

## Tesis de Posgrado

# Estudio de las propiedades de la sacarosa fosfato sintetasa de germen de trigo

Salerno, Graciela L.

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:**

Salerno, Graciela L.. (1977). Estudio de las propiedades de la sacarosa fosfato sintetasa de germen de trigo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1571\\_Salerno.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1571_Salerno.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Salerno, Graciela L.. "Estudio de las propiedades de la sacarosa fosfato sintetasa de germen de trigo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1977. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1571\\_Salerno.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1571_Salerno.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE  
LA SACAROSA FOSFATO SINTETASA DE GERMEN DE TRIGO

Autor: GRACIELA L. SALERNO  
Director de tesis: DR. HORACIO G. PONTIS  
Lugar de trabajo: DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
FUNDACION BARILOCHE

*Ref. N.º 1571  
2/2*

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1 9 7 7

A M I S P A D R E S

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Horacio G. Pontis, director del trabajo, por su constante apoyo y sus importantes enseñanzas.

Al Dr. Carlos E. Cardini por su interés y sugerencias brindadas durante el transcurso del trabajo.

Al Ing. Rafael Pont Lezica y al Dr. William A. Frankart por sus valiosos consejos y críticas.

A la Lic. María Cristina Brugni y a la Ing. Clara Fernández por su colaboración y apoyo constantes.

A la Sra. Elise Schad por su ayuda en la redacción de este trabajo.

A todos los que integraron el Departamento de Biología de Fundación Bariloche por su cooperación y críticas vertidas en numerosas discusiones.



## I N D I C E

ABREVIATURAS .....	i
INTRODUCCION .....	1
MATERIALES Y METODOS .....	24
RESULTADOS	
Extracción y purificación de la enzima ....	37
Propiedades generales de la enzima .....	47
Estudios cinéticos .....	85
DISCUSION .....	94
CONCLUSIONES .....	119
REFERENCIAS .....	121

## ABREVIATURAS

ADP	:	adenosina difosfato
ADPG	:	adenosina difosfatoglucosa
AMP	:	adenosina monofosfato
ATP	:	adenosina trifosfato
CDP	:	citidina difosfato
CDPG	:	citidina difosfatoglucosa
CTP	:	citidina trifosfato
DEAE-celulosa	:	dietilaminoetil-celulosa
DTT	:	ditiotreitól
EDTA	:	ácido etilendiamino-tetraacético
Fru-6-P	:	fructosa-6-fosfato
GDP	:	guanosina 5'-difosfato
GDPG	:	guanosina 5'-difosfoglucosa
GTP	:	guanosina 5'-trifosfato
HEPES	:	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
MES	:	ácido 2(N-morfolino)etanosulfónico
NDPG	:	nucleósido difosfatoglucosa
PCMB	:	p-cloromercuribenzoato
Pi	:	ortofosfato
PIPES	:	ácido piperazina-N-N'-bis(2-etanosulfónico)
Sac-6-P	:	sacarosa-6-fosfato
		Uridina difosfato

TDPG : timidina difosfatoglucosa  
TRIS : tris(hidroximetil)aminometano  
UDP : uridina difosfato  
UDPG : uridina difosfatoglucosa  
UMP : uridina monofosfato  
UTP : uridina trifosfato

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



## SACAROSA EN EL METABOLISMO DE LAS PLANTAS SUPERIORES

La sacarosa es el disacárido más importante en el reino vegetal, por su amplia distribución sin excepción en todas las plantas verdes, su relativa alta concentración en la mayoría de las células, y por su importancia metabólica (1). Es uno de los principales productos de la fotosíntesis, y, además, una de las sustancias orgánicas más importante transportada en el floema desde los centros fotosintéticos al resto de la planta (2,3). Más aún, es la principal forma de almacenaje de hidratos de carbono y a su vez provee una fuente rápida de fructosa y glucosa, para ser posteriormente utilizadas en síntesis y como reserva de energía. Hay también evidencias que este disacárido cumple un rol como factor de control, a pesar de encontrarse en altas concentraciones (4).

### Sacarosa como producto de la fotosíntesis

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual se sintetizan hidratos de carbono a partir de anhídrido carbónico y de agua, en células clorofílicas y en presencia de la luz.



Esta fijación de  $\text{CO}_2$  en materia orgánica es, por lo tanto, esencial para el crecimiento de las plantas, ya que a partir de los productos fotosinté-

ticos y de algunos compuestos inorgánicos simples obtenidos del medio ambiente, aquellas sintetizan todas sus estructuras. La fijación del  $\text{CO}_2$  culmina con la formación de triosa fosfato que va a dar lugar, entre otras sustancias, a la formación de sacarosa (5,6) (fig. 1).

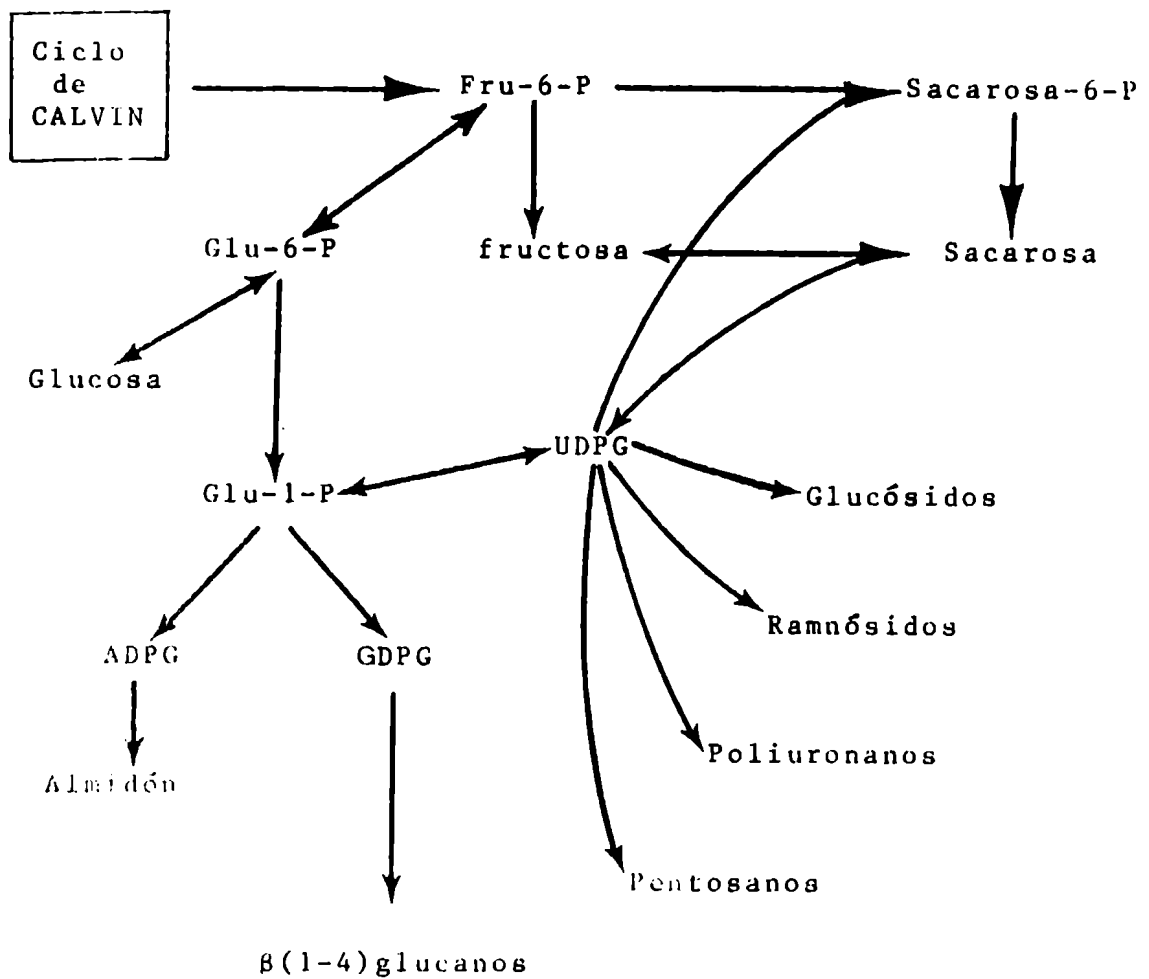


FIGURA 1.

Los hidratos de carbono sintetizados deben ser luego traslocados desde las zonas fotosintéticas al resto de la planta, y esto tiene lugar a través del floema (7). El transporte en el floema típicamente tiene lugar entre los siguientes centros (fig. 2):

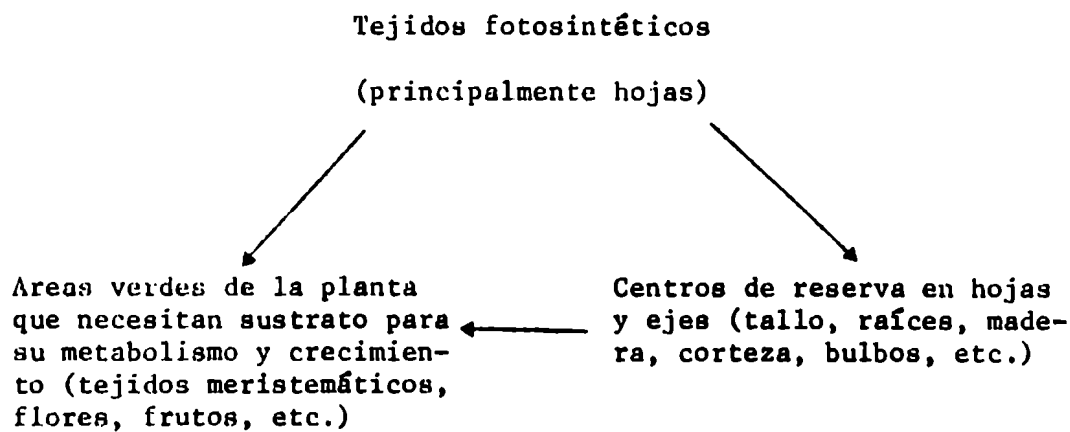


Fig. 2. Distribución de los productos de la fotosíntesis.

La traslocación se estudia en las plantas intactas usando sustancias radiactivas, que se hacen asimilar por las hojas (8). Analizando los azúcares en los tallos de plantas de *Rubus occidentalis* y *Glycine max*, a las cuales se les había suministrado  $^{14}\text{CO}_2$ , Burley (9) probó la hipótesis que la sacarosa era la principal forma en que se mueven los hidratos de carbono. Además encontró que tanto la glucosa como la fructosa estaban marcadas de igual manera y que la proporción de sacarosa a hexosas aumentaba con la distancia de traslocación. Estos hallazgos sugirieron que la sacarosa es traslocada y que la glucosa y fructosa resultan de su hidrólisis. En otros experimentos, para poder conocer la composición del floema se ana-

lizó el contenido de su exudado. Die y Tammes (10) suministraron  $^{14}\text{CO}_2$  a hojas de *Yucca flaccida* y recogieron el exudado en partes distantes de la inflorescencia. En todas las fracciones de exudado, la sacarosa constituyó el 90% de la radiactividad medida.

La traslocación de  $^{14}\text{C}$  a través del tiempo fue estudiada por Geiger y Swanson (11) en plantas pequeñas de *Beta vulgaris* a las que se les podaba prácticamente todas las hojas, y sólo se les dejaba una hoja totalmente desarrollada (hoja fuente) y otra hoja pequeña (hoja destino de los fotoasimilados para completar su crecimiento), el hipocotilo y la raíz. Siguieron la acumulación de  $^{14}\text{C}$  por métodos muy precisos en las hojas destino cuando se exponía a la hoja fuente a  $^{14}\text{CO}_2$  durante 7 a 10 minutos. Detectaron un rápido recambio de la radiactividad en la sacarosa total, lo cual sugería que ese disacárido era la principal sustancia exportada. Además, determinaron la velocidad de traslocación en plantas de *Beta vulgaris* (12). Evaluando la velocidad neta de síntesis de sacarosa, la medida de la cantidad total de sacarosa, y la velocidad para alcanzar la saturación isotópica, Geiger y Swanson indicaron que la concentración total de sacarosa de la hoja fuente era el origen del traslocado.

Hay gran número de estudios que se podrían citar como ejemplo sobre transporte de asimilados pero, básicamente se pueden resumir sus resultados diciendo que la sacarosa es siempre el azúcar predominante, a pesar que la velocidad de transporte y su origen pueden variar a lo largo del día: durante las horas de luz, es un producto de la fotosíntesis y es una fototraslocación rápida; en la noche, se sintetiza a partir de ácidos orgánicos, fosfatos orgánicos y residuos insolubles y es un mecanismo de transporte lento (13).

El hecho experimental que la sacarosa no sólo constituía el producto principal de la fotosíntesis sino que además era la principal sustancia traslocada, ha presentado a fisiólogos vegetales y bioquímicos el interrogante sobre cuáles serían las ventajas para las plantas de tener sacarosa en lugar de glucosa, como principal azúcar. Arnold ha propuesto la hipótesis que la sacarosa podría ser un derivado protegido de la glucosa, es decir, sería una forma de proteger al monosacárido del ataque por enzimas que catalizan su metabolismo durante la traslocación (14). Arnold llegó a esta conclusión después de analizar parámetros físicos de glucosa y sacarosa, tales como densidades, viscosidades y tensiones superficiales de soluciones de ambas, y no encontrar ninguna diferencia fundamental al respecto. Sin embargo, teniendo en cuenta las propiedades químicas, ha señalado que la distribución universal de las enzimas que catalizan el metabolismo de glucosa, haría a este monosacárido extremadamente vulnerable. Por el contrario, Arnold destaca que la sacarosa es mucho menos reactiva y esto hace que se pueda mover a grandes distancias relativas y lleve residuos de glucosa a sitios específicos de crecimiento y almacenamiento.

#### Sacarosa como regulador del metabolismo

Diversas evidencias experimentales sugieren que los niveles de sacarosa pueden modificar el grado de diferenciación de un tejido (15). Experimentos *in vitro* han demostrado que la diferenciación del tejido vascular está relacionada con la concentración de sacarosa (16). También se observó que la cantidad de xilema inducido en callos de *Parthenocissus tricuspidata*

(17), y la variación en el número, tamaño, y estructura de los vasos regenerados en callos de *Coleus* (16), están dadas por la concentración del disacárido en el medio de cultivo. La inducción de la diferenciación del xilema en tejidos de callos por técnicas de gradiente, está favorecida por IAA junto con una relativamente baja concentración de sacarosa (1-2%). De lo contrario cuando se utiliza IAA con una concentración mayor de sacarosa (3-4%), se favorece la inducción de floema (18,19). Se logró inducir también la diferenciación del xilema, floema y raíces de *Acer pseudoplatanos*, cuando el medio de cultivo contenía ácido naftalen acético (1 mg/ml), cinetina (0,05-0,5 mg/l) y sacarosa (3-5%). Con concentraciones menores al 2% a pesar que se diferenciaban elementos de xilema y floema, no lo hicieron las raíces (20). Estos experimentos, llevaron a Wright y Northcote a la conclusión que la concentración de sacarosa, tanto intra como extracelular, está sujeta a un control muy fino y, el nivel de la misma presente en un tejido, está directamente correlacionado con la actividad de las enzimas sacarosa sintetasa, sacarosa fosfato sintetasa, sacarosa fosfato fosfatasa, e invertasas neutras y ácidas (20). Así, en tejidos de callos, la sacarosa no sólo es degradada a glucosa y fructosa, sino también es sintetizada. En consecuencia, en aquellos tejidos se logra un control de la variación del nivel de sacarosa, y de acuerdo a la concentración del disacárido en el tejido, podría existir la posibilidad que éste ejerza algún efecto fisiológico semejante al de una hormona. Sin embargo, Wright y Northcote señalaron que es muy difícil establecer la diferencia entre un requerimiento nutricional esencial y una acción hormonal.

Además de haberse observado la vinculación entre el nivel de sacarosa y la diferenciación en tejidos, se ha comprobado que dicho nivel puede de-

terminar la aparición de enzimas. Pontis et al. (21) encontraron en explantas de tubérculos de *Helianthus tuberosus*, crecidas en oscuridad, y cuyo medio de crecimiento estaba suplementado con sacarosa, se promovía un aumento en el nivel de almidón sintetasa, y, concomitantemente, la aparición de amilopectina. El nivel de la enzima dependía de la concentración de sacarosa en el medio. Este efecto podía ser eliminado por la adición de puromicina al medio de cultivo, lo cual indicaba que se estaría en presencia de un fenómeno de inducción enzimática. Otros azúcares como fructosa, rafinosa, o maltosa, no podían reemplazar a la sacarosa. También se provocaba un aumento en la almidón sintetasa cuando se agregaban al medio glucosa y ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético. Estos resultados están correlacionados con otros previos (22) en los que se había comprobado que la adición de auxina y glucosa aumentaba el nivel de sacarosa sintetasa en tejidos de tubérculos en crecimiento. Estos ejemplos muestran claramente que la sacarosa también puede ejercer una influencia en el metabolismo celular, y su rol no se limita a ser fuente de glucosa y fructosa.

### BIOQUIMICA DE SACAROSA

#### Enzimas que intervienen en su metabolismo

Por muchos años se trató de dilucidar el mecanismo de biosíntesis de la sacarosa. En un principio, cuando se llevaban a cabo experimentos para estudiar la síntesis del almidón, se sugirió que la sacarosa era sintetizada a partir de éste (23). Sin embargo, ya en 1933, se demostró que en reba-

nadas de papa sumergidas en soluciones el 20% de glucosa y fructosa se sintetizaba sacarosa con muy poco cambio en la concentración de almidón (24).

La síntesis de sacarosa a partir de glucosa y fructosa pudo demostrarse claramente infiltrando monosacáridos radiactivos (25). Al no poder detectarse fructosa- $^{14}\text{C}$  libre, cuando se agregaba glucosa- $^{14}\text{C}$ , y viceversa, pero en cada caso ambas partes de la sacarosa eran radiactivas, se concluyó que ninguno de los dos monosacáridos libres estaban involucrados como tales en la síntesis de la sacarosa. Además, se demostró la formación inmediata de fosfatos orgánicos después de la infiltración de los azúcares simples, con lo cual se especuló que la síntesis de sacarosa involucraba intermediarios fosforilados.

La primera enzima encontrada capaz de sintetizar sacarosa fue sacarosa fosforilasa, extraída de la bacteria *Pseudomonas saccharophila* (26,27). Esta enzima cataliza la condensación de glucosa-1-P y fructosa dando como productos sacarosa y fosfato inorgánico. Este hallazgo sugirió que podría haber una reacción enzimática similar en plantas (28,29). Se hicieron muchos intentos para demostrar la existencia de esta enzima en extractos de plantas, sin resultados positivos (30,31), lo cual indicaba que posiblemente éste no fuera el sistema responsable de la síntesis de sacarosa en plantas.

Los resultados obtenidos en experimentos fotosintéticos con  $^{14}\text{CO}_2$ , en hojas de remolacha azucarera, llevados a cabo por Buchanan et al. (32-34), indicaron que los precursores de la sacarosa eran compuestos fosforilados. Aislaron un producto que se identificó como sacarosa-1-P, por lo cual postularon el siguiente mecanismo:





El UDPG había sido aislado anteriormente por Leloir y colaboradores (35) de levadura. Su rol en las reacciones en las cuales se sintetizaban disacáridos y oligosacáridos fue demostrado por primera vez en levadura, al aislarse la enzima que catalizaba la síntesis de trealosa a partir de UDPG y glucosa-6-P (36). Con esta reacción fue demostrada la capacidad del UDPG de donar la parte de glucosa a otros compuestos (37), lo cual abrió el camino para la búsqueda de las enzimas que intervienen en la síntesis de sacarosa.

El significado del UDPG en la síntesis de sacarosa fue definitivamente aclarado cuando Leloir y Cardini encontraron que extractos de germen de trigo y otras plantas (remolacha, sorgo dulce, arveja, caña de azúcar) catalizaban la síntesis de sacarosa a partir del UDPG y fructosa (38,39), de acuerdo a la siguiente reacción:



La enzima que cataliza esta reacción es la sacarosa sintetasa. Durante su aislamiento, Leloir y Cardini (40) encontraron que extractos crudos de germen de trigo contenían además un sistema enzimático capaz de sintetizar sacarosa fosfato. La enzima, sacarosa fosfato sintetasa cataliza la siguiente reacción:



Leloir y Cardini mostraron que la sacarosa-6-P era hidrolizada por extractos crudos, a sacarosa y fosfato. Este efecto fue atribuido a fosfatasas que existen comúnmente en tejidos de plantas. Sin embargo, fue Mendicino (41) el primero que indicó que la hidrólisis de la sacarosa-6-P era debida a una

fosfatasa específica. Posteriormente, Hawker y Hatch probaron conclusivamente la existencia de dicha enzima específica (42) en diversas plantas y la purificaron parcialmente de caña de azúcar y zanahoria (43,44). Entonces la biosíntesis de la sacarosa puede ocurrir por dos caminos diferentes tanto en tejidos fotosintéticos como en no fotosintéticos: 1) por transferencia de la glucosa del UDPG a la fructosa (fig. 3, reacción a), catalizada por la sacarosa sintetasa (UDP-glucosa:D-fructosa-2-glucosil transferasa E.C.2.4.1.13); 2) por transferencia de la glucosa del UDPG a la fructosa-6-P para dar sacarosa-6-P (reacción b), catalizada por la sacarosa-6-P sintetasa (UDP-glucosa:D-fructosa-6-P 2-glucosil transferasa E.C.2.4.1.14.0), que es luego hidrolizada a sacarosa por la acción de la sacarosa-6-P fosfatasa (reacción c) (sacarosa-6-P fosfohidrolasa E.C. 3.1.3. ..).

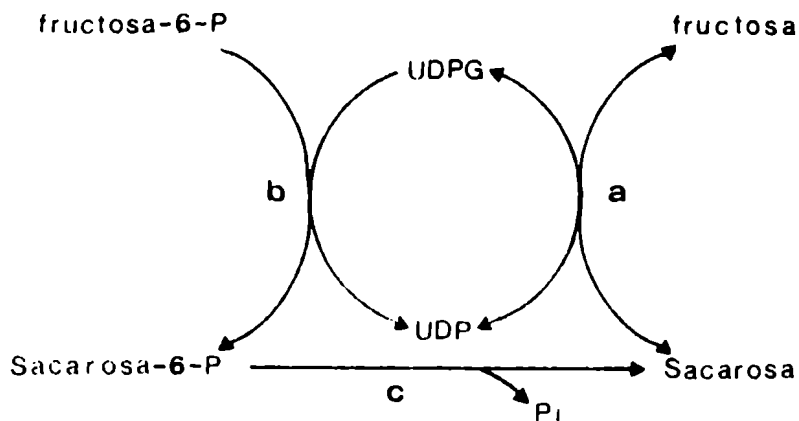


Fig. 3. Reacciones que conducen a sacarosa.

La existencia de estas dos enzimas, sacarosa sintetasa y sacarosa fosfato sintetasa, abre un interrogante en la bioquímica vegetal, ya que las reacciones catalizadas por ambas conducen al mismo producto, o sea, sacarosa. Entonces, las preguntas obvias que surgen son: ¿cuál es la función que desempeñan in vivo cada una de las enzimas?, y ¿cuál es la responsable de la síntesis de sacarosa?

Basándose en experimentos de fijación de  $^{14}\text{CO}_2$  (33,45-47), y en estudios de infiltración de glucosa- $^{14}\text{C}$  (48,49) en los cuales se analizó la distribución de la radiactividad incorporada a cada uno de los componentes de sacarosa, se concluyó que la ruta de formación del disacárido durante la fotosíntesis a partir de  $\text{CO}_2$ , son las reacciones b + c de la fig. 3. O sea, todos los resultados indican que la sacarosa-6-P es sintetizada primero, y, luego, hidrolizada a sacarosa libre. Por consiguiente, al menos la reacción de síntesis a partir de UDPG y fructosa no contribuye significativamente a incrementar el nivel de sacarosa total.

Por otra parte, las diferencias entre ambas sintetetasas son notables. Así, la constante de equilibrio para la reacción catalizada por la sacarosa-6-P sintetasa es de 3250, con un  $\Delta F^\circ$  de -2700 cal a pH 7,5, lo cual indica que la reacción está desplazada hacia la síntesis de la sacarosa-6-P, o sea es prácticamente irreversible. La constante de equilibrio determinada para la reacción (a), catalizada por la sacarosa sintetasa, fue alrededor de 2 (50-52), y con un  $\Delta F^\circ$  de -280 cal a pH 7,5 y es, por lo tanto una reacción fácilmente reversible. El equilibrio favorece levemente la síntesis de sacarosa, pero si alguno o ambos sustratos, fructosa y/o UDPG, fueran removidos, por ejemplo a través de otras reacciones metabólicas, entonces tendrá

lugar la reacción de clivaje. Estos resultados sugirieron que la sacarosa sintetasa aparentemente actúa en el sentido de clivaje, más que en el de síntesis de sacarosa (50, 53-56). De manera que todo parecería indicar que el rol de la sacarosa sintetasa sería el de catalizar la formación de UDPG, dando a la célula un camino alternativo a la reacción de las pirofosforilasas que catalizan la formación de nucleósidos difosfato azúcares (57). Cabe señalarse que una diferencia importante entre la sacarosa fosfato sintetasa y la sacarosa sintetasa radica en la distinta especificidad que ambas tienen con respecto al UDPG. Mientras la primera es totalmente específica, la segunda admite otros nucleótidos azúcares como ADPG, TDPG, y CDPG como dadores (58-61). Esta circunstancia indica que la reacción de la sacarosa sintetasa funcionando en el sentido de clivaje de la sacarosa permitiría mantener la energía del enlace glucosídico de la misma, y los nucleótidos azúcares formados podrían ser utilizados para la síntesis de glucósidos, almidón, callosa, o polisacáridos de la pared celular (57). A pesar de esto, debe tenerse en cuenta que, el UDP, producto de la reacción o sustrato, tiene una alta afinidad (4) respecto a la sacarosa sintetasa, y evita que la reacción con otros nucleósidos difosfato como ADP, TDP, CDP, o GDP, se lleve a cabo cuando él está presente (58).

En cualquier caso, las ideas actuales tienden a asignar a la sacarosa sintetasa el rol fisiológico de clivaje de la sacarosa, mientras que a la sacarosa fosfato sintetasa le correspondería el de síntesis de sacarosa, vía sacarosa-6-P.

Finalmente debe señalarse que además de las enzimas mencionadas, existen las conocidas genéricamente con el nombre de invertasas, que catalizan

la hidrólisis de sacarosa a glucosa y fructosa. Su presencia ha sido demostrada en diversos tejidos vegetales (62-64), y se las clasifica de acuerdo a su pH óptimo en ácidas y neutras. Hay evidencias que parecen indicar que estas enzimas aparecen en las células en estadios metabólicos en los cuales no se detecta, o se encuentra muy disminuida la actividad de sacarosa sintetasa (62).

Si bien existen innumerables trabajos sobre el rol y propiedades de las invertasas en plantas, desde el punto de vista de la biosíntesis de sacarosa la enzima que ha sido más estudiada es la sacarosa sintetasa, probablemente, porque su actividad y la reacción por ella catalizada han sido vinculadas en numerosos estudios a la síntesis de almidón (53,59,61,65,66).

Se detallan a continuación las propiedades generales y el estado de conocimiento actual sobre las enzimas relacionadas con sacarosa (fig. 3), y en particular, sobre la sacarosa fosfato sintetasa, cuyas propiedades se estudiaron en este trabajo.

#### a) Sacarosa sintetasa

Esta enzima se encuentra muy distribuida en todo el reino vegetal (4, 67) y ha sido purificada hasta homogeneidad de *Phaseolus aureus* (68).

Aunque el equilibrio favorece la síntesis de sacarosa, la reacción es fácilmente reversible y puede conducir a la síntesis de nucleósidos difosfato glucosa, a partir de sacarosa.

El pH óptimo para la reacción en el sentido de síntesis de sacarosa oscila entre 7,5 y 8,5, de acuerdo a las enzimas obtenidas de distintas

fuentes. El clivaje de sacarosa tiene lugar a un pH óptimo entre 6 y 6,5.

En contraste con el alto grado de especificidad que presenta para fructosa y sacarosa, la sacarosa sintetasa puede actuar con distintos nucleósidos difosfato glucosa y nucleósidos difosfato. De cualquier forma, presenta una  $K_m$  para UDPG (0,2 - 1,5 mM) diez veces menor que para cualquier otro nucleósido difosfato glucosa (4). Por otra parte, la  $K_m$  para fructosa (2 - 6 mM), es también diez veces menor en presencia de UDPG que en presencia de otro NDPG (58).

La enzima no muestra ningún requerimiento absoluto para iones metálicos, pero, sin embargo se ha podido demostrar que la síntesis de sacarosa es activada por cationes divalentes ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Ba^{2+}$ ) mientras que los mismos inhiben el clivaje (53,69-73). También se ha encontrado que el UDP es un fuerte inhibidor de la síntesis de sacarosa y que esta inhibición puede ser revertida por  $Mg^{2+}$  (73).

Numerosos compuestos han sido probados como posibles activadores o inhibidores de la reacción, sin que se haya podido encontrar ninguno que alterase significativamente la actividad de la enzima in vitro (70-76). Más aún, algunas sustancias que tienen importancia fisiológica modifican la actividad de la enzima, pero no hay evidencias que estos efectos ocurran in vivo (62). Se demostró en todas las preparaciones de sacarosa sintetasa que los grupos sulfhidrilos son esenciales para su actividad (77-78), y en la mayoría de los casos son inhibidas por reactivos mercuriales, como por ejemplo, p-cloromercuribenzoato, pero pueden ser reactivadas por la adición de cisteína, DTT, o mercaptoetanol (77).

El peso molecular de la enzima ha sido determinado en enzimas aisladas de varias fuentes, y se ha encontrado que en general es aproximadamente 400.000 (4). Para el caso en que la enzima fue preparada en forma homogénea, fue posible determinar que la molécula tiene cuatro subunidades idénticas de peso molecular entre 90.000 y 100.000 (68).

El mecanismo cinético ha sido estudiado en detalle y se ha sugerido que la adición de sustratos y liberación de productos sigue un mecanismo ordenado (74,75).

#### b) Sacarosa fosfato sintetasa

##### Distribución

La sacarosa fosfato sintetasa se halla ampliamente distribuida en las plantas superiores. Se demostró su existencia por primera vez en germen de trigo (40,41), y posteriormente se estudió en: trigo (79), remolacha azucarera (80), papa (78-81), caña de azúcar (82), batata (81), cebada (81), nabo silvestre (81), arroz (83), habas (83-84), maíz (83,85), poroto japonés (50), trébol (81), porotos (79), gramíneas (85), ricino (83), uva (86), tabaco (82), arveja (63,79,82), espinaca (41,79), y lechuga (41). Además está presente en diversos tejidos de las plantas, tanto en los fotosintéticos (41,51,82,88), como en los de reserva, semillas, tubérculos o raíces, y en embriones en crecimiento (41,50,78,81,83,89-92). En la actualidad aún no hay experimentos concluyentes que permitan aclarar definitivamente dónde está localizada la enzima en los tejidos verdes, si en el cloroplasto o en el citoplasma (87,93). Las últimas evidencias experimentales parecen indicar que la sacarosa no puede atravesar la membrana interna del cloroplasto (67,79,93,94), lo cual implica-

ría que no podría sintetizarse dentro del mismo para luego salir al citoplasma. De modo que una posible explicación de los resultados en los que se ha detectado actividad de la sacarosa fosfato sintetasa en preparaciones de cloroplastos (51), sería que en dichos aislamientos se obtienen cloroplastos contaminados con proteínas del citoplasma (93).

#### Aislamiento y purificación

La enzima fue aislada por primera vez de germen de trigo en 1955 (40), y a pesar del tiempo transcurrido no ha sido aún obtenida una preparación homogénea. Más aún, en la mayoría de los trabajos se menciona que la enzima aislada se encuentra acompañada en porcentajes variables, de sacarosa sintetasa como contaminante. Los métodos usados para purificarla son en general clásicos, y están basados en un fraccionamiento con sulfato de amonio y/o protamina, seguido en algunos casos por cromatografía en DEAE-celulosa (41, 78, 84, 92).

#### Propiedades generales

Es difícil generalizar sobre la estabilidad de la sacarosa fosfato sintetasa debido a que existen datos muy dispares para las enzimas aisladas de distintas fuentes, y, probablemente, esto puede atribuirse a los distintos procedimientos usados para purificarla. Por un lado, Mendicino (41) mantiene que la enzima es estable aún congelada, conservándose en este estado prácticamente toda su actividad. Por el contrario, enzimas aisladas de hojas (81), y de tubérculos (78) aparentan ser muy inestables.

Un resultado peculiar que debe mencionarse, es el hallado por Fekete (84), quien encontró que congelando y descongelando preparaciones de enzima,



se separaba un activador de la misma. Los sobrenadantes sólo mantenían una actividad residual muy pequeña.

El peso molecular de la sacarosa fosfato sintetasa ha sido solamente determinado por Nomura y Akazawa (92) trabajando con una enzima aislada de escutelo de semillas de arroz, por dos técnicas distintas: filtración en gel y centrifugación en gradiente de glicerol, de acuerdo al método de Martin y Ames (95). El primer método indicó un peso molecular aproximado de 450.000. En cambio en el segundo, la constante de sedimentación hallada,  $S_{20,w} = 10,4 S$ , corresponde a un peso molecular de 217.000, calculado de acuerdo a la ecuación de Martin y Ames. Esta discrepancia no ha sido explicada y deja abierto un interrogante sobre el valor real del peso molecular de la enzima.

#### Estudios sobre la reacción

Especificidad: La sacarosa fosfato sintetasa se comporta en forma similar a otras transglucosidasas (52,96) que tienen como sustrato un nucleótido azúcar, o sea que es muy específica respecto de UDPG, el cual no puede ser reemplazado por ADPG, GDPG, o TDPG, y también con respecto a fructosa-6-P, ya que no reacciona ni con fructosa-1-P ni con fructosa-1,6-diP (41,78).

pH óptimo: En la Tabla 1 se muestran los pH óptimos obtenidos para enzimas aisladas de distintas fuentes. En general, el pH óptimo oscila alrededor de 6,5, si bien en algunos casos se ha podido observar una meseta entre 6 y 7,6 en las curvas de actividad vs. pH. Esto podría explicar los resultados que señalan un pH óptimo superior al indicado.

Tabla 1. pH óptimo de la sacarosa fosfato sintetasa  
de diferentes fuentes

Origen	pH óptimo	Referencia
Trigo	7,4; 6,5; 6,4	40, 41, 97
Papa	6,0; 7,5	78, 81
Batata	6,0	81
Caña de azúcar	6,7	82
Haba	6,4	84
Arroz	7,5	92
Cebada, uva, trébol	6,5	81

Constantes cinéticas: Los valores hallados para los parámetros cinéticos están indicados en la Tabla 2 (4).

Su observación muestra que no hay mayores diferencias entre las preparaciones enzimáticas de las distintas fuentes. Sin embargo, cabe señalar que en algunos casos las curvas de saturación presentan una leve sigmoicidad, lo que está indicado por los coeficientes de Hill muy poco superiores a la unidad.

