

0,13 mg/ml, 1 mg of microsomal protein and not more than 10 minutes of incubation period.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ANDREWS, P. (1970).—Purification of Lactose Synthetase A protein form human milk and demonstration of its interaction with α -Lactalbumin. *FEBS Letters*, **9** (5): 297-300.
- 2) BABAD, H., y HASSID, W. Z. (1966).—Soluble Uridine Diphosphate D-galactose: D-glucose β -4-D-galactosyltransferase from Bovine Milk. *J. Biol. Chem.*, **241** (11): 2672-2678.
- 3) BREW, K.; VANAMAN, T. C., y HILL, R. L. (1968).—The role of α -lactalbumin and the A protein in lactose synthetase: a unique mechanism for the control of a biological reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **59**: 491-497.
- 4) BRODBECK, U., y EBNER, K. E. (1966).—Resolution of a Soluble Lactose Synthetase into two protein components and solubilization of microsomal Lactose Synthetase. *J. Biol. Chem.*, **241** (3): 762-764.
- 5) BRODBECK, U., y EBNER, K. E. (1966).—The subcellular distribution of the A and B proteins of Lactose Synthetase in Bovine and Rat Mammary Tissue. *J. Biol. Chem.*, **241** (23): 5526-5532.
- 6) COFFEY, R. G., y REITHEL, F. J. (1968).—The Lactose Synthetase Particles of Lactating Bovine Mammary gland. Preparation of Particles with intact Lactose Synthetase. *Biochem. J.*, **109** (169): 169-176.
- 7) COFFEY, R. G., y REITHEL, F. J. (1968).—The Lactose Synthetase Particles of Lactating Bovine Mammary Gland. Characteristics of the Particles. *Biochem. J.*, **109** (169): 177-183.
- 8) FITZGERALD, D. K.; BRODBECK, U.; KIYOSAWA, I.; MAWAL, R.; COLVIN, B., y EBNER, K. E. (1970).— α -lactalbumin and the lactose synthetase Reaction. *J. Biol. Chem.*, **245** (8): 2103-2108.
- 9) HILL, R. L.; BREW, K.; VANAMAN, T. C.; TRAYER, I. P., y MATTOCK, P. (1968).—The structure, function and evolution of α -lactalbumin. *Brookhaven Sympos. Biol.*, **21**: 139-154.
- 10) KARIMOTO, R. S., y REITHEL, F. J. (1965).—The synthesis of lactose by a soluble protein derived from bovine mammary tissue. *Life Sci. Pergamon Press Ltd. Printed in Great Britain*, **4**: 919-922.
- 11) KLEE, W. A., y KLEE, C. B. (1972).—The interaction of α -lactalbumin and the A protein of lactose synthetase. *J. Biol. Chem.*, **247** (8): 2336-2344.
- 12) KUHN, N. J. (1968).—Lactogenesis in the rat. Metabolism of uridine diphosphate galactose by mammary gland. *Biochem. J.*, **106**: 743-748.
- 13) KUHN, N. J. (1969).—Progesterone withdrawal as the lactogenic trigger in the rat. *J. Endocr.*, **44**: 39-54.
- 14) KUHN, N. J. (1969).—Specificity of Progesterone inhibition of Lactogenesis. *J. Endocr.*, **45**: 615-616.
- 15) LOWRY, H. O.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A., y RANDALL, R. J. (1951).—Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265.
- 16) PALMITER, R. D. (1969).—Properties of Lactose Synthetase form Mouse Mammary Gland: role of a proposed third component. *Biochim. Biochim. Biophys. Acta*, **178**: 35-46.
- 17) PRIEELS, J. P.; DOLMANS, M.; LEONIS, J., y BREW, K. (1975).—Nitration of Tyrosyl Residues in Human α -Lactalbumin. Effect on Lactose Synthase Specifier Activity. *Eur. J. Biochem.*, **60**: 533.
- 18) TRAYER, I. P., y HILL, R. L. (1971).—The Purification and Properties of the A protein of Lactose Synthetase. *J. Biol. Chem.*, **246** (21): 6666-6675.

ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS METODOS DE DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LACTOSA SINTETASA EN LOS MICROSOMAS DE TEJIDO MAMARIO DEL GANADO BOVINO. EFECTOS QUE SOBRE ESTA ACTIVIDAD ENZIMATICA EJERCEN LA CONGELACION Y REFRIGERACION

Por I. Burguete Toral*
A. López Pérez
J. Burgos González

INTRODUCCION

La elección del método de determinación de la actividad lactosa sintetasa (LS) ha sido con frecuencia motivo de controversia. Los métodos espectrofotométricos hasta ahora empleados se basan en la determinación del UDP formado mediante una serie de reacciones acopladas, una de las cuales (generalmente la lactosa deshidrogenasa) oxida el NADH a NAD, lo que permite conocer la cantidad de lactosa sintetizada vía los cambios de extinción a 340 m μ . El método desarrollado por DAVIDSON⁷ ha sido objeto de modificaciones por otros investigadores (BRODBECK y EBNER⁴, ANDREWS¹, FITZGERALD y col.⁸ y ANDREWS¹ y KITCHEN² entre otros). Estos métodos son sumamente ventajosos por su rapidez y sencillez, pero ofrecen, por el contrario, inconvenientes tales como la interferencia de otros enzimas o sistemas enzimáticos que oxidan también el NADH.

Los métodos radioquímicos (BRODBECK y EBNER⁵, KLEE y KLEE⁹ y BREW y col.³) cuantifican la actividad LS mediante el recuento radiactivo de la lactosa formada a partir de UDP-galactosa marcada con ¹⁴C. Estos ensayos de incorporación, aunque resultan engorrosos y requieren el uso de un instrumental más complejo, son más sensibles.

En el presente trabajo se estudia la eficacia de ambos métodos (espectrofotométrico y radioquímico) para cuantificar la actividad LS en microsomas obtenidos a partir de tejido de glándula mamaria de bóvidos, así como el efecto que ejercen sobre dicha actividad la refrigeración de microsomas y la congelación de la glándula mamaria.

* Cátedra de Biología.
An. Fac. Vet. León., 1983, 29, 335-342.

MATERIAL Y METODOS

Reactivos químicos

El Uridín-5-difosfato-galactosa (UDP-D-¹⁴C-gal.) (ICN PHARMACEUTICALS, INC) fue suministrado en una disolución acuosa de etanol (2/8) (v/v), con una actividad específica de 30mCi/mmol. Los restantes productos utilizados procedían de Sigma Chem. Co., Merck, BDH, etc., y eran de calidad reactivo.

Material biológico

Se emplearon ubres de vacas en fase de lactación, procedentes de animales de 8 años de edad y raza Frisona.

Obtención de la fracción microsómica

La fracción microsómica fue obtenida siguiendo en líneas generales el procedimiento de COFFEY y REITHEL⁶. El tejido glandular se cortó en tiras finas de aproximadamente 1 mm de espesor y se homogeneizaron en un triturador de cuchillas en una disolución que contenía sacarosa 0.25M, 2-Mercaptoetanol 10 mM y Tris-clorhídrico 10 mM, pH 7.4 (se emplearon 2.5 ml de esta disolución por gramo de tejido). La homogeneización se completó en un Potter Elvehjem. Todas estas operaciones se realizaron en cámara fría a 0-4° C.

El homogeneizado se centrifugó durante 10 minutos a 2.500 × g., desechándose el sedimento. El sobrenadante se filtró a través de lana de vidrio y se recentrifugó a 2.500 × g. (5 minutos). El sobrenadante obtenido se sometió a una nueva centrifugación, a 19.200 × g. durante 20 minutos y el sobrenadante de esta centrifugación se centrifugó finalmente a 105.000 × g. durante 90 minutos, obteniéndose así un sedimento constituido por la fracción microsómica.

Los microsomas se resuspendieron en sacarosa 0.25 M y se conservaron, hasta su empleo, a 4° C.

