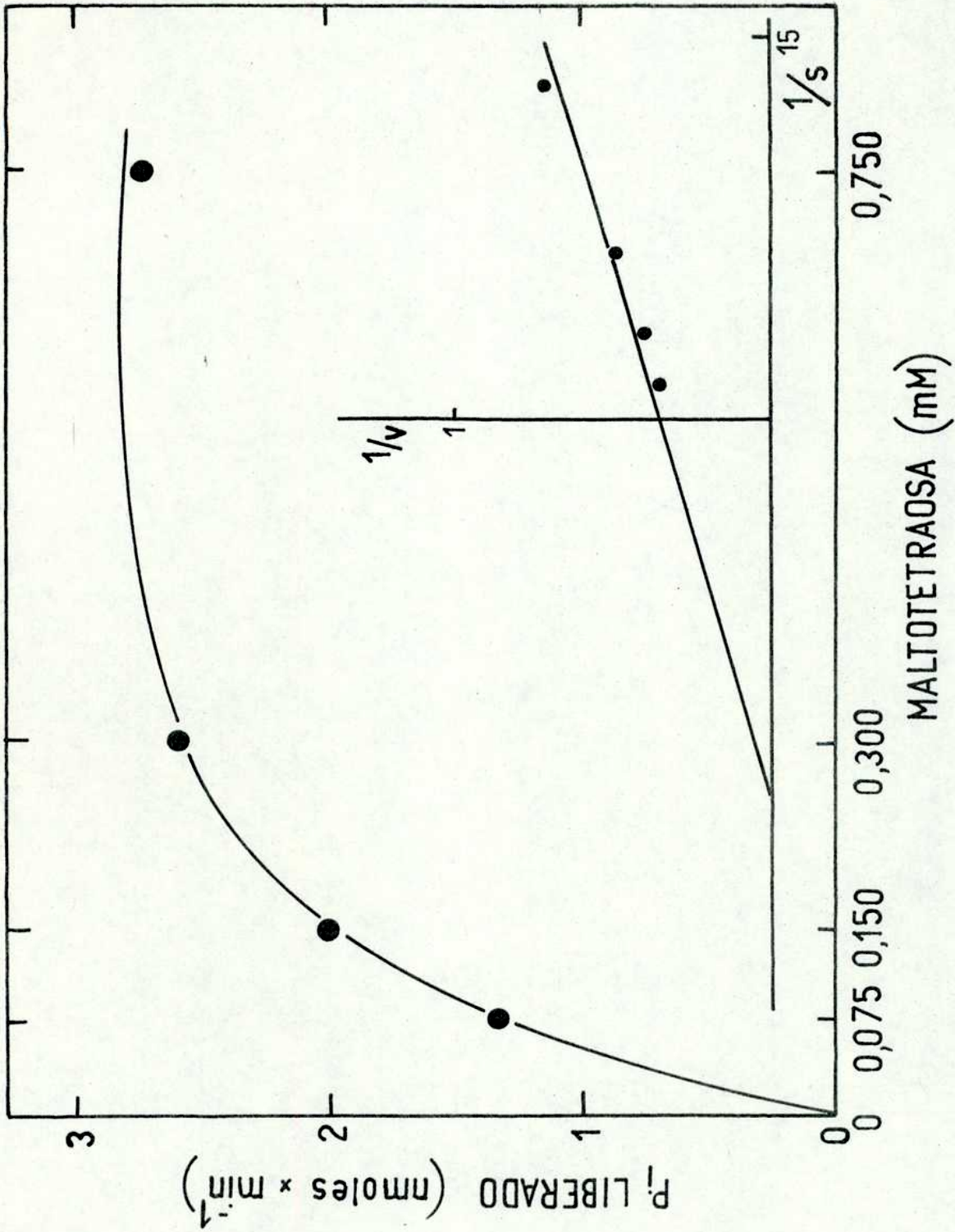


Figura 23 - Efecto de la concentración de M<sub>4</sub> sobre la velocidad inicial de reacción. En el extremo inferior derecho se inserta la representación de los datos experimentales según Lineweaver-Burk (1934).

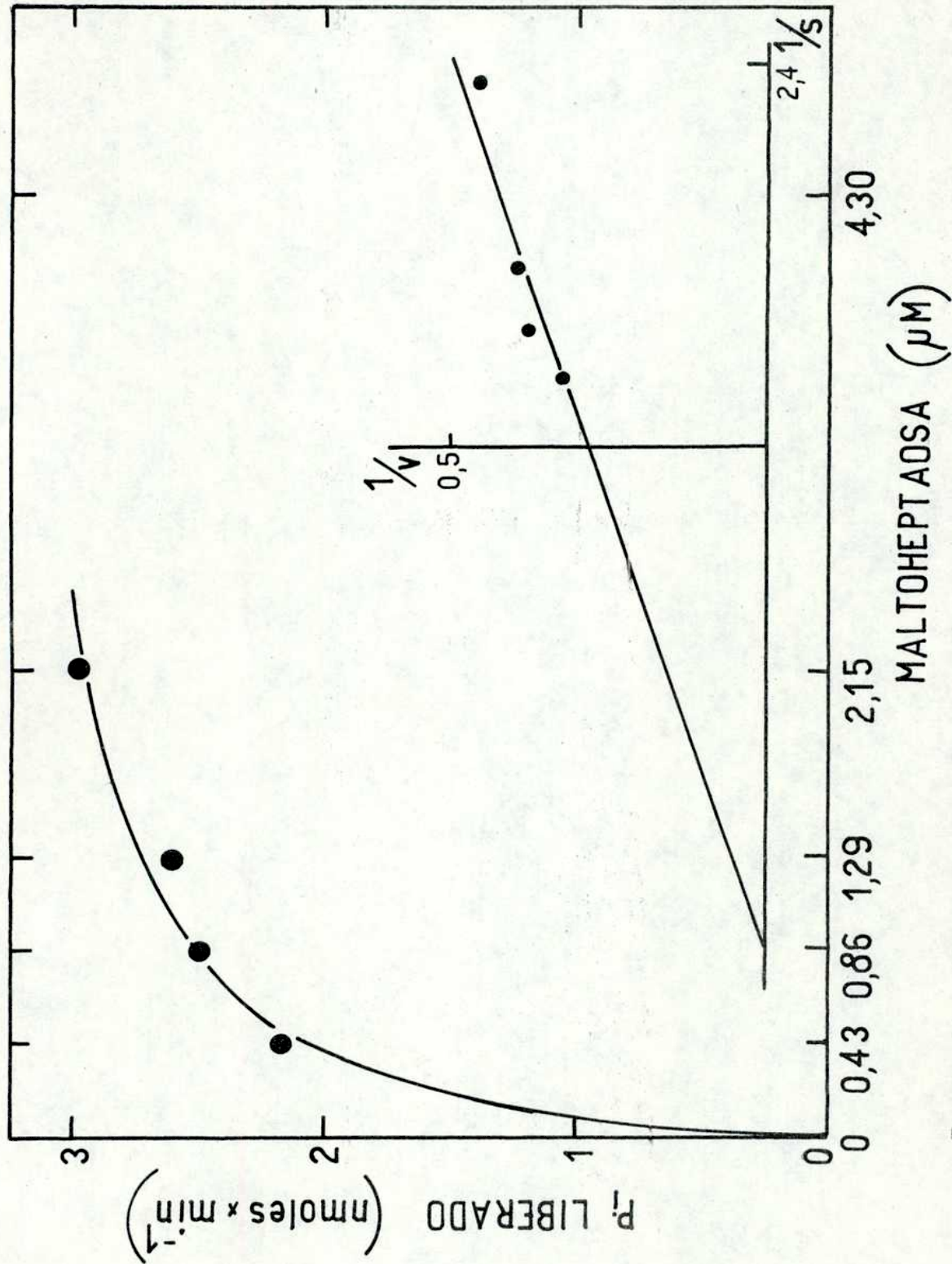


Figura 24 - Efecto de la concentración de  $M_7$  sobre la velocidad inicial de reacción. En el extremo inferior derecho se inserta la representación de los datos experimentales según Lineweaver-Burk (1934).

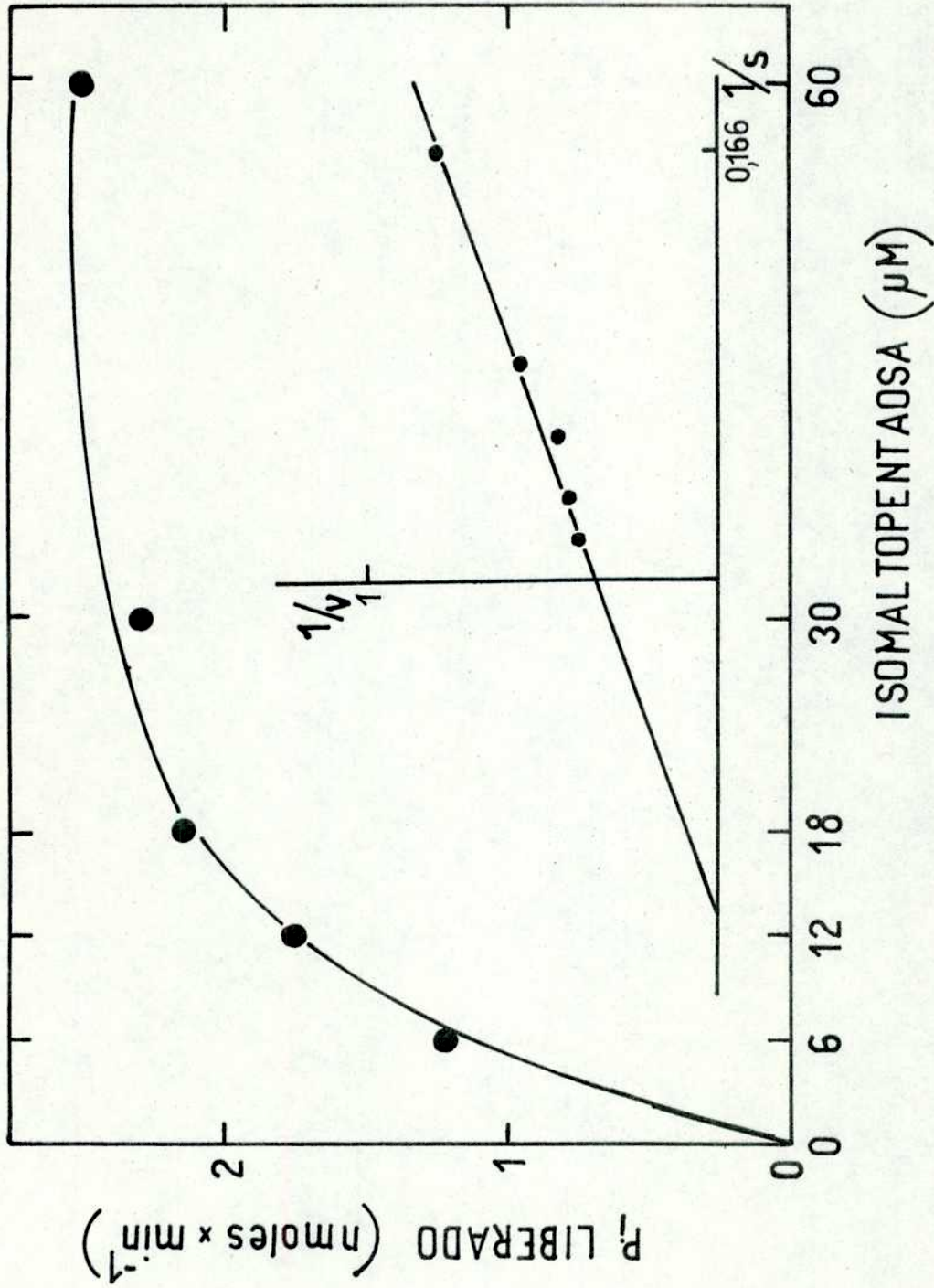


Figura 25 - Efecto de la concentración de iso-M<sub>5</sub> sobre la velocidad inicial de reacción. En el extremo inferior derecho se inserta la representación de los datos experimentales según Lineweaver-Burk (1934).

