

«DIACETILO REDUCTASA DE HIGADO DE PALOMA»

Por Víctor Díez Fernández

INDICE

CAPITULO I.—INTRODUCCION.—I.1. Biosíntesis de acetoina y diacetilo.—1. Síntesis por condensación de acetaldehído y piruvato.—2. Síntesis de acetoina por condensación de acetaldehído libre y acetaldehído activado.—3. Síntesis por condensación de acetaldehído activo y acetyl-coenzima-A.—I.2. Síntesis de acetoina en tejidos animales.—I.3. Síntesis de diacetilo en tejidos animales.—I.4. Catabolismo del diacetilo y la acetoina.—1. Transformaciones del diacetilo: Reducción y dismutación.—2. Transformaciones de la acetoina: Reacción butiléniglicol deshidrogenasa.—3. Utilización del diacetilo, la acetoina y el butiléniglicol: Ciclo de butanodiol.—I.5. Diacetilo reductasa en tejidos animales.—CAPITULO II.—MATERIAL, METODOS Y PRODUCTOS (ASPECTOS GENERALES).—II.1. Material y reactivos.—II.2. Métodos. 1. Determinación de proteína.—1.A. Método de biuret. Técnica de Chance y Redfearn (1961). 1.B. Digestión ácida y nesslerización.—1.C. Extinción a 280-260 m μ .—2. Purificación de la acetoina.—3. Determinación de diacetilo. Método de Owades y Jacovak.—4. Determinación de la suma de diacetilo y acetoina. Método de Westerfeld (Westerfeld, 1945).—5. Determinación de la actividad diacetilo reductasa.—CAPITULO III.—PURIFICACION Y PESO MOLECULAR DE LA DIACETILO REDUCTASA DE HIGADO DE PALOMA.—III.1. Introducción.—III.2. Material y métodos.—III.3. Resultados.—1. Purificación: Estudios preliminares. Homogeneización con agua y con sacarosa 0,25 M. Eliminación de fracciones particuladas por centrifugación. Precipitación con acetona. Precipitación con sulfato amónico. Precipitación con sulfato de protamina. Fraccionamiento por adsorción en gel de fosfato cálcico. Cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-100. Estabilidad de la diacetilo reductasa en diferentes medios.—2. Determinación del peso molecular.—III.4. Discusión. Método de purificación.—CAPITULO IV. ESTEQUIOMETRIA DE LA REACCION CATALIZADA. ESPECIFICIDAD DE SUBSTRATOS. REVERSIBILIDAD. COFACTORES E INHIBICION POR SUSTANCIAS NO ANALOGAS DE LOS SUBSTRATOS.—IV.1. Introducción.—IV.1.2. Material y métodos.—IV.1.3. Resultados.—1. Estequiometría.—2. Reversibilidad.—3. Especificidad de sustratos. Actividad D.R. con NADH y NADPH en las distintas etapas de purificación.—4. Participación de cofactores. Efectos de la diálisis.—Influencia de diversos quelantes sobre la actividad D.R.—Inhibición por el ácido salicílico.—IV.1.4. Discusión.—CAPITULO V.—PARAMETROS CINETICOS Y TERMODINAMICOS. MECANISMO DE REACCION.—V.1. Introducción.—V.2. Material y métodos.—V.3. Resultados.—1. Relación entre la concentración de enzima y actividad D.R. (Test de linealidad).—2. Influencia de la concentración de sustratos sobre la actividad diacetilo reductasa.—3. Inhibición por los productos. Inhibición por el NAD. Inhibición por la acetoina. 4. Inhibición por análogos estructurales del diacetilo. Acetona. Hexano 2,5 diona. Dietilcetona. α -cetoglutarato.—5. Cálculo de los parámetros termodinámicos.—V.4. Discusión.—CAPITULO

ISBN-84-600-6415-8-obra completa

ISBN-84-600-6416-6-tomo 2

Depósito legal: O. 390 - 1974

GRAFICAS SUMMA. Polígono Ind. de Silvota. Llanera, OVIEDO.

LO VI.—EFECTOS DEL PH SOBRE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA REACCION. VI.1. Introducción.—VI.2. Material y métodos.—VI.3. Resultados.—1. Influencia del pH sobre la actividad enzimática.—2. Efectos del pH sobre la estabilidad enzimática.—3. Efectos del pH sobre los parámetros cinéticos de la reacción.—VI.4. Discusión.—CAPITULO VII.—CONCLUSIONES.—8. RESUMEN.—BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO I

INTRODUCCION

La acetofna (acetil-metil-carbinol, AMC) y el diacetilo (2-3 butanodiona) son compuestos cetónicos de cuatro átomos de carbono, que proceden del metabolismo anaeróbico del piruvato en los sistemas biológicos. Ambos compuestos se encuentran muy difundidos entre levaduras y bacterias, en las que, en algunos casos, llegan a ser productos mayoritarios de la fermentación de los hidratos de carbono (véase v.g. FRATEUR, 1950; DE LEY, 1959).

Se conocen pocos datos concretos acerca de la distribución del acetilmetilcarbinol y el diacetilo en el reino animal, aún cuando ya hacia 1930 habían sido identificados como constituyentes menores de la orina humana y de la sangre de los animales superiores (SCHMALFUSS, 1930; LEMOIGNE y MONCUILLON, 1930; SCHMALFUSS y col., 1931). La concentración fisiológica de AMC y diacetilo en la sangre de aves y mamíferos se calcula en alrededor de 10 μ m (LEMOIGNE y MONCUILLON, 1930; SCHMALFUSS y col., 1934; WESTERFELD, 1945; DAWSON y HULLIN, 1954 a y b; GABRIEL y col., 1971), aunque los valores obtenidos por los distintos autores son bastante variables.

El significado biológico de la síntesis de estos compuestos en los tejidos animales no ha sido aclarado. Se ha propuesto que, en las bacterias, la producción de acetofna serviría para controlar el pH externo desviando el metabolismo de la glucosa hacia la formación de productos neutros en lugar de ácidos (GALE, 1948) y, más recientemente, HARVEY y COLLINS (1963) han señalado que actúa como mecanismo de detoxicación para retirar el exceso de piruvato intracelular en los raros casos en que se forma más piruvato del que es utilizado en otras rutas prioritarias, como cuando se incuban los microorganismos en medios ricos en citrato. Sin embargo, es dudoso que estas hipótesis formuladas para los microorganismos sean válidas en los tejidos animales, que disponen de otros sistemas de regulación del pH más eficaces y menos costosos y en los que la formación de ácido pirúvico está más sujeta al control metabólico.

I.1. BIOSÍNTESIS DE ACETOÍNA Y DIACETILO

En general la acetofna y el diacetilo derivan en los sistemas biológicos del piruvato; se ha descrito que algunos tejidos animales y vegetales pueden sintetizar también estos compuestos a partir del acetaldehído (GREEN y col., 1942; SINGER y PENSKE, 1952), pero con mayor lentitud. Durante algún tiempo ha sido frecuente considerar como precursores del AMC y el diacetilo al citrato y a las hexosas, cuya adición a los medios de cultivo estimula la síntesis microbiana de estos productos, pero este efecto se considera hoy debido a su capacidad de actuar como precursores del piruvato.

La formación de acetofna y/o diacetilo tiene lugar mediante reacciones de condensación del acetaldehído activado, un intermediario, que procede de la descarboxilación del piruvato en presencia de pirofosfato de tiamina. Se han descrito tres mecanismos de síntesis de estos compuestos: a) Producción de acetolactato por condensación de piruvato y acetaldehído activado y descarboxilación del mismo a acetofna o diacetilo; b) condensación de acetaldehído activado y acetaldehído libre, con formación de acetofna; c) condensación de acetilcoenzima-A con acetaldehído activo, dando diacetilo y, por reducción enzimática de éste, acetilmetilcarbinol.

