

Tesis de Posgrado

Enzima ramificante de hígado de rata : Aislamiento, purificación y propiedades

Krisman de Fischman, Clara Rebeca

1963

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Krisman de Fischman, Clara Rebeca. (1963). Enzima ramificante de hígado de rata : Aislamiento, purificación y propiedades. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1198_KrismandeFischman.pdf

Cita tipo Chicago:

Krisman de Fischman, Clara Rebeca. "Enzima ramificante de hígado de rata : Aislamiento, purificación y propiedades". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1198_KrismandeFischman.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

178
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exáctas y Naturales



ENZIMA RAMIFICANTE DE HIGADO DE RATA
AISLAMIENTO, PURIFICACION Y PROPIEDADES

Clara R. Krisman de Fischman

TESIS PRESENTADA, PARA OBTAR AL
TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1963

- 1 -

Padrino de Tesis

DR. LUIS F. LÉLOIR

- 2 -

A MI MADRE

A LA MEMORIA DE MI PADRE

AGRADECIMIENTOS

Desee expresar mi agradecimiento al Dr. Luis F. Leloir, por su dirección, constante interés y sus impreciables consejos y sugerencias.

Al Dr. Carlos E. Cardini y demás miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Compositar" que han hecho posible la realización de éste trabajo con sus valiosas sugerencias y ayuda.

Al Dr. Ignacio Piretsky que como Director del Instituto Nacional de Microbiología me brindó las facilidades necesarias para desarrollar el presente trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

ABREVIATURAS

TCA	:	ácido tricloroacético
α -D-G-1-P	:	glucosa-1-fosfato
UDPG	:	uridina difosfato glucosa
P _i	:	fósforo inorgánico
G-6-P	:	glucosa-6-fosfato
ADP	:	adenosina difosfato
ATP	:	adenosina trifosfato
UDP	:	uridina difosfato
UTP	:	uridina trifosfato
G	:	glucosa
M ₂	:	maltosa
M ₃	:	maltotriosa
M ₄	:	maltotetraosa
M ₅	:	maltopentosa
C ¹⁴ G-1-P	:	glucosa-1-fosfato radiactiva
EDTA	:	etilen diamina tetracetato
rpm	:	revoluciones por minuto.

I N D I C E

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

<u>GLUCÓGENO</u>	11
<u>Propiedades generales</u>	12
<u>Aislamiento y purificación</u>	13
<u>Análisis estructural</u>	14
Enzimas que intervienen en el metabolismo del glucógeno :	
a) <u>Síntesis de glucógeno</u>	17
UDP-glucosa-glucógeno glucosiltransferasa	17
Enzima ramificante ó α 1 \rightarrow 4-glucano 6-glucosiltransferasa	17
b) <u>Degradación del glucógeno</u>	18
Fosforilasa ó α -1,4-glucano; ortofosfato-glucosiltransferasa	18
Amilo 1 \rightarrow 6 glucosidasa ó enzima desramificante	18
Transglucosilasas	19
α -amilasa ó α -1,4-glucano 4-glucanohidrolasa	20
γ -amilasas ó α -1,4-glucano-glucosidrolasa	20

P A R T E E X P E R I M E N T A L

TÉCNICAS GENERALES

a) <u>Preparación de reactivos</u>	
Cloruro de calcio	23
Solución Iodo-Ioduro	23
Reactivo de Iodo	23
Cloruro de amonio	23
Gel de fosfato de calcio	23

Preparación de polímeros

Fitoglucógeno 23

Glucógeno Standard 23

Glucógeno 24

Amilosa y Amilopectina 25

 Preparación del almidón de papa 25

 Fraccionamiento 26

Dextrina β -límite de amilopectina y glucógeno 27

Dextrinas límite de fosforilasa de amilopectina y glucógeno 27

Preparación de enzimas

β -amilasa 28

Fosforilasa de músculo 28

α -amilasa de saliva 30

α -amilasa de hígado 30

Determinación de proteínas 31

Límite de β -amilólisis de glucógeno o amilopectina 31

Longitud promedio de cadena 31

Determinación de azúcares 33

Método del fenol sulfúrico 33

Método de la antrona 33

Método de Park y Johnson 34

RESULTADOS

PARTES I

DETERMINACION COLORIMETRICA DEL GLUCOGENO CON IODO

Efecto de diferentes sales	37
Fuerza iónica	38
Curva de absorción	40
Método adoptado	40
Glucógeno en tejidos	42
Recuperación	44
Efecto de temperatura	44
Efecto del pH	44
Estabilidad del color con el tiempo	44
Glucógeno de distintos orígenes	45
Otros polisacáridos	48

PARTES II

ENZIMA RAMIFICANTE

Determinación de la actividad ramificante	54
Determinación de la actividad α -amilásica	55
Determinación de la actividad ramificante en presencia de α -amilasa	55
Purificación de la enzima ramificante	58
Preparación de los extractos de tejidos	58
Tratamiento con gel de fosfato de calcio	59
Precipitación con sulfato de amonio	59

P A R T E II

(cont.)

Propiedades de la enzima	60
Cinética	61
pH óptimo	61
Salas	63
Efecto de posibles activadores	65
Formación de un polisacárido semejante al glucógeno	65
Acción sobre amilopectina	66
Acción sobre la dextrina β -límite de amilopectina	66
Acción sobre otros polisacáridos	67
<u>CONCLUSIONES</u>	69
<u>RESUMEN</u>	73
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	74

La enzima ramificante, es una de las que participan en la biosíntesis del glucógeno.

El estudio de la enzima y de la reacción que cataliza depende de la existencia de un método adecuado para la identificación del producto; por lo tanto, éste trabajo consta de dos partes :

- 1° Determinación colorimétrica del glucógeno;
- 2° Enzima ramificante.

Antes de detallar los estudios realizados, se hará una breve descripción de las propiedades del glucógeno y las enzimas que intervienen en su metabolismo.

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

GLUCÓGENO

Los hidratos de carbono se acumulan, principalmente en forma de glucógeno, en casi todas las células animales.

Este polisacárido, como otros del tipo del almidón, tiene un espectro característico de absorción en el infrarrojo. Se observan tres picos de absorción en las frecuencias 928 ± 3 ; 838 ± 3 ; $760 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$. Todos los carbohidratos que contienen unidades α -D-glucopiranosas presentan el pico en 838 cm^{-1} , mientras que solamente los glucanos con uniones $\alpha 1 \rightarrow 4$ tienen los picos en 928 y 760 (1).

La estructura química del glucógeno recién pudo ser estudiada con mayor detalle cuando se describieron los métodos de metilación, que permitieron establecer los principales tipos de unión entre las unidades constituyentes. Así se determinó que es un homopolisacárido altamente ramificado, que contiene solamente unidades de D-glucosilos formando cadenas con uniones $\alpha 1 \rightarrow 4$, las ramas están combinadas entre sí por uniones $\alpha 1 \rightarrow 6$. También se encontró una pequeña proporción de uniones $\alpha 1 \rightarrow 3$ (2, 3). Este tipo de estructura permite colocar el glucógeno en el mismo grupo de polisacáridos que los almidones de plantas; se sabe que difiere de la amilopectina (uno de los componentes del almidón) solamente en el grado de ramificación.

Es interesante destacar que se ha encontrado glucógeno en algunas plantas (fitoglucógeno) (4) y un polisacárido semejante a la amilopectina, en el hígado de algunos enfermos (Glucogenosis Tipo IV) (5, 6).

Propiedades generales

Las soluciones acuosas tienen un poder dextrorrotatorio de aproximadamente $+100^\circ$. Presentan una opalescencia blanco-azulada de tal intensidad, que en concentración de 1 %, por ejemplo, no resultan adecuadas para mediciones polarimétricas.

El glucógeno da una coloración característica con soluciones de yodo en IK, cuya intensidad según el origen del polisacárido.

Por hidrólisis con ácidos minerales diluidos (HCl 1.0-2.0 N) a 100°C durante 2-5 horas, se obtiene un 97 % de conversión a glucosa. Se ha encontrado galactosa (7) en los hidrolizados del glucógeno de hígado de pollo alimentado con cantidades tóxicas de galactosa. Peat y col. (8) encontraron algo de maltulosa (4- $[\alpha\text{-glucopiranosido}]\text{-fructosa}$) entre los productos de la acción de α -amilasa sobre glucógeno de hígado de conejo.

En las determinaciones de peso molecular se obtienen valores de 1 a 10×10^6 que indican el peso promedio, ya que las preparaciones de glucógeno son polidispersas.

Algunas proteínas como suero albúmina, globulina y miosina pueden formar complejos con el glucógeno.

Las dextrinas obtenidas por acción de la fosforilasa o de la β -amilasa tienen mayor afinidad por las proteínas; éstas parecen asociarse con las ramas externas. Rosenfeld y col. (10) han estudiado la interacción proteína-glucógeno, pero aún no ha sido establecida su naturaleza.

La Concanavalina A (una globulina extraída de "Canavalia ensiformis") forma

un complejo insoluble (11) que se produce preferentemente con glucógeno de gema -
dados o con las dextrinas de β -amilasa (12).

Aislamiento y purificación

El glucógeno puede extraerse de los tejidos con álcali concentrado a 100° C, con hidrato de cloral a 80° ó con ácido tricloroacético frío. El método más usado es el desarrollado por Bernard y Pflüger. Se digiere el tejido con solución concentrada de KOH (20 - 60 %) a 100° C; de ésta manera se destruyen las proteínas, ácidos nucleicos, etc., y el glucógeno se precipita de la solución con alcohol. Por reprecipitaciones sucesivas se obtiene un glucógeno purificado.

A partir de un homogenizado de hígado, Lazarow (13) obtuvo una fracción que sedimenta a 14.000 rpm, formando una pastilla semitransparente que se adhiere fuertemente al fondo del tubo. Lo llamó "glucógeno particulado" y tiene un peso molecular del orden de 2×10^8 (aproximadamente 100 veces mayor que el del glucógeno común).

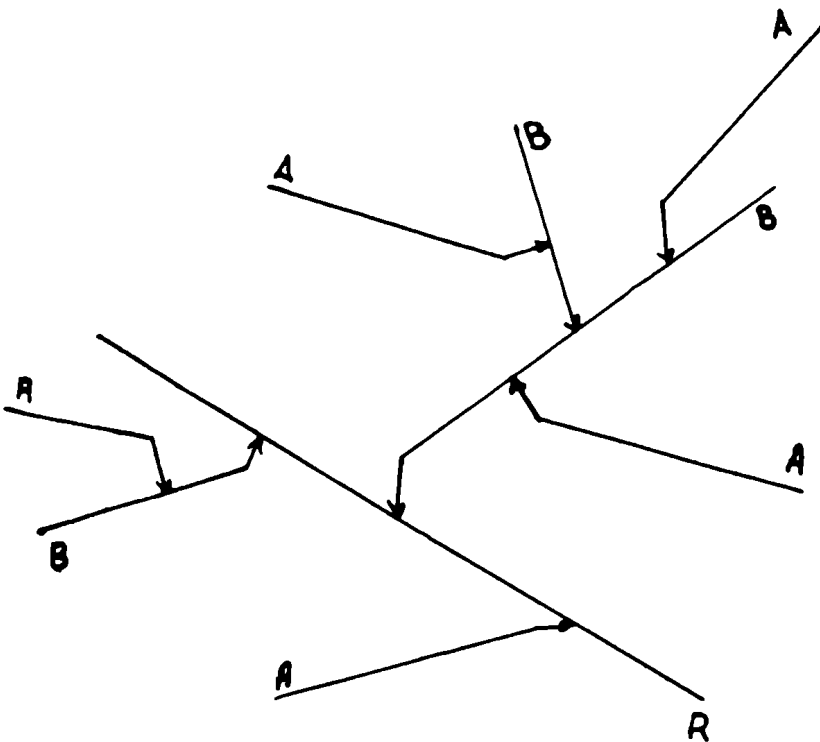
Por extracción con ácido tricloroacético frío Stetten y Stetten (14) obtuvieron preparados de muy alto peso molecular.

En cambio el glucógeno extraído por KOH, es siempre de menor peso molecular que los anteriores.

Los métodos de extracción han sido muy discutidos (14). Se ha dicho que el KOH produce degradación del glucógeno y que el TCA extrae selectivamente la fracción de mayor peso molecular o quizá agregados de varias moléculas unidas por enlaces. Queda por resolver aún cuál de los dos tipos de extracción, alcalina o ácida, conserva mejor el estado original del glucógeno.

Análisis estructural

Este tema está extensamente tratado en el artículo de D.J. Moras (15).
pueden usar métodos químicos o enzimáticos. Actualmente se acepta para el glu-
cogeno la estructura multiramificada, en forma arboresca, propuesta por Meyer (16).



Estructura molecular del glucógeno, propuesta por Meyer.

- . : cadena lineal formada por residuos glucosílicos unidos en $\alpha 1 \rightarrow 4$
- . : punto de ramificación, unión glucosídica $\alpha 1 \rightarrow 6$
- | : grupo reductor libre
- | : tipos de cadena

Cadena A (cadena lateral) unida por el carbono reductor formando una única unión $\alpha 1 \rightarrow 6$.

Cadena B (cadenas principales) a la cual se unen una o más cadenas A; además ella misma está unida a otra cadena por el grupo reductor formando una unión $\alpha 1 \rightarrow 6$.

Cadena C, a ésta se unen otras cadenas, y es la que probablemente tiene en un extremo el grupo reductor libre.

Las cadenas individuales varían considerablemente en longitud.

Un glucógeno de peso molecular del orden de 8 millones, contiene aproximadamente 49.500 unidades D-glucosa. De éstas alrededor del 8 % constituyen puntos de ramificación, o sea que hay 3.960 uniones $\alpha 1 \rightarrow 6$ y el mismo número de grupos terminales o puntas no reductoras que corresponden a las cadenas externas, cuya longitud es de 6 a 9 unidades glucosas (17). En cambio, entre dos uniones $\alpha 1 \rightarrow 6$ existen de 3 a 4 unidades glucosas. Esto da como resultado una molécula muy compacta, cuya forma no parece ser esférica, sino más bien asimétrica (15).

Los glucógenos de distintas fuentes difieren no sólo en el peso molecular sino también en el grado de asimetría molecular. En la Tabla -i- están resumidas las propiedades del glucógeno.

Tabla -1- Propiedades del glucógeno

Propiedad		Referencia
molecular	$2-15 \times 10^6$	Harrap y Manners, <i>Nature</i> , <u>170</u> (1952) 419.
promedio de (CL) (x) residuos glucosa)	10-14	Manners, <i>Adv. Carb. Chem.</i> <u>12</u> (1957) 262.
uniones α 1 \rightarrow 6 externas %	8-10	" " " " " " "
β -amilólisis %	40-50	" " " " " " "
de las cadenas e (residuos glucosa)	6-9	" " " " " " "
de las cadenas e luego de la β -amilasa e glucosa)	2,5	" " " " " " "
de las cadenas e luego de la fosforilasa o. (residuos glucosa)	4	Walker-Whelan, <i>B.J.</i> , <u>16</u> (1960) 264.
de las cadenas inte- residuos glucosa)	3-4	Manners, <i>Adv. Carb. Chem.</i> , <u>17</u> (1962) 373.
con Concarnavalina A	+	Cifonelli, <i>J.A.C.S.</i> , <u>78</u> (1956) 2485.
n con iodo	marrón rojizo	
presencia de 20a	460 m μ	

(x) CL : son las iniciales de Chain Length ; representa el número de residuos D-glucosa por grupo terminal.

ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN EL METABOLISMO DEL GLUCÓGENO

a) SÍNTESIS DEL GLUCÓGENO

En la actualidad se acepta que la biosíntesis del glucógeno se realiza mediante la intervención de dos glucosiltransferasas, la UDP-Glucosa-glucógeno-glucosiltransferasa (18, 19) y la $\alpha 1 \rightarrow 4; \alpha 1 \rightarrow 6$ glucano 6-glucosiltransferasa (20).

La primera sintetiza las uniones $\alpha 1 \rightarrow 4$ alargando las cadenas. La segunda, introduce los puntos de ramificación al transferir un trozo de cadena " $\alpha 1 \rightarrow 4$ " a otra cadena, formando las uniones $\alpha 1 \rightarrow 6$.

