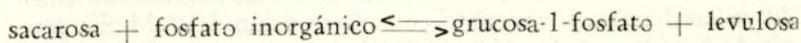


PURIFICACION DE SACAROSA FOSFORILASA POR ELECTROFORESIS

Por NORBERTO J. PALLERONI
Laboratorio de Fermentaciones.
Facultad de Ciencias Agrarias

Sacarosa fosforilasa es la enzima que cataliza la fosforolisis de sacarosa, según la ecuación



La enzima ha sido encontrada en la bacteria *Pseudomonas saccharophila*, y su descubridor dió las normas para prepararla a partir de células secas (1). Con posterioridad, se ha purificado la enzima por otros métodos, partiendo de *P. saccharophila*, *P. putrefaciens* y *Leuconostoc mesenteroides* (2,3). Los procedimientos usados en esos trabajos incluyen precipitación con sulfato de amonio, eliminación de ácidos nucleicos con sulfato de protamina, precipitación con ácido, y absorción y elución de gel de fosfato de calcio.

En la nota presente se comunican los resultados obtenidos por el autor en el Departamento de Bacteriología de la Universidad de California durante el año 1956, utilizando un procedimiento de electroforesis. El aparato empleado posee una cubeta de sección semicilíndrica que permite utilizar distintos materiales como soporte de la mezcla a analizar. En la experiencia que describimos, se ha utilizado esponjas (en un número total de 38) obtenidas cortando con un sacabocado esponjas de material sintético del comercio. Los cilindros, de una altura un poco mayor que un centímetro y de un diámetro igual al ancho de la cubeta, fueron cortados en dos mitades siguiendo el eje del cilindro, y colocados uno a continuación del otro, de modo de llenar totalmente la capacidad de la cubeta. Una vez armado el conjunto, se saturaron las esponjas con la solución buffer. La octava esponja (contando a partir del cátodo) fué retirada de la cube-

1) Ing. Agr. Profesor Titular de Microbiología Agrícola e Industrial y de Química Orgánica y Biológica.

ta, exprimida, sumergida en la solución de enzima y colocada nuevamente en su lugar. El volumen absorbido por la esponja fué de 2 ml.

La enzima utilizada en nuestra experiencia fué obtenida de la manera que sigue. *Pseudomonas saccharophila* fué cultivada por 24 horas con agitación, a 30°C en el medio descrito anteriormente (4); las células fueron lavadas dos veces con agua antes de ser utilizadas. 24,1 g de células (peso húmedo) fué molido en mortero frío con 72,3 g de alúmina levigada (Blue Label R.R. Alundum, 60 mesh, Norton Co., Worcester, Mass.). El producto fué suspendido en 96,4 ml de buffer de fosfato M/30, pH 6,8, conteniendo etilene-diamina-tetraacetato de sodio en concentración 10^{-4} M. La suspensión fue centrifugada en frío durante 25 minutos a 6000 g, y luego se centrifugó el sobrenadante por 35 minutos a 20.000 g. 40 ml. de extracto fueron tratados con 20 ml. de solución saturada de sulfato de amonio conteniendo etilenediamina-tetraacetato en concentración 10^{-4} M. El precipitado fué descartado. Al sobrenadante se agregó 60 ml. de solución de sulfato de amonio. El precipitado fue disuelto en 40 ml. de solución buffer de fosfato 0,01 M a pH 6,0, y se agregó 8 ml. de sulfato de protamina (Lilly and Co.) al 2 por ciento. Luego de centrifugar, agregó 96 ml. de sulfato de amonio, y el precipitado obtenido fué disuelto en 15 ml. de buffer de fosfato 0,03 M pH 6,8. La solución fué dializada a 4°C utilizando una solución externa compuesta por fosfato 0,03 M a pH 7,4. El volumen final de la solución fué de 6,7 ml. Se eliminó por centrifugación un abundante precipitado formado durante la diálisis. La preparación ofreció a este punto una relación 280/260 igual a 1,36 midiendo en el espectrofotómetro Beckman modelo DU una dilución apropiada de la enzima en buffer de fosfato 0,03 M a pH 7,4.

