

## Purificación y propiedades de la ornitina transcarbamilasa de hígado de cobaya

F. J. Mataix y M. Ruiz-Amil\*

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Farmacia  
Santiago de Compostela

(Recibido el 6 de agosto de 1974)

F. J. MATAIX and M. RUIZ-AMIL. *Purification and Properties of Ornithine Transcarbamylyase in Guinea Pig Liver*. Rev. esp. Fisiol., 31, 41-46. 1975.

Ornithine transcarbamylyase, the enzyme which catalyzes the formation of citrulline from ornithine and carbamoylphosphate, has been purified from guinea pig liver. By the procedure indicated in the present paper a 200 fold purification of the enzyme has been achieved. Using both the purified fraction and the crude extract, a parallel determination of some physicochemical properties has been carried out. The  $pH$  of maximal activity of OTC was 7.8 for both preparations. The maximal stability of the enzyme with respect to  $pH$  showed a plateau over the range of  $pH$  7 to 9.5 in the purified fraction, whereas the crude extract exhibited a major stability which lay between  $pH$  5 and 10. Both OTC preparations showed similar behavior regarding thermal stability, the enzyme being still active at a  $50^{\circ}C$  temperature. The values of the apparent  $K_m$ 's proved to be 4.4 mM for the substrate ornithine and 5 mM for carbamoylphosphate.

La ornitina transcarbamilasa (OTC) (E.C.2.1.3.3) (carbamilfosfato:L-ornitina carbamiltransferasa), enzima ampliamente difundido en el reino animal y vegetal aunque con distinta significación fisiológica (4), ha sido objeto de purificaciones y determinación de propiedades fisicoquímicas partiendo de diversas fuentes. GRISOLIA y COHEN (8) y REICHARD (19) obtuvieron en forma altamente purificada la OTC de rata, la cual en electroforesis de

papel migra como único componente en el intervalo de  $pH$  5-8,5 con un punto isoeléctrico de 8,1. El  $pH$  óptimo de actividad fue de 7,3 y los valores de  $K_m$  para ornitina y carbamilfosfato fueron 1,4 mM y 0,41 mM, respectivamente. Otros autores (3, 5) obtuvieron la OTC a partir de hígado de bovino con un 95 % de pureza y mediante electroforesis a  $pH$  6,5 y  $pH$  7,5, postularon que el punto isoeléctrico de este enzima se halla entre esos dos valores de  $pH$ . La  $K_m$  para el carbamilfosfato resultó ser de 0,1 mM y la de la ornitina que variaba con el  $pH$  fue de 3 mM a  $pH$  8 y 1 mM a  $pH$  7,6. También

\* Dirección actual: Cátedra de Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid - 3.

a partir del mismo órgano se obtuvo un grado de purificación de 40, con un rendimiento del 4,4 % (11). El pH de máxima actividad variaba según el tampón utilizado, presentando un valor de 6,9 con tris-(hidroximetil)-amino metano y 7,9 con glicina. Las  $K_m$  para ornitina y carbamilfosfato fueron 1,45 mM y 1,79 mM, respectivamente. Por otra parte, GRILLO *et al.* (9) purificaron y estudiaron asimismo la OTC de hígado de bovino, el cual mostró un pH óptimo de actividad de 8,5 utilizando tampón de glicina o trietanolamina y una  $K_m$  de 12,5 mM para la ornitina y de 7,1 mM para el carbamilfosfato.

Más diversificados han sido los trabajos de purificación y determinación de propiedades fisicoquímicas de la OTC de plantas y microorganismos, entre los que destacan los realizados a partir de *Streptococcus faecalis* (18, 13), *Streptococcus D10* (2), *Pseudomonas aeruginosa* IRC-204 (17), *Halobacterium salinarium* (7) y semillas de guisantes (12).

En este trabajo se presentan datos sobre la purificación de la ornitina transcarbamilasa de hígado de cobaya, y sobre algunas de sus propiedades fisicoquímicas. El proceso de purificación se llevó a cabo por tratamiento térmico, precipitación fraccionada con sulfato amónico y cromatografía en columna de hidroxapatito. Los valores de máxima actividad y estabilidad al pH de este enzima así como el comportamiento térmico, se determinaron paralelamente en el extracto crudo y en la fracción purificada; asimismo se han determinado las  $K_m$  aparentes para los sustratos usando esta última fracción.

### Material y métodos

*Animales de experimentación.* Se utilizaron cobayas machos adultos que se sacrificaron por sección completa de las carótidas, y a los que se les extrajo el hígado, material de partida para la purificación.

