

Gray Peri

Universidad de Chile

Facultad de Química y Farmacia

Cátedra de Bioquímica General

DUPLICADO

ESTUDIOS SOBRE APIRASAS DE PAPA

Obtención de Apirasa "A" Parcialmente purificada

MEMORIA DE PRUEBA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO

YEDY ISRAEL JACARD

1962

Estimación de la actividad de la apirasa en las preparaciones de la enzima obtenidas por el método propuesto y por el método de la literatura. Se comparó la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método propuesto con la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método de la literatura. Se comparó la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método propuesto con la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método de la literatura. Se comparó la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método propuesto con la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método de la literatura.

S U M M A R Y

En la presente se describe un nuevo método de preparación de la enzima apirasa. Se comparó la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método propuesto con la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método de la literatura. Se comparó la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método propuesto con la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método de la literatura.

1.- The first stages of a new preparation method of potato apyrase are described.

2.- The enzyme obtained compares well with other preparations of apyrase described in the literature.

3.- A simple criterion for the evaluation of yield and purification is proposed.

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

A partir de los extractos de la patata se obtiene la enzima apirasa. Se comparó la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método propuesto con la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método de la literatura. Se comparó la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método propuesto con la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método de la literatura.

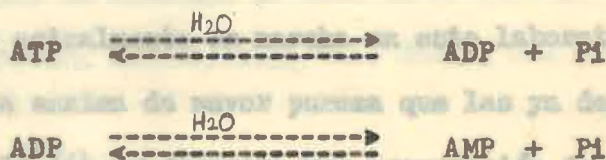
ABSTRACT

En la presente se describe un nuevo método de preparación de la enzima apirasa. Se comparó la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método propuesto con la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método de la literatura. Se comparó la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método propuesto con la actividad de la apirasa en las preparaciones obtenidas por el método de la literatura.

INTRODUCCION

Extractos de papa son capaces de hidrolizar el ATP y ADP hasta AMP y ortofosfato. Numerosos estudios han sido efectuados con el fin de caracterizar y purificar la o las enzimas responsables de tal actividad. (1) (2) (3) (4) (5) (6). Se ha convenido en denominar "apirasa" a este sistema con dos actividades enzimáticas para diferenciarlo de las ATPasas que no atacan el ADP. (1). La apirasa ha sido usada al igual que estas últimas, como reactivo analítico.

Se ha llegado a la conclusión de que la hidrólisis del ATP por la apirasa ocurre en dos etapas (2) (3),



Al estudiarse en este laboratorio la relación entre la velocidad de reacción y la concentración de la enzima, no fué posible obtener una función lineal, lo que está de acuerdo con los datos de Krishnan (4), cuyo método de preparación fué el que seguimos en primera instancia. Esto hizo pensar que podía tratarse de una mezcla de enzimas o que la preparación pudiera contener un inhibidor.

A partir de un extracto con actividad apirásica, es posible obtener dos tipos de apirasas con diferentes propiedades cinéticas. Molnar y Lorand (5) las denominan A y B y opinan que éstas corresponderían respectivamente a la apirasa soluble e insoluble descritas por Krishnan.

ABREVIATURAS:

ATP : adenosintrifosfato; ADP : adenosindifosfato; AMP : adenosinmonofosfato; P-P : pirofosfato; P_i : H_3PO_4 ; TRIS : tri (hidroximetil) aminometano; ATPasa : adenosintrifosfatasa.

PCA = Acido perclórico; Q.e. = actividad específica.

U = Unidades de actividad enzimática.

La apirasa A hidroliza el fosfato terminal del ATP a una velocidad mayor que la hidrólisis P. terminal del ADP. La apirasa B hidroliza ATP y ADP aproximadamente a la misma velocidad. Contaminaciones de apirasa B en la apirasa A harán bajar la relación entre las velocidades de hidrólisis de ATP y ADP (razón ATP/ADP).

El procedimiento que se describirá a continuación está encaminado a la obtención de la apirasa A, por lo que en las diversas etapas se ha buscado obtener paralelamente a una purificación un aumento en la razón ATP/ADP.