TABLA VI- Constantes cinéticas para diferentes "primers"

Los valores de  $K_m$  para los polisacáridos se expresan en grupos finales, suponiendo aproximadamente 9 % para fitoglucógeno y sus dextrinas y 4,5 % para amilopectina y su dextrina.

"Primer"	$K_m \times 10^5$ (Molaridad en grupos finales)	$V_{m\acute{a}x}$ (nmoles de $P_i$ liberados/min)
Amilopectina	0,22	18
Dextrina $\beta$ -límite de amilopectina	0,05	4,7
Fitoglucógeno	14,9	94
Dextrina $\beta$ -límite de fitoglucógeno	31,2	7,1
Dextrina $\phi$ -límite de fitoglucógeno	39,5	-
Maltotriosa	5,5	6,5
Maltotetraosa	6,7	4,9
Maltoheptaosa	0,04	5,3
Isomaltopentaosa	0,76	4,3



afinidad de los oligosacáridos aumenta con el aumento de la longitud de la cadena glucosídica desde  $M_3$  a  $M_7$ .

De igual modo, cuando se compara el fitoglucógeno con su dextrina  $\beta$ -límite o con su dextrina  $\phi$ -límite, la afinidad aumenta con el aumento en la longitud de sus ramas exteriores (Tabla VI). El efecto de las ramas exteriores sobre la afinidad parece ser bastante diferente en el caso de amilopectina y su dextrina  $\beta$ -límite. El valor del  $K_m$  para esta última es menor y resulta del mismo orden que para la  $M_7$ . Es probable que la estructura más laxa de la dextrina de amilopectina permite que todas sus ramas exteriores actúen como "primer", a pesar de las ramificaciones. La alta afinidad por iso- $M_5$  estaría a favor de esta hipótesis. Estos resultados indican que el núcleo central del polisacárido tendría una gran influencia sobre la afinidad de la enzima por las ramas exteriores.

La Tabla VII compara las constantes de Michaelis para diferentes aceptores con los datos publicados para fosforilasa de endosperma de semilla inmadura de maíz dulce y tubérculo de papa y almidón sintetasas. Los  $K_m$  de la fosforilasa de embrión de semilla germinada de maíz dulce para amilopectina, fitoglucógeno y dextrina  $\beta$ -límite de amilopectina son diferentes de los valores encontrados para la fosforilasa de endosperma de semilla inmadura de maíz dulce (Lavintman y col., 1972). La enzima de embrión tiene cuatro veces más afinidad por amilopectina que la enzima de endosperma y 18 veces más afinidad por amilopectina que la fosforilasa de tubércu-

TABLA VII- Comparación de los valores de  $K_m$  para diferentes aceptores de fosforilasas de plantas y de almidón sintetetasas

Enzima	$K_m$ (molaridad en grupos finales) x $10^5$					
	Amilo- pectina	Fitoglu- cógeno	Glucógeno animal	$M_7$	Dextrina -límite de	
					Amilopéc- tina	Fitoglu- cógeno
Fosforilasa de embrión	0,22	14,9	-	0,04	0,05	31,2
Fosforilasa de endosperma	0,85	21	110	-	0,6	20
Fosforilasa de papa	4	-	71	19	-	-
Almidón sintetasa de maíz dulce	75	110	-	-	-	-
Almidón sintetasa de papa	39	90	-	-	-	-

Los valores de  $K_m$  se expresan en frupos finales, suponiendo aproximadamente un 9 % para fitoglucógeno y un 4,5 % para amilopectina.

Los valores de  $K_m$  de fosforilasa de endosperma son de Lavintman y col., (1972); los de almidón sintetasa de maíz dulce y de fosforilasa de papa para glucógeno animal son de Frydman y Cardini (1965) y los de almidón sintetasa de papa, de Frydman y Cardini (1966). El  $K_m$  de fosforilasa de papa para amilopectina es de Brown y Cori (1961) y Lee, Y.P. (1960).

lo de papa. El  $K_m$  por fitoglucógeno de la enzima de embrión es ligeramente menor que el correspondiente  $K_m$  de la fosforilasa de endosperma.

Los valores de  $K_m$  para amilopectina como para fitoglucógeno de ambas fosforilasas de maíz dulce (embrión de semilla germinada y endosperma de semilla inmadura) son menores que los valores publicados para ambos polisacáridos aceptores, de almidón sintetasa (Frydman y Cardini, 1965; 1966).

Por otra parte, resulta de interés destacar que la afinidad de la enzima de embrión por  $M_7$  es más de 500 veces la afinidad de la fosforilasa de tubérculo de papa por el mismo oligosacárido (Tabla VII).

#### V- Inhibidores

Varios nucleótidos y nucleótidos azúcar agregados a la mezcla de incubación, inhiben la actividad fosforilásica de la isoenzima de embrión de semilla germinada de maíz dulce, como se indica en la Tabla VIII. Se encontró que el ADP-glucosa y el UDP-glucosa eran los mejores inhibidores de la actividad de fosforilasa de embrión de semilla germinada. La enzima es inhibida un 58 % por ADP-glucosa 5 mM y un 40 % por UDP-glucosa 5 mM. Estos nucleótidos azúcar se comportan cinéticamente como inhibidores del tipo no-competitivo (Figuras 26 y 27).

La enzima de endosperma inmaduro es también inhibida por ADP-glucosa, pero desde el punto de vista cinético se comporta como un inhibidor de ti-

TABLA VIII- Efecto de nucleótidos y nucleótidos-azúcar

Las condiciones son las descritas en Materiales y Métodos, incluyendo 0,12 nmoles de  $^{14}\text{C}$  Glu-1-P (42.000 cpm) en la mezcla de incubación.

La actividad en ausencia de agregados se toma igual a 100.

Agregados	Concentración mM	$^{14}\text{C}$ glucosa incorporada cpm	Actividad
	-	4.007	100
AMP	5	3.973	99,1
ADP	4,6	2.638	65,8
ATP	5	3.129	78
AMP cíclico	3,1	4.327	108
UMP	5	4.141	103
UDP	5	3.210	80,1
UTP	5	2.824	70,4
ADP-glucosa	5	1.683	42
UDP-glucosa	5	2.405	60

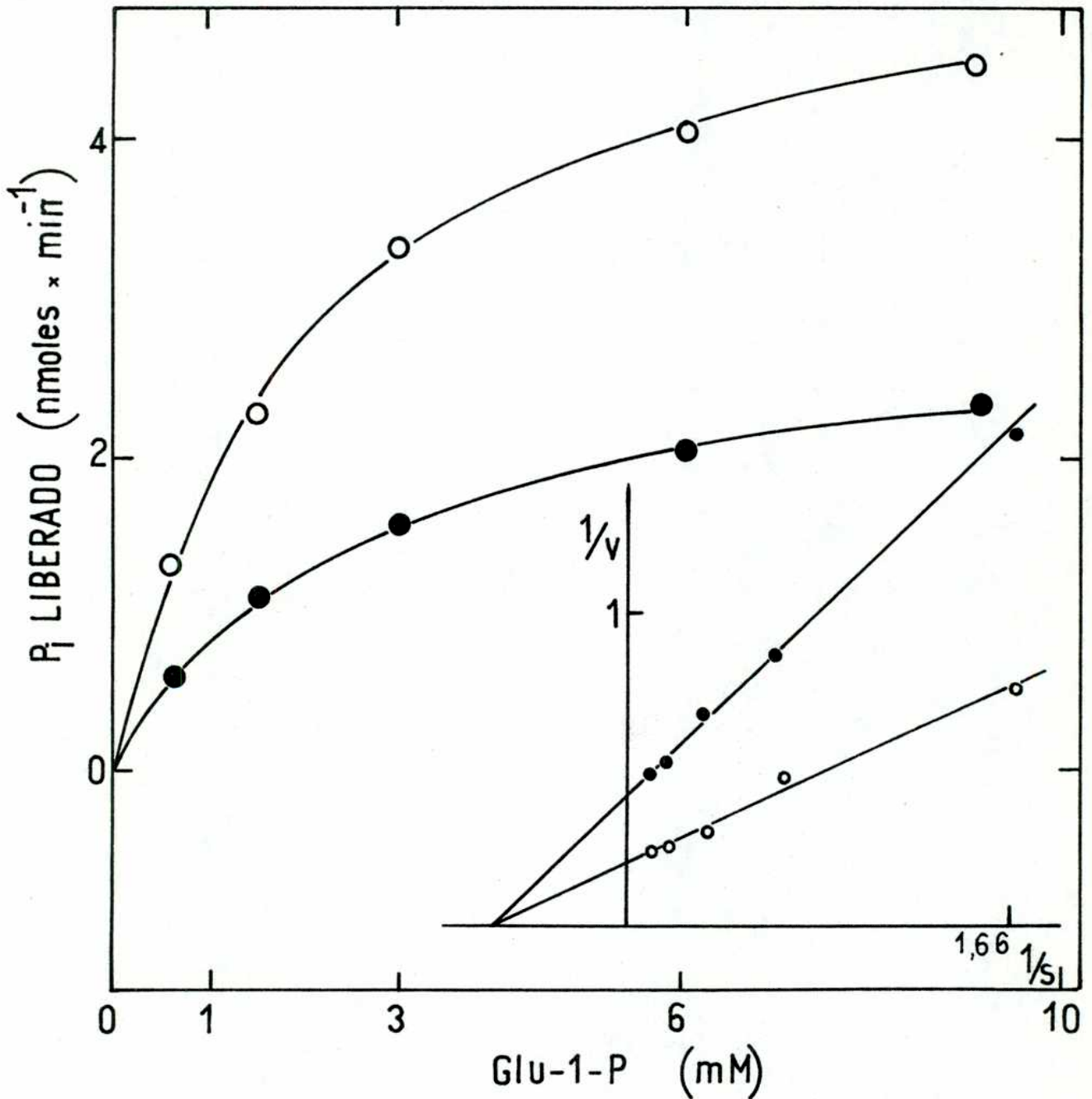
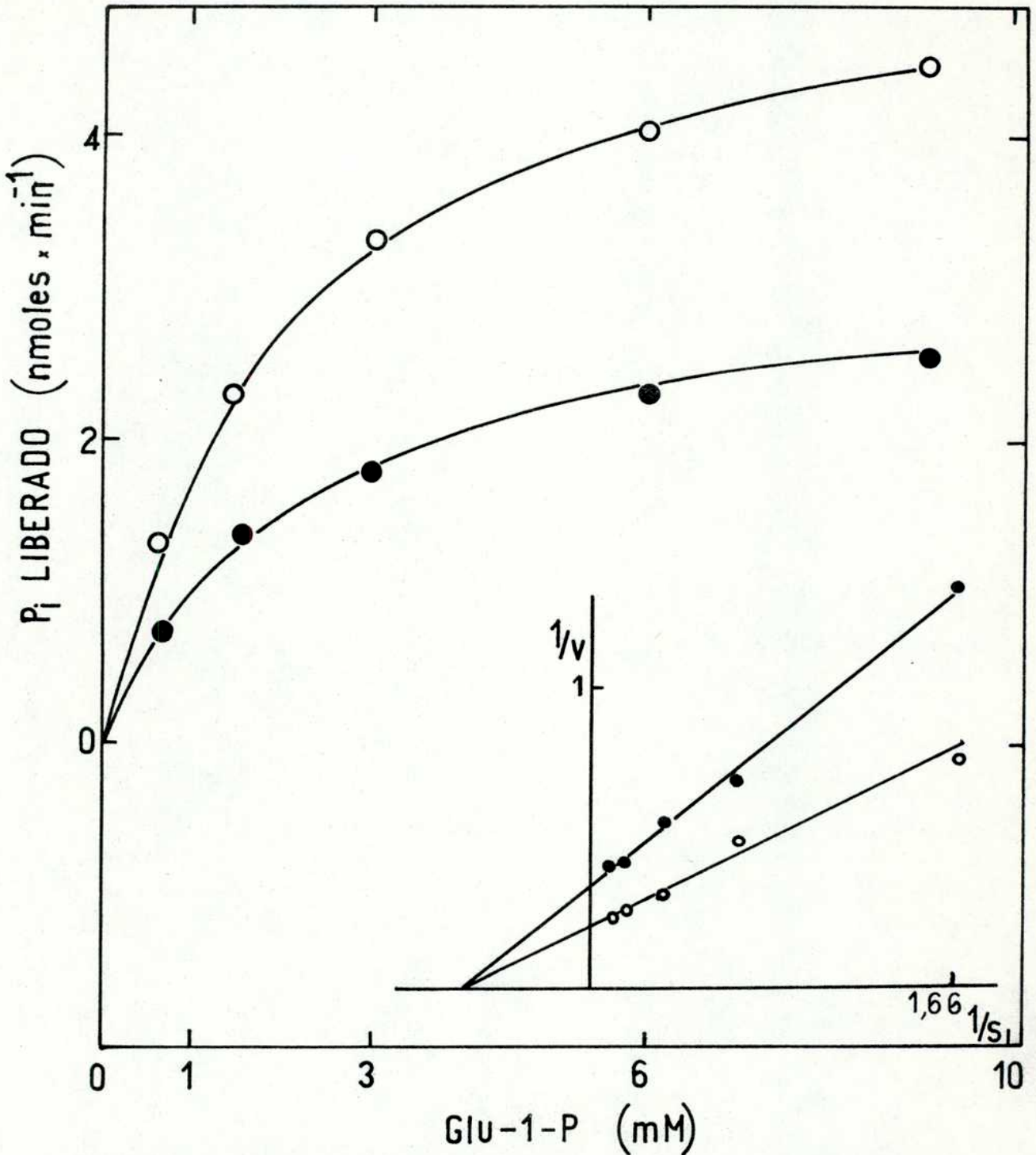