I.1.1. Síntesis por condensación de acetaldehído y piruvato

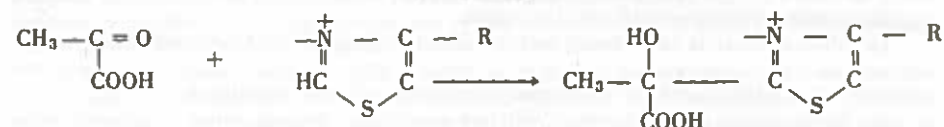
La formación de acetofna por esta vía —que opera en la mayor parte de las bacterias anaerobias facultativas y en algunas levaduras— fue demostrada por primera vez por JUNI (1952, a) en extractos de *Aerobacter aerogenes* y otras bacterias. Según el citado autor, la síntesis se efectúa

en dos etapas: a) condensación de acetaldehído activo y piruvato, dando lugar a la producción de ácido acetoláctico y b) descarboxilación del acetolactato a acetofna.

La primera de estas etapas está catalizada por el sistema enzimático piruvato oxidasa, requiere la presencia de pirofosfato de tiamina —cocarboxilasa, difosfatiamina, TPP o DPT— y es activada por iones magnesio. La reacción consta de los siguientes pasos (HOLZER y BEAUCAMP, 1961; KRAMPITZ y col., 1961):

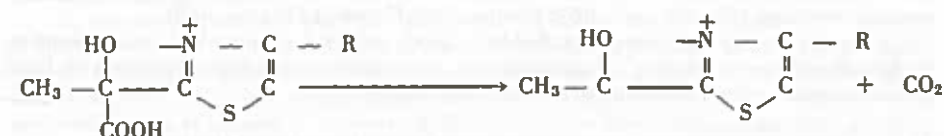
Una molécula de ácido pirúvico se une al carbono 2 del anillo tiazólico del pirofosfato de tiamina, formando un primer intermediario, el piruvato activado o α -lactil-2-pirofosfato de tiamina (Ec. I.1.).

(Ec. I.1.)



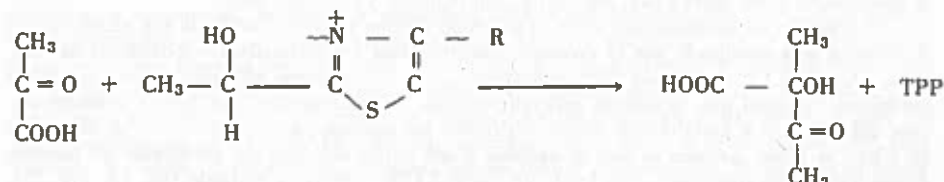
El piruvato activado, que es muy inestable se descarboxila rápidamente, dando lugar a α -hidroxietil-2-pirofosfato de tiamina (acetaldehído activado o acetaldehído-TPP) (Ec. I.2.).

(Ec. I.2.)



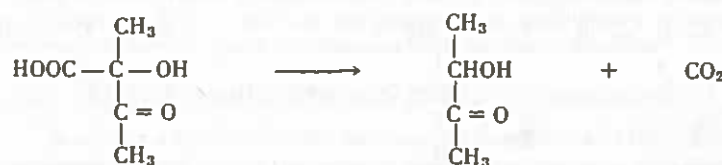
A partir del acetaldehído activo formado se produce ácido α -acetoláctico por una reacción de condensación acilólica con el piruvato preexistente. El grupo acetaldehído es transferido al ácido pirúvico, para dar pirofosfato de tiamina libre y acetolactato (Ec. I.3.).

(Ec. I.3.)



En una segunda etapa, el ácido acetoláctico se descarboxila a acetofna, mediante una reacción enzimática activada por los iones manganeso (Ec. I.4.).

(Ec. I.4.)



Esta reacción está catalizada por la acetolactato descarboxilasa o 2-acetolactato carboxilasa (Ec. 4.1.1.5.) un enzima bastante frecuente entre las bacterias, que parece ser muy específico para el isómero dextrorrotatorio del ácido α -acetoláctico, lo que subraya la importancia biológica de

participaba en la síntesis de acetofina por las muestras de músculo cardíaco porcino, obtenidas por el método de Green y colaboradores.

Para explicar estos resultados, GREEN (1952) propuso que el acetilmetilcarbinol se formaba por condensación de dos unidades de acetaldehído activo ligadas cada una de ellas a una molécula de enzima, lo que parecía concordante con el hecho de que la formación de acetofina requería la presencia del grupo activador (pirofosfato de tiamina). Sin embargo, JUNI y HEYM (1956) señalaron que el AMC procedía de la condensación de aldehído acético libre y activado, previa disociación del acetaldehído-TPP a acetaldehído libre cuando la síntesis se efectúa a partir del piruvato. La tesis de estos autores se basa en los siguientes datos experimentales:

a) La velocidad de producción de acetofina es función lineal de la concentración de enzima en presencia de sustratos y cofactores en exceso. En estas condiciones la velocidad debería ser proporcional al cuadrado de la concentración enzimática si se siguiese el mecanismo propuesto por GREEN, según el cual han de condensarse dos complejos enzima-acetaldehído-TPP para que se forme acetofina. El esquema de JUNI y HEYM predice una relación lineal entre actividad y concentración enzimática, ya que participa una sola molécula de enzima por cada molécula de AMC sintetizada.

b) Durante la descarboxilación del ácido pirúvico se produce acetaldehído libre, lo que pudo ser comprobado por destilación en corriente de Nitrógeno y recogida en una solución de bisulfito sódico. Además, al retirar por destilación el acetaldehído libre producido se observa un descenso en la formación de AMC equivalente en términos molares al aldehído acético eliminado.

Esto demuestra que el acetaldehído libre interviene en la reacción, pero no como sustrato único, en cuyo caso la síntesis de acetofina se vería reducida sólo en 1/2 del acetaldehído retirado. Por otra parte la formación de AMC, tanto a partir de piruvato como de acetaldehído, requiere la presencia de pirofosfato de tiamina, lo que prueba que el otro participante en la reacción es el acetaldehído activo y se sigue la ecuación I.6. (pág. 39).

Por lo que se sabe hasta el momento, los tejidos animales producen acetolactato por condensación de acetaldehído activado y piruvato, pero no lo utilizan como intermediario de la formación de acetofina —al menos directamente—, puesto que no tienen α -acetolactato descarboxilasa (JUNI, 1952, b; JUNI y HEYM, 1955). En cambio, sí disponen de al menos dos sistemas enzimáticos que catalizan la formación de acetilmetilcarbinol a partir de diacetilo (véanse apartados I.4. y I.5.), la diacetilo mutasa (GREEN y col., 1947) y la diacetilo reductasa (MARTÍN y BURGOS, 1970; GABRIEL y col., 1971; BURGOS y MARTÍN, 1972) y, por tanto, también puede proceder de éste.

I.3. SÍNTESIS DE DIACETILO EN TEJIDOS ANIMALES

No se conoce el mecanismo utilizado para la síntesis de diacetilo por los tejidos animales. Incluso es posible que no sea formado en ellos y que el que pueda hallarse proceda del metabolismo de la flora intestinal, ya que algunos de los microorganismos que la componen son buenos productores de este compuesto. Este parece ser el origen normal, si se excluye la ingestión por el hombre de bebidas alcohólicas, de la mayor parte del etanol presente en la sangre de la vena porta de los mamíferos (KREBS y PERKINS, 1970) y podría serlo también del diacetilo e incluso de la acetofina que, como el etanol, son productos habituales de los gérmenes anaerobios facultativos.

Sin embargo, a falta de confirmación experimental, es de suponer que exista también una síntesis tisular. En los tejidos animales se forma ácido α -acetoláctico y, aun cuando éste no sea descarboxilado enzimáticamente a acetilmetilcarbinol, por falta de la correspondiente acetolactato descarboxilasa, es previsible que lo sea espontáneamente a diacetilo. Por otra parte, concurren todos los factores necesarios para que opere la vía de condensación de acetilcoenzima-A y acetaldehído activado: piruvato descarboxilasa, pirofosfato de tiamina, ácido pirúvico y acetil-CoA.

I.4. CATABOLISMO DEL DIACETILO Y LA ACETOFINA

Aunque se ha comprobado que el acetilmetilcarbinol y el diacetilo se sitúan en algunos sistemas biológicos entre los principales productos de la fermentación de los azúcares, se ha

prestado poca atención a su catabolismo. La conversión del diacetilo en acetofina y otros compuestos y del AMC en butilenglicol (2,3 butanodiol) ha sido en cierta medida bien estudiada, pero no así la utilización de estos compuestos, a pesar de conocerse datos indicativos de que el butanodiol, en apariencia producto final de la cadena, es metabolizado rápidamente.