La apirasa de papa es activada por Ca^{++} , lo que introduce en el ensayo enzimático una nueva variable, la cual para ser controlada debe estudiarse más en detalle. Para efectuar este estudio y para otros estudios de cinética actualmente en marcha en este laboratorio, es necesario disponer de una enzima de mayor pureza que las ya descritas.

M. Szekely (6) ha descrito una preparación de apirasa mediante una adsorboprecipitación de la enzima en $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y elución posterior con CaCl_2 . Es posible que en este tratamiento, en el cual la enzima es sometida a grandes concentraciones de Ca^{++} , queden finalmente cantidades apreciables de este catión en la preparación. Se ha observado que no es fácil removerlo por diálisis sino que es necesario usar intercambiadores catiónicos para suprimirlo. (7). Esto dificulta el estudio posterior de la activación por este ión.

Molnar y Lorand (5) describen una preparación en la cual obtienen una apirasa de gran actividad, pero incluyen en la preparación la misma etapa de M. Szekely de adsorboprecipitación con fosfato de calcio, para continuar con una purificación en columnas cromatográficas de DEAE y Amberlita CG-50. Esta preparación presenta los mismos inconvenientes ya mencionados respecto a la activación por ión calcio, además de un rendimiento final muy bajo.

Se encuentran en la literatura, descripciones de preparaciones de apirasa con actividades específicas bastantes elevadas (2), pero el progreso de la metódica preparativa no se describe con suficiente detalle, además, en general, no se encuentran datos de la relación entre velocidad de hidrólisis de ATP y ADP en cada una de las etapas.

Debido a todas estas razones, se decidió elaborar desde la primera etapa ^{un nuevo método} de preparación de apirasa en el cual se obtuviera una buena purificación, un buen rendimiento, y el mínimo de contaminaciones con otras enzimas.

Es importante recalcar que un estudio completo sobre el mecanismo de acción de una enzima, requiere cantidades estequiométricas de ella, razón por la cual es necesario disponer de un método de preparación que permita obtener la enzima en cuestión no sólo en un alto grado de pureza, sino que también en cantidades apreciables, vale decir, del orden de los centenares de miligramos.

El objeto del presente trabajo es describir las primeras etapas de una nueva purificación de apirasa "A" de papa, las cuales están elaboradas con mira al objetivo anteriormente citado.

MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron papas de cáscara roja, adquiridas al azar en diversos establecimientos comerciales. Los métodos de preparación se describen en la sección "Resultados".

El ATP, ADP y AMP provienen de Sigma Chemical Co. El AMP se purificó en una columna de Dowex-1 formiato para obtenerlo libre de otros nucleótidos. (8). El resto de los reactivos son de grado analítico.

Medio de Ensayo. La incubación es efectuada a 30°C, en 1 ml de volumen reactivo que contiene la enzima a una concentración final tal que hidroliza entre 0,1 - 0,3 micromoles de ATP por minuto. Las enzimas de alta actividad específica se ensayan diluidas en seroalbúmina de concentración 0,1 mg/ml. Los sustratos se encuentran en concentración final de 0,002M;

Ca 0,005M y Buffer succinato pH6.0 0,10M. La reacción se detiene al agregar 3 ml de ácido tricloroacético frío al 4 %. Posteriormente se determina Pi en el volumen total por el método de Fiske y Subbarow (9).

A menos que se indique expresamente un nucleótido usado como sustrato es el ATP.

Determinación de proteínas. Las proteínas fueron determinadas por el método de Biuret (10) o por determinación espectrofotométrica a 280 y 260 mμ.

Actividad Pirofosfatasa. Fue determinada en ausencia de ión Ca en el medio de reacción, para evitar la precipitación del pirofosfato de calcio. Las otras condiciones son iguales a las descritas para los nucleótidos (12).

Unidad de Enzima y Actividad Específica. La unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de ésta que produce la liberación de 1 micromol de Pi en un minuto en el medio de incubación a 30°. La actividad específica (a.e.) está expresada en unidades de enzima/mg de proteínas.

A menos que se indique expresamente, las diversas manipulaciones se efectuaron entre 0-2°C.