Figura 26 - Efecto de la concentración de Glu-1-P sobre la velocidad inicial de reacción en ausencia y en presencia de ADP-glucosa 5 mM. O: sin ADP-glucosa; ● : con ADP-glucosa. En el extremo inferior derecho se inserta la representación de los datos experimentales según Lineweaver-Burk (1934).



**Figura 27** - Efecto de la concentración de Glu-1-P sobre la velocidad inicial de reacción en ausencia y en presencia de UDP-glucosa 5 mM. O: sin UDP-glucosa; ●: con UDP-glucosa. En el extremo inferior derecho se inserta la representación de los datos experimentales según Lineweaver-Burk (1934).

po mixto, afectando la velocidad máxima y el  $K_m$  (Lavintman y col., 1972). Por otra parte, la enzima de endosperma de semilla inmadura es menos sensible a la inhibición por UDP-glucosa.

La fosforilasa de E.coli es también inhibida por ADP-glucosa (Tsai y Nelson, 1969b) y Madsen (1961) propuso un mecanismo regulatorio para la síntesis de glucógeno basado en la inhibición por UDP-glucosa de la fosforilasa de músculo y de Agrobacterium.

La actividad de fosforilasa de la isoenzima de embrión de semilla germinada fué también medida en presencia de cantidades crecientes de citrato de sodio en la mezcla de reacción, pues habíamos observado en ensayos previos que la actividad enzimática medida en presencia de buffer citrato era anormalmente baja. La Tabla IX muestra que la actividad enzimática disminuye marcadamente por efecto del ión citrato (unas veinte veces a una concentración de 0,15 M). Este efecto es opuesto al observado para las almidón sintetasas, tanto soluble como particulada, donde el citrato produce una activación de más del 250 % (Tabla IX). Las concentraciones de citrato usadas en este trabajo fueron mucho menores que las empleadas por Ozbun y col. (1971) para activar la almidón sintetasa de semillas de maíz waxy. En este trabajo usamos concentraciones fisiológicas de citrato (Long, C., 1961).

Ya se había demostrado que el citrato activa la enzima ramificante de maíz dulce que tiene como sustrato la amilosa (unas cinco veces a

TABLA IX- Efecto de concentración de iones citrato sobre las actividades de fosforilasa y almidón sintetasa de embrión de semilla germinada de maíz dulce

---

Concentración de ión citrato mM	Actividad de		
	Fosforilasa	Almidón sintetasa Particulada	Soluble
0	100	100	100
5	92	-	110
10	85	-	120
20	-	200	-
50	32	250	187
100	24	310	255
150	5	-	-

---

Las condiciones de ensayo de fosforilasa se describen en Materiales y Métodos. Las almidón sintetasa soluble y particulada se preparan y ensayan por los métodos descritos por Cardini y Frydman (1966). La actividad en ausencia de iones citrato se toma igual a 100.



0,15 M) (Lavintman, N., 1966). El efecto opuesto de citrato que actúa por un lado sobre la almidón sintetasa y la enzima ramificante activando y por otro lado sobre fosforilasa inhibiendo, y la inhibición de fosforilasa por ADP-glucosa (el principal sustrato de ambas almidón sintetasa, soluble y particulada), sugeriría que estos metabolitos podrían estar involucrados en un mecanismo de control de síntesis de almidón.

#### VI- Mecanismo de acción

Se estudió el mecanismo de alargamiento de las cadenas exteriores de los polisacáridos por acción de la fosforilasa de embrión de semilla de maíz dulce de tres días de germinación, según la técnica de Whelan y Bailey (1954), usando el método de Krisman (1962a) para la determinación del espectro con iodo. Se probó que con aceptores de peso molecular y estructura diferentes, la introducción de nuevas unidades de glucosa en la cadena tiene lugar a distintas velocidades. Puede ocurrir que el largo de cadena de sólo una molécula aceptora aumente mediante una molécula de fosforilasa y no haya transferencia sobre otras moléculasceptoras. En estos casos la reacción de síntesis ocurre según un mecanismo de "cadena única" (single-chain), lo que da por resultado una mezcla de cadenas de largos muy distintos. En otros casos, los largos de cadena de todas las moléculasceptoras aumentan a igual velocidad, o sea, las unidades de glucosa se transfieren a cada molécula a igual ritmo. Este mecanismo se

designa como de "cadena múltiple" (multi-chain) y da como resultado una familia de cadenas de largo homogéneo. Existen esquemas intermedios (French, D., 1961) y todos son el resultado de diversos factores, como la distinta afinidad del sustrato por la enzima o de la adsorción de la enzima al sustrato cuando éste tiene un peso molecular alto.

Hemos estudiado cuál es el tipo de alargamiento con cadenas exteriores de dos, tres y cuatro unidades de glucosa como ocurre en las dextrinas  $\phi, \beta$  de fitoglucógeno, límite de  $\beta$ -amilasa de amilopectina y de fitoglucógeno y límite de fosforilasa de fitoglucógeno, respectivamente y comparamos los resultados con los obtenidos con  $M_3$ ,  $M_4$  y  $M_7$  y con los respectivos polisacáridos normales. Ese tipo de dextrinas con cadenas cortas de no más de tres unidades pueden formarse "in vivo" por acción de la  $\beta$ -amilasa o de la enzima ramificante (Enzima Q) si ésta actúa en forma análoga a la de hígado (Verhues y Hers, 1966). La influencia de los largos de cadena sobre la afinidad en la fosforilasa de tubérculo de papa ha sido estudiada por De Souza y Cardini (1967) quienes llegaron a la conclusión que el alargamiento de cadena tiene lugar vía un mecanismo de "cadena única" en el caso de  $M_3$ , un mecanismo intermedio en el caso de  $M_4$  y uno de "cadena múltiple" en el caso de  $M_7$ . La introducción de nuevas unidades de glucosa ocurre vía un mecanismo de "cadena única" en el caso de iso-maltooligosacáridos, por uno de "cadena múltiple" en el caso de amilopectina y por un mecanismo de "cadena única" en el caso de la dextrina

$\beta$ -límite de amilopectina (De Souza y Cardini, 1967).

La fosforilasa de tubérculo de papa produce alargamientos del tipo de "cadena múltiple" sólo con "primers" eficientes como amilopectina (Whelan y Bailey, 1954). Resultados similares se obtuvieron con fosforilasa b de músculo y glucógeno como "primer" (Parodi y col., 1970). Banks y col. (1970) sugirieron que sólo algunas de las cadenas exteriores del glucógeno actúan como "primers" de fosforilasa produciendo así cadenas largas sobre la superficie molecular. Por otro lado, Lavintman y col. (1972) encuentran que para la fosforilasa de endosperma de semilla inmadura de maíz dulce el alargamiento es del tipo de "cadena múltiple" para amilopectina así como para fitoglucógeno, glucógeno y dextrinas  $\beta$ -límite de amilopectina y fitoglucógeno.

Los resultados que obtuvimos con la isoenzima de fosforilasa de embrión de semilla germinada de maíz dulce con oligosacáridos de  $M_3$ ,  $M_4$  y  $M_7$  se ilustran en las figuras 28, 29 y 30. Los datos están a favor de un esquema de alargamiento de tipo "cadena múltiple". El típico mecanismo de "cadena única" descrito para la fosforilasa de tubérculo de papa en presencia de "primers" ineficientes (Whelan y Bailey, 1954; De Souza y Cardini, 1967) no se observa en estos casos.