En las páginas siguientes se revisan los aspectos más interesantes de estos problemas.

I.4.1. Transformaciones del diacetilo: Reducción y dismutación

El diacetilo puede reducirse a acetofina mediante una reacción en la que el NADH actúa como donador de electrones, cuya estequiometría es la siguiente:

(Ec. I.10.)

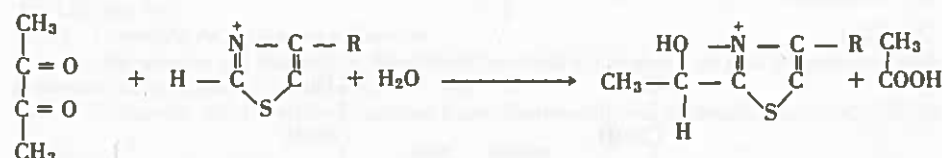


La reacción está catalizada por la diacetilo reductasa (acetofina deshidrogenasa o acetofina: NAD oxidoreductasa, (Ec. I.1.1.5.) un enzima descrito inicialmente por STRECKER y HARARY (1954) en extractos de *Staphylococcus aureus* y *Aerobacter aerogenes* que se ha comprobado está muy difundido entre las bacterias (SEITZ y col., 1963 a y b) y tejidos animales (MARTÍN y BURGOS, 1970; MARTÍN, 1971; GABRIEL y col. 1971).

STRECKER y HARARY demostraron que la diacetilo reductasa de *S. aureus* opera irreversiblemente y no activa la oxidación del AMC a diacetilo ni aun actuando acoplada a otras reacciones enzimáticas que reoxidarían rápidamente el NADH que pudiera formarse. Este resultado discrepa en cierto modo de las conclusiones publicadas anteriormente por SEBECK y RANDLESS (1952) sobre el mecanismo de utilización del butilenglicol como fuente de energía por bacterias del género *Pseudomonas*, pero ha sido repetidamente confirmado en otros sistemas biológicos (SEITZ y col., 1963 a; SPECKMAN y COLLINS, 1968; CHUANG y COLLINS, 1968; GABRIEL y col., 1971*; BURGOS y MARTÍN, 1972). De ser cierto que estos microorganismos oxidan la acetofina a diacetilo mol a mol, o la diacetilo reductasa no participa en la reacción o de hacerlo ha de tratarse de una especie enzimática distinta de las hasta ahora descritas.

El diacetilo puede también transformarse en ácido acético y acetofina o diacetilmetilcarbinol por una reacción de dismutación observada por primera vez por GREEN y colaboradores (1947) en el músculo pectoral del palomo. Una molécula de diacetilo reacciona con una de agua y otra de pirofosfato de tiamina, dando lugar a la formación de ácido acético y acetaldehído activo.

(Ec. I.11.)

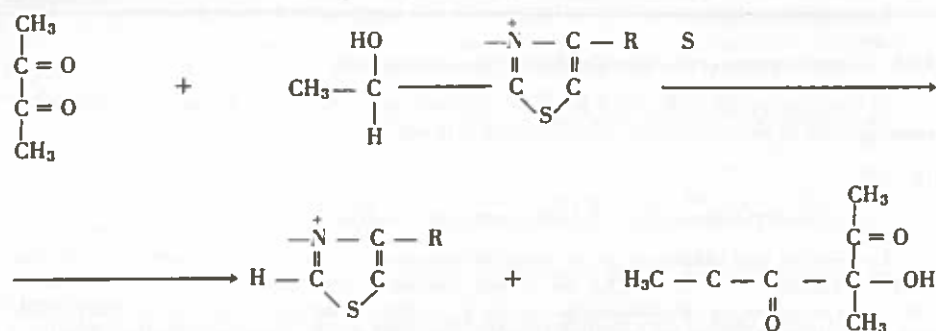


El acetaldehído activo puede seguir dos caminos: disociarse en pirofosfato de tiamina y aldehído acético libre y condensarse con éste, dando lugar a acetofina (Ec. I.5. y I.6., págs. 38 y 39) o condensarse directamente con diacetilo y pasar a formar un nuevo cetol, el diacetilmetilcarbinol (Ec. I.12.). El balance entre estas dos vías depende de la concentración de diacetilo en el medio: si es baja, se dificulta su condensación con el aldehído acético activo y éste será utilizado, en su mayor parte, para la síntesis de AMC; si es alta, la mayoría del acetaldehído-TPP

* GABRIEL y sus colaboradores (1971) han señalado también que pueden detectarse pequeñas cantidades de diacetilo formadas enzimáticamente a partir de la acetofina en presencia de metasulfato de fenazina y nitroazul de tetrazolio para reoxidar el NADH formado, NAD y un extracto de polvo acetónico de hígado de rata, pero la baja pureza de sus preparaciones introduce un factor de inseguridad acerca de la participación de la diacetilo reductasa en esta reacción.

se condensará con el diacetilo antes de poder disociarse a aldehído libre, con lo que predominará la producción de diacetil-metil-carbinol sobre la de acetofina.

(Ec. I.12.)



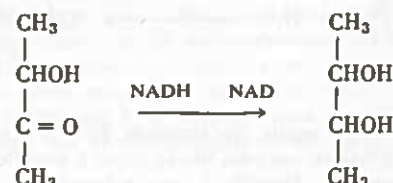
Las reacciones de dismutación del diacetilo están catalizadas por un enzima TPP-dependiente —denominado por GREEN y colaboradores diacetilo mutasa— que cataliza también la formación de acetolactato a partir del piruvato (SCHWEET y col., 1951; JUNI y HEYM, 1956) lo que demuestra que se trata de la piruvato oxidasa.

I.4.2. Transformaciones de la acetofina: reacción butilénlglicol deshidrogenasa

El catabolismo de la acetofina suele estar asociado con una abundante producción de butilénlglicol. Se ha demostrado (DOISY y WESTERFELD, 1943) que el AMC y el propio butanodiol pueden actuar como donadores de grupos acetilo en la acetilación del ácido p-aminobenzóico y que las dispersiones tisulares de riñón de conejo convierten parte del acetilmetilcarbinol en acetato y acetoacetato (DAWSON y HULLIN, 1954b), pero la cantidad de acetofina utilizada por estos mecanismos es sólo una pequeña fracción del total metabolizado.

La conversión de la acetofina en butilénlglicol se efectúa por una reacción de oxidorreducción semejante a la que da lugar a la formación de AMC a partir del diacetilo: el grupo cetónico del acetilmetilcarbinol es reducido a alcohol secundario por la transferencia de electrones desde el NADH, que resulta oxidado a NAD (Ec. I.13.). Esta reacción es reversible, aunque el equilibrio es muy favorable al sentido AMC-butanodiol.

(Ec. I.13.)



La reducción de la acetofina según la ecuación I.13. está catalizada por la butilénlglicol deshidrogenasa (BGDH ó 2-3 butilénlglicol: NAD oxidorreductasa, (Ec. I.1.1.4.) que, como la diacetilo reductasa, fue descrita por primera vez por STRECKER y HARARY (1954) en extractos de *A. aerogenes* y *S. aureus*. Los mismos autores comprobaron que, a pesar de la similitud existente entre las dos reacciones, la reducción del AMC y la del diacetilo estaban catalizadas por enzimas distintos y parcialmente separables por precipitación con sulfato amónico y sulfato de protamina y por adsorción en gel de fosfato cálcico.

Sin embargo, aún es hoy objeto de controversia la posibilidad de que las actividades D. R. y BGDH puedan corresponder a la misma especie enzimática, BRYN, HETLAND y STORMER (1971)

han concluido —confirmando datos anteriores respecto a la diacetilo reductasa y a la butilénlglicol deshidrogenasa de origen bacteriano (JUNI y HEYM, 1957)— que los dos enzimas son idénticos en la cepa de *Aerobacter aerogenes* estudiada por ellos, al observar un cociente aproximadamente constante en las distintas etapas de un sistema de purificación que permite multiplicar la actividad específica original, por un factor de 124. Las preparaciones de BRYN y colaboradores parecen electroforéticamente puras, pero es de lamentar que no se haya demostrado la coincidencia entre migración de proteína y actividad, ni se ofrezca un estudio estadístico para comprobar si las diferencias apreciadas en la relación D.R./BGDH a lo largo del proceso de purificación pueden ser debidas a errores experimentales o tienen algún significado.