*Aparatos usados.* Las centrifugaciones

se llevaron a cabo en centrifuga refrigerada SPINCO modelo J 21. Las medidas espectrofotométricas se realizaron en espectrofotómetro PYE-UNICAM modelo 1800 SP. Para la electroforesis en gel de poliacrilamida se utilizó un equipo de la casa Shandon. El fraccionamiento en columna se realizó utilizando un colector de fracciones marca L.K.B. modelo 3406 B.

*Productos químicos.* El carbamilfosfato fue suministrado por SIGMA. La ornitina y otros compuestos utilizados eran de grado analítico.

### PURIFICACIÓN DE ORNITINA TRANSCARBAMILASA

*Paso 1.* El hígado de cobaya fue homogeneizado con cuatro veces su peso de tampón tris-maleato 0,005 M pH 7,2.

*Paso 2.* El extracto obtenido se sometió a calentamiento de 55° C durante 15 minutos y se dejó reposar 10 minutos. A continuación se centrifugó durante 15 minutos a 23.000 g desechándose el precipitado.

*Paso 3.* Al sobrenadante anterior se le adicionó lentamente y agitando solución de sulfato de protamina al 1 % (P/V) en tampón tris-maleato 0,005 M pH 7,2 en una proporción de 0,1 mg de sulfato de protamina por mg de proteína. Se dejó reposar durante media hora y se centrifugó a 23.000 g, durante 15 minutos.

*Paso 4.* Al sobrenadante obtenido en el paso anterior se le añadió  $SO_4(NH_4)_2$  sólido en cantidad adecuada para lograr una saturación del 45 %. Se dejó reposar 20 minutos y se centrifugó posteriormente a 23.000 g, 15 minutos.

*Paso 5.* Al líquido sobrenadante separado en el paso anterior se le añadió nuevamente  $SO_4(NH_4)_2$  en cantidad suficiente para alcanzar un 75 % de saturación. Después de 20 minutos de reposo se centrifugó a 23.000 g, durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante y se disolvió el precipitado en tampón tris-maleato 0,005 M pH 7,2.

*Paso 6.* La solución enzimática anterior se dializó en tres fases sucesivas de 3, 12 y 3 horas, frente a 3, 5 y 3 litros del tampón de tris-maleato 0,005 M pH 7,2, respectivamente.

*Paso 7.* La fracción dializada se cromatografió en columna de intercambio iónico de hidroxapatito (20). La columna utilizada fue de flujo directo de 2 cm de diámetro y 60 cm de altura, y se equilibró con tampón de fosfato 0,001 M pH 6,8. Una vez que se agregó la fracción enzimática se eluyó con 500 ml de tampón de fosfato pH 6,8 a las siguientes concentraciones: 0,001, 0,005, 0,1, 0,175 y 0,25 M.

Todas las operaciones del proceso, excepto el tratamiento térmico, se llevaron a cabo en cámara fría a 0-4° C.

#### PUREZA DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA

La preparación con actividad enzimática fue sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida según técnica descrita por DAVIS (6).

#### DETERMINACIONES ANALÍTICAS

La medida de la ornitina transcarbamilasa se realizó según el método de JONES (10) por valoración de la citrulina formada por la técnica colorimétrica de ARCHIBALD (1). Las unidades de actividad

enzimática se expresan en  $\mu$ moles de citrulina formada por minuto, en las condiciones de ensayo. La mezcla de reacción, salvo donde se indique expresamente alguna variación, contenían 15  $\mu$ moles de carbamilo fosfato, 5  $\mu$ moles de ornitina y 200  $\mu$ moles de tampón tris-maleato pH 7,8 en un volumen final de 0,5 ml. La cantidad de extracto enzimático y fracción purificada que se agregaba a la mezcla de reacción contenía unos 0,8 mg y 30  $\mu$ g de proteínas, respectivamente.

La determinación de proteínas se realizó según el método de LOWRY *et al.* (14) en el caso de extracto crudo y en el de las fracciones resultantes del tratamiento por calor, sulfato de protamina y sulfato amónico. Para los eluatos procedentes de la columna cromatográfica se tomó como valor de los mg de proteína por ml la medida directa de densidad óptica a 280 nm (16).