Los iso-maltcoligosacáridos son utilizados como sustratos a semejanza de lo que ocurre con la fosforilasa de tubérculo de papa (De Souza y Cardini, 1967), pero a diferencia de lo que ocurre con la almidón sintética de papa (Frydman y Cardini, 1966)

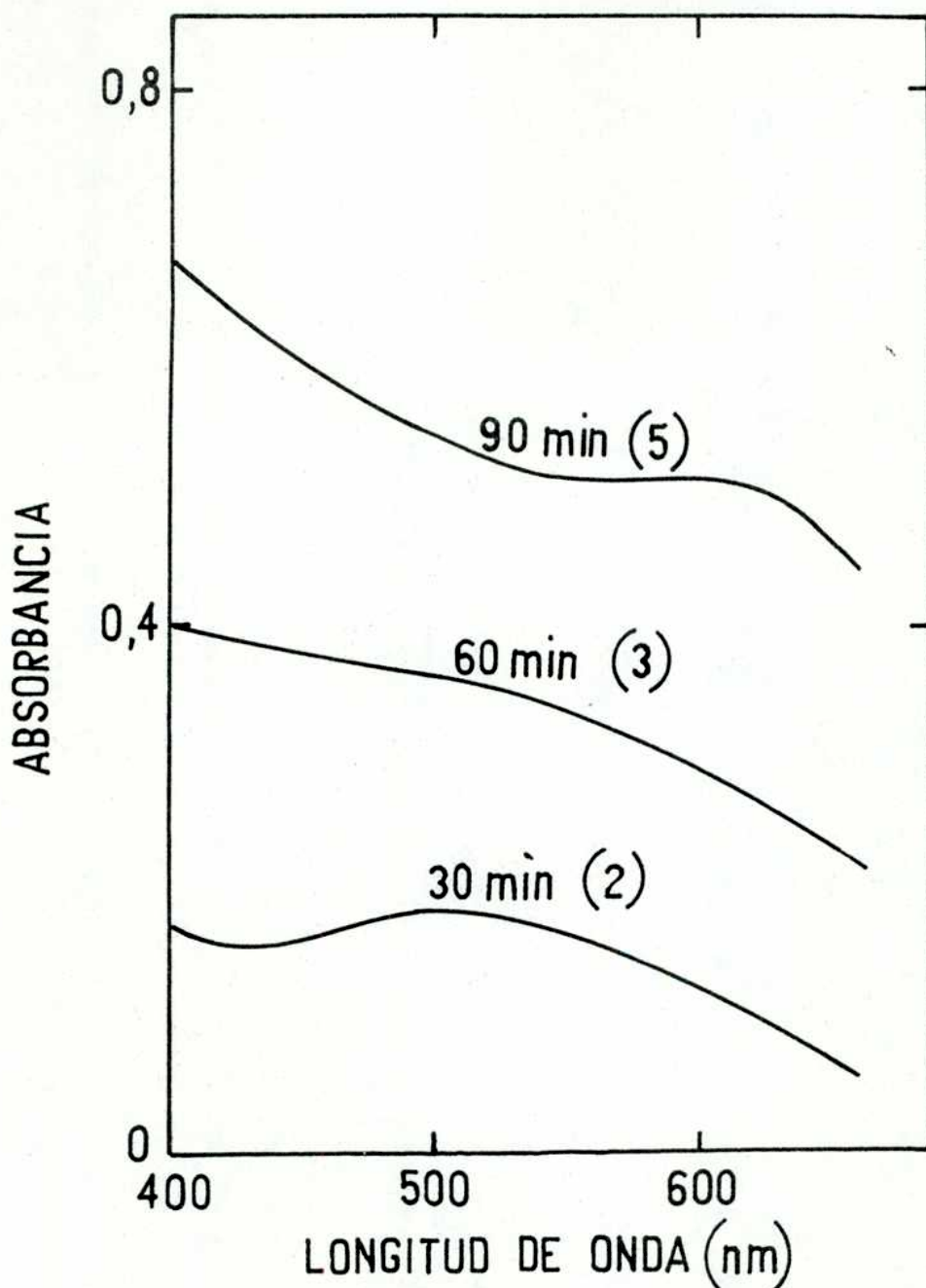


Figura 28 - Mecanismo de alargamiento. Curvas de absorbancia de los productos de la síntesis con  $M_3$  como "primer", con iodo. La mezcla de reacción standard contiene  $0,04 \mu\text{moles}$  de  $M_3$ . A los tiempos de incubación indicados en cada curva, se determinan el  $P_i$  liberado (Fiske y SubbaRow, 1925) y las curvas de absorción (Krisman, C.R., 1962a). El número de residuos de glucosa incorporados en cada caso se calcula según Whelan y Bailey (1954) y se indica entre paréntesis.

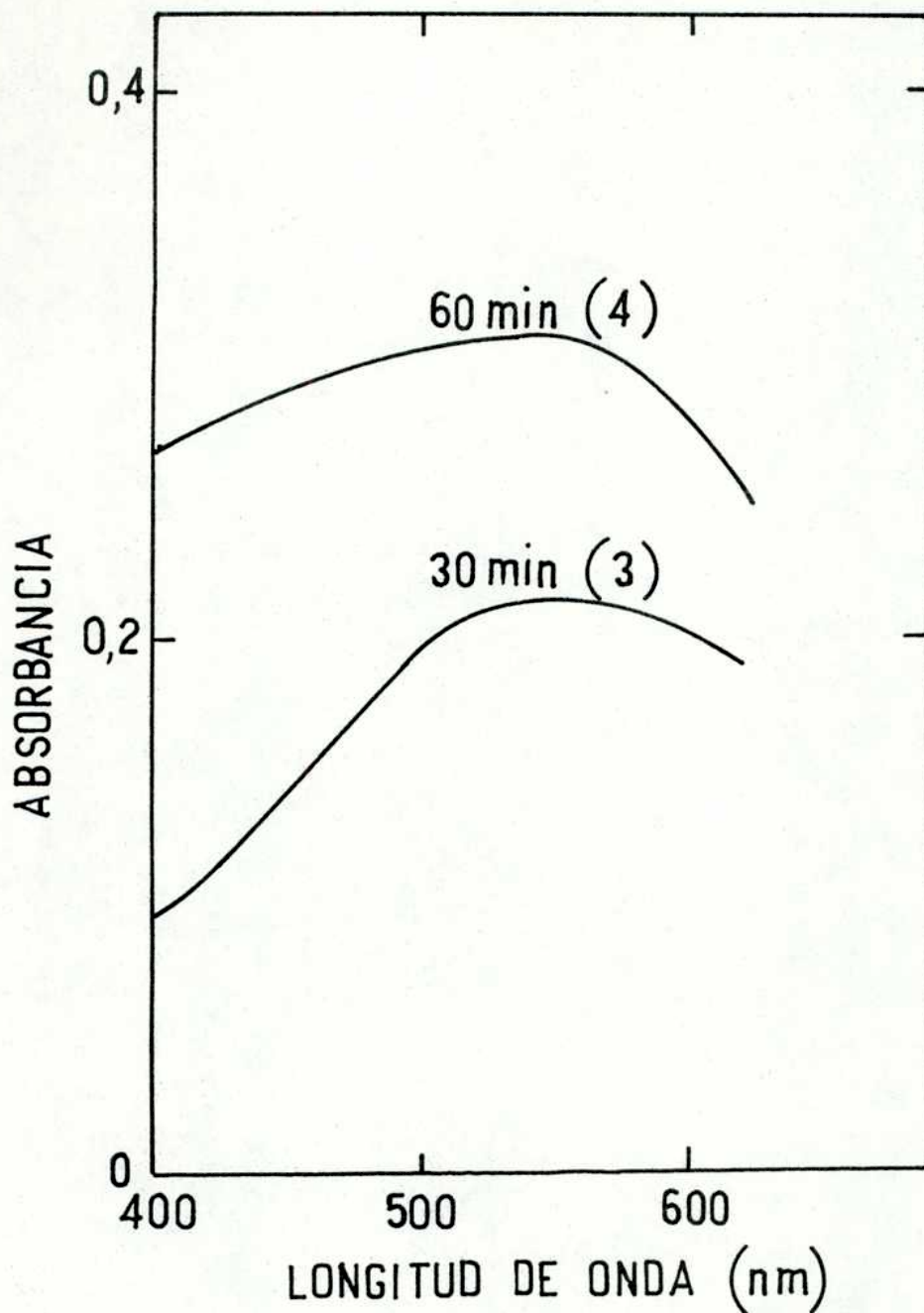


Figura 29 - Mecanismo de alargamiento. Curvas de absorción de los productos de la síntesis con  $M_4$  como "primer", con iodo. La mezcla de reacción standard contiene  $0,03 \mu\text{moles}$  de  $M_4$ . A los tiempos de incubación indicados en cada curva se determinan el  $P_i$  liberado (Fiske y SubbaRow, 1925) y las curvas de absorción (Krisman, C.R., 1962a). El número de residuos de glucosa incorporados en cada caso se calcula según Whelan y Bailey (1954) y se indica entre paréntesis.

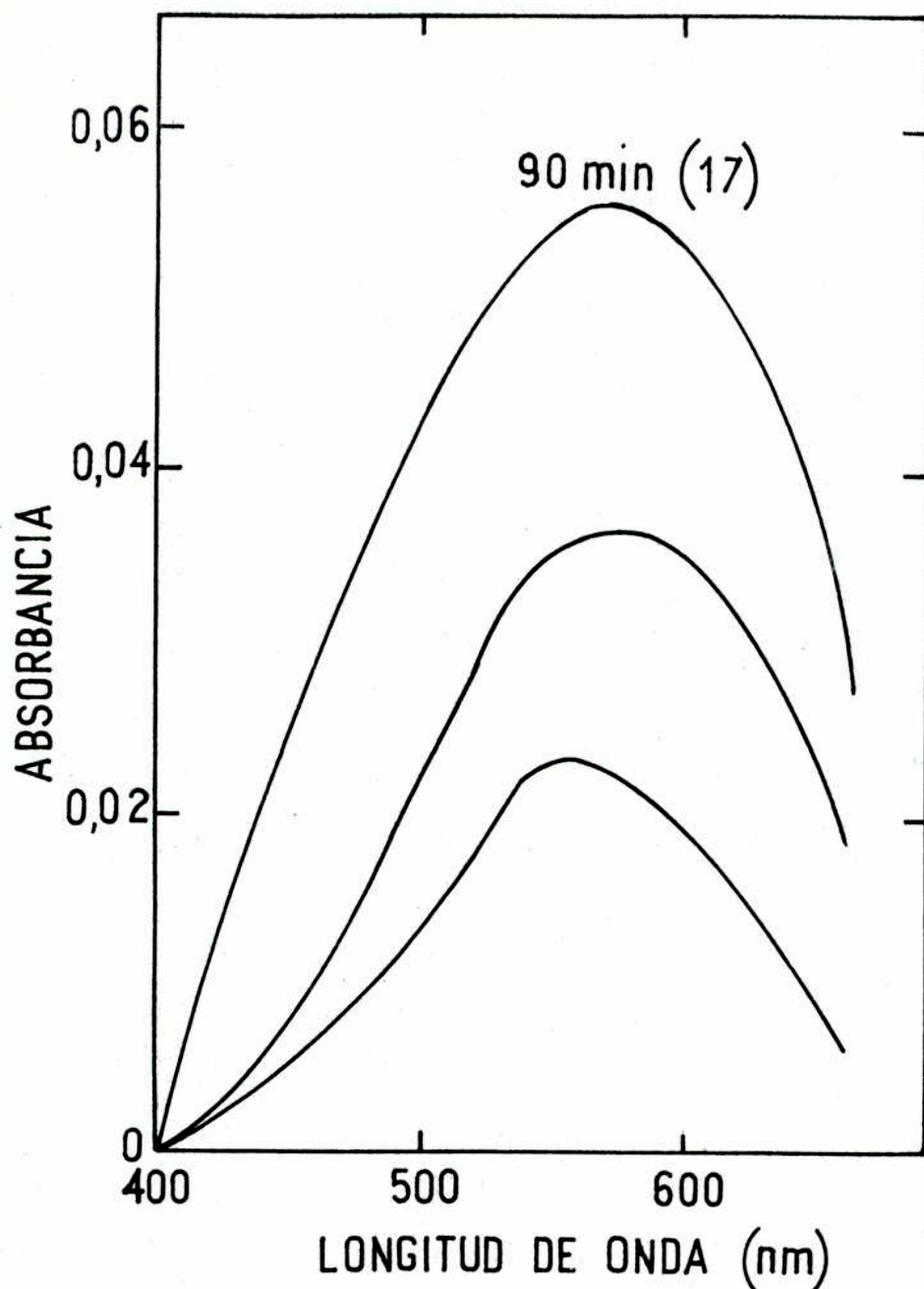


Figura 30 - Mecanismo de alargamiento. Curvas de absorción de los productos de la síntesis con  $M_7$  como "primer", con iodo. La mezcla de reacción standard contiene 7 nmoles de  $M_7$ . A los tiempos de incubación indicados en cada curva se determinan el  $P_i$  liberado (Fiske y SubbaRow, 1925) y las curvas de absorción (Krisman, C.R., 1962a). El número de residuos de glucosa incorporados en cada caso se calcula según Whelan y Bailey (1954) y se indica entre paréntesis.