En cualquier caso, una conclusión positiva tiene más valor que una negativa en el problema que nos ocupa, puesto que el hecho de no conseguir separar dos enzimas por un método de aislamiento determinado no excluye que sean distintos. Se considera, por tanto, que la diacetilo reductasa y la butilénlglicol deshidrogenasa son especies enzimáticas diferentes, aunque no se descarta que pueda existir un tercer enzima, al que estén asociados las dos actividades catalíticas.

MARTÍN y BURGOS (1970) han detectado la presencia de BGDH en tejidos animales, posteriormente confirmada por GABRIEL y sus colaboradores (1971) en hígado de rata. Por lo que se sabe hasta el momento (GABRIEL y col., 1971; BURGOS y MARTÍN, 1972), este enzima y la diacetilo reductasa están claramente diferenciados en los mamíferos (véase apartado I.5.).

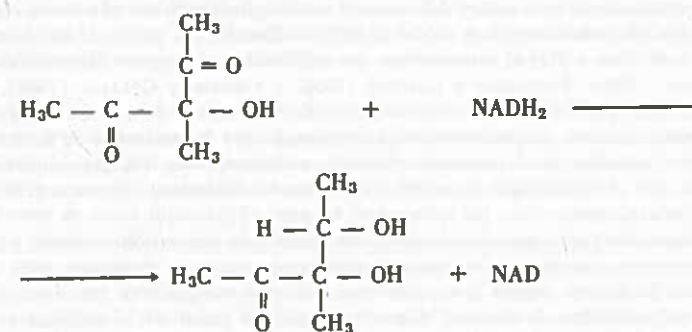
I.4.3. Utilización del diacetilo, la acetofina y el butilénlglicol: ciclo de butanodiol

Se conoce muy poco respecto a los mecanismos de utilización biológica de estos compuestos, a pesar de existir datos demostrativos de que son consumidos. En los tejidos animales el diacetilo puede ser aprovechado, al menos en parte, por la reacción de dismutación descrita en el apartado I.4.1., uno de cuyos productos es el ácido acético; es de suponer que esta misma reacción opere también en otros sistemas biológicos, puesto que el enzima que la cataliza, la piruvato oxidasa, se encuentra muy difundido también en bacterias y levaduras. Respecto a la acetofina y el butilénlglicol, DAWSON y HULLIN (1954a), completando experiencias anteriores (GREENBERG, 1943; WESTERFELD y BERG, 1943) han demostrado que, tras ser inyectados por vía intravenosa, su nivel sanguíneo desciende rápidamente y en mucha mayor proporción de lo que cabría explicar por excreción urinaria, lo que permite suponer que de algún modo son metabolizados.

Algunos microorganismos, entre ellos *Micrococcus ureae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens*, crecen en medios que contienen AMC y butanodiol como única fuente de energía. JUNI y HEYM (1955) han propuesto que estos compuestos y el diacetilo son utilizados mediante una ruta cíclica que consta de las siguientes etapas:

- Oxidación del butilénlglicol a acetofina acoplada a la reducción de NAD a NADH (Ec. I.13, pág. 44).
- Oxidación de la acetofina a diacetilo.
- Dismutación del diacetilo a diacetilmetilcarbinol y liberación de una primera molécula de acetato (ecuaciones I.11. y I.12., págs. 43 y 44).
- Reducción del diacetilmetilcarbinol a acetilbutanodiol, con oxidación de NADH a NAD.

(Ec. I.14.)



e) Hidrólisis del acetilbutanodiol a ácido acético y butilén-glicol, con lo que el ciclo re-comienza.

(Ec. I.15.)



El resultado final del ciclo es que por cada molécula de butanodiol, AMC o diacetilo que ingresa, se forman dos de acetato, que puede incorporarse al ciclo de Krebs vía acetilcoenzima-A o acetaldehído.

Se ha comprobado que ciertas cepas de *Ps. fluorescens* y *Ps. aeruginosa* utilizan el butilén-glicol transformándolo en acetato y acetaldehído, previa oxidación a acetoina y diacetilo como intermediarios (SEBECK y RANDLESS, 1952), al parecer siguiendo el mecanismo que se representa en la figura 2.

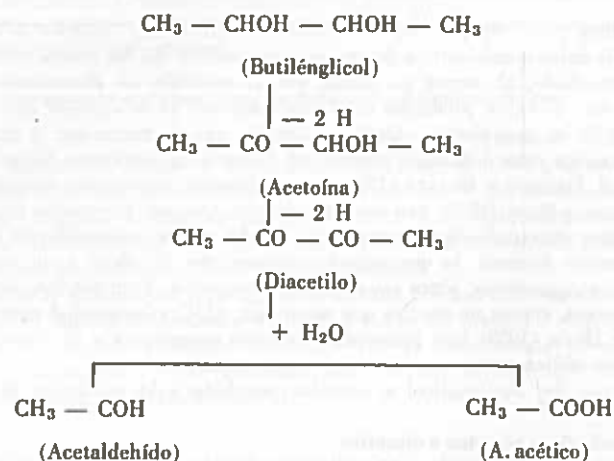


Figura 2.—Oxidación del butanodiol por *Pseudomonas fluorescens* 64 OSU. (Según SEBECK y RANDLESS, 1952).

El funcionamiento de esta ruta y del ciclo del butilén-glicol requiere que exista en los sistemas biológicos algún procedimiento para oxidar el AMC a diacetilo. A partir de los datos de Sebeck y RANDLESS y de JUNI y HEYN, parece obvio que realmente existe, pero MICHAELIAN y HAMMER (1936), PORTNO (1966), SPECKMAN y COLLINS (1968) y CHUANG y COLLINS (1968), entre otros, han estudiado este problema en diversas especies de bacterias y levaduras, llegando a la conclusión contraria. En este mismo orden, está descartado que la oxidación de la acetoina pueda efectuarse por inversión de la reacción diacetilo reductasa —la vía más directa (Ec. I.10., pág. 22)— ya que el enzima que la cataliza opera irreversiblemente (STECKER y HARARY, 1954; SEITZ y col. 1963a; GABRIEL y col., 1971; BURGOS y MARTÍN, 1972).

Cabe pensar, por tanto, que el ciclo de butilén-glicol y la conversión a acetato y acetaldehído son mecanismos que operan sólo en unos pocos microorganismos, dado que en la mayor parte de los sistemas biológicos parece faltar una etapa de paso obligado en las dos secuencias. Sin embargo, la imposibilidad de detectar diacetilo formado a partir de la acetoina podría ser debida a que éste fuese metabolizado tan rápidamente que la concentración de equilibrio entre

producción y consumo quedase por debajo de la sensibilidad de los métodos de determinación empleados; SUOMALAINEN y RONKAINEN (1968) han demostrado que esto es lo que ocurre en el caso, muy similar, de la descarboxilación espontánea del ácido acetoláctico a diacetilo, que había sido puesta en duda por COLLINS y su grupo.

Se ha sugerido también que el AMC y el butilén-glicol podrían ser convertidos en grasa (DAWSON y HULLIN, 1954 b) pero hasta el momento no hay base experimental suficiente para confirmarlo.

I.5. DIACETILO REDUCTASA EN TEJIDOS ANIMALES

La presencia de diacetilo reductasa en el reino animal fue demostrada por primera vez en diversos órganos de ternera, gallina y paloma, por MARTÍN y BURGOS, (1970), siendo confirmada más tarde por otro grupo en hígado de rata (GABRIEL y col., 1971). La D.R. parece tener una amplia distribución entre las aves y los mamíferos, con mayor concentración en el hígado, donde se observan constantemente las actividades específicas más altas (MARTÍN, 1971).