UDP-Glucosa-glucógeno-glucosiltransferasa.

Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



Igual que la fosforilasa de músculo, requiere un poliacárido altamente ramificado como acepter (19). El glucógeno no degradado es el más efectivo.

Un aspecto interesante de ésta enzima aún no aclarado es el mecanismo de activación por la G-6-P.

La actividad de extractos enzimáticos de hígado de rata está asociada con el glucógeno particulado (19). Lock (21) encontró que el 98 % de la actividad es sedimentable y confirmó que la enzima está unida al glucógeno y no a los componentes vesiculares de la fracción.

Enzima ramificante ó $\alpha 1 \rightarrow 4$ -glucano 6-glucosiltransferasa

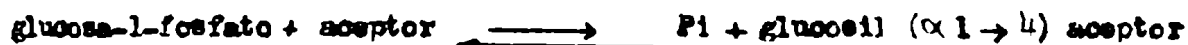
Transfiere varios residuos glucosilos de una cadena a otra similar ó a la misma, introduciendo los puntos de ramificación. En estos, el residuo glucosa parti-

pa en uniones por sus carbonos 1, y 6.

b) DEGRADACION DEL GLUCOGENO

Fosforilasa $\alpha 1 \rightarrow 4$ -glucano ; ortofosfato-glucosiltransferasa.

La fosforilasa (22 - 25) cataliza la siguiente reacción :



Se considera que "in vivo" ésta reacción está desplazada en el sentido de la degradación, eliminando unidades glucosa; ésta acción se detiene cuando quedan alrededor de 4 residuos glucosilos por rama (26). El polisacárido resultante es una γ -dextrina o dextrina límite de fosforilasa.

La fosforilasa de glucógeno se encuentra en dos formas: una activa a y la otra inactiva b (27). Se han desarrollado muchas teorías referentes a la interconversión de ambas formas. El concepto actual es que la fosforilasa b se convierte en a , mediante una fosforilación con la participación de ATP y de una enzima fosforilasa quinasa específica (28, 29). La reacción inversa es catalizada por otra enzima, una fosfatasa específica (30 - 32).

Amilo $1 \rightarrow 6$ glucosidasa o enzima desramificante.

Es una enzima que hidroliza las uniones $\alpha 1 \rightarrow 6$ de los puntos de ramificación, cuando la cadena externa está reducida a un único residuo glucosa.

Walker y Whelan (33) demostraron que después de la acción de la fosforilasa quedan 4 unidades glucosa por rama. Por lo tanto, para que se efectúe el proceso de desramificación es necesaria la participación de dos enzimas, una transglucosilasa que transfiere tres residuos glucosa de una a otra rama alargando una de las cadenas, y la glucosidasa que recién entonces puede actuar eliminando la rama que quedado con un solo residuo glucosa.

ran que ocurre por acción combinada de una transglucosilasa y la amilo 1 → 6 gluco-
sidasa, mecanismo semejante al propuesto anteriormente para la degradación de la
dextrina límite de fosforilasa (33). La transferencia dejaría al descubierto peque-
ñas ramas de una sola glucosa, sobre las que actuaría la amilo 1 → 6 glucosidasa.
El producto límite de la acción transferásica-glucosidásica sería glucosa y un po-
lisacárido lineal del tipo amilosa.

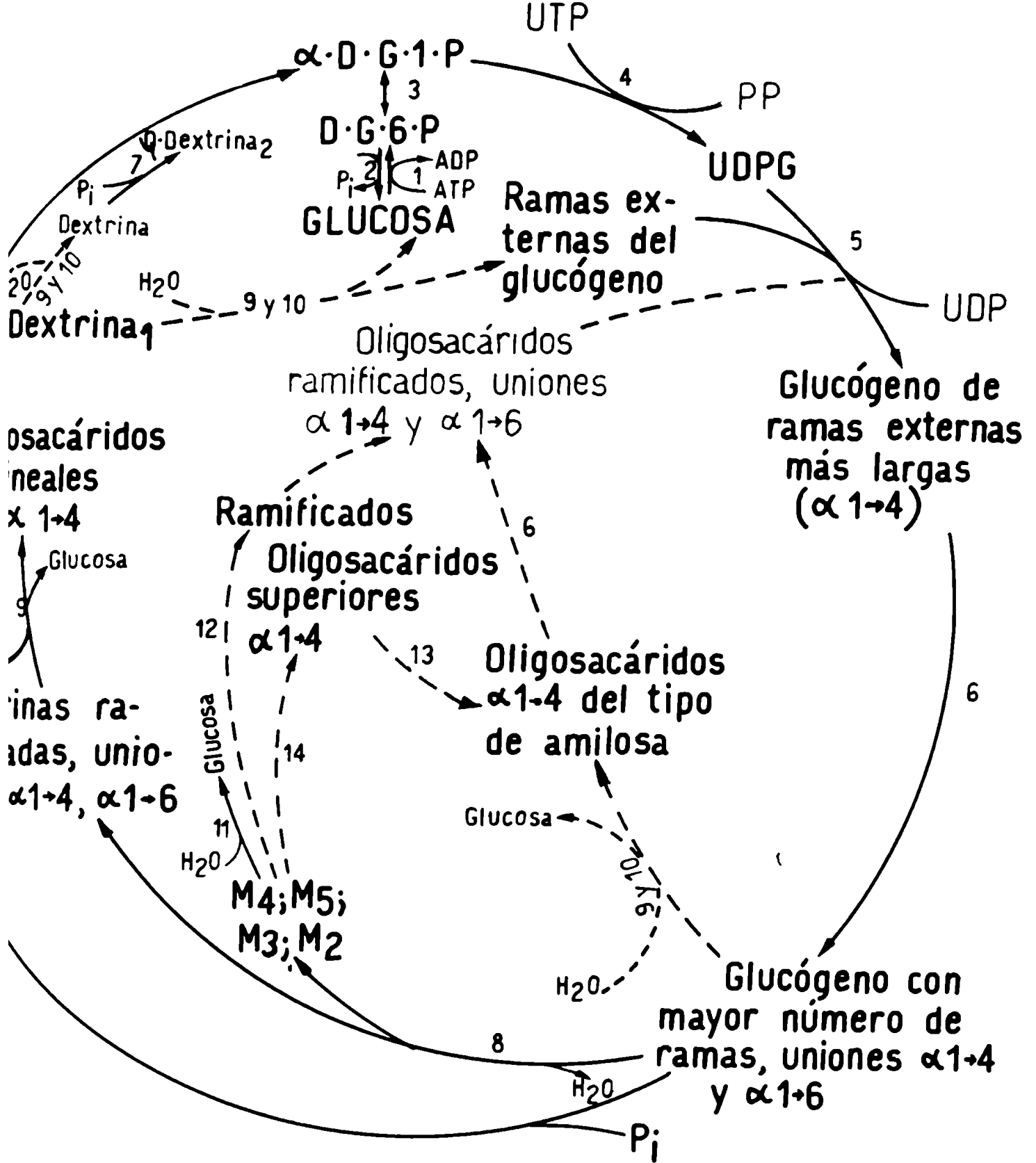
α-amilasa ó α-1,4-glucano 4 glucanhidrolasa

Esta enzima degrada las uniones α-1 → 4 del glucógeno. El mecanismo de su
acción ha sido estudiado por Olavarría y Torres (44) quienes encontraron que esta
enzima actúa en dos etapas. La primera es rápida y corresponde a la ruptura de
las cadenas exteriores del glucógeno con formación de maltotetraosa, maltotriosa
y maltopentaosa, la segunda etapa es lenta y consiste en la degradación de la
parte interna de la molécula dando lugar a fragmentos ramificados, maltosa y pe-
queñas cantidades de maltotriosa.

γ-amilasa ó α-1,4-glucano-glucanhidrolasa

Difieren de las α-amilasas en que liberan de a uno los residuos glucosa ,
comenzando por el extremo no reductor. Esta enzima ha sido encontrada en hígado
por Rosenfeld y Popova (45) y por Torres y Olavarría (46). Actúa sobre glucógeno
y malto-oligosacáridos.

La secuencia de acción y los productos de reacción de las enzimas descritas
se han reunido en lo que podría llamarse el CICLO DEL GLUCÓGENO (Fig. 1). En el
mismo se incluyen además de las enzimas que actúan directamente sobre la molécu-
la del glucógeno, las que degradan y reordenan los productos de ruptura de este
polisacárido.



CICLO DEL GLUCOGENO

Las flechas corresponden a enzimas cuya participación en el ciclo se ha demostrado. Los números se refieren a enzimas cuya participación en el ciclo no es segura.

- | | |
|----------------------------|---|
| 1) Glucosa 6-fosfatasa | 8) α -Amilasa |
| 2) Glucosa 6-fosfatasa | 9) Amilo 1,6 glucosidasa |
| 3) UDP-glucosa 4-epimerasa | 10) Transglucosidasa (Shelton) |
| 4) UDP-glucosa 4-epimerasa | 11) γ -Amilasa |
| 5) UDP-glucosa 4-epimerasa | 12) Transglucosidasa (Lukomskaia) |
| 6) UDP-glucosa 4-epimerasa | 13) Oligo 1,4-1,4 glucantransferasa (Illingworth) |
| 7) UDP-glucosa 4-epimerasa | 14) Transglucosidasa (Stetten) |

PART B EXPERIMENTAL

TECNICAS GENERALES

a) PREPARACION DE REACTIVOS

Cloruro de calcio ($CaCl_2$ puro)

Solución saturada a temperatura ambiente (20° C).

Solución de Iodo-Ioduro

260 mg de I_2 resublimado y 2.6 g de KI en 10 ml de agua destilada.

Reactivo de Iodo

Se mezclan 130 ml de solución saturada de $CaCl_2$ y 0.5 ml de solución Iodo -
duro. Esta mezcla se guarda en un frasco color caramelo con tapa esmerilada
dentro de la heladera; se conserva bien durante un mes.

Cloruro de amonio

Solución saturada a temperatura ambiente (20° C).

Gel de fosfato de calcio

Preparado según Keilin y Hartree (54). Para ello se mezcla $CaCl_2$ y PO_4^{3-} .
precipitado que se forma a pH 7.4, después de varios lavados, es el que se uti-
za, en concentraciones apropiadas, como adsorbente de proteínas.

b) PREPARACION DE POLISACARIDOS

Fitoglucógeno

Gentilmente cedido por el Dr. Carlos E. Cardini.

Glucógeno standard

Preparación comercial de Amerl Drug & Chemical Co., New York, y de hígado de
cordero de Mann Research Lab., New York, ó preparado según Somogyi (47).

Glucógeno

Se sigue una modificación del clásico método Pflüger.

Se coloca el hígado recién extraído en un vaso de precipitados con 2 ml de ClNa 60 % (P/V) por cada gramo de tejido. Se calienta en un baño maría hirviendo durante tres horas, agitando durante la primer hora. Esta solución se deja en reposo durante una noche a temperatura ambiente. Se separa en la superficie un conglomerado de jabón que ocluye todas las impurezas sólidas, y el fluido perfectamente claro, a veces gelatinoso, se pasa a otro recipiente. El material sólido se suspende en un volumen de agua igual al del fluido decantado, se calienta para que el jabón se disperse y en ese momento se agrega ClNa hasta que coagule nuevamente; se enfría y filtra, reuniendo el líquido obtenido con el anterior. Se mide el volumen total y se agregan 50 ml de alcohol 95 % por cada 100 ml de solución alcalina agitando continuamente. Si se omite la segunda extracción, es necesario diluir el primer fluido alcalino con un volumen igual de agua para obtener una concentración final de álcali de 30 % que es la necesaria para la precipitación con alcohol.

El precipitado se deja decantar durante una noche a temperatura ambiente. Se sifona la capa clara del sobrenadante y el precipitado se separa del resto por centrifugación. Luego se lo lava varias veces con una solución de alcohol- ClNa 20 % (1:2, V/V) hasta que el líquido salga incoloro y una vez más con alcohol 95 %. El glucógeno impuro se disuelve en agua; las partículas insolubles se eliminan por filtración. Se agrega el filtrado ClH (2N) hasta reacción ácida al papel rojo Congo (color azul pardo). Con el objeto de tener una mejor flocu-

lución del glucógeno, se agregan 50 ml de alcohol 50 % por cada 100 ml de solución y se filtra. Al filtrado se agrega alcohol 95 % hasta un volumen total de 80 ml por cada 100 ml de solución acuosa ácida original. La concentración alcohólica final será aproximadamente de 45 %, suficiente para efectuar la precipitación completa del glucógeno en medio ácido.

El precipitado se deja sedimentar una noche, se lo separa por centrifugación y se lava dos veces con alcohol 45 %, dos con alcohol 95 % y finalmente con éter. Se deja secar obteniendo un polvo blanco. Este producto tiene cantidad apreciable de ClNa que se puede eliminar reprecipitando dos veces con alcohol 45 %. Si en la precipitación final el alcohol sólo causa opacidad pero no precipitación, se debe a la ausencia de electrolitos; agregando 0.3 ml de ClNa 0.1 N por cada 100 ml de fluido precipita inmediatamente el glucógeno.

Amilosa y amilopectina

Estos polisacáridos, gentilmente cedidos por el Dr. Carlos M. Cardini, fueron preparados según el método de Cowie y Greenwood (48), basado en el de Schoch (49), a partir de almidón de papa. Se aprovecha la propiedad de ciertos alcoholes como el butanol o el timol de formar complejos insolubles con la amilosa.

- Preparación del almidón de papa: según la técnica descrita por Schoch (50). Se utilizan papas lavadas, peladas y cortadas en rebanadas finas, que se tratan en licuadora con 2 a 3 volúmenes de agua destilada. La suspensión obtenida se filtra a través de una tela de nylon. Se repite el tratamiento en licuadora con el residuo fibroso que queda en el filtro y se vuelve a filtrar. Se juntan ambos filtrados que contienen una suspensión de almidón, se deja sedimentar

nte 1 hora; en este tiempo los granos de mayor tamaño forman un precipitado
o y firme. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el almidón en 20 ó 30
ml de agua dejando sedimentar. Este procedimiento se repite varias veces
para obtener un sobrenadante límpido.

- Fraccionamiento: se agrega una suspensión de 2 g de almidón en 40 ml de
agua a 260 ml de agua en ebullición, y se deja hervir 30 minutos; se enfría a 60°
después de agregar 0.5 g de timol en polvo, se mantiene a 60° durante otros
30 minutos. Finalmente, se deja a temperatura ambiente durante tres días con el
fin de que el complejo amilosa-timol precipite completamente. Se separa el
precipitado por centrifugación, y el sobrenadante que contiene la amilopectina,
la liofiliza y luego se hierve a reflujo con metanol para eliminar el timol. Se
redisuelve en agua y liofiliza nuevamente con lo que se obtiene amilopectina pura.
El complejo amilosa-timol se dispersa en 200 ml de agua en ebullición, y se pre-
cipita la amilosa saturando la solución con butanol (20 ml) y dejando enfriar len-
tamente. El complejo amilosa-butanol, se separa por centrifugación y se lava va-
rias veces con agua saturada con butanol.

Con el objeto de purificar esta fracción se la redisuelve en agua hirviendo
para dar una solución 0.2 % (P/V) de amilosa (teniendo en cuenta que el almidón
comercial contiene aproximadamente 20 % de amilosa), y se agrega butanol (un vo-
lumen equivalente al 10 % de la solución acuosa); se deja enfriar en forma len-
ta después de 24 ó 36 horas aparece el precipitado del complejo amilosa-butanol.

Para evitar la retrogradación permanente, el complejo no debe secarse directa-
mente; primero se lo deshidrata por agitación con 10 volúmenes de butanol frío y

uego se filtra. Esta operación se repite varias veces y el producto final se seca en estufa al vacío a 75° C.

Dextrina β -límite de amilopectina y glucógeno

Fueron preparadas por el método de Hestrin (51). Para ello se incubaba durante una noche a 30° C bajo vapores de tolueno, 1 g de amilopectina ó glucógeno con 6 mg de β -amilasa (cuya preparación se describe más adelante) y 8 ml de buffer citrato 0.1 M pH 6.0 en un volumen total de 20 ml. El polisacárido residual se precipita con 2 volúmenes de metanol y se separa por centrifugación. Después de eliminar el alcohol en un desecador al vacío, se repite la incubación con β -amilasa hasta que no se libera más maltosa. La dextrina límite se purifica precipitándola varias veces con metanol 75 % y dializando al final.