RESULTADOS

Selección del método de ensayo de la actividad lactosa sintetasa

Con objeto de elegir el método de ensayo más idóneo para la medida de la actividad lactosa sintetasa, se compararon los métodos espectrofotométrico y radioquímico:

a) Método espectrofotométrico

Se tomaron, en repetidas ocasiones, preparaciones microsómicas obtenidas según se ha descrito en «Material y Métodos» y se midieron, siguiendo el método de ANDREWS¹, los cambios en la absorbancia, a 340 nm, debidos a la oxidación del NADH a NAD.

La cubeta muestra contenía, en un volumen final de 1 ml, la siguiente mezcla de reacción: Tris-clorhídrico (pH 7.4), 50 micromoles; Cl₂Mn, 4 micromoles; PEP, 1 micromol; ATP, 0.1 micromoles; NADH, 0.2 micromoles; PK, tipo I (EC 2.7.1.40), con nucleósido difosfoquinasa (EC 2.7.4.6) y lactosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.27), 0.5 mg; α-D(+)-glucosa, 80 micromoles; α-lactalbúmina, 150 micromoles; UDP-D-galactosa, 0.4 micromoles y cantidades variables de preparación enzimática (fracción microsómica).

Las lecturas se efectuaron a 25° C. La cubeta referencia contenía el medio de incubación sin glucosa.

b) Método radioquímico

Alícuotas de las mismas preparaciones fueron ensayadas por el método radioquímico, basado en el de BRODBECH y EBNER⁵, con arreglo a las siguientes etapas:

a) Mezcla de reacción generalmente empleada: Siguiendo la modificación de KLEE y KLEE⁹ al procedimiento inicialmente descrito por BREW y col.⁹, se depositaron en tubos de ensayo de fondo cónico, sumergidos en hielo, los siguientes componentes: Tris-clorhídrico (pH 7.4), 5 micromoles; Cl₂Mn, 4 micromoles; ATP, 0.5 micromoles; α-lactalbúmina, 20 microgramos; α-D-(+)-glucosa, 2 micromoles; UDP-¹⁴C-galactosa, 7 × 10⁻² micromoles y preparación enzimática; el volumen final se ajustó a 0.5 ml. Como blanco se utilizó el mismo sistema sin glucosa. La radiactividad del UDP-¹⁴C-galactosa, 26.500 d.p.m., fue ajustada mezclando el sustrato radiactivo con UDP-galactosa no marcada. Estas operaciones se realizaron siempre en cámara fría (0-4° C).

b) Incubación: Se agitó suavemente el medio, para favorecer la mezcla de sus componentes y se taparon los tubos. Se introdujeron en un baño de agua termostataado a 37° C ± 1° C durante 20 minutos, transcurridos los cuales se detuvo la reacción introduciendo los tubos en un baño de hielo picado y añadiendo 0.5 ml de agua fría (4° C).

c) Separación del producto de la reacción: Se agitó la mezcla y se depositó cuidadosamente, dejándola resbalar por las paredes, sobre la superficie del lecho cromatográfico, protegido por una capa de unos 3 mm de agua bidestilada, de una microcolumna de Dowex 1 × 8 (200-400 mesh, forma iónica cloruro) de 0.5 cm de diámetro y 3 cm de altura. La introducción de la muestra se aceleró

con la ayuda de presión. El tubo de ensayo en que tuvo lugar la reacción se lavó con otros 0.5 ml de agua fría que se introdujeron igualmente en la columna; finalmente, ésta se diluyó con 1 ml de agua. Todo el proceso se realizó en una cámara frigorífica a 4° C.

El eluato cromatográfico, que contenía el producto radiactivo ¹⁴C-lactosa, de la reacción enzimática, en un volumen de 2 ml, se recogió directamente en viales de recuento del espectrómetro de centelleo líquido.

d) Determinación de la ¹⁴C-lactosa: A la muestra radiactiva, y a temperatura ambiente, se añadieron 15 ml de líquido de centelleo constituido por una mezcla de POP/POPOP/Tritón X-10/tolueno (8 g de POP, 0.2 g de POPOP, 1 litro de Tritón X-100 y 2 litros de tolueno), se agitó y se mantuvo unos minutos en un baño a 37° C hasta que la muestra clarificó por completo.