RESULTADOS

ETAPA 1: EXTRACTO

A.- Preparación del Extracto

La etapa de extracción se estudió usando diversas soluciones acuosas. Una cantidad de papas se homogeniza en una juguera durante 1 minuto. La pasta resultante es después extraída durante 5 min., con agitación lenta, con 1 volumen de las soluciones que se indican en la Tabla N°1. Después de este tiempo, el líquido resultante es filtrado por compresión en tela. El filtrado se clarifica por centrifugación a 13.000 g por 20 min. A 0° y se ensaya.

TABLA N° 1

	Unidades extraídas por 100 g de papas	Actividad especif. (a.e.)	Relac. ATP/ADP
SUSTRATO:		SUSTRATO	
	ATP	ADP	ADP
Agua dest.	1330	1260	1,95
KCl 0,15M	1310	1240	1,56
NaCl 0,15M	1222	1195	1,31
Na ₂ B ₄ O ₇ 0,05M	1220	1075	1,23
KOH 0,01M	725	565	1,25
H ₂ SO ₄ 0,01M	1240	1165	0,92
KCN 0,01 pH7	1240	1300	1,51

Como pueda observarse en la Tabla N°1, el agua constituye el medio de extracción que nos da la mayor cantidad de unidades totales y la mejor actividad específica. El inconveniente de la extracción con agua es la intensa coloración que toma el extracto a las pocas horas de preparado. Esto se debe a la gran cantidad de fenoloxidasas que contiene (13). Hemos encontrado que esto puede ser obviado guardando el extracto en atmósfera de nitrógeno. Con este procedimiento es posible mantener el extracto por 24 horas sin que la débil coloración que adquiere interfiera en la purificación o en la determinación de proteínas.

B.- Calentamiento del Extracto Acuoso

Se efectuaron varios intentos de purificación del extracto por medio de calor a diferentes pH. Se obtuvieron muy bajas purificaciones y rendimientos.

ETAPA 2: TRATAMIENTO CON ACIDO PERCLORICO

Después de varios intentos de purificación del extracto por ajuste del pH entre 3,5 y 5,5, en los cuales la actividad apirásica se reparte en sobrenadantes y precipitados, se llegó a un método de purificación con ácido perclórico. (PCA) El ácido perclórico, que por lo general es un enérgico desnaturalizante de proteínas, precipita la apirasa en forma cuantitativa, sin desnaturalizarla. El precipitado es después redisoluto, con lo que se vuelve a obtener aproximadamente el 100% de las unidades apirásicas existentes en el extracto.

En el sobrenadante quedan proteínas que no precipitan con PCA pero que precipitan con ácido fosfotúngstico y dan reacción de proteínas por el método de Biuret. Es muy posible que estas se traten, en su mayor parte, de micoproteínas (14).

La ventaja de este método es la obtención de una enzima que tiene aproximadamente el doble de la actividad que la del extracto, y que está, en gran parte, libre de actividades esterásicas y pirofosfatásica. Por otra parte, la apirasa queda en un medio de proteínas alteradas por el PCA que se han disuelto en un medio alcalino. Estas proteínas son fácilmente descartadas en las siguientes etapas de purificación.

A.- Metódica de la Precipitación con PCA.

El extracto acuoso es preparado según el procedimiento ya descrito. Este extracto se precipita con ácido perclórico 1M a 0° con agitación rápida. La adición del ácido se hace en un tiempo máximo de 10 minutos y terminada la adición se agita por 1 minuto más. El precipitado obtenido se centrifuga a 13000 g por 5 min. a 0°C. El sobrenadante no contiene apirasa y es descartado. El precipitado se redissuelve rápidamente, y el tiempo desde que se comienza la adición de PCA hasta la redisolución del precipitado no debe exceder los 40 minutos. Pasado este tiempo hemos constatado una gran pérdida de enzima.

Las condiciones óptimas, referentes a concentración final de ácido perclórico en la precipitación, pH de redisolución del precipitado y el volumen de redisolución de este, se analizan a continuación.

B.- Concentración final óptima de PCA en la precipitación.

El extracto es precipitado a diferentes concentraciones de ácido perclórico. El precipitado es redissuelto en un volumen de agua igual al del extracto. El PCA residual se neutraliza con TRIS(base) 1M. El pH final es de 7.5. Los resultados se describen en la Tabla N°2.