Dextrinas límite de fosforilasa de amilopectina y glucógeno

Se obtienen haciendo actuar fosforilasa de músculo (51) sobre amilopectina y glucógeno.

La mezcla de reacción es la siguiente : polisacárido 100 mg; buffer fosfato 0.15 M pH 6.8; cisteína neutra 0.015 M; fosforilasa (cuya preparación se describe más adelante) de la 3^{ra} etapa de purificación en cantidad correspondiente a 5 mg de proteína, en un volumen total de 20 ml. Se incubaba a 30° C y se procede en la misma forma que para la preparación de la dextrina β -límite.

c) PREPARACION DE MINIMAS

β -amilasa

Se prepara según Ballou y Luck (52), agitando lentamente 100 g de grano de trigo mediano molido con 300 ml de agua destilada, durante media hora a temperatura ambiente. El material grueso se separa por centrifugación a 2.000 rpm. La suspensión de partículas finas se centrifuga a 0° C durante 20 minutos a 4.000 rpm. El sobrenadante (200 - 210 ml) tiene un aspecto turbio.

Todas las etapas siguientes se hacen a 0 - 4° C.

Al líquido sobrenadante se agrega un volumen igual de etanol redestilado (95 %) frío. Luego se continúa por unos minutos la agitación lenta. Se deja en reposo unos minutos y el precipitado que flocula se descarta después de centrifugar.

Al sobrenadante claro se agrega 1.8 veces su volumen de alcohol 95 %. Esto da un contenido alcohólico final de aproximadamente 80 % en volumen. La mezcla se agita lentamente durante varios minutos y se deja un rato en reposo. Se obtiene un precipitado blanco flocoulento, que se lava varias veces con acetona fría luego se deja secar al aire.

El rendimiento es de 0.9 g de β -amilasa por cada 100 g de trigo.

Fosforilasa de músculo

Para su preparación se siguió el método descrito por Cori y col. (53). Con una inyección intravenosa de 5 ml. de pentobarbital sódico (60 mg/ml) se anestesia un conejo bien alimentado, que luego se sacrifica por decapitación dejándolo sangrar;

animal no debe tener convulsiones.

Después de eliminar la piel se extraen los músculos de las patas y lomo, se lavan rápidamente y se llevan a 0 - 4° C manteniendo ésta temperatura durante todas las operaciones posteriores.

- 1ª etapa : los músculos se pasan dos veces por una picadora de carne y se suspenden inmediatamente en un volumen de agua destilada fría. Se agita con una botella de vidrio y después de 10 minutos se filtra por una gasa. El músculo filtrado se presiona bien con una espátula para recuperar la mayor cantidad posible de líquido, sin exprimir la gasa.

El filtrado se centrifuga 5 minutos a 8.000 rpm y el sobrenadante se extrae a través de papel ó algodón (agregando, en el caso de usar algodón, Cl₂Na para una concentración final de 3×10^{-3} M). Se mide el pH a 10° C con electrodo de vidrio (generalmente está a pH 6.5 - 6.7) y se ajusta a pH 6.4 con buffer acetato 0.1 M de pH 4.6 ó con Cl₂Na 0.05 N. Este agregado se hace lentamente y con agitación. El extracto, apenas turbio, se dializa contra agua destilada durante 3 a 4 horas, agitando de vez en cuando las bolsitas de diálisis. Todas las operaciones desde la extracción de los músculos hasta la diálisis se deben realizar en menos de 2 horas. El extracto dializado se ajusta a pH 6.0 con Cl₂Na ó acetato; después de unos minutos se forma un precipitado floculento que se separa centrifugando a 8.000 - 10.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante claro se filtra a través de papel Whatman N° 1 plegado; al filtrado se agrega CO₂Na₂ con mucho cuidado hasta llegar a pH 6.8.

- 2ª etapa : La solución se precipita agregando sulfato de amonio hasta 0.41 de saturación; esta concentración se alcanza agregando 70 ml de solución de sulfato de amonio saturada a t° ambiente (pH 6.8) por cada 100 ml de extracto. Se deja en reposo durante una noche y sedimenta un precipitado floculento que se separa centrifugando a 10.000 x g durante 20 minutos.

- 3ª etapa : el precipitado que contiene fosforilasa, se disuelve en 10 a 15 ml de agua destilada. La solución algo turbia se dializa nuevamente durante 60 a 80 minutos contra agua destilada fría. El tubo de diálisis se transfiere a un vaso que contiene la siguiente solución : 2.5 ml de clorhidrato de cisteína 0.3 M ó verona 0.015 M, 100 ml de glicerofosfato de sodio 0.02 M y agua hasta completar 250 ml (el pH se ajusta a 6.6 - 6.8). Si se agrega a la solución anterior FNa hasta una concentración final de 0.1 M, el rendimiento de los cristales mejora y además se inhibe la conversión enzimática de fosforilasa α en β . Se sigue la diálisis durante 16 a 20 horas más, cambiando 3 a 4 veces el líquido externo.

Según los autores, en esta etapa cristaliza la enzima. En nuestro caso se utilizó directamente la solución contenida en el tubo de diálisis, porque no se separaron cristales.

α -amilasa de saliva

Se centrifuga la saliva durante 10 minutos a 2.000 rpm, y el sobrenadante se diluye 100 veces con agua destilada.

α -amilasa de hígado

La amilasa contenida en la fracción de "glucógeno particulado" de hígado de

ta, se preparó según el procedimiento descrito por Torres y Olavarría (46).

El hígado de una rata bien alimentada se trata en un homogenizador con tres rúmses de agua destilada. La pastilla de glucógeno obtenida después de centrifugar a 25.000 x g se suspende en agua y se precipita con acetona fría (-15° C). centrifuga nuevamente y el precipitado se lava dos veces con acetona fría y se ca al vacío en un desecador. El precipitado de glucógeno particulado se disuel- en buffer citrato 0.5 M pH 6.4 llevando la concentración a 4 mg/ml.

d) DETERMINACION DE PROTEINAS

Las proteínas se determinan por el método de Kunitz y McDonald (55) utilizando como standard una solución de albúmina cristalina de bovino.

e) LIMITES DE β -AMILOLISIS DE GLUCOGENO O AMILOPECTINA

Se incuba 1 mg de polisacárido con 0.03 mg de β -amilasa y buffer citrato 0.5 M a pH 6.0 en un volumen final de 0.15 ml durante una noche a 37° C, bajo pares de tolueno. Se detiene la reacción, calentando durante 10 minutos a 100° C se mide el poder reductor de una alícuota adecuada por el método de Park y Johnson (56) en un volumen final de 2 ml.

f) LONGITUD PROMEDIO DE CADENA (CL)

Este valor expresa el número de unidades glucosas por cada glucosa terminal. realiza una oxidación con periodato (57) y se determina :

a) los volúmenes relativos de álcali requeridos para titular el formiato li- ndo por la oxidación del glucógeno y de un standard de α -etil glucósido, y

b) las concentraciones relativas del glucógeno y del standard, medidas con el método de la antrona.

La oxidación se lleva a cabo con metaperiodato de sodio 0.1 M durante 48 horas a 3° C, en la oscuridad.

En un erlenmeyer con tapa esmerilada se pipetea 1 ml de una solución al 1 % (P/V) de glucógeno, y en otro erlenmeyer 1 ml de una solución recién preparada de α -metil glucósido al 0.1 % (P/V); ambos se colocan dentro de un baño de hielo. A cada una de las soluciones frías se agrega 1.0 ml de solución de periodato, se mezcla cuidadosamente (siempre dentro del baño de hielo) y se dejan reaccionar en la oscuridad durante 48 horas a 4° C. Después de este período de oxidación se agrega 0.1 ml de etilen glicol frío y se deja en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente.

Se preparan dos blancos, utilizando para ello sendos erlenmeyers, agregando cada uno de ellos 1.0 ml de metaperiodato de sodio 0.2 M frío y 0.1 ml de etilen glicol. Las soluciones se mezclan y se dejan estar en la oscuridad y a temperatura ambiente para asegurar la reducción completa del periodato; luego se agrega 0.1 ml de solución de glucógeno a uno de los blancos y 1.0 ml de solución de α -metil glucósido al otro, guardando ambos en heladera hasta que se complete la oxidación de las otras soluciones.

La titulación se realiza agregando 1 ml de IK 1 % y 1 ml de tiosulfato 0.01 N. El exceso de tiosulfato se titula con una solución de Iodo 0.01 N usando unas gotas de almidón al 1 % como indicador. El valor obtenido en la titulación del blanco menos el del ensayo da el volumen de Iodo equivalente al ácido fórmico liberado.

El número de unidades glucosas presentes en el glucógeno y en el α -metil glucósido se determina por el método de la antrona (58).

$$\text{Longitud promedio de cadena} = \frac{V_M}{V_G} \times \frac{A_G}{A_M}$$

V_M y V_G : volúmenes utilizados para titular el exceso de ácido del metilglucósido (M) y del glucógeno (G).

A_M y A_G : valores obtenidos en la determinación con antrona.

g) DETERMINACION DE AZUCARES

Método del fenol-sulfúrico

Este método (59) permite dosar azúcares totales tengan o no el grupo reductor libre, es decir que sirve para medir azúcares simples, oligosacáridos y polisacáridos.

Consiste en medir el color producido cuando se tratan estas sustancias con ácido sulfúrico concentrado y fenol. Se utiliza como testigo una solución de glucosa.

- Procedimiento: a 0.8 ml de muestra se agregan 0.04 ml de fenol destilado 80 % y luego en forma brusca 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Después de solar se calienta en baño maría hirviendo durante 10 minutos, se enfría y lee a 490 m μ .

Método de la antrona

Igual que el método anterior permite dosar azúcares totales (58). Estos se hidratan en un medio de ácido sulfúrico dando un derivado del furfural que se

reacciona con la antrona para dar un compuesto azul que es el que se mide.

- Reactivo modificado de antrona (60): se disuelven 0.4 g de antrona en 10 ml de SO_4H_2 pro-análisis. Esta solución se pasa cuidadosamente a un recipiente que contiene 60 ml de agua destilada y 15 ml de etanol 45 %.

- Procedimiento: se agregan 10 ml del reactivo a 1.0 ml de muestra. Se calienta durante 10 minutos a 100°C y se lee a $620 \text{ m}\mu$.

El blanco se hace en la misma forma pero usando 1 ml de agua en lugar de muestra.

Método de Park y Johnson

Con este método (56) se pueden determinar aquellos azúcares que tienen el grupo reductor libre.

Se basa en la propiedad que tienen los azúcares de reducir, en medio alcalino, a iones ferricianuro para formar el Azul de Prusia en presencia de iones férricos.

- Reactivos: a) 0.5 g $\text{Fe}(\text{OH})_3$ disueltos en 1 litro de agua
b) 5.3 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y 0.65 g de CNK en 1 litro de agua
c) 1.5 g de sulfato amónico férrico y 1 g de Duponol, disueltos en 1 litro de SO_4H_2 0.05 N.

- Procedimiento: a 3 ml de muestra se le agrega 1 ml de la solución b) y 1 ml de la solución a); después de mezclar se calienta a 100°C durante 15 minutos. Se enfría y se agrega 5 ml de la solución c), se deja en reposo 15 minutos a temperatura ambiente y se lee a $690 \text{ m}\mu$.

Simultáneamente se prepara un blanco en el que se reemplaza la muestra por agua y se hace el testigo con una solución conocida de azúcar.

Para este volumen final el método permite dosar entre $0.005 - 0.05 \mu\text{moles}$ de glucosa.

R E S U L T A D O S

P A R T E I

D E T E R M I N A C I O N C O L O R I M E T R I C A
D E L
G L U C O G E N O C O N I O D O

Hasta el presente, los métodos usados para el dosaje colorimétrico del glucógeno han consistido en la hidrólisis del polisacárido y posterior determinación de la glucosa liberada (58 - 62).

Los procedimientos basados en la formación de un complejo coloreado con el yodo han sido criticados por Lugon Morris (63) quien señaló que la intensidad del color varía mucho con la temperatura y el tipo de glucógeno examinado. Además Muner y Somers (64) observaron que la intensidad de la coloración aumenta por el agregado de sulfato de amonio saturado.

La primera parte de este trabajo se dedicó a la búsqueda de un método simple reproducible para el dosaje colorimétrico del glucógeno con yodo, en presencia de altas concentraciones de sales. El mismo es aplicable a los polisacáridos del tipo del almidón y con él se puede distinguir entre el glucógeno, la amilopectina y la amilosa.

Este método se utilizó posteriormente para medir la actividad de la enzima amilificante.

E F E C T O D E D I F E R E N T E S S A L E S

Se estudió la influencia que tienen las diferentes sales en la reacción colorimétrica del glucógeno con yodo. Como se ve en la Tabla I, la intensidad del color aumenta de 4 a 7 veces según la sal.

El sulfato de amonio, citrato de sodio y cloruro de calcio son las más efectivas.

Se eligió el Cl_2Ca para los estudios posteriores debido a que el sulfato de amonio y el citrato de sodio producen la precipitación del glucógeno cuando aumentan su concentración.

Tabla I - Efecto de sales en la reacción del glucógeno con el yodo

La mezcla de reacción contiene: glucógeno 0.06 mg; I₂ 0.52 mg; IK 5.2 mg; y sal^(x) en un volumen total de 1.52 ml. Se hace el blanco correspondiente a cada sal con todos los reactivos menos el glucógeno.

Por el agregado de cada sal se produce un desplazamiento de la longitud de onda del máximo de absorción. En este caso todas las lecturas se hicieron a 500 $\mu\mu$, que es el máximo que corresponde al complejo glucógeno-yodo en presencia de sulfato de amonio.

Sal agregada	Cantidad (gramos)	absorción
$\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	0.72	0.270
$(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_4$	0.65	0.295
$(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_4$	0.43	0.315
Citrato de sodio	0.81	0.350
NaCl	0.42	0.270
NH_4Cl	0.40	0.130
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.57	0.370
CaCl_2	0.87	0.340
-	-	0.050

(x) - las cantidades indicadas de sal corresponden a 1.3 ml de solución saturada, excepto para el sulfato de amonio.

F U E R Z A I O N I C A

Se determinó la influencia de la fuerza iónica sobre la coloración del complejo glucógeno-yodo, en presencia de distintas sales.

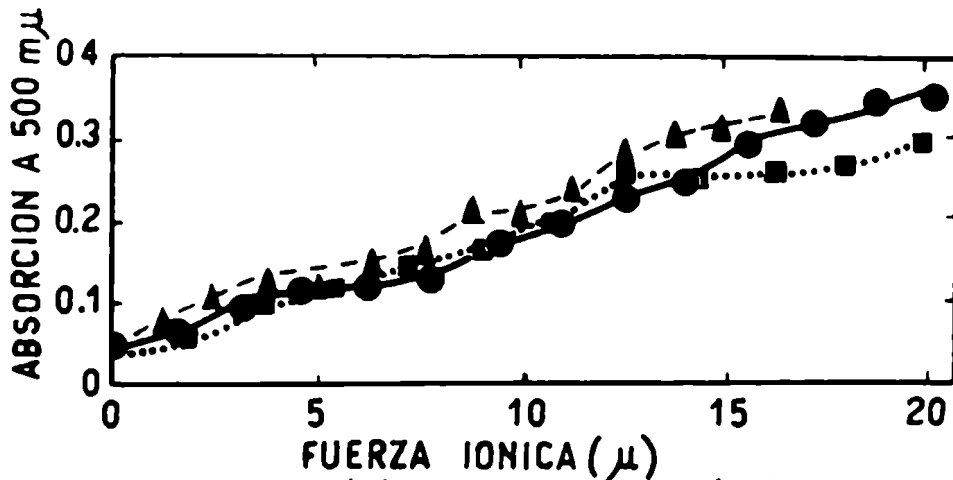


Fig. 1. Influencia de la fuerza iónica en la coloración del complejo Glucógeno-Iodo en presencia de distintas sales.- Mezcla de reacción: glucógeno, 16 mg; I₂, 0,518 mg; IK, 5,2 mg; volumen final, 1,52 ml. Aparato, espectrofotómetro Beckman DU, λ : 500 m μ . Δ , sulfato de amonio; \bullet , citrato de litio; \blacksquare , cloruro de calcio.