En la tabla I se muestran los resultados obtenidos en las determinaciones de la actividad enzimática por uno y otro procedimiento.

TABLA I
Comparación de la eficacia de los métodos espectrofotométrico y radioquímico en la determinación de la actividad lactosa-sintetasa de microsomas mamarios

Proteína (mg)	Método	Radiactividad de la lactosa (d.p.m.)	% transformación de UDP- ¹⁴ C-gal. en ¹⁴ C-lactosa	Actividad específica (μmol/min. mg)
0.5	E	—	—	N.D.
	R	8.816	33.27	2.41
		9.022	34.04	
		9.528	35.95	
	E	—	—	N.D.
	R	14.978	56.52	2.03
15.135		57.11		
16.057		60.59		
E	—	—	N.D.	
	R	17.320		65.36
		18.415		69.49
18.721		70.64		

(1) E = Método espectrofotométrico.

R = Método radioquímico.

N.D. = No detectada.

Los datos presentados en esta tabla corresponden a la media de tres determinaciones para cada valor.

Efecto de la congelación del tejido mamario sobre la actividad lactosa sintetasa

La riqueza de la glándula mamaria en tejido conectivo hace necesario cortar finamente el tejido glandular antes de proceder a su trituración y homogeneización. Estas operaciones resultan más sencillas si se parte de tejido congelado, aunque pueda acarrear otros inconvenientes.

Para observar la posible influencia de la congelación sobre la actividad lactosa sintetasa del tejido mamario se dividió el tejido mamario en dos porciones. A partir de una de ellas; en la que se efectuaron cuatro experimentos, se prepararon microsomas en fresco; la otra se congeló y almacenó 24 horas a -20° C, preparándose igualmente la fracción microsómica.

En la tabla II se recogen los resultados obtenidos por el método radioquímico en los ensayos de la actividad lactosa sintetasa de la fracción microsómica, preparada por uno y otro procedimiento.

TABLA II
Influencia de la congelación previa del tejido mamario sobre la actividad de dicho tejido. Proteína microsómica: 0.5 mg, en todos los casos. Método de determinación: Radioquímico

Experimento	Tejido (1)	Radiactividad media de la lactosa (d.p.m.)	% transformación de UDP- ¹⁴ C-gal. en ¹⁴ C-lactosa	Actividad específica (μmol/min. mg)
A	F	11.312	42.69	2.99
	C	10.391	39.21	2.74
B	F	10.917	41.20	2.88
	C	10.523	39.71	2.78
C	F	11.049	41.69	2.92
	C	10.523	39.71	2.78
D	F	11.706	44.17	3.10
	C	10.917	41.20	2.88

(1) F = Fresco.

C = Congelado.

Los datos presentados en esta tabla corresponden a la media de tres determinaciones para cada valor.

Influencia sobre la actividad lactosa sintetasa de la conservación en refrigeración de la fracción que contiene los microsomas

PALMITER¹⁰ señala una vida media de la actividad catalítica lactosa sintetasa de la fracción microsómica de 13 horas, conservando el homogeneizado del tejido mamario a 4° C. Sin embargo, BROBECK y EBNER⁵ afirman que las preparaciones microsómicas mantienen su actividad enzimática durante 14 días en disoluciones de sacarosa de concentración moderada.

Con el fin de disponer de un modo regular de material abundante y uniforme, se estudió la estabilidad del enzima en las preparaciones microsómicas suspendidas en sacarosa 0.25 M, como recomiendan BROBECK y EBNER⁵. Para ello se suspendió en la disolución citada un sedimento microsómico hasta alcanzar una concentración de 50 μg de proteína microsómica/μl de disolución y se mantuvo a 4° C durante un mes, procediéndose al análisis de su actividad enzimática, siguiendo el método radioquímico, al comienzo y a los 10, 20 y 30 días de almacenamiento. Los resultados obtenidos quedan recogidos en la tabla III.