La amilopectina, al igual que el fitoglucógeno dan un esquema típico de "cadena múltiple" (Figuras 31 y 32) indicando que todas las cadenas son buenos aceptores de glucosa. Del mismo modo, las dextrinas límite con largo de cadenas exteriores de 2-4 unidades como máximo (French, D., 1960) dan esquemas de "cadena múltiple" (Figuras 33, 34 y 35), iguales a los que exhiben los oligosacáridos de igual número de unidades de glucosa. Si suponemos que sólo las cadenas exteriores sean lasceptoras tendríamos para éstas y para  $M_3$ ,  $M_4$  y  $M_7$  un mismo tipo de alargamiento (Tandecarz y col., 1973).

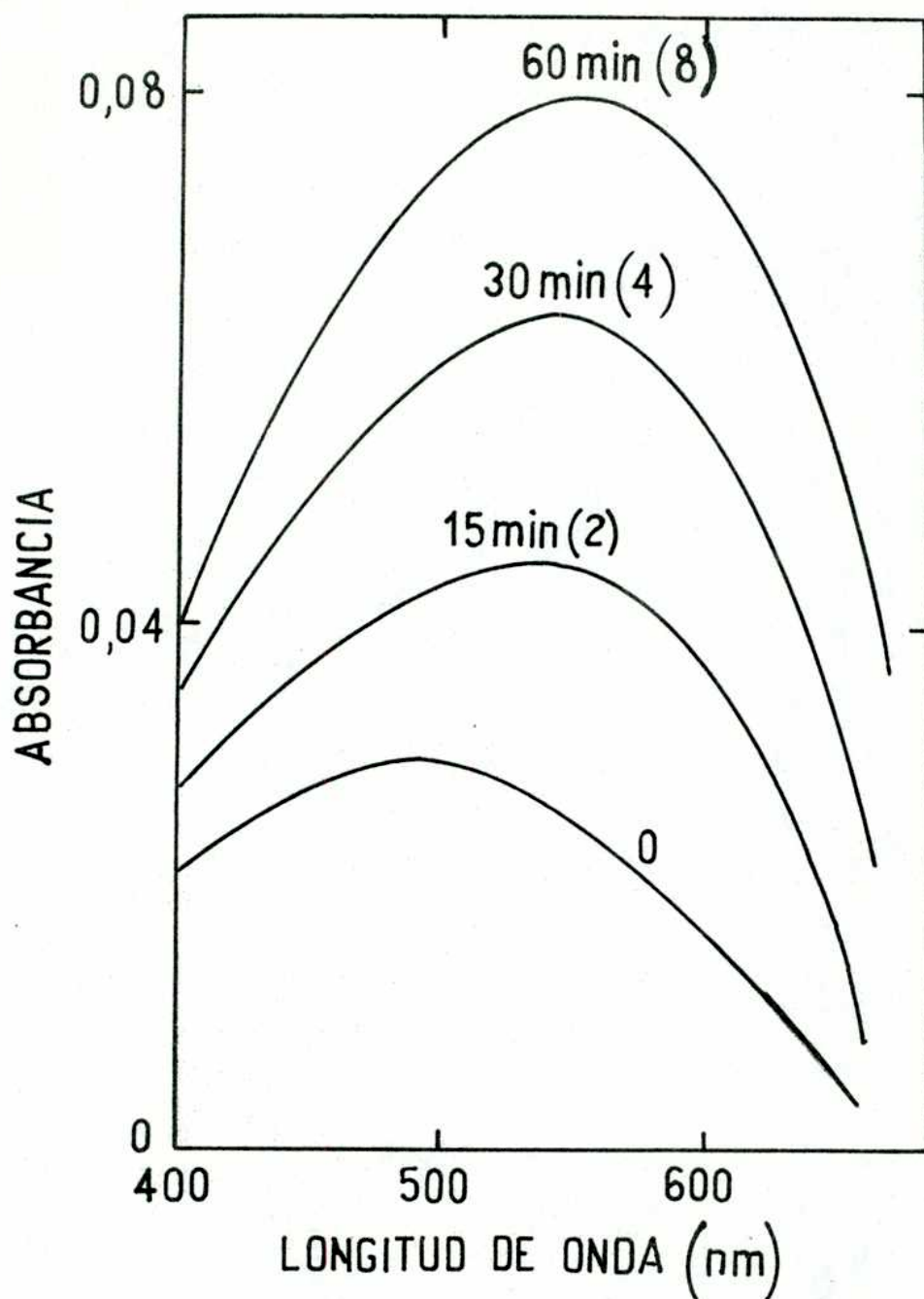


Figura 31 - Mecanismo de alargamiento. Curvas de absorción de los productos de la síntesis con amilopectina como "primer", con iodo. La mezcla de reacción standard contiene 5  $\mu$ g de amilopectina. A los tiempos de incubación indicados en cada curva, se determinan el  $P_i$  liberado (Fiske y Subbarow, 1925) y las curvas de absorción (Krisman, C.R., 1962a). El número de residuos de glucosa incorporados en cada caso se calcula según Whelan y Bailey (1954) y se indica entre paréntesis.



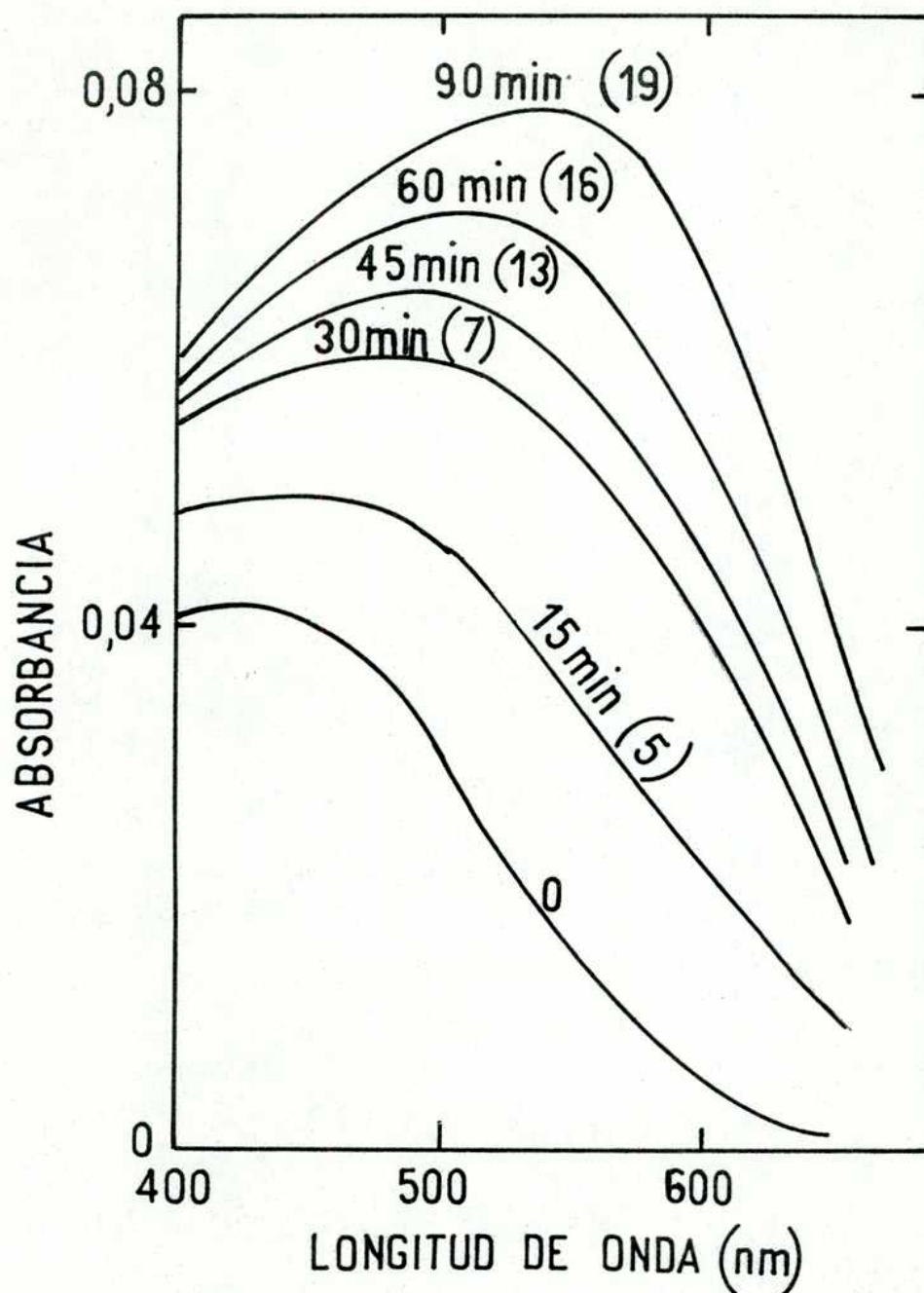


Figura 32 - Mecanismo de alargamiento. Curvas de absorción de los productos de la síntesis con fitoglucógeno como "primer", con iodo. La mezcla de reacción standard contiene 25  $\mu\text{g}$  de fitoglucógeno. A los tiempos de incubación indicados en cada curva se determinan el  $\text{P}_i$  liberado (Fiske y SubbaRow, 1925) y las curvas de absorción (Krisman, C.R., 1962a). El número de residuos de glucosa incorporados en cada caso se calcula según Whelan y Bailey (1954) y se indica entre paréntesis.