La determinación de actividad de la enzima fué efectuada mezclando 2 ml. de enzima con 0,48 ml. de una solución de fosfato monopotásico aproximadamente M/10, con lo cual el pH de la mezcla se bajó a 6,8. 0,2 ml. de enzima fué mezclado con 0,4 ml. de buffer de fosfato 0,03 M pH 6,8 y 0,2 ml. de sacarosa 0,5 M. Incubó a 30°C y a los 10 minutos tomó 0,4 ml. de la mezcla, agregó 1,6 ml. de ácido tricloroacético al 2 por ciento, y analizó fosfato inorgánico por el método de Fiske y SubbaRow (5). La actividad específica de la preparación fué de 7,2 unidades (micromoles de fosfato esterificado en 20 minutos a 30°C en la mezcla total) por miligramo de proteína. La determinación de proteínas totales fue efectuada de acuerdo al método de Weichselbaum (6).

La actividad fosforilásica de nuestro preparado es baja en comparación con la de los preparados obtenidos por otros autores (2,3). Es muy posible que la baja actividad se haya debido a un bajo contenido de enzima en las células de la cepa utilizada. En lugar de utilizar la cepa madre, nosotros hemos partido del mutante capaz de desarrollar en levulosa, y tal vez haya en éste una menor actividad fosforilásica que en aquélla.

La enzima fué conservada a 0°C durante 3 días antes de ser sometida a la electroforesis a fin de eliminar la actividad invertásica que posee todo preparado obtenido en la forma descripta.

En el extracto se determinó también la actividad de la fosfohexosaisomerasa. La enzima fué diluída 1:5 con buffer de tris (hidroximetil) aminometano-clorhídrico 0,2 M, pH 7,4, conteniendo cloruro de magnesio 0,01 M, y se halló una actividad de 12,5 unidades por miligramo de proteína. En nuestro ensayo, una unidad de enzima representa la cantidad de enzima capaz de convertir 1 micromol de fructosa-6-fosfato en una hora a 30°C en una mezcla constituída por 0.1 ml. de enzima, 0,1 ml. de fructosa-6-fosfato 0,1 M pH 7,4, y agregando luego de la incubación 4,8 ml. de solución de tricloroacético al 2 por ciento para detener la reacción.

2 ml. de enzima conteniendo 346 unidades de fosforilasa y 602 unidades de fosfohexosaisomerasa fueron sometidos a la electroforesis por 20 horas a 4°C, utilizando buffer de fosfato 0,03 M pH 7,45 y corriente de 270 volts. Al cabo del tiempo indicado se extrajo el líquido de cada esponja por presión entre dos portaobjetos limpios. Cada muestra fué analizada en cuanto a proteína total, fosforilasa e isomerasa. La figura 1 resume los datos obtenidos en los análisis. La tabla 1 muestra las actividades específicas de fosforilasa de las fracciones 16 a 24, y se observa que en una de las fracciones se ha logrado una actividad de 135 unidades por mg de proteína, lo cual está por encima de las mejores purificaciones logradas hasta ese momento por los otros métodos. Según se observa en la figura, esa fracción está prácticamente libre de fosfohexosaisomerasa.

Es evidente que el método electroforético no puede ser recomendado para producir cantidades considerables de la enzima con el grado de pureza anotado, pero la obtención de fracciones de alta pureza tiene importancia para el estudio de diversas propiedades de la enzima que pueden ser observadas en esa escala. Es probable que el grado de pureza alcanzado pueda ser superado aún si se parte de extractos de mayor actividad específica inicial que los empleados para esta experiencia. También aparece recomenda-

