

OBTENCION DE L(+)-ACETOINA POR SINTESIS ENZIMATICA

*Por R. Martín Sarmiento
J. González
F. Provecho
J. Burgos*

INTRODUCCION

Los enzimas del metabolismo de la acetoína y el butilénolico parecen ser estereoespecíficos en la mayor parte, si no en todos, los sistemas biológicos^{1 3 6 8}. Las bacterias producen generalmente D(-)-acetoína a partir del piruvato⁸, mientras que datos obtenidos en nuestro laboratorio ponen de manifiesto que los tejidos animales, o al menos algunos de ellos, sintetizan la forma L(+). En cuanto al 2,3-butanodiol, algunos microorganismos producen exclusivamente la forma D(-), otros la L(+) y, finalmente, otros mezclas de una y otra con la forma *meso*⁸; los tejidos animales disponen de un enzima, la L-glicol deshidrogenasa, que reduce la L-acetoína a L-butanodiol y la D-acetoína a *meso*-butilénolico¹.

Dado que el isómero no utilizado por un enzima estereoespecífico suele comportarse como inhibidor de vía muerta del mismo, los estudios relacionados con el funcionamiento de estas rutas metabólicas deberían ser efectuados haciendo uso de las correspondientes formas estéricas. Tales estudios no suelen realizarse de este modo por la inexistencia en el mercado de los isómeros pertinentes y las grandes dificultades con que se tropieza para su purificación a partir de mezclas racémicas o su síntesis química. En el presente artículo se describe un método enzimático para la obtención de L(+)-acetoína, de fácil realización y que no requiere material especializado.

MATERIAL Y METODOS

El Sephadex G-10 fue obtenido de Pharmacia Fine Chemicals. El NADH (Sigma, Grado III) fue purificado por lavado con metanol/éter siguiendo el

An. Fac. Vet. León, 1980, 26, 159-163.

método de DALZIEL⁴ y el diacetilo por destilación fraccionada en una columna Hempel, recogiendo la fracción que destila entre 88 y 89°C a 760 mm Hg. El éter etílico fue deshidratado con alambre de sodio y liberado de peróxidos por destilación sobre hierro reducido.

Las determinaciones de la suma de acetoína y diacetilo se efectuaron por el método de WESTERFELD⁹. Las de diacetilo, por el de Owades y Jakovac, siguiendo la descripción del mismo efectuada por PACK y col.⁷ y las de acetoína, por el método de FUERTES y col.⁵. El NADH se determinó por su extinción a 340 nm y la proteína por su absorbancia a 280 nm. La rotación óptica de la L-acetoína obtenida se midió en un electropolarímetro Perkin Elmer 241.

La síntesis enzimática de L-acetoína se llevó a cabo con diacetilo reductasa de hígado de bóvido, tras comprobarse que reduce el diacetilo a la forma L(+) de aquélla sin posterior transformación a butanodiol. Las preparaciones utilizadas corresponden a la etapa 2 del proceso de purificación del enzima descrito por BURGOS y MARTÍN².

RESULTADOS

Síntesis

En un vial con tapón fácilmente perforable, se incubaron a temperatura ambiente 0,16 ml de diacetilo, 1,2 g de NADH y 6.000 unidades de diacetilo reductasa de hígado de bóvido en 12 ml de tampón fosfato bisódico monopotásico 0,5M de pH 6. La marcha de la reacción se siguió comprobando periódicamente el consumo de NADH por la extinción a 340 nm. Cuando la estabilización de la absorbancia a esa longitud de onda puso de manifiesto que la reacción se había detenido, se añadieron otros 0,16 ml de diacetilo y 1,2 g más de NADH. Se dejó nuevamente transcurrir la reacción hasta detenerse, se añadió por segunda vez diacetilo y NADH en las mismas cantidades y se prolongó la incubación hasta estabilizarse la absorbancia a 340 nm.

Se obtuvieron así en torno a 250 mg de L(+)-acetoína, impurificada con aproximadamente 120 mg de diacetilo, 40 mg de proteína, 1,2 g de NADH y, por diferencia con el coenzima añadido, 2,4 g de NAD. Volumen al término de la incubación, unos 12 ml.

Eliminación de las impurezas de proteína y NAD/NADH

Las mezclas de incubación se cromatografiaron en una columna de 5 × 50 cm de Sephadex G-10, utilizando como eluyente agua destilada y recogiendo las fracciones (de 20 ml) que dan reacción positiva frente al método de WESTERFELD⁹, excepto las 2-3 primeras que suelen encontrarse demasiado contaminadas con NAD/NADH. Las experiencias piloto efectuadas pusieron

de manifiesto que, tras esta etapa, se elimina prácticamente la totalidad de la proteína y hasta el 99 % de los coenzimas, recogiéndose del orden del 90-95 % de la acetoína y el diacetilo en un volumen total de 140-160 ml.

Concentración

La L(+)-acetoína en los eluatos de las cromatografías en Sephadex G-10 fue extraída cinco veces con dos volúmenes de éter. El éter se evaporó luego en un Rotovapor a 25°C y 120 mm Hg, con lo que se obtuvo un residuo de 8-10 ml de agua conteniendo hacia 200 mg de L-acetoína, con unos 40-80 mg de diacetilo, 5 mg de NAD/NADH y prácticamente exenta de proteína. La adición de agua hasta 30 ml y la repetición de esta etapa deja reducida la contaminación con NAD/NADH a unos 0,25 mg, reteniendo hacia el 94 % de la acetoína; volumen final, unos 2 ml.