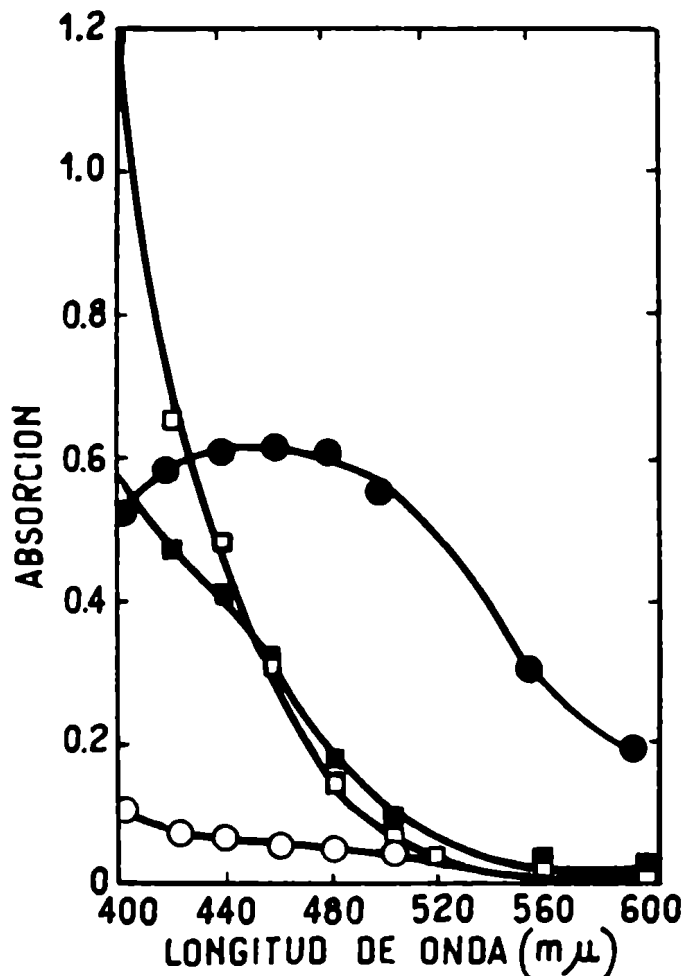


FIG. 2. Espectro de absorción del complejo Glucógeno-Iodo en presencia de cloruro de calcio.- \blacksquare , Blanco con cloruro de calcio; \square , Blanco sin cloruro de calcio; \bullet , Glucógeno con cloruro de calcio (restado el blanco); \circ , Glucógeno sin cloruro de calcio (restado el blanco).

Observando la Fig. 1, se puede concluir que para una dada fuerza iónica corresponde aproximadamente la misma intensidad de color, cualquiera sea la sal agregada al medio.

CURVA DE ABSORCION

Si se agrega Cl_2Ca a la mezcla de reacción, ésta presenta el máximo de absorción a $460 \text{ m}\mu$ (Fig. 2) y la intensidad de color aumenta 10 veces.

El efecto del Cl_2Ca sobre el blanco es pequeño en el intervalo de $460 - 600 \text{ m}\mu$, pero a longitudes de onda menores la absorción del blanco es muy alta y la presencia del Cl_2Ca lo reduce a la mitad.

Se estudió la influencia de cada uno de los reactivos que participan en la reacción manteniendo todas las demás condiciones constantes.

La Fig. 3 muestra el efecto de las diferentes concentraciones de Cl_2Ca . Como la absorción no varía apreciablemente agregando más de 0.26 mg de I_2 (ver Fig. 4), se eligió esta cantidad para evitar blancos muy altos.

Un estudio similar, hecho con el objeto de obtener una intensidad de color independiente de la concentración de IK , demostró que esta última debe hallarse en un exceso de 10 veces (P/V) respecto del iodo.

M E T O D O A D O P T A D O

En base a estos datos, se adoptó el siguiente procedimiento: se agregan 2.6 ml de reactivo de iodo a 0.4 ml de una muestra que contenga entre 0.06 y 0.75 mg de lucógeno por ml . Después de mezclar se obtiene una solución límpida de color

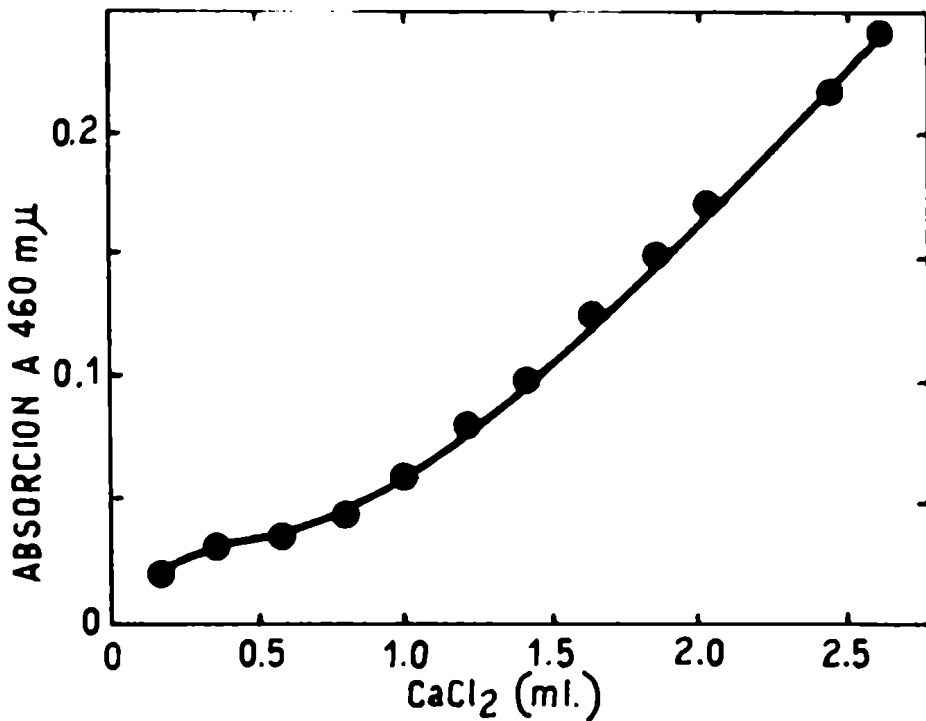


FIG. 3. Efecto de la concentración del cloruro de calcio.- La mezcla de reacción está constituida por: 0,1 mg de glucógeno; 0,26 mg de I₂; 2,6 mg de IK y las cantidades indicadas de cloruro de calcio (solución saturada), el volumen total es de 3,0 ml. Para cada concentración de Cl₂Ca se hace el correspondiente blanco.

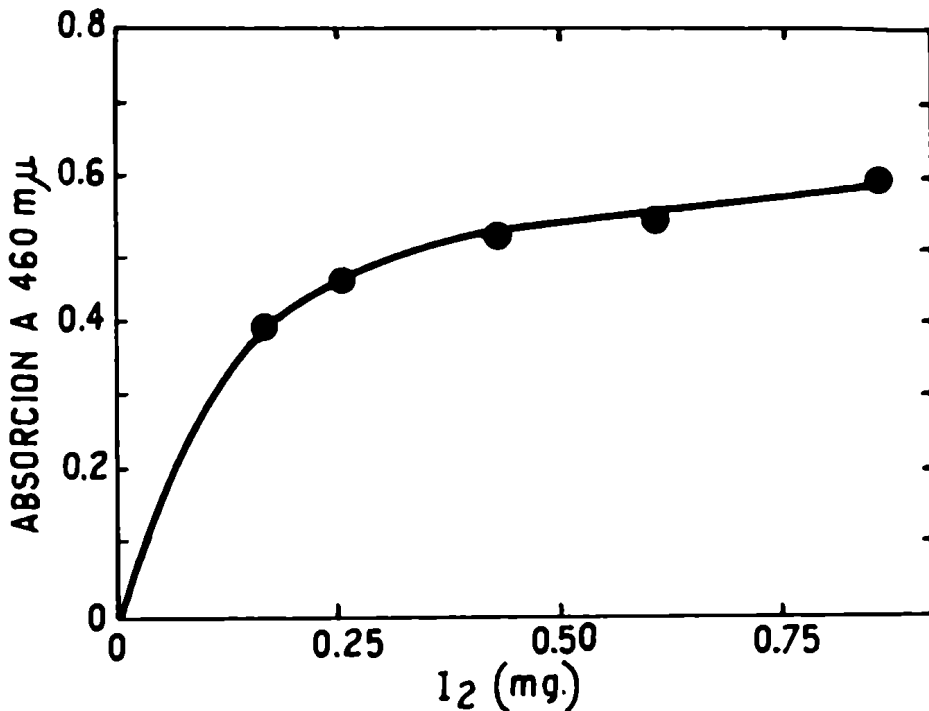


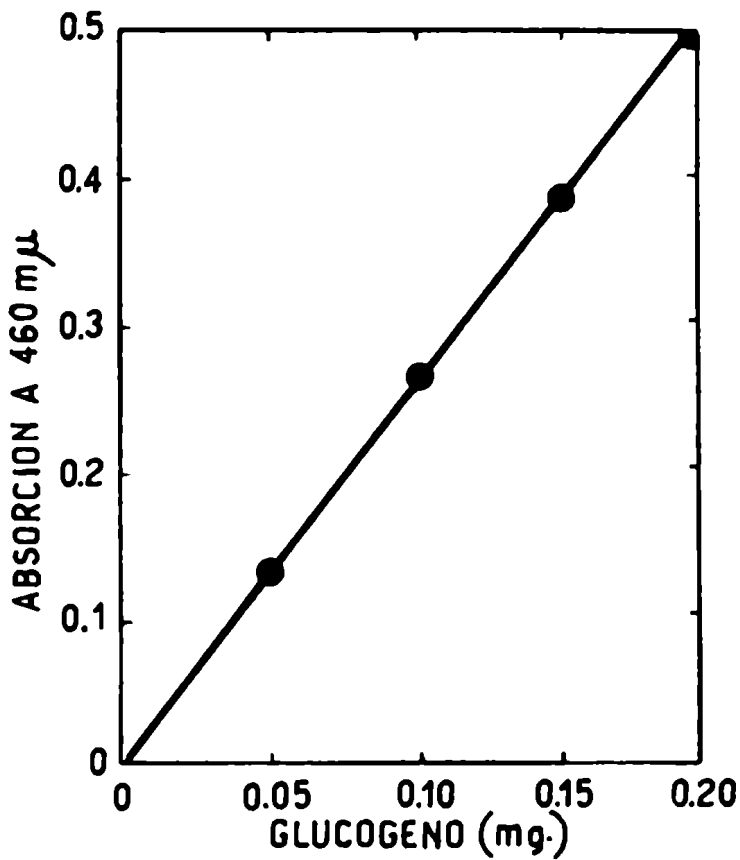
FIG. 4. Efecto del Iodo.- La mezcla de reacción está constituida por 0,2 mg de glucógeno; 1,7 g de cloruro de calcio; 9,38 mg de IK y las cantidades indicadas de I₂ en un volumen final de 3,0 ml. Al valor para cada concentración de iodo se ha restado su correspondiente blanco.

arrón rojo cuya absorción se mide a 460 m μ . Esta resulta proporcional a la concentración de glucógeno hasta 1 mg/ml (Fig. 5).

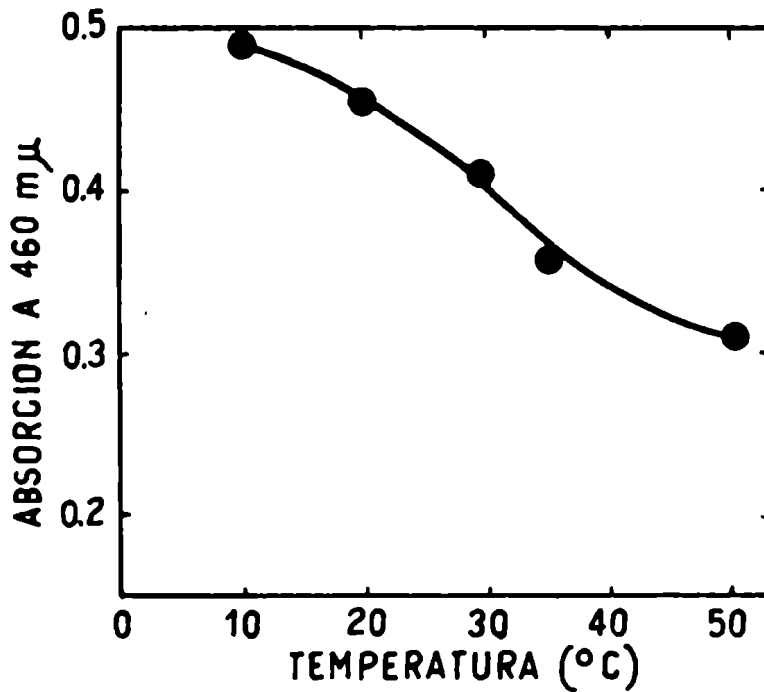
GLUCOGENO EN TEJIDOS

Para medir el glucógeno tisular se extrae con HOK según la técnica común (65) procediendo de la siguiente manera : se agregan 0.9 ml de HOK 33 % a 100 mg de tejido recién extraído ó a 0.1 ml de un homogenizado. La mezcla se calienta durante 20 minutos a 100° C y se enfría. Si se observan restos celulares se pueden eliminar por centrifugación. Al sobrenadante límpido se le agrega 1.3 ml de etanol (95%), se homogeneiza y después de calentar hasta ebullición incipiente se enfría inmediatamente en un baño de hielo para facilitar la floculación del glucógeno. Se saca el sobrenadante obtenido por centrifugación a 3.000 rpm durante 15 minutos el tubo se coloca invertido sobre un trozo de papel absorbente. No es necesario precipitar varias veces el glucógeno como es habitual para otras técnicas. Sin embargo, es muy importante neutralizar el exceso de álcali agregando 0.2 ml de solución saturada de ClNH_4 y mezclando cuidadosamente con una varilla de vidrio. La solución de ClNH_4 debe mojar bien las paredes del tubo; luego, se calienta 5 minutos a 100° C para eliminar el HOH_4 formado, se enfría y se agregan 0.2 ml de agua destilada y 2.6 ml del reactivo de iodo, determinando la absorción a 460 m μ . Se procede en la misma forma con los blancos y los standard (testigos) de glucógeno.

Los glucógenos de diferentes especies no siempre dan el mismo color; es conveniente utilizar un standard del mismo origen.



G. 5. Absorción a 460 m μ en función de la concentración de glucógeno.-
Mezcla de reacción: cloruro de calcio, 1,7 g; I₂, 0,26 mg; IK, 2,6 mg;
glucógeno, en las concentraciones indicadas. Volumen final: 3,0 ml.



G. 6. Efecto de temperatura.- Mezcla de reacción: glucógeno, 0,2 mg;
cloruro de calcio, 1,7 g; I₂, 0,26 mg; IK, 2,6 mg. Volumen final 3,0 ml.

RECUPERACION

Se controló el método agregando cantidades conocidas de glucógeno a extractos de tejido, cuyo contenido se había determinado previamente.

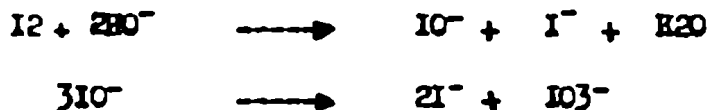
Se obtuvieron recuperaciones de $100 \pm 5 \%$.

E F E C T O D E T E M P E R A T U R A

En ausencia de sales, un aumento de temperatura produce una disminución de color (63) del 37 % para un intervalo de 10°C . En cambio, en presencia de Cl_2O_2 la disminución es solamente del 11 % (ver Fig. 6).

E F E C T O D E L p H

A pH neutro o ácido, no hay variación en la intensidad de color; se deben evitar pH superiores a 7 pues el color disminuye rápidamente. Este efecto se debe a la desaparición de I_2 en forma de hipoclorito.



