

Purificazione per cromatografia di affinità dell' enzima malico estratto da uva¹⁾

di

P. SPETTOLI, A. BOTTACIN e A. ZAMORANI

Purification of malic enzyme from grape berries by affinity chromatography

S u m m a r y . — Malic enzyme (E.C. 1.1.1.40) from Raboso grape berries has been purified by affinity chromatography. Main characteristics and kinetic properties before and after affinity chromatography column have been examined. The enzyme is NADP-specific and it requires divalent cations. Before purification, the enzyme has K_m values for NADP⁺ and Mg²⁺ of 0.035 mM and 0.42 mM respectively; it shows allosteric behaviour to malate. The HILL plot slope for malate is 1.86 and $S_{0.5}$ is 1.5 mM. The purified malic enzyme doesn't exhibit allosteric properties and K_m is 0.066 mM for NADP⁺, 0.30 mM for Mg²⁺ and 2 mM for malate.

Introduzione

Nella precedente nota (ZAMORANI *et al.* 1979) sono state studiate le principali caratteristiche dell' enzima malico (EM) estratto dalle bacche dell' uva Raboso con due distinte metodiche.

Si era notato che alcune proprietà erano differenti per i preparati enzimatici ottenuti con tamponi diversi. Poiché gli estratti differivano notevolmente anche per la quantità di impurezze proteiche, queste erano state indicate, in via ipotetica, come la causa del diverso comportamento dell' enzima.

Anche nelle ricerche di altri autori, come sarà in seguito riportato, è stato più volte messo in evidenza un comportamento allosterico dell' EM per quanto riguarda la K_m verso l' acido L-malico.

Per questi motivi ci siamo proposti di approfondire le indagini adottando come metodo di purificazione la cromatografia di affinità e confrontando le caratteristiche dell' EM prima e dopo tale purificazione.

I lavori precedentemente pubblicati sulla purificazione dell' EM e sulle sue caratteristiche di azione possono essere così sintetizzati: HAWKER (1969) ha determinato l' EM presente nelle bacche dell' uva mettendone in relazione le variazioni quantitative con la fisiologia di maturazione del frutto. JOHNSON e HATCH (1970) per l' EM estratto da foglie di mais e di altre piante hanno notato la dipendenza da cationi bivalenti (Mg²⁺ e Mn²⁺) e hanno rilevato che il valore della K_m per l' acido L-malico varia, col variare del pH, da 0,15 mM a 0,4 mM e che a sua volta l' ottimo di pH varia con la concentrazione dell' acido malico. Anche KRISHNAMURTHY e PATWARDHAN (1971) con EM estratto dalla polpa del mango e purificato su colonna di DEAE-cellulosa,

¹⁾ Lavoro eseguito con il contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma.

hanno trovato che è indispensabile la presenza di ioni Mn^{2+} e che la K_m per il $NADP^+$ è 16,6 mM. Secondo MACRAE (1971), invece, l' EM estratto dai mitocondri di nove differenti piante, ha come cofattore preferenziale il NAD^+ , mantenendo, però, una certa attività anche con il $NADP^+$.

Un' accurata caratterizzazione dell' enzima malico è stata fatta da BRANDON e VAN BOEKEL-MOL (1973) studiando il metabolismo acido di Crassulacee. Questi autori hanno purificato l' EM 1236 volte con un recupero dell' 1 % e ne hanno determinato per gel filtrazione il peso molecolare, che è risultato di 237.000. Inoltre essi hanno trovato un ottimo di pH 7,2, una K_m per l' acido L-malico di 0,37 mM tra 17 e 39 °C, di 0,46 mM per Mn^{2+} e di 14 mM per il $NADP^+$ e la completa dipendenza da $NADP^+$ e Mn^{2+} .