Los datos publicados hasta el momento muestran que el/los enzima/s de tejidos animales (MARTÍN y BURGOS, 1970; GABRIEL y col., 1971; BURGOS y MARTÍN, 1972; MARTÍN, 1971) y el/los de origen bacteriano (STRECKER y HARARY, 1954; SEITZ y col., 1963 a; SPECKMAN, 1969) tienen diversas propiedades cinéticas comunes —operan irreversiblemente, no requieren activadores metálicos, presentan un máximo de actividad en torno a pH 6— lo que sugiere que, en términos generales, responden a los mismos mecanismos de regulación. En cambio, a diferencia de lo que ocurre en las bacterias, la diacetilo reductasa y la butilén-glicol deshidrogenasa parecen ser dos enzimas claramente distintas en los tejidos de los mamíferos: GABRIEL y colaboradores (1971) han demostrado que las dos actividades pueden ser separadas parcialmente por cromatografía en CM-Sephadex de preparaciones de hígado de rata y BURGOS y MARTÍN (1972) han obtenido muestras purificadas de hígado de ternera totalmente exentas de actividad butilén-glicol deshidrogenasa, que resulta eliminada por precipitación fraccionada con acetona. Además, las preparaciones purificadas de hígado bovino presentan una gran especificidad hacia el diacetilo, mostrando que las exigencias respecto a la estructura del sustrato oxidado son aún más estrictas que la presencia de dos grupos cetónicos en la molécula o de un grupo cetónico en la proximidad de otro metílico (BURGOS y MARTÍN, 1972), lo que explica por qué este enzima no cataliza la reducción de la acetoina a butilén-glicol.

Por otra parte, la diacetilo reductasa y la butilén-glicol deshidrogenasa poseen características distintas en los animales superiores. La butilén-glicol deshidrogenasa requiere iones metálicos divalentes como activadores, cataliza una reacción reversible y, al menos en hígado de rata, se comporta como una especie molecular única en las cromatografías en CM-Sephadex, según los datos publicados por GABRIEL y colaboradores. El mismo tratamiento resuelve la actividad diacetilo reductasa en dos picos, repitiéndose este resultado por cromatografía de uno de ellos. De un modo similar, la filtración en gel de Sephadex G-100 de preparaciones de D. R. de hígado bovino utilizando como eluyente tampón fosfato 0.5 M pH 6.3 separa dos picos de actividad que corresponden a pesos moleculares 76.000 y 26.000 (BURGOS y MARTÍN, 1970); BURGOS y MARTÍN (1972) han comprobado que la proporción entre ambas bandas varía con la molaridad del eluyente, lo que les ha llevado a sugerir que podría tratarse del mismo enzima en distintos estados de asociación, cuyo equilibrio fuese regulado por la fuerza iónica del medio, correspondiendo la banda de peso molecular 26.000 a un monómero y la de peso molecular 76.000 a un trímero.

No se ha aclarado aún el significado biológico de la reacción diacetilo reductasa. Se ha propuesto que podría actuar en los tejidos animales como mecanismo de detoxicación, para evitar la acumulación de diacetilo o como sistema de reoxidación de los piridin-nucleótidos reducidos en la glicolisis y otras vías oxidativas (MARTÍN, 1971; BURGOS y MARTÍN, 1972).

La primera de estas hipótesis se basa en la localización preferentemente hepática del enzima y en que muchos de los microorganismos del intestino son buenos productores de diacetilo, por lo que cabe esperar la presencia de cantidades notables de éste en la vena porta; no sería improbable, por tanto, que la diacetilo reductasa tuviese en el hígado un papel detoxicante similar al que ha sido asignado al alcohol deshidrogenasa en idénticas circunstancias (KREBS y PERKINS, 1970). La segunda se apoya en las características de las vías metabólicas en que participa la

diacetilo reductasa, cuyo balance final —en términos de piridín nucleótidos— es la oxidación de una molécula de NADH, como mínimo, por cada dos de piruvato consumidas y en el hecho de que intracelularmente el enzima se concentra con preferencia en la fracción soluble (MARTÍN y BURGOS, 1970), en la que también se encuentran los enzimas glicolíticos y que es la más apropiada para realizar una función de esta naturaleza.

Los estudios cinéticos de la reacción pueden dar la información necesaria para decidir cuál es su papel biológico, pero los datos que han sido aportados hasta el momento, son contradictorios. Utilizando preparaciones de hígado de rata, GABRIEL y sus colaboradores (1971) han calculado en 48 mM. el valor de la constante de Michaelis para el diacetilo, mediante representaciones de Lineweaver-Burk a concentración constante de NADH. Este valor es tan extremadamente alto —probablemente dos o tres órdenes de magnitud por encima de la concentración fisiológica del sustrato, según los mismos autores— que asignaría necesariamente una función detoxicante a la diacetilo reductasa, ya que el enzima apenas podría operar en condiciones normales y su actividad sólo sería significativa en caso de un aumento notable de la concentración tisular del diacetilo.

MARTÍN y BURGOS (1972) han obtenido cifras muy distintas para el enzima de hígado de ternera empleando el método de representaciones doblemente inversas de FLORINI y VESTLING (1957), que permite determinar simultáneamente todas las constantes cinéticas de la reacción. Según estos autores, la constante de Michaelis para el NADH es de 0.1 mM., valor que se aproxima a la concentración de NADH que cabe esperar en los tejidos animales (GLOCK y McLEAN, 1955), y de 39.8 μ M. para el diacetilo, más de mil veces inferior a la descrita con preparaciones de hígado de rata. Si la suposición de GABRIEL y colaboradores acerca de la concentración tisular de diacetilo es correcta, estos valores permitirían la actuación del enzima bovino en las condiciones fisiológicas y su participación en la regulación del estado de oxidación de los piridín nucleótidos.

Cabe sospechar que el dato de KM diacetilo calculado por Gabriel y colaboradores sea erróneo. El método gráfico aplicado por ellos para la determinación de la constante sólo presenta un aspecto parcial de la reacción y puede dar valores muy alejados de los reales si no se demuestra previamente, como ocurre en este caso, que la concentración de sustrato fijo es suficiente para saturar al enzima. Sin embargo, también es posible que la discrepancia de sus resultados con los de MARTÍN y BURGOS, obtenidos por un procedimiento más fidedigno, se deba a que la diacetilo reductasa de distintos orígenes tenga propiedades muy diferentes. Esto mismo es lo que sugiere la comparación entre algunos datos conocidos referentes a los enzimas de hígado de paloma y de bovino, tales como su distribución intracelular y la actividad específica de los extractos tisulares no purificados (MARTÍN y BURGOS, 1971).

Esta tesis está concebida como un estudio de la diacetilo reductasa de hígado de paloma en orden a establecer sus diferencias con la de hígado de bovino y rata, ampliar el conocimiento de las diacetilo-reductasas animales y completar los estudios cinéticos realizados por otros autores encaminados a decidir el mecanismo de la reacción.

CAPITULO II

MATERIAL, METODOS Y PRODUCTOS (ASPECTOS GENERALES)

II.1. MATERIAL Y REACTIVOS

Las pesadas se efectuaron en balanzas analíticas «Sartorius» modelos 2.400 y 2.600 y en granatarios «OHAUS» modelo 750 S.

Para las mediciones de pH se utilizó un pHmetro «Radiometer» modelo PHM-28b.

Las homogeneizaciones de los tejidos se realizaron en un triturador de cuchillas «M.S.E.» modelo 7.700 y un homogeneizador de vidrio tipo «Potter Elvehjem».

Las centrifugaciones de las preparaciones enzimáticas se llevaron a cabo en una ultracentrífuga refrigerada «Beckman-Spinco» modelo L-50. Para las centrifugaciones ordinarias se empleó una centrífuga «MARTIN CHRIST» modelo Universal Junior 33.000.

Las diálisis se efectuaron a 0-4°C., utilizando tubo de celofán «Visking» de 2,5 cm. de diámetro.

Para las liofilizaciones se empleó un aparato tipo «Quickfit» equipado con una bomba de alto vacío «EDWARD» mod. ED-35, y dos condensadores de acetona-nieve carbónica.

Las cromatografías se efectuaron en gel de SEPHADEX (Pharmacia, Upsala, Suecia) con columnas de vidrio de la misma marca, modelos K 15-90 y K 25-45. Las fracciones se recogieron en un colector LKB modelo 7.000.