TABLA N°2 (2)

	Conc.Final PCA (M)	% U.Totales redisueltas en Tris pH 7,5	Activ. Espec.	Purif. repect. a.e. ATP	<u>ATP</u> <u>ADP</u>
Extracto	0	100	1,2	-	2,0
	0,05	97	2,4	2	2,0
	0,10	95	2,4	2	3,0
	0,20	65	1,2	no hay	2,7

(2): Los valores anotados corresponden a un promedio de tres experimentos.

Aunque la concentración final 0,05M PCA podría parecer la óptima, por obtenerse al máximo de rendimiento, se ha elegido la concentración 0,20M pues la enzima resultante a esa concentración está menos contaminada con actividades pirofosfatásicas y esterásicas que la enzima resultante por precipitación a 0,05M. Por otra parte, la razón ATP/ADP es mayor en la enzima resultante de 0,10M PCA.

C.- pH óptimo de redisolución del precipitado 0,10M PCA.

Se estudia el efecto del pH en la redisolución del precipitado perclórico. El tampón usado es citrato 0,1M. El volumen del tampón es igual al volumen inicial del extracto precipitado. Los pH estudiados fueron desde 4 hasta 7,5. Recién a pH 7,5 se disuelve totalmente el precipitado y constituye el pH óptimo, sin embargo, el redissolver con Tris da una con mayor a.e. que el hacerlo con citrato. El procedimiento adoptado entonces es la redisolución del precipitado a pH 7,5 con Tris.

El volumen de redisolución fue estudiado y se llegó a concluir que el óptimo es el correspondiente a 1/2 del volumen del extracto precipitado. Con esto se reduce el volumen de trabajo, hecho de gran importancia al efectuarse preparaciones en gran escala.

Resumen de la Etapa 2.

El extracto acuoso es precipitado con ácido perclórico 1M hasta concentración final de 0,10M. El precipitado es redissuelto con Tris 0,02M hasta obtener pH 7,5 y se completa con agua hasta 1/2 del volumen inicial.

La enzima obtenida se ha guardado hasta 3 días a 0° sin constatarse pérdida en la actividad.

ETAPA 3: FRACCIONAMIENTO CON SULFATO DE AMONIO.

La enzima obtenida en la etapa 2 es ahora sometida a un fraccionamiento con sulfato de amonio. En esta etapa, al igual que en la anterior, se estudian las condiciones óptimas del fraccionamiento. Para el cómputo de la concentración de sulfato de amonio, se considera que una solución con 700 g/l está saturada a 0°.

A.- Concentración óptima de sulfato de amonio.

El fraccionamiento se efectuó a pH 6,0, el cual fue controlado potenciométricamente en muestras diluidas entre 5-10 veces. El sulfato de amonio se agregó en sustancia a la solución que contenía la enzima a una concentración aproximada de 8-9mg de proteína por ml. La adición se hace lentamente, con agitación y a 0°. Terminada esta, se deja 20 min. más con agitación a fin de obtener equilibrio entre el precipitado y la fracción que queda en el sobrenadante. Se centrifuga 20 min. a 13000 g a 0°. El precipitado se disuelve en un volumen de agua correspondiente a 1/20 del volumen del extracto inicial. (Resultados en la Tabla N°3)

TABLA N°3

% saturac. (NH ₄) ₂ SO ₄		U. Totales	a.e.	% Recuperac.	Purif.
Enzima Etapa 2		2040	1,51	100	-
	0-30%	0	0	0	-
	30-45%	195	0,94	9	no hay
	45-70%	326	3,80	15	2,5
	70-100%	0	0	0	-

Como puede observarse, al hacer el fraccionamiento con sulfato de amonio a pH 6,0, se obtiene un bajo rendimiento, con una purificación que también es baja. El fraccionamiento a este pH es útil, sin embargo, en la primera precipitación 0-30% en la cual se descarta una gran cantidad de proteínas que no presentan actividad apirásica. Es posible que estas sean proteínas que se han

desnaturalizado en el tratamiento con ácido perclórico, además de las que precipitan normalmente a esa concentración de sulfato de amonio.