DAVIES *et al.* (1974) hanno studiato la distribuzione e le proprietà dell' enzima malico in numerose piante superiori e DAVIES e PATIL (1974) hanno messo in evidenza il comportamento allosterico dell' EM estratto dai tuberi di patata e preliminarmente purificato 2500 volte; anche questi autori hanno riscontrato la completa dipendenza dell' enzima dal $NADP^+$ e da cationi bivalenti. LAKSO e KLEWER (1975 a) hanno studiato le proprietà fisiche dell' EM nell' uva Carignano ancora acerba, riscontrandone la dipendenza dal $NADP^+$ e dai cationi Mg^{2+} o Mn^{2+} , l' ottimo di pH a 7,4 e la K_m per l' acido L-malico di 0,45 mM. Secondo DROUET e HARTMANN (1977) l' EM estratto dalle pere sarebbe NAD -dipendente, avrebbe maggiore affinità per Mn^{2+} rispetto a Mg^{2+} e una K_m per l' acido L-malico di 0,45 mM a pH 6,9; l' alcol etilico ad alte concentrazioni inibirebbe l' attività mentre in basse percentuali stimolerebbe la decarbossilazione dell' acido malico.

Materiali e metodi

Estrazione dell' enzima

L' EM è stato estratto dalle bacche dell' uva Raboso, raccolta al giusto grado di maturazione e conservata a -20 °C. 30 g di acini sbucciati e privati dei vinaccioli sono stati omogenizzati con un apparato Ultra Turrax in 100 ml di tampone Tris-HCl 0,5 M, pH 8,4, contenente KCl 0,2 M, acido ascorbico 0,2 M, cisteina-HCl 30 mM e EDTA 3 mM. L' omogenato è stato poi centrifugato a 30.000 g per 15 min e filtrato con quattro strati di garza. Questa sospensione costituiva l' estratto crudo.

Determinazione dell' attività enzimatica

L' attività dell' enzima malico è stata determinata misurando la riduzione del $NADP^+$ a 340 nm, a 35 °C e a pH 7,1. Il saggio è stato eseguito su 3 ml di soluzione contenenti 120 μ mol di Tris-HCl, pH 7,1, 10 μ mol di $MgCl_2$, 0,4 μ mol $NADP^+$ e 40 μ mol di K-L-malato.

Per calcolare l' attività specifica il contenuto in proteine degli estratti è stato valutato con il metodo di LOWRY *et al.* (1951), utilizzando come standard albumina di siero bovino.

Purificazione per precipitazione con glicole polietilenico

A 10 ml di estratto crudo sono stati aggiunti 3,9 g di glicole polietilenico 4000 (PEG) e si è mantenuto in lenta agitazione per 30 min in bagno di ghiaccio. La sospensione è stata centrifugata a 33.000 g per 20 min; il precipitato è stato risospeso in 1 ml di Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8, per ogni grammo di peso fresco e ricentrifugato a 33.000 g per 20 min.

Desalificazione per gel-filtrazione

L'estratto crudo è stato fatto passare attraverso una colonna (1,6 × 70 cm) di Sephadex G-25 (tipo medium) equilibrata con tampone Tris HCl 25 mM, pH 7,1, MgCl₂ 10 mM e β-mercaptoetanololo 10 mM.

Cromatografia di affinità

L'estratto desalficato è stato caricato su una colonna del diametro 1,6 cm contenente 12 ml di 2',5'-ADP-Sepharose 4 B (Pharmacia).

Questo materiale, costituito da Sepharosio al quale è legato in modo covalente un analogo del NADP⁺, 1'-N⁶-(6-aminesil)-adenosina-2',5'-difosfato, è già stato impiegato da BRODELIUS *et al.* (1974) per separare da un estratto grezzo di *Candida utilis*, gli enzimi NADP-dipendenti, con rese notevolmente superiori a quelle dei metodi convenzionali di purificazione. La colonna è stata termostata a 4 °C ed equilibrata con tampone a pH 7,1 uguale a quello usato per la gel-filtrazione. L'eluizione dell'enzima è stata eseguita con lo stesso tampone aggiunto di NADP⁺ e di NaCl in concentrazioni rispettivamente 1 mM e 1 M. Il flusso è stato 0,6 ml/l' e si sono raccolte frazioni di 2,2 ml.

Disc-gel-elettroforesi

La disc-gel-elettroforesi è stata attuata con poliaccrilamide al 5,5 % secondo la metodica riferita da DAVIS (1964).