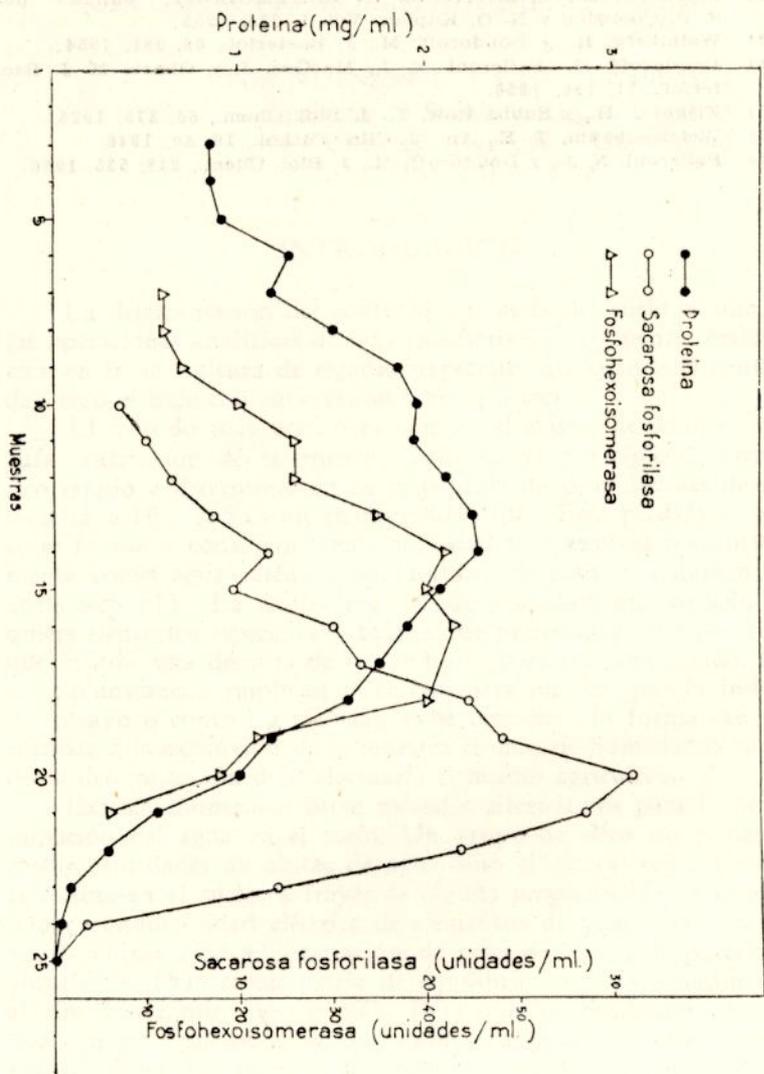
ble prolongar la electroforesis a períodos mayores que el utilizado en nuestro ensayo.

Algunas experiencias de electroforesis realizadas con el objeto de purificar la enzima manosa isomerasa de la misma especie bacteriana indican que el método no permite alcanzar un grado de purificación mayor al obtenido por los métodos ya ensayados (7).

TABLA 1

Fracción Nº	Actividad específica
16	7,5
17	9,4
18	14,1
19	20,4
20	31,4
21	51,0
22	75,0
23	135,0
24	94,0

BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

- (1) Doudoroff, M., J. Biol. Chem., 151, 351, 1943.
- (2) Doudorof, M., en METHODS IN ENZYMOLOGY, editado por S. P. Colowick y N. O. Kaplan, Vol. I, 225, 1955.
- (3) Weimberg, R., y Doudoroff, M., J. Bacteriol., 68, 381, 1954.
- (4) Doudoroff, M., Palleroni, N. J., MacGee, J. y Ohara, M. J. Bacteriol., 71, 196, 1956.
- (5) Fiske, C. H., y Subba Row, Y., J. Biol. Chem., 66, 375, 1925.
- (6) Weichselbaum, T. E., Am. J. Clin. Pathol., 16, 40, 1946.
- (7) Palleroni, N. J., y Doudoroff, M., J. Biol. Chem., 218, 535, 1956.