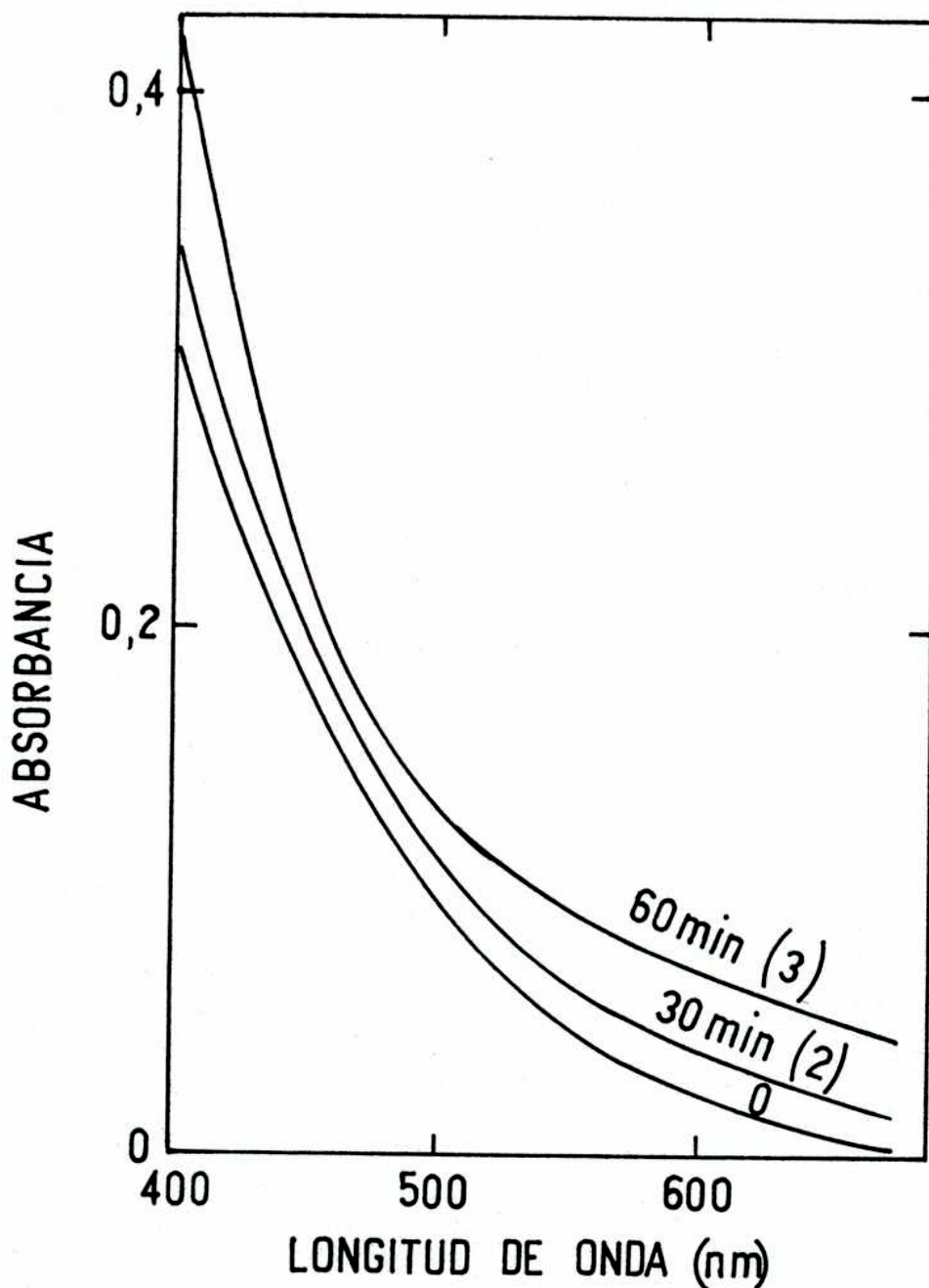


Figura 33 - Mecanismo de alargamiento. Curvas de absorción de los productos de la síntesis con la dextrina  $\beta$ -límite de fitoglucógeno como "primer", con iodo. La mezcla de reacción standard contiene 3,2  $\mu\text{g}$  de dextrina  $\beta$ -límite de fitoglucógeno. A los tiempos indicados en cada curva se determinan el  $\text{P}_i$  liberado (Fiske y SubbaRow, 1925) y las curvas de absorción (Krisman, C.R., 1962a). El número de residuos de glucosa incorporados en cada caso se calcula según Whelan y Bailey (1954) y se indica entre paréntesis.

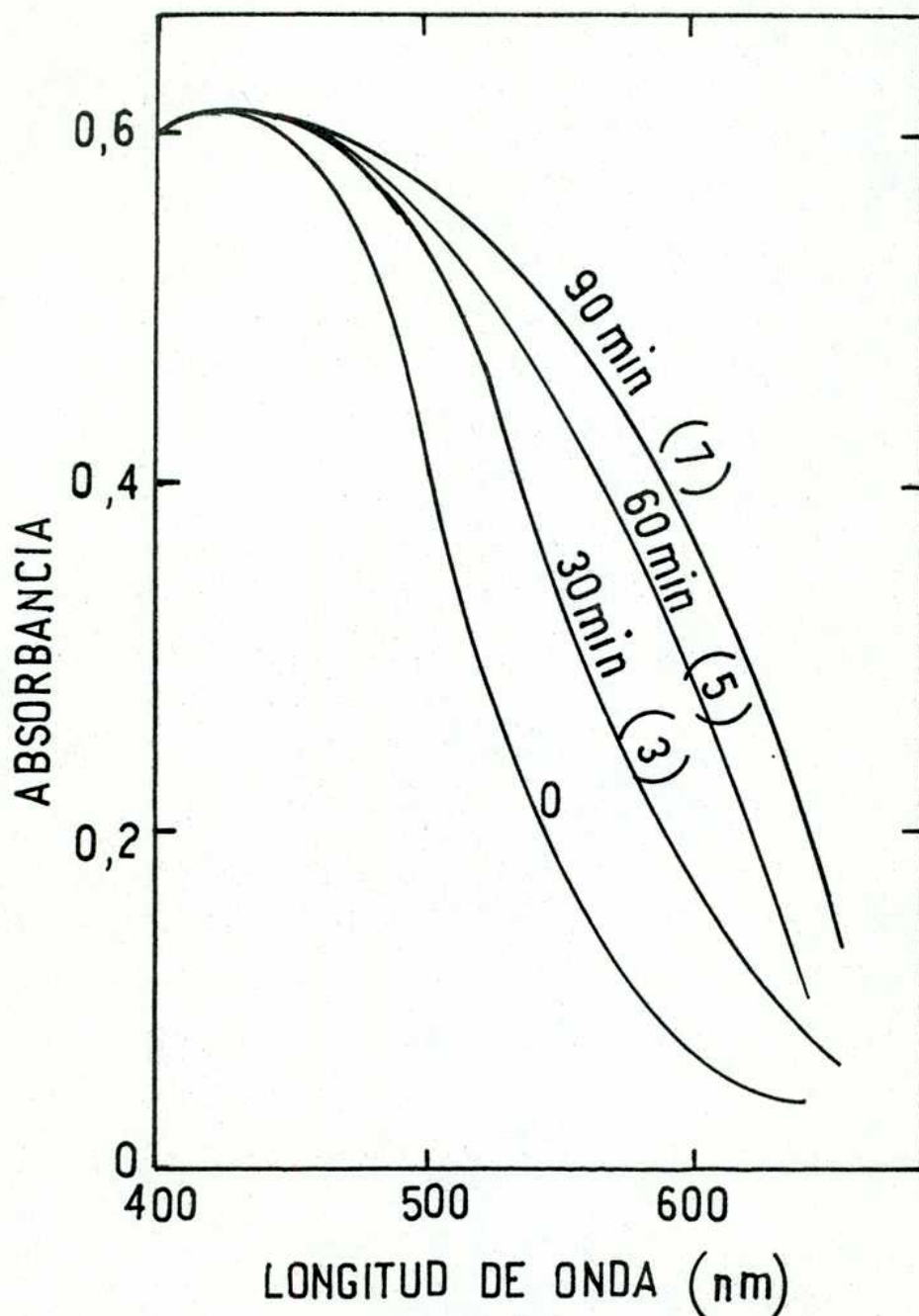


Figura 34 - Mecanismo de alargamiento. Curvas de absorción de los productos de la síntesis con la dextrina  $\phi$ -límite de fitoglucógeno como "primer", con iodo. La mezcla de reacción standard contiene 41  $\mu\text{g}$  de dextrina  $\phi$ -límite de fitoglucógeno. A los tiempos indicados en cada curva se determinan el  $\text{P}_i$  liberado (Fiske y SubbaRow, 1925) y las curvas de absorción (Krisman, C.R., 1962a). El número de residuos de glucosa incorporados en cada caso se calcula según Whelan y Bailey (1954) y se indica entre paréntesis.

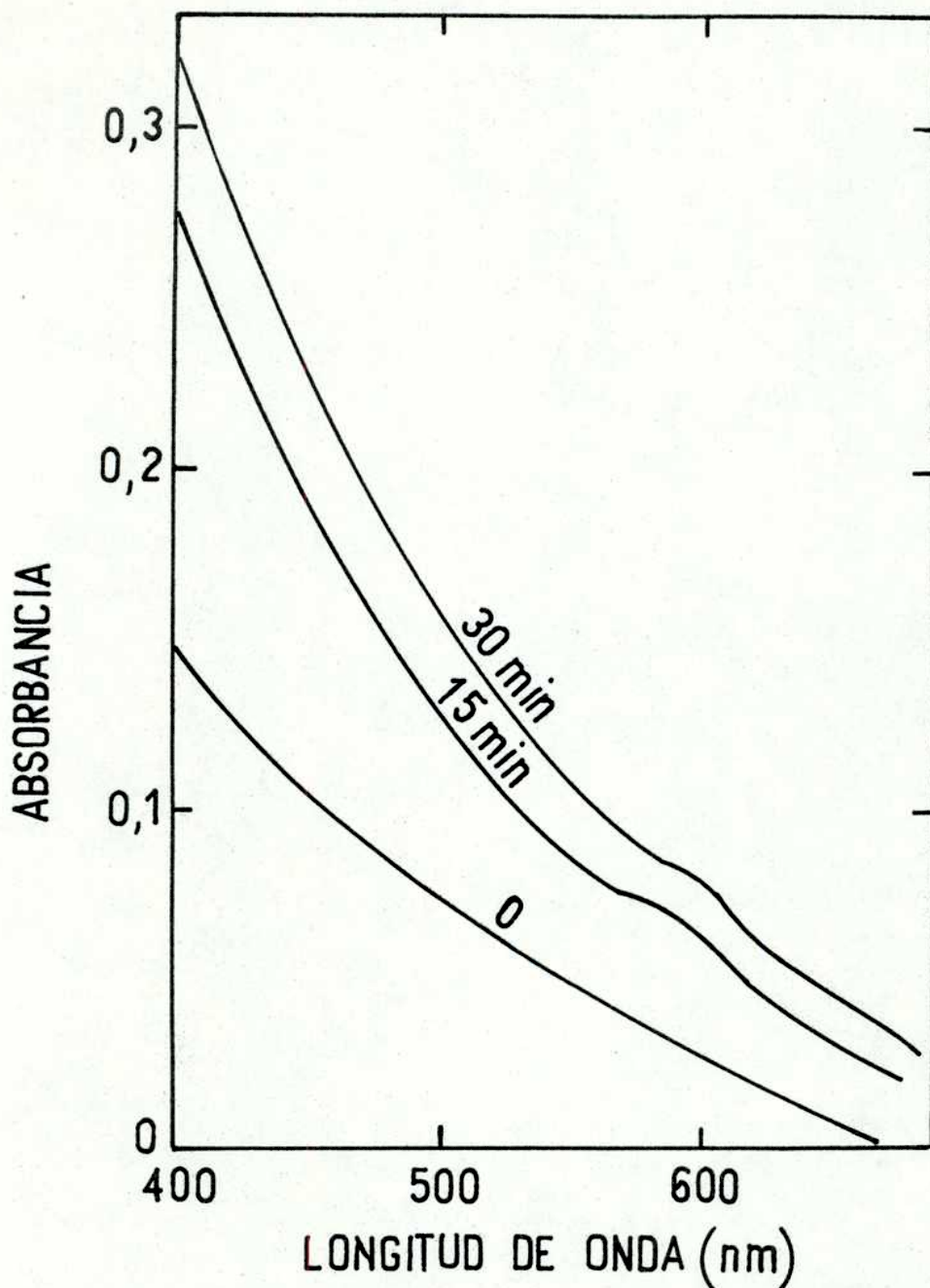


Figura 35 - Mecanismo de alargamiento. Curvas de absorción de los productos de la síntesis con dextrina  $\phi, \beta$  de fitoglucógeno como "primer", con iodo. La mezcla de reacción standard contiene 1,7  $\mu\text{g}$  de dextrina  $\phi, \beta$  de fitoglucógeno. A los tiempos indicados en cada curva se determinan el  $\text{P}_i$  liberado (Fiske y SubbaRow, 1925) y las curvas de absorción (Krisman, C.R., 1962a).