Tabla 2. Constantes cinéticas para la sacarosa fosfato sintetasa

Planta	UDPG		Fru-6-P		Referencia
	$K_m$ (mM)	n	$K_m$ (mM)	n	
Trigo	7,4		3,0		41
			2,2		40
	0,67 <sup>a,b</sup>	1,5	2,6 <sup>a,b</sup>	1,8	97
	1,9 <sup>b</sup>	1,7	3,4 <sup>b</sup>	1,4	97
Cebada	2,7		1,8 <sup>b</sup>	1,4	81
Nabo silvestre	4,2		1,3 <sup>b</sup>	1,4	81
Trébol	3		0,6 <sup>b</sup>	1,5	81
Papa	2 <sup>c</sup> y 2,5		0,9 <sup>b</sup>	1,4	81
	7,4		5,5		78
Batata	5,4		0,6 <sup>b</sup>	1,4	81
Caña de azúcar			2,4		82
Haba	3,9	1	1,4	1	84
	19,8 <sup>d</sup>	1	6,3 <sup>d</sup>	1,1	84
	9,8 <sup>e</sup>	1,5	4,3 <sup>e</sup>	1,6	84
	4,6 <sup>i</sup>	1	1,4 <sup>f</sup>	1	84
Aroz	25		2 - 5,9		92

a: en presencia de  $MgCl_2$  22 mM;b: curvas sigmoideas,  $A_{0,5}$ ;c: en presencia de  $BuCl_2$  5 mM;

d: en presencia de citrato 40 mM;

e: enzima sin el activador;

f: en presencia de citrato 100 mM.

Equilibrio: La constante de equilibrio de la reacción catalizada por la sacarosa fosfato sintetasa fue determinada por Mendicino (41) quien encontró a 38°C un valor de 53 a pH 5,5 y de 3250 a pH 7,5. Estos valores indican un  $\Delta F^\circ$  de aproximadamente -2700 cal para la hidrólisis de la unión glucosídica de la sacarosa-6-P. Es decir alrededor de 4000 cal menor que para la sacarosa. Es difícil entender por qué la presencia de un grupo fosfato en la posición C-6 de la fructosa afecta tan significativamente la unión glucosídica del disacárido, contribuyendo a su estabilización (57).

La variación con el pH en los valores obtenidos para la constante de equilibrio por Mendicino, muestran, tal como lo sugiere él mismo, que la reacción debería escribirse:



donde está indicado claramente la participación de los iones hidrógeno en la reacción y por lo tanto cómo el pH afecta el equilibrio final.

Efecto de iones metálicos: La sacarosa fosfato sintetasa de cualquier fuente no requiere en forma absoluta para su actividad, la presencia de ningún ion metálico. A pesar de ello varios investigadores (81,97,98) han demostrado que los iones  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  tienen un efecto activador mientras que según Murata (81) el ion  $\text{Ca}^{2+}$  inhibiría la actividad de la enzima.

También se han estudiado los efectos de algunos aniones en la actividad. Slabnik et al. (78) han mostrado que los iones sulfato y cloruro producen un efecto negativo, y es importante destacar estos resultados ya que estos aniones pueden afectar la actividad medida cuando se fracciona la enzima por medio de sales o por cromatografía en resina de intercambio iónico. Fekete (84)

ha señalado que el ion citrato para las preparaciones de enzima de haba, juega un rol fundamental vinculado a la presencia o ausencia de un activador unido a la enzima. La naturaleza de dicho activador no ha sido aclarada aún. Similarmente, varios aniones dicarboxílicos serían capaces de provocar un incremento en la actividad enzimática en los casos en que el activador mencionado se encuentra ausente.

Influencia de otros metabolitos: La sacarosa fosfato sintetasa se comporta de modo similar a otras transglucosidasas, respecto a la inhibición por producto, o sea UDP actúa como un fuerte inhibidor competitivo con una  $K_i$  aparente de 3,6 mM. Este hecho fue demostrado inicialmente por Mendicino (41) y luego fue corroborado en enzimas aisladas de muy diversas fuentes (78,81, 84,92).

Por otra parte, existe discrepancia sobre el efecto de otros nucleósidos trifosfato o monofosfato tales como UTP, ATP, UMP y AMP. Mientras que Mendicino (41) y Nomura y Akazawa (92) señalan que ni UMP ni UTP tienen influencia en la reacción, Fekete (84) indica que ambos compuestos actúan como inhibidores. La diferencia nuevamente radica en la presencia del activador antes mencionado, unido o no a la enzima. Una serie de metabolitos han sido estudiados como posibles modificadores de la actividad enzimática. No ha sido hallada ninguna influencia con sacarosa, fructosa, glucosa, glucosa-1-P, glucosa-6-P, fructosa-1-P, fructosa-1,6-diP, 3-fosfoglicérico, gliceraldehído-3-P, piruvato, fosfoenolpirúvico, citrato, succinato, malato, oxalacetato, y glicolato, entre 5 y 10 mM (92). En cambio Preiss y Greenberg (97) han hecho la importante observación que 2-deoxiglucosa-6-P y 1,5-anhidroglucitol-6-P,

análogos de fructosa-6-P, estimulaban la actividad de la enzima, e indicaron que estos datos sugerían la presencia de un segundo sitio en la enzima al cual se unían los efectores.

Slabnik et al. (78) estudiaron en forma comparativa el efecto que diversas sustancias, tales como fenil glucósidos, ácido clorogénico, ácido shikímico y solanina, tenían sobre la actividad de la sacarosa fosfato sintetasa y de la sacarosa sintetasa. Encontraron que la primera enzima no era afectada por los glucósidos mientras que sí lo era por las otras sustancias.

Por último, demostraron que la enzima es inhibida parcialmente por p-cloromercuribenzoato, lo cual sugiere que la enzima tiene grupos sulfhidrilos esenciales para su actividad.

#### c) Sacarosa fosfato fosfatasa

Su distribución es tan amplia como la de las otras enzimas vinculadas a sacarosa (4).

La enzima es específica para sacarosa-6-P y puede diferenciarse de otras fosfatasas en que requiere en forma específica  $Mg^{2+}$  (43). Por otra parte, es parcialmente inhibida por sacarosa, maltosa y melizitosa, mientras que lactosa, celobiosa, trealosa, gentiobiosa y rafinosa no producen efecto alguno (44).

El pH óptimo de la enzima se encuentra alrededor de 6,4 - 6,7, y la actividad cae rápidamente a pH más ácidos (42,43).

Se conoce muy poco sobre las propiedades moleculares de la enzima y sólo se tienen estimaciones muy aproximadas de su peso molecular (alrededor de 100.000) (42).

Dada la importancia de la sacarosa fosfato sintetasa como responsable de la síntesis de sacarosa in vivo, el presente estudio está orientado a adquirir conocimientos que completen los actuales, y que permitan esclarecer los mecanismos por los cuales se modifica la actividad de la misma. En consecuencia, se espera lograr una mayor visión de conjunto que ayude a comprender mejor cómo se regulan los niveles de sacarosa en la célula.

## M A T E R I A L E S   Y   M E T O D O S



### REACTIVOS UTILIZADOS

Los reactivos utilizados para las determinaciones de actividad enzimática fueron adquiridos en SIGMA Chemical Company, St. Louis, EE.UU. La sacarosa-6-P fue preparada de acuerdo al método descrito más adelante. El ácido tiobarbitúrico fue purificado de acuerdo al método de Waravdekar-Saslaw (99).

DEAE-cellulosa fue comprada en SERVA, Alemania; Sepharosa 6B, en PHARMACIA, Suecia; y los demás reactivos utilizados en la preparación de la enzima y durante su purificación, en FLUKA, Suiza.

UDP- $^{14}\text{C}$ -glucosa y  $^{14}\text{C}$ -fructosa-6-P fueron suministrados por AMERSHAM, EE.UU., y por el Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar.

Las proteínas usadas en la determinación del peso molecular y las enzimas auxiliares empleadas en la determinación de actividad enzimática, fosfatasa alcalina (tipo IX) y piruvato quinasa (tipo II), fueron compradas en SIGMA Chemical Company, St. Louis, EE.UU.

La sacarosa fosfato sintetasa fue obtenida a partir de germen de trigo, adquirido en una semillera de Buenos Aires.

Las sales de TRIS se prepararon pasando sales de sodio de UDPC y de fructosa-6-P por Dowex 50 ( $\text{H}^+$ ) y neutralizándolas con TRIS.

## DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Todas las medidas de actividades enzimáticas fueron llevadas a cabo bajo condiciones donde la velocidad era lineal en el tiempo y respecto a la cantidad de enzima.

### Sacarosa fosfato sintetasa

Método A: Está basado en la medición de la sacarosa-6-P formada mediante el reactivo del ácido tiobarbitúrico (100), luego de destruir la fructosa-6-P remanente con NaOH (40).

La mezcla de incubación contenía, expresados en  $\mu$ moles, en un volumen total de 50  $\mu$ l, los siguientes componentes: UDPG, 0,50; fructosa-6-P, 0,50; buffer HEPES pH 6,5, 5; enzima, y los compuestos cuyo efecto se quería estudiar. En los primeros pasos de la purificación, la mezcla de incubación contenía además 1  $\mu$ mol de NaF. Se incubó a 30°C durante diferentes tiempos, y la reacción se interrumpió por el agregado de 0,2 ml de NaOH 0,5 N. La mezcla de incubación sin UDPG fue usada como blanco; el nucleótido azúcar fue agregado después de haber interrumpido la reacción con álcali. Se calentó a 100°C por 10 minutos, y luego se enfrió rápidamente. Se añadió 0,6 ml del reactivo ácido tiobarbitúrico y se calentó a 100°C por 7 minutos. Se enfrió y se leyó la densidad óptica a 432 nm.

Método B: Se basa en la medición del UDP formado, de acuerdo al método de Cabib (101), que determina el nucleósido difosfato por medio de piruvato quinasa, estimando el ácido pirúvico resultante como 2,4-dinitrofenilhidrazona. La mezcla de incubación contenía, expresados en  $\mu$ moles, en un volumen

total de 50  $\mu$ l: UDPG, 0,50; fructosa-6-P, 0,50; buffer HEPES-K pH 6,5, 5; enzima, y demás compuestos en cuya presencia se quería determinar la actividad. Se incubó a 30°C durante diferentes tiempos. La reacción se interrumpió calentando a 100°C por 1 minuto, y luego se enfrió. La mezcla de incubación sin fructosa-6-P fue usada como blanco; el ester fosfórico fue adicionado una vez detenida la reacción. Posteriormente se agregó 60  $\mu$ l de una mezcla que contenía, en  $\mu$ moles: buffer TRIS-HCl pH 9, 10; PEP, 0,25; KCl, 10; MgSO<sub>4</sub>, 2,5; y 10  $\mu$ g de piruvato quinasa (350-400 unidades/mg). Esta segunda incubación se realizó a 37°C y después de 15 minutos, se interrumpió por el agregado de 0,15 ml del reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina. Después de cinco minutos, se adicionaron 0,2 ml de NaOH 10 N y 0,5 ml de alcohol 96%. El color desarrollado se leyó a una densidad óptica de 520 nm.

Método C: El fundamento de este método es la determinación de sacarosa-6-P, separada de los demás componentes de la mezcla de incubación por medio de una resina intercambiadora de iones (Dowex-1-cloruro, 200-400 mesh) que previamente se somete a la acción de fosfatasa alcalina. La mezcla de incubación contenía, en  $\mu$ moles, en un volumen total de 50  $\mu$ l: UDPG-<sup>14</sup>C (actividad específica: 160.000-240.000 cpm/ $\mu$ mol), 0,25; fructosa-6-P, 0,5; buffer HEPES pH 6,5, 5; enzima y compuestos cuyo efecto se estudiaba. Se incubó a 30°C, durante distintos tiempos, y la reacción se detuvo por el agregado de 10  $\mu$ l de buffer glicina-NaOH 1 M pH 10. Se calentó a 100°C, un minuto, y luego se enfrió. El blanco de reacción contenía todos los componentes de la mezcla de incubación con excepción de fructosa-6-P. Se adicionó luego, 5  $\mu$ l (50  $\mu$ g; 10 unidades/mg proteína) de fosfatasa alcalina. Se incubó por 30 minutos a 37°C. La reacción se detuvo por agregado de 0,2 ml de agua helada. La saca-

rosa- $^{14}\text{C}$  liberada por acción de la fosfatasa alcalina, se separó de los restantes componentes pasando la totalidad de la muestra por una columna de Dowex 1-cloruro (200-400 mesh), 0,6 x 2 cm, siendo eluída con 2 ml de agua. El eluato fue recogido directamente en viales, a los que se les agregó 8 ml de un líquido de centelleo [PPO-POPOP (4 g PPO y 0,3 g de POPOP en un litro de tolueno): TRITON (2,5:1)].

Método D: Este método está basado en la determinación del UDP formado que previamente es separado de los demás componentes, por cromatografía en papel. La mezcla de incubación corresponde a la usada en el método A, pero en este caso la reacción se detuvo por calentamiento a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto. Luego de completar los blancos respectivos, se aplicó una alícuota de 40  $\mu\text{l}$  sobre papel Whatman N° 1 y se cromatografió en etanol-acetato de amonio 1 M pH 7,5 (7:3) (102), en forma descendente por 24 horas. Las zonas del papel correspondientes a UDP se recortaron y se eluyeron con HCl 0,1 M. Se determinó la cantidad de UDP midiendo la densidad óptica a 260 nm.

Método E: Está basado en la medición de la sacarosa-6-P formada, después que se la ha separado de los demás componentes de la reacción por cromatografía en papel. La mezcla de incubación corresponde a la usada en el método C, excepto que la reacción se detuvo por calentamiento a  $100^{\circ}\text{C}$ , 1 minuto. Se colocó una alícuota de 25  $\mu\text{l}$  sobre papel Whatman N° 1. Los productos de reacción fueron separados por cromatografía descendente en etanol-acetato de amonio 1 M, pH 3,8 (7:3) (102), durante 28 horas. Las zonas correspondientes a la  $^{14}\text{C}$ -sacarosa-6-P, determinadas en el papel por compara-

ción con standards de sacarosa-6-P no radiactiva, se cortaron, y se determinó su radiactividad en un líquido de centelleo cuya composición era: 4 g de PPO y 0,3 g de POPOP en un litro de tolueno.

Los métodos B, C, y D fueron usados especialmente con metabolitos que podían interferir en el desarrollo de color con el reactivo del ácido tiobarbitúrico (método A).

#### Sacarosa sintetasa

La actividad de la enzima se estimó midiendo la reacción en el sentido de síntesis de sacarosa mediante el uso del reactivo del ácido tiobarbitúrico, luego de destruir la fructosa remanente con NaOH (39). La mezcla de incubación contenía, expresados en  $\mu$ moles, en un volumen total de 50  $\mu$ l: UDPG, 0,25; fructosa, 0,50; buffer TRIS-HCl pH 8, 5; la enzima, y compuestos en el caso en que se quería estudiar el efecto de los mismos. El procedimiento que se siguió fue ya descrito para el método A en la determinación de la sacarosa fosfato sintetasa.

#### Fosfatasas

Método A: Está basado en la determinación del fósforo liberado mediante la técnica de Fiske-Subbarow (103). La mezcla de incubación contenía, en  $\mu$ moles, en un volumen final de 50  $\mu$ l: fructosa-6-P, 0,5; buffer HEPES pH 6,5, 5; y la enzima. En algunos ensayos, la mezcla de incubación contenía además 10  $\mu$ moles de MgCl<sub>2</sub>. La reacción se detuvo después de haber incubado durante 30 minutos

a 37°C, por el agregado de ácido sulfúrico 5 N. Una vez agregados los restantes reactivos del método de Fiske-Subbarow, el color desarrollado se leyó a una densidad óptica de 660 nm.

Método B: Alternativamente se determinó la actividad de fosfatasas midiendo la fructosa-<sup>14</sup>C liberada de la <sup>14</sup>C-fructosa-6-P. La mezcla de incubación, contenía expresados en µmoles, en un volumen final de 50 µl: <sup>14</sup>C-fructosa-6-P (actividad específica 150.000 cpm/µmol), 0,5; buffer HEPES pH 6,5, 5; y la enzima. Se incubó durante 30 minutos a 37°C, y se interrumpió la reacción con 0,2 ml de agua. Se aplicó la mezcla, en su totalidad, sobre columnas de Dowex-1-cloruro (200-400 mesh) 0,6 x 2 cm. La fructosa-<sup>14</sup>C fue eluída con 2 ml de agua, recoigiéndose el eluato directamente en viales, a los que se les agregaban 8 ml de líquido de centelleo [PPO-POPOP (4 g PPO y 0,3 g de POPOP en un litro de tolueno): TRITON (2,5:1)].

#### Fosforilasa

El método está basado en la medición del fosfato liberado de la glucosa-1-P de acuerdo al método de Fiske-Subbarow (103). La mezcla de incubación contenía, en un volumen total de 50 µl: 1,2% de glucógeno, 1,5 µmoles de glucosa-1-P; 0,05 µmoles de AMP; 0,5 µmoles de buffer TRIS-Maleato pH 6,5, y enzima. Se incubó durante distintos tiempos, a 37°C, y la reacción se detuvo por el agregado de 1,55 ml de agua helada. Se adicionaron luego los reactivos para medir fosfato. Se esperó 10 minutos antes de leer el color desarrollado a una densidad óptica de 660 nm.

### DETERMINACION DE PROTEINAS

Método de Lowry (104): Se empleó este método pero con las modificaciones de Oyama y Eagle (105), y se usó como patrón, albúmina bovina cristalizada.

Método de Warburg y Christian (106): Se midió la densidad óptica a 260 y 280 nm.

### ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA

La electroforesis se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Jovin et al. (107). Se preparó un gel de separación (0,5 x 10 cm), de una composición en acrilamida del 7,5%, y sobre éste se fotopolimerizó un gel de concentración de 0,5 x 0,6 cm. Se sembraron muestras de 100 µl que contenían, como máximo, 100 µg de proteína disueltos en una solución de glicerol al 50% y 10 µl de azul de bromotimol al 1%. La proteína se había dializado previamente contra el buffer catódico de electroforesis (glicina 2,88 g/l, TRIS 0,6 g/l, pH 8,3). El buffer anódico se preparó ajustando con TRIS a pH 8,1, 60 ml de HCl 1 N, que se llevaron a un volumen final de un litro. Se hizo circular 2 mA/tubo hasta que el colorante, indicador del frente, había pasado el gel de concentración, y luego 4 mA/tubo durante aproximadamente dos horas, tiempo en el cual el colorante llegaba a 0,5 cm del extremo inferior del gel. Las proteínas se detectaron por teñido durante 15 minutos con una solución de Amido Schwartz al 1% en ácido acético al 7%. El exceso de colorante fue eliminado por lavados con ácido acético al 7%, a una temperatura de 50°C. El líquido de lavado se cambió cada media hora durante las primeras cinco horas. La locali-

zación de la enzima fue llevada a cabo cortando con un bisturí geles no teñidos, en rebanadas de 1 mm de espesor. Cada rebanada fue colocada en un tubo que contenía la mezcla de reacción correspondiente al método A para medir la actividad. El tiempo de incubación fue, generalmente, de  $1/2$  - 3 horas. Cuando se deseaba determinar más de una actividad enzimática en el mismo gel, cada rebanada fue dividida en partes iguales, que luego se incubaron con las respectivas mezclas de reacción.

### ELECTROENFOCADO

Las experiencias de electroenfocado se llevaron a cabo de acuerdo a la técnica de Godson (107). El método permite realizar electroenfocado en microescala. La proteína (0,1 - 0,5 mg) se distribuyó en un gradiente de glicerol de 8 a 60% con una concentración de anfolito de 1% (pH 3 - 10).

La solución anódica estaba constituida por glicerol 80% y ácido fosfórico 0,09 M, y la solución catódica por NaOH 0,25 N. Se aplicó una tensión de 500 volts durante 15 horas, a 4°C.

Se eluyó la columna haciendo pasar el gradiente de glicerol por una celda de flujo continuo en el espectrofotómetro Zeiss (PMQ-II), para determinar la densidad óptica a 280 nm. El líquido emergente de la celda fue fraccionado y se determinó la actividad enzimática en cada fracción, por medio del método A.

### DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

El peso molecular fue determinado por dos métodos, filtración en gel y centrifugación en gradiente de glicerol. La enzima utilizada para estos ex-



perimentos fue previamente dializada según el método que se empleaba, o bien contra el buffer de equilibrio de la columna de Sepharosa 6B, o bien contra el buffer del gradiente de glicerol.

I. Filtración en gel: Se utilizó una columna de Sepharosa 6B de 2 x 48 cm, equilibrada con buffer TRIS-HCl pH 7,4 0,05 M, y EDTA 1 mM. La columna se calibró mediante el pasaje de 1 ml de una solución que contenía 2 mg de creatina quinasa, 2 mg de aldolasa, 2,5 mg de catalasa y 5 mg de tiroglobulina. Fue eluída con el mismo buffer de equilibrio a una velocidad de 10 ml/hora, y se recogieron fracciones de 1 ml. Se determinó la densidad óptica a 230 nm para detectar todas las proteínas, y además, la posición de la catalasa fue verificada midiendo la densidad óptica a 405 nm. La determinación del peso molecular de la sacarosa fosfato sintetasa fue realizada aplicando una muestra de 1,7 ml (15 mg de proteína) en sacarosa 20%. La elución se hizo en la misma forma que para las proteínas patrones y se determinó la posición de la enzima por su actividad, de acuerdo al método A.

II. Centrifugación en gradiente de glicerol (95): La enzima fue centrifugada en un gradiente lineal de 5 ml de glicerol entre 15 y 30% p/v, en un buffer HEPES 50 mM pH 6,5 y mercaptoetanol 5 mM. Se recogieron fracciones de 6 gotas, y en ellas se determinó la actividad enzimática por el método A. Se utilizaron como enzimas marcadoras catalasa que tienen un  $S_{20,w} = 11,3 S$  y un peso molecular de 240.000 (95), y fosforilasa cuyo  $S_{20,w} = 13,5$  y su peso molecular es 370.000 (108).

De acuerdo al tipo de experimento, el gradiente contenía además fructosa-6-P, UDFG, o  $MgCl_2$ .

### PREPARACION DE SACAROSA-6-P

Se preparó sacarosa-6-P incubando UDPG y fructosa-6-P en presencia de sacarosa fosfato sintetasa purificada. La mezcla de reacción contenía 400  $\mu$ moles de UDPG, 600  $\mu$ moles de fructosa-6-P, 2000  $\mu$ moles de buffer HEPES pH 6,5, 300  $\mu$ moles de PEP, 4000  $\mu$ moles de KCl, 800  $\mu$ moles de  $MgCl_2$ , 20 unidades de piruvato quinasa y 4 ml de sacarosa fosfato sintetasa (4,4  $\mu$ moles de sacarosa-6-P/ml/min) en un volumen total de 40 ml. Después de incubar 40 minutos a 30°C, se detuvo la reacción calentando por un minuto a 100°C. Se centrifugó la proteína desnaturalizada. El análisis de la mezcla de reacción indicó la formación de 360  $\mu$ moles de sacarosa-6-P (90% de rendimiento). La solución se ajustó a pH 8,5 con NaOH, y se aplicó a una columna de Dowex 1-borato de 2 x 56 cm. La columna se eluyó con un gradiente lineal de borato de amonio 0,2 M pH 8,6 (400 ml) a borato de amonio 0,8 M pH 8,6 (400 ml), de acuerdo a la técnica de Lefbvre et al. (109). El diagrama de elución puede verse en la fig. 5. Se juntaron las fracciones correspondientes al pico de sacarosa-6-P y se ajustó el pH a 7 por agregado de ácido bórico. La solución fue liofilizada y el bórico remanente fue eliminado con metanol.

La sacarosa-6-P que se obtuvo fue analizada determinándose su contenido en fosfato y fructosa. Por cromatografía descendente en papel Whatman N° 1 en etanol-acetato de amonio 1 M, pH 3,8 (7:3) (102), durante 30 horas, se pudo observar una sola mancha con un  $R_f$  de 0,56.

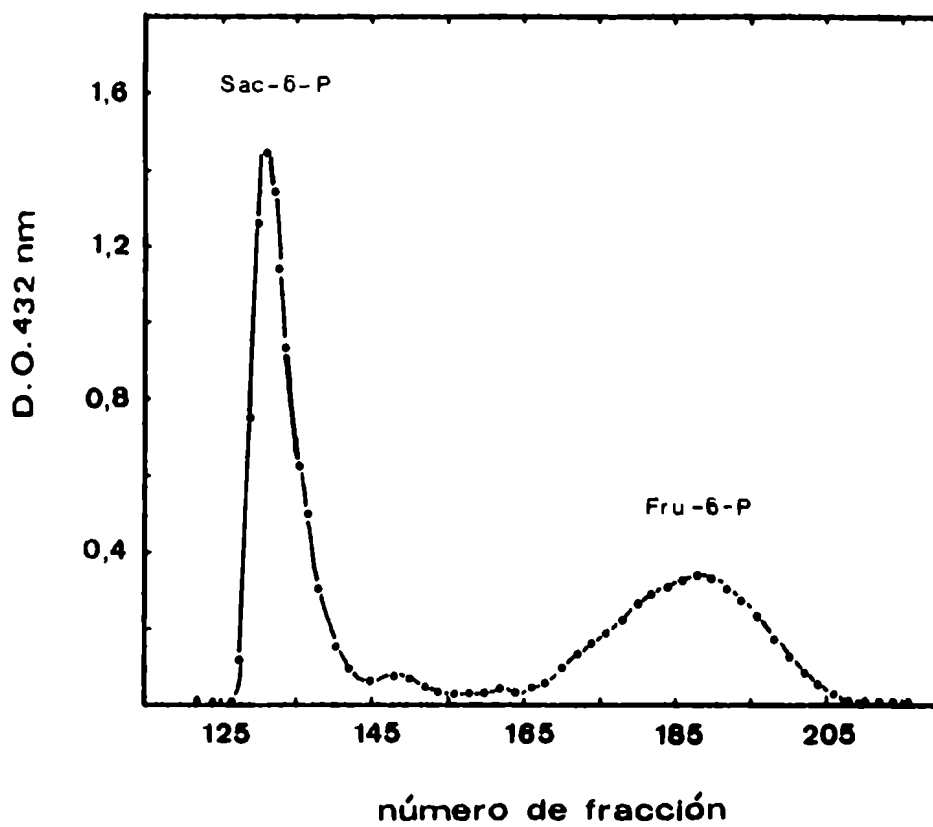


Fig. 5. Cromatografía en Dowex 1-borato. Se recogieron fracciones de 3,8 ml. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por el método del ácido tiobarbitúrico (100).

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

## EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA ENZIMA

### Procedimiento A

Preparación del homogenato: Se suspendieron 300 g de germen de trigo en 900 ml de buffer TRIS-HCl 5 mM pH 8, EDTA 5 mM, y cianuro de potasio 10 mM. Dicha suspensión fue agitada ocasionalmente y, después de una hora, fue filtrada a través de cuatro capas de muselina, descartándose el residuo. El filtrado fue centrifugado a 27.000 x g durante 30 minutos y el sobrenadante fue dializado contra 3 cambios de 8 litros de buffer TRIS-HCl 20 mM pH 8, mercaptoetanol 5 mM y EDTA 1 mM.

Fraccionamiento con sulfato de amonio: El dializado fue llevado a 40% de saturación con sulfato de amonio sólido. Se dejó equilibrar durante 30 minutos bajo constante agitación. Durante el fraccionamiento se mantuvo el pH entre 7 y 7,3 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 M. El precipitado formado se separó por centrifugación a 27.000 x g durante 20 minutos, y se descartó. El sobrenadante se llevó a 45% de saturación y se mantuvo con agitación constante por 30 minutos. Se separó el precipitado por centrifugación a 27.000 x g durante 20 minutos. El precipitado se suspendió en un mínimo volumen de buffer TRIS-HCl 20 mM pH 7,5, mercaptoetanol 5 mM y EDTA 1 mM. La suspensión fue luego dializada contra una solución de sulfato de amonio al 40%, pH 7, durante toda la noche. La suspensión equilibrada fue luego centrifugada a 40.000 x g por 30 minutos. El sobrenadante fue separado y el precipitado fue extraído con 1 ml de sulfato de amonio al 40%, separando el sobrenadante por centrifugación a 40.000 x g durante 20 minutos. Este procedimiento de extracción se repitió dos veces.

Después de determinar la actividad enzimática, se juntaron los sobrenadantes con mayor actividad de sacarosa fosfato sintetasa. La solución resultante fue dializada contra TRIS-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM y mercaptoetanol 5 mM.

Primera cromatografía en DEAE-celulosa: El dializado, al que se denominó E(0,1,2), fue cromatografiado en una columna de DEAE-celulosa de 2 x 20 cm equilibrada con el mismo buffer de diálisis. Después de pasar la muestra, se comenzó la elución con un gradiente lineal de cloruro de sodio (volumen total, 400 ml) entre 0,1 y 0,8 M disuelto en el mismo buffer de equilibrio. Se recogieron fracciones de 2 ml y se les determinó las actividades de sacarosa fosfato sintetasa y sacarosa sintetasa y se leyó la absorbancia a 280 nm [Fig. 6 (a)]. Se juntaron las fracciones con actividad de sacarosa fosfato sintetasa, y se concentraron en una celda de ultrafiltración Amicon con una membrana PM-10.

Segunda cromatografía en DEAE-celulosa: La solución enzimática concentrada se dializó contra 2 litros de buffer HEPES 20 mM pH 6,7, EDTA 1 mM y mercaptoetanol 5 mM en glicerol 20%. El dializado se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa 1 x 20 cm equilibrada con el mismo buffer de diálisis. Después de pasada la muestra, se comenzó la elución con un gradiente lineal entre 0 y 0,5 M en cloruro de sodio (volumen total, 80 ml) disuelto en el mismo buffer de equilibrio. Se recogieron fracciones de 1 ml, en las que se midió las actividades enzimáticas de sacarosa fosfato sintetasa y sacarosa sintetasa, y se leyó la densidad óptica a 280 nm [Fig. 6 (b)]. Se juntaron las fracciones con actividad de sacarosa fosfato sintetasa y se concentraron en una celda de ultrafiltración Amicon con membrana PM-10.

En la tabla 3 está tabulada una purificación de acuerdo al procedimiento A.

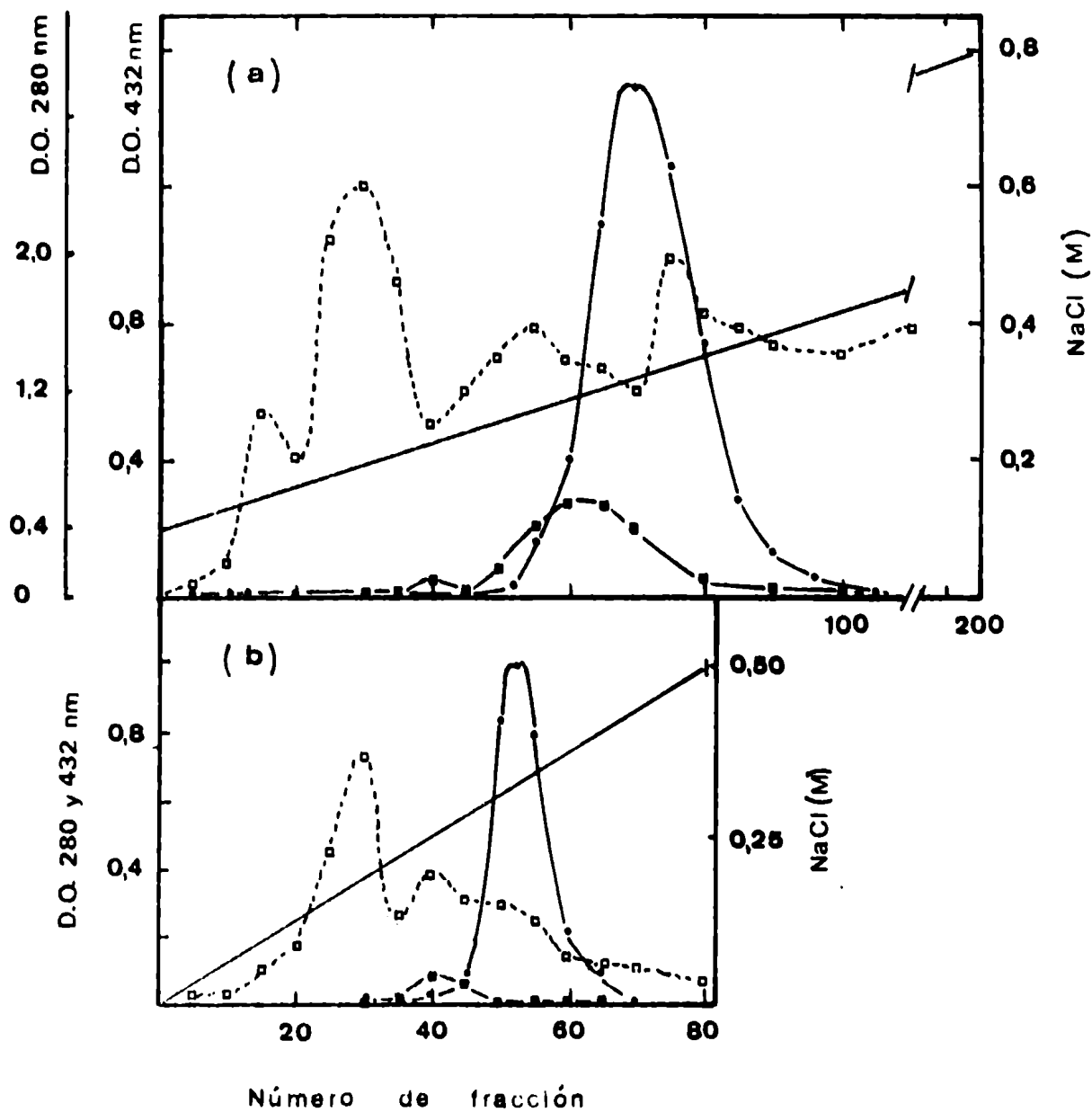


Fig. 6. Cromatografías en DEAE-celulosa. (a) Primera cromatografía; (b) Segunda cromatografía; (•) actividad de sacarosa fosfato sintetasa por el método A; (◼) actividad de sacarosa sintetasa; (◻) proteínas.

Tabla 3. Purificación de la enzima - Procedimiento A

Fracción:	Volumen ml	Actividad U/ml	Actividad total U	Proteína mg/ml	Actividad específica U/mg prot.	Purifica- ción	Recupera- ción %
Homogenato dializado	440	77	33.880	38	2,02	1	100
Sulfato de amonio 40-45%	8,3	861	7.146	53	16,24	8	21
E (0, 1, 2)	11,4	355	4.047	21	16,90	8,4	12
1ra DEAE-celulosa	2,3	1.360	3.128	19	71,60	35,4	9,2
2da DEAE-celulosa	2,0	1.266	2.532	4,8	263,75	130	7,4

Una unidad (U) de sacarosa fosfato sintetasa cataliza la formación de 1 nmol de sacarosa-6-P/minuto, a 30°C.



### Procedimiento B

Preparación del homogenato: Se suspendieron 200 g de germen de trigo en 600 ml de buffer TRIS-HCl 5 mM pH 8, EDTA 5 mM, y cianuro de potasio 10 mM. Dicha suspensión fue agitada ocasionalmente y, después de una hora, fue filtrada a través de cuatro capas de muselina, descartándose el residuo. El filtrado fue centrifugado a 27.000 x g durante 30 minutos y el sobrenadante fue dializado contra 3 cambios de 6 litros de buffer TRIS-HCl 20 mM pH 8, mercaptoetanol 5 mM y EDTA 1 mM.

Fraccionamiento con sulfato de amonio: Al homogenato dializado se le agregó sulfato de amonio hasta 35% de saturación controlando el pH después de agregada la sal y manteniéndolo entre 7 y 7,3 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 M. Se centrifugó a 27.000 x g durante 20 minutos. El precipitado fue descartado y el sobrenadante se llevó a 45% de saturación, dejándose 30 minutos con agitación continua. Se centrifugó a 27.000 x g por 20 minutos y el precipitado se resuspendió en el volumen de buffer HEPES 20 mM pH 6,5, mercaptoetanol 5 mM y EDTA 1 mM. La suspensión fue dializada contra el mismo buffer con tres cambios de un litro cada uno, durante toda la noche. Esta fracción contiene sacarosa sintetasa, sacarosa fosfato sintetasa y fosfatasas no específicas.