TABLA III
Cambios en la actividad enzimática de los microsomas conservados a 4° C en sacarosa 0.25 M. Método de determinación: radioquímico. Proteína microsómica: 1 mg.

Día	Radiactividad media de la lactosa (d.p.m.)	% transformación de UDP- ¹⁴ C-gal. en ¹⁴ C-lactosa	Actividad específica (m μ mol/min. mg)
0	16.310	61.55	2.15
10	11.049	41.69	1.46
20	10.786	40.70	1.42
30	5.524	20.84	0.73

Los datos presentados en esta tabla corresponden a la media de tres determinaciones para cada valor.

DISCUSION

Desgraciadamente, los estudios relativos a la actividad lactosa sintetasa de microsomas suelen efectuarse a tiempo fijo y pocas veces se ha intentado cuestionar la validez de las determinaciones así efectuadas.

Nuestros ensayos, también realizados a tiempo fijo, con diversas preparaciones microsómicas dieron resultados similares: el método espectrofotométrico, aparentemente ventajoso por su sencillez, dio resultados negativos, tanto utilizando la citada mezcla de reacción de ANDREWS¹ como la de BRODBECK y EBNER⁴.

COFFEY y REITHEL⁶ observaron una disminución de los cambios en la extinción a 340 m μ por unidad de tiempo, disminución que estimaron tanto más acusada cuanto más se prolongue el tiempo de incubación, aunque no dieron explicación a dicho fenómeno.

Se carece de datos con respecto al posible efecto inhibitor de la lactosa sintetasa ejercido por la lactosa y el UDP. No obstante, cabría pensar que fuese debido a la escasa estabilidad del enzima o incluso a la reducción del NAD formado vía otras reacciones de óxido-reducción acopladas al citado piridín nucleótido.

El método radioquímico ensayado por nosotros resultó, por el contrario, altamente satisfactorio.

Los resultados obtenidos indican que, aunque la actividad enzimática es menor en el tejido congelado que en el fresco, las diferencias son escasas. Confirman, por tanto, los estudios realizados por COFFEY y REITHEL⁶. Por otra parte, se pone de manifiesto que nuestras preparaciones microsómicas mantienen el 66 % de la actividad inicial después de 20 días de almacenamiento, muy similar a la que se obtiene a los 10 días, superando las obtenidas en las condiciones citadas por otros autores.

RESUMEN

Se ha realizado un estudio comparativo de los métodos espectrofotométrico y radioquímico en la determinación de la actividad lactosa sintetasa, así como un estudio de los efectos que sobre ella ejercen la congelación del tejido mamario y la refrigeración de la fracción microsómica. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la elevada eficacia del método radioquímico, así como de la congelación y refrigeración para la conservación del tejido glandular y fracción microsómica mamaria bovina, manteniéndose un 66 % de la actividad lactosa sintetasa a los 20 días de almacenamiento a refrigeración.

COMPARATIVE STUDY OF TWO PROCEDURES FOR DETERMINATION OF LACTOSE SYNTHETASE ACTIVITY IN MICROSOMES OF BOVINE MAMMARY GLAND. EFFECTS OF REFRIGERATION AND FREEZING ON THIS ENZIMATIC ACTIVITY