De esta manera, se conserva esta primera precipitación a pH 6.0, pero a una concentración de sulfato de amonio de un 40% de saturación, concentración en la que tampoco se obtiene apirasa en el precipitado. El fraccionamiento sobre 40% se estudió a pH 7.5 para encontrar la concentración superior óptima de sulfato de amonio. Los resultados se describen en la Tabla Nº4.

TABLA Nº4

Fraccionamiento a pH 6.0 (0-40% sat.) y pH 7.5 (40-).

	% saturac. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	% U.Totales	a.s.	Purific.
Enzima Etapa 2		100	1,5	-
	0-40% pH 6.0	0	0	-
	40-61% pH 7.5	25	3,9	2,6
	40-66% pH 7.5	65	9,4	6,2
	40-69% pH 7.5	69	9,0	6,0

Como puede observarse, la fracción que produce la mejor purificación es la correspondiente a 40-66%. Esta fracción se estudia ahora con el fin de determinar el pH óptimo.

B.- Estudio del pH óptimo en la precipitación entre 40% y 66% de saturación del sulfato de amonio.

TABLA Nº5

	pH de precipitación	U. Totales	a.s.	Purific.
Enzima Etapa 2		100	1,5	-
	pH 6.8	64	12,3	8,2
	pH 7.5	65	9,0	6,0
	pH 8.1	55	6,7	4,4

Resumen de la tercera Etapa.

La enzima proveniente de la etapa 2 se precipita con sulfato de amonio sólido hasta llegar a 40% de saturación. El pH se mantiene en 6.0 con NH_4OH concentrado. El sobrenadante obtenido por centrifugación a 13000 g es llevado a 66% de saturación manteniendo el pH en 6.8 con NH_4OH concentrado.

Extra 45% y Dixon

470-101-151-07

El precipitado 40-66% obtenido se redisuelve en agua hasta una concentración de 12 - 15 mg. de proteínas/ml y se ensaya.

ETAPA 4. CALENTAMIENTO DE LA ENZIMA EN SULFATO DE AMONIO.

La enzima obtenida en la etapa 3 se sometió a un fraccionamiento con sulfato de amonio en caliente. Con este objeto, la enzima se llevó a diferentes concentraciones con solución saturada de sulfato de amonio a pH 6,8, pH que resultó ser el óptimo, y se calentó a 55° por diferentes tiempos. Se observó que un calentamiento de 1 minuto daba los mejores resultados. Después de este tiempo se centrifugó a 13.000 g. a 0° y el precipitado fué redisuelto en agua para ensayarlo (a de Tabla N° 6). El sobrenadante obtenido del calentamiento es ahora llevado a un 80 % de saturación con solución saturada de sulfato de amonio a pH 6,8. Se deja reposar 1 hora a 0° y el precipitado que se obtiene es centrifugado a 25.000 g por 10 minutos a 0° y redisuelto en agua para ensayarlo. (b de Tabla N° 6)

Para cada concentración de sulfato de amonio se hizo un estudio comparativo sin calentamiento. Los resultados de este experimento se describen en la Tabla N° 6.

TABLA N° 6

Calentamiento de la enzima por 1 minuto a 55° a diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

La enzima proviene de la Etapa 3 con a.e. = 4.9: U. Totales 100 %

	% U.T. a.e. Purif.			% U.T. a.e. Purif.			% U.T. a.e. Purif.		
	0 - 40 % sat.			0 - 50 % sat.			0 - 60 % sat.		
(a) <u>Precipitado</u>									
Sin calentar	10	1,1	-	23	1,5	52	57	3,1	-
Calentado	5	0,4	-	15	0,8	-	59	3,0	-
(b) <u>Sobrenadante</u>									
Sin calentar	75	5,1	1,1	47	13,8	2,8	12	4,5	-
Calentado	72	4,8	-	66	12,3	2,5	17	6,1	1,2

Como puede observarse, el sobrenadante que resulta del calentamiento a 50 % de saturación con sulfato de amonio, permite obtener una enzima 2,5 veces más purificada que la de la etapa anterior. Gran parte de la

TABLA N° 6

apirasa precipita en frío a 50 % sat. pero, como puede verse en la Tabla N° 6, esta pasa al sobrenadante al ser calentada, es decir se redisuelve. La mayor parte de las otras proteínas, por el contrario, precipitan al aumentar la temperatura. Si se usa en este calentamiento una enzima de la etapa 3, de mayor actividad específica, es posible obtener mejores resultados, con purificaciones hasta de 6 veces.