Le prove sono state condotte a 4 °C in una camera Bio-Rad con corrente di 3 mA/tubo finché il blu di bromofenolo, usato come indicatore di corsa, non raggiungeva la fine del gel. I gels sono stati colorati per le proteine immergendoli in Blue Coomassie Brilliant R 250 e decolorati in una soluzione di acido acetico al 7,5 %. L'EM è stato colorato incubando al buio i gels in Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, K-L malato 16 mM, MgCl₂ 1 mM, NADP⁺ 1,5 mM, p-nitrobluetetrazolio 0,52 mM e fenazinametasolfato 0,24 mM per 30 min a 35 °C. Un gel di controllo includeva tutti i costituenti eccetto il NADP⁺. I gels sono stati conservati in acido acetico al 7 %.

Risultati e discussione

Grado di purificazione

Nella tabella è riportata la purificazione ottenuta con PEG e con la successiva cromatografia di affinità.

Con PEG 4000 si è avuto un fattore di purificazione 15, con la cromatografia di affinità tale rapporto è elevato a 578 mantenendo un recupero di attività dell' 82 %. Questa resa deve essere considerata elevata anche in relazione a quella (35 %) da noi ottenuta con la cromatografia a scambio ionico.

Le analisi elettroforetiche hanno messo in evidenza la maggior purificazione ottenuta con la cromatografia di affinità: nella Fig. 1, infatti, si nota che le bande proteiche si riducono da undici a nove mentre non varia il numero (tre) delle bande enzimatiche ad attività malica. Dopo la cromatografia di affinità, quindi, oltre agli enzimi dell'EM, sono ancora presenti sei composti proteici.

Proprietà cinetiche dell'EM

Si sono studiate le proprietà cinetiche, nei riguardi dei cofattori (Mg²⁺ e NADP⁺) e dell'acido L-malico, dei preparati enzimatici a diverso stadio di purificazione.

Purificazione dell' EM
Malic enzyme purification

| | Volume totale (ml) | Proteina totale (mg) | Attività (μ mol L-malato/min) Totale | Attività Specifica | Recupero (%) | Fattore di purificazione |
|------------------------------|-----------------------|-------------------------|---|-----------------------|-----------------|-----------------------------|
| Crudo | 1200 | 1200 | 19,20 | 0,016 | 100 | 1 |
| PEG 4000 | 100 | 72 | 17,28 | 0,24 | 90 | 15 |
| Cromatografia di affinità | 15 | 1,7 | 15,72 | 9,25 | 82 | 578 |

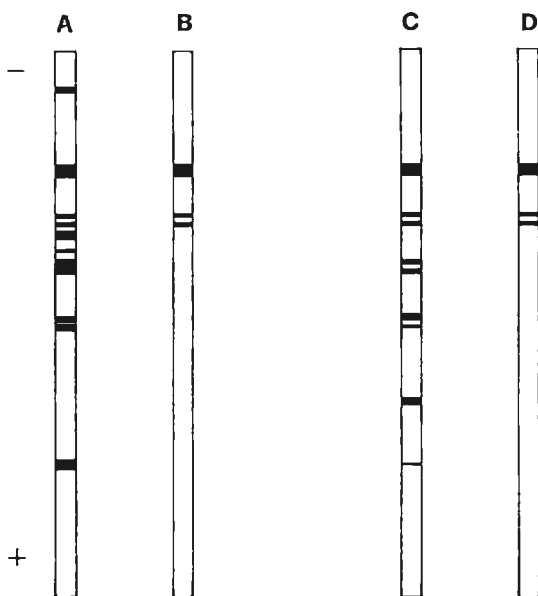


Fig. 1: Profili elettroforetici delle proteine e dell' EM precipitato con PEG (A, B) e ottenuto da cromatografia di affinità (C, D).

Electrophoresis patterns of proteins and malic enzyme by PEG precipitate (A, B) and by affinity chromatography (C, D).