Las determinaciones espectrofotométricas en espectrofotómetros de doble haz, Beckman DB y Beckman DBG, provistos de registradores automáticos con expansor de escala. Para las determinaciones de actividades enzimáticas el bloque de cubetas del espectrofotómetro fue termostatado, conectándolo a un ultratermostato «Colora» modelo N. Para acelerar el equilibrio térmico de la mezcla de reacción, la habitación en que se efectuaron estas determinaciones fue termostatada a la misma temperatura. Las determinaciones colorimétricas se efectuaron en los citados espectrofotómetros o en un colorímetro «BAUCH & LOMB» modelo Spectromic 20.

A lo largo del presente trabajo se utilizaron productos químicos, calidad reactivo, de las marcas comerciales Merck, BDH, Sigma y similares. La acetoina fue purificada previamente a su uso, por medio de lavado bajo nitrógeno con éter etílico (deshidratado y libre de peróxidos) según la técnica descrita por R. MARTÍN y J. BURGOS (1972), al comprobarse que contenía restos de diacetilo. Los productos bioquímicos fueron suministrados por Boehringer, excepto las muestras de proteínas utilizadas en la determinación de pesos moleculares, que procedían de Calbiochem.

El agua empleada en las disoluciones fue desionizada en un desmineralizador SETA modelo D/400 y posteriormente destilada en vidrio.

II.2. MÉTODOS

II.2.1. Determinación de proteína

2.1.A. Método de biuret. Técnica de Chance y Redfearn (1961)

Reactivos:

- Biuret.—1,5 grs. de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 6 grs. de tartrato sódico-potásico, 30 grs. de sosa y 1 gr. de yoduro potásico, disueltos en un litro de agua destilada.
- Solución acuosa de colato sódico al 40 %.

Técnica.—A 1,5 mls. de reactivo de biuret se añadieron entre 0,5 y 1,5 mls. de muestra conteniendo de 1 a 5 mgs. de proteína y el volumen se llevó a tres mls. con agua destilada. Después de 30 minutos de reposo se leyó la absorbancia a $540\text{ m}\mu$, contra un blanco sin proteína, y los resultados se refirieron a la gráfica patrón de la figura 3, que se obtuvo a partir de una solución de ovoalbúmina de concentración conocida.

Ocasionalmente fue necesario añadir unas gotas de colato sódico (al 40 %) para eliminar la turbidez de las muestras.

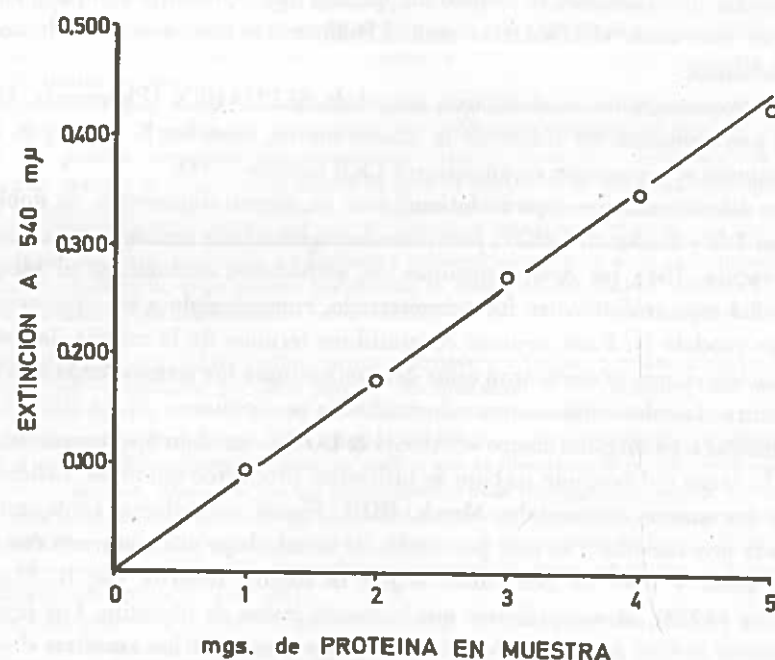


Figura 3.—Gráfica standard para las determinaciones de proteína por el método del biuret. Proteína patrón ovoalbúmina.

2.1.B. Digestión ácida y neslerización

Se realizó siguiendo el método de determinación de nitrógeno de JOHNSON (1941).

Reactivos utilizados:

Acido sulfúrico concentrado NaOH 4N.

Agua oxigenada de 30 vols. Reactivo de Nessler: 4 grs. de IK, 4 grs. de I_2Hg y 1,75 grs. de goma arábiga, diluidos en un litro de agua destilada.

Técnica.—De la suspensión o solución de proteína problema se pipetó, en el fondo de sendos tubos de ensayo, perfectamente limpios, una cantidad adecuada de muestra (10-100 microgramos de nitrógeno). Se prepararon dos blancos con 0,2 mls. de agua destilada. Los tubos se secaron en una estufa a $100-110^\circ\text{C}$. (de 3 a 5 horas) y una vez secos se digirieron a la llama de un mecherón Bünsen con 0,2 mls. de ácido sulfúrico concentrado. Se trataron a continuación con 2-3 gotas de agua oxigenada de 30 vols. (o las gotas necesarias para que el digerido quedase transparente e incoloro) y se añadieron, en el orden que se citan, 4,8 mls. de agua destilada, 2 mls. de reactivo de Nessler y 3 mls. de NaOH 4N. El contenido se agitó fuertemente y se midió luego la absorbancia a 490 milimicras . El color amarillo que se desarrolla tras la adición del reactivo de Nessler es estable al menos un día. Todas las muestras se analizaron por triplicado y los valores que se indican fueron, en cada caso, la media aritmética de las tres réplicas.

Las lecturas se refirieron a la gráfica patrón de la figura 4, obtenida a partir de una solución de ovoalbúmina.

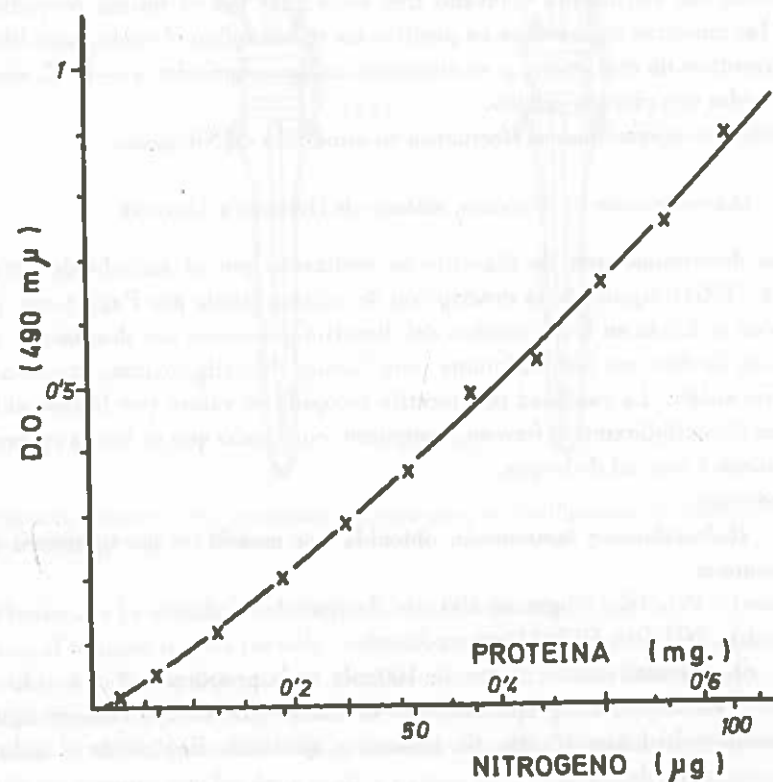


Figura 4.—Gráfica patrón para las determinaciones de proteína por el método de Johnson. (Patrón: ovoalbúmina).

2.1.C. Extinción a 280-260 milimicras (WARBURG y CHRISTIAN 1941)

En las preparaciones de bajo contenido protéico, en los que no pudo éste determinarse por los métodos descritos y en las que interesaba conservar la totalidad de la muestra, la proteína fue determinada espectrofotométricamente, a partir de la absorbancia a 280 y 260 m μ , aplicando la fórmula:

$$\text{mgs. de proteína/ml.} = (1,55 \times E_{280}) - (0,76 \times E_{260})$$

2.2. Purificación de la acetoina

Se llevó a cabo siguiendo el método descrito por WESTERFELD (1945), modificado por MARTÍN y BURCOS (1972). La acetoina se trituró en un mortero de porcelana, en el que fue lavada con éter etílico deshidratado y libre de peróxidos (que se obtuvo por tratamiento con alambre de sodio y destilación en presencia de hierro reducido). El producto se filtró a través de una capa de papel de filtro ordinario. El depósito fue retriturado y lavado tres veces más por el mismo procedimiento.