SUMMARY

It has been realized a comparative study between two methods for determination of Lactose Synthetase activity (spectrophotometric and radiochemical) and the effects of refrigeration and freezing on this activity. The results show a better efficacy of the radiochemical assay, as well as that refrigeration and freezing preserve the lactose synthetase activity (66 %) in microsomal fraction and mammary gland tissue, during 20 days.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ANDREWS, P. (1970).—Purification of lactose synthetase. A protein from human milk and demonstration of its interaction with α -Lactalbumin. FEBS Letters, **9** (5): 297-300.
- 2) ANDREWS, P.; KITCHEN, B. H., y WINZOR, D. J. (1973).—Use of Affinity Chromatography for the Quantitative Study of Acceptor-Ligand Interactions: The Lactose Synthetase System. Biochem. J., **135**: 897-900.
- 3) BREW, K.; VANAMAN, T. C., y HILL, R. L. (1968).—The role of α -lactalbumin and the A protein in lactose synthetase; a unique mechanism for the control of a biological reaction. Proc. National Acad. Sci., **59**: 491-497.
- 4) BRODBECK, Y., y EBNER, K. E. (1966).—Resolution of a Soluble Lactose Synthetase into two Protein Components and Solubilization of Microsomal Lactose Synthetase. J. Biol. Chem., **241** (3): 762-764.
- 5) BRODBECK, V., y EBNER, K. E. (1966).—The Subcellular Distribution of the A and B Proteins of Lactose Synthetase in Bovine and Rat Mammary Tissue. J. Biol. Chem., **241** (23): 5526-5532.
- 6) COFFEY, R. G., y REITHEL, F. J. (1968).—The Lactose Synthetase Particles of Lactating Bovine Mammary Gland. Preparation of Particles with intact Lactose Synthetase. Biochem. J., **109** (169): 169-176.

- 7) DAVIDSON, E. A. (1959).—Specificity of pyruvate kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* **33**: 238.
- 8) FITZGERALD, D. K.; BRODBECK, V.; KIYOSAWA, I.; MAWAL, R.; COLVIN, B., y EBNER, K. E. (1970).—Lactalbumin and the Lactose Synthetase Reaction. *J. Biol. Chem.*, **245** (8): 2103-2108.
- 9) KLEE, W. A., y KLEE, C. B. (1972).—The interaction of α -lactalbumin and the A protein of lactose synthetase. *J. Biol. Chem.*, **247** (8): 2336-2344.
- 10) PALMITER, R. D. (1969).—Properties of Lactose Synthetase from Mouse Mammary Gland: role of a proposed third component. *Biochim. Biophys. Acta.* **178**: 35-46.

CATEDRA DE TECNOLOGIA Y BIOQUIMICA DE LOS ALIMENTOS

(Prof. Dr. JUSTINO BURGOS GONZALEZ)

α -DICARBONILO REDUCTASA DE HIGADO DE PALOMA: 1) CINETICA DE LA REDUCCION DEL PIRUVATO DE ETILO CON NADPH COMO COENZIMA

Por J. González Prieto
A. Bernardo
R. Martín Sarmiento
I. Vidal

INTRODUCCION

BERNARDO y sus colaboradores² han aislado recientemente, a partir de hígado de paloma, una α -dicarbonilo reductasa [L (+)- α -hidroxicarbonilo: NAD (P) óxido reductasa], similar a la descrita inicialmente por PROVECHO *et al.*¹² en hígado de bóvido. Este enzima había venido siendo considerado una diacetilo reductasa específica^{7, 8}, pero los estudios de especificidad efectuados por los autores mencionados pusieron de manifiesto que, además del diacetilo, reduce todo tipo de α -dicarbonilos de más de tres átomos de C, entre ellos el piruvato de etilo, a los correspondientes L (+)- α -hidroxicarbonilos utilizando como donador de hidrógeno NADH o NADPH.

El presente artículo da cuenta de las experiencias realizadas para determinar el mecanismo de reacción y las constantes de afinidad del enzima en la reducción del piruvato de etilo con NADPH.

MATERIAL Y METODOS

El NADPH fue obtenido de Boehringer, el piruvato de etilo de Sigma, el lactato de etilo de Merck y la pentano-3-ona de Spectrix. La acetona (Panreac) fue purificada siguiendo el método descrito por VOGEL (1964).

Las preparaciones enzimáticas se obtuvieron según el método descrito por BERNARDO y col.²

Las determinaciones de actividad se efectuaron espectrofotométricamente a partir del descenso en absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del coenzima en un medio termostático a 25°C y tamponado a pH 6,1 con fosfato

An. Fac. Vet. León., 1983, 29, 343-353.