Primera cromatografía en DEAE-celulosa: La solución dializada se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa de 3 x 20 cm equilibrada con el mismo buffer de diálisis. Después de pasar la muestra se eluyó con un gradiente lineal de 0 - 0,5 M de cloruro de sodio disuelto en el buffer de equilibrio (volumen total, 900 ml). Se recogieron fracciones de 4,5 ml, donde se midieron las actividades de sacarosa fosfato sintetasa y sacarosa sintetasa. El

diagrama de elución que se obtuvo [fig. 7 (a)] muestra la separación entre ambas enzimas. La elución de las proteínas fue seguida determinando la densidad óptica a 280 nm.

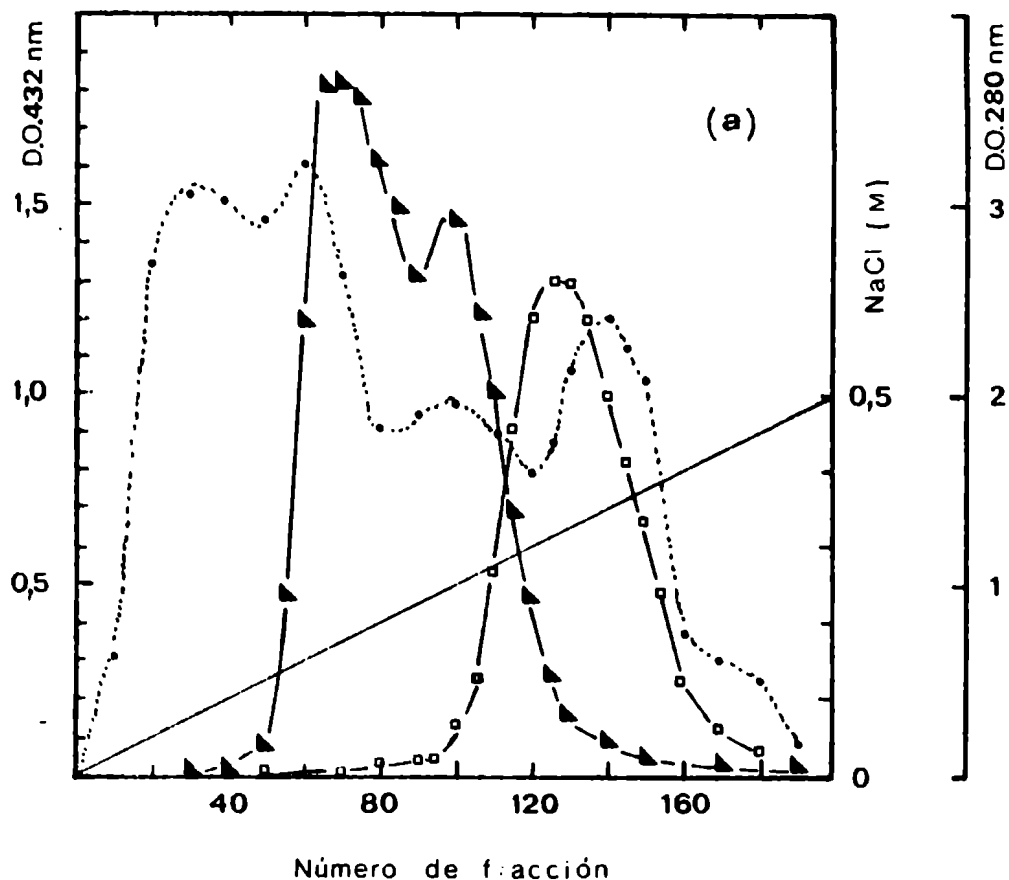


Fig. 7 (a). Primera cromatografía en DEAE-celulosa. (◻) actividad de sacarosa fosfato sintetasa medida por el método A; (▴) actividad de sacarosa sintetasa; (·) proteínas.

Segunda cromatografía en DEAE-celulosa: Las fracciones que correspondían al pico de actividad de sacarosa fosfato sintetasa, se juntaron y dializaron contra buffer HEPES 20 mM pH 6,5 mercaptoetanol 5 mM, y EDTA 5 mM en glicerol 20%. El dializado se pasó por una columna de DEAE-celulosa de 2 x 20 cm previamente equilibrada con el buffer de diálisis. Después de pasar la muestra,

se eluyó con un gradiente lineal entre 0 y 0,5 M de cloruro de sodio disuelto en el buffer de equilibrio de la columna (volumen total, 400 ml). Se recogieron fracciones de 2 ml y se midieron las actividades de sacarosa fosfato sintetasa y sacarosa sintetasa. La elución de proteínas fue seguida leyendo la densidad óptica a 280 nm [fig. 7 (b)].

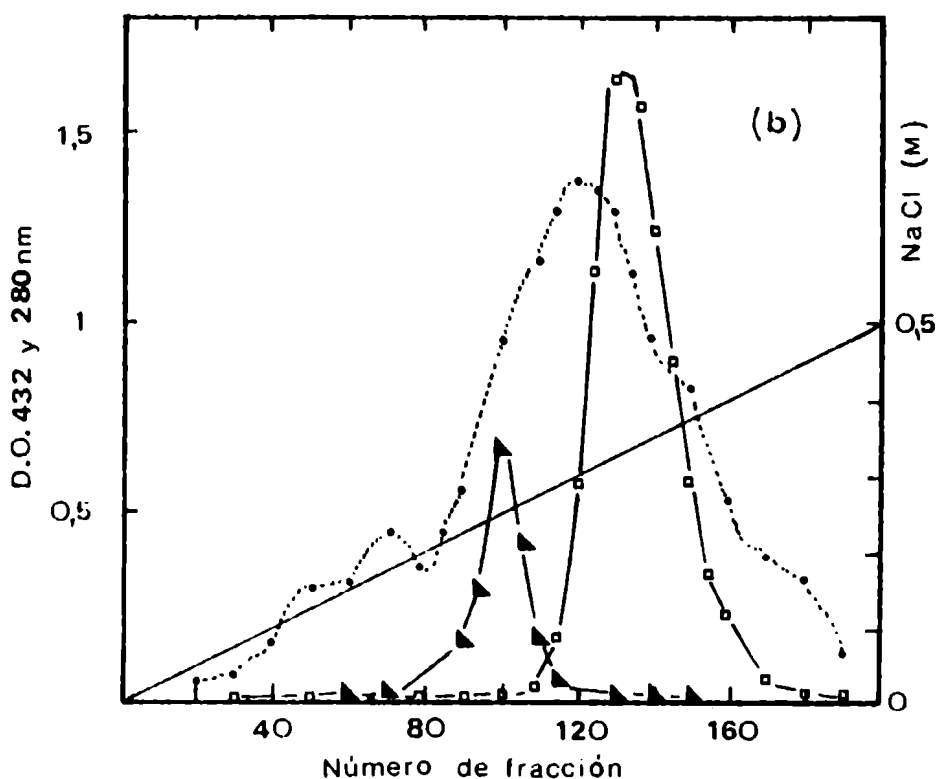


Fig. 7 (b). Segunda cromatografía en DEAE-celulosa. (□) actividad de sacarosa fosfato sintetasa medida por el método A; (▲) actividad de sacarosa sintetasa; (•) proteínas.

Se juntaron las fracciones con actividad de sacarosa fosfato sintetasa y se concentraron en una celda de ultrafiltración Amicon con membrana PM-10. La enzima concentrada fue dializada contra buffer TRIS-HCl 50 mM pH 7,5 y fructosa-6-P 5 mM.

Cromatografía en Sepharosa 6B: 0,8 ml de enzima (15 mg de proteína) fueron cromatografiados en una columna de Sepharosa 6B de 2 x 42 cm equilibrada con el mismo buffer en que se había dializado la enzima. Se recogieron fracciones de 1 ml a las que se les determinó la actividad de sacarosa fosfato sintetasa y la densidad óptica a 280 nm. Se juntaron las fracciones con mayor actividad específica (fig. 8) y se concentraron por diálisis con vacío en sacos de colodio.

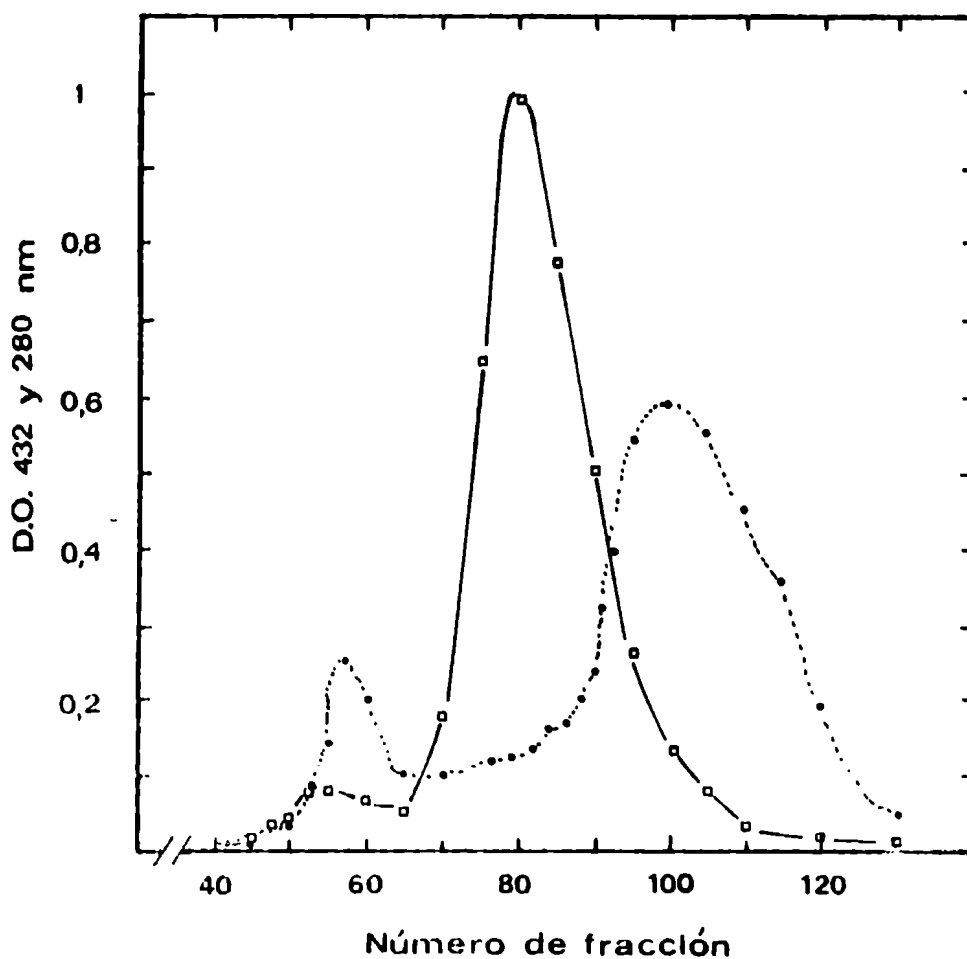


Fig. 8. Cromatografía en Sepharosa 6B. (□) actividad de sacarosa fosfato sintetasa medida por el método A. (•) proteína.

En la tabla 4 están tabulados los datos correspondientes a una purificación de acuerdo al procedimiento B.

Tabla 4. Purificación de la enzima - Procedimiento B

Fracción	Volumen ml	Actividad U/ml	Actividad total U	Proteína mg/ml	Actividad específica U/mg prot.	Purifica- ción	Recupera- ción %
Homogenato dializado	305	81	24.705	41	1,97	1	100
Sulfato de amonio 35-45%	34,1	645	21.994	81	7,9	4	89
1 <sup>ra</sup> DEAE-celulosa	118	178	21.004	8,6	20,7	10,5	85
2 <sup>da</sup> DEAE-celulosa	64	220	14.080	1,6	137,5	69,8	57
2 <sup>da</sup> DEAE-celulosa (concentrada)	5,4	2.570	13.878	18,6	138,1	70	56
Sepharosa 6B (a)	1,1	459	505	0,675	680	345	(b) 13 (24)

(a) Datos correspondientes a una muestra de 0,8 ml de enzima de la 2<sup>da</sup> DEAE-celulosa concentrada. Unidades totales aplicadas: 2056.

(b) El porcentaje entre paréntesis corresponde a la recuperación respecto de la etapa anterior.

Una unidad (U) de sacarosa fosfato sintetasa cataliza la formación de 1 nmol de sacarosa-6-P/minuto, a 30°C.

Electroforesis en gel de poliacrilamida: La enzima obtenida en el paso anterior fue sometida a electroforesis en poliacrilamida, y el resultado se observa en la fig. 9.

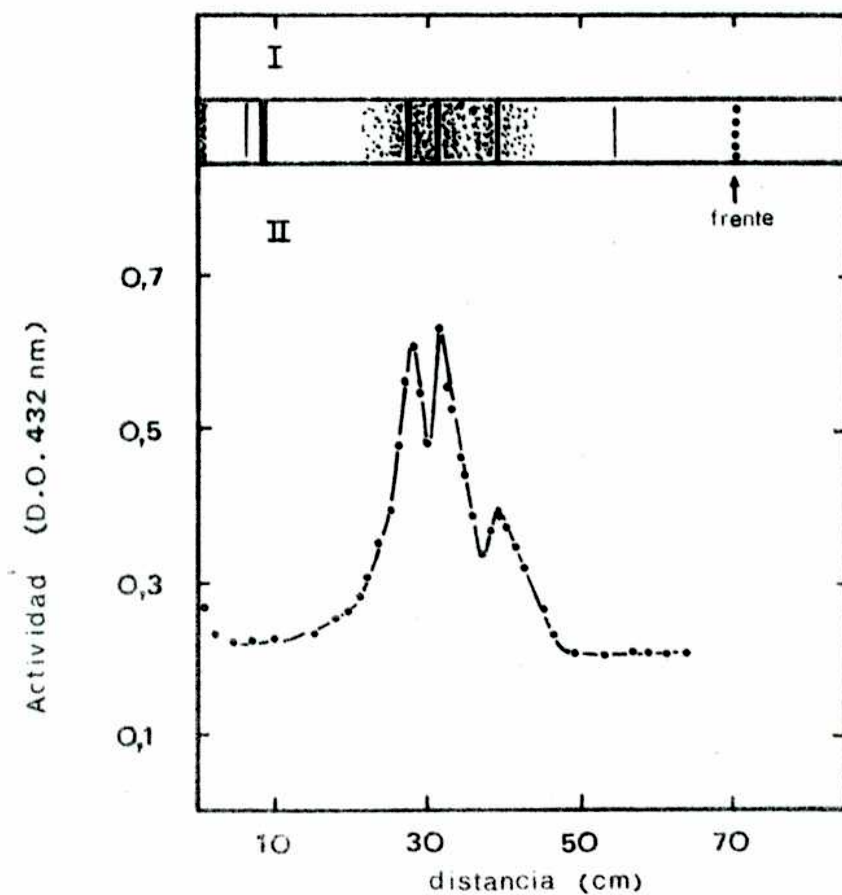


Fig. 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida. (I) Bandas obtenidas por tinción con Amido Schwarz; (II) Actividad de la enzima, por el método A, en secciones de 1 mm de gel.

PROPIEDADES GENERALES DE LA ENZIMA

ESTABILIDAD

A los efectos de estudiar la estabilidad de la enzima, el homogenato dializado se centrifugó a 100.000 x g por una hora. Alícuotas del sobrenadante se mantuvieron a distintos pH, por 5 minutos a 50°C, en ausencia y en presencia de fructosa-6-P 10 mM. Luego se midió la actividad al pH óptimo por el método A (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad de sacarosa fosfato sintetasa mantenida a distintos pH durante 5 minutos a 50°C.

Buffer 20 mM	pH	Actividad remanente (%)	
		Sin fru-6-P	Con fru-6-P 10 mM
MES	5,2	8	38
MES	6,0	13	45
MES	6,4	20	53
HEPES	6,8	55	58
HEPES	7,8	60	64

También se estudió la variación de la estabilidad de la enzima a baja temperatura en presencia y ausencia de fructosa-6-P 10 mM, para lo cual se mantuvo a 0°C durante 20 y 72 horas, a distintos pH. La actividad fue determinada al pH óptimo por el método A (fig. 10).

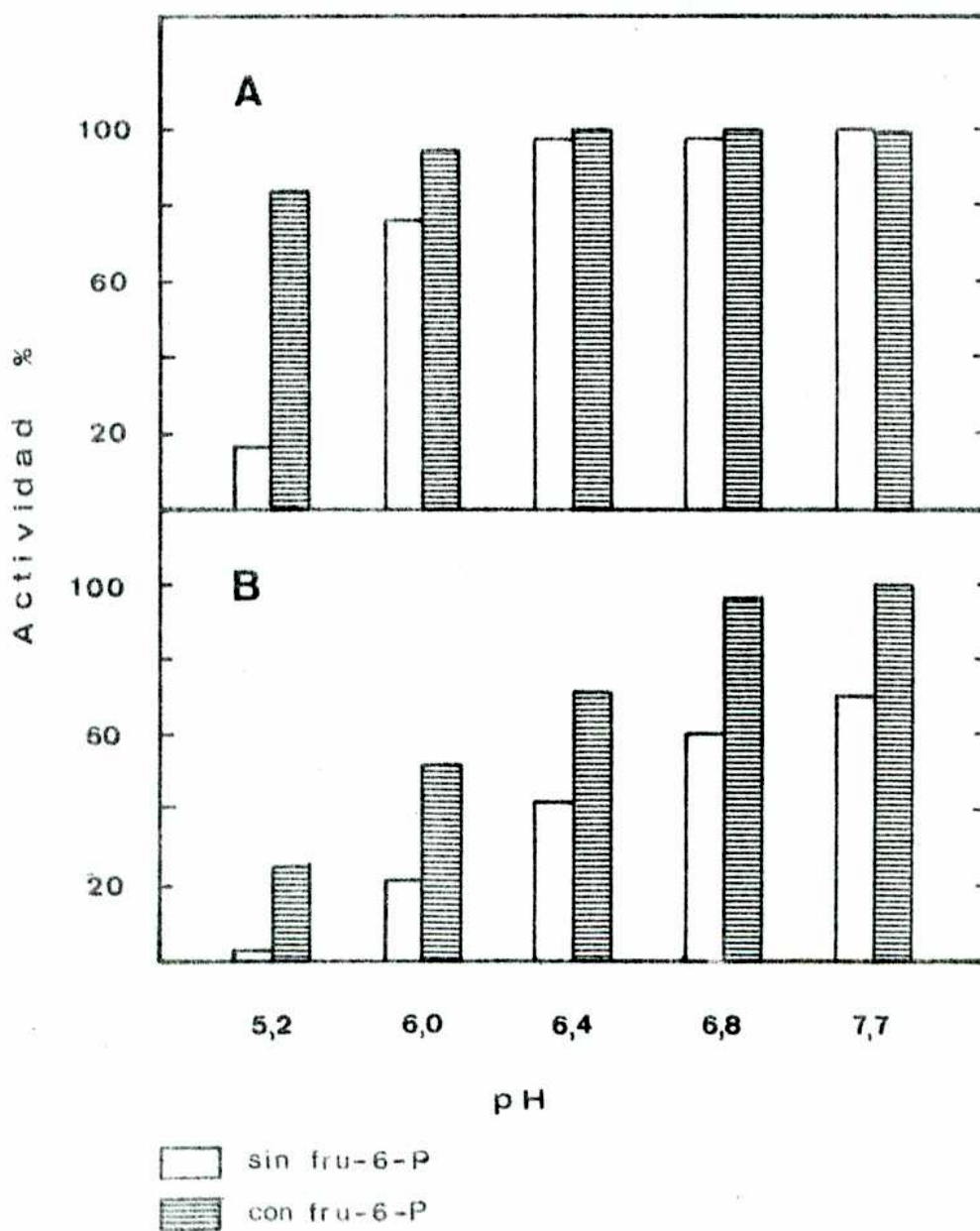


Fig. 10. Actividad de la sacarosa fosfato sintetasa cuando fue mantenida a distintos pH a 0°C: (A) durante 20 horas; (B) durante 72 horas, en presencia y ausencia de fructosa-6-P 10 mM. La enzima se encontraba en buffer MES 20 mM a pH 5,2, 6 y 6,4 y en buffer HEPES 20 mM a pH 6,8 y 7,7.



Por otra parte, mientras se desarrollaba el método de purificación de la enzima, se estudió la estabilidad de la misma a lo largo del tiempo cuando se la guardaba bajo condiciones diferentes (Tabla 6).

Tabla 6. Estabilidad de la enzima guardada bajo diferentes condiciones.

Temperatura °C	Tiempo Meses	Actividad remanente (%)	Etapas de la purificación
-50	1	84	Proc. B, segunda DEAE <sup>a</sup>
-50	1	100	Proc. B, segunda DEAE <sup>a, b</sup>
-20	11	45	Proc. A, primera DEAE
-20	1	32	Proc. A, segunda DEAE
-20	1	86	Proc. A, segunda DEAE <sup>a</sup>
-20	1	82	Proc. B, segunda DEAE <sup>a</sup>
-20	1	98	Proc. B, segunda DEAE <sup>a, b</sup>
0	1	90	Proc. B, segunda DEAE <sup>a</sup>
0	1	100	Proc. B, segunda DEAE <sup>a, b</sup>
0	2	51	Proc. B, segunda DEAE <sup>a</sup>
0	4	11	Proc. B, segunda DEAE <sup>a</sup>

En todos los casos se usó buffer HEPES 20 mM pH 7,4.

- (a) El buffer en el que se guardaba la enzima contenía 20% de glicerol.  
 (b) El buffer contenía fructosa-6-P 10 mM.

enzima podía, además, ser liofilizada, reteniendo el 80% de su actividad.

DETERMINACION DEL pH OPTIMO

El pH óptimo hallado para la enzima fue de alrededor de 6,5, como se puede observar en la curva de actividad en función del pH (fig. 11).

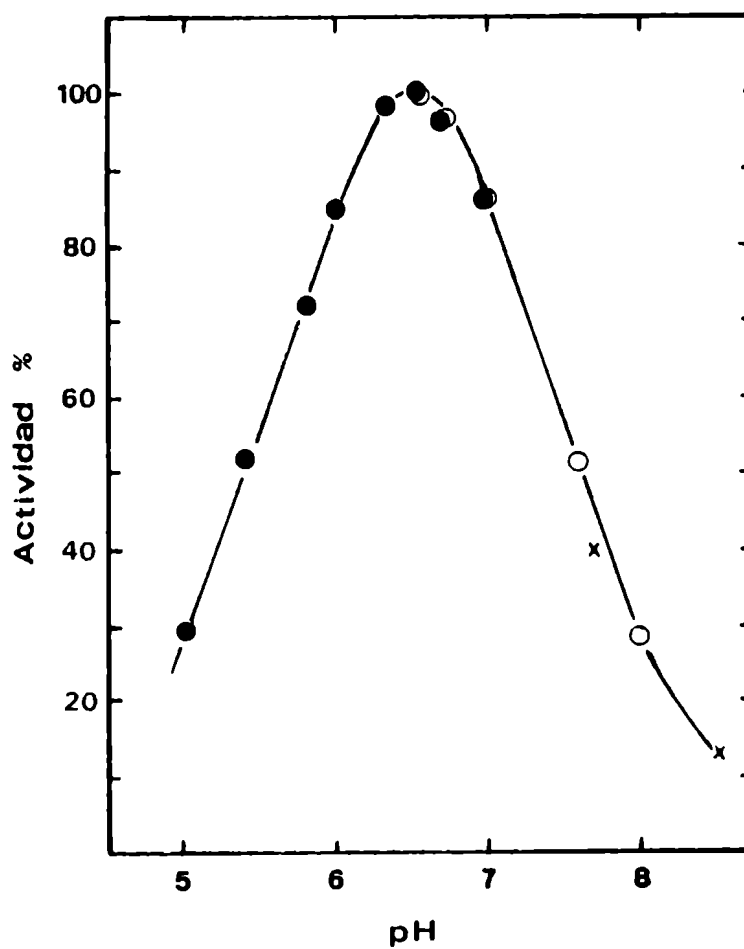


Fig. 11. Actividad de la sacarosa fosfato sintetasa a distintos pH, determinada por el método A. Se emplearon, para los diferentes pH los buffers: (●) MES, (○) HEPES, (x) TRIS-HCl, a una concentración final de 0,1 M.

Con el objeto de comprobar si la actividad de la enzima era modificada por la naturaleza del buffer utilizado en las incubaciones, se determinó aquélla usando distintos buffers al pH óptimo (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad de sacarosa fosfato sintetasa al pH óptimo en presencia de distintos buffers.

Buffer (#)	<u>nmoles de sac-6-P</u> min·ml de enzima	Actividad %
MES	611	98
PIPES	614	99
HEPES	620	100
TRIS-Maleato	353	57
Citrato	465	75
Fosfato	316	51
EDTA	552	89

(#) Los buffers se encontraban presentes en el medio de incubación a una concentración final de 100 mM.

#### DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO

La fig. 12 (A) muestra los resultados obtenidos cuando se sometió la enzima a electroenfocado con un amplio rango de pH (3-10), y la fig. 12 (B), cuando el rango de pH estuvo limitado entre 4 y 6. El pico de actividad de la sacarosa fosfato sintetasa corresponde a un punto isoeléctrico de 5,1.

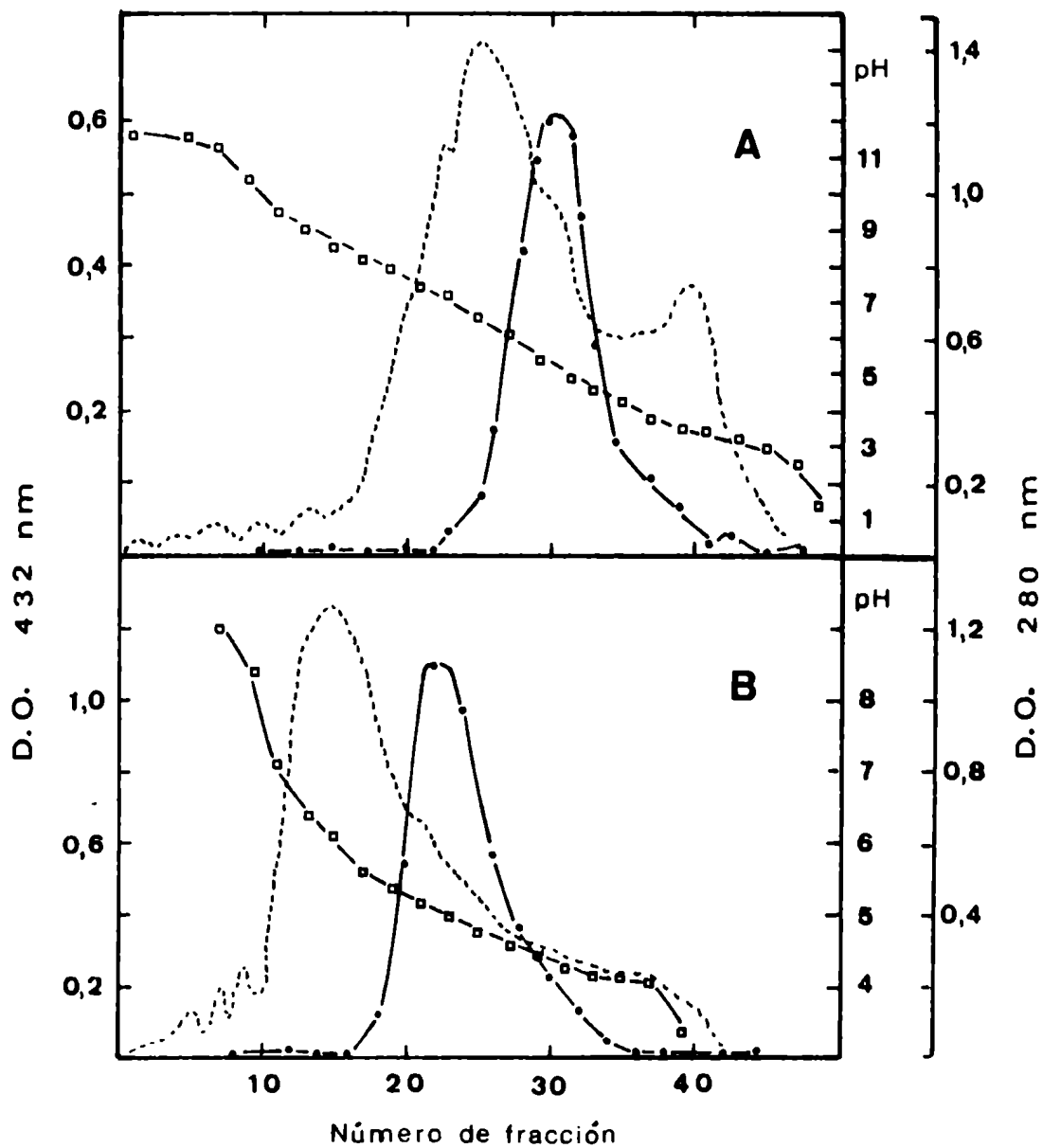


Fig. 12. Electroenfocado. Se determinó la actividad de sacarosa fosfato sintetasa por el método A (•), el pH (□), y la densidad óptica a 280 nm (···). (A) rango de pH 3-10, (B) rango de pH 4-6.

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

1) Por filtración en gel

El peso molecular hallado para la sacarosa fosfato sintetasa de germen de trigo por filtración en gel fue de alrededor de 380.000 - 390.000 (fig. 13).

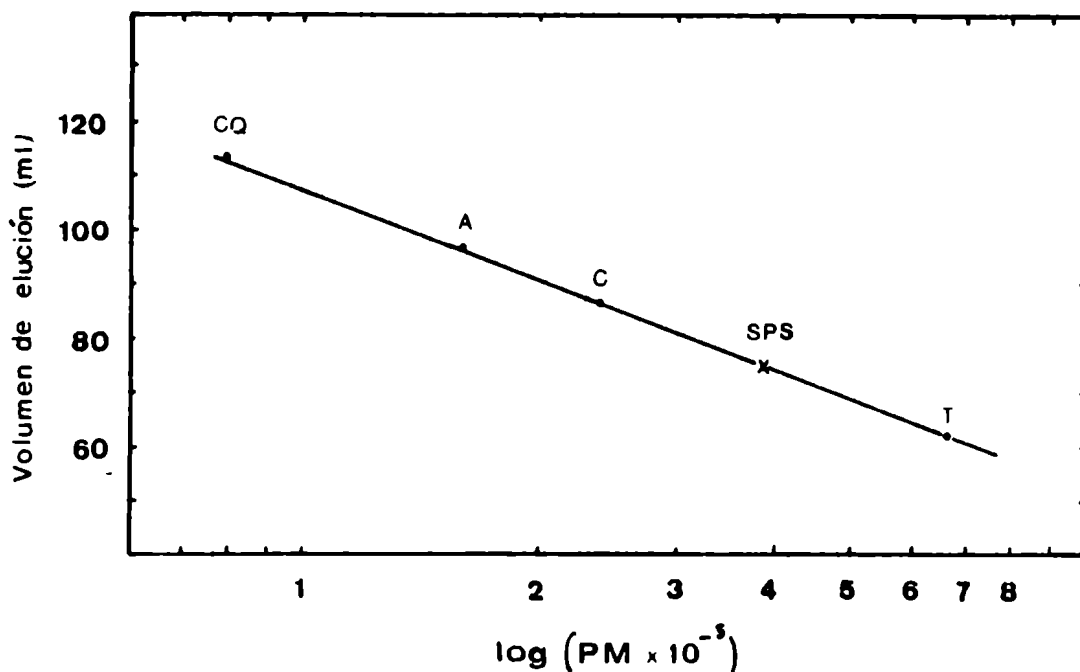


Fig. 13. Determinación del peso molecular de la sacarosa fosfato sintetasa, en Sepharosa 6B. CQ: creatinaquinasa (PM 80.000; A: aldolasa (PM 150.000); C: catalasa (PM 240.000); SPS: sacarosa fosfato sintetasa; T: tiroglobulina (PM 660.000).

Se encontró en algunas preparaciones de enzima, cuando se pasaban a través de Sepharosa 6B, más de un pico con actividad de sacarosa fosfato sintetasa (fig. 14).

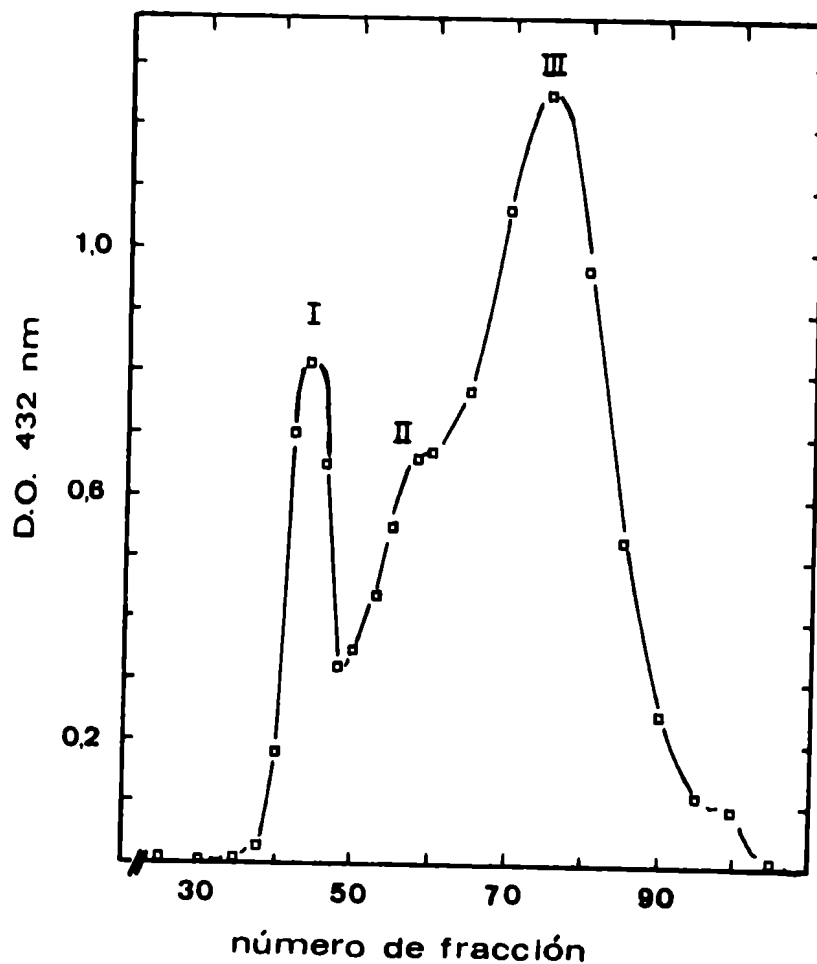


Fig. 14. Cromatografía en Sepharosa 6B. La actividad de las fracciones se determinó mediante el método A.

Los picos que se observan en la fig. 14 corresponden a un peso molecular aproximado de 390.000, 800.000 y más de 1.000.000. Este tipo de diagramas no se alteraba cuando la enzima era pasada por una columna de Sepharosa 6B previamente equilibrada con un buffer que contenía  $MgCl_2$  10 mM o fructosa-6-P 10 mM.

Se pudo aislar, aunque con muy bajo rendimiento, uno de los picos de aparente peso molecular más alto (I), y se lo volvió a someter a un pasaje por Sepharosa 6B (fig. 15).