A las muestras de acetoina ya purificadas se les aplicó el vacío, para liberarlas de los residuos de éter etílico y se almacenó en un congelador a -15°C . dentro de un desecador con cloruro cálcico.

Todas las operaciones se efectuaron en atmósfera de Nitrógeno.

II.2.3. Determinación de diacetilo, método de OWADES y JACOVAK

Las determinaciones de diacetilo se realizaron por el método de OWADES y JACOVAK (1963), siguiendo la descripción del mismo citada por PACK y col. (1964). La técnica se funda en la separación del diacetilo del medio por destilación a 65°C . y reacción de éste con hidroxilamina para formar dimetilglioxima, que es un compuesto no volátil. La cantidad de diacetilo recogido se valora por la intensidad del color del dimetilglioximato ferroso, compuesto coloreado que se forma en presencia de amoníaco y una sal de hierro.

Reactivos:

1) *Hidroxilamina tamponada*, obtenida por mezcla de las siguientes disoluciones acuosas:

- PO_4HK_2 : 33 grs. en 100 mls. de agua destilada.
- $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$: 11 grs. en 25 mls.
- Acetato sódico: 35 grs. de 100 mls. en la proporción 2 : 4 : 1.

2) *Acetona fosfato*, preparada disolviendo 29 grs. de PO_4HK_2 en agua destilada, añadiendo luego 40 mls. de acetona y ajustando finalmente el volumen a 200 mls. con agua destilada.

3) *Tartrato alcalino*, preparado mezclando una disolución saturada a 20°C ., de tartrato sódico potásico con hidróxido amónico concentrado en la proporción 22 : 3.

4) *Disolución ácida de sulfato ferroso*, obtenida disolviendo 5 grs. de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ en 100 mls. de una disolución acuosa de ácido sulfúrico al 1 %. Este reactivo fue utilizado siempre poco después de su preparación, antes de que comenzara a aparecer un ligero color amarillo, que desarrolla tras un almacenamiento prolongado.

Técnica.—Las destilaciones se realizaron utilizando el dispositivo que aparece en el esquema de la figura 5., desarrollado por este Departamento (MEDARDE y BURCOS, trabajo no publicado) con un contenido en diacetilo entre 1 y 50 $\mu\text{grs.}$ se transfirieron al tubo I, que fue puesto en un baño termostático a 65°C . El diacetilo fue arrastrado al tubo II por corriente de Nitrógeno, con un flujo de 100 a 150 mls./min., durante 90 a 120 minutos, siendo recogido en éste con un ml. de la disolución de hidroxilamina tamponada.

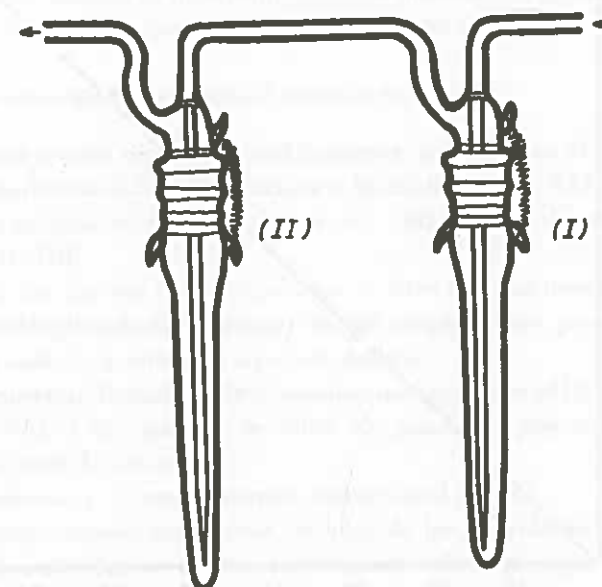


Figura 5.—Esquema del mecanismo utilizado para las destilaciones de diacetilo por el método de OWADES y JACOVAK (1963).

Finalizada la destilación, el tubo II se colocó en un baño a 75°C . durante 10 minutos, al término de este período, se añadieron 0,5 mls. de acetona fosfato, 1,5 mls. de tartrato alcalino y 0,1 mls. de la disolución ácida de sulfato ferroso, agitando inmediatamente después. El volumen se ajustó a 5 mls. con la disolución de fosfato bipotásico al 33 % y se midió la intensidad del color resultante a 530 m μ , comparando las lecturas con las de la gráfica patrón de la figura 6.

A pesar de que los resultados obtenidos por este método son muy reproducibles, en todas las determinaciones de diacetilo efectuadas se incluyeron patrones internos.

Obtención de la gráfica patrón

A partir de una disolución de diacetilo (40 mg./ml.) en el reactivo de hidroxilamina tamponada, se obtuvieron por triplicado muestras con un contenido total de diacetilo de 3,75, 7,5, 15, 30, 60 y 80 μ grs. El volumen se ajustó a 2 mls. con el reactivo de hidroxilamina y se determinó el diacetilo por el método de OWADES y JACOVAK, sin destilación previa, con los resultados que se representan en la figura 6. Los puntos que aparecen en la gráfica corresponden a la media aritmética de tres réplicas.

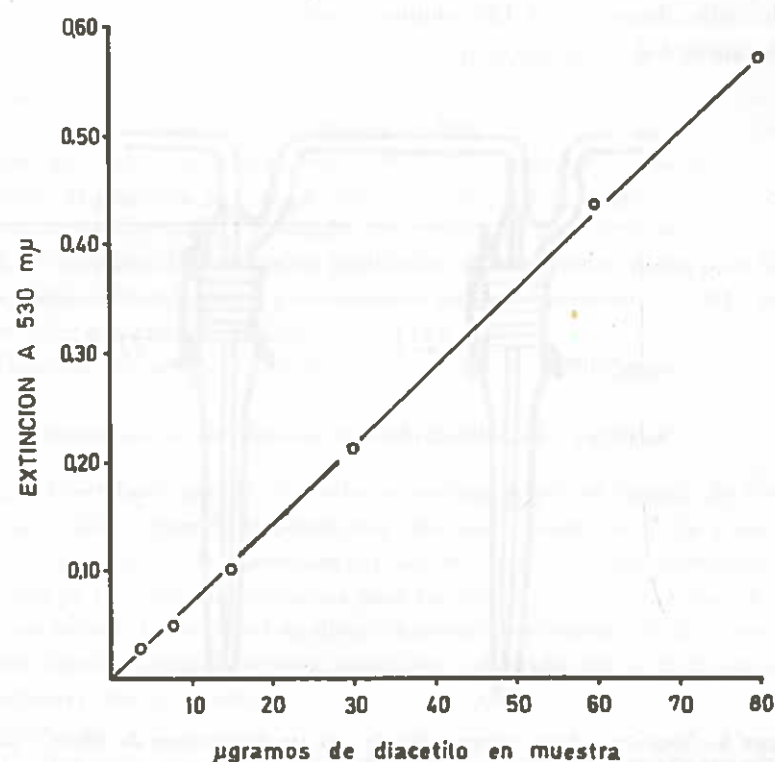


Figura 6.—Gráfica patrón para la determinación de diacetilo por el método de OWADES y JACOVAK.

II.2.4. Determinación de la suma de diacetilo y acetoína. Método de Westerfeld (WESTERFELD (1945)).

Este método es una adaptación al test de Voges Proskauer (BARRIT 1963). Determina por lo tanto la suma de acetoína y diacetilo, basándose en la oxidación de la acetoína a diacetilo, por acción de un álcali y reacción, en medio básico, del

diacetilo con los grupos guanidínicos de la creatina, dando lugar a la formación de un compuesto de color rosáceo, que tiene su máxima absorbancia a 530 mμ.

Reactivos:

- 1) Creatina al 0,5 % en agua destilada.
- 2) Disolución de α -naftol al 5 %, en NaOH, 2,5 N. Este reactivo debe ser preparado inmediatamente antes de su uso.