Eliminación de las impurezas de diacetilo

El diacetilo contenido en las preparaciones fue eliminado casi en su totalidad por burbujeo de nitrógeno (100-150 ml/min) a 24°C durante 90 min. Esta operación permitió reducir las impurezas de diacetilo a no más de 5-7 mg, sin pérdidas aparentes de L(+)-acetoína.

Rendimiento del método y rotación óptica específica de la acetoína producida

A partir de 460 mg de diacetilo se obtuvieron, en las distintas experiencias efectuadas, entre 185-200 mg de acetoína, lo que equivale a un rendimiento de alrededor de un 40 %, con un $(\alpha)_D^{20}$ medio de la acetoína de + 225°.

DISCUSION

El método que se propone permite obtener, con un rendimiento muy aceptable, disoluciones concentradas de L(+)-acetoína de un grado de pureza elevada si se compara con la que suele conseguirse en la síntesis de estereoisómeros de otros compuestos semejantes. Por otra parte, la rotación óptica específica de la acetoína obtenida es aproximadamente igual a la más alta hasta ahora descrita para el isómero L de este compuesto ($226,4 \pm 20,5$; véase ref.¹), lo que pone de manifiesto que debe hallarse muy poco o nada contaminada con la forma D. Como inconvenientes del método cabe citar que no es fácilmente adaptable a la obtención de grandes cantidades de producto y que resulta relativamente caro, principalmente por la necesidad de utilizar NADH en proporciones elevadas en relación con la acetoína producida; este inconveniente

niente queda, en gran parte, paliado utilizando preparaciones de NADH de baja calidad y purificándolas por lavado con metanol/éter⁴.

Para el desarrollo de este método se han probado también otros procedimientos alternativos de incubación, purificación y concentración. En la etapa de purificación resultan bastante críticos el pH y la molaridad del tampón para conseguir una buena estabilidad del enzima y una velocidad de reacción elevada. Para la eliminación de la proteína y el NADH se ha ensayado su precipitación con disolventes orgánicos (mezclas de metanol/éter), lo que presentó el inconveniente de arrastrar en el precipitado una gran parte de la acetoína. Se ha intentado también efectuar la concentración por congelación pero, dada la baja molaridad de solutos en los eluatos de las cromatografías en Sephadex, el descenso en el punto crioscópico es escaso y el proceso resulta, en consecuencia, difícil de controlar. Se ha tratado asimismo de concertar las disoluciones de acetoína por liofilización; sin embargo, no fue posible encontrar condiciones de presión y temperatura de trabajo que permitieran sublimar el agua sin que pasase gran parte de la acetoína a la fase gaseosa. Finalmente, se ha intentado mejorar la eliminación del diacetilo de las preparaciones elevando la temperatura durante el burbujeo de nitrógeno, pero incluso a 65°C no se ha apreciado mejora sustancial alguna en el resultado de la operación.

RESUMEN

Se describe un método para la obtención de L(+)-acetoína con un elevado grado de pureza y un rendimiento en torno al 40 %. El citado método se basa en la síntesis de L-acetoína por reducción de diacetilo con diacetilo reductasa de hígado de bóvido y en su purificación y concentración por cromatografía en Shepadex G-10, extracción con éter seguida de evaporación a vacío del disolvente y eliminación de los restos de diacetilo por burbujeo de nitrógeno a 25°C.

L(+)-ACETOIN PREPARATION BY ENZYMATIC SYNTHESIS

SUMMARY

A procedure which allows to obtain very pure L(+)-acetoin is described. The method is based upon diacetyl reduction by bovine liver diacetyl reductase followed by Sephadex G-10 purification, ethyl ether extraction, evaporation of the solvent under vacuum and elimination of diacetyl residues by bubbling nitrogen at 25°C. The yield of the procedure lies around 40 %.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BERNARDO, A. (1977).-Purificación, propiedades y múltiples formas de la butilén-glicol deshidrogenasa de músculo de gallina y su caracterización como un nuevo enzima. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria de León.

- 2) BURGOS, J. y MARTIN, R. (1972).-Purificación and some properties of diacetyl reductase from beef liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **268**: 261-270.
- 3) COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE OF I.U.P.A.C.-I.U.B. (1972).-*Enzyme Nomenclature*. Elsevier, Amsterdam.
- 4) DALZIEL, K. (1962).-Some observations on the preparation and properties of dihydronicotinamide-adenine dinucleotide. *Biochem. J.*, **84**: 240-244.
- 5) FUERTES, J., BERNARDO, A., BURGOS, J. y MARTIN, R. (1977).-Determinación colorimétrica de acetoína y 2,3-butilén-glicol en muestras biológicas. *An. Fac. Vet. León*, **23**: 127-134.
- 6) LEDINGHAM, G. A. y NEISH, A. C. (1954).-En *Industrial Fermentations*, (UNDERKOFER, L. A. y HICKEY, R. J., eds.), vol. II. Chemical Publishing Company, New York.
- 7) PACK, H. Y., SANDINE, W. E., ELLIKER, P. R. y DAY, E. A. (1964).-Owades and Jakovac method for diacetyl determination in mixed-strain starters. *J. Dairy Sci.*, **47**: 981-986.
- 8) TAYLOR, M. B. y JUNI, E. (1960).-Stereoisomeric specificities of 2,3-butanediol dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta*, **39**: 448-457.
- 9) WESTERFELD, W. W. (1945).-Determination of blood acetoin. *J. Biol. Chem.*, **161**: 495-502.