Cuando los volúmenes exceden de 10 ml se presentan dificultades en el calentamiento, pues es arriesgado subir la temperatura muy rápidamente hasta 55° y luego es difícil enfriar con suficiente rapidez un volumen grande. Por este motivo se estudió el calentamiento a una temperatura inferior y por tiempos más prolongados. La concentración de sulfato de amonio fué conservada en 50 % sat. y el pH en 6,8. La temperatura escogida fue de 30°C y los tiempos de calentamiento fluctuaron entre 0 y 40 minutos. Después del calentamiento las fracciones se enfrían y se centrifugan. El sobrenadante obtenido es después precipitado con sulfato de amonio saturado hasta una concentración de 80 % y centrifugado. Se redisuelve en un volumen de agua correspondiente a 1/50 del volumen del extracto. Los resultados se describen en la Tabla N° 7.

TABLA N° 7

sobrenadante calentado (b) 30°		U. Totales	a.e.	Purif.	
Enzima Etapa 3		100	5,7	-	
0 min.	48	25	6,1	2,9	
5 min.	62	62	10,8	6,7	
10 min.	50	101	17,9	9,0	
20 min.	100	47	8,2	8,2	
40 min.	62	52	9,2	5,7	

Como puede observarse, en la Tabla N° 7 al efectuar el calentamiento a 30°, es posible obtener una mayor purificación que a 55°. El tiempo óptimo de calentamiento se encuentra entre 10 y 20 minutos. Si la centrifugación se hace a 30° en vez de 0°, los resultados son mejores en cuanto a rendimiento (Tabla N° 8).

TABLA N°8

Calentamiento y centrifugación en caliente.

	% Unidades	Activ. Especif.	Purificación
Enzima de Etapa 3	100	5,6	-
Enzima resultante de calentamiento y centrif. en cañ.	90	78,00	14

Resumen de la Etapa 4.

La enzima de la etapa 3 (12-125 mg prot./ ml) es calentada por 10 minutos a 30° a una concentración de 50% de saturación de sulfato de amonio, el que es agregado en solución saturada a pH 6,8. Luego de este tiempo es centrifugada por 5 minutos a 30° a 20000g. El sobrenadante obtenido es precipitado en frío a 80% sat de sulfato de amonio con solución saturada a pH 6,8, centrifugado, redissuelto en agua y ensayado.

ETAPA 5 FRACCIONAMIENTO CON ALCOHOL/.

Se efectuaron los primeros estudios de purificación con alcohol etílico (Et OH). El alcohol de 95% se agregó a -10°C, haciendo luego las correcciones para alcohol 100% sin tomar en cuenta la contracción de volumen. El pH del fraccionamiento fue de 6,5 y las etapas de precipitación se efectuaron entre 0 y 5°C. No se controló fuerza iónica.

En las diferentes fracciones se obtiene un precipitado que solo es parcialmente soluble en agua. El sobrenadante de esta suspensión contiene la actividad apirásica; el precipitado (insoluble en agua) no presenta tal actividad y es descartado. La enzima fraccionada proviene de la etapa 4. Los resultados se describen en la Tabla 9.

TABLA N°9

Fraccionamiento con alcohol.

	Concentrac. Etanol	Unidades T	% Unid. Tot.	As	Purific.
Enzima Etapa 4	-	1860	100	34	5
	0-24%	445	24	62	1,8
	24-38%	655	35	106	3,1
	38-57%	375	20	75	2,2

La precipitación que se describe en la Tabla 9 está efectuada a una temperatura de -5°. Como puede observarse, la enzima se reparte en los tres precipitados.

Después se fraccionó entre otros límites de concentración de alcohol, manteniendo la temperatura de precipitación en 0°C (Tabla 10).