E S T A B I L I D A D D E L C O L O R C O N E L T I E M P O

Como se ve en la Tabla II, la absorción de la solución no varía apreciablemente en el intervalo de 1 hora.

Tabla II - Estabilidad del color

La mezcla de reacción es igual que la descrita en " Método adoptado "

Tiempo (min.)	Absorción	Tiempo (min.)	Absorción
0	0.525	40	0.520
5	0.520	50	0.515
10	0.520	140	0.490
15	0.520	215	0.490
20	0.520	a las 24 hs.	0.400

GLUCOGENO DE DISTINTOS ORIGENES

Se analizaron glucógenos obtenidos de diferentes orígenes y de animales en distintas condiciones, por el método del yodo y el del fenol sulfúrico (59); se usó como standard glucógeno de hígado de rata.

Los resultados se han reunido en la Tabla III. Para una mejor interpretación de los mismos se define el valor \bar{g} como el cociente entre el glucógeno obtenido por el método del yodo y el hallado por la técnica del fenol sulfúrico, expresado ambos en mg.

Para el glucógeno standard se adopta el valor de 1 para esa relación. Se observa que los glucógenos degradados dan valores muy bajos de \bar{g} .

Tabla III - Determinación del valor \bar{R} para distintos glucógenos

Glucógeno	Método de análisis		\bar{R} (Iodo/f.sulfúrico)
	Iodo (mg de Glucog.)	fenol sulfúrico (mg de Glucog.)	
hígado de conejo	1.08	1.06	1.02
hígado de serpiente hembra	0.77	0.92	0.84
hígado de serpiente macho	1.3	1.5	0.86
hígado de sapo macho	1.28	1.47	0.87
hígado de sapo hembra	3.4	4.2	0.81
hígado de rata diabética	1	1.16	0.86
hígado de rata diabética	2.07	2.57	0.81
hígado de rata en ayunas	2.00	2.37	0.84
hígado de rata normal	1.08	1.15	0.94
hígado de rata en ayunas	0.89	1.05	0.85
hígado de rata normal	1.02	1.22	0.83
fragua de rata normal	0.39	0.35	1.1
fragua de rata normal	1.16	1.05	1.1
fragua de rata normal			
insulina	0.35	0.32	1.1
hígado de rata diabética	0.43	0.74	0.57
urina β -límite	2.15	4.85	0.45
urina límite de fosforilasa	2.7	5.1	0.53
urina de α -amilasa	0.06	0.3	0.2

Los valores de ambos métodos están expresados en mg de glucógeno, referidos a un standard de hígado de rata. Inmediatamente después de extraer el tejido a analizar se hidroliza con HCl 33 % y luego se toman alícuotas, a partir de las cuales se procede según el método general.

También se analizó el glucógeno de eritrocitos. Para su extracción se procede de acuerdo a J.B. Sidbury y col. (66). Los glóbulos se separan por centrifugación de sangre citratada a 2.000 x g durante 15 minutos ; se lavan dos veces con solución de ClNa 0.85 %, se tratan con igual volumen de ácido tricloroacético 20 % y se homogeneizan bien con una varilla de vidrio y se centrifugan a 2,500 rpm

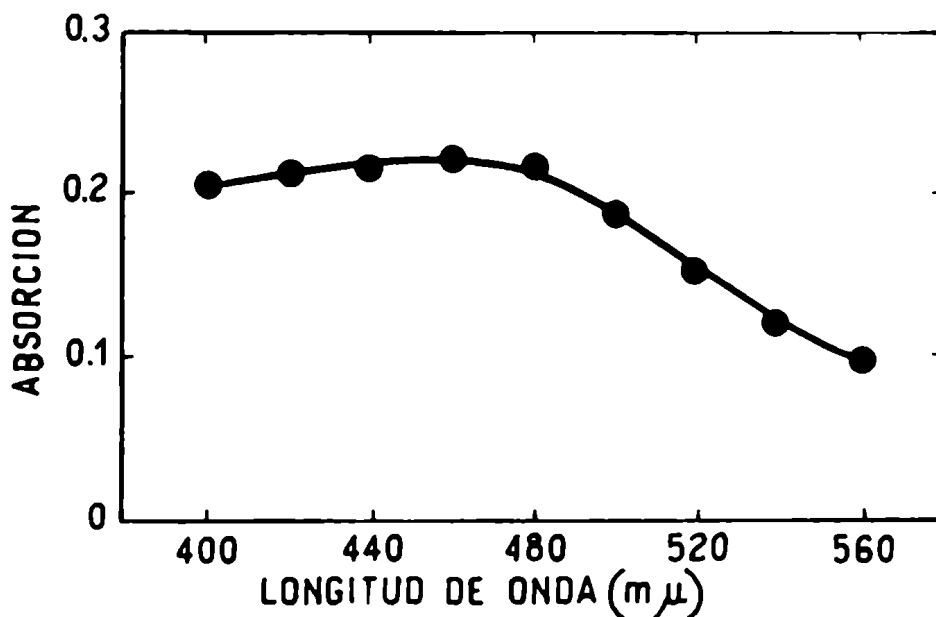


FIG. 7. Curva espectrofotométrica en presencia del reactivo de Iodo del glucógeno obtenido de glóbulos.-

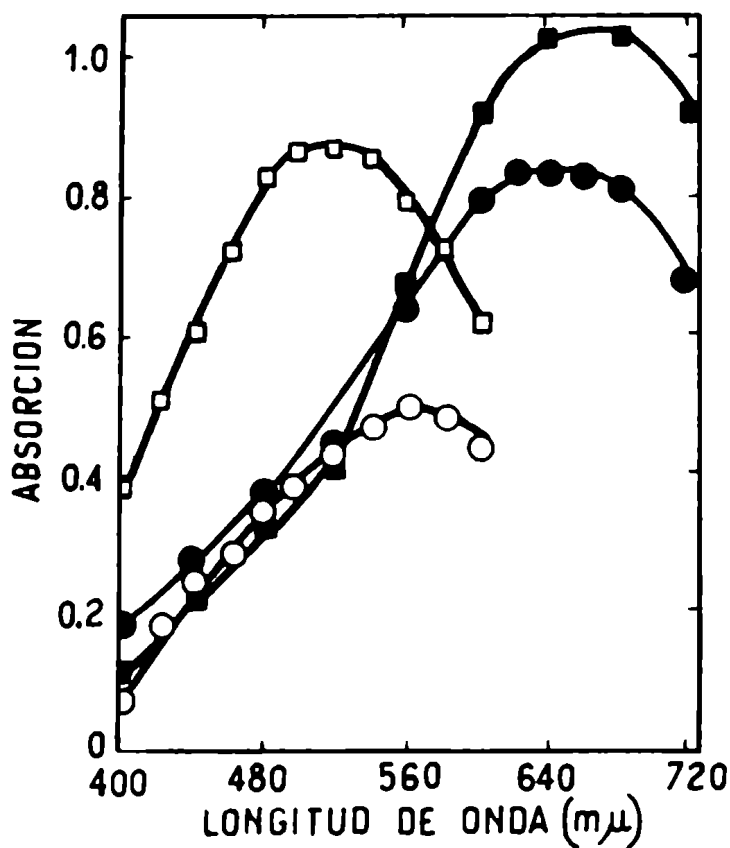


FIG. 8. Espectro de absorción de los complejos amilopectina-Iodo y amilosa-Iodo.- ○, Amilopectina sin cloruro de calcio; □, Amilopectina con cloruro de calcio; ■, Amilosa sin cloruro de calcio; ●, Amilosa con cloruro de calcio.

durante 10 minutos. El sobrenadante se dializa contra agua destilada durante 24 horas. Se toma una alícuota a la cual se le agrega el reactivo de iodo y se hace el espectro del glucógeno (Fig. 7).

En otro experimento se separaron los elementos de la sangre con el objeto de ver en qué fracción se encuentra el glucógeno.

Se obtuvo el plasma por centrifugación a 2.000 rpm. Los glóbulos fueron separados aprovechando la propiedad del dextrano de sedimentar los rojos y dejar en suspensión los blancos. De las tres fracciones analizadas, plasma, glóbulos rojos y glóbulos blancos, sólo se encontró glucógeno en la última. Esto coincide con los datos obtenidos con técnicas histoquímicas (67).

OTROS POLISACARIDOS

El almidón soluble comercial da con el I2 una coloración marrón violeta con absorción máxima a 520 m μ . En ausencia de Cl2Oa, el color varía de verde a azul, medida que aumenta la concentración de almidón. La absorción es proporcional en el rango de 0.05 a 0.5 mg/ml.

La amilopectina, el componente ramificado del almidón presenta una absorción máxima a 520 - 540 m μ (Fig. 8), que se desplaza hasta 560 m μ en ausencia de Cl2Oa. La intensidad del color se duplica en presencia de la sal. Con amilopectina derivada por β -amilasa (dextrina β -límite) la absorción disminuye en un 30 %, permaneciendo invariable el λ máx. En el caso del glucógeno, en cambio, los λ máx. de las dextrinas límites disminuyen.

La amilosa presenta el mismo color azul con λ máx. a 690 m μ en ausencia ó

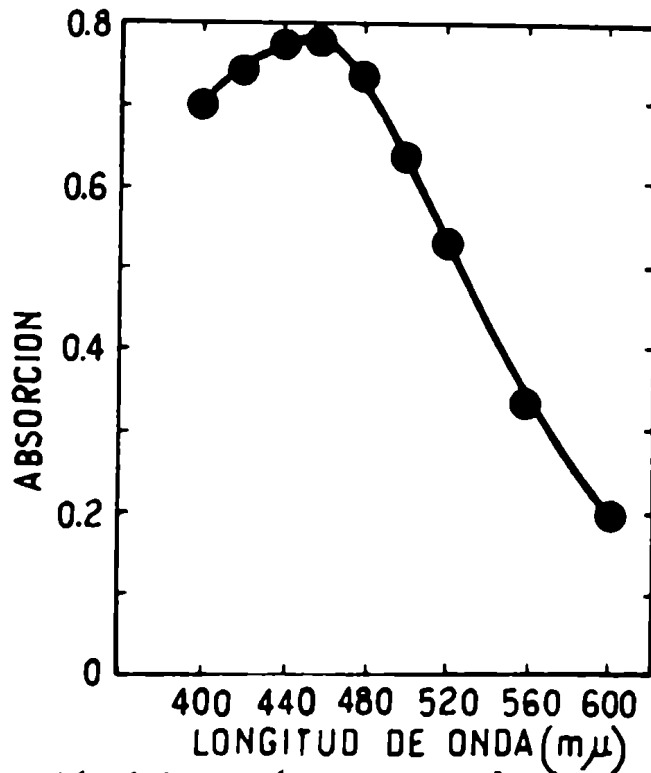
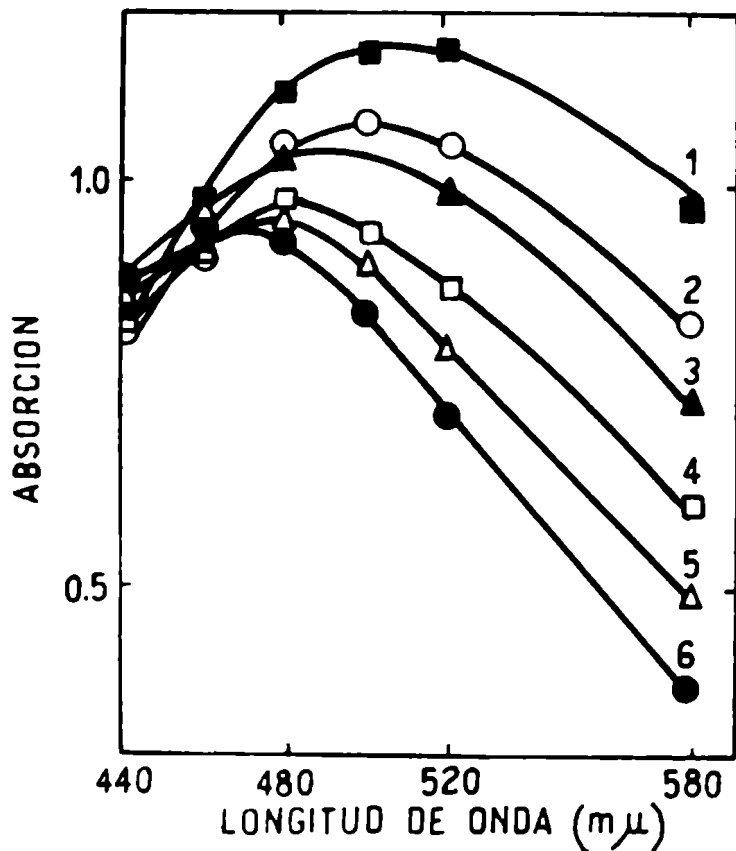


FIG. 9. Espectro de absorción del glucógeno vegetal en presencia del reactivo de iodo.-



Curva	Amilopectina		Glucógeno	
	%	mg.	%	mg.
1	100	0.2	-	-
2	80	0.16	20	0.04
3	60	0.12	40	0.08
4	40	0.08	60	0.12
5	20	0.04	80	0.16
6	-	-	100	0.20

FIG. 10. Curvas espectrofotométricas de mezclas de amilopectina y glucógeno con reactivo de iodo.-

presencia de Cl_2Ca (Fig. 8). El agregado del Cl_2Ca disminuye un poco la intensidad del color.

En la Figura 9 se puede ver el espectro del glucógeno vegetal (glucógeno de raíz) en presencia del reactivo de iodo.

Con el objeto de ver la variación que se produce en la intensidad óptica y en el máximo de absorción de una mezcla de amilopectina y glucógeno, se prepararon mezclas de ambos componentes. En la Fig. 10 se ven los espectros correspondientes a cada una de las mezclas. Se observa que la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción para cada una de las mezclas varía desde 520 $m\mu$ (λ máx. para amilopectina pura) hasta 460 m (λ máx. para glucógeno puro).

En base a estos datos, si se calculan los coeficientes de extinción de amilopectina y glucógeno puros a 520 y 460 $m\mu$ respectivamente, se puede obtener una fórmula general para el cálculo de las cantidades de amilopectina y glucógeno presentes en una mezcla, mediante un sistema de dos ecuaciones.

$$\text{Amilopectina} \left\{ \begin{array}{l} \lambda: 520 \text{ m}\mu \dots \text{D.O.} : 1.157; \quad E_{A.520}^{1\%} : 23.14 \\ \lambda: 460 \text{ m}\mu \dots \text{D.O.} : 0.980; \quad E_{A.460}^{1\%} : 19.6 \end{array} \right.$$

$$\text{Glucógeno} \left\{ \begin{array}{l} \lambda: 520 \text{ m}\mu \dots \text{D.O.} : 0.715; \quad E_{0.520}^{1\%} : 14.3 \\ \lambda: 460 \text{ m}\mu \dots \text{D.O.} : 0.920; \quad E_{0.460}^{1\%} : 18.4 \end{array} \right.$$

$$\text{Lectura a } 460 \text{ m}\mu: L_{460} = G.E. \frac{1\%}{G.460} + A.E. \frac{1\%}{A.460} \quad (1)$$

$$\text{Lectura a } 520 \text{ m}\mu: L_{520} = A.E. \frac{1\%}{A.520} + G.E. \frac{1\%}{G.520} \quad (2)$$

λ : longitud de onda;
D.O.: densidad óptica.

$\frac{1\%}{G.460}$ y $\frac{1\%}{G.520}$ coeficiente de extinción a 460 ó 520 m μ respectivamente.

A: cantidad de amilopectina en g/ml

G: cantidad de glucógeno en g/ml

L_{520} y L_{460} : lectura ó absorción medida a 520 ó 460 m μ respectivamente.

De las ecuaciones (1) y (2) se puede despejar:

$$\text{Amilopectina: } A : \frac{18.4 \times L_{520} - 14.3 \times L_{460}}{145.6} \times 1/100 \text{ g/ml}$$

$$\text{Glucógeno: } G : \frac{L_{460} - 19.6 \times A}{18.4} \times 1/100 \text{ g/ml}$$

Se probó este método con dextrano, inulina y manano. Ninguno de ellos forma complejos coloreados.