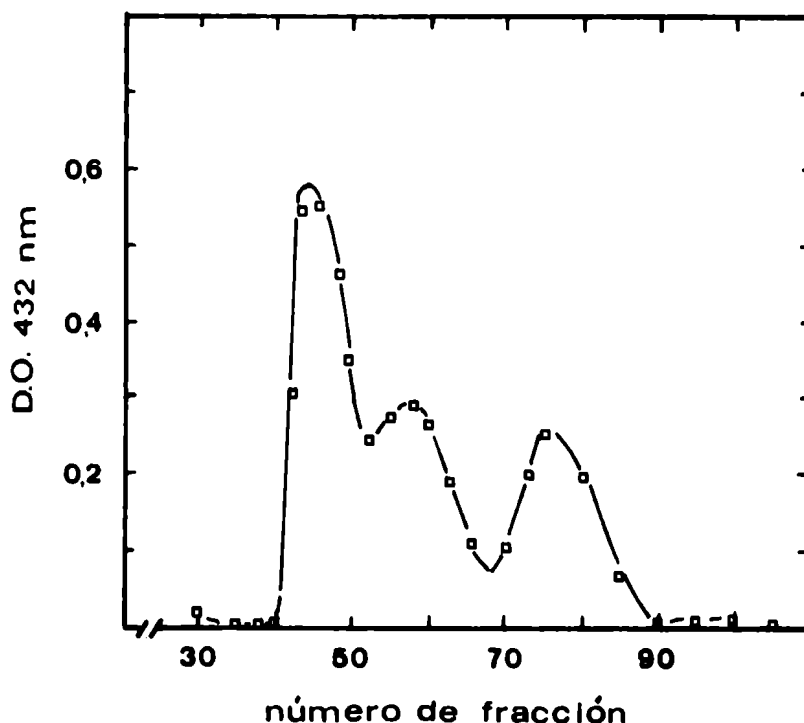


Fig. 15. Cromatografía en Sepharosa 6B del pico I de la fig. 14. Se midió la actividad por el método A.

Al recorrer el pico I se obtuvieron nuevamente varios picos con actividad enzimática en posiciones similares a las de la fig. 14; o sea el pico de peso molecular aproximado de 390.000 y los de peso molecular más alto.

## 2) Por centrifugación en gradiente de glicerol

El coeficiente de sedimentación estimado de acuerdo al método de Martin y Ames (95) usando como patrón fosforilasa ( $S_{20,w} = 13,5 S$ ) fue  $S_{20,w} = 13,9 \pm 0,5 S$ , lo que corresponde a un peso molecular aproximado de  $386.000 \pm 20.000$ . La posición de sacarosa fosfato sintetasa se encuentra prácticamente superpuesta con la de fosforilasa (fig. 16).

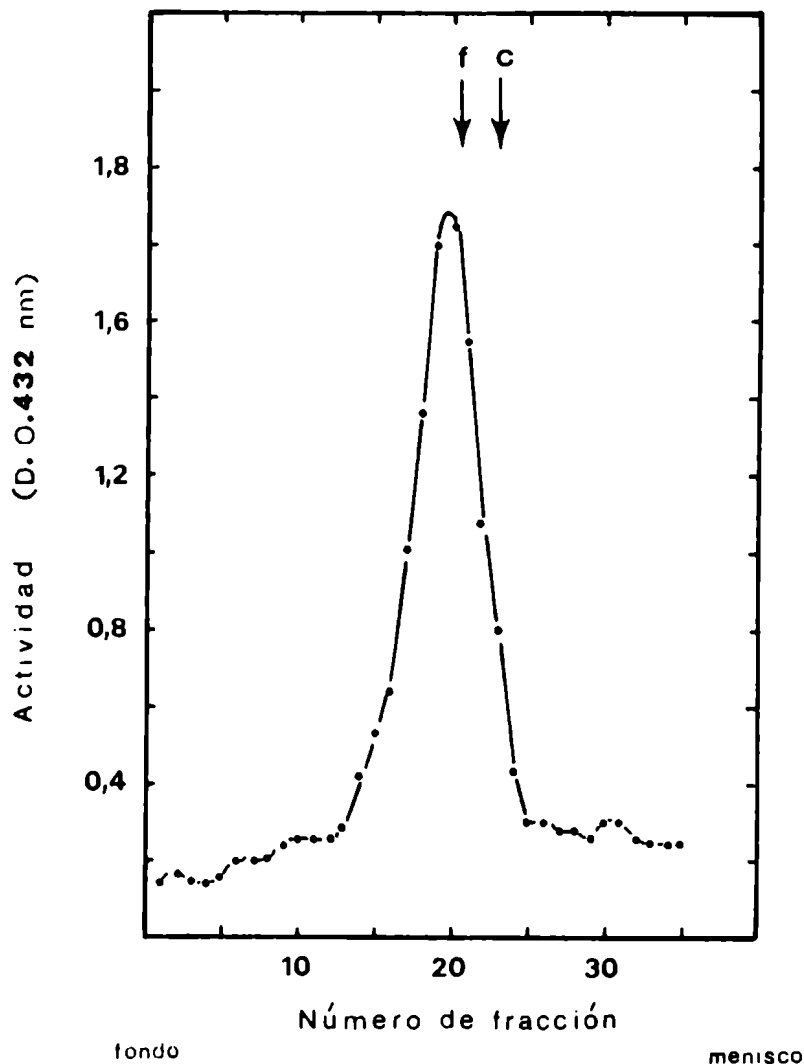


Fig. 16. Centrifugación en gradiente de glicerol 15-30%. La actividad de sacarosa fosfato sintetasa fue medida por el método A. Las flechas indican las posiciones de los máximos correspondientes a (f) fosforilasa y (c) catalasa.

Se hicieron también gradientes que contenían además fructosa-6-P 10 mM, o UDPG 5 mM o  $MgCl_2$  10 mM, con objeto de ver si se observaba alguna modificación en la forma en que sedimentaba la sacarosa fosfato sintetasa. Los resultados obtenidos (fig. 17) no muestran diferencia apreciable en la sedimentación de la enzima.



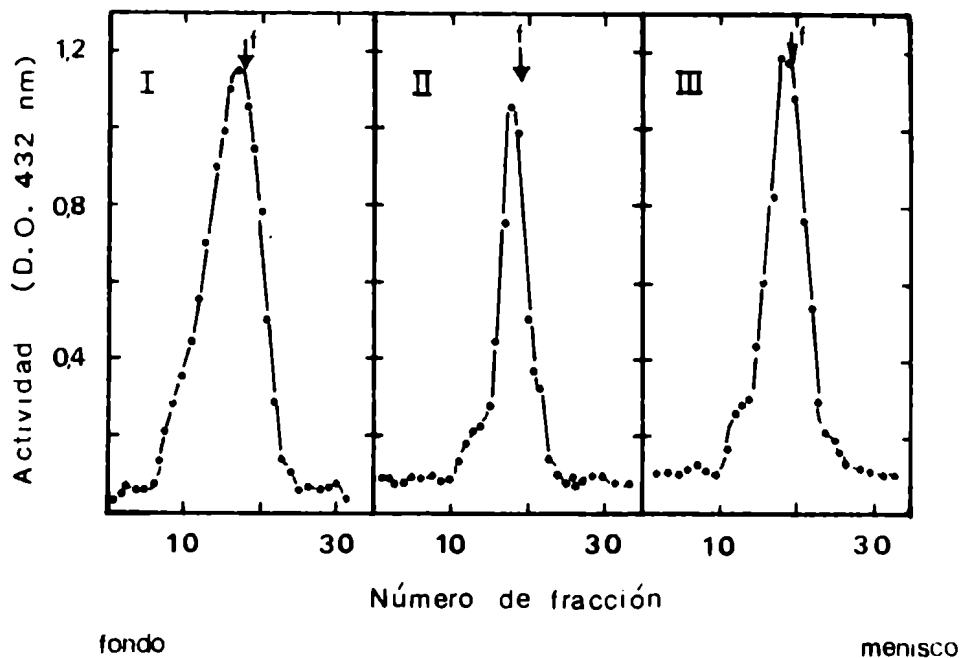


Fig. 17. Centrifugación en gradiente de glicerol 15-30%. El buffer contenía además: (I) fructosa-6-P 10 mM; (II) UDPG 5 mM; (III)  $MgCl_2$  10 mM. Se determinó la actividad enzimática por el método A. (f) posición del máximo de fosforilasa.

Para ver si existía algún fenómeno de asociación entre sacarosa sintetasa y sacarosa fosfato sintetasa, se procedió a centrifugar una mezcla de ambas enzimas en un gradiente de glicerol 15-30%. Ambas enzimas sedimentaron como si estuviesen solas (fig. 18).

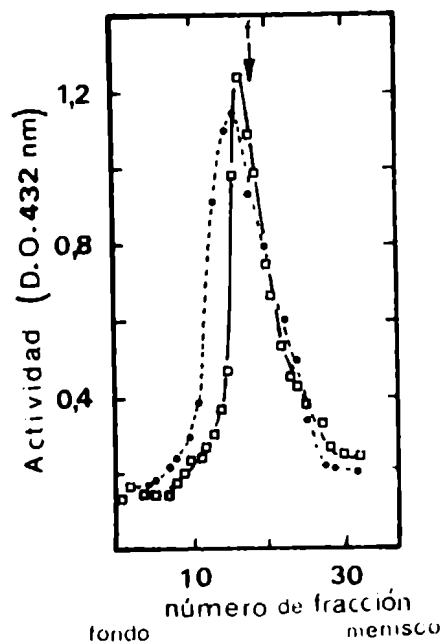


Fig. 18. Centrifugación en gradiente de glicerol 15-30%. (o) actividad de sacarosa fosfato sintetasa por el método A. (•) actividad de sacarosa sintetasa. (f) posición del máximo de fosforilasa.

EFEECTO DE DIFERENTES COMPUESTOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMAEfecto del p-cloromercuribenzoato (PCMB)

Quando se incubó la enzima con concentraciones variables de PCMB se produjo una disminución de la actividad que llegó hasta el 100% (fig. 19).

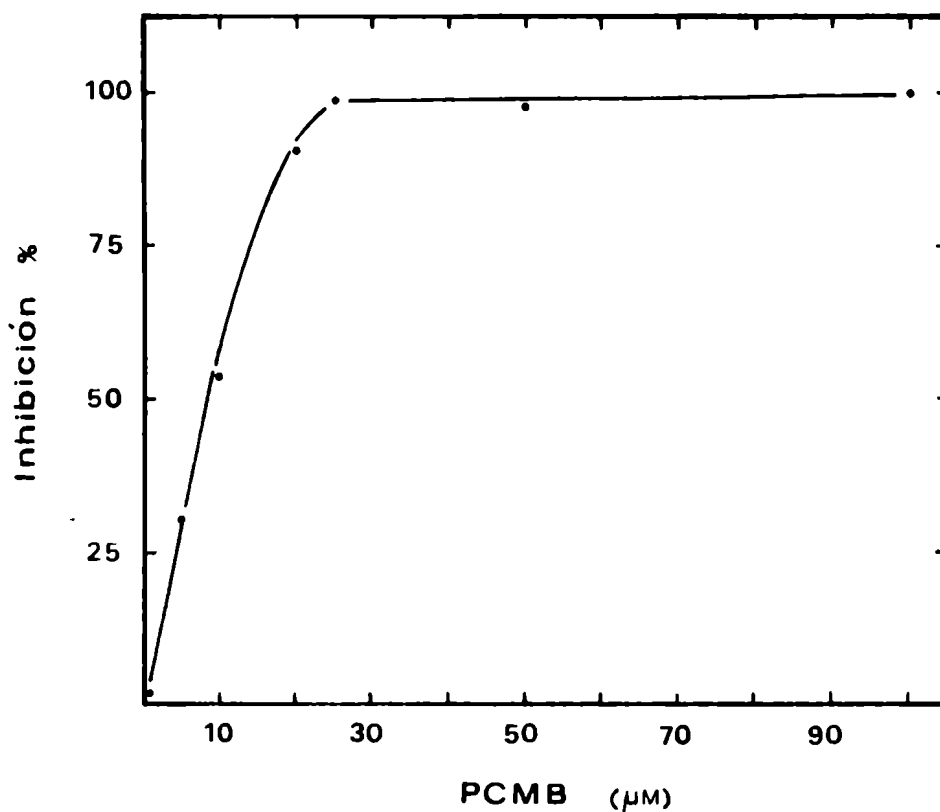


Fig. 19. Efecto del p-cloromercuribenzoato (PCMB). Se preincubó la enzima (0,013 mg de proteína) con diferentes concentraciones de PCMB durante 5 minutos a 30°C y luego se determinó su actividad por el método A.

La inhibición producida por el PCMB pudo ser revertida tanto por el agregado de DTT (fig. 20) como por la adición de β-mercaptoetanol (fig. 21).

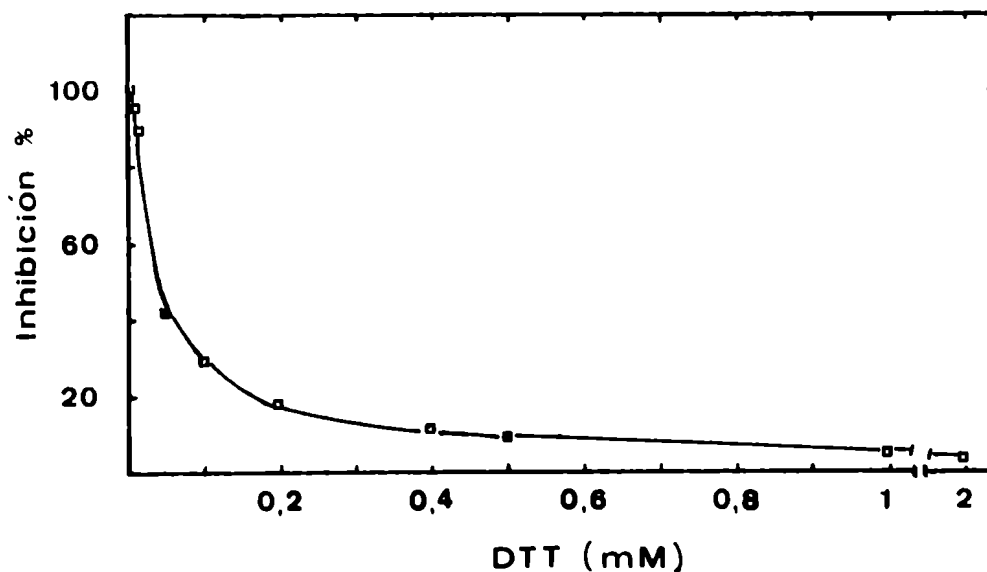


Fig. 20. Reversión de la inhibición producida por PCMB, por DTT. Se preincubó la enzima (0,013 mg de proteína) con PCMB (25  $\mu$ M final) por 5 minutos a 30°C y luego se le agregó diferentes concentraciones de DTT. Se determinó la actividad por el método A.

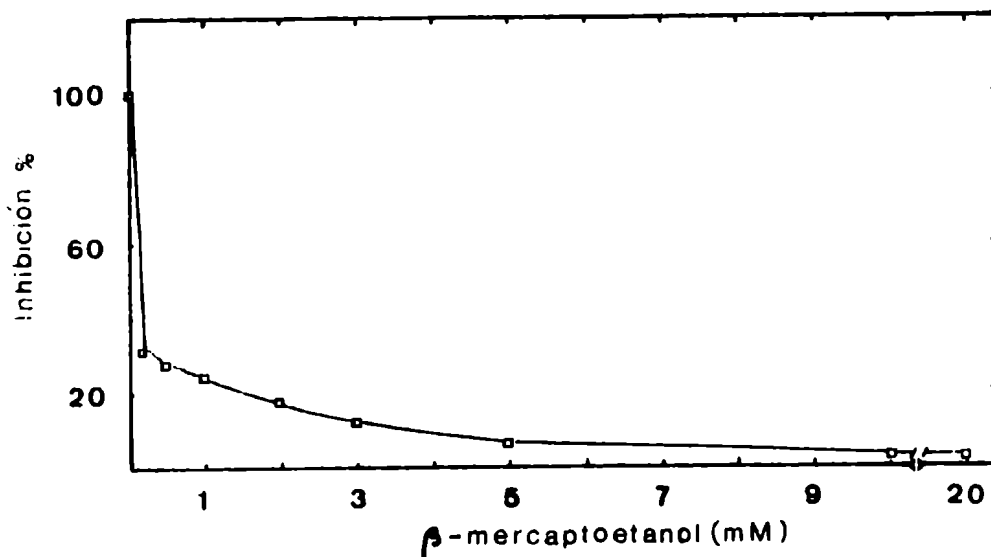


Fig. 21. Reversión de la inhibición producida por PCMB por  $\beta$ -mercaptoetanol. Se preincubó la enzima con PCMB (25  $\mu$ M final) por 5 minutos a 30°C y luego se le agregó cantidades diferentes de  $\beta$ -mercaptoetanol. La actividad se midió por el método A.

Influencia de cationes

Cationes monovalentes. Para poder estudiar el efecto de cationes monovalentes como  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , se midió la actividad de la enzima en presencia de UDPG, fructosa-6-P y HEPES como sales de TRIS. En la tabla 8 se encuentran los resultados obtenidos cuando el  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , como acetatos, estaban presentes en el medio de incubación en distintas concentraciones.

Tabla 8. Efecto de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$

Adición	Concentración mM	Sacarosa-6-P formada nmoles/min·ml enzima	Actividad %
Ninguna	—	580	100
$\text{Na}^+$	20	578	99
	50	580	100
	100	582	100
$\text{K}^+$	20	580	100
	50	575	99
	100	575	99
	200	570	98

Cationes bivalentes. Los cationes bivalentes,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , activan la síntesis de la sacarosa-6-P (81,92,97,98). Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  en la actividad de la sacarosa fosfato sintetasa (fig. 22). La actividad se incrementa llegando a una meseta.

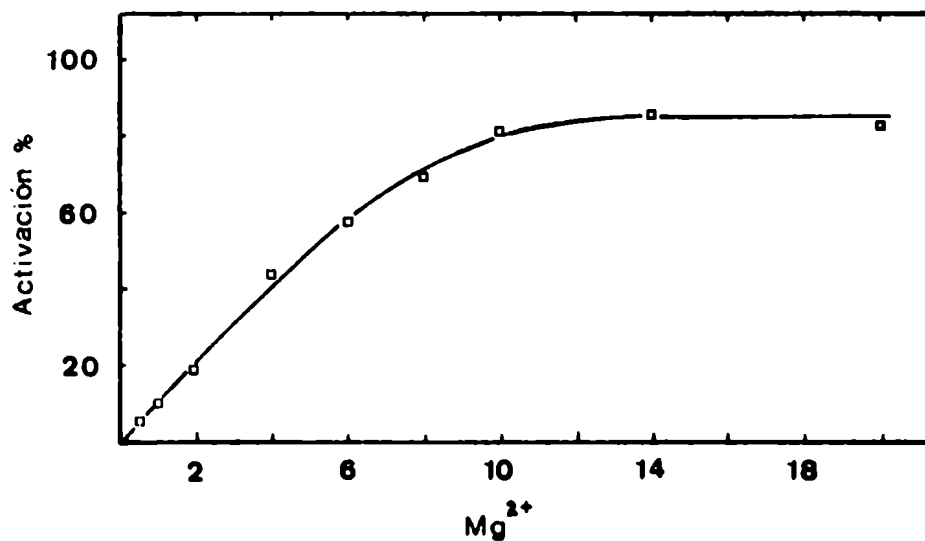


Fig. 22. Efecto del  $MgCl_2$  sobre la actividad de la sacarosa fosfato sintetasa, medida por el método A.

Quando se graficaron las inversas de las velocidades en función de las inversas de las concentraciones de  $Mg^{2+}$ , se obtuvo una recta de la cual se sacó la velocidad máxima (fig. 23). La  $K$  aparente para el  $Mg^{2+}$  fue de 1,3 mM. La velocidad máxima se usó para construir un gráfico de Hill (110) (gráfico inserto en la fig. 23) que dio un coeficiente de 1,66.

La adición de  $Mn^{2+}$  al medio de incubación provocó también un aumento significativo de la síntesis de sacarosa-6-P (fig. 24).

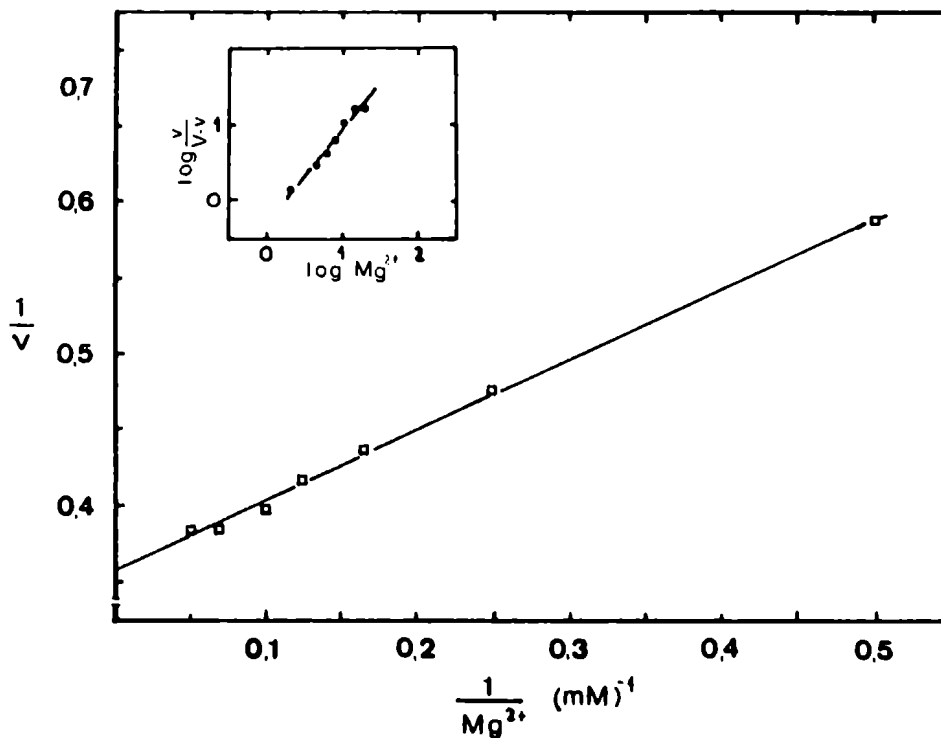


Fig. 23. Influencia del  $Mg^{2+}$  en la actividad de la enzima. Gráfico de inversas. La actividad fue medida por el método A. La velocidad está expresada en  $\mu$ moles de sac-6-P formados/min·ml.

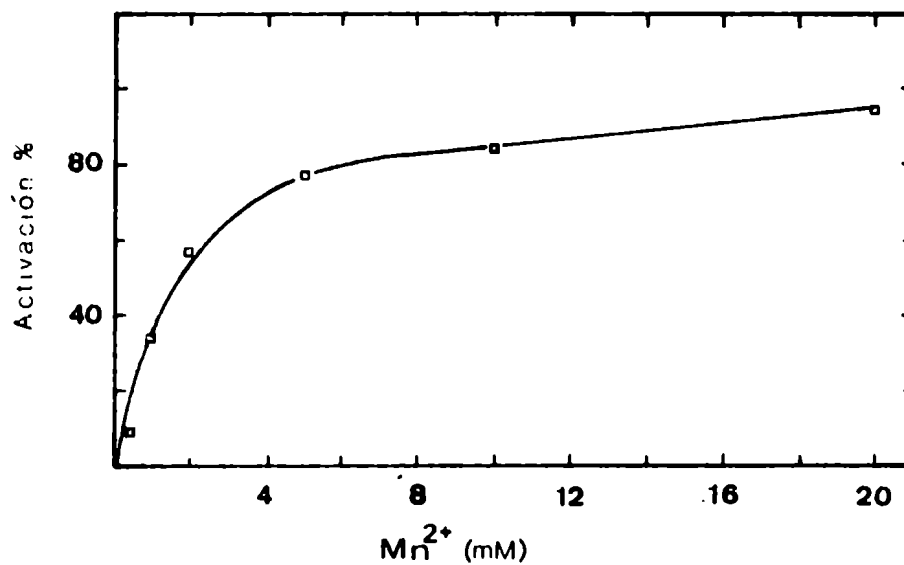


Fig. 24. Efecto del  $Mn^{2+}$ . La actividad fue medida por el método A.

Del gráfico de inversas se obtuvo la velocidad máxima y la K aparente para  $Mn^{2+}$ , 0,44 mM. La velocidad máxima determinada se usó para construir un gráfico de Hill (fig. 25 y gráfico inserto en la misma), que dió un coeficiente de 1.

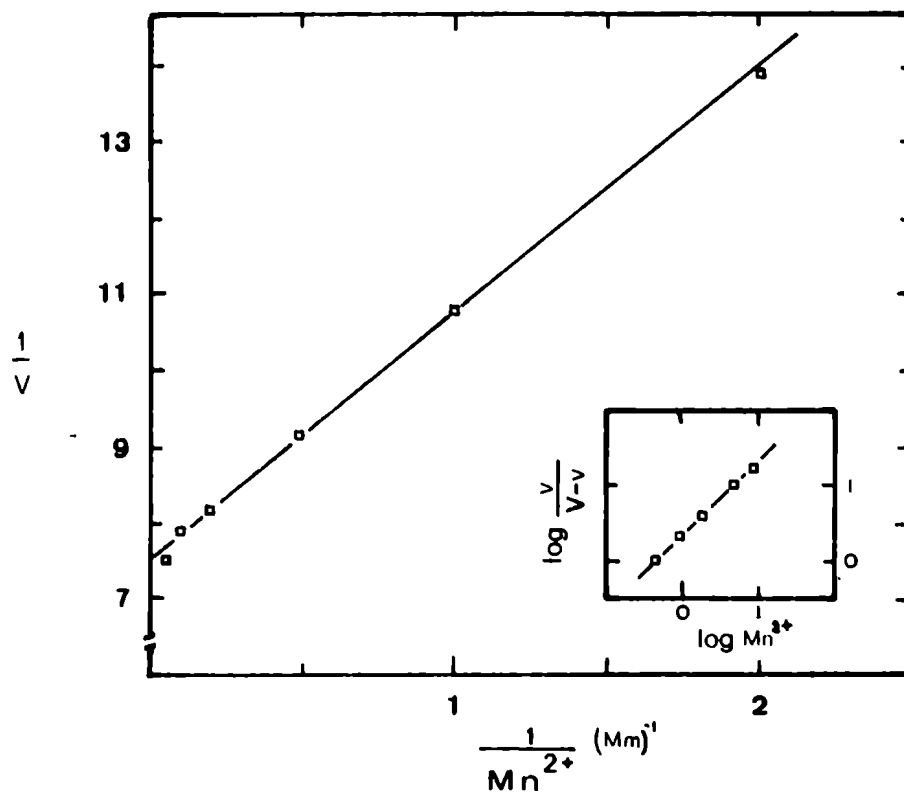


Fig. 25. Influencia del  $Mn^{2+}$  en la actividad de la enzima. Gráfico de inversas. Se midió la actividad por el método A. La velocidad está expresada en  $\mu$ moles de sac-6-P formados/min·ml.

Por el contrario, el agregado de  $\text{Ca}^{2+}$  en concentraciones de 5, 10 y 20 mM, produjo un incremento de actividad mucho menor (18, 25 y 27% respectivamente).

Se pudo demostrar también que las activaciones producidas por el  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  no tienen dependencia con el pH de reacción (fig. 28).

#### Cationes bivalentes y la inhibición por UDP

Otros autores demostraron que el UDP es un inhibidor competitivo de la enzima aislada de germen de trigo y de otras fuentes (41,78,92). Sin embargo, no se indicó que podría existir alguna conexión entre la activación por iones bivalentes y la inhibición por UDP. Se demostró que tanto el  $\text{Mg}^{2+}$  como el  $\text{Mn}^{2+}$  revierten la inhibición producida por el producto UDP (fig. 26).

La actividad se redujo 80-90% de su valor en presencia de UDP entre 5-10 mM. La adición de  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$  provocó una recuperación de actividad hacia valores más próximos al control, que depende de la concentración inicial de UDP presente, y de la concentración final del ion bivalente. Así, por ejemplo  $\text{Mn}^{2+}$  5 mM revirtió totalmente la inhibición causada por UDP 2 mM, mientras que fueron necesarias concentraciones mayores de  $\text{Mg}^{2+}$  (superiores a 10 mM), para obtener la misma reversión.

Por el contrario, el agregado de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio de incubación no permitió superar la inhibición producida por el UDP (fig. 27).



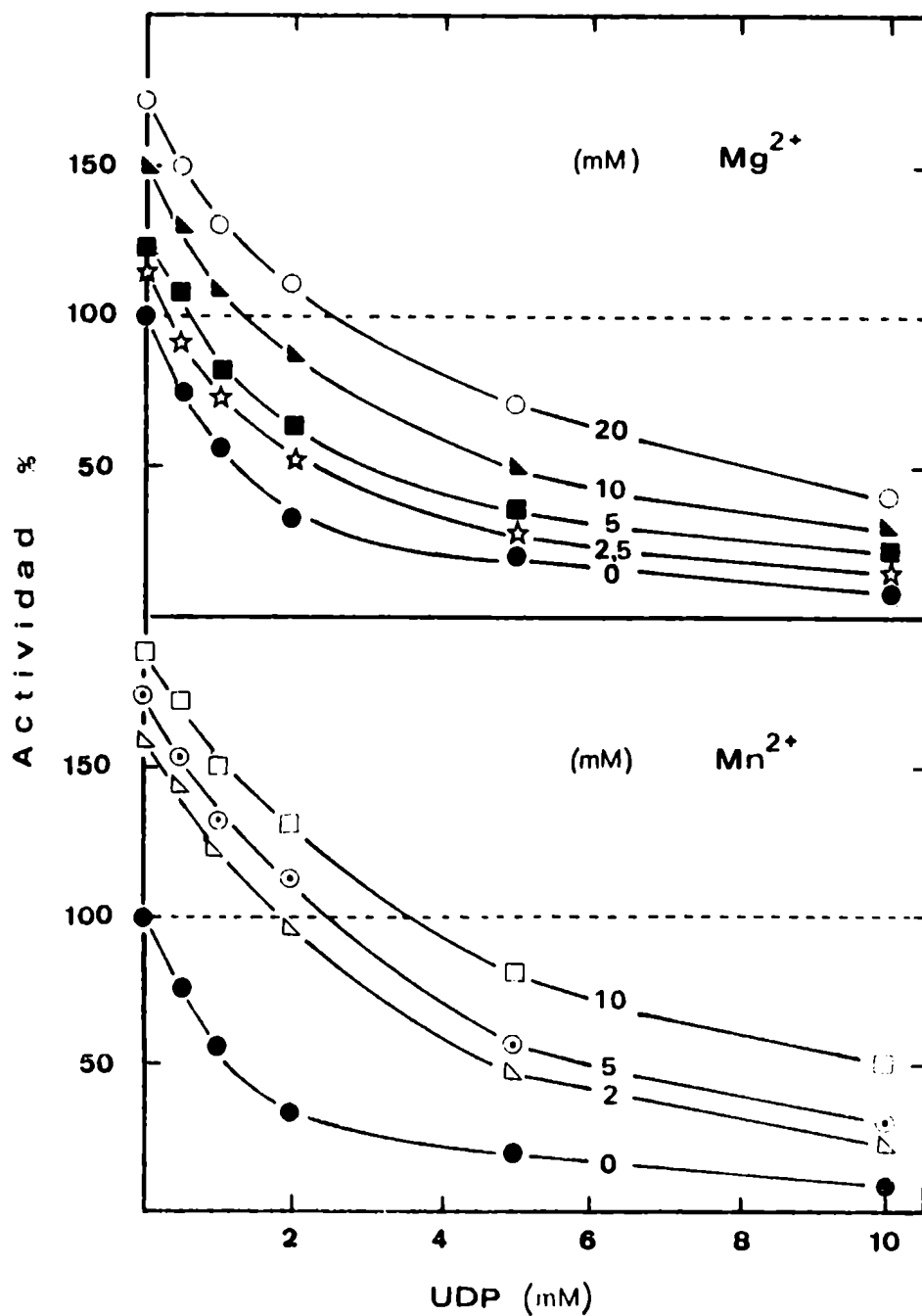


Fig. 26. Reversión de la inhibición por UDP cuando se modifica la concentración de Mg<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup>. Se tomó como 100% la actividad en ausencia de UDP. Datos de Alamos. Se midió la actividad por el método A.

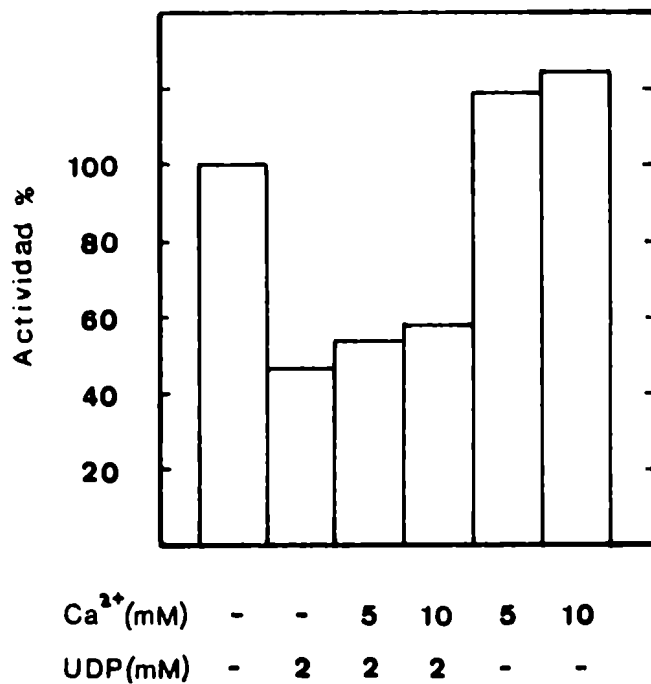


Fig. 27. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la inhibición por UDP. La actividad fue medida por el método A.

La inhibición de la sacarosa fosfato sintetasa por UDP fue muy poco alterada cuando se modificó el pH de reacción. Los resultados presentados en la fig. 28 indican que la presencia de UDP 2 mM produce alrededor de 40-60% de inhibición entre pH 5,5 y 7,5.

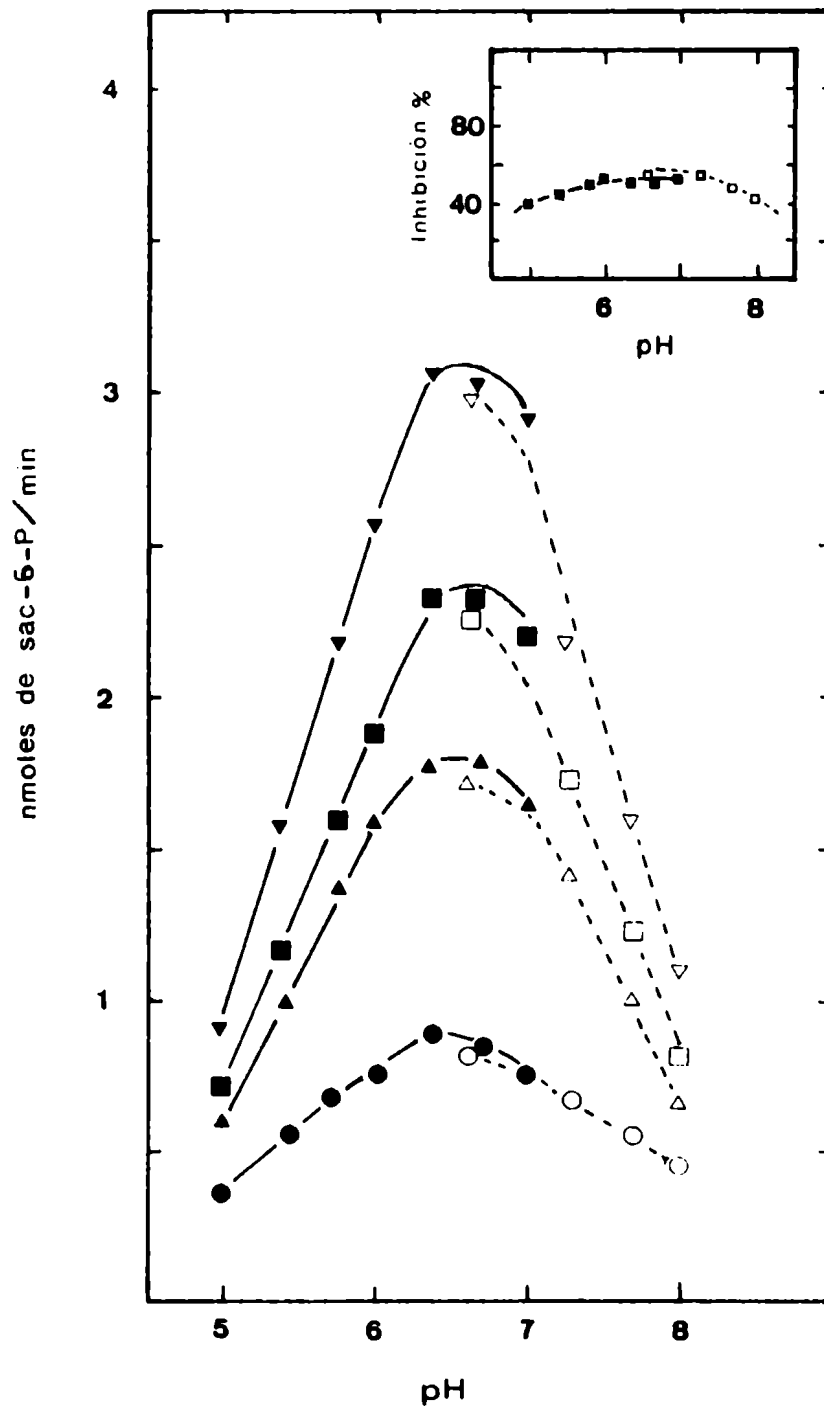


Fig. 28. Efecto del pH. Los símbolos negros corresponden a buffer MES y los símbolos blancos a buffer HEPES. (▲-△) control, ninguna adición; (●-○) 2 mM UDP; (■-□) 2 mM UDP, 20 mM Mg<sup>2+</sup>; (▼-▽) 20 mM Mg<sup>2+</sup>. La figura inserta ilustra la variación de la inhibición porcentual por UDP 2 mM con el pH. Se midió la actividad por el método A.