#### Resultados y discusión

El grado de purificación y porcentaje de recuperación obtenidos por el proceso de fraccionamiento descrito en Material y Métodos, fueron 198 y 7,5 %, respectivamente (tabla I). El grado de purificación alcanzado es bastante aceptable si lo comparamos con los valores logrados a partir de hígado de bovino por el grupo

Tabla I. Purificación de ornitina transcarbamilasa de hígado de cobaya

Etapa	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Volumen (ml)	Act. específica* (U/mg proteína)	Recuperación (%)	Purificación (*)
Extracto crudo	3,9	46,00	365	0,085	100,0	—
Sobrenadante trat. térmico	3,3	20,00	270	0,165	62,5	1,94
Prec. sulfato de protamina	3,2	16,00	315	0,200	70,8	2,35
Prec. sulfato amónico	3,6	16,00	40	0,255	10,1	2,64
Columna de hidroxapatito **	9,7	0,58	11	16,800	7,5	198,00

\* Se determinó según se describe en Material y Métodos.  
\*\* Tampón de fosfato 0,175 m.

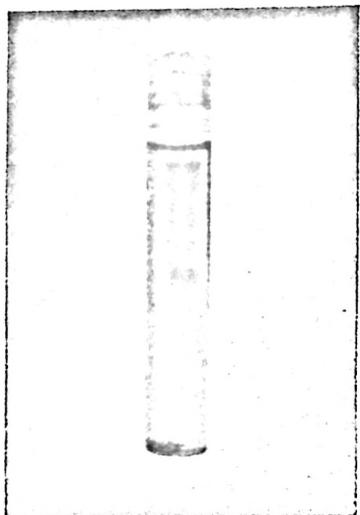


Fig. 1. Electroforegrama en gel de poliacrilamida de la fracción de la ornitina transcarbamilasa obtenida por cromatografía en columna de hidroxilapatito.

de JOSEPH *et al.* (11) y así lo demuestra el electroforegrama obtenido de la fracción parcialmente purificada (fig. 1) que presenta dos bandas muy unidas de marcada intensidad de color, frente a otra separada de las anteriores y más tenue de una proteína que impurifica.

En la fracción parcialmente purificada se determinaron propiedades fisicoquímicas de la OTC, algunas de las cuales se llevaron a cabo asimismo en el extracto crudo, lo que nos ha permitido comparar los valores obtenidos. Así, en lo que respecta a la influencia del pH sobre la actividad enzimática se obtuvo tanto en la fracción purificada como en el extracto crudo un margen de máxima actividad entre pH 7,8 y pH 8,7 (algo mayor para pH 7,8) presentando una bajada intermedia a pH 8,1 (fig. 2). Esta oscilación de pH óptimo de actividad es semejante al mostrado por otros autores (11) con la OTC de hígado de bovino. Dado que para la obtención del perfil de pH de máxima actividad se han empleado distintos tam-

pones, la disminución observada a pH 8,1 podría deberse al hecho de que a ese pH el tampón utilizado actuara en cierto modo como inhibidor, como han mostrado BURNETT y COHEN (3) y RAVEL *et al.* (16) al indicar la dificultad en la elección del tampón ya que las aminas primarias son carbamiladas no enzimáticamente por el carbamil fosfato. Podría también interpretarse como que el pH 8,1 fuese el punto isoeléctrico de la OTC de hígado de cobaya, lo cual concuerda con valores encontrados en otros trabajos (19). Igualmente sería posible la existencia de dos isoenzimas, los cuales exhibiesen dos óptimos distintos de actividad al pH, concretamente pH, 7,8 y 8,7, lo cual puede ser también sustentado por la presencia en el gel de poliacrilamida, de dos bandas íntimamente unidas con máxima coloración.

En cuanto a los estudios de estabilidad al pH, es decir, el pH para el cual una

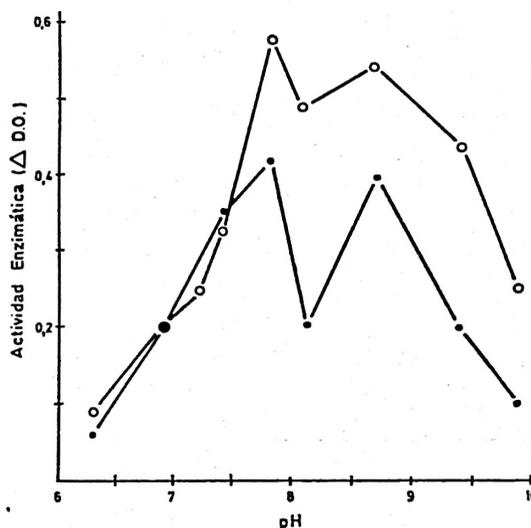


Fig. 2. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la ornitina transcarbamilasa de la fracción purificada (●—●) y del extracto crudo (○—○).