## DISCUSION

### Electroforesis en gel de poliacrilamida

Los datos presentados en este trabajo señalan que la distribución y características de las isoenzimas de fosforilasa de maíz dulce, variedad Golden Bantam, varían en los distintos estadios del desarrollo de la semilla, desde el grano al estado inmaduro hasta la semilla en germinación. La distinta distribución en endosperma y en embrión reflejaría un aspecto del metabolismo de ambos tejidos. Se conoce que tanto en el embrión como en endosperma tiene lugar una activa síntesis de proteínas y en especial de ciertas enzimas durante las primeras etapas de la germinación (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1963). Varias enzimas muestran un aumento significativo en el número y en la actividad de las isoenzimas después de tres días de germinación (Firenzuoli y col., 1968; Macko y col., 1967). Además, en el endosperma hay una activa síntesis de almidón de reserva, proceso que se revierte en la germinación. En el embrión, la mayor síntesis es la de polisacáridos estructurales con una formación transiente de almidón. La diferencia hallada en nuestro caso fué que en el grano inmaduro hay mayor número de isoenzimas de fosforilasa y éstas muestran mayor actividad en el endosperma que en el embrión, mientras que en la semilla madura y germinada sólo son observables en el embrión. El hecho de que en el endosperma en germinación desaparezca la fosforilasa confirma

el hecho conocido de que la degradación del almidón en esta fase se debe a la amilasa.

Cuando se comparan extractos crudos de semilla inmadura entera y de embrión aislado de semilla germinada, a partir del tercer día de iniciada la germinación se observa la aparición de una banda en el zimograma, cerca del cátodo e intensamente coloreada, que no tiene similar en el grano inmaduro (Figura 4). El fraccionamiento con sulfato de amonio y el análisis de las fracciones permite apreciar que esa nueva banda, aparentemente propia de la germinación, se encuentra concentrada en la fracción que precipita entre 45 y 80 % de saturación con sulfato de amonio (Figuras 7 y 8). Las isoenzimas de fosforilasa halladas tanto en grano inmaduro como en embrión de semilla germinada se comportan en forma semejante con los diversos polisacáridos usados como "primers". En cambio, las dos que aparecen en el zimograma de embrión a los tres días de germinación sólo se manifiestan en presencia de amilosa. El color marrón de esas bandas hace sospechar que en esa zona haya una superposición de fosforilasa y enzima ramificante. Ensayos en busca de enzima ramificante, por incubación de los geles con amilosa, pero en ausencia de Glu-1-P fueron negativos, es decir que no aparecen bandas que por coloración con iodo den color púrpura. Podría ser que la enzima ramificante actúe más rápidamente sobre una cadena en crecimiento que sobre una cadena de una molécula pre-existente de amilosa. Otra posibilidad es que ambas enzimas, fosforilasa y enzima ramificante estén presentes

en esas zonas como complejo enzimático.

Sobre la existencia de isoenzimas de fosforilasa hay varios trabajos. Fekete (1968) encontró dos fosforilasas de diferentes propiedades en *Spinacia oleracea* y en cotiledones de *Vicia faba*. Las dos fosforilasas electroforéticamente distinguibles encontradas por Fredrick (1963; 1967) en *Oscillatoria* podrían estar relacionadas como lo están las fosforilasas a y b de músculo en mamíferos, ya que la fosforilasa de alga de mayor movilidad ( $a_2$ ) requiere AMP y  $Mn^{+2}$ . Davis y col. (1967) mostraron la existencia de tres isoenzimas de fosforilasa b,  $I^b$ ,  $II^b$  y  $III^b$  en extractos de corazón de conejo, observables por electroforesis en gel de poliacrilamida. Cada una de estas formas b se puede convertir a la correspondiente forma a por incubación con fosforilasa quinasa y ATP. Así, las mismas observaciones que se hicieron para fosforilasa se han hecho para otras enzimas, como piruvato quinasa (Koler y col., 1964) y lactato deshidrogenasas (Wilson y col., 1964). Es posible el aislamiento de diferentes isoenzimas capaces de catalizar la misma reacción, en organismos superiores en determinado estadio del desarrollo. En algunos casos, una determinada enzima puede estar confinada en un tejido u órgano particular como ocurre con la piruvato quinasa, o varias formas moleculares de una enzima pueden coexistir como en el caso de fosforilasas o lactato deshidrogenasas. Esta especialización fisiológica y genética ha surgido presumiblemente en el curso de la evolución para proveer a un tejido u órgano con una enzima adaptada

para funcionar en óptimas condiciones en ese microambiente. Las fosforilasas I y IV de semillas de maíz normal (Tsai y Nelson, 1969b) representan otro caso de isoenzimas presentes en diferentes tejidos. La primera está presente sólo en endosperma a través de todas las etapas del desarrollo y durante la germinación de la semilla. Por otra parte, la fosforilasa IV está presente sólo en embrión durante el desarrollo y la germinación.

La isoenzima de fosforilasa que encontramos en este trabajo parece ser característica de la germinación y su localización en el embrión sugiere su intervención en el metabolismo del almidón propio de ese tejido.

#### Purificación parcial de la isoenzima de fosforilasa de embrión de semilla germinada

Al pasar el eluido activo de Sephadex G-25 por la columna de DEAE-celulosa se obtiene una fracción con actividad fosforilásica que tiene una actividad específica de 10 nmoles por minuto por mg de proteína. Este valor es unas quince veces más alto que el que se obtiene del eluido de Sephadex G-25. Además, es interesante el hecho que la actividad total aumenta dos veces (Tabla IV), lo que indicaría la posible existencia en el extracto crudo de un inhibidor de la isoenzima, que se eluye separadamente luego del pasaje por la columna de DEAE-celulosa o queda retenido sobre la misma, requiriendo una concentración salina mayor para ser eluido. La evidencia de un sistema inhibidor compuesto por dos factores ha sido presentada en maíz para la alcohol deshidrogenasa (Efron y Schwartz, 1968).



La electroforesis en gel de poliacrilamida de la fracción correspondiente al pico de elución de la columna de DEAE-celulosa (Figura 9) (máximo de actividad), revela que la actividad de fosforilasa está asociada con una única banda (isoenzima) ubicada muy cerca del extremo catódico (Figura 10).

### Cinética

No encontramos actividad de fosforilasa en ausencia de "primer". Todas las isoenzimas de maíz dulce requieren "primer" para su actividad.

Examinamos la capacidad de la maltosa para servir de "primer" ya que se encontró que una de las isoenzimas de fosforilasa de maíz normal utiliza maltosa como "primer" (Tsai y Nelson, 1969a). Como la maltosa comercial puede estar contaminada con  $M_3$ , purificamos el material como se describe en *Materiales y Métodos*. La maltosa purificada nos dió resultados negativos durante el curso de nuestros experimentos, y concluimos que la maltosa no es "primer" para la isoenzima de fosforilasa de embrión de semilla germinada. La  $M_3$  probó ser el "primer" de cadena glucosídica más corta que sirve de aceptor. Un resultado similar se encontró con la fosforilasa de tubérculo de papa (Whelan y Bailey, 1954).

La enzima tiene gran afinidad por amilopectina y su dextrina  $\beta$ -límite, una menor afinidad por fitoglucógeno y una más baja aún por las dextrinas  $\phi$ - y  $\beta$ - de fitoglucógeno.

En general, los  $K_m$  para los maltooligosacáridos de residuos de glucosa de igual número que las ramas exteriores de los polisacáridos, son menores que los  $K_m$  correspondientes a estos últimos. La única excepción es la que constituye la  $\beta$ -dextrina de amilopeptina, que ya comentamos en Resultados. Resulta evidente, en consecuencia, la importancia del núcleo central del polisacárido sobre la afinidad de la isoenzima de fosforilasa de embrión en la reacción de alargamiento de las ramas exteriores.

Si consideramos la misma concentración en peso (Tabla V), el fitoglucógeno resulta el mejor aceptor. Esto puede ser debido a la mayor proporción de extremos no reductores.

No encontramos ninguna isoenzima de fosforilasa específica para un determinado aceptor.

### Inhibidores

En contraste con los resultados de Tsai y Nelson (1968; 1969a), no encontramos inhibición por ATP muy notable. Ensayamos también interconversión de enzimas con ATP,  $Mg^{+2}$  y fosforilasa b quinasa de músculo, con resultados negativos. Nuestros datos señalan que el ADP-glucosa, y en menor escala el UDP-glucosa son inhibidores no-competitivos de la isoenzima de embrión (Figuras 26 y 27). Esta inhibición de la fosforilasa por ambos nucleósidos difosfato podría ser un fenómeno regulatorio importante "in vivo", y es similar a la inhibición por UDP-glucosa observada en fosforilasas de músculo de

conejo (Madsen, N.B., 1961), *Agrobacterium* (Madsen, N.B., 1961) y *Neurospora* (Shepherd y Segel, 1969).

Otro efecto notable es el producido por citrato (Tabla IX). El efecto inhibitorio ejercido a concentraciones fisiológicas es opuesto al efecto activador sobre ambas almidón sintetasas, la soluble y la particulada.

El hecho de que la isoenzima de fosforilasa de embrión de semilla germinada de maíz dulce parece estar regulada por los sustratos de ambas almidón sintetasas y por citrato (Tabla IX) indicaría probablemente que la fosforilasa activa está lejos, espacial y temporalmente, de las almidón sintetasas activas.

#### Mecanismo de acción

Sobre la base de la medición de los espectros con iodo, concluimos que el alargamiento de las cadenas glucosídicas ocurre a través de un mecanismo de "cadena múltiple" con los oligosacáridos ensayados ( $M_3$ ,  $M_4$  y  $M_7$ ). El mismo tipo de mecanismo fué encontrado para amilopectina, fitoglucógeno y las dextrinas de ambos polisacáridos. Estos resultados indicarían que en el mecanismo de alargamiento de las cadenas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) no influye el núcleo central del polisacárido.

### CONCLUSIONES

Los datos experimentales presentados en esta tesis permiten extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- La semilla inmadura de maíz dulce, variedad Golden Bantam presenta varias isoenzimas de fosforilasa. El número de estas isoenzimas es mayor en endosperma que en embrión.
- 2.- En semilla madura o germinada sólo se observan isoenzimas de fosforilasa en el embrión.
- 3.- Existe en el embrión de semilla de tres días de germinación una isoenzima de fosforilasa diferente a las fosforilasas descritas hasta el presente. Esta isoenzima, que se encuentra localizada exclusivamente en tejido embrionario de semilla de maíz dulce en germinación, no se observa ni en el embrión ni en el endosperma de semilla inmadura o madura.
- 4.- Esta isoenzima precipita a altas concentraciones de sulfato de amonio (por encima de 45 % de saturación).
- 5.- La isoenzima de embrión de semilla de tres días de germinación no se adsorbe sobre DEAE-celulosa ni sobre DEAE-Sephadex A-50. Se eluye con las primeras fracciones que salen de la columna.
- 6.- El  $K_m$  para Glu-1-P es 1,77 mM, mientras que el de la fosforilasa IV de embrión de semilla de maíz normal es 1 mM (Tsai y Nelson, 1969b).