Se observó también que la presencia de  $Mg^{2+}$  20 mM revierte la inhibición y, más aún, produce una pequeña activación sobre los valores controles. En la fig. 28 está representada también la actividad de la enzima a diferentes pH cuando el  $Mg^{2+}$  se encuentra como único modificador.

Por otra parte, la acumulación de UDP durante el transcurso de la reacción provocó una disminución de la velocidad de reacción con el tiempo. Se estudió el efecto de los iones bivalentes en la curva de tiempo de la actividad enzimática. En la fig. 29 se ilustra dicho efecto cuando se adicionó  $Mn^{2+}$  al medio de incubación.

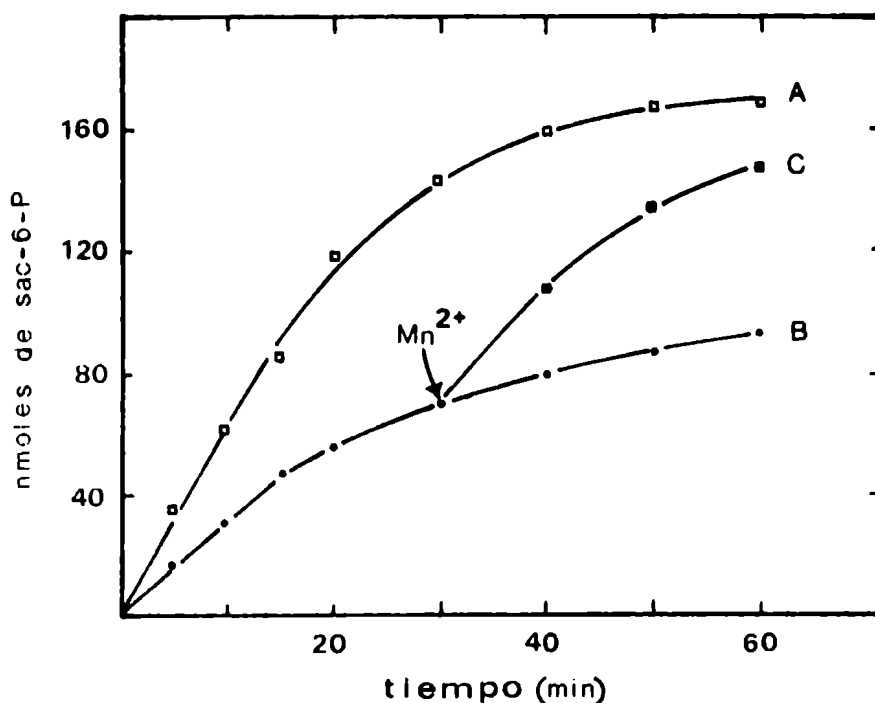


Fig. 29. Efecto de la adición de  $Mn^{2+}$  en la curva de tiempo. (A) el medio de incubación contenía 5 mM  $Mn^{2+}$  desde  $t=0$  min.; (B) control sin la adición de ion bivalente; (C) adición de  $Mn^{2+}$  en el momento indicado por la flecha, de manera que la concentración final era la misma que en la curva A. La actividad enzimática fue medida por el método A.

Cuando se puso  $Mn^{2+}$  en una concentración de 5 mM desde el comienzo de la incubación, la reacción fue lineal durante aproximadamente 20 minutos (Curva A).

En ausencia del ion bivalente, la velocidad cay6 antes. Con la adici6n de  $Mn^{2+}$  a la misma concentraci6n que la curva A, se logr6 la reversi6n de la inhibici6n producida por el UDP acumulado y la velocidad prosigui6 pr6cticamente lineal otra vez.

#### Efecto de aniones

Los resultados presentados en la tabla 9 muestran el efecto producido por varios aniones. El maleato, isocitrato, fosfato y sulfato provocaron una inhibici6n significativa.

Tabla 9. Efecto de aniones en la actividad de la sacarosa fosfato sintetasa.

Adici6n (*)	sacarosa-6-P formada nmoles	Actividad %
Ninguna	15,5	100
Piruvato	12,9	83
Lactato	15	97
Maleato	10,5	68
Citrato	9,5	61
Isocitrato	9,5	61
Tartrato	13	84
Succinato	12,8	83
Cloruro	13	84
Bromuro	15,5	100
Fluoruro	15,3	100
Ioduro	13,5	87
Nitrato	13,5	87
Sulfato	9,5	61
Fosfato	10,5	68
Malonato	12	77
Malato	15	97
Fumarato	12,8	83

(\*) Todos los aniones adicionados se encontraban como sales s6dicas y a una concentraci6n final de 50 mM.

La inhibición producida por distintas concentraciones de maleato están representadas en la fig. 30, y del gráfico inserto en la misma se calculó el coeficiente de Hill, que resultó menor que la unidad.

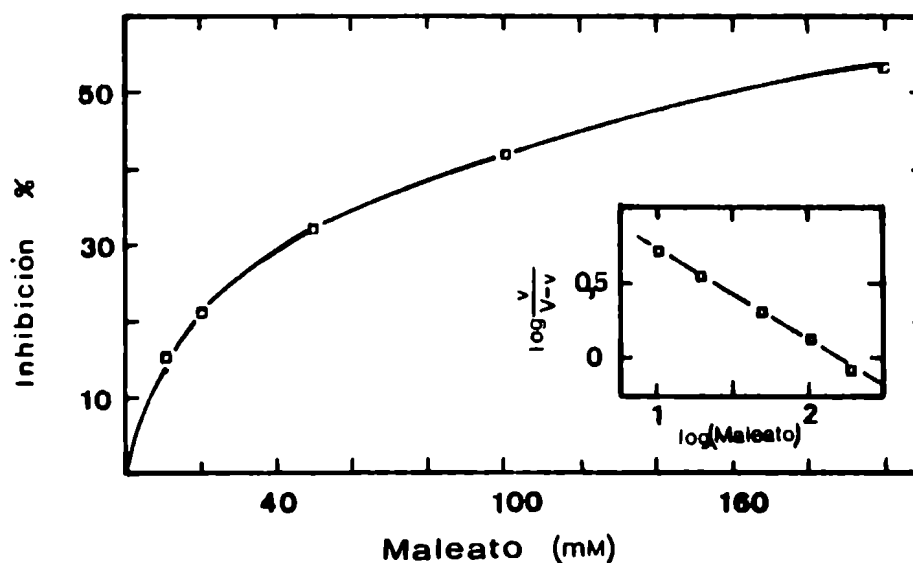


Fig. 30. Efecto del maleato en la actividad de la enzima. Se tomó como  $V$  a la actividad en ausencia del inhibidor. La actividad se midió de acuerdo al método A.

Se estudió con mayor detalle el efecto del citrato y fosfato y la influencia del ion  $Mg^{2+}$  en la inhibición producida por aquellos aniones. En las fig. 31 y 32 se observa la disminución de la actividad enzimática con el aumento de la concentración de citrato y fosfato respectivamente, en presencia y ausencia de  $Mg^{2+}$  20 mM. En los gráficos insertos están representados los valores correspondientes a la ecuación de Hill. En ambos casos el coeficiente de Hill fue menor que uno.

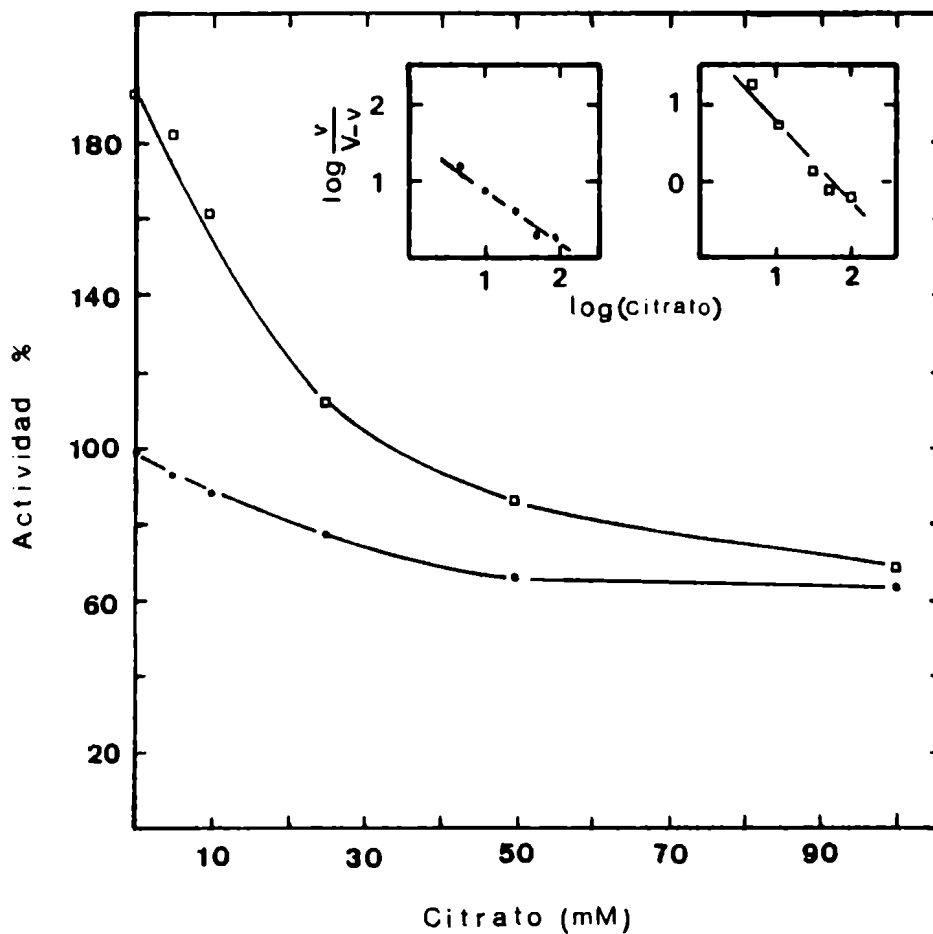


Fig. 31. Efecto del citrato en presencia y ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ . (•) actividad sin  $\text{Mg}^{2+}$ ; (◻) actividad en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  20 mM. Se consideró 100% a la actividad de la enzima sin efectores. V: velocidad en ausencia de inhibidor. La actividad fue medida por el método A.

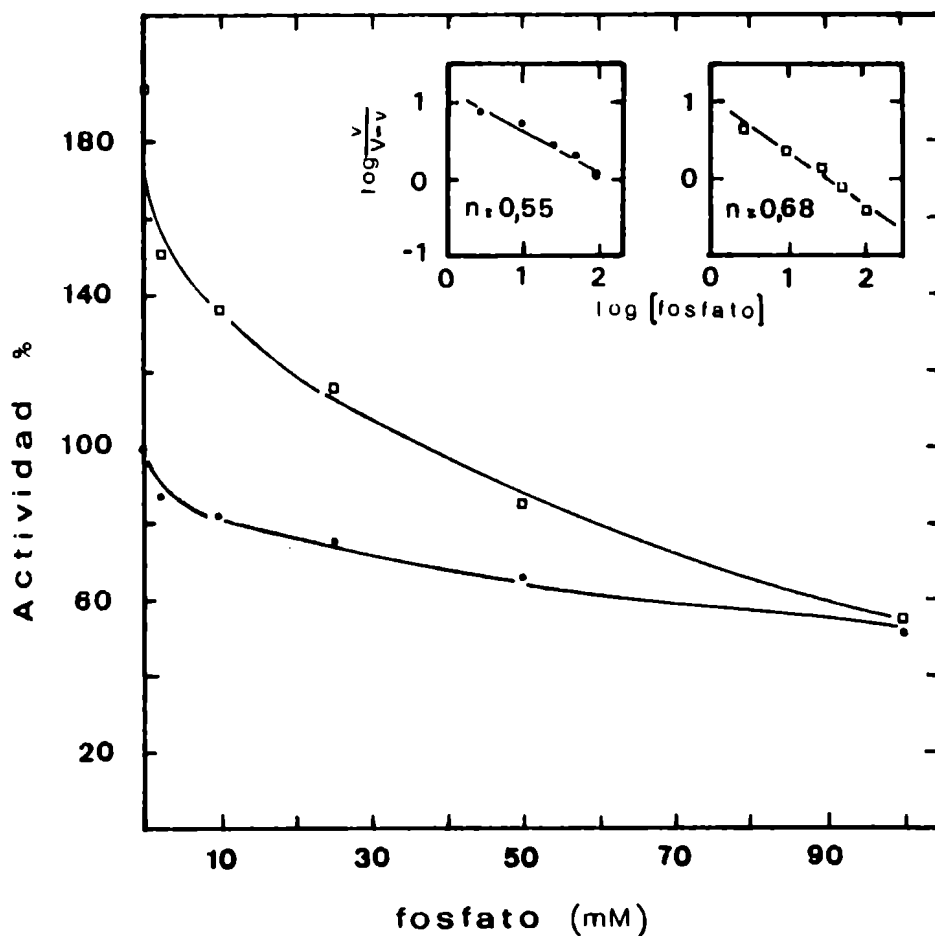


Fig. 32. Efecto del fosfato en presencia y ausencia de  $Mg^{2+}$ . (•) actividad sin  $Mg^{2+}$ ; (◻) actividad en presencia de  $Mg^{2+}$  20 mM. Se consideró 100% a la actividad de la enzima sin efectores. V: velocidad en ausencia de inhibidor. Se midió la actividad por el método A.

#### Efecto de nucleótidos

Se estudió la influencia de varios nucleósidos mono-, di- y trifosfato sobre la actividad de la enzima (tabla 10). Tanto UMP como AMP prácticamente no inhiben, mientras que ADP lo hace en pequeña proporción. Todos los nucleósidos trifosfato provocan una apreciable inhibición.



Tabla 10. Efecto de nucleótidos. Actividad medida por el método A.

Nucleótido	Actividad %		
	5 mM	Adición de $Mg^{2+}$	
		—	5 mM
Ninguno	100	138	145
UMP	92	135	146
UDP	17	37	50
UTP	33	54	75
AMP	102	138	147
ADP	82	114	133
ATP	58	85	111
CTP	53	91	100
GTP	33	72	100

El efecto inhibitorio producido por distintas concentraciones de ATP están representados en la fig. 33.

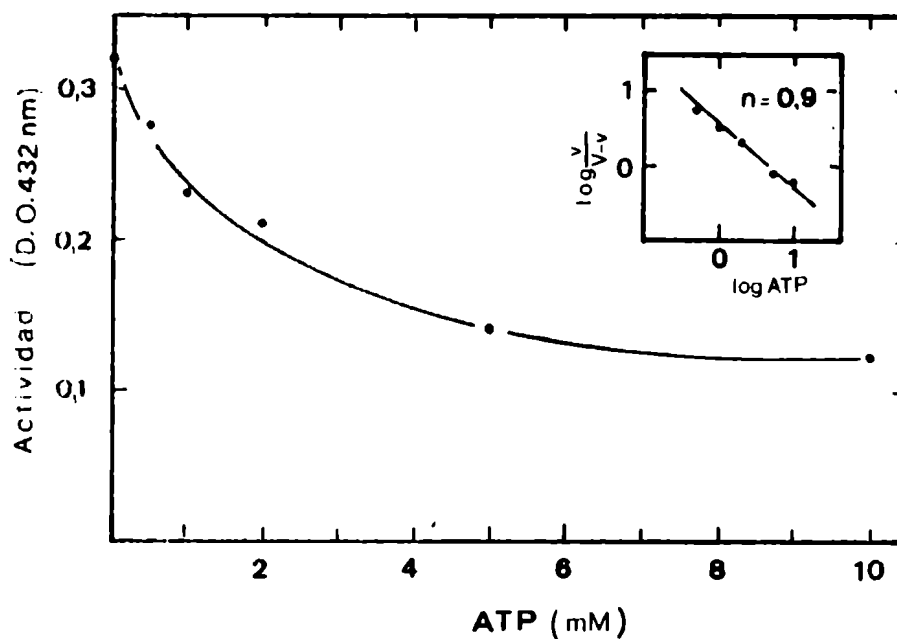


Fig. 33. Efecto de ATP. Actividad medida por el método A. V: velocidad en ausencia de inhibidor.

Se determinó también la actividad enzimática a una concentración fija de ATP (5 mM) en presencia de concentraciones variables de  $Mg^{2+}$  (fig. 34).

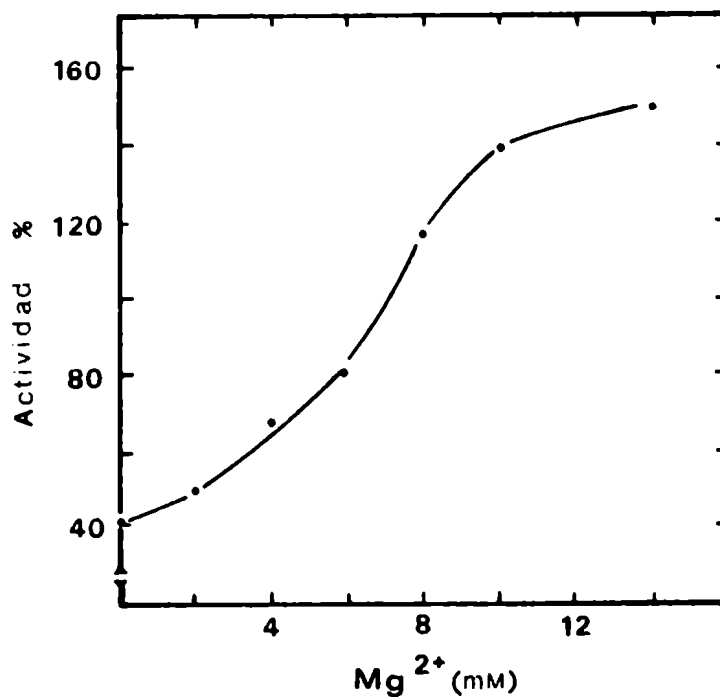


Fig. 34. Actividad de sacarosa fosfato sintetasa en presencia de concentraciones variables de  $Mg^{2+}$  y de ATP 5 mM. Actividad medida por el método A.

Para determinar el tipo de inhibición que presentan los nucleósidos trifosfato, se determinaron las velocidades iniciales a distintas concentraciones de UDPG. La concentración de fructosa-6-P fue mantenida fija en 10 mM (fig. 35). Se obtuvieron rectas que se interceptan sobre el eje de las ordenadas, lo cual indica que ATP, GTP y UTP son inhibidores del tipo competitivo respecto de UDPG.

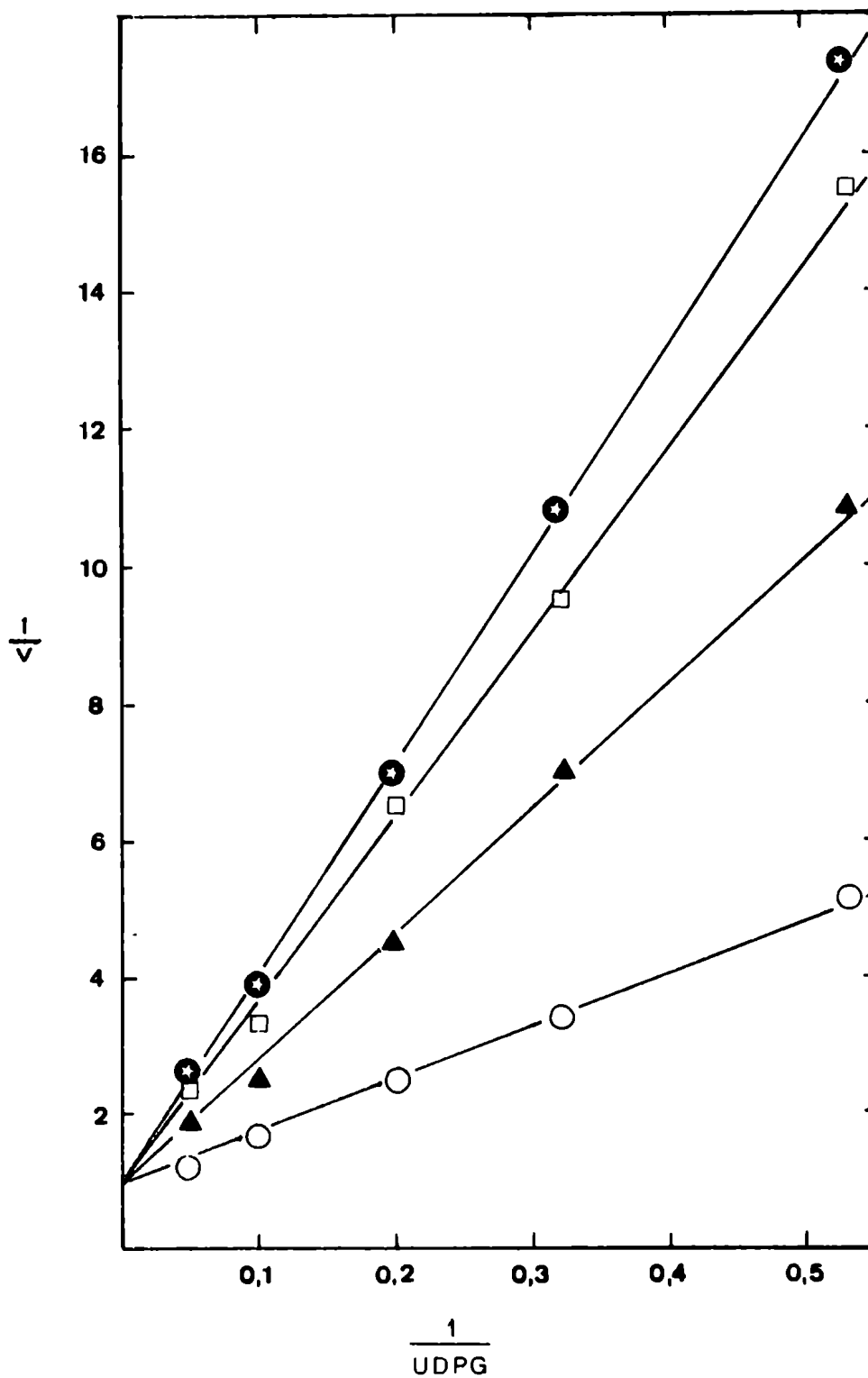


Fig. 35. Inhibición por ATP, GTP y UTP, siendo UDPG el sustrato variable, y fructosa-6-P fija (10 mM). Las concentraciones de nucleótidos fueron: (▲) ATP 5 mM; (□) GTP 5 mM; (●) UTP 5 mM; (○) sin adición. La actividad fue medida por el método A. La velocidad está expresada en  $\mu\text{moles de sac-6-P formados/min}\cdot\text{ml}$ .

Efecto de azúcares

a) Monosacáridos: Se estudió la acción de varios monosacáridos sobre la actividad de la enzima, elegidos además, con el objeto de obtener alguna información sobre el mecanismo de la reacción. Los resultados de la tabla 11 indican que el único capaz de producir inhibición es la  $\delta$ -gluconolactona.

Tabla 11. Efecto de monosacáridos.

Monosacárido	Concentración mM	Actividad %
Ninguno	—	100
Glucosa (*)	50	98
Fructosa (*)	50	98
Glucosamina (*)	10	100
	50	98
$\beta$ -D-tioglucosa (#)	10	111
	50	110
$\delta$ -gluconolactona (#)	10	83
	50	46

(\*) Actividad medida por el método B.

(#) Actividad medida por el método A.

b) Oligosacáridos: Los resultados presentados en la tabla 12 muestran que solamente sacarosa produce inhibición en la actividad enzimática.

Se encontró además que la inhibición producida por sacarosa variaba con las distintas preparaciones enzimáticas ensayadas. En algunos casos se pudo determinar que la inhibición, para una misma preparación, se modificaba con el transcurso del tiempo (tabla 13).

Tabla 12. Efecto de oligosacáridos. La actividad fue medida por el método B.

Oligosacárido 50 mM	UDP formado nmoles	Actividad %
Ninguno	19,5	100
Sacarosa	10	52
Rafinosa	20	102
Melizitosa	20	102
Estaquiosa	21	107
Maltosa	20	102
Celobiosa	19,5	100
Trehalosa	19,6	100
Turanosa	20	102
Melibiosa	20	102

Tabla 13. - Variaciones de la inhibición por sacarosa con las preparaciones enzimáticas.

Preparación de enzima	Inhibición por sacarosa 50 mM %
I	26
II	30
III	22
IV	50-60
IV*	18
V	43

La inhibición fue medida en el momento de la preparación enzimática, excepto IV\* que es la misma preparación IV medida dos meses más tarde. La actividad se midió por el método B.

Dada la importancia de la inhibición por sacarosa, ésta fue determinada por diferentes métodos. En la tabla 14 se presentan los resultados obtenidos cuando se utilizó la preparación denominada V en la tabla 13 (actividad específica: 141 nmoles/min·mg de proteína). Los mismos resultados fueron obtenidos cuando se midió la inhibición en otras preparaciones durante el desarrollo de este estudio.

Tabla 14. Inhibición por sacarosa. La actividad de la enzima fue determinada por diferentes métodos analíticos.

Método de medida	Inhibición %
B	43
C	40
D	41
E	43

La concentración final de sacarosa en el medio de incubación fue de 50 mM.

La inhibición por sacarosa fue estudiada también a diferentes concentraciones del disacárido (fig. 36).

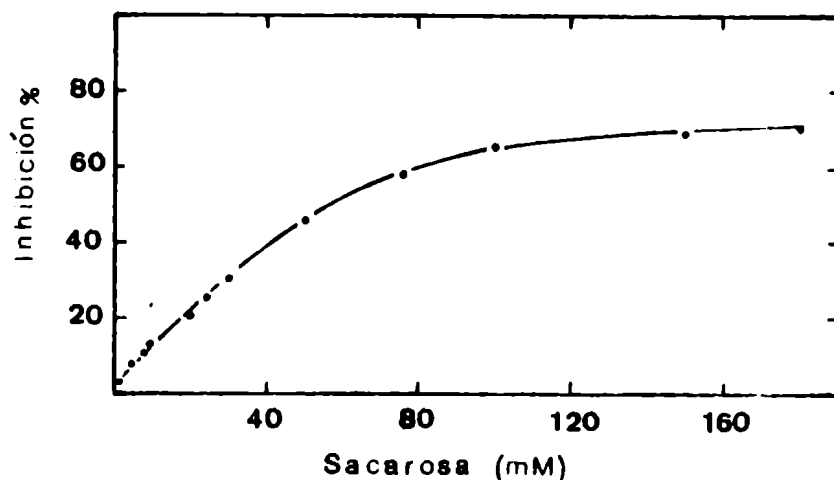


Fig. 36. Inhibición por sacarosa. La actividad se midió por el método B.

La inhibición por sacarosa fue estudiada cinéticamente variando las concentraciones de fructosa-6-P y UDPG, a niveles fijos de sacarosa. Se graficaron las recíprocas de las velocidades iniciales en función de las inversas de las concentraciones de fructosa-6-P (111) a distintos niveles de sacarosa y a una concentración fija de UDPG (10 mM) (fig. 37). En el gráfico secundario inserto se muestra la variación de pendientes y ordenadas en el origen.

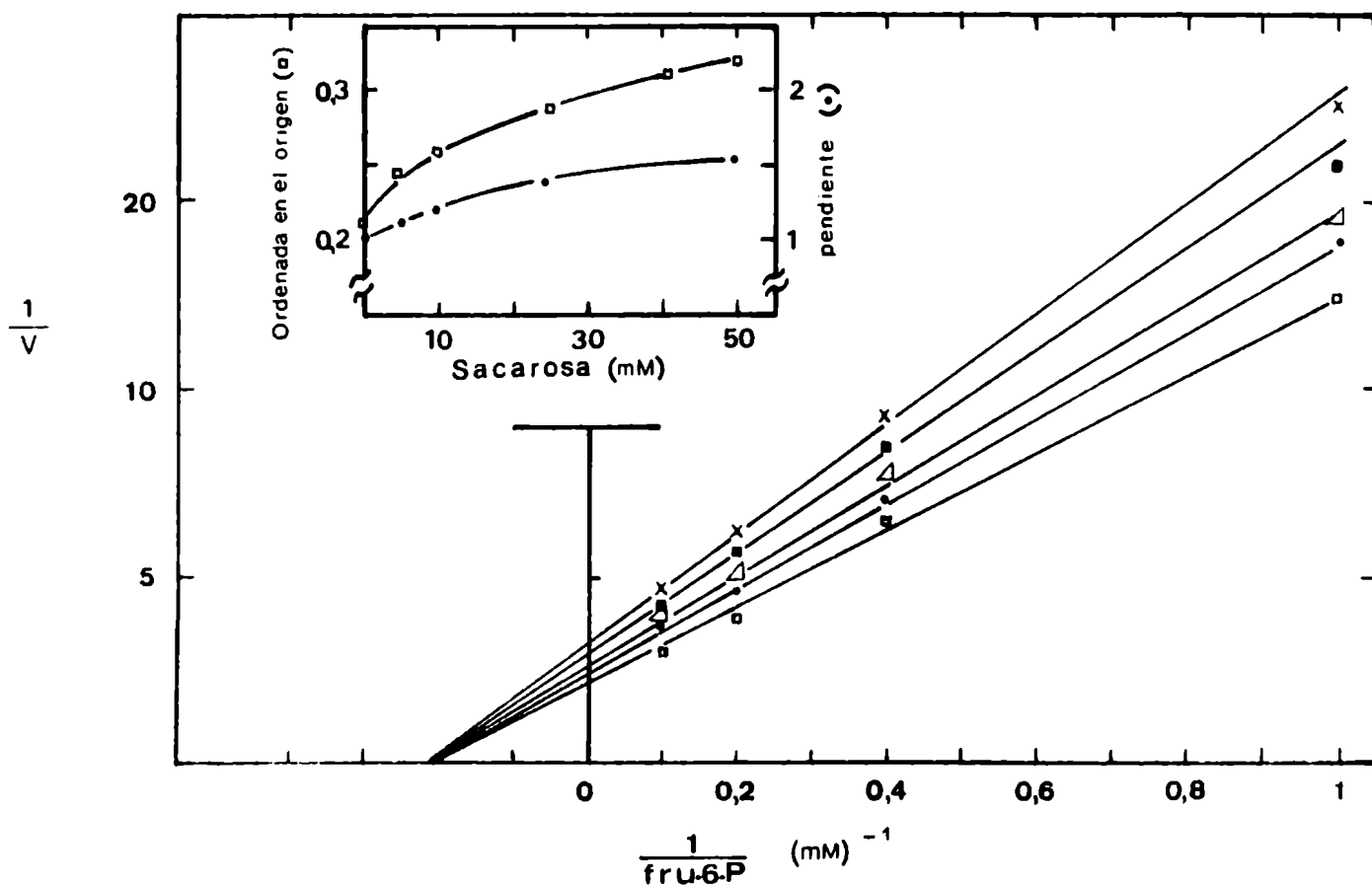


Fig. 37. Efecto de las concentraciones variables de fructosa-6-P sobre la velocidad inicial, a varios niveles de sacarosa: (•) 5 mM; ( $\Delta$ ) 10 mM; ( $\blacksquare$ ) 25 mM; ( $\times$ ) 50 mM; ( $\square$ ) sin adición. La concentración de UDPG se mantuvo constante en 10 mM. La actividad fue medida por el método C. La velocidad está expresada en  $\mu\text{moles de UDP formados}/\text{min}\cdot\text{ml}$ .

La sacarosa resultó ser un inhibidor no competitivo respecto de fructosa-6-P. Las pendientes y las ordenadas en el origen dieron funciones no lineales cuando se graficaron en función de la concentración del disacárido. La inhibición por lo tanto es no competitiva hiperbólica.

Se estudió el efecto que la sacarosa presenta respecto del otro sustrato, UDPG (fig. 38). El gráfico de inversas muestra que la inhibición no es lineal, y que corresponde a un efecto más complejo.

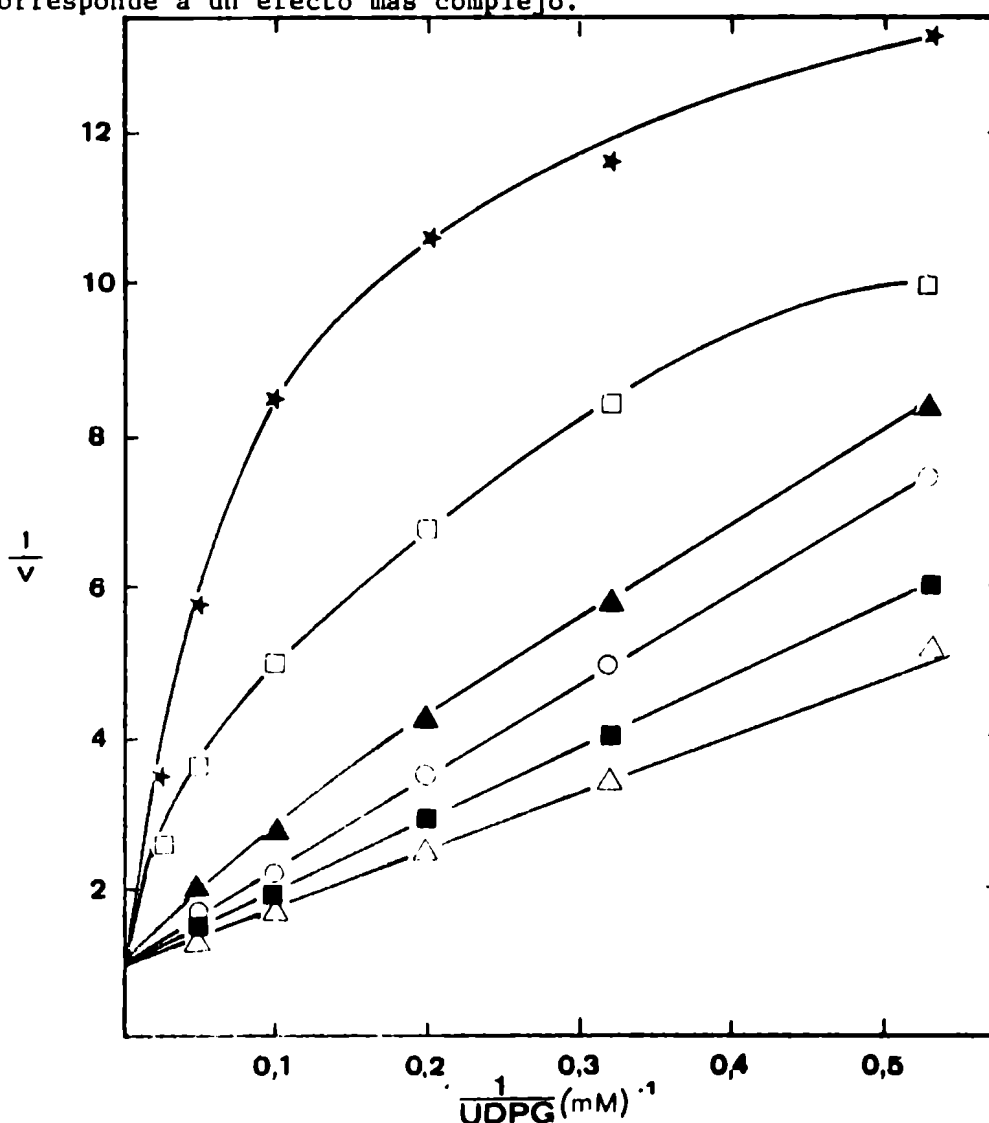


Fig. 38. Efecto de concentraciones variables de UDPG sobre la velocidad inicial, a varios niveles de sacarosa: (■) 5 mM; (○) 20 mM; (▲) 50 mM; (□) 100 mM; (★) 200 mM; (△) sin adición. La concentración de fructosa-6-P se mantuvo a 10 mM. La actividad se midió según el método B. La velocidad está expresada en  $\mu\text{moles de UDP formados/min}\cdot\text{ml}$ .