La mezcla de reacción contenía, además de los sustratos, 200  $\mu$ moles de cada uno de los siguientes tampones: tris-maleato entre pH 6 y 8,3 y glicina entre pH 8,7 y 10.

muestra enzimática es estable durante 15 minutos, manteniendo una actividad residual medible a  $pH$  óptimo de actividad (figura 3). Se observa que la OTC de la fracción purificada presenta una zona de estabilidad entre  $pH$  7 y 9,5, mientras que el enzima del extracto puro muestra un margen mayor que va de  $pH$  5 a  $pH$  10, lo cual se podría interpretar como que las proteínas acompañantes de la OTC en el extracto crudo ejercen un efecto altamente protector. Este amplio margen de estabilidad con respecto a las variaciones de  $pH$ , permite a la OTC cumplir su función en la detoxicación de amonio, el cual puede —según su concentración— determinar notables variaciones del  $pH$  intracelular, máxime si se

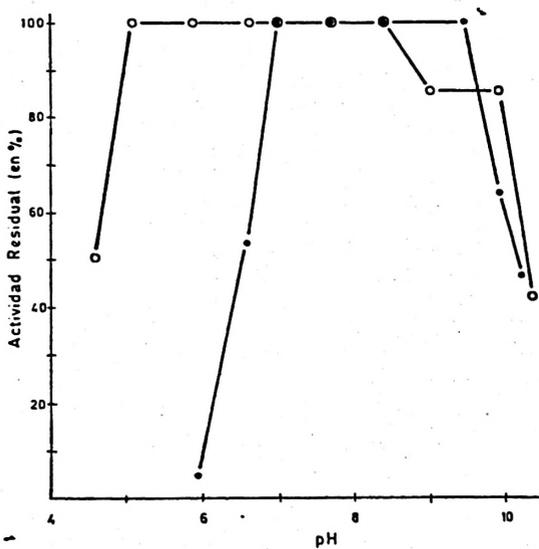


Fig. 3. Estabilidad de la ornitina transcarbamilasa de la fracción purificada (●—●) y del extracto crudo (○—○) a diferentes  $pH$ .

El extracto crudo conteniendo 10 mg de proteína/ml y la fracción purificada conteniendo 0,58 mg/ml se diluyeron cuatro veces con uno de los siguientes tampones a concentración 0,1 M: tris-maleato entre  $pH$  4 y 8 y glicina entre  $pH$  8,5 y 11. Se incubaron las preparaciones a  $37^{\circ}C$ , 15 minutos y, posteriormente, se determinaron las actividades enzimáticas al  $pH$  de máxima actividad ( $pH$  7,8).

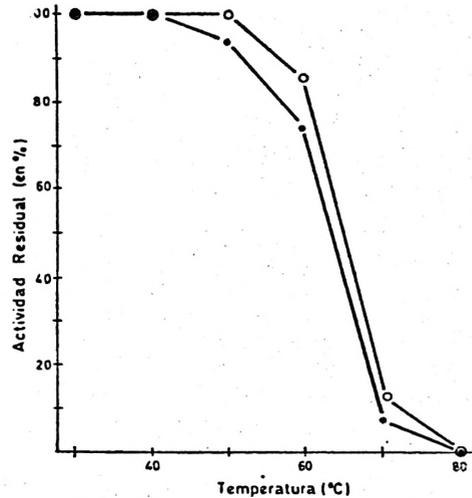


Fig. 4. Estabilidad de la ornitina transcarbamilasa a diferentes temperaturas.

Partes alícuotas de la fracción purificada (●—●) y del extracto crudo (○—○) se incubaron durante 15 minutos a las temperaturas indicadas, determinándose seguidamente actividades enzimáticas en el sobrenadante obtenido tras centrifugación, los cuales se expresaron como porcentaje respecto a la actividad original.

tiene en cuenta la localización mitocondrial de este enzima (15).

El comportamiento frente al calor de la OTC proporcionó iguales resultados con la fracción purificada y el extracto crudo (figura 4), los cuales mostraron una estabilidad térmica total hasta los  $50^{\circ}$  y tan sólo una pérdida de actividad de un 20 a un 25 % a los  $60^{\circ}C$ . Esta característica es constante en las OTC de otros orígenes habiendo sido aprovechada en la mayoría de los procesos de purificación del enzima llevados a cabo por los distintos autores.

En cuanto a las constantes de MICHAELIS aparentes de la OTC, para sus sustratos carbamifosfato y ornitina a partir de la representación de dobles recíprocos de LINEWEAVER BURK (fig. 5), los valores encontrados fueron de 5 mM para el carbamifosfato y 4,4 mM para la ornitina.