TABLA N° 10

Fraccionamiento con Etanol

Concentración Etanol (vol. %)	U. Totales	% U. Totales	a.e.	Purif.
Enzima Etapa 4	2.070	100	64	-
0 - 20 %	45	2		
20 - 35 %	0	0	0	0
35 - 65 %	960	46	215	3.2
65 - 70 %	0	0	0	0

Como la enzima proveniente de la etapa 4 contiene pequeñas cantidades de sulfato de amonio, lo que dificulta en la reproducibilidad en la precipitación con alcohol, se efectuó otro fraccionamiento en el cual la enzima se dializó previamente durante 15 minutos en agua con flujo constante. Algo de actividad se pierde por diálisis. Los resultados se describen en la Tabla N° 11.

TABLA N° 11

Fraccionamiento con Etanol

Concentración Etanol (vol. %)	U. Totales	% U. Totales	a.e.	Purif.
Enzima Etapa 4	440	100	42	-
0 - 29 %	21	5	45	1,07
29 - 47 %	65	15	316	7,5
47 - 64 %	0	0	0	-

Como puede observarse en la Tabla N° 11, la fracción 29-47 % etanol se obtiene una enzima de alta pureza, pero se presenta el problema del bajo rendimiento que se obtiene. En este trabajo se ha preferido presentar como etapa 5 a la correspondiente al fraccionamiento descrito en la Tabla N° 10, aunque en este se obtiene una enzima cuya pureza es menor a la descrita en la Tabla N° 11. Esto es analizado con más detalle en el punto Discusión.

Es muy posible que estudios más exhaustivos de esta etapa puedan producir, posteriormente, mayores actividades y rendimientos.

PREPARACION RESUMEN DE LAS 5 ETAPAS

Se purificaron finalmente 2 lt de extracto acuoso siguiendo las condiciones óptimas que se describen al final de cada etapa. Volúmenes mayores a este presentan el problema del tiempo de precipitación con ácido perclórico el cual no debe exceder de 40 minutos.

TABLA Nº 12

Resumen final de las 5 etapas de preparación

Exp 48c
K.I.

Etapas	Vol. (ml)	Unid. ml	Unid. Tot.	Prot. mg/ml	a.s.	Rend. %	Purif.	ATP ADP	Prod
1.Extras.	2000	5,8	11600	12,8	0,46	100	1	2,4	-
2.PCA	1000	10,9	10900	8,6	1,37	94	2,9	2,9	2,7
3.(NH ₄) ₂ SO ₄	100	83,0	8300	13,8	6,0	72	13,0	3,6	9,4
4. " salient	40	207,0	8300	3,0	64,0	72	139	3,9	100
5.Etanol	13,4	284,0	3800	1,31	215,0	33	465	7,1	153

DISCUSION

1.- Purificación y Rendimiento.

Generalmente el enzimólogo se encuentra ante el problema de elegir entre dos preparaciones, o dos etapas de una preparación, una de las cuales le da una alta purificación y un bajo rendimiento, y otra que le produce un rendimiento mayor, pero una purificación menor. El problema es entonces hasta que punto debe sacrificarse el rendimiento por la purificación y vice-versa.

Ante la no existencia en la literatura de un criterio uniforme respecto a este punto, hemos decidido fijarnos una expresión que denominaremos "Producto de Purificación" (PrP), para poder considerar al mismo tiempo la purificación y el rendimiento de una etapa. El producto de purificación correspondería entonces al producto entre el rendimiento obtenido, considerando $\frac{1}{2}$ la cantidad de unidades con que se inicia la preparación, y la purificación obtenida hasta esa etapa, considerando como $\frac{1}{2}$ a la actividad de la primera etapa

Producto de Purificación = Rendimiento x Purificación.

En una buena purificación al PrP debe ir siempre en aumento. Para una purificación del doble, en una etapa, el rendimiento debe ser superior al 50 %. Esto es solamente imposible en las etapas de cristalización de una enzima que ya está totalmente pura, pero en las etapas anteriores nos parece que debe buscar siempre este aumento.

Para ilustrar esto y a la vez para comparar la preparación que se presenta, hemos tomado como ejemplo a la preparación de glucosa 6-fosfato Dehidrogenasa de Kuby y col. (15). Esta preparación nos parece una de las mejor descritas entre las que se encuentran en la literatura en purificación de enzimas.