P A R T E I I

E N Z I M A

R A M I F I C A N T E

La formación de las uniones $\alpha 1 \rightarrow 6$, puntos de ramificación en la molécula de glucógeno, se lleva a cabo por una enzima que transfiere varios residuos glucosílicos, preexistentes en la molécula, de una a otra rama.

La Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica asignó a esta enzima el nombre de $\alpha 1 \rightarrow 4$ - glucano 6 - glucosiltransferasa (E.C.2.4.1.18). También figura en la bibliografía como amilo-1,4 \rightarrow 1,6 transglucosidasa. Por razones de concisión, en este trabajo la llamaremos Enzima Ramificante.

Las enzimas ramificantes están muy distribuidas en la naturaleza. Han sido estudiadas en vegetales (en cuyo caso se les dió el nombre de "enzima Q") (68-72), levadura (73), "Polytomella coeca" (74), "Neisseria perflava" (75) y en tejidos animales (20).

Cori y col. (76) observaron que la fosforilasa obtenida a partir de hígado o corazón, a diferencia de la de músculo esquelético, producía un polisacárido que se coloreaba de marrón con el yodo. Estos resultados fueron interpretados como evidencia de contaminación de la fosforilasa por una enzima ramificante.

Se ha descrito (20) la purificación parcial de la amilo 1,4 \rightarrow 1,6 transglucosidasa, obtenida a partir de hígado y músculo de rata; pero no se ha logrado separarla completamente de la α -amilasa, principal contaminante.

Lerner (20) demostró que esta enzima es la responsable de la aparición de los puntos de ramificación. Para ello, incubó una dextrina ψ -límite de glucógeno con C^{14} G-1-P y fosforilasa. El polisacárido resultante marcado con Glucosa- C^{14} en las ramas externas, fué utilizado como sustrato de una enzima cruda de hígado o de músculo, y encontró que algunos de los residuos glucosílicos originalmente

unidos en $\alpha 1 \rightarrow 4$ aparecían unidos en $\alpha 1 \rightarrow 6$. Este reordenamiento se efectuaba en ausencia de fósforo inorgánico o de glucosa libre. Basándose en estas observaciones, Lerner postuló por primera vez el mecanismo de acción de la enzima ramificante, la cual formaría nuevas ramas exteriores, transfiriendo un segmento de cadena maltosídica, al carbono 6 de un residuo de glucosa aceptor.

En los estudios realizados hasta el presente se trabajó con extractos poco purificados en los cuales hay α -amilasa, que también utiliza como sustrato las ramas externas del glucógeno o amilopeptina. Por lo tanto, la disminución de absorción debida al acortamiento de las cadenas se debe a la acción simultánea de ambas enzimas.

Con el objeto de estudiar la enzima ramificante se buscó un método de determinación específico que permitiera medir su actividad en extractos crudos, en presencia de α -amilasa.

D E T E R M I N A C I O N

D E L A A C T I V I D A D R A M I F I C A N T E

La actividad enzimática se determina por el método de coloración con yodo, midiendo la disminución de la absorción a 520 $m\mu$ después de incubar con amilopeptina como sustrato.

Salvo indicación especial, la mezcla de reacción contiene 0.2 mg de amilopeptina y enzima en buffer citrato 0.3 M pH 6.4 (volumen final 0.1 ml).

El tiempo de incubación es de 30 minutos y la temperatura 37° C.

Una vez inactivada la enzima, la mezcla de reacción se diluye con agua hasta

0.4 ml, se agrega 2.6 ml del reactivo de iodo y se mide la absorción a 520 $m\mu$ contra un blanco de agua y reactivo de iodo.

En el caso de utilizar enzima purificada, se agrega 0.02 mg de proteína y la reacción se interrumpe calentando 2 minutos a 100° C. Con preparaciones crudas la cantidad de enzima agregada es 0.01 ml y la reacción se detiene agregando 0.9 ml de HCl 33 %; luego se sigue el procedimiento descrito en la Parte I correspondiente a glucógeno de tejidos.

DETERMINACION
DE LA ACTIVIDAD α -AMILASICA

La actividad α -amilásica se determina midiendo la disminución de la absorbancia a 460 $m\mu$ cuando utiliza glucógeno como sustrato. La mezcla de reacción y el procedimiento utilizado, son los mismos que para la enzima ramificante, pero empleando 0.2 mg de glucógeno en lugar de amilopectina.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
RAMIFICANTE EN PRESENCIA DE α -AMILASA

Se puede calcular la interferencia de la α -amilasa en la determinación de la enzima ramificante realizando por separado medidas con glucógeno y amilopectina como sustratos.

Se ha encontrado que la enzima ramificante no actúa sobre el glucógeno de hígado de conejo (determinado por el método de coloración con el iodo), comportamiento similar al de la enzima ramificante de levadura estudiada por Gunja y col. (73).

Puede observarse en la Tabla IV que la disminución de la absorción a 520 m μ obtenida al incubar α -amilasa de saliva o de "glucógeno particulado" con amilopectina bajo las condiciones previamente descritas, es aproximadamente igual a la disminución que se obtiene a 460 m μ cuando se incuba con glucógeno. Por lo tanto, este último sustrato es empleado para medir la actividad α -amilásica. Si se utiliza amilopectina como sustrato, la acción simultánea de las dos enzimas produce un efecto aditivo. Por lo tanto, se puede expresar la actividad de la enzima ramificante, en extractos crudos, como la diferencia entre la disminución de absorción a 520 m μ con sustrato de amilopectina y la disminución a 460 m μ usando glucógeno como sustrato.

$$\Delta \text{ actividad ramificante} = \Delta \text{ absorción} \quad - \quad \Delta \text{ absorción} \\ \begin{array}{c} \text{a } 520 \text{ m}\mu \\ \text{(sustrato)} \\ \text{(amilopectina)} \end{array} \quad \quad \quad \begin{array}{c} \text{a } 460 \text{ m}\mu \\ \text{(sustrato)} \\ \text{(glucógeno)} \end{array}$$

Se aplicó este método para expresar la purificación de la enzima ramificante a partir del extracto crudo.

Tabla IV - Determinación de la actividad ramificante en presencia de α -amilasa

Para la mezcla de reacción y determinación de la actividad, se procede según lo descrito anteriormente. En los experimentos 1 y 2 se utiliza α -amilasa de saliva y de glucógeno particulado respectivamente. En el 2° experimento se usó como control un tubo calentado 10 minutos a 100° C para inactivar la enzima. En ambos experimentos se utiliza enzima ramificante de la última etapa de purificación. La actividad se expresa como disminución de densidad óptica a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del sustrato utilizado.

Experimento	Enzima	Sustrato	
		Amilopectina - $\Delta 520 \text{ m}\mu$	Glucógeno - $\Delta 460 \text{ m}\mu$
1	Ramificante	0.160	0
	Aamilasa de saliva	0.425	0.435
	Ramificante + Amilasa de saliva	0.628	0.450
2	Ramificante	0.105	0
	Aamilasa de hígado	0.090	0.110
	Ramificante + Amilasa de hígado	0.210	0.090

PURIFICACION
DE LA ENZIMA RAMIFICANTE

Todas las operaciones se llevan a cabo a una temperatura de 0 - 2° C.

Preparación de los extractos de tejidos

Las ratas se alimentan con solución concentrada de sacarosa "ad libitum" durante 5 ó 6 horas, o bien por sonda, en dosis de 2 a 3 ml cada hora, proceso que se repite 4 veces; luego de la última sonda se deja al animal en reposo durante 3 horas y se lo sacrifica dándole un golpe en el cuello. El hígado se extrae inmediatamente y se corta en pequeños trozos que se lavan dos veces con solución fría de sacarosa 0.25 M que contiene versene 10^{-3} M, para eliminar la sangre.

Los trozos se desintegran en un homogenizador de vidrio del tipo Potter, con tres volúmenes de sacarosa 0.25 M-versene 10^{-3} M.

Por centrifugación a 5.000 x g durante 15 minutos, se eliminan células enteras, restos celulares y núcleos. El sobrenadante (Extracto crudo) se centrifuga a 25.000 x g durante 15 minutos, descartándose el sedimento. El nuevo sobrenadante se centrifuga en la ultracentrífuga preparativa Spinco, modelo L, a 105.000 x g durante 45 minutos. El sobrenadante lípido de esta última centrifugación se aspira cuidadosamente con una pipeta evitando el arrastre de películas de grasa que flotan en la superficie. La mayor parte de la actividad ramificante se recupera en esta fracción lípida, de color amarillento, mientras que la amilasa queda retenida en la pastilla de glucógeno particulado.

Tratamiento con gel de fosfato de calcio

Se centrifugan 4 ml de una suspensión de gel de fosfato de calcio (20 mg/ml) y se descarta el sobrenadante. El precipitado del gel, se resuspende en 8 ml del sobrenadante de 105.000 x g. Esta suspensión se deja durante 15 minutos a 0° C con agitación ocasional y se elimina el precipitado por centrifugación a 25.000 x g. Esta operación se repite una vez con el sobrenadante.

Precipitación con sulfato de amonio

El noveno sobrenadante que proviene de la 2ª adsorción con gel se precipita con igual volumen de solución de sulfato de amonio saturada a 4° C pH 6.8. Se deja en reposo 15 minutos a 0° C agitando ocasionalmente y luego se centrifuga durante 15 minutos a 25.000 x g. El precipitado de proteínas se resuspende en buffer (1/8 del volumen original de extracto crudo) y se dializa con agitación contra 1 litro de solución de glutatión 10^{-4} M, durante 2 horas, cambiando el líquido externo después de 1 hora.

Se encontró que el glutatión impide la inactivación de la enzima durante la dialisis. El dializado resultante contiene aproximadamente 16 mg de proteína/ml. Como se puede ver en la Tabla V, la actividad específica aumenta 35 veces después de estas etapas de purificación.

Tabla V - Purificación de la enzima

Se prepararon las diferentes fracciones y ensayaron sus actividades de acuerdo a lo descrito anteriormente.

La actividad ramificante se expresa como la diferencia entre la disminución de la absorción a 520 m μ y la disminución a 460 m μ .

Fracción	Volumen	Activi- dad ramifi- cante	Proteína total	Actividad Especí- fica	Factor de purifi- cación	Recu- pera- ción
	(ml)		(mg)	$\frac{\text{Absorción}}{\text{mg proteína}}$		%
Extracto crudo	10.4	291	1185.6	0.24	1	100
Sobrenad. 25.000 x g	9.2	276	676.2	0.41	1.7	95
Sobrenad. 105.000 x g	8.0	216	294.4	0.73	3.05	74
2 ^o Sobrenad. luego de adsorción en gel de fosfato de calcio	8.0	114	85.6	1.7	7.1	49.5
Sulfato de amonio y diálisis	8.0	136	16	8.5	35.5	47

PROPIEDADES DE LA ENZIMA

Quando se incuba la enzima ramificante purificada, con amilopectina o amilosa durante 18 horas a 37° C bajo vapores de tolueno, no se liberan azúcares reductores; por lo tanto, se puede considerar que la preparación está libre de α -amilasa. Incubando en las mismas condiciones con un gran exceso de dextrina β -límite de amilopectina, tampoco se liberan azúcares reductores. Esto indica que la enzima purificada no tiene actividad detectable de amilo 1 \rightarrow 6 glucosidasa (25).

Incubando esta enzima con dextrano no se observó cambio en el poder reductor ni en el color con el yodo. Por lo tanto, estas preparaciones están libres de la dextrano 1 → 6 glucosidasa descrita por Rosenfeld & col. (78) en tejidos animales.

La enzima purificada es muy estable y se puede guardar sin pérdida de actividad durante dos meses a -15°C , ya sea como solución concentrada o como precipitado de sulfato de amonio.

C I N E T I C A

Como se ve en la Fig. 11, la actividad es proporcional a la concentración de enzima dentro de ciertos límites. Los ensayos de actividad enzimática se llevan a cabo siempre dentro de estos límites de concentración.

En la Fig. 12 se ve la variación de la actividad enzimática con la concentración de sustrato. La curva de la Fig. 13 muestra la variación de la actividad enzimática en función del tiempo.

p H O P T I M O

Como se puede ver en la Fig. 14, en presencia de buffer citrato el pH correspondiente al máximo de actividad es 6.4. Se obtiene mayor actividad con éste buffer que con Tris-citrato de la misma molaridad.

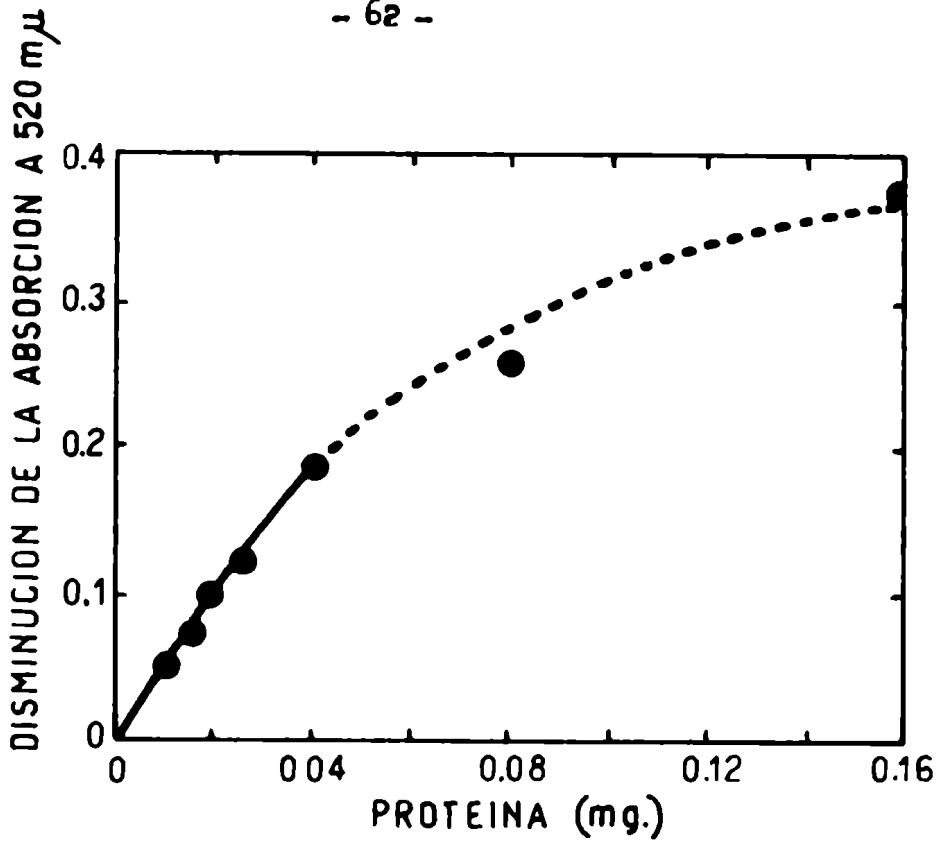


FIG. 11. Relación entre actividad y concentración de enzima.- Las condiciones son las descritas anteriormente.

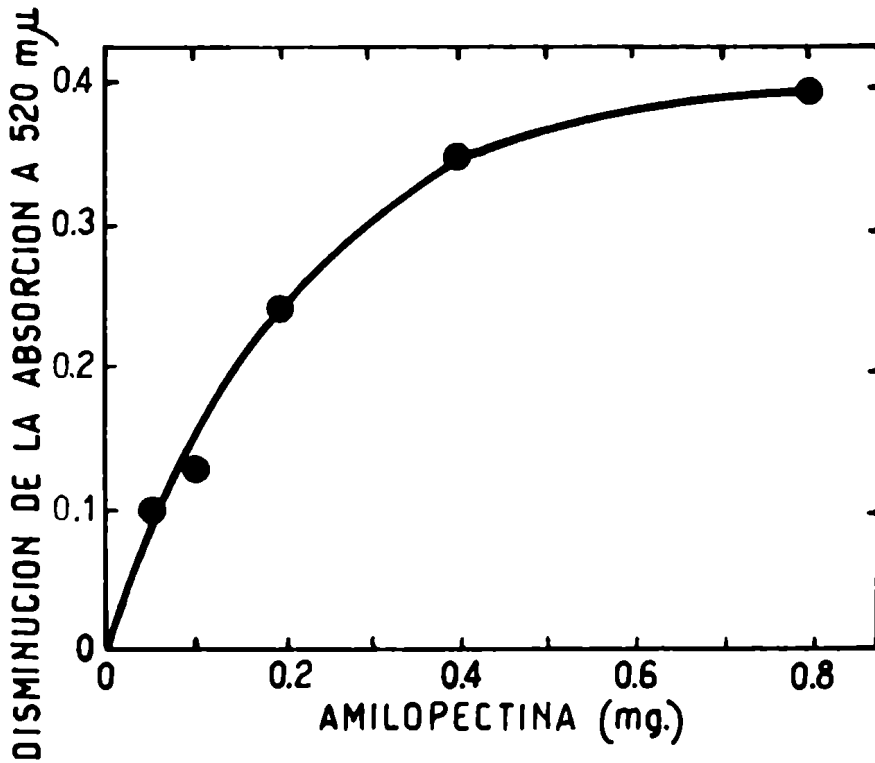


FIG. 12. Efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de reacción.- Las condiciones son las de un ensayo estándar.