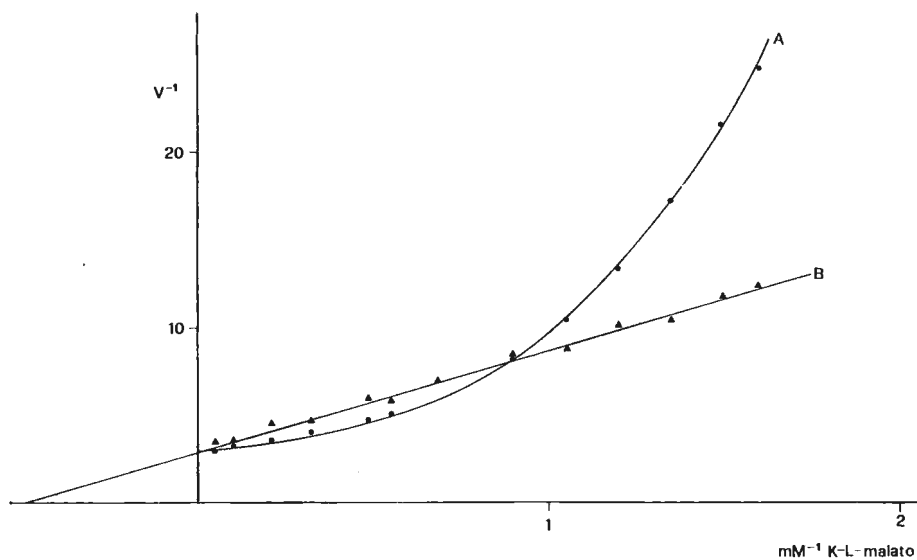


Fig. 2: Diagrammi di LINEWEAVER-BURK dell' EM purificato per precipitazione con PEG (A) e per cromatografia di affinità (B). K_m per l' L-malato è 2 mM (B).

LINEWEAVER-BURK plots of malic enzyme purified by PEG (A) and by affinity chromatography (B). K_m for malate is 2 mM (B).

Nelle condizioni normali di saggio (Mg^{2+} 1,6 mM, $NADP^+$ 0,13 mM, pH 7,1 e a 35 °C) con concentrazione di acido L-malico compresa tra 0 e 0,5 mM, l' EM ottenuto dalla colonna di affinità ha seguito la normale cinetica di MICHAELIS-MENTEN e si è calcolata con il metodo grafico di LINEWEAVER-BURK una K_m di 2 mM. Nelle stesse condizioni con l' EM purificato solo per precipitazione con PEG si è ottenuta una curva (Fig. 2, A) che dimostra l' esistenza di cooperatività positiva tra i siti di legame del substrato. Applicando l' equazione di HILL (Fig. 3, A) si è determinato il coefficiente