TABLA N° 13

Etapas N°	Producto Purificación (PrP) Gluc. 6 P. Dehid.	Producto Purificación Apirasa en este trabajo
EXTRACTO		
1.-	1.26	2.7
2.-	2.0	9.3
3.-	3.0	100
4.-	47	165
6.-	147	
9.-	173	
12.- la. cristalización	340	
15.- 4a. cristalización	253	

2.- Comparación con otras preparaciones de apirasa descritas en la literatura.

	Act.	5 unid. Final	$\frac{ATP}{NADP}$	$\frac{ATP}{NADP}$	$\frac{ATP}{NADP}$
Krishnan (4)	70 U/mg peso seco	6%	sin dato	sin dato	1.84 (*)
Holmard and Lorand (5)	107 U/mg prot	17%	sin dato	sin dato	1.83
Tham et al					
Reche J. (2)	113 U/mg de N prot. (97°C)	40%	sin dato	sin dato	1
Schely N. (6)	300 U/mg peso seco	sin dato	30	no hidrol.	sin dato
Este laborat.	215 U/mg prot.	33%	108	1890	7.1

(*) Valor obtenido en este laboratorio.

En la preparación de Holmard and Lorand la comparación está efectuada con apirasa obtenida de papas rojas.

Puede concluirse que el método de preparación de apirasa de papa descrito en el presente trabajo se puede comparar favorablemente con las demás preparaciones descritas en la literatura, hasta donde es posible hacerlo con los escasos datos que dan los diversos autores. Como se han agotado hasta ahora solamente dos procedimientos, la precipitación con ácido y el fraccionamiento con sulfato de amonio, se puede suponer que será posible aumentar bastante más la actividad específica de nuestra preparación. Por otra parte, el alto producto de purificación de las etapas descritas, comparable a etapas más avanzadas de otras preparaciones enzimáticas, asegura que nuestro procedimiento es adecuado al fin propuesto, es decir, la obtención de una enzima altamente purificada para ser usada en cantidades estequiométricas.

RESUMEN

- 1.- Se describen las primeras etapas de un método de purificación de apirasa de papa.
- 2.- Las etapas (Extracción, precipitación en ácido, precipitación con sulfato de amonio y fraccionamiento con alcohol) se analizan en detalle.
- 3.- La enzima obtenida se puede comparar favorablemente con la apirasa de otras preparaciones descritas en la literatura.
- 4.- Se propone un nuevo criterio para evaluar rendimiento y purificación de una determinada etapa.

NOTA:

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la subvención RG 5631-C3 del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos y por el Proyecto de Investigaciones, Ley 11.575 de la Universidad de Chile.

XX

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Meyerhof O. J. Biol. Chem. 107, 157, (1945)
- 2.- Theai H-v; Roche J. y An, T. T. Bull. Soc. Chem. Biol. Paris 36, 529, (1954).
- 3.- Traverso-Cori A. and Cori O. Bioph., Bioch. Acta 57 158 (1962)
- 4.- Krishnan P. S. Studies on Apyrases I. Arch. Biochem. 20, 261 (1949).
- 5.- Molnar and Lorand L. Studies on Apyrases. Arch. Biochem. and Bioph. 93-2, 353 (1961).
- 6.- Szakely M. Acta Chem. Acad. Sci. Hung. 1, 325 (1951).
- 7.- Marcus D. Comunicación personal.
- 8.- Morrison J. F. and Doherty M. D. Bioch. J. 79, 433 (1961).
- 9.- Fiske C. H. and SubbaRow Y. J. Biol. Chem. 66, 375 (1925).
- 10.- Mehl J. W. J. Biol. Chem. 157, 173, (1944).
- 11.- Warburg O. and Christian W. Bioch. Z 310, 384, (1941).
- 12.- Naganna B. Raman A., Venguapal and Scripathi C.E. Biochem. J. 60, 215, (1955).
- 13.- Kubowitz F. Biochem Z. 32 (1938)
- 14.- Morales J. A. ''Estudio de las protefinas del suero humano por medio de la electroforesis en papel''. Ed. Universitaria Santiago de Chile 23, (1958).
- 15.- Noltmann E., Gubler and C., Kuby S. J. Biol. Chem. 236 , 1225, (1961).