S A L E S

La enzima ramificante de hígado, igual que la enzima Q de papa, requiere ciertas sales para desarrollar al máximo su actividad.

Entre las sales ensayadas (ver Tabla VI) el citrato de sodio 0.3 M produce el efecto mayor. El Mn^{++} , Mg^{++} , molibdato de amonio y p-cloromercuribenzoato de sodio, son inhibidores.

Tabla VI - Efecto de sales en la actividad ramificante

Las incubaciones se llevan a cabo en las condiciones descritas, excepto que la concentración de buffer es 0.01 M para el experimento 1, y 0.3 M para el experimento 2. Se hizo el blanco correspondiente para cada sal.

Experimento	Sal	Concentración (M)	Actividad ^(x) Relativa.
1	Ninguna	-	1
	Borato de sodio	0.2	1.73
	Acetato de amonio	0.2	1.6
	Citrato de sodio	0.3	2.06
	Citrato de sodio	0.1	1.54
	Molibdato de amonio	0.046	0.24
	Acetato de magnesio	0.6	0.4
	Cloruro de magnesio	0.2	0
	p-cloromercuribenzoato	0.0001	0
2	Ninguna	-	1
	EDTA	0.01	1
	$MgCl_2$	0.01	0.33

(x) Se toma como 1 la actividad en ausencia de sales.

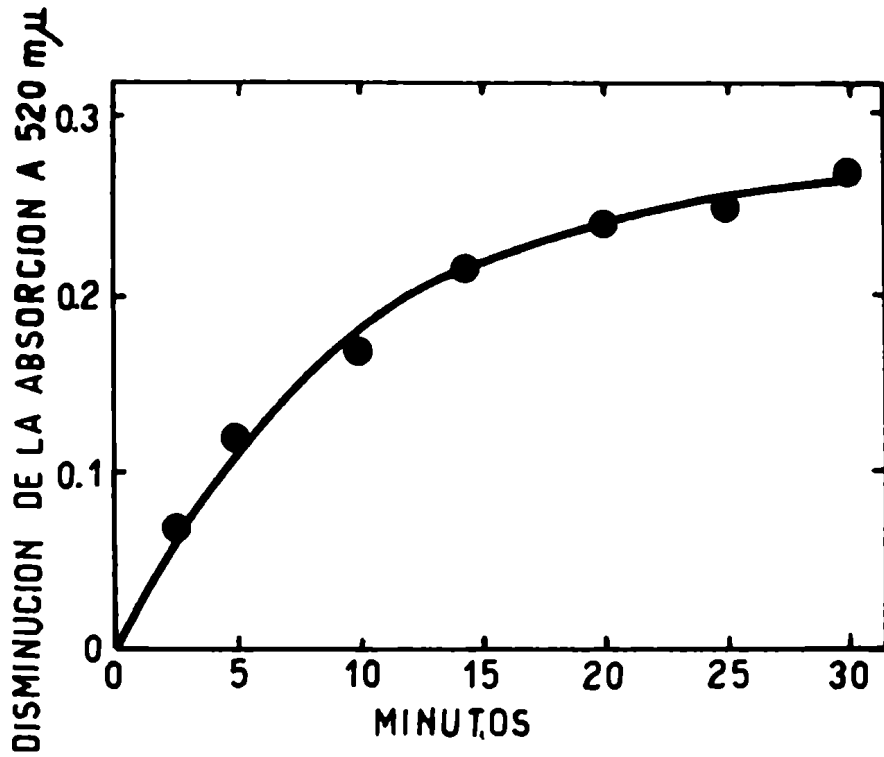


FIG. 13. Actividad enzimática en función del tiempo.- La mezcla de incubación contiene por ml: 3,2 mg de amilopectina en buffer citrato 0,3 M; enzima, cantidad correspondiente a 4 mg de proteína. Se incuba a 37° C. A cada uno de los tiempos indicados, se sacan alícuotas de 50 μl y se inactivan agregándolas a una mezcla de 0,35 ml de agua y 2,6 ml de reactivo de iodo.

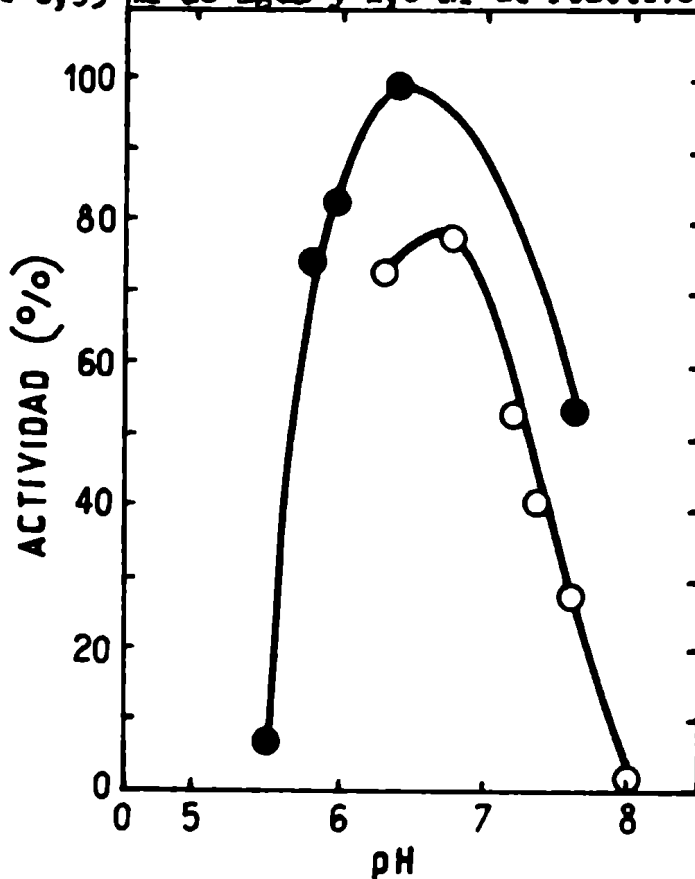


FIG. 14. pH óptimo en: ●, buffer citrato 0,3 M y 0,02 mg de enzima;
○, buffer Tris-citrato 0,3 M y 0,08 mg de enzima.
Las demás condiciones según lo descrito anteriormente.

E F E C T O D E P O S I B L E S A C T I V A D O R E S

Barber y col. (74) informaron que la transglucosilación catalizada por la enzima ramificante de "Polytomella coeca" se acelera por el agregado de di, tri, y oligosacáridos. Con el objeto de ver si la enzima ramificante de hígado puede ser activada por oligosacáridos, se ensayaron las siguientes sustancias ; maltosa, maltotriosa, hidrolizados parciales de amilopectina, de glucógeno y de amilosa. En ningún caso pudo observarse activación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Larner y Uwah (77) quienes ensayaron maltosa, isomaltosa y panosa.

F O R M A C I O N D E U N P O L I S A C A R I D O S E M E J A N T E A L G L U C O G E N O

Acción sobre amilopectina

Al incubar amilopectina con enzima ramificante de hígado, se obtiene un polisacárido semejante al glucógeno. Este polisacárido tiene, en presencia del reactivo de iodo, un espectro de absorción que coincide con el del glucógeno con un λ máx. a 460 m μ (Fig. 15). Los datos de la Tabla VII muestran que ha aumentado el número de ramas, medidas por el método del periodato y por incubación con β -amilasa. Los valores son similares a los que figuran en la literatura (15) para distintos glucógenos, que tienen una longitud promedio de 9 a 18 unidades glucosas y el límite de β -amilolisis entre 39 - 45 %, pero no coinciden exactamente con los obtenidos utilizando glucógeno comercial como control .

Tabla VII - Efecto de la enzima ramificante sobre la amilopectina

Datos de β -amilólisis, longitud promedio de cadena y grupos terminales no reductores

Mezcla de reacción: 60 mg de amilopectina, cantidad de enzima ramificante correspondiente a 6.4 mg de proteína, buffer citrato 0.3 M pH 6.4.

Volumen total : 7.0 ml.

Control, igual que el anterior, pero agregando enzima al final de la incubación. Después de incubar una noche a 37° C bajo vapores de tolueno se agregan 2 volúmenes de metanol.

El precipitado que se obtiene centrifugando a 2.000 rpm se lava dos veces con una mezcla de metanol:agua (3:1), se redissuelve en un pequeño volumen de agua y se dializa para eliminar las sales. Se toman alícuotas para cada experimento.

Poliacárido	β -amilólisis (%)	Longitud promedio de cadena ($\bar{O}L$)	Grupos no reductores (%)
Amilopectina	53	23	4.4
Amilopectina + Enzima ramificante	50	18	5.6
Glucógeno	45	15	6.7

Acción sobre la dextrina β -límite de amilopectina

El resultado del experimento efectuado con dextrina β -límite de amilopectina se describe en la Tabla VIII. La enzima ramificante produce un desplazamiento de 520 a 460 m μ en el $\lambda_{m\acute{a}x.}$, una disminución en la longitud promedio de cadena y formación de nuevas ramas, lo que se demuestra por la acción de la β -amilasa que libera maltosa.

Tabla VIII - Acción de la enzima ramificante sobre la dextrina β -límite de amilopectina

Sistema completo : igual que para la Tabla VII

Substrato	Longitud promedio de cadena. (CL)	Absorción a 520 m μ	λ máx. (m μ)	β -amilolisis (%)
Dextrina β - límite de amilopectina	16.4	0.760	520	-
Dextrina β - límite de amilopectina + enzima ramificante	11.7	0.590	460	8

Acción sobre otros polisacáridos

En la primera parte de este trabajo se demostró que en presencia del reactivo de todo la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción es 460 m μ para el glucógeno, 520 m μ para amilopectina y varía entre 460 y 520 m μ para mezclas de ambos.

Las curvas de la figura 16 muestran un desplazamiento en el λ máx. después de incubar la enzima ramificante de hígado con almidón de trigo, almidón de maíz waxy y amilosa.

Se deduce que estos polisacáridos le sirven de sustrato.

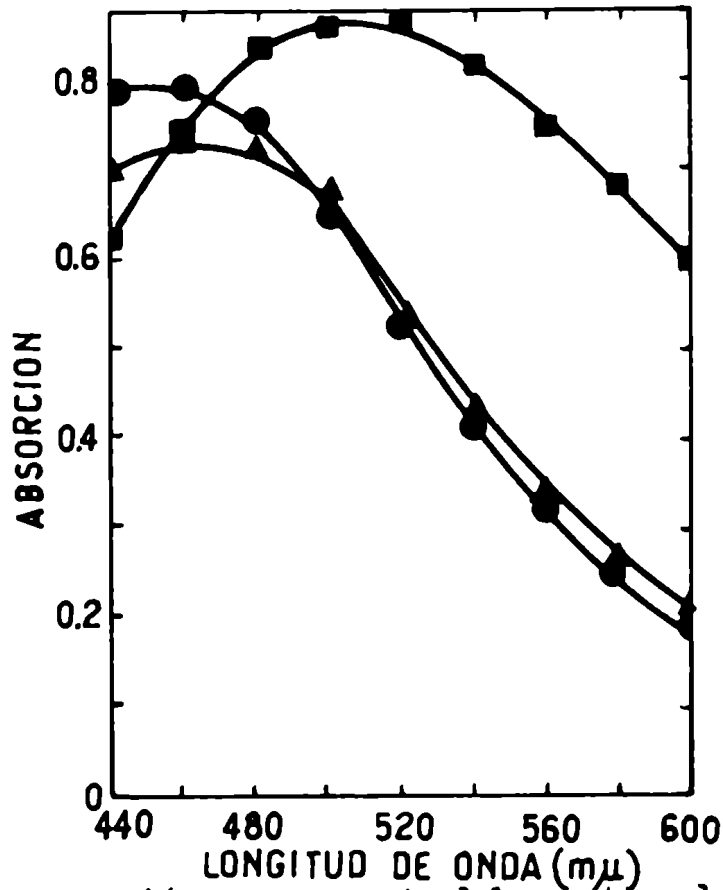


FIG. 15. Espectro de absorción en presencia del reactivo de yodo del polisacárido que se obtiene por acción de la enzima ramificante sobre amilopectina.- Se emplean las condiciones descritas en la Tabla VII.

■, Amilopectina; ●, Amilopectina después de la incubación con enzima ramificante; ▲, Glucógeno.

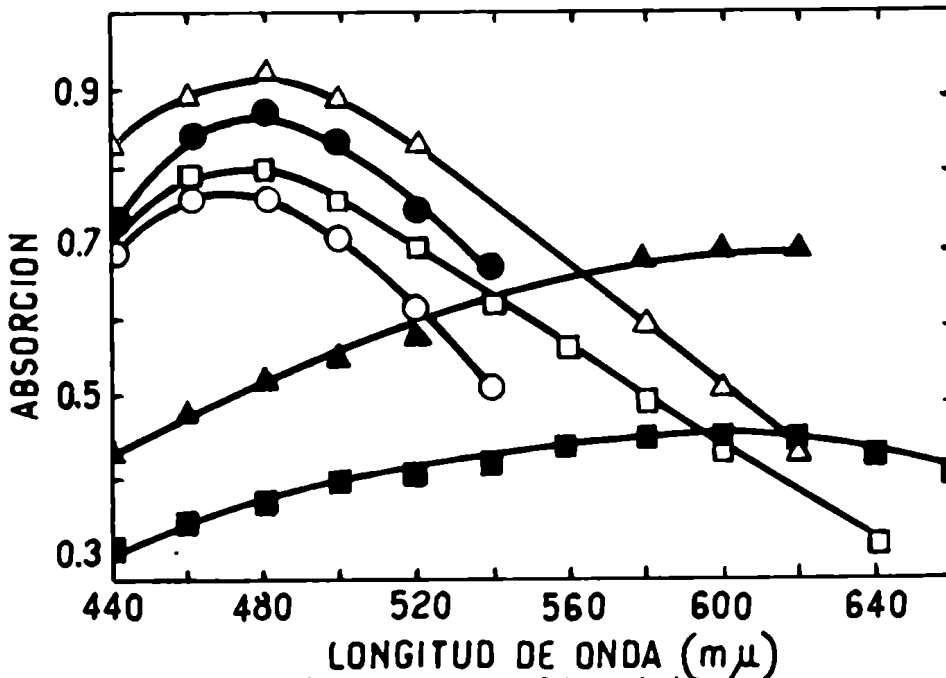


FIG. 16. Espectros de absorción de los polisacáridos en presencia del reactivo del yodo, antes (símbolos llenos) y después (símbolos vacíos) de incubarse con enzima ramificante de hígado. Las condiciones son las ya descritas.

Δ, ▲ : Amilosa; ○, ● : polisacárido del maíz waxy; □, ■ : almidón de trigo.

CONCLUSIONES

El método de coloración con iodo, descrito en la primera parte de este trabajo, es rápido y simple. El color es estable y no varía apreciablemente con la temperatura.

Si se reduce a la cuarta parte los volúmenes de todos los reactivos se pueden medir cantidades tan pequeñas como 0.02 mg de glucógeno.

Los polisacáridos que por hidrólisis liberan azúcares reductores pero que no forman complejo con el iodo, no interfieren.