Si se comparan los valores obtenidos en

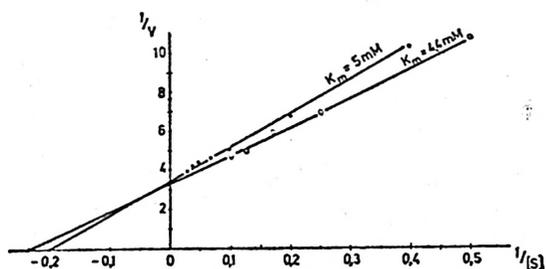


Fig. 5.  $K_m$  aparente de la ornitina transcarbamilasa de hígado de cobaya respecto al carbamilo fosfato (●—●) y de la ornitina (○—○), utilizando la fracción purificada.

La mezcla de reacción contenía concentración fija de un sustrato para saturación práctica del enzima (carbamilo fosfato, 15  $\mu$ moles; ornitina, 5  $\mu$ moles) y el otro en concentraciones variables. Asimismo, 200  $\mu$ moles de tampón tris-maleato pH 7,8.

las propiedades fisicoquímicas de la OTC de hígado de cobaya con los descritos por otros autores en otras especies animales, se observa una cierta similitud entre los mismos. Estos datos pueden confirmar la gran analogía de estos organismos no sólo en lo que se refiere a la función fisiológica de la OTC, como enzima clave específico del ciclo de la urea, sino en cuanto a su comportamiento frente a factores que pueden influir en la velocidad de la reacción.

### Resumen

Se ha estudiado el proceso de purificación de la ornitina transcarbamilasa partiendo de hígado de cobaya, obteniéndose el enzima con un factor de purificación de aproximadamente 200 veces. Asimismo se llevaron a cabo estudios comparativos de algunas propiedades fisicoquímicas de la OTC con la fracción purificada y el extracto crudo. El pH óptimo de actividad fue de 7,8 en ambos casos. La máxima estabilidad del enzima respecto al pH mostró una zona de estabilidad entre 7 y 9,5, mientras que el extracto crudo era estable entre los pH 5 y 10. Igual comportamiento frente al calor presentó el enzima de las dos fracciones, siendo totalmente estable hasta 50° C. Los valores de las constantes de Michaelis resulta-

ron ser 4,4 mM para el sustrato ornitina y 5 mM para el carbamilo fosfato.

### Bibliografía

1. ARCHIBALD, R. M.: *J. Biol. Chem.*, 156, 121, 1944.
2. BISHOP, S. H. y GRISOLIA, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 139, 344, 1967.
4. COHEN, P. P. y BROWN, G. W., JR.: En «Comparative Biochemistry» II (Florkin, M. y Mason, H. S., eds.). Academic Press, Nueva York, 1960, p. 161.
5. COHEN, P. P. y MARSHALL, M.: En «The enzymes» (Boyer, P. D., Lardy, H. y Myrback, K., eds.). Academic Press, Nueva York, 1962, p. 327.
6. DAVIS, B. J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404, 1964.
7. DUNDAS, I. E. D.: *Eur. J. Biochem.*, 16, 393, 1970.
8. GRISOLIA, S. y COHEN, P. P.: *J. Biol. Chem.*, 198, 561, 1952.
9. GRILLO, M. A. y BEDINO, S.: *Enzymologia*, 35, 1, 1968.
10. JONES, M. E.: En «Methods in enzymology» (Collowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds.). Academic Press, Nueva York, 1962, p. 916.
11. JOSEPH, R. L., BALDWIN, E. y WATTS, D. C.: *Biochem. J.*, 87, 409, 1963.
12. KAZIMIERS, K. y COHEN, P. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 107, 271, 1964.
13. KURTIN, E. W., BISHOP, S. H. y HIMOE, A.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 45, 551, 1971.
14. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FRARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
15. MIRUTANI, D., FUJITA, H. J.: *Electron microscopy Tokyo*, 18, 17, 1969.
16. NEILANDS, J. B. y STUMPF, P. K.: En «Principios de Enzimología», Aguilar, Madrid, 1967, p. 46.
17. RAMOS, F., STALON, V., PIERARD, A. y WIAME, J. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 139, 98, 1967.
18. RAVEL, J. M., GRONA, M. L., HUMPHREYS, J. S. y SHIVE, W.: *J. Biol. Chem.*, 234, 1452, 1959.
19. REICHARD, P.: *Acta Chem. Scan.*, 11, 523, 1957.
20. TISELIUS, A., HJERTEN, S. y LEVIN, O.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 65, 132, 1956.