- 7.- El núcleo central de los polisacáridos influye en la afinidad de la isoenzima de fosforilasa de embrión por sus sustratos "primer".
- 8.- La inhibición de la isoenzima de embrión por los sustratos de ambas almidón sintetasas (soluble y particulada), y por citrato, que es activador a su vez de enzima ramificante y de almidón sintetasas, apuntan a la idea de que estos metabolitos desempeñan un rol en el mecanismo de control de la síntesis de los polisacáridos constituyentes del almidón.
- 9.- El mecanismo de alargamiento de las ramas exteriores de los diferentes "primers" ensayados es del tipo de "cadena múltiple".
- 10.- El núcleo central de los polisacáridos no influye en el tipo de mecanismo de alargamiento de las cadenas glucosídicas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4).

*C. G. ...*

BIBLIOGRAFIA

- Akatsuka, T. y Nelson, O.E. (1966) J. Biol. Chem. 241, 2280
- Alam, S.S. y Hemming, F.N. (1973) Phytochemistry 12, 1641
- Bailey, J.M., Whelan, W.J. y Peat, S. (1950) J. Chem. Soc. 3692
- Banks, W., Greenwood, C.T. y Khan, J.M. (1970) Die Stärke 22, 333
- Banks, W., Geddes, R., Greenwood, C.T. y Jones, I.G. (1972) Die Stärke 24, 245
- Brown, D.H. y Cori, C.F. (1961) en: The Enzymes (2a. edición) (Boyer, P.D., Lardy, H. y Myrbäck, K., eds.), Academic Press, Nueva York, vol. 5, pág. 207
- Cardini, C.E. y Frydman, R.B. (1966) Methods Enzymol. 8, 387
- Cori, C.F., Colowick, S.P. y Cori, C.T. (1937) J. Biol. Chem. 121, 465
- Cori, C.F., Cori, G.T. y Green, A.A. (1943) J. Biol. Chem. 151, 39
- Cori, G.T., Illingworth, B. y Keller, P.J. (1955) Methods Enzymol. 1, 200
- Creech, R.G. (1965) Genetics 52, 1175
- Davis, B.J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404
- Davis, C.H., Schliselfeld, L.H., Wolf, D.P., Leavitt, C.A. y Krebs, E.G. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4824
- De Souza, B.C. y Cardini, C.E. (1967) Anales Asoc. Quím. Argentina 55, 271
- Drummond, G.S., Smith, E.E. y Whelan, W.J. (1972) Eur. J. Biochem. 26, 168
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. (1956) Anal. Chem. 28, 350
- Duncan, W.A.M. y Manners, D.J. (1958) Biochem. J. 69, 343

- Edelman, J., Shibko, S.I. y Keys, A.J. (1959) *J. Exp. Bot.* 10, 178
- Efron, Y. y Schwartz, D. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61, 586
- Evers, A.D. y McDermott, E.E. (1970) *Die Stärke* 22, 23
- Fekote, M.A.R. de (1968) *Planta* 79, 208
- Firenzuoli, A.M., Vanni, P. y Baccari, V. (1968) *Plant Physiol.* 43, 260
- Fiske, C.H. y SubbaRow, J. (1925) *J. Biol. Chem.* 66, 375
- Fredrick, J.F. (1963) *Phytochemistry* 2, 413
- Fredrick, J.F. (1967) *Phytochemistry* 6, 1041
- Fredrick, J.F. (1971) *Physiol. Plantarum* 25, 32
- French, D. (1960) en: *The Enzymes* (2a. edición) vol. 4A (Boyer, P.D., Lardy, H. y Myrbäck, K., eds.), Academic Press, Nueva York y Londres, pág. 345
- French, D. (1961) *Nature* 190, 445
- French, D. y Wild, G.M. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75, 4990
- Frydman, R.B. y Cardini, C.E. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 96, 294
- Frydman, R.B. y Cardini, C.E. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 116, 9
- Frydman, R.B. y Cardini, C.E. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 312
- Gilbert, L.M., Gilbert, G.A. y Spragg, S.P. (1964) en: *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Whistler, R.L., ed.), vol. IV, Academic Press, Nueva York y Londres, pág. 25
- Green, D.E. y Stumpf, P.K. (1942) *J. Biol. Chem.* 142, 355
- Greenwood, C.T. (1956) *Adv. Carbohydr. Chem.* 11, 335
- Greenwood, C.T. y Das Gupta, P.C. (1958a) *J. Chem. Soc.* 707

- Greenwood, C.T. y Das Gupta, P.C. (1958b) *J. Chem. Soc.* 703
- Gunja-Smith, Z., Marshall, J.J., Mercier, C., Smith, E.E. y Whelan, W.J.  
(1970) *FEBS Lett.* 12, 101
- Hanes, C.S. (1940) *Proc. Roy. Soc. London B* 128, 421
- Hawker, J.S., Ozbun, J.L. y Preiss, J. (1972) *Phytochemistry* 11, 1287
- Illingworth, B., Brown, D.H. y Cori, C.F. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
47, 469
- Jones, F.T. y Bean, M.M. (1972) *Microscope* 20, 333
- Kjolberg, O. y Manners, D.J. (1963) *Biochem. J.* 86, 258
- Koler, R.D., Bigley, R.H., Jones, R.T., Riggs, D.A., Vanbellinchen, P. y  
Thompson, P. (1964) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 29, 213
- Krisman, C.R. (1962a) *Anal. Biochem.* 4, 17
- Krisman, C.R. (1962b) *Biochim. Biophys. Acta* 65, 307
- Krisman, C.R. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 1206
- Krisman, C.R. y Barengo, R. (1975) *Eur. J. Biochem.* 52, 117
- Larner, J. (1953) *J. Biol. Chem.* 202, 491
- Lavintman, N. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 116, 1
- Lavintman, N., Tandecarz, J.S. y Cardini, C.E. (1972) *Anales Asoc. Quím.*  
*Argentina* 60, 163
- Lavintman, N. y Cardini, C.E. (1972) en: *Biochemistry of the Glycosydic  
Linkage* (Piras, R. y Pontis, H.G., eds.), Academic Press, Nueva York,  
pág. 503



- Lavintman, N. y Cardini, C.E. (1973) FEBS Lett. 29, 43
- Lavintman, N., Tandecarz, J.S., Carceller, M., Mendiara, S. y Cardini, C.E.  
(1974) Eur. J. Biochem. 50, 145
- Lee, Y.P. (1960) Biochim. Biophys. Acta 43, 18
- Lee, E.Y., Carter, J.H., Nielsen, L.D. y Fischer, E.H. (1970) Biochemistry  
9, 2347
- Lee, E.Y.C., Marshall, J.J. y Whelan, W.J. (1971) Arch. Biochem. Biophys.  
143, 365
- Lehrfeld, J. (1971) Carbohydr. Res. 19, 400
- Leloir, L.F. y Cardini, C.E. (1957) J. Am. Chem. Soc. 79, 6340
- Leloir, L.F., Fekete, M.A.R. de y Cardini, C.E. (1961) J. Biol. Chem. 236,  
636
- Leloir, L.F., Parodi, A.J. y Behrens, N.H. (1971) Revta. Soc. Argen. Biol.  
47, 108
- Lineweaver, H. y Burk, D. (1934) J. Am. Chem. Soc. 56, 658
- Long, C. (Ed.) (1961) Biochemists' Handbook, Spon, Londres, pág. 958
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) J. Biol.  
Chem. 193, 265
- Macko, V., Honold, G.R. y Stahmann, M.A. (1967) Phytochemistry 6, 465
- Madsen, N.B. (1961) Biochim. Biophys. Res. Commun. 6, 310
- Manners, D.J. (1973) en: Phytochemistry, vol. 1 (Miller, L.P., ed.) Van  
Nostrand Reinhold, Nueva York, pág. 176

- Mayer, A.M. y Poljakoff-Mayber, A. (1963) en: The germination of seeds,  
Pergamon Press, Oxford, pág 101
- Meyer, K.H. y Fuld, M. (1949) *Helv. Chim. Acta* 32, 757
- Ornstein, L. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 321
- Ozbun, J.L., Hawker, J.S. y Preiss, J. (1971) *Plant Physiol.* 48, 765
- Ozbun, J.L., Hawker, J.S. y Preiss, J. (1972) *Biochem. J.* 126, 953
- Parodi, A.J., Mordoh, J., Krisman, C.R. y Leloir, L.F. (1970) *Eur. J.*  
*Biochem.* 16, 499
- Parrish, F.W. y Whelan, W.J. (1961) *Die Stärke* 13, 231
- Peat, S., Whelan, W.J. y Bailey, J.M. (1953) *J. Chem. Soc.* 1422
- Peat, S., Whelan, W.J. y Turvey, J.R. (1956) *J. Chem. Soc.* 2317
- Perdon, A.A., Del Rosario, E.J. y Juliano, B.O. (1975) *Phytochemistry* 14, 949
- Preiss, J., Lammel, C. y Sabraw, A. (1971) *Plant Physiol.* 47, 104
- Recondo, E. y Leloir, L.F. (1961) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6, 85
- Rinderknecht, H., Wilding, P. y Haverback, B.J. (1967) *Experientia* 23, 805
- Salamini, F., Tsai, C.Y. y Nelson, O.E. (1972) *Plant Physiol.* 50, 256
- Schiefer, S., Lee, E.Y.C. y Whelan, W.J. (1973) *FEBS Lett.* 30, 129
- Shannon, J.C. y Creech, R.G. (1973) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 210, 279
- Shepherd, D. y Segel, I.W. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 131, 609
- Slabnik, E. y Frydman, R.B. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 709
- Somogyi, M. (1952) *J. Biol. Chem.* 195, 19
- Tandecarz, J.S., Lavintman, N. y Cardini, C.E. (1973) *Carbohydr. Res.* 26, 385

Tandecarz, J.S., Lavintman, N. y Cardini, C.E. (1975) Biochim. Biophys.

Acta 399, 345

Trevelyan, W.E., Procter, D.P. y Harrison, J.S. (1950) Nature 166, 444

Tsai, C.Y. y Nelson, C.E. (1968) Plant Physiol. 43, 103

Tsai, C.Y. y Nelson, O.E. (1969a) Plant Physiol. 44, 159

Tsai, C.Y. y Nelson, O.E. (1969b) Genetics 61, 813

Verhue, W. y Hers, H.G. (1966) Biochem. J. 92, 222

Villemez, C.I., Swanson, A.L. y Hassid, W.Z. (1966) Arch. Biochem. Biophys.

116, 446

Whelan, W.J. (1958) en: Encyclopaedia of Plant Physiology (Ruhland, W., ed.),

Springer verlag, Berlín, vol. 6, pág. 154

Whelan, W.J. (1964) en: Methods in Carbohydrate Chemistry (Whistler, R.L.,

ed.), Academic Press, Nueva York, vol. IV, pág. 261

Whelan, W.J. (1971) Biochem. J. 122, 609

Whelan, W.J. y Bailey, J.M. (1954) Biochem. J. 58, 560

Wilnauer, L.P., Senti, F.R. y Stern, M.D. (1955) J. Polymer Sci. 16, 1

Wilson, A.C., Kaplan, N.O., Levine, L., Pesce, A., Reichlin, M. y Allison,

W.S. (1964) Fed. Proc. 23, 1258

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Stuenkel', written in a cursive style. The signature is underlined.