No existe una correlación estricta entre los resultados obtenidos con el procedimiento descrito y con los métodos clásicos, puesto que estos últimos miden residuos hexosas, mientras que el color desarrollado con el reactivo de iodo depende de la longitud de la cadena (79 - 81). Por lo tanto, este método es más específico para el glucógeno.

Las cadenas exteriores del glucógeno desempeñan un papel muy importante en la reacción colorimétrica. Así, por ejemplo, cuando se hace actuar la fosforilasa que deja solamente 4 residuos glucosiles en las ramas exteriores, la absorción se reduce en un 25 %, mientras que con el polisacárido que resulta de la acción de la β -amilasa, que deja 2 a 3 residuos glucosiles, la absorción disminuye en un 43 %.

Se definió un valor \bar{R} que expresa la relación entre los mg de glucógeno obtenidos por el método del iodo y por el del fenol sulfúrico. Este valor es 1 para el glucógeno utilizado como standard y es útil para diferenciar un glucógeno normal de un degradado, en cuyo caso el valor de \bar{R} es bajo.

Los experimentos realizados con mezclas de glucógeno y amilopectina demuestran que la longitud de onda del máximo de absorción ($\lambda_{\text{máx.}}$) está comprendida entre los valores correspondientes al glucógeno (460 $m\mu$) y a la amilopectina (520 $m\mu$) puros. Se deduce que el $\lambda_{\text{máx.}}$ está relacionado con el grado de ramificación del polisacárido. Esto concuerda con los datos recientemente publicados por Archibald y col. (82).

El método propuesto no permite obtener información cuantitativa sobre las variaciones en proporción y distribución de las uniones $\alpha 1 \rightarrow 6$ en el sustrato. Sin embargo, determinando el $\lambda_{\text{máx.}}$ del complejo polisacárido-iodo se puede diferenciar un polisacárido del tipo de glucógeno de uno del tipo de amilopectina. Esto resultó muy útil para el estudio de la enzima ramificante.

Si se utiliza la amilopectina como sustrato de la enzima ramificante, el producto resultante es un polisacárido del tipo del glucógeno.

El hecho de que la enzima ramificante no tenga acción detectable (medida por el método del iodo) sobre el glucógeno de hígado de conejo y que por acción de la α -amilasa la disminución en la absorbancia a 520 $m\mu$ sea igual a la disminución que se observa a 460 $m\mu$ (cuando se utiliza como sustrato amilopectina o glucógeno respectivamente) permitió determinar la actividad ramificante en extractos crudos, haciendo incubaciones con ambos polisacáridos por separado.

Los experimentos descritos en la 2^a parte del trabajo demuestran que la enzima ramificante de hígado de rata, es soluble.

Se puede obtener completamente libre de su principal contaminante, la α -amilasa, cuando los extractos de hígado provienen de ratas alimentadas; en estas condiciones se forma "glucógeno particulado" que al ser separado por centrifugación a 105.000 x g arrastra la α -amilasa, dejando a la enzima ramificante en el sobrenado.

dante. Sin embargo, cuando el hígado es pobre en glucógeno, también la α -amilasa queda en el sobrenadante, en cuyo caso resulta más difícil separarla. El gel de almidón y almidón en polvo no sirven para adsorberla completamente. Ensayos efectuados con glucógeno particulado tratado con urea 8 M, demostraron ^(x) ser efectivos en la eliminación de esta enzima, cuando se encuentra en concentraciones bajas.

La enzima ramificante de hígado, igual que las enzimas Q de plantas, requiere el agregado de sales para desarrollar al máximo su actividad. Difiere de la Q de papa (83, 84) porque es inhibida por el molibdato de amonio pero no lo es por el borato de sodio. Igual que la de levadura (73), papa (77) y otras, no es activada por oligosacáridos como la de " *Polytomella coeca* " (74).

La enzima de hígado puede utilizar como sustratos la amilosa, la amilopectina y la dextrina β -límite de amilopectina. El hecho de que ésta última sirva como sustrato y que el polisacárido resultante pueda ser atacado in vivo por la β -amilasa, indica que la enzima ramificante también puede transferir trozos de cadenas ramificadas.

La enzima ramificante de hígado y la de levadura presentan una especificidad semejante por los sustratos (73) pero difieren de la enzima Q de algunas plantas en que solamente pueden transformar amilosa en amilopectina (85) sin llegar a formar glucógeno.

La enzima ramificante obtenida a partir del endosperma de choclo (maíz dulce) ^(x) que contiene glucógeno además de almidón, utiliza como sustratos tanto amilopectina como amilosa, siendo el producto final un polisacárido de espectro semejante al glucógeno.

(x) Observaciones personales de Clara R. Krizan.

Rosenbaum y Hassid (86) y Peat, Whelan y Bailey (83) estudiaron el mecanismo de formación de amilopectina por la acción de la enzima Q de papa utilizando como sustrato dextrinas lineales de longitud conocida. Llegaron a la conclusión de que requiere una cierta longitud mínima de cadena comprendida entre 42 y 116 unidades glucosa.

Larner (20) utilizando un glucógeno cuyas ramas externas estaban marcadas con glucosa radiactiva, demostró que la enzima ramificante de origen animal, requiere una longitud de cadena promedio de 6 a 11 unidades glucosas en las ramas exteriores para transglucosidar.

Estas observaciones y el hecho de que tanto la longitud de las cadenas interiores (5 a 8 unidades glucosílicas) como las exteriores (12 - 17 unidades) de la amilopectina sean mayores que las del glucógeno podría indicar, entre otras posibilidades que la diferencia entre las enzimas ramificantes de origen animal y vegetal reside en la especificidad respecto de la longitud de cadena.

Uno de los problemas que queda por resolver es la determinación de la longitud mínima del oligosacárido lineal que puede servir como sustrato de la enzima ramificante de origen animal.

Clara L. Kisman de Fischman

L. Kisman

RESUMEN

Se describe un método rápido, simple y específico para determinar colorimétricamente el glucógeno en concentraciones que varían entre 0.15 y 1 mg/ml con un reactivo de I2 en IK en presencia de sales.

Este procedimiento colorimétrico puede ser utilizado para la determinación del glucógeno contenido en los tejidos. Se puede diferenciar un polisacárido del tipo del glucógeno de uno del tipo de amilopectina, determinando el $\lambda_{\text{máx}}$ del complejo polisacárido - yodo.

Se utilizó este método para medir la actividad de la enzima ramificante.

La α -1,4-glucano : α -1,4-glucano 6-glucosiltransferasa ha sido purificada 35 veces respecto de los extractos de hígado de rata.

Se logra separar la α -amilasa, por centrifugación de los extractos de hígado con elevado contenido en glucógeno, a alta velocidad.

La acción enzimática sobre amilopectina es óptima en buffer citrato 0.3 M a pH 6.4. Requiere sales y es inhibida por Mn^{++} , Mg^{++} y p-cloromercuribenzoato de sodio. La enzima ramificante de hígado puede utilizar también como substratos amilosa y dextrina β -límite de amilopectina.

Se describe un método para ensayar la enzima en presencia de α -amilasa.

B I B L I O G R A F I A

1. Barker, S.A., Burns, E.J., Stacey, M., Whiffen, D.H., J.Chem.Soc., 171 (1954).
2. Wolfrom, M.L., Thompson, A., J.Am. Chem. Soc., 79, 4219 (1957).
3. Abdel-Azher, M., Smith, F., Arch. Biochem. Biophys., 78, 451 (1958).
4. Post, S., Whelan, W.J., Farvey, J.R., J. Chem. Soc., 2317 (1956).
5. Illingworth, B., Cori, G.T., J. Biol. Chem., 199, 653 (1952).
6. Illingworth, B., Am. J. Clin. Nutr., 9, 683 (1961).
7. Nordin, J.H., Hansen, R.G., J. Biol. Chem. 238, 489 (1963).
8. Post, S., Roberts, P.J., Whelan, W.J., Biochem. J. (London) 51, XVII (1952).
9. Harrup, B.S., Manners, D.J., Nature, 178, 419 (1952).
10. Rosenfeld, H.L., Plyshovskaya, H.G., Chem. Abstr., 48, 9425 i (1954).
11. Cifonilli, J.A., Montgomery, R., Smith, F., J. Am. Chem. Soc. 78, 2485 (1956).
12. Manners, D.J., Wright, A., J. Chem. Soc., 4592 (1962).
13. Larver, A., Anatom. Record, 84, 31 (1942).
14. Stetten, D.W., Stetten, M.R., Polysaccharides in Biology, (Editor G.F. Springer), The Josiah Macy, Jr., Foundation, New York, (1957).
15. Manners, D.J., Advances in Carbohydrate Chemistry, 12, 261 (1957).
16. Meyer, K.H., Fuld, H., Helv. Chim. Acta, 24, 375 (1941).
17. Manners, D.J., Advances in Carbohydrate Chem., 17, 371 (1962).
18. Leloir, L.F., Cardini, G.H., J. Am. Chem. Soc., 79, 6340 (1957).
19. Leloir, L.F., Goldberg, S.H., J. Biol. Chem., 235, 919 (1960).
20. Larver, J., J. Biol. Chem., 202, 491 (1953).

21. Luck David, J.L., *J. Bioph. Biochem.Cytol.*, 10, 195 (1961).
22. Farnes, J.K., Bazanowsky, T., *Compt. Rend. Soc. Biol.(Paris)* 120, 307 (1935).
23. Cori, G.F., Cori, G.T., *Proc. Soc. Expt. Biol. and Med.*, 34, 702 (1936).
24. Cori, G.T., Cori, G.F., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 36, 119 (1937).
25. Green, A.A., Cori, G.T., *J. Biol. Chem.*, 151, 21 (1943).
26. Walker, G.J., Whelan, W.J., *Bioch. J.*, 71, 20 P (1959).
27. Green, A.A., Cori, G.T., *J. Biol. Chem.*, 151, 31 (1943).
28. Krebs, E.G., Fischer, E.H., *Bioch. et Bioph. Acta*, 20, 150 (1956).
29. Hall, T.W., Sutherland, E.W., Weillait, W.D., *J. Biol. Chem.*, 218, 483 (1956).
30. Gewes, D.J., Fischer, E.H., Krebs, E.G., *J. Biol. Chem.*, 235, 805 (1960).
31. Keller, P.J., *J. Biol. Chem.*, 214, 135 (1955).
32. Weillait, W.D., Sutherland, E.W., *J. Biol. Chem.*, 218, 469 (1956).
33. Walker, G.J., Whelan, W.J., *Biochem. J.*, 76, 264 (1960).
34. Cori, G.T., Larner, J., *J. Biol. Chem.*, 188, 17 (1951).
35. Larner, J., Illingworth, B., Cori, G.T., Cori, G.F., *J. Biol. Chem.*, 191, 641 (1952).
36. Giri, K.V., Nagabhushanna, A., Nigam, V.N., Belavadi, B., *Science*, 121, 898 (1955).
37. Stetten, M.R., *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 1437 (1959).
38. Lukomlaya, I.S., *Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R.*, 129, 1172 (1959).
39. Whelan, W.J., *Nature*, 190, 954 (1961).
40. Brown, D.H., Illingworth, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 48, 1783 (1962).

41. Petrova, A.N., *Enzymologia*, 21, 23 (1959).
42. Abdullah, M., Whelan, W.J., *Nature*, 197, 979 (1963).
43. Brown, D.H., Illingworth, B., Cori, C.F., *Nature*, 197, 982 (1963).
44. Olavarría, J.M., Terres, H.N., *J. Biol. Chem.*, 237, 1746 (1962).
45. Rosenfeld, H.L., Popova, J.A., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 44, 129 (1962).
46. Terres, H.N., Olavarría, J.M., *Acta Phys. Lat.*, 11, 95 (1961).
47. Somogyi, M., *Methods in Enzymology*, (S.P. Colowick and N.O. Kaplan, eds.) Academic Press, New York, III, 3 (1957).
48. Cowie, J.M.G., Greenwood, C.T., *J. Chem. Soc.*, 2862 (1957).
49. Schoch, T.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 2954, 2957 (1942).
50. Schoch, T.J., *Methods in Enzymology*, (S.P. Colowick and N.O. Kaplan, eds.), Academic Press, New York, III, 5 (1957).
51. Hestrin, S., *J. Biol. Chem.*, 179, 943 (1949).
52. Ballou, G.A., Lusk, J.M., *J. Biol. Chem.*, 139, 253 (1941).
53. Cori, G.T., Illingworth, B., Keller, P., *Methods in Enzymology*, (S.P. Colowick and N.O. Kaplan, eds.), Academic Press, N.Y., I, 200 (1955).
54. Keilin, D., Hartree, E.F., *Proc. Roy. Soc. London B.*, 124, 399 (1937).
55. Kunitz, M., McDonald, M.R., *J. Gen. Physiol.*, 29, 393 (1945-6).
56. Park, J.T., Johnson, M.J., *J. Biol. Chem.*, 181, 249 (1949).
57. Fales, F.W., *Anal. Chem.*, 31, 1898 (1959).
58. Sifter, S., Dayton, S., Novic, B., Mantwyler, B., *Arch. Bioch.*, 25, 191 (1950).
59. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956).
60. Fales, F.W., *J. Biol. Chem.*, 191, 113 (1951).

61. Montgomery, R., *Arch. Bioch. Biophys.* 61, 378 (1957).
62. Good, C.A., Krumer, H., Somogyi, M., *J. Biol. Chem.*, 100, 485 (1933).
Van Wagtenloek, W.J., Simonsen, D.H., Hackett, P.L., *J. Biol. Chem.*,
163, 301 (1946).
63. Ingon Morris, D., *J. Biol. Chem.*, 166, 199 (1946).
64. Sumner, J.B., Somers, G.F., *Arch. Bioch.*, 4, 7 (1944).
65. Hassid, W.S., Abraham, S., *Methods in Enzymology*, (S.P. Colowick and
N.O. Kaplan, eds.), Academic Press, New York, III, 37 (1957).
66. Sidbury, J.B., Corbly, M., Fischer, J., House, E.,
Pediatrics, 27, 103 (1961).
67. Marcel Basile, *The Cell*, (I. Brachet y A.E. Mirsky), Academic Press,
New York, I, 173 (1961).
68. Barber, S.A., Burns, E.J., Wilkinson, I.A., Feat, S.,
J. Chem. Soc. 84 (1950).
69. Gilbert, G.A., Patrick, A.D., *Biochem. J.*, 51, 181 (1952).
70. Bam, H., Gilbert, G.A., *Nature*, 171, 983 (1953).
71. Hobson, P.W., Whelan, W.J., Feat, S., *J. Chem. Soc.*, 3566 (1950).
72. Ram, J.S., Giri, K.V., *Arch. Biochem. Biophys.*, 38, 231 (1952).
73. Gunja, S.H., Manners, D.J., Mung, K., *Biochem. J.*, 75, 441 (1960).
74. Barber, S.A., Bobbington, A., Burns, E.J., *J. Chem. Soc.*, 4051 (1953).
75. Hahre, J.E., Carlson, S.A., Hill, J.K., *Science*, 106, 523 (1947).
76. Cori, G.T., Cori, C.F., *J. Biol. Chem.*, 151, 57 (1943).
77. Lerner, J., Uvah, D.H., *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 3647 (1956).
78. Rosenfeld, H.L., Lukomskaya, I.S., *Clin. Chim. Acta.*, 2, 105 (1957).
79. Swanson, M., *J. Biol. Chem.*, 172, 825 (1948).

80. Thom, J.A., French, D., J. Am. Chem. Soc., 82, 4144 (1960).
81. Bailey, J.M., Whelan, W.J., J. Biol. Chem., 236, 969 (1961).
82. Archibald, A.R., Fleming, I.D., Liddle, A.M., Manners, D.J., Mercer, G.A., Wright, A., J. Chem. Soc., 1183 (1961).
83. Feat, S. Whelan, W.J., Bailey, J.M., J. Chem. Soc., 1422(1953).
84. Gilbert, G.A., Swallow, A.J., J. Chem. Soc., 2849 (1949).
85. Feat, S., Turvey, J.R., Jones, G., J. Chem. Soc., 1540 (1959).
86. Nussenbaum, S., Hassid, W.Z., J. Biol. Chem., 196, 785 (1952).