Se calcularon los coeficientes de Hill con los valores de velocidad determinados para ambos sustratos (de las fig. 37 y 38) en presencia de distintas concentraciones de sacarosa (fig. 39 y 40).

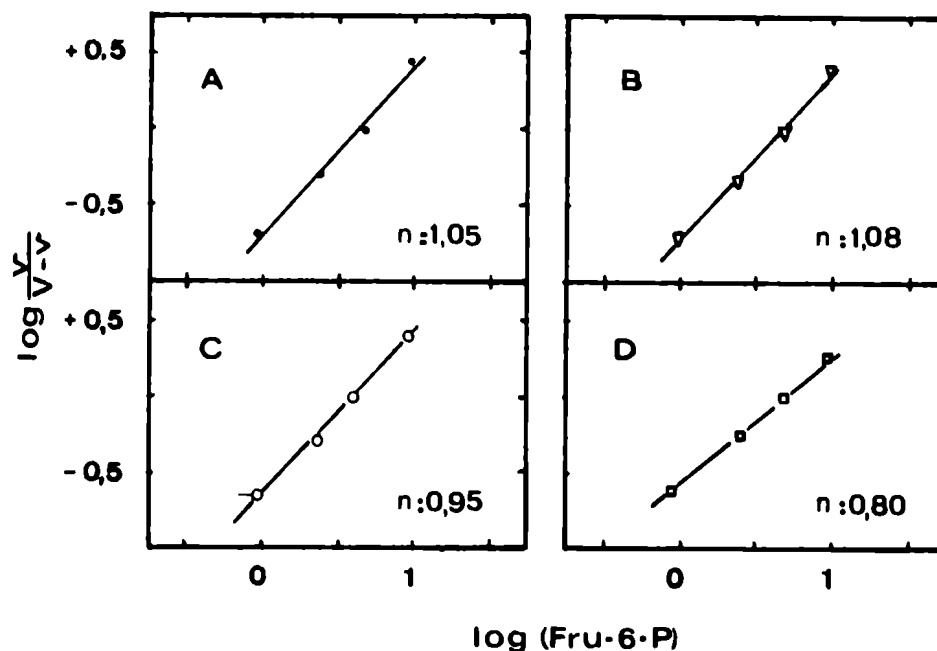


Fig. 39. Gráficos de Hill correspondientes al efecto de concentraciones variables de fructosa-6-P sobre la velocidad inicial, a varios niveles de sacarosa: (A) sin sacarosa; (B) 10 mM; (C) 25 mM; (D) 50 mM. V: velocidad máxima obtenida de la fig. 37.

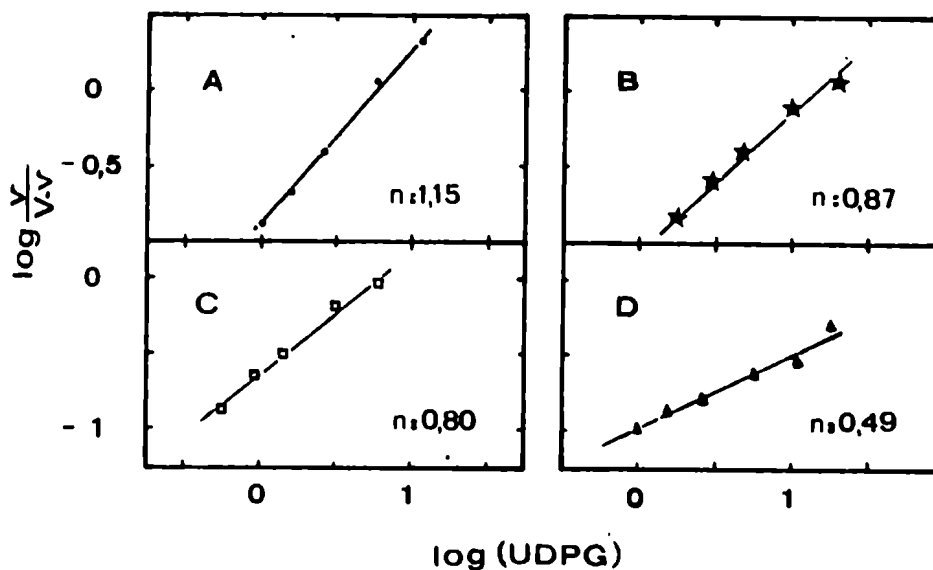


Fig. 40. Gráficos de Hill correspondientes al efecto de concentraciones variables de UDPG sobre la velocidad inicial, a varios niveles de sacarosa: (A) sin sacarosa; (B) 20 mM; (C) 50 mM; (D) 100 mM. V: velocidad máxima obtenida de la fig. 38.

La inhibición por sacarosa fue también estudiada en presencia de  $Mg^{2+}$  (fig. 41). Con los datos obtenidos se hizo un gráfico de Dixon (112) en el que se observa que los puntos pueden ser unidos con dos líneas rectas (para ambos casos, con y sin  $Mg^{2+}$ ) (fig. 42).

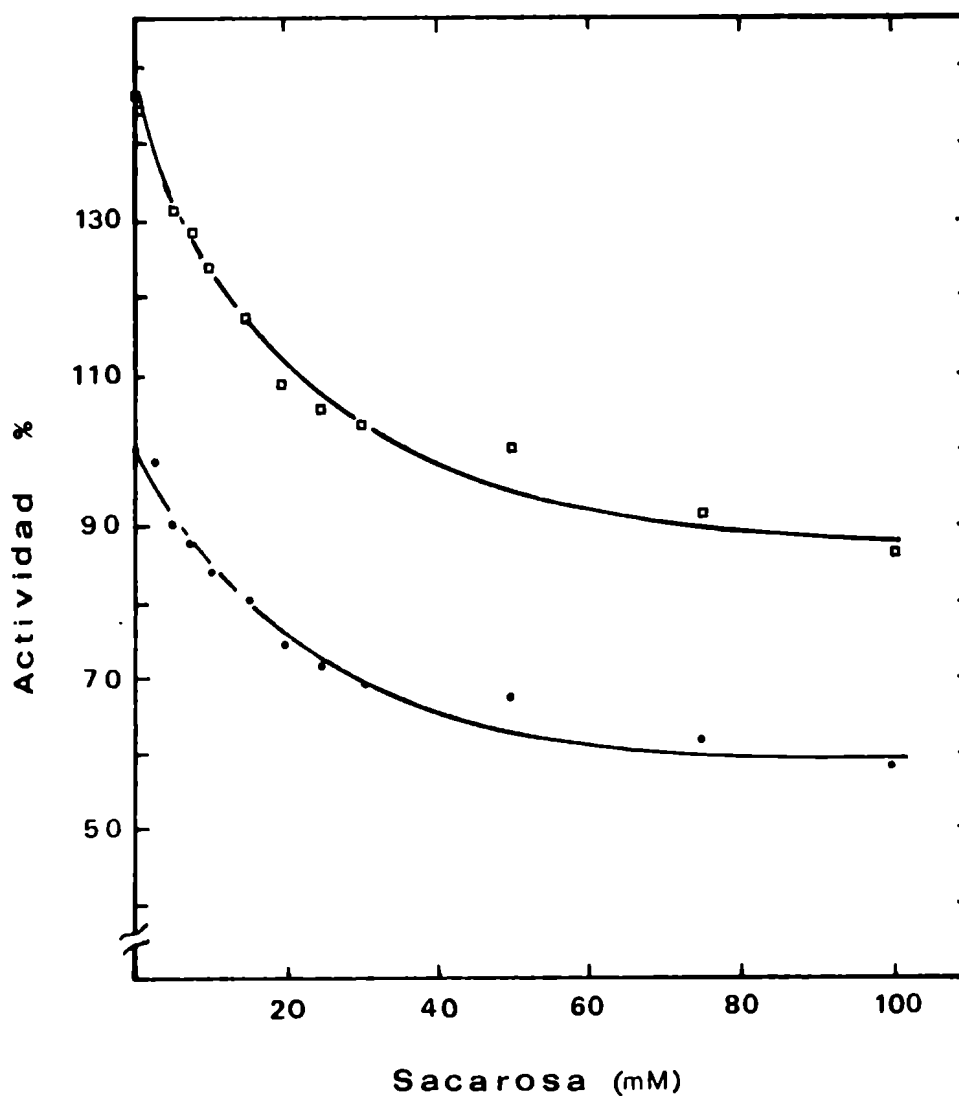


Fig. 41. Efecto de sacarosa en presencia de  $Mg^{2+}$ . Se graficó la actividad en ausencia de  $Mg^{2+}$  (•) y con  $Mg^{2+}$  20 mM (◻). La actividad se midió por el método B.

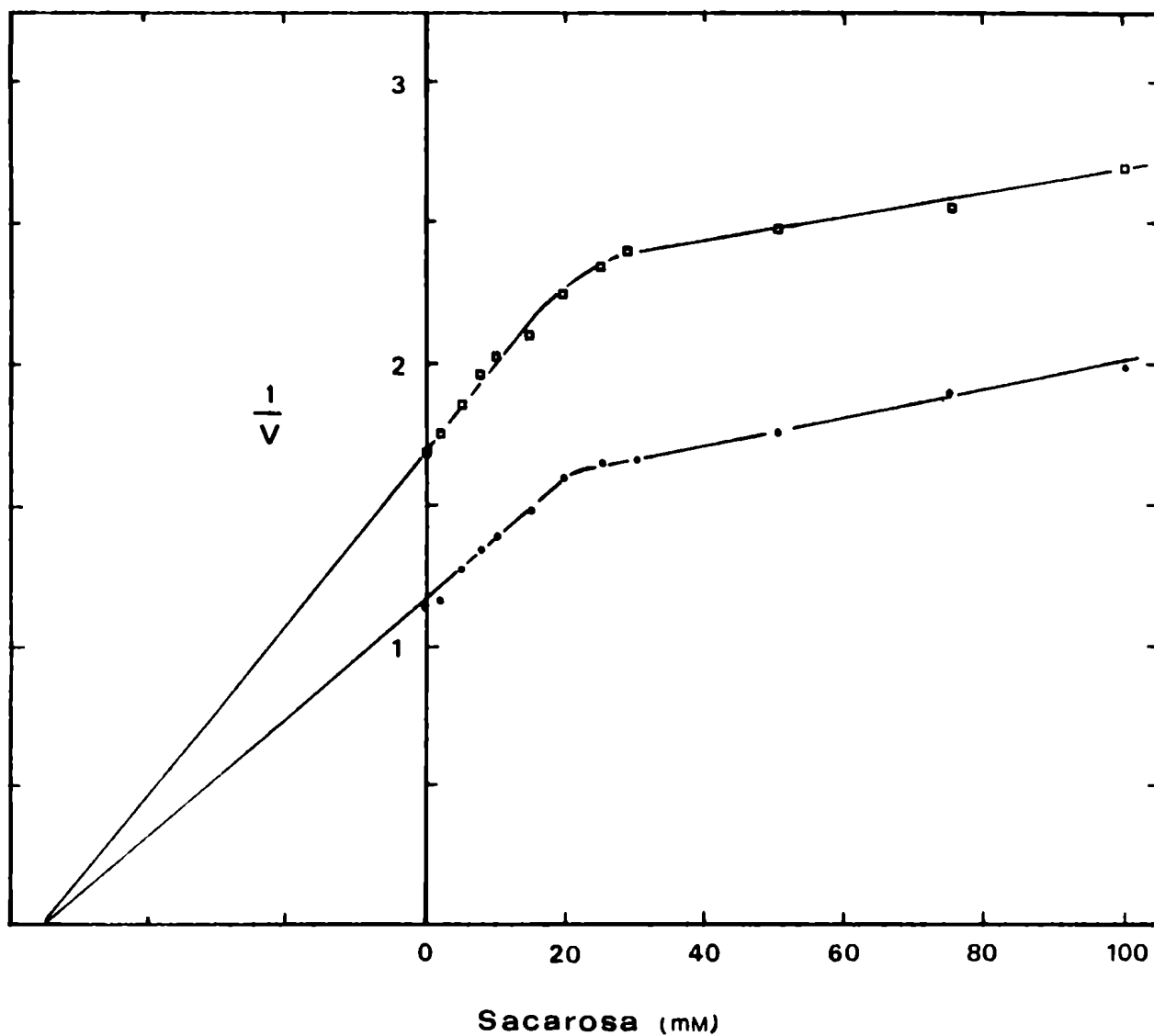


Fig. 42. Gráfico de Dixon correspondiente a los datos de la fig. 41. En ausencia de  $Mg^{2+}$  ( $\square$ ) y con  $Mg^{2+}$  20 mM ( $\bullet$ ).

Se determinó además, la actividad enzimática a una concentración fija de sacarosa (100 mM) en presencia de concentraciones variables de  $Mg^{2+}$ . Se hizo un gráfico de inversas y como referencia se graficaron también los valores en ausencia de sacarosa. Cuando se graficaron los datos de acuerdo a la ecuación de Hill, se obtuvo, para la curva con sacarosa, un coeficiente de 0,5 (fig. 43 y gráfico inserto en la misma).

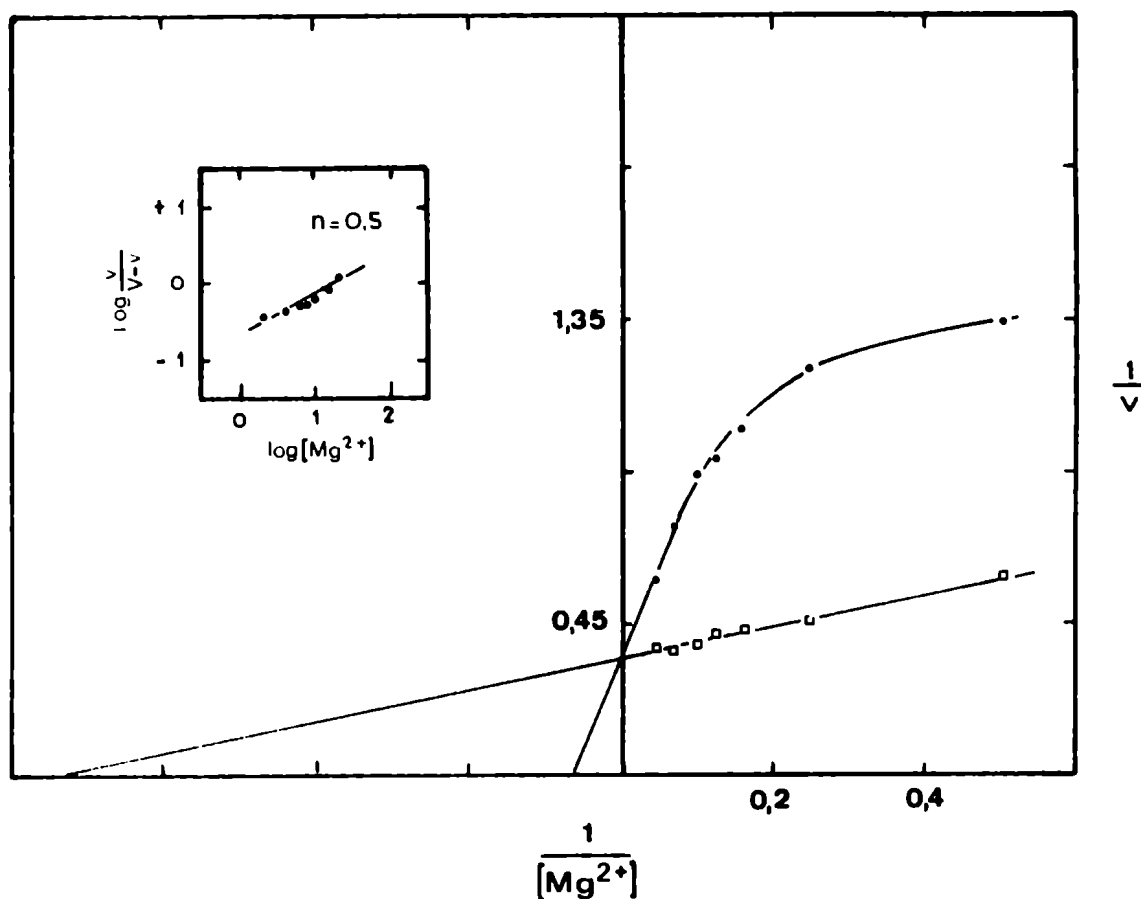


Fig. 43. Efecto de concentraciones variables de  $Mg^{2+}$  sobre la velocidad en presencia de sacarosa 100 mM (•). Como referencia se incluyeron los valores en ausencia de sacarosa (◻). La actividad fue medida por el método B.

ESTUDIOS CINETICOS

Velocidad inicial: Se determinó la velocidad inicial cuando se variaba la concentración de un sustrato, mientras la del otro se mantenía constante a diferentes niveles.

En la fig. 44 están representados los resultados obtenidos cuando el sustrato variable fue UDPG y el sustrato constante, a diferentes concentraciones, fue fructosa-6-P.

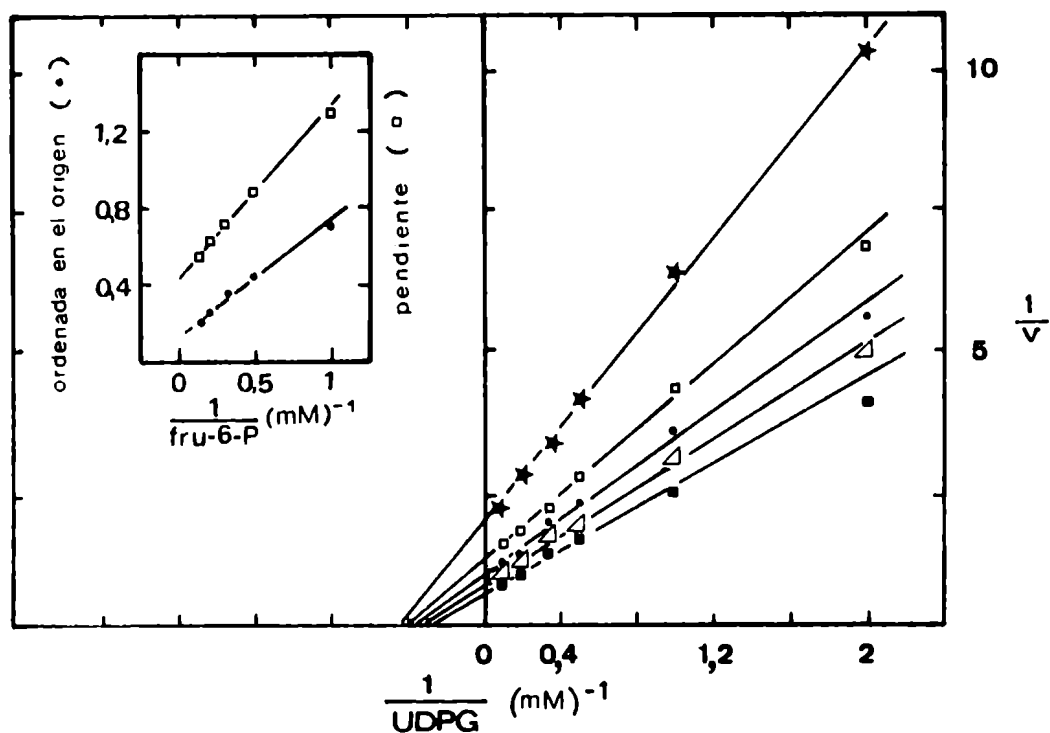


Fig. 44. Efecto de concentraciones variables de UDPG sobre la velocidad inicial, a distintos niveles de fructosa-6-P. La actividad fue medida por el método A. Las concentraciones de fructosa-6-P fueron: (★) 1 mM; (◻) 2 mM; (•) 3 mM; (◊) 5 mM y (▪) 10 mM. En el gráfico inserto se graficaron las pendientes y ordenadas en el origen del gráfico primario como función de la recíproca de la concentración de fructosa-6-P. La velocidad está expresada en  $\mu$ moles de sac-6-P formados/min·ml.

En este gráfico de dobles recíprocas se obtuvieron líneas rectas para cada concentración de fructosa-6-P y esta familia de rectas tiene un punto de intersección a la izquierda del eje de las ordenadas y por debajo de las abscisas. En el gráfico inserto en la fig. 44 se representaron las pendientes y ordenadas en el origen del gráfico primario en función de las recíprocas de las concentraciones de fructosa-6-P. En ambos casos se obtuvieron líneas rectas.

Cuando el sustrato que se varió fue fructosa-6-P, mientras que UDPG se mantuvo constante, a distintas concentraciones, se obtuvieron también representaciones lineales que se interceptaron a la izquierda del eje vertical (fig. 45). El gráfico inserto en la fig. 45 muestra que tanto las pendientes como las ordenadas en el origen son funciones lineales de las inversas de la concentración del sustrato fijo.

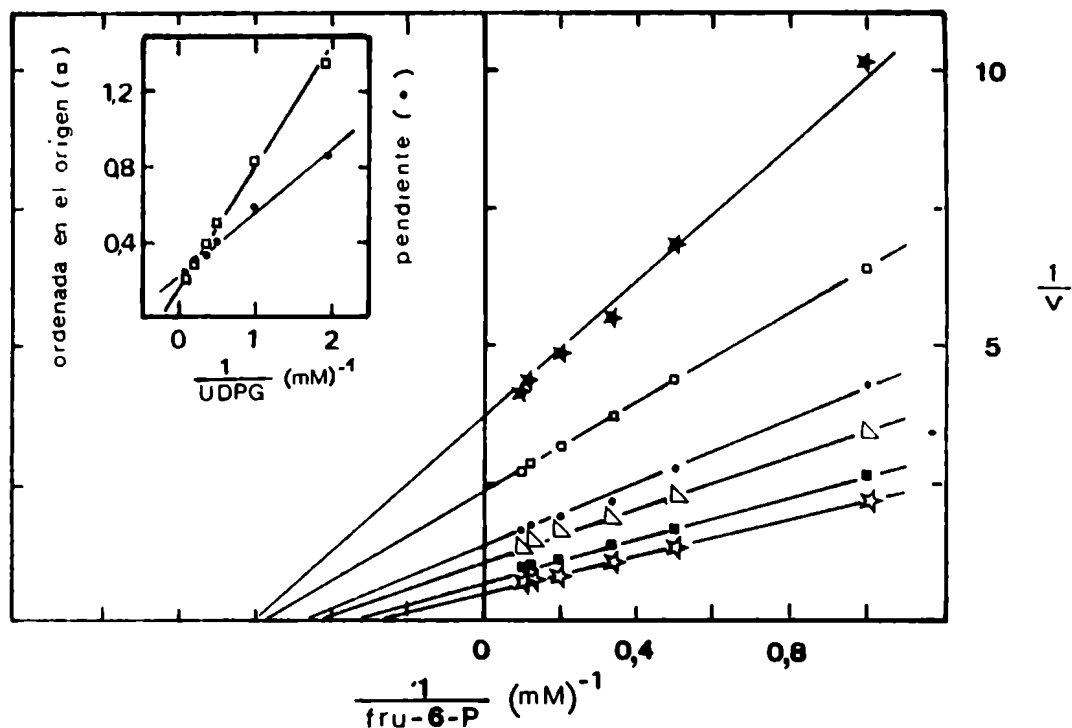


Fig. 45. Efecto de concentraciones variables de fructosa-6-P sobre la velocidad inicial, a distintos niveles de UDPG. La actividad fue medida por el método A. Las concentraciones de UDPG fueron: (★) 0,5 mM; (◻) 1 mM; (•) 2 mM; (△) 3 mM; (▪) 5 mM y (☆) 8 mM. La velocidad está expresada en  $\mu$ moles de sac-6-P formados/min·ml.

Inhibición por producto: Se determinó la velocidad inicial a distintas concentraciones de UDPG y en presencia de diferentes niveles de UDP (fig. 46).

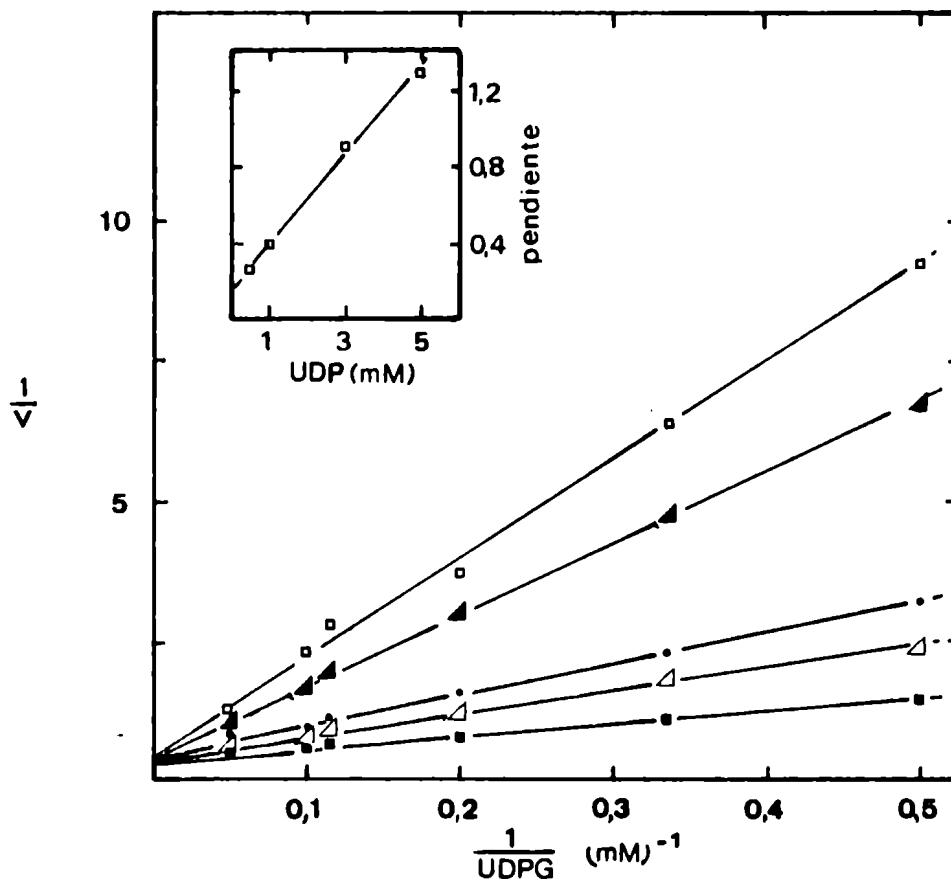


Fig. 46. Inhibición por UDP, siendo UDPG el sustrato variable, y fructosa-6-P fijo a 10 mM. Las concentraciones de UDP fueron:  $(\triangle)$  0,5 mM;  $(\cdot)$  1 mM;  $(\blacktriangle)$  3 mM;  $(\circ)$  5 mM y  $(\blacksquare)$  sin adición. La actividad fue medida por el método A. La velocidad está expresada en  $\mu\text{moles de sac-6-P formados/min}\cdot\text{ml}$ .

Se obtuvo una familia de rectas que se interceptan sobre el eje de las ordenadas, lo cual indica claramente que es una inhibición competitiva lineal. Estos resultados confirman los obtenidos por otros autores que demostraron que el UDP era un inhibidor competitivo (41,78,81,92).

El efecto inhibitorio del UDP cuando fructosa-6-P fue el sustrato variable y UDPG el sustrato fijo, se muestra en la fig. 47.

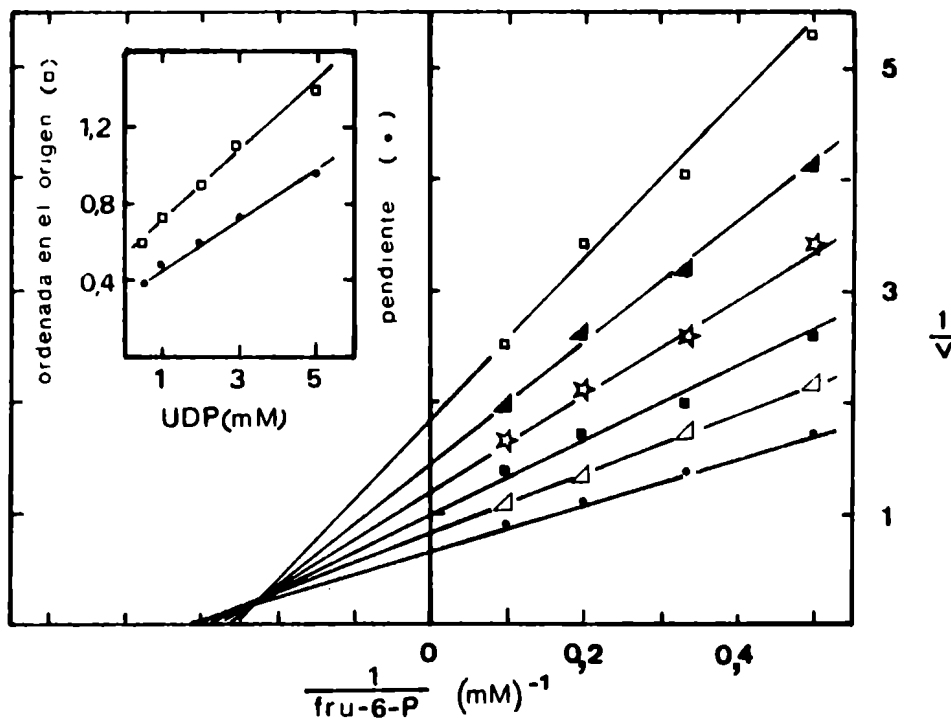


Fig. 47. Inhibición por UDP con fructosa-6-P como sustrato variable. La concentración de UDPG fue 10 mM. Las concentraciones de UDP fueron: (◻) 0,5 mM; (■) 1 mM; (☆) 2 mM; (▲) 3 mM; (○) 5 mM y (•) sin adición. La actividad fue medida por el método A. La velocidad está expresada en  $\mu\text{moles de sac-6-P formados/min.ml}$ .

La inhibición es no competitiva, siendo las ordenadas en el origen y las pendientes funciones lineales de la concentración del inhibidor UDP (gráfico inserto en la fig. 47).

Con respecto al otro producto, sacarosa-6-P, ya Mendicino (41) probó que no inhibe a la enzima. En el presente trabajo se confirmó este resultado ya que concentraciones de sacarosa-6-P de 5, 10 y 50 mM no produjeron modificación de la actividad enzimática.



De acuerdo a las sugerencias de Segel (113) se determinó la velocidad inicial a concentraciones de UDPG variables y en presencia de diferentes niveles de UDP. Para cada concentración fija del otro sustrato, fructosa-6-P, se obtuvo una familia de rectas (fig. 48 y 49).

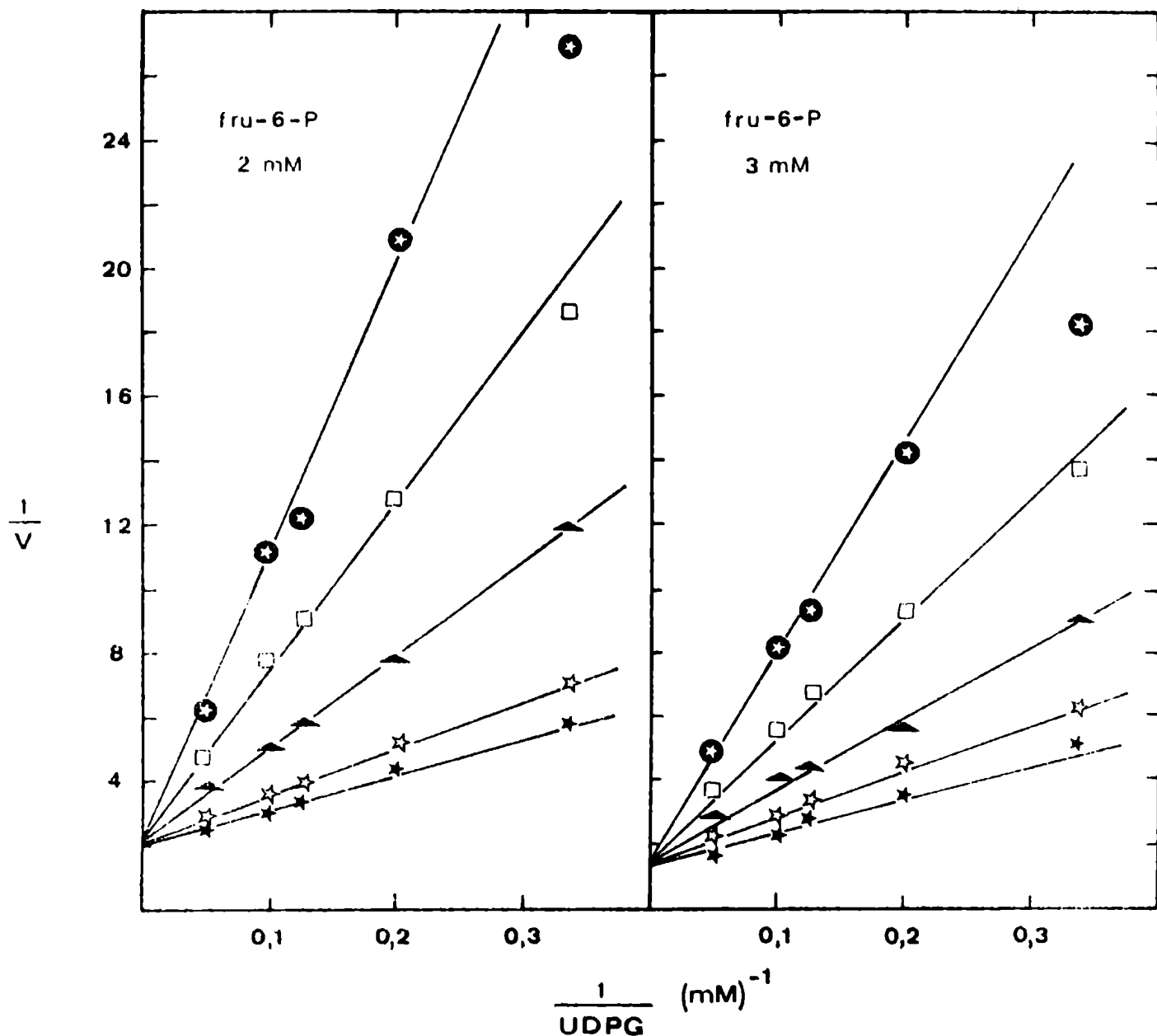


Fig. 48. Inhibición por UDP con UDPG como sustrato variable, a diferentes concentraciones constantes de fructosa-6-P (2 y 3 mM). Las concentraciones de UDP fueron: (☆) 0,5 mM; (▲) 1 mM; (□) 3 mM; (⊙) 5 mM y (★) sin adición. La actividad se midió por el método A. La velocidad está expresada en  $\mu\text{moles de sac-6-P formados/min}\cdot\text{ml}$ .