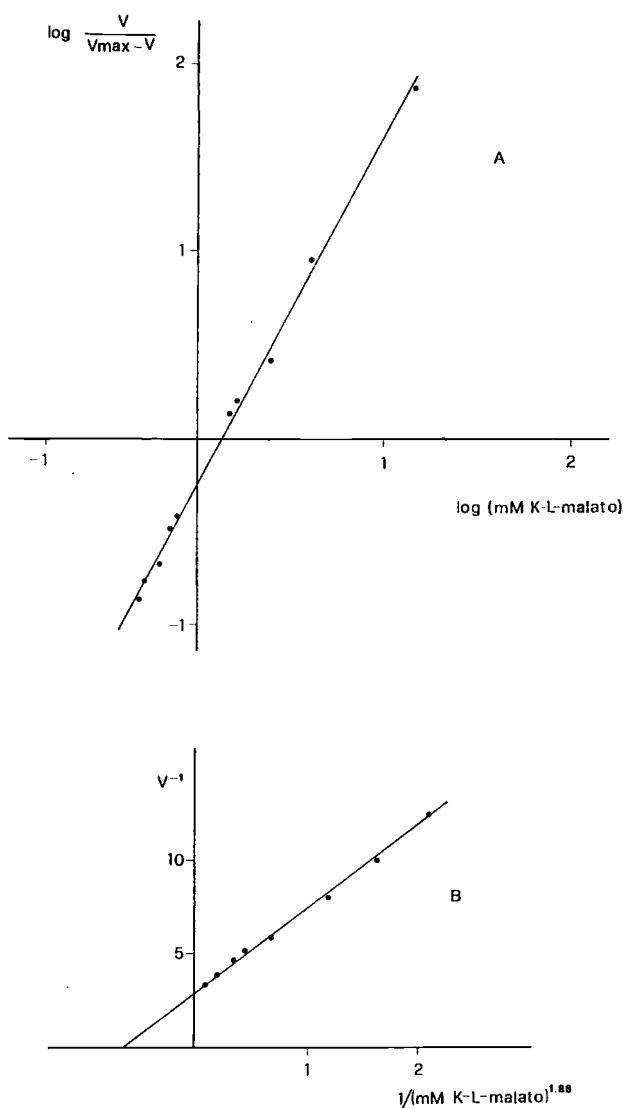


Fig. 3: A: Equazione di HILL per l' enzima malico precipitato PEG: pendenza 1,86 (n_H).
— B: $S_{0,5}$ di 1,25 mM per l' enzima malico precipitato con PEG.

A: HILL plot for malic enzyme by PEG precipitate: slope 1.86 (n_H). — B: $S_{0,5}$ 1.25 mM for malic enzyme by PEG precipitate.

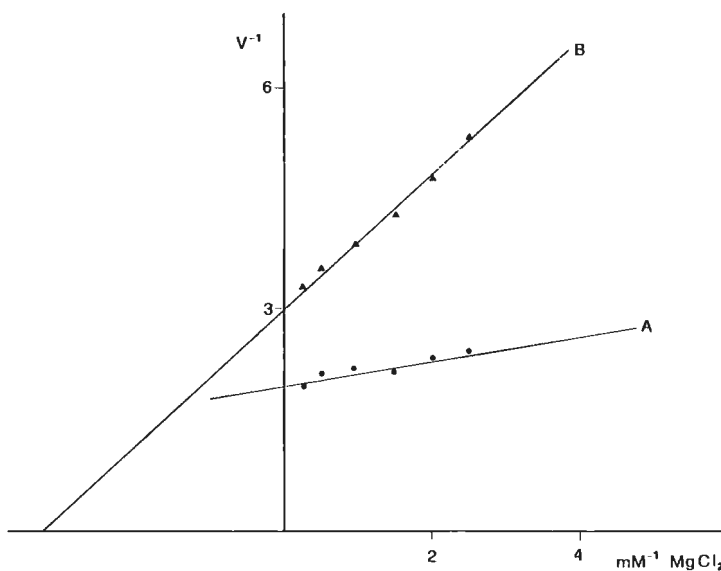


Fig. 4: A: K_m di 0,42 mM per l' enzima malico precipitato con PEG. — B: K_m di 0,30 mM per l' enzima malico da cromatografia di affinità.

A: K_m 0.42 mM of malic enzyme by PEG precipitate. — B: K_m 0.30 mM of malic enzyme by affinity chromatography.

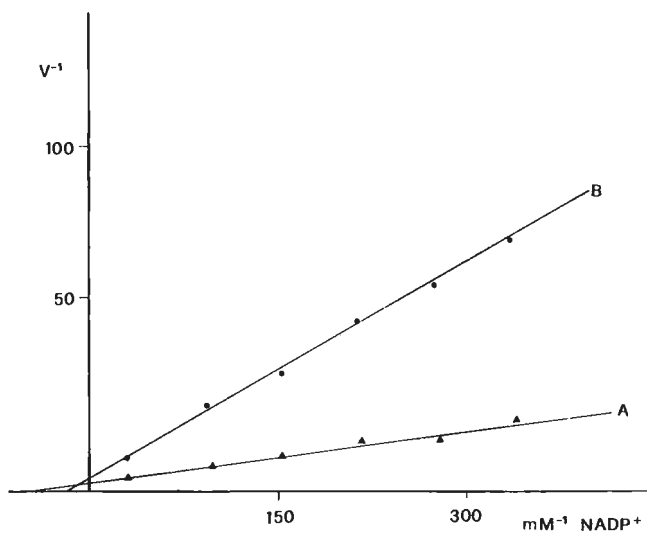


Fig. 5: A: K_m di 0,035 mM per l' enzima malico precipitato con PEG. — B: K_m di 0,066 mM per l' enzima malico da cromatografia di affinità.