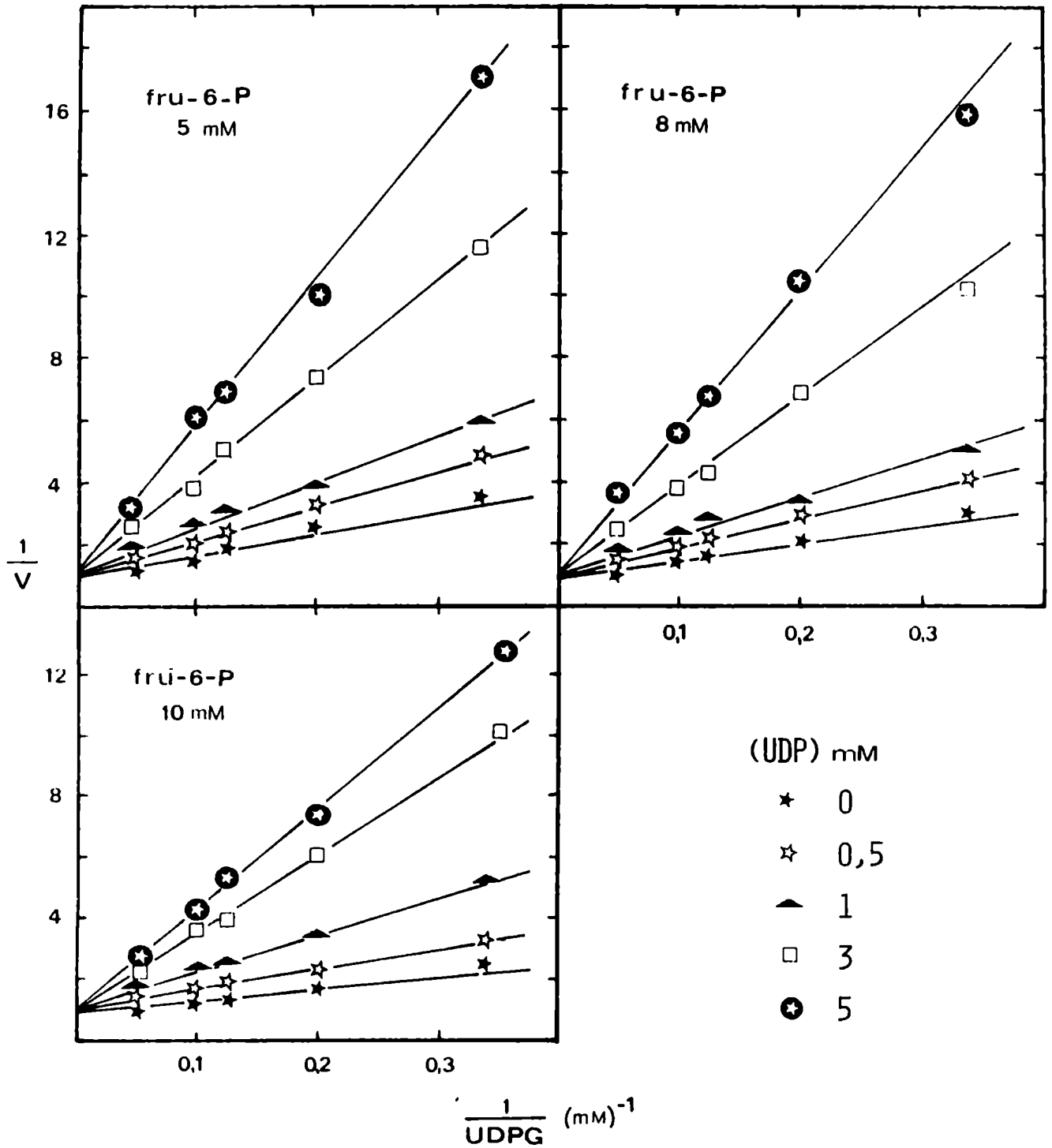


Fig. 49. Inhibición por UDP con UDPG como sustrato variable, a diferentes concentraciones constantes de fructosa-6-P (5, 8 y 10 mM). Se midió la actividad por el método A. La velocidad está expresada en  $\mu$ moles de sac-6-P formados/min·ml.

Las pendientes correspondientes a las rectas de cada uno de los gráficos (fig. 48 y 49) fueron graficadas en función de la concentración respectiva de UDP (fig. 50).

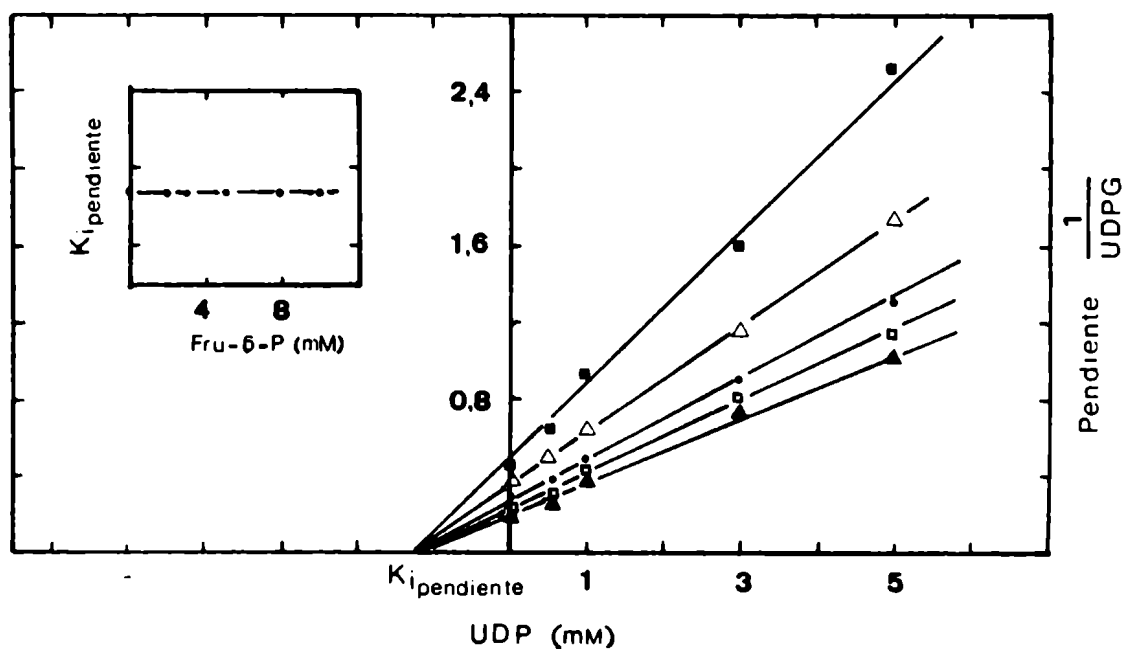


Fig. 50. Gráfico de las pendientes de  $1/UDPG$  en función de UDP (fig. 48 y 49) a diferentes y constantes concentraciones de fructosa-6-P. Las concentraciones de fructosa-6-P son: ( $\blacksquare$ ) 2 mM; ( $\triangle$ ) 3 mM; ( $\bullet$ ) 5 mM; ( $\circ$ ) 8 mM y ( $\blacktriangle$ ) 10 mM. El gráfico inserto en la figura muestra la variación de  $K_{i\text{pendiente}}$  con las concentraciones de fructosa-6-P. La actividad fue medida por el método A. La velocidad está expresada en  $\mu\text{moles de sac-6-P formados/min}\cdot\text{ml}$ .

El gráfico inserto en la fig. 50 muestra que los  $K_{i\text{pendiente}}$  no se modifican con la variación de la concentración de fructosa-6-P.

Cinética de la inhibición por fosfato: Con el objeto de obtener más evidencias para esclarecer el mecanismo cinético de la reacción catalizada por la sacarosa fosfato sintetasa, se estudió en particular, la inhibición por fosfato. A tal efecto se determinaron las velocidades iniciales a distintas concentraciones de fructosa-6-P y en presencia de diferentes niveles de fosfato. La concentración del otro sustrato fue mantenida fija en 10 mM (fig. 51).

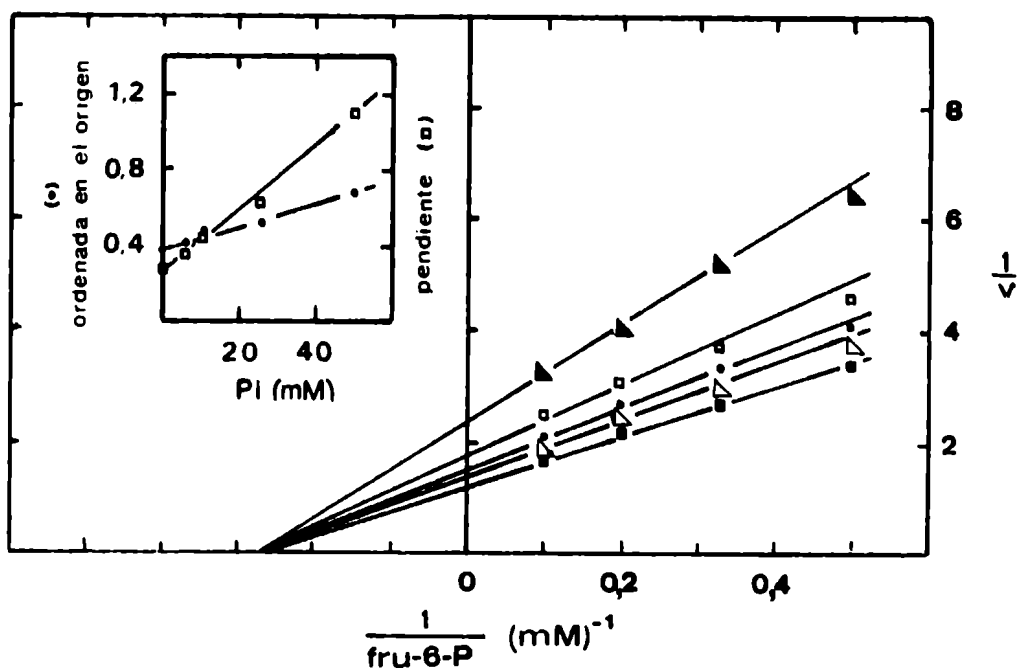


Fig. 51. Inhibición por fosfato, con fructosa-6-P como sustrato variable. La concentración de UDPG fue 10 mM. Las concentraciones de fosfato fueron: ( $\Delta$ ) 5 mM; ( $\cdot$ ) 10 mM; ( $\square$ ) 25 mM; ( $\blacktriangle$ ) 50 mM y ( $\blacksquare$ ) sin adición. En el gráfico secundario se representaron las pendientes y ordenadas en el origen del gráfico primario en función de las concentraciones de fosfato. La actividad fue medida por el método A. La velocidad está expresada en  $\mu$ moles de sac-6-P formados/min.ml.

Se obtuvo una familia de rectas que se interceptaron a la izquierda del eje vertical, lo cual indica que el fosfato es un inhibidor no competitivo, lineal, respecto de fructosa-6-P.

Cuando el sustrato variable fue UDPG y fructosa-6-P fue constante (10 mM), los resultados obtenidos para diferentes concentraciones de fosfato están representados en la fig. 52.

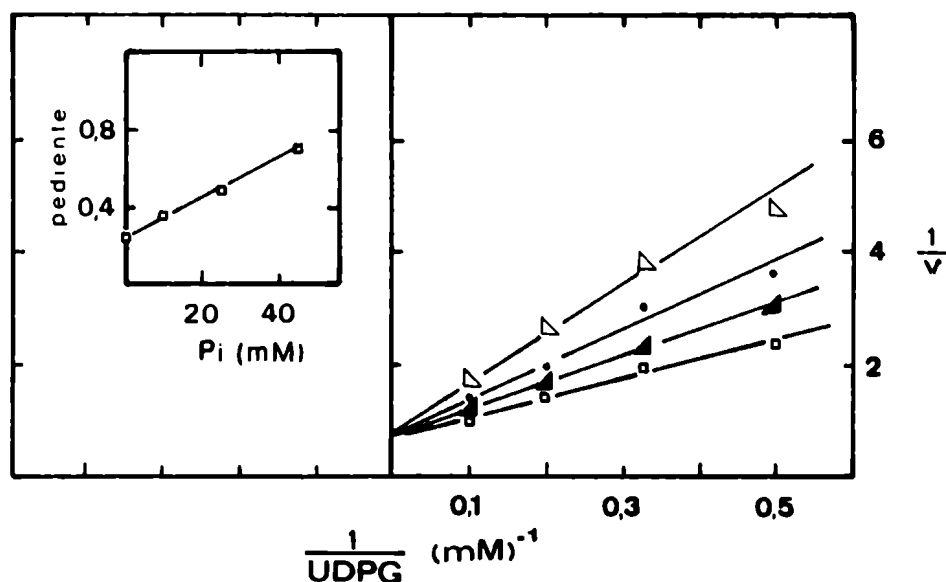


Fig. 52. Inhibición por fosfato, con UDPG como sustrato variable. La concentración de fructosa-6-P fue de 10 mM. Las concentraciones de fosfato fueron: (▲) 10 mM; (●) 25 mM; (△) 50 mM y (○) sin adición. En el gráfico inserto se representaron las pendientes del gráfico primario en función de la concentración de fosfato. La actividad se midió por el método A. La velocidad está expresada en  $\mu\text{moles de sac-6-P formados/min}\cdot\text{ml}$ .

El fosfato resultó ser un inhibidor competitivo respecto de UDPG, ya que las rectas se interceptan sobre el eje de las ordenadas. Cuando se representaron las pendientes de las rectas del gráfico primario en función de las correspondientes concentraciones de fosfato, se obtuvo una línea recta.

## D I S C U S I O N

### PURIFICACION DE LA SACAROSA FOSFATO SINTETASA

Se eligió germen de trigo como fuente de enzima, ya que se deseaba disponer de un material relativamente homogéneo y de fácil constante obtención.

La enzima ha sido aislada de varias fuentes, inclusive de germen de trigo, pero nunca ha sido purificada hasta homogeneidad. Además, dichas preparaciones contenían proporciones variables de sacarosa sintetasa. Los procedimientos utilizados para su purificación han sido: fraccionamiento con sulfato de amonio, precipitación con protamina, y cromatografía de intercambio iónico (41,81,84, 92).

Uno de los objetivos del presente trabajo fue tratar de obtener un método de purificación rápido, sencillo y reproducible, mediante el cual se lograra una preparación enzimática lo más pura posible. La purificación de la enzima se ha llevado a cabo por dos procedimientos. Ambos tienen en común que separan por completo la sacarosa fosfato sintetasa de sacarosa sintetasa, que es extraída de los tejidos vegetales juntamente con ella, y que constituye una de las principales impurezas de preparaciones anteriores. En el procedimiento A se logró esa separación mediante una extracción diferencial de un precipitado de sulfato de amonio, mientras que en el procedimiento B, mediante cromatografías en DEAE-celulosa. El primer método (A) fue el empleado cronológicamente en primer término, pero ante los bajos rendimientos obtenidos se desarrolló el procedimiento B.

Una de las dificultades que se encontraron a medida que se avanzaba en la purificación de la enzima, fue su inestabilidad, lo cual llevó a introducir glicerol en los buffers utilizados, con el objeto de proteger a la enzima. Di-

cha inestabilidad se puso más de manifiesto cuando se la sometió a filtraciones en gel en Sepharosa 6B, donde aún en presencia de glicerol y/o de uno de los sustratos, fructosa-6-P, se produjeron pérdidas de actividad del orden del 60-70%. Sin estos agregados la pérdida de actividad podía llegar hasta el 90%.

La enzima que se obtiene por pasaje a través de Sepharosa 6B, se encuentra totalmente libre de sacarosa sintetasa, de sacarosa-6-P fosfatasa, de glucosa-6-P isomerasa y fosfatasas inespecíficas. La actividad específica obtenida para esta enzima es de 680 nmoles de producto/min.mg de proteína, y se encuentra 345 veces purificada respecto del homogenato. Estos datos corresponden a una preparación promedio, puesto que se han obtenido preparaciones con valores de actividad enzimática superiores e inferiores.

La enzima eluída de Sepharosa 6B posee una alta actividad específica pero no se encuentra homogénea aún, ya que presentó varias bandas de proteínas cuando se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida. La determinación de la actividad en el gel fraccionado indicó la presencia de tres bandas con actividad enzimática, lo cual permite sugerir que sacarosa fosfato sintetasa existe como tres isoenzimas separables en base a su carga en un campo eléctrico. Hasta el momento no se conoce otra propiedad diferencial de las mismas y se espera en futuros estudios, poder individualizarlas.

### PROPIEDADES GENERALES DE LA ENZIMA

#### ESTABILIDAD

Durante distintas etapas de la purificación de la enzima se estudió su estabilidad bajo diferentes condiciones. Inicialmente, se pensó en lograr una



purificación del homogenato manteniéndolo a alta temperatura, a distintos pH. Se encontró que si permanecía durante 5 minutos a 50°C, la enzima perdía actividad, especialmente a pH menores que 6,4. En presencia de fructosa-6-P, la pérdida era menor. Este tipo de experimentos sugirió que el sustrato, fructosa-6-P, podría ejercer un efecto protector sobre la enzima (Tabla 6). Este efecto también se manifestó cuando la enzima era mantenida a 0°C.

A medida que se avanzaba en la purificación, la enzima se hacía más inestable y por consiguiente para mantener su actividad fue necesario guardarla en presencia de glicerol y/o fructosa-6-P. De acuerdo a los resultados obtenidos, se considera que las condiciones óptimas para guardar la enzima purificada son mantenerla en buffer pH 7,4, con mercaptoetanol 0,1 mM, fructosa-6-P 10 mM y glicerol 20% (por períodos cortos de tiempo a 0°C, en cambio por períodos largos, conviene a -20°C o a -50°C).

La sacarosa fosfato sintetasa presenta una diferencia importante con respecto a la sacarosa sintetasa en cuanto a la resistencia de ambas frente al congelamiento y descongelamiento (72). Mientras que la primera puede ser congelada a -20°C y -50°C, y se recupera la actividad al descongelar, la segunda pierde un 75% (72). También es posible someter la enzima a liofilización sin que haya una gran pérdida de actividad.

#### GRUPOS SULFHIDRILOS

La sacarosa fosfato sintetasa de germen de trigo, al igual que la enzima estudiada en extractos de tubérculos de papa por Slabnik et al. (78), es afectada por reactivos de grupos sulfhidrilos, como el PCMB. Este efecto puede ser revertido por completo en presencia de DTT y  $\beta$ -mercaptoetanol en el medio de incubación.

No se ha podido efectuar una titulación del número de grupos sulfhidrílicos, ni determinar si hay una diferencia en reactividad de los mismos, por no contar con una enzima homogénea. Sin embargo, se pudo observar que la actividad de la enzima disminuye, a una concentración más elevada de DTT o  $\beta$ -mercaptoetanol, lo cual podría indicar que se estarían comenzando a clivar puentes sulfhidrúlicos que serían esenciales para determinar la estructura activa de la proteína (114).

#### pH OPTIMO Y PUNTO ISOELECTRICO

La actividad de la enzima en función del pH presenta un óptimo alrededor de 6,3 a 6,7 (fig. 11), rango en el cual están comprendidos la mayoría de los resultados obtenidos por otros autores para la enzima aislada de diversas fuentes (tabla 1).

Es importante señalar que la actividad de la enzima depende del buffer que se utilice para su determinación. Tanto fosfato como TRIS-maleato y citrato tienen un efecto inhibitorio y por lo tanto no son recomendables para determinar ni la actividad de la enzima, ni su variación con el pH (tabla 7).

Por el contrario, los buffers de Good et al. (115), HEPES, PIPES y MES son óptimos para medir la actividad.

El punto isoeléctrico fue determinado durante experiencias de isoelectroenfocado destinadas a estudiar la purificación de la enzima. Se obtuvo un pI de 5,1 cuando se usó anfolitos de rango amplio o de rango reducido (fig. 12).

#### CONSTANTES CINETICAS

La constante de Michaelis determinada para fructosa-6-P, en ausencia o en presencia de  $MgCl_2$  20 mM, es 3 - 4,5 mM. Para UDPG, la  $K_m$  hallada en iguales

condiciones es 3 mM. Las curvas de saturación para ambos sustratos fueron hiperbólicas. Por el contrario, las mismas curvas, determinadas por Preiss y Greenberg (97) para la enzima de germen de trigo, fueron sigmoidas. Murata (81) encontró un comportamiento similar para las enzimas aisladas de batata, papa, cebada y trébol. En estos casos (81, 97), el orden aparente de reacción, osciló entre 1,4 y 1,8, indicando un bajo grado de interacción.

Nomura y Akazawa encontraron que la enzima de escutelo de arroz seguía también una cinética michaeliana. Además, hicieron la observación que la enzima se apartaría de este tipo de cinética cuando se mide a pH 6,5 (92). En el presente trabajo no se observaron diferencias con el pH y, aún a bajas concentraciones de UDPG y fructosa-6-P, no fue posible demostrar curvas de saturación no hiperbólicas.

#### PESO MOLECULAR

Los estudios para determinar el peso molecular fueron realizados por dos técnicas distintas: filtración en columnas de Sepharosa 6B y por centrifugación en gradiente de glicerol.

##### a) Por filtración en gel.

El peso molecular determinado por este método fue de alrededor de 380.000 - 390.000. Este valor es inferior al hallado por Nomura y Akazawa (92) que estimaron un peso molecular de 450.000 para la enzima aislada de escutelo de arroz.

El valor indicado en primer término corresponde al de la mayoría de las preparaciones enzimáticas. Sin embargo, algunas preparaciones mostraron un perfil de elución que además del pico de actividad correspondiente al peso molecular 390.000, presentaban otros cuyos pesos moleculares aproximados se estima-

ron en 800.000 y 1.000.000 (fig. 14). Cuando el pico de mayor peso molecular se volvió a cromatografiar en Sepharosa 6B bajo idénticas condiciones, se pudo observar que aparecían además las otras especies de menor peso molecular (fig. 15).

Como la aparición de las especies de alto peso molecular no era reproducible, se realizaron experimentos destinados a aclarar si su formación se debía a algún artefacto producido durante la purificación. Con este objeto se cromatografiaron muestra con distintas concentraciones de proteínas, o bien preparaciones enzimáticas a las cuales se había desnaturalizado parcialmente. También se realizaron cromatografías en presencia de  $MgCl_2$  10 mM y de fructosa-6-P 10 mM.

Ninguna de las experiencias condujo a la aparición de las formas enzimáticas de mayor peso molecular, y por lo tanto se dejó de lado la posibilidad de un artefacto.

En conclusión, hasta el momento no se halló una explicación para la aparición de especies de distintos pesos moleculares. No se descarta la posibilidad que sólo fuesen extraídas ocasionalmente.

Otro resultado, vinculado a las filtraciones en gel, que no ha sido posible explicar por completo, es la gran pérdida de actividad que tiene lugar cuando preparaciones de enzima se someten a esta técnica. En un primer momento se pensó que podría deberse a la gran dilución de la enzima durante la cromatografía, pero experimentos realizados tratando de reproducir las condiciones de dilución de la columna, no mostraron tales pérdidas de actividad. También se hubiera podido atribuir a la pérdida de un factor que hubiese acompañado a la enzima en los pasos anteriores y que se separase de la misma durante la filtración en gel. Para probar esta hipótesis, se concentraron las fracciones ante-

riores y posteriores a las del pico de actividad (de peso molecular 390.000) y alícuotas de los concentrados se adicionaron a la enzima para ver si se obtenía la actividad inicial. El resultado de este experimento fue también negativo.

b) Por centrifugación en gradiente de glicerol

La constante de sedimentación se determinó según la técnica de Martin y Ames (95) con la diferencia que se usaron gradientes de glicerol en lugar de sacarosa ya que ésta ocasiona interferencia en la actividad de la enzima. El valor hallado fue  $S_{20,w} = 13,9 \pm 0,5$  S. En base a esta constante de sedimentación se calculó un peso molecular aproximado de  $386.000 \pm 20.000$ , que concuerda con el determinado por la técnica de filtración en gel. Nomura y Akazawa, usando el mismo método (92) encontraron un  $S_{20,w}$  de 10,4 S, que correspondería a un peso molecular de 217.000, resultado que no sólo no concuerda con los datos hallados por los mismos autores por filtración en gel, sino que también difiere de los presentados en este trabajo.

Como los perfiles de actividad durante la sedimentación de la enzima en gradientes de glicerol no fueron totalmente simétricos, se decidió hacer experiencias en las que el buffer del gradiente contuviese, además, fructosa-6-P 10 mM, ó UDPG 5 mM, ó  $MgCl_2$  10 mM, para ver si ocurría alguna modificación en la forma en que sedimentaba la enzima. Los resultados no mostraron diferencia apreciable en la forma de sedimentación bajo las distintas condiciones (fig. 17).

Se estudió la posibilidad que existiese alguna asociación entre sacarosa sintetasa y sacarosa fosfato sintetasa, ya que se había observado durante los distintos pasos de la purificación de la sacarosa fosfato sintetasa que ambas enzimas tenían propiedades muy semejantes. Sin embargo, cuando ambas enzimas

se centrifugaron en un gradiente de glicerol no se pudo observar ninguna diferencia en la forma de sedimentar cuando estaban juntas o separadas. Tampoco hubo diferencias cuando se adicionó  $\text{MgCl}_2$  10 mM al buffer del gradiente.

#### EFECTO DE DIFERENTES COMPUESTOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA

Se considera en general que una reacción irreversible es el punto más adecuado en un camino metabólico para ejercer el control del mismo (116).

Como la reacción catalizada por la sacarosa fosfato sintetasa posee un equilibrio desplazado hacia la formación de sacarosa-6-P, y en presencia de sacarosa fosfato fosfatasa, dicho producto es inmediatamente hidrolizado a sacarosa y fosfato, puede ser considerada como una reacción prácticamente irreversible. Por consiguiente, sería probable que la actividad de la enzima estuviera sujeta a regulación.

Con el objeto de determinar la existencia de inhibidores o activadores de la reacción catalizada por la enzima, se estudió la influencia de diversos metabolitos sobre su actividad.

#### INFLUENCIA DE IONES

##### a) Cationes

El efecto de cationes monovalentes había sido estudiado anteriormente para la enzima de escutelo de arroz por Nomura y Akazawa (92), quienes encontraron un cierto efecto estimulante de potasio.

Para poder estudiar el efecto de cationes monovalentes, se determinó la acti-

vidad enzimática en presencia de sustratos y de buffer como sales de TRIS. Se pudo demostrar que ni el sodio ni el potasio tienen efecto alguno sobre la enzima.

Diversos autores demostraron que  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  producen un efecto estimulador sobre la sacarosa fosfato sintetasa (78,81,91,97,98). Se ha confirmado, para la enzima purificada de germen de trigo, que ambos cationes ejercen un efecto activador. Las constantes aparentes determinadas para ambos iones ( $K$  para  $Mg^{2+}$ , 1,3 mM;  $K$  para  $Mn^{2+}$ , 0,4 mM) indican que los dos cationes tienen una alta afinidad por la enzima. Por el contrario, el ion  $Ca^{2+}$  produce una activación mucho menor.

Para otras enzimas aisladas de plantas se ha encontrado que la influencia del  $Mg^{2+}$  en la actividad de las mismas varía con el pH (117). En el caso de sacarosa sintetasa (53,69-73) se encontró que el ion  $Mg^{2+}$  inhibe la actividad de la enzima en el sentido de clivaje de sacarosa, a su pH óptimo 6,5, mientras que activa la síntesis del disacárido que ocurre a pH 8. En cambio, para la sacarosa fosfato sintetasa no se ha observado ningún cambio en la activación por los cationes bivalentes ( $Mn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ ) con el pH.

Se intentó verificar si la sacarosa fosfato sintetasa requería en forma absoluta alguno de los cationes bivalentes para su actividad. Para ello se dializó la enzima contra EDTA 10 mM o 50 mM y también se la incubó a 4°C en presencia de EDTA 10 mM. Una vez eliminado el EDTA, no se comprobó modificación de la actividad enzimática, lo cual sugiere que la enzima no tiene requerimiento absoluto de aquellos iones. Un procedimiento similar permitió establecer que la glutamina sintetasa requiere en forma absoluta iones  $Mn^{2+}$  para su actividad, y que los mismos se encuentran directamente unidos a la proteína (118).

b) Aniones

Se determinó la actividad de la enzima en presencia de diversos aniones (tabla 9). Solamente maleato, isocitrato, citrato y sulfato provocaron una inhibición significativa, a una concentración final de 50 mM. A pesar que esta concentración es relativamente alta para los niveles que pueden encontrarse en los tejidos, la inhibición producida no puede ser considerada como un simple efecto de fuerza iónica, ya que algunos de los aniones ensayados (bromuro, fluoruro) no tuvieron ningún efecto. Tampoco puede afirmarse que la inhibición es provocada específicamente por aniones polivalentes, y en particular, por aquéllos que tienen más de un carboxilo, puesto que compuestos muy similares, con igual número de carboxilos ionizados, como malato y maleato, muestran efectos totalmente diferentes. Al mismo tiempo se puede observar que la inhibición es específica de algunos aniones y no puede ser causada por el catión que los acompaña, pues todas eran sales de sodio.

La influencia de algunos aniones ha sido estudiada por Fekete (84) y Nomura y Akazawa (92). Hawker (82) sólo probó malato y Slabnik et al. (78) cloruro y sulfato.

Nomura y Akazawa no encontraron efecto con aniones tales como citrato, succinato, malato, oxalacetato y glicolato, probablemente porque fueron probados a concentraciones bajas (5 y 10 mM).

Los resultados de Fekete son difíciles de interpretar. Si bien encuentra que varios aniones carboxílicos (malato, fumarato, citrato, succinato, piruvato, aspartato y acetato) tienen un efecto activador, éste sólo se manifiesta cuando la enzima se encuentra desprovista de un activador de naturaleza desconocida, aislado por esta autora. En cambio cuando la enzima tiene el activador unido, tienen un efecto inhibitorio. Resulta difícil evaluar la significación de la



presencia o ausencia del mencionado activador en el contexto general de la inhibición producida por aniones, ya que Fekete ha informado (119) que la detección de aquel compuesto estaba ligada a una variedad particular de haba.

Fue estudiada con mayor detalle la inhibición provocada por maleato, citrato y fosfato. El maleato no es un compuesto natural pero fue tenido en cuenta porque es utilizado como buffer. Se encontró que provoca una fuerte inhibición (fig. 30), y el coeficiente de Hill calculado para este anión dió un valor de 0,6.

En cambio, el efecto inhibitorio de citrato y fosfato era de particular importancia pues están presentes normalmente en los tejidos (120). La inhibición fue estudiada también en presencia de iones  $Mg^{2+}$  (fig. 31 y 32). El  $Mg^{2+}$  modifica sólo en parte el efecto inhibitorio de los aniones, cuando su concentración es mayor que la de estos últimos. El coeficiente de Hill correspondiente a la inhibición provocada por citrato y fosfato es menor que uno. Podría pensarse que la inhibición tiene lugar a concentraciones relativamente elevadas de ambos aniones y por lo tanto no tendría ningún significado fisiológico. Sin embargo, se han determinado concentraciones de esa magnitud (120).

Los resultados hallados para el fosfato son importantes puesto que puede considerarse, junto con sacarosa, como uno de los productos terminales de las reacciones catalizadas por la enzima en estudio y por la sacarosa fosfato fosfatasa. Los estudios cinéticos llevados a cabo utilizando fosfato como inhibidor que no genera producto, se discuten más adelante.

#### EFFECTO DE NUCLEOTIDOS

Se determinó la actividad de la enzima en presencia de varios nucleósidos mono-, di- y trifosfato. Especialmente interesaba conocer el efecto de UTP y

ATP, ya que son, en cierta forma, precursores de los sustratos de la reacción.

Los resultados obtenidos (tabla 10) difieren de los hallados por Nomura y Akazawa (92) y Mendicino (41). Para estos autores, ni ATP ni UTP afectaban la actividad de la enzima a una concentración de 5 mM. La información publicada por Fekete sobre la acción de los nucleótidos, nuevamente depende si la enzima está o no acompañada por el factor activador (84).

En el presente trabajo se encontró que los nucleósidos monofosfato (UMP y AMP) no tienen acción sobre la enzima. El ADP provoca una pequeña inhibición mientras que UTP, GTP, CTP y ATP inhiben entre 50 y 70%. La inhibición producida por UTP, CTP y ATP resultó ser competitiva respecto de UDPG (fig. 35).

El UDP provoca una fuerte inhibición (80%) resultado hallado por otros autores que también demostraron que es un inhibidor competitivo (41,78,91,92). El estudio cinético de la inhibición por UDP como producto de la reacción se trata en detalle más adelante.

Ya se ha demostrado que a pesar que el  $Mg^{2+}$  tiene un efecto estimulante sobre la enzima, ésta no lo requiere en forma absoluta para su actividad. Por otra parte, está comprobado que el  $Mg^{2+}$  participa en numerosas reacciones donde intervienen sustratos fosforilados y que, en algunos casos, también está involucrada una unión directa del  $Mg^{2+}$  con la enzima (118). Como la enzima es inhibida por diferentes nucleótidos, se estudió la influencia del  $Mg^{2+}$  sobre esta inhibición (tabla 10). El ion divalente, a concentraciones fisiológicas, es capaz de revertir la inhibición producida. Este efecto se estudió con mayor detalle para ATP y UDP. Para ATP se encontró que hasta que la concentración de  $Mg^{2+}$  no alcanza y supera a la del nucleótido (fig. 34) no revierte por completo la inhibición. O sea, esto indicaría que Mg-ATP no inhibe mientras que ATP libre es el inhibidor.

Se mencionó anteriormente que la inhibición por UDP, como producto de la reacción y la influencia estimulante del  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  habían sido estudiadas. Sin embargo no ha sido indicado antes que pudiese existir alguna conexión entre la activación por los iones bivalentes y la inhibición por UDP. Se demostró que tanto el  $Mg^{2+}$  como el  $Mn^{2+}$  revierten la inhibición producida por el producto UDP (fig. 26). Este, aún a concentraciones bajas (0,5 mM) inhibe la reacción en ausencia de los cationes. La actividad se reduce a un 80-90% en presencia de UDP entre 5-10 mM. La adición de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  dan como resultado la recuperación de la actividad al nivel de los valores del control, dependiendo de la concentración inicial de UDP presente y de la concentración final alcanzada para el ion bivalente. El  $Ca^{2+}$ , que tenía un efecto activador menor, no logra superar la inhibición (fig. 27).

La modificación del pH no altera la inhibición producida por UDP. Los resultados mostraron que UDP 2 mM produce una inhibición entre 40-60% entre pH 5,5 y 7,5, presentando una meseta alrededor del pH óptimo (fig. 28). La adición de  $Mg^{2+}$  provoca un aumento de actividad, llevándola a valores por encima del control.

Con objeto de ilustrar cómo la acumulación de UDP durante el transcurso de la reacción afecta la velocidad de reacción, se estudió la misma en el tiempo, simultáneamente en presencia y ausencia de  $Mn^{2+}$ . Cuando el ion bivalente estaba presente, la reacción fue lineal durante más tiempo. La adición de  $Mn^{2+}$  después de un cierto tiempo de iniciada la reacción, removió la inhibición producida por el UDP acumulado (fig. 29).