A: K_m 0.035 mM for malic enzyme by PEG precipitate. — B: K_m 0.066 mM for malic enzyme by affinity chromatography.

n_H di 1,86 che ha permesso di calcolare in 1,25 la concentrazione di acido L-malico per la quale con l' EM purificato con PEG si ha una velocità di reazione uguale alla metà della V_{max} (vedi Fig. 3, B).

Nei riguardi dei cofattori (Mg^{2+} e $NADP^+$) sia l' enzima purificato con PEG sia quello trattato su colonna di affinità hanno seguito la cinetica di MICHAELIS-MENTEN. E' stato, quindi, possibile calcolare le K_m con il metodo grafico dei doppi reciproci (Fig. 4 e 5).

Conclusioni

La cromatografia di affinità con l' impiego di un analogo del $NADP^+$ come "ligando" ha consentito di realizzare una purificazione di 578 volte rispetto all' estratto crudo con una perdita di attività di solo il 18 %. La gel-elettroforesi ha però messo in evidenza che anche dopo il passaggio per colonna di affinità erano presenti diverse specie proteiche oltre l' EM. Questo può essere dovuto alla presenza nell' estratto di altre attività enzimatiche $NADP$ -dipendenti.

La purificazione ottenuta è però stata sufficiente per consentire la determinazione delle caratteristiche cinetiche dell' EM eliminando le interferenze, precedentemente notate (ZAMORANI *et al.* 1976), dovute alle impurezze. Il confronto tra le K_m rispetto agli ioni Mg^{2+} , al $NADP^+$ e all' acido L-malico dei due preparati enzimatici ha dimostrato che nei riguardi dei cofattori l' EM ha seguito in ogni caso la cinetica di MICHAELIS-MENTEN. I valori di K_m da noi trovati sono risultati in buon accordo con quelli di altri ricercatori (JOHNSON e HATCH 1970, DAVIES e PATIL 1974). La cinetica dell' EM nei riguardi del substrato ha risentito in modo ancora più evidente l' influenza del livello di purificazione. Solo per l' EM trattato con colonna di affinità è stato possibile calcolare, secondo MICHAELIS e MENTEN, la K_m (2 mM) il cui valore ha concordato con altri precedentemente trovati (DAVIES *et al.* 1974). L' EM purificato per precipitazione con PEG ha avuto comportamento allosterico; per esso è stata calcolata una $S_{0,5}$ di 1,25 mM. Anche altri autori hanno riscontrato per l' EM comportamento allosterico con cooperatività positiva verso il substrato. DAVIES *et al.* (1974) hanno trovato che l' enzima malico dei vegetali, eccezione fatta per le Graminacee, presenta proprietà allosteriche. DAVIES e PATIL (1974) hanno riportato una K_m di 0,67 mM per L-malato a pH 6,8, ma proprietà allosteriche a pH 7,0; lo stesso comportamento hanno riscontrato DROUET e HARTMANN (1977).

La cooperatività positiva verso l' acido L-malico è stata interpretata da alcuni autori (LAKSO e KLEWER, 1975 a, 1975 b) in funzione del ruolo dell' EM nella fisiologia della maturazione del frutto, in modo particolare dell' acino d' uva. L' EM, infatti, avrebbe un' importanza fondamentale nel determinare l' accumulo (per beta-carbossilazione dell' acido piruvico o del fosfoenolpiruvico) e la degradazione dell' acido malico nelle uve.

DAVIES (1977) ha spiegato la cooperatività positiva dell' enzima malico verso il malato in termini di adattamento del sistema alle variazioni di pH. Secondo il principio della microreversibilità, se la velocità della decarbossilazione del malato viene stimolata, la velocità di carbossilazione del piruvato lo sarà anch' essa. In tal modo le cinetiche sigmoidali verso il malato permetterebbero al sistema di adattarsi più rapidamente alla produzione di malato.

E' possibile, quindi, che l' allostericità sia normalmente posseduta dall' EM in vivo e che essa venga perduta, come riscontrato da altri (DAVIES e PATIL 1974, DAVIES *et al.* 1976) per le modificazioni molecolari conseguenti ai processi di purificazione.

Riassunto

L' enzima malico (E.C. 1.1.1.40) estratto dall' uva Raboso è stato purificato per cromatografia di affinità. Sono state determinate le principali caratteristiche e le proprietà cinetiche dell' enzima prima e dopo il passaggio su colonna di affinità. L' enzima è NADP-specifico e la sua attività richiede cationi bivalenti. L' estratto prima della purificazione per cromatografia di affinità presenta valori di K_m per NADP⁺ e per Mg²⁺ rispettivamente di 0,035 mM e di 0,42 mM ed ha comportamento allosterico verso l' acido L-malico; dall' equazione di HILL si è trovato un n_H di 1,86 ed il corrispondente valore di $S_{0,5}$ uguale a 1,25 mM. Dopo la purificazione l' enzima non aveva più proprietà allosteriche e le K_m sono state 0,066 mM per il NADP⁺, 0,30 mM per Mg²⁺ e 2 mM per l' acido L-malico.

Bibliografia

- BRANDON, P. C. and BOEKEL-MOL, T. N. VAN, 1973: Properties of purified malic enzyme in relation to crassulacean acid metabolism. *Europ. J. Biochem.* 35, 62—69.
- BRODELIUS, P., LARSSON, P.-O. and MOSBACH, K., 1974: The synthesis of three AMP-analogues: N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 5'-monophosphate, N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 2',5'-bisphosphate, and N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 3',5'-bisphosphate and their application as general ligands in biospecific affinity chromatography. *Europ. J. Biochem.* 47, 81—89.
- DAVIES, D. D., 1977: Control of pH and glycolysis. In: SMITH, H. (Ed.): Regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants. *Ann. Proc. Phytochem. Soc.* 14, 41—62. Academic Press, London.
- — —, NASCIMENTO, K. H. and PATIL, K. D., 1974: The distribution and properties of NADP malic enzyme in flowering plants. *Phytochemistry* 13, 2417—2425.
- — — and PATIL, K. D., 1974: Regulation of "malic" enzyme of *Solanum tuberosum* by metabolites. *Biochem. J.* 137, 45—53.
- DAVIS, B. J., 1964: Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 405—427.
- DROUET, A. G. and HARTMANN, C. J. R., 1977: Activity of pear fruit malic enzyme; its regulation by metabolites. *Phytochemistry* 16, 505—508.
- HAWKER, J. S., 1969: Changes in the activities of enzymes concerned with sugar metabolism during the development of grape berries. *Phytochemistry* 8, 9—17.
- JOHNSON, H. S. and HATCH, M. D., 1970: Properties and regulation of leaf nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-malate dehydrogenase and "malic" enzyme in plants with the C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem. J.* 119, 273—280.
- KRISHNAMURTHY, S. and PATWARDHAN, M. V., 1971: Properties of malic enzyme (decarboxylating) from pulp of mango fruit (*Mangifera indica*). *Phytochemistry* 10, 1811—1815.
- LAKSO, A. N. and KLIEWER, W. M., 1975 a: Physical properties of phospho-enol-pyruvate carboxylase and malic enzyme in grape berries. *Amer. J. Enol. Viticult.* 26, 75—78.
- — — — —, 1975 b: The influence of temperature on malic acid metabolism in grape berries. *Plant Physiol.* 56, 370—372.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J., 1951: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265—275.
- MACRAB, A. R., 1971: Malic enzyme activity of plant mitochondria. *Phytochemistry* 10, 2343—2347.
- ZAMORANI, A., SPETTOLI, P., BOTTACIN, A. e VARANINI, Z., 1979: Estrazione e prima caratterizzazione dell' enzima malico dall' uva Raboso. *Riv. Viticult. Enol.* 32, 354—363.

Eingegangen am 31. 7. 1979

Dr. P. SPETTOLI
Istituto di Chimica Agraria e Industrie Agrarie
Università degli Studi di Padova
35100 - Padova
Via Gradenigo, 6
Italia