Si bien los resultados obtenidos con una misma preparación de enzima fueron reproducibles, hubo una cierta variabilidad entre una preparación y otra,

especialmente en el grado de activación producida por los iones bivalentes. En cambio, la inhibición por UDP fue siempre reproducible.

Los experimentos descriptos indican que  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  pueden ejercer una acción reguladora sobre la actividad de la sacarosa fosfato sintetasa. Un efecto similar ha sido demostrado para sacarosa sintetasa (73), la cual, como ya se mencionó, es activada por los iones bivalentes en el sentido de síntesis de sacarosa e inhibida en el de clivaje. Es decir, que las dos enzimas capaces de sintetizar sacarosa son afectadas por  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ , y en ambos casos dichos cationes pueden revertir la inhibición por producto.

Los iones bivalentes también juegan un papel importante en la actividad de la sacarosa fosfato fosfatasa (42). Sin embargo, es muy difícil evaluar el significado fisiológico de todos estos datos.

Los resultados de este estudio podrían correlacionarse con los de Gustafson y Gander (121), quienes sugieren que se podría regular la dirección de catálisis de la UDPG pirofosforilasa de plantas de soja, si se pudiesen modificar las concentraciones intracelulares o intracompartamentales del ion  $Mg^{2+}$  libre. O sea, un incremento en la concentración de catión bivalente daría como consecuencia la activación de la síntesis de UDPG, y por lo tanto, la formación de sacarosa-6-P no solamente se incrementaría porque el nivel de UDPG, uno de sus sustratos, se ha elevado, sino porque además se revertiría la inhibición producida por el producto UDP.

#### EFECTO DE AZUCARES

##### a) Inhibición por $\delta$ -gluconolactona

El estudio de la acción de monosacáridos en la actividad de la enzima fue encarado eligiendo aquéllos que por su estructura podían dar también alguna

información sobre el mecanismo de reacción. Un criterio semejante fue usado en el estudio de sacarosa sintetasa (73) donde se encontró que glucosa,  $\beta$ -D-tioglucona, glucosamina, ácido glucónico, y  $\delta$ -gluconolactona afectaban la actividad de la enzima. Cuando se determinó la influencia de estos monosacáridos en la actividad de sacarosa fosfato sintetasa (tabla 11), se encontró que el único que provocó inhibición fue la  $\delta$ -gluconolactona. Este resultado es importante pues permite especular sobre el mecanismo por el cual se produce la transferencia de la glucosa del UDPG a la fructosa-6-P, como se ha hecho para sacarosa sintetasa (73), que cataliza una reacción en la que ocurre una transferencia similar. Tanto en UDPG, como en sacarosa-6-P, la configuración del carbono anomérico es  $\alpha$ , lo cual indica que la reacción transcurre con retención de la configuración. Esto elimina un mecanismo de simple desplazamiento que conduce a una inversión en el producto. Podría en cambio ocurrir un doble desplazamiento, con dos inversiones de Walden obteniéndose un producto con la misma configuración que el sustrato. Este mecanismo ha sido demostrado para sacarosa fosforilasa (122).

Las reacciones de transglucosilación catalizadas por glucógeno fosforilasa (123) y  $\beta$ -glucosidasa (124) que tienen lugar con retención de la configuración, son inhibidas por  $\delta$ -gluconolactona (125). La lactona adopta una conformación de media silla (126,127) similar a la de un ion cíclico carbonio-oxonio (que se forma en la catálisis ácida de un glucósido (128)). Por consiguiente, la lactona aparentemente competiría por el sitio de transferencia de glucosilos y el estado transiente normal sería, probablemente un complejo glucosa-enzima en el cual la parte glucosílica tiene conformación de media silla. Este mecanismo ha sido propuesto para la reacción catalizada por la sacarosa sintetasa (73). En este caso la enzima facilitaría una reacción de desplazamiento seguida

de un ataque frontal por fructosa sobre el ion carbonio estabilizado (4).

Para el caso de la sacarosa fosfato sintetasa, la  $\delta$ -gluconolactona también produce una inhibición importante en la actividad de la enzima, y por lo tanto la reacción podría tener lugar mediante un mecanismo similar al propuesto para sacarosa sintetasa.

Una reacción de doble desplazamiento es poco probable, porque intentos en este trabajo para demostrar la presencia de una enzima glucosilada no dieron resultado. En efecto, no se pudo detectar ningún intercambio entre UDPG y UDP- $^3\text{H}$ , cuando dichos compuestos fueron incubados con la enzima, en ausencia de fructosa-6-P. En cambio, estudios similares llevados a cabo con la sacarosa fosforilasa, dieron evidencia en favor de una reacción de doble desplazamiento, y en este caso, sí fue posible aislar el intermediario enzima-glucosilada (122).

#### b) Inhibición por sacarosa

Cuando se estudió el efecto de oligosacáridos se encontró que el único que producía una inhibición significativa fue sacarosa (tabla 12). Este efecto parece ser específico ya que otros disacáridos con una estructura similar, como turanosa, o trisacáridos en los cuales la sacarosa forma parte de su molécula, como rafinosa, melizitosa, y estaquiosa, no evidenciaron ningún efecto en la reacción.

Como sacarosa puede ser considerada como un producto final de la reacción catalizada por la enzima, se consideró muy importante asegurarse que esta inhibición era real y no producto de los métodos utilizados. Por este motivo, fue determinada por el método B (medición del UDP según la técnica de Cabib y Leloir); por el método D (medición del UDP luego de ser separado de UDPG por cromatografía en papel) y además, por el método C (estimación de sacarosa-6-P

radiactiva). En todos los casos se obtuvieron resultados similares. Esta comprobación sirvió para poder verificar que las variaciones que se encontraban en el grado de inhibición eran debidas a las distintas preparaciones enzimáticas, y no al método de medida. Se encontró también que en algunas preparaciones el efecto inhibitorio disminuía con la edad de la enzima. Estas variaciones pueden explicar los resultados contradictorios de Nomura y Akazawa (92) y Hawker (83), quienes no detectaron ninguna inhibición por sacarosa en las enzimas por ellos preparadas y los de Fekete (129). Fekete encontró que sacarosa 10 mM producía una inhibición del 10% en la enzima de cotiledones de haba.

La inhibición por sacarosa fue estudiada cinéticamente, encontrándose que actúa como un inhibidor no competitivo respecto a fructosa-6-P. El análisis de los gráficos secundarios indicó que la inhibición era de tipo parcial, hiperbólica (fig. 37). Este tipo de inhibición de acuerdo a Cleland (130) ocurre cuando el inhibidor hace que la reacción sea desviada por un camino alternativo que es más lento que el normal.

El estudio cinético de la inhibición por sacarosa respecto a UDPG, mostró un resultado más complejo (fig. 38). El gráfico podría corresponder a un tipo de inhibición producida por formas diferentes de la misma enzima, o también según Segel (131) al de una enzima con dos sitios idénticos a los cuales se une el sustrato y un sitio para el inhibidor, de manera tal que el inhibidor excluye al sustrato solamente de uno de sus dos sitios.

Al graficar los resultados obtenidos cuando el sustrato variable era UDPG o fructosa-6-P, de acuerdo a la ecuación de Hill, el coeficiente determinado fue menor que uno para las mayores concentraciones de sacarosa (fig. 39 y 40). Estos datos parecen indicar que la sacarosa se une a la enzima en forma negativamente cooperativa (132-137).

El efecto inhibitorio producido por sacarosa fue estudiado variando la concentración de la misma (fig. 30). Se observó que la inhibición ocurre a niveles del disacárido que pueden ser encontrados en las células vegetales (135-138).

Posteriormente se buscó algún metabolito que pudiera revertir la inhibición causada por sacarosa. La única evidencia encontrada es que el ion  $Mg^{2+}$  puede llevar la actividad a los niveles del control (fig. 41). Cuando se graficaron los datos representados en la fig. 41 de acuerdo a Dixon, se obtuvo una serie de puntos que podían unirse con dos rectas de distinta pendiente. Dichas rectas interceptan al eje de las abscisas en dos puntos diferentes, y, como consecuencia, podrían estimarse aparentemente dos  $K_i$ : una de 50 mM y la otra de un orden de magnitud mayor. Por consiguiente, se podría sugerir que son dos formas de enzima con reactividad distinta frente a sacarosa. El  $Mg^{2+}$  no modificó el tipo de representación.

Los resultados obtenidos con la enzima en presencia de sacarosa son de compleja interpretación. Los datos indicarían que se puede estar en presencia de formas diferentes de la misma enzima, y/o se trataría de una enzima que muestra cooperatividad negativa.

Estas alternativas contribuirían, sin duda, a explicar cómo sería posible que la enzima funcione en presencia de sacarosa.

#### MECANISMO DE REACCION. ESTUDIO CINETICO

La sacarosa fosfato sintetasa cataliza una reacción en la cual dos sustratos dan lugar a la formación de dos productos, o sea, es una reacción Bi Bi, de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Cleland (139).

Para determinar el mecanismo de la reacción, se efectuaron estudios de



velocidad inicial, inhibición por producto y por inhibidores que no generan producto. La determinación de la velocidad inicial cuando se varía la concentración de uno de los sustratos mientras la del otro se mantiene constante a diferentes concentraciones, permite distinguir entre un mecanismo secuencial y un mecanismo ping-pong. Para mecanismos secuenciales Bi Bi, sean ordenados o al azar, los gráficos de inversas de velocidad inicial dan una serie de líneas rectas que se encuentran en un punto a la izquierda del eje de ordenadas. En cambio, para mecanismos ping-pong, un gráfico similar da una serie de líneas rectas paralelas.

Cuando, para la reacción de la sacarosa fosfato sintetasa, se determinó la velocidad inicial en condiciones en que la concentración de UDPG era variable mientras que la de fructosa-6-P se mantuvo constante a diferentes niveles, el gráfico correspondiente (fig. 44) dió una serie de líneas que evidentemente tenían un punto de intersección. Por consiguiente, esta experiencia eliminó la posibilidad que fuese un mecanismo ping-pong. Los resultados indicaron, por lo tanto, la existencia de un mecanismo secuencial Bi Bi, es decir un mecanismo en el cual ambos sustratos deben combinarse con la enzima antes que el primer producto sea liberado. Al representar pendientes y ordenadas en el origen del gráfico primario (gráfico inserto en la fig. 44) en función de las inversas de la concentración de fructosa-6-P, se obtuvieron líneas rectas. Este resultado sugiere que la fructosa-6-P se combina con sólo una forma de la enzima.

Un resultado similar se obtuvo cuando se determinó la velocidad inicial manteniendo constante UDPG, y se variaba fructosa-6-P (fig. 45). En el gráfico de inversas se obtuvieron líneas rectas que se cortaban a la izquierda del eje de ordenadas. Al mismo tiempo, las representaciones gráficas de pendientes y

ordenadas en el origen como funciones del sustrato fijo, fueron lineales.

En consecuencia, todos estos resultados indican que el mecanismo de la reacción es secuencial. Sin embargo, no permiten decidir si la adición de sustratos o la liberación de productos tiene lugar en un orden obligatorio (es decir que la unión de un sustrato a la enzima precede a la de otro) o al azar (o sea, cualquiera de los sustratos se une a la enzima sin ningún orden específico).

Para poder resolver cual de los dos tipos de mecanismo secuencial corresponde a la reacción en estudio, se realizaron experimentos de inhibición por producto y por inhibidores que no generan producto, de acuerdo a lo recomendado por Cleland (139-142).

Cuando se estudió la variación de la velocidad inicial en presencia de diferentes concentraciones de UDP mientras se modificaba la concentración de UDPG, se obtuvo un gráfico de dobles recíprocas que mostró claramente que la inhibición es de tipo competitivo (fig. 46) y además, de acuerdo al gráfico secundario, se puede decir que es una inhibición lineal. El UDPG, lo mismo que UDP, se une a una sola forma de la enzima, que puede ser la misma para ambos, o formas de enzima distintas separadas por pasos libremente reversibles. Este resultado confirmó los obtenidos por otros autores que habían encontrado que UDP es un inhibidor competitivo respecto de UDPG (41,78,81,92).

El efecto inhibitorio de UDP cuando se varió la concentración de fructosa-6-P, y UDPG se mantuvo constante, fue no competitivo (fig. 47). El gráfico secundario muestra la modificación de las ordenadas en el origen. Estos datos sugieren que UDP se une a una forma de enzima que es diferente de la forma a que se une fructosa-6-P.

Cleland ha señalado que para un mecanismo ordenado Bi Bi, es posible predecir tres inhibiciones por producto de tipo no competitivo y una de tipo competitivo. Para un mecanismo al azar se pueden esperar cuatro inhibiciones por producto de tipo no competitivo (130).

Los resultados hasta ahora discutidos indicarían que el mecanismo podría ser ordenado. Sin embargo, predicciones sobre los tipos de inhibición por producto para reacciones Bi Bi (tabla 16) indican que los resultados obtenidos también podrían corresponder a un mecanismo al azar de equilibrio rápido (143).

Este mecanismo podría distinguirse de uno ordenado si se hubiera podido hacer un análisis del tipo de inhibición producida por los dos productos, pero como ya Mendicino ha demostrado (41), el otro producto de la reacción, sacarosa-6-P, no inhibe a la enzima. Esto fue confirmado en el presente trabajo. En consecuencia el sistema de la sacarosa fosfato sintetasa corresponde a una situación en donde uno de los productos produce una inhibición despreciable, a concentraciones razonables. Es decir, toda la discusión del mecanismo de la reacción debe basarse en los tipos de inhibición que se obtengan con el único producto de la reacción que inhibe (UDP). De acuerdo a Segel (113), que analiza un caso similar, se puede decidir si el mecanismo es ordenado o al azar observando las pendientes del gráfico secundario obtenido del gráfico primario de la inhibición competitiva por producto. Por lo tanto, se hicieron experimentos en los cuales se determinó la velocidad inicial en función de UDPG variable, a distintos niveles de UDP. Se obtuvo una familia de rectas para cada concentración fija de fructosa-6-P (fig. 48 y 49). De los gráficos de inversas se calcularon las pendientes de las rectas de cada familia, las cuales se graficaron en función de la concentración correspondiente de UDP (fig. 50). Como

Tabla 16. Inhibición por producto para mecanismos Bi Bi.

Mecanismo	Producto inhibidor	Sustrato variable	
		A	B
Ordenado Bi Bi	P	NC	NC
	Q	C	NC
Ordenado de equilibrio rápido Bi Bi	P	-	-
	Q	C	C
Al azar Bi Bi	P	NC	NC
	Q	NC	NC
Al azar de equilibrio rápido Bi Bi	P	C	C
	Q	C	C
Al azar de equilibrio rápido Bi Bi con inhi- bidor EAP	P	NC	C
	Q	C	C
Al azar de equilibrio rápido Bi Bi con inhi- bidor EBQ	P	C	C
	Q	C	NC
Al azar de equilibrio rápido Bi Bi con inhi- bidor EAP y EBQ	P	NC	C
	Q	C	NC
Ping pong Bi Bi	P	NC	C
	Q	C	NC

Inhibición: C: competitiva; NC: no competitiva.

en un sistema ordenado  $K_{i\text{pendiente}}$  (intersección con el eje de abscisas) se mantiene constante para todas las concentraciones de fructosa-6-P, mientras que en un sistema al azar  $K_{i\text{pendiente}}$  puede variar con los niveles de fructosa-6-P, es posible fácilmente distinguir entre ambos mecanismos. El resultado obtenido en el gráfico inserto en la fig. 50 muestra que  $K_{i\text{pendiente}}$  no se modifica cuando la concentración de fructosa-6-P varía. O sea, todos estos datos sugieren fuertemente que el mecanismo de reacción para la sacarosa fosfato sintetasa es ordenado.

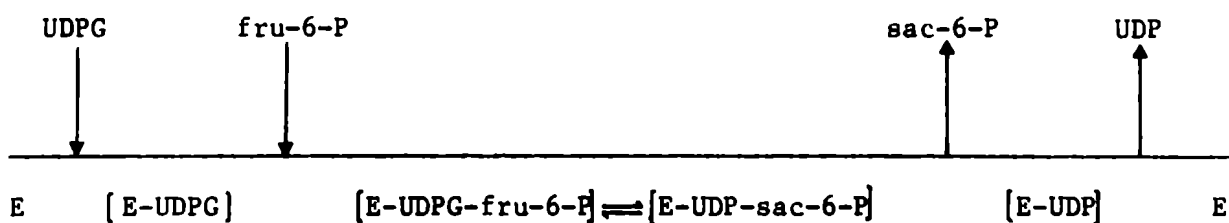
Se obtuvieron más evidencias sobre el tipo de mecanismo cinético cuando se usaron inhibidores que no generan producto. Fekete (84) había encontrado, para la enzima aislada de habas, que el fosfato inhibe la reacción catalizada por la sacarosa fosfato sintetasa, y en el presente trabajo se demostró el mismo efecto para la enzima estudiada. De esta manera, se pudo usar al fosfato como inhibidor del tipo que no genera producto.

Cuando se estudió la variación de la velocidad inicial con concentraciones diferentes de fructosa-6-P en presencia de niveles distintos de fosfato, se obtuvo un gráfico de inversas correspondiente a una inhibición del tipo lineal no competitivo. Estos resultados indican que el fosfato y la fructosa-6-P se combinan con formas diferentes de la enzima.

Por el contrario, el gráfico de inversas de velocidad inicial en función de la inversa de concentraciones de UDPG, a diferentes niveles de fosfato con fructosa-6-P constante, dio una inhibición de tipo competitivo. El gráfico de las pendientes fue también lineal. En consecuencia, estos datos indican que el fosfato se combina con la misma forma de enzima que UDPG que está reversiblemente conectada con la forma con que se combina el UDPG (144).

El estudio cinético realizado sugiere, entonces, que el mecanismo para

la reacción catalizada por la sacarosa fosfato sintetasa es ordenado. Como ya se ha indicado, el UDP es un inhibidor competitivo con respecto a UDPG y no competitivo con respecto a fructosa-6-P. Por lo tanto, si el sistema es ordenado, UDPG debe ser el primer sustrato que se combina con la enzima, y UDP el último producto que se libera, Luego, fructosa-6-P será el segundo sustrato que se adiciona, y sacarosa-6-P el primer producto. Este mecanismo se puede esquematizar, según Cleland, de la siguiente forma:



### CONCLUSIONES

- Se han desarrollado dos métodos de purificación para la sacarosa fosfato sintetasa que permiten su separación total de la sacarosa sintetasa.
- Se determinó la existencia de isoenzimas separables en gel de poliacrilamida.
- El peso molecular promedio hallado para esta enzima, por filtración en gel y centrifugación en gradiente de glicerol es de 385.000. También se determinó el coeficiente de sedimentación  $S_{20,w} = 13,9 \pm 0,5$  S.
- Se ha comprobado que la sacarosa fosfato sintetasa no posee requerimiento absoluto de iones bivalentes, pero sí es activada por  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y en menor grado por  $Ca^{2+}$ .
- Los iones bivalentes,  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  pueden revertir la inhibición producida por UDP, nucleósidos trifosfato, y por aniones polivalentes (citrato y fosfato). La acción del catión es probable que se deba a diferentes causas: pueden eliminar los metabolitos inhibidores al complejarse con ellos, y también podrían afectar la conformación de la enzima, o sea habría una interacción metal-proteína.
- Como la  $\delta$ -gluconolactona inhibe a la enzima, se sugiere que el mecanismo de transferencia de glucosa del UDPG a fructosa-6-P es semejante al de sacarosa sintetasa. Por no haberse detectado un intermediario glucosa enzima, es improbable un mecanismo de doble desplazamiento.

- Se ha determinado que sacarosa es inhibidor específico de la reacción. Estudios cinéticos de esta inhibición sugieren que podrían existir dos formas de enzima, o bien se estaría en presencia de una enzima que muestra cooperatividad negativa.
  
- Se sugiere que la sacarosa fosfato sintetasa podría ser regulada si la concentración del ion  $Mg^{2+}$  pudiera modificarse.
  
- Se ha estudiado el mecanismo cinético de la reacción, encontrándose que la misma transcurre por un mecanismo secuencial ordenado, en el cual el primer sustrato que se une a la enzima es el UDPG y el último producto que se libera es el UDP.

*Antonio*

*Enf. Port.*



R E F E R E N C I A S

1. Yudkin, J., Edelman, J. y Hough, L. (Eds.). Sugar. Butterworths, London, 1971.
2. Salisbury, F.B. y Ross, C. Plant Physiology. Wadsworth Publishing Company, Inc., California, 1969, p. 242.
3. Hess, D. Plant Physiology. Springer-Verlag, New York, 1975, p. 277.
4. Pontis, H.G. En Northcote, D.H. (ed.), Plant Biochemistry II, Vol. 13, Univ. Park Press, Baltimore, 1977, p. 80.
5. Ray, P.M. The Living Plant. 2da ed. Holt, Rinehart y Winston, Inc., New York, 1972.
6. Kelly, G.J., Latzko, E. y Gibbs, M. Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 181 (1976).
7. Zimmermann, M. En Wilkins, M.B. (ed.), The Physiology of Plant Growth and Development. McGraw-Hill Publishing Company Ltd., England, 1969, p. 383.
8. Crafts, A.S. y Crisp, C.E. Phloem Transport in Plants. W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1971.
9. Burley, J.W.A. Plant Physiol. 36, 820 (1961).
10. Die, J. van y Tammes, P.M.L. Acta Bot. Neerl. 13, 84 (1964).
11. Geiger, D.R. y Swanson, C.A. Plant Physiol. 40, 685 (1965).
12. Geiger, D.R. y Swanson, C.A. Plant Physiol. 40, 942 (1965).
13. Hartt, C.E. y Kortschak, H.P. Plant Physiol. 42, 89 (1967).
14. Arnold, W.N. J. Theoret. Biol. 21, 13 (1968).
15. Montaldi, E.R. En Moguilewsky, I. y Mejía, R.H., Recientes progresos en Biología, 1971, p. 265.
16. Beslow, D.T. y Rier, J.P. Plant Cell Physiol. 10, 69 (1969).

17. Rier, J.P. y Beslow, D.T. *Bot. Gaz.* 128, 73 (1967).
18. Wetmore, R.H. y Rier, J.P. *Amer. J. Bot.* 50, 418 (1963).
19. Jeffs, R.A. y Northcote, D.H. *J. Cell Sci.* 2, 77 (1967).
20. Wright, K. y Northcote, D.H. *J. Cell Sci.* 11, 319 (1972).
21. Pontis, H.G., Wolosiuk, R.A., Fernández, L.M. y Bettinelli, B. En Piras, R. y Pontis, H.G. (eds.), *Biochemistry of the Glycosidic Linkage*. Academic Press, New York, 1972, p. 239.
22. Pontis, H.G. *Physiol. Plant.* 23, 1089 (1970).
23. Gibbs, M. En Steward, F.C. (ed.), *Plant Physiol.*, Vol. IV B, Academic Press, New York, 1966, p. 3.
24. Nelson, J.M. y Auchincloss, R. *J. Am. Chem. Soc.* 55, 3769 (1933).
25. Putnam, E.W. y Hassid, W.Z. *J. Biol. Chem.* 207, 885 (1954).
26. Hassid, W.Z. y Doudoroff, M. *Advan. Carbohyd. Chem.* 5, 29 (1950).
27. Hassid, W.Z. y Doudoroff, M. *Advan. Enzymol.* 10, 123 (1950).
28. Panya, K.P. y Ramakrishnan, C.V. *Naturwissenschaften* 43, 85 (1956).
29. Shukla, J.P. y Prabhu, K.A. *Experientia* 16, 202 (1959).
30. Turner, J.F. *Nature* 172, 1149 (1953).
31. Hatch, M.D., Sacher, J.A. y Glasziou, K.T. *Plant Physiol.* 38, 338 (1963).
32. Buchanan, J.G., Barsham, J.A., Benson, A.A., Bradley, D.F., Calvin, M., Daus, L.L., Goodman, M., Hayes, P.M., Lynch, V.H., Norris, L.T. y Nilson, A.T. En McElroy, W.D. y Glass, B. (eds.), *Phosphorus Metabolism*, Vol. 2, Johns Hopkins Press, Baltimore, 1952, p. 440.
33. Buchanan, J.G., Lynch, V.H., Benson, A.A., Bradley, D.F. y Calvin, H. *J. Biol. Chem.* 203, 935 (1953).
34. Buchanan, J.G. *Arch. Biochem. Biophys.* 44, 140 (1953).
35. Caputto, R., Leloir, L.F., Cardini, C.E. y Paladini, A.C. *J. Biol. Chem.* 184, 333 (1950).

36. Leloir, L.F. y Cabib, E. J. Am. Chem. Soc. 75, 5445 (1953).
37. Nikaido, H. y Hassid, W.Z. Advan. Carbohyd. Chem. 26, 351 (1971).
38. Leloir, L.F. y Cardini, C.E. J. Am. Chem. Soc. 75, 6084 (1953).
39. Cardini, C.E., Leloir, L.F. y Chiriboga, J. J. Biol. Chem. 214, 149 (1955).
40. Leloir, L.F. y Cardini, C.E. J. Biol. Chem. 214, 157 (1955).
41. Mendicino, J. J. Biol. Chem. 235, 3347 (1960).
42. Hawker, J.S. y Hatch, M.D. Biochem. J. 99, 102 (1966).
43. Hawker, J.S. Phytochemistry 5, 1191 (1966).
44. Hawker, J.S. Biochem. J. 102, 401 (1967).
45. Edelman, J., Ginsburg, V. y Hassid, W.Z. J. Biol. Chem. 213, 843 (1955).
46. Bean, R.C., Barr, B.K., Welch, H.V. y Porter, G.G. Arch. Biochem. Biophys. 96, 524 (1962).
47. Bean, R.C., Porter, G.G. y Barr, B.K. Plant Physiol. 38, 280 (1963).
48. Putnam, E.W. y Hassid, W.Z. J. Biol. Chem. 207, 885 (1954).
49. Vittorio, P.V., Krotkov, G. y Reed, G.B. Canadian J. Bot. 32, 369 (1954).
50. Delmer, D.P. y Albersheim, P. Plant Physiol. 45, 782 (1970).
51. Haq, S. y Hassid, W.Z. Plant Physiol. 40, 591 (1965).
52. Hassid, W.Z. Ann. Rev. Plant Physiol. 18, 253 (1967).
53. Pressey, R. Plant Physiol. 44, 759 (1969).
54. Murata, T. Nippon Nogei Kagaku Kaishi 45, 441 (1971).
55. Pontis, H.G. y Wolosiuk, R.A. FEBS Lett. 28, 86 (1972).
56. Hardy, P.J. Plant Physiol. 43, 224 (1968).
57. Neufeld, E.F. y Hassid, W.Z. Advan. Carbohyd. Chem. 18, 309 (1963).
58. Grimes, W.J., Jones, B.L. y Albersheim, P. J. Biol. Chem. 245, 188 (1970).
59. Murata, T., Sugiyama, T., Minamikawa, T. y Akazawa, T. Arch. Biochem. Biophys. 113, 34 (1966).

60. Cardini, C.E. y Recondo, E. *Plant & Cell Physiol.* 3, 313 (1962).
61. Fekete, M.A.R. de y Cardini, C.E. *Arch. Biochem. Biophys.* 104, 173 (1964).
62. Ap Rees, T. En Northcote, D.H. (ed.), *Plant Biochemistry*, Vol. 11, Butterworths, London, 1974, p. 89.
63. Lyne, R.L. y ap Rees, T. *Phytochemistry* 11, 2171 (1972).
64. Sasaki, T., Tadokoro, K. y Suzuki, S. *Phytochemistry* 10, 2047 (1971).
65. Turner y Turner, J.F. *Aust. J. Biol. Sci.* 10, 302 (1957).
66. Fekete, M.A.R. de. *Planta* 87, 311 (1969).
67. Davies, D.R. En Pridham, J.B. (ed.), *Plant Carbohydrate Chemistry*, Academic Press, New York, 1974, p. 61.
68. Delmer, D.P. *J. Biol. Chem.* 247, 3822 (1972).
69. Avigad, G. *J. Biol. Chem.* 239, 3613 (1964).
70. Delmer, D.P. *Plant Physiol.* 50, 469 (1972).
71. Tsai, C.Y. *Phytochemistry* 13, 885 (1974).
72. Wolosiuk, R.A. Tesis, Univ. de Buenos Aires, 1974.
73. Wolosiuk, R.A. y Pontis, H.G. *Mol. Cell. Biochem.* 4, 115 (1974).
74. Gabrielian, N.D., Komaleva, R.L. y Shibaev, V.N. *Moldavskaya Biol.* 7, 337 (1973).
75. Wolosiuk, R.A. y Pontis, H.G. *Arch. Biochem. Biophys.* 165, 140 (1974).
76. Shukla, R.N. y Sanwal, G.G. *Arch. Biochem. Biophys.* 142, 303 (1971).  
Slack, C.R. *Phytochemistry* 5, 397 (1966).
78. Slabnik, E, Frydman, R.B. y Cardini, C.E. *Plant Physiol.* 43, 1063 (1968).
79. Bird, I.F., Cornelius, M.J., Keys, A.L. y Whittingham, C.P. *Phytochemistry* 13, 59 (1974).
80. Rorem, E.S., Walker, H.G. y McCready, R.M. *Plant Physiol.* 35, 269 (1960).

81. Murata, T. *Agr. Biol. Chem.* 36, 1877 (1972).
82. Hawker, J.S. *Biochem. J.* 105, 943 (1967).
83. Hawker, J.S. *Phytochemistry* 10, 2313 (1971).
84. Fekete, M.A.R. de. *Eur. J. Biochem.* 19, 73 (1971).
85. Bucke, C. y Oliver, I.R. *Planta* 122, 45 (1975).
86. Hawker, J.S. *Phytochemistry* 8, 9 (1969).
87. Bird, I.F., Porter, H.K. y Stocking, C.R. *Biochim. Biophys. Acta* 100, 366 (1965).
88. Nomura, T., Nakayama, N., Murata, T. y Akazawa, T. *Plant Physiol.* 42, 327 (1967).
89. Hatch, M.D., Sacher, J.A. y Glasziou, K.T. *Plant Physiol.* 38, 338 (1963).
90. Vieweg, G.H. *Planta* 116, 347 (1974).
91. Nomura, T., Kono, Y. y Akazawa, T. *Plant Physiol.* 44, 756 (1969).
92. Nomura, T. y Akazawa, T. *Plant & Cell Physiol.* 15, 477 (1974).
93. Walker, D.A. En Northcote, D.H. (ed.), *Plant Biochemistry*, Vol. 11, Butterworths, London, 1974, p. 1.
94. Heldt, H.W. y Sauer, F. *Biochim. Biophys. Acta* 234, 83 (1971).
95. Martin, R.G. y Ames, B.N. *J. Biol. Chem.* 236, 1372 (1961).
96. Ginsburg, V. *Advan. Enzymol.* 26, 35 (1964).
97. Preiss, J. y Greenberg, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 289 (1969).
98. Keys, A.J. Ph.D. Thesis, Univ. London, 1959.
99. Warawdekar, V.S. y Saslaw, L.D. *J. Biol. Chem.* 234, 1945 (1959).
100. Percheron, F. *Comp. Rend. Ac. Sc.* 255, 2521 (1962).
101. Cabib, E. y Leloir, L.F. *J. Biol. Chem.* 231, 259 (1958).
102. Paladini, A.C. y Leloir, L.F. *Biochem. J.* 51, 426 (1952).

103. Fiske, C.G. y Subbarow, Y. J. Biol. Chem. 66, 375 (1925).
104. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
105. Oyama, V.I. y Eagle, H. Proc. Soc. Exptl. Bio. Med. 91, 305 (1956).
106. Warburg, O. y Christian, W. Biochem. Z. 310, 380 (1941).
107. Godson, G.N. Anal. Biochem. 35, 66 (1970).
108. Fisher, E.H., Pocker, A. y Saari, J.C. En Campbell, P.N. y Dickens, F. (eds.), Essays in Biochemistry, Vol. 6, Academic Press, London, 1970, p. 23.
109. Lefebvre, M.J., Gonzalez, N.S. y Pontis, H.G. J. Chromatog. 15, 495 (1964).
110. Atkinson, D.E. Ann. Rev. Biochem. 35, 85 (1966).
111. Lineweaver, H. y Burk, D.J. J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 (1934).
112. Dixon, M. Biochem. J. 55, 170 (1953).
113. Segel. I.H. Enzyme Kinetics, Wiley, New York, 1975, p. 673.
114. Konigsberg, W. En Hirs, C.H.W. y Timasheff, S.N. Methods in Enzymology, Vol. XXV, Academic Press, New York, 1972, p. 185.
115. Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S. y Singh, R.M.M. Biochemistry 5, 467 (1966).
116. Weber, G. En Keleti, T. (ed.) Mechanism of action and regulation of enzymes, North-Holland, Budapest, 1975, p. 237.
117. Preiss, J., Biggs, M.L. y Greenberg, E. J. Biol. Chem. 242, 2292 (1967).
118. Stadtman, E.R., Shapiro, B.M., Kingdon, H.S., Woolfolk, C.A. y Hubbard, J.S. Adv. Enz. Regulation 6, 257 (1968).
119. Comunicación personal, 1976.
120. Sols, A. y Marco, R. En Current topics in cellular regulation, Vol. 2, 1970, p. 227.

121. Gustafson, G.L. y Gander, J.E. *J. Biol. Chem.* 247, 1387 (1972).
122. Voet, J.G. y Abeles, R.H. *J. Biol. Chem.* 245, 1020 (1970).
123. Tu, J., Jacobson, G.R. y Graves, D.J. *Biochemistry* 10, 1229 (1971).
124. Levy, G.A. y Snaith, S.M. *Advan. Enzymol.* 36, 151 (1972).
125. Bentley, R. *Ann. Rev. Biochem.* 41, 953 (1972).
126. Reese, E.T., Parrish, F.W. y Ettlenger, M. *Carbohydrate Res.* 18, 381 (1971).
127. Hackert, M.L. y Jacobson, R.A. *Acta Crystallogr. B* 27, 203 (1971).
128. Be Miller, J.N. *Advan. Carbohydrate Chem.* 22, 25 (1967).
129. Fekete, M.A.R. de. *Planta* 87, 324 (1969).
130. Cleland, W.W. En Boyer, P.D. (ed.) *The Enzymes*, 3<sup>ra</sup> ed., Vol. 2, Academic Press, New York, 1970, p. 1.
131. Segel, I.H. En *Enzyme Kinetics*, Wiley, New York, 1975, p. 196.
132. Conway, A. y Koshland, D.E., Jr. *Biochemistry* 7, 4011 (1968).
133. Levitzki, A. y Koshland, D.E., Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 1121 (1969).
134. Levitzki, A. y Koshland, D.E., Jr. En Horecker, B.L. y Stadtman, E.R. (ed.) *Current topics in cellular regulation*, Academic Press, New York, 1976, p. 1.
135. Edelman, J. y Jefford, T.G. *Biochem. J.* 93, 148 (1964).
136. Chrispeels, M.J., Tenner, A.J. y Johnson, K.D. *Planta* 113, 35 (1973).
137. Humphreys, T.E. *Phytochemistry* 11, 1311 (1972).
138. Humphreys, T.E. *Phytochemistry* 12, 1211 (1973).
139. Cleland, W.W. *Biochim. Biophys. Acta* 67, 104 (1963).
140. Cleland, W.W. *Biochim. Biophys. Acta* 67, 173 (1963).
141. Cleland, W.W. *Biochim. Biophys. Acta* 67, 188 (1963).



142. Cleland, W.W. *Ann. Rev. Biochem.* 36, 77 (1967).
143. Segel, I.H. *En Enzyme Kinetics*, Wiley, New York, 1975, p. 653.
144. Segel, I.H. *En Enzyme Kinetics*, Wiley. New York, 1975, p. 779.