Técnica.—Se añadieron a 5 mls. de muestra con un contenido de acetoína o diacetilo, entre 1 y 15 μ grs. 1 ml. de creatina y 1 ml. de una disolución de naftol en sosa, en el orden citado, agitando inmediatamente después. Las lecturas de la absorbancia a 530 mμ, se efectuaron contra un blanco compuesto por todos los reactivos, menos la acetoína y el diacetilo. Las muestras que contenían diacetilo se leyeron al cabo de 15 minutos y las que contenían acetoína a los 90.

En todos los análisis se incluyeron patrones internos con cantidades conocidas de acetoína y diacetilo, a cuyas lecturas se refirieron las de las muestras.

II.2.5. Determinación de la actividad diacetilo reductasa.

Se llevaron a cabo espectrofotométricamente, siguiendo en el tiempo los cambios en la absorbancia a 340 mμ debidos a la oxidación del NADH a NAD. Este procedimiento se basa en el hecho de que por cada mol. de diacetilo reducido se oxida uno de NADH.

Con el fin de eliminar las interferencias de otros enzimas inespecíficos (NADH oxidasa y Butilénlicoldeshidrogenasa) en las preparaciones poco purificadas se realizaron los análisis, mediante el siguiente sistema:

Cubeta muestra: Tampón fosfato bisódico monopotásico pH 6,1, 0,05 M diacetilo 10 mM, NADH 0,6 μ moles, acetoína 15 μ moles, y preparación enzimática en un volumen total de tres mls.

Cubeta referencia: Como la anterior, omitiendo el diacetilo.

En las preparaciones purificadas, exentas de las actividades antes señaladas, los análisis de actividad se efectuaron poniendo solamente agua destilada en la cubeta referencia, y suprimiendo la acetoína en la cubeta muestra.

CAPITULO III

PURIFICACION Y PESO MOLECULAR DE LA DIACETILO REDUCTASA DE HIGADO DE PALOMA

III.1. INTRODUCCIÓN

La purificación de los enzimas a partir de sus fuentes naturales representa con frecuencia una labor tan tediosa cuan imprescindible para determinados estudios posteriores. Normalmente, el enzima buscado supone un tanto por ciento muy pequeño del peso seco del material inicial

y del contenido protéico total, que en gran parte puede estar constituido por otros enzimas, cuyas propiedades son a veces muy parecidas a las del deseado. Para estudiar propiedades tales como la especificidad de sustratos es, sin embargo, inevitable afrontar cuantas dificultades presente su purificación, hasta obtenerlo en un estado de pureza tal que resulten eliminadas otras actividades enzimáticas que induzcan a error en las determinaciones.

No existe un método general de purificación enzimática. Los métodos utilizados para purificar un determinado enzima desnaturalizan otros; ligeras modificaciones químicas de una proteína enzimática afectan a su comportamiento durante la purificación, y pequeñas variaciones estructurales pueden modificar considerablemente su comportamiento enzimático. Existen sin embargo ciertos principios fundamentales de purificación enzimática, en los que se basan la mayor parte de los métodos utilizados a este fin.

El proceso de purificación va precedido de la extracción del enzima del tejido en que se encuentra, lo que se lleva a cabo destruyendo su organización celular. Puede conseguirse esto sometiendo el tejido a sonicación, homogeneizándolo en una batidora de cuchillas o en un homogeneizador de vidrio, o por la acción de ciertos disolventes (acetona, por ejemplo).

La purificación de un enzima consiste en separar la proteína enzimática objeto de estudio del resto de los componentes del extracto por fraccionamientos sucesivos. Para ello se aplica una serie de métodos, de los que los más frecuentes son los que se citan a continuación:

1) *Precipitación*

La solubilidad de la mayor parte de las proteínas en disoluciones acuosas se debe a la interacción entre las moléculas bipolares del agua y los grupos ionizados de las moléculas protéicas. La precipitación suele ser consecuencia de que la fuerza de atracción entre las moléculas protéicas (proteína-proteína), superan a las existentes entre las proteínas y el agua. La intensidad de las interacciones electrostáticas entre las propias moléculas de proteína, viene dada por la fórmula:

$$F = \frac{e^+ e^-}{D r^2}$$

siendo D la constante dieléctrica del medio. Los reactivos que cambian la constante dieléctrica o la fuerza iónica de una disolución acuosa han de influir, por tanto, en la solubilidad protéica.

Las proteínas son polielectrolitos con distinto número y tipo de grupos ionizables, que en cada molécula protéica es, por tanto, función del pH; hasta con alterar éste, conservando las otras circunstancias fijas, para producir un cambio en su solubilidad.

La aplicación de estos principios a las disoluciones enzimáticas, permite fraccionarlas en virtud del distinto grado de solubilidad de las proteínas.

a) *Precipitación fraccionada por disolventes orgánicos*

Los disolventes orgánicos, tales como el etanol, metanol y acetona, producen la precipitación de las proteínas en las disoluciones acuosas, debido a que reducen la constante dieléctrica del medio y aumentan por tanto las fuerzas de atracción entre las moléculas protéicas y disminuyen las existentes entre las proteínas y el agua.

La aplicación de esta técnica tiene la limitación de que estos disolventes actúan con frecuencia como agentes desnaturizantes y producen por tanto la inactivación de los enzimas. Su empleo obliga a tomar precauciones especiales. La temperatura del disolvente debe ser de alrededor de -15°C . y su adición a las muestras ha de realizarse de manera que la temperatura se mantenga siempre en torno a 0°C . La separación del precipitado requiere pues el uso de centrifugas refrigeradas.

b) *Precipitación fraccionada por cambios de pH.*

La solubilidad de las proteínas varía notablemente con el pH de la disolución y cada proteína tiene un valor pH para el cual su solubilidad es mínima. Las variaciones de pH que una

proteína puede soportar sin que precipite, difieren visiblemente de proteína a proteína, hecho que sirve para separar los diversos componentes protéicos de una mezcla. Este método puede ser utilizado siempre que las características de la proteína enzimática lo permitan. Puede ser conveniente, como etapa previa de purificación, acidificar el medio hasta pH 5 y eliminar el precipitado por centrifugación, con lo que la mayor parte de los nucleoproteidos se eliminan.

c) *Precipitación fraccionada por sales*

Para aislar las proteínas enzimáticas a partir de disoluciones acuosas, se utiliza bastante un procedimiento que consiste en efectuar su precipitación, añadiendo una cantidad suficiente de una sal inorgánica. La presencia de sales neutras en una disolución acuosa afecta a la solubilidad de las proteínas de diversas formas. Por una parte aumenta el número de grupos cargados al disociarse la sal en sus iones correspondientes, y la solubilidad de las proteínas se incrementa. Por otra, disminuye la actividad de agua, a medida que aumenta la concentración de sales, hasta que las interacciones proteína-proteína superan a las de proteína-agua; la solubilidad disminuye y la proteína precipita.

Entre las sales utilizadas a este fin, está el sulfato amónico, de gran utilidad, debido, entre otras causas, a su gran solubilidad en agua (707 gr./l. a 0°C .) y a carecer de efectos perjudiciales sobre la mayoría de los enzimas.

d) *Precipitación por el calor.*

No todas las proteínas ofrecen la misma estabilidad frente al calor en las disoluciones acuosas. Por ello pueden fraccionarse por calentamiento fraccionado. La presencia del sustrato protege con frecuencia a los enzimas contra la desnaturalización por el calor. Aunque no es una técnica generalizada, a veces puede ser conveniente, por ello, someter las preparaciones enzimáticas (en presencia o no del sustrato) a un tratamiento térmico inferior al necesario para desnaturizar el enzima, y eliminar el precipitado por centrifugación. En los enzimas que, como el aquí estudiado, son piridinnucleótidos dependientes, este procedimiento resulta siempre muy costoso.

2) *Fraccionamiento por adsorción*

Las proteínas son adsorbidas por diversas sustancias en determinadas condiciones de pH y a una fuerza iónica baja. El gel de fosfato cálcico y el gel de alúmina son los más utilizados para adsorber proteínas en mezclas heterogéneas.

Este método puede ser aplicado de dos maneras diferentes. Si el enzima es adsorbido por el gel, podrá así ser separado de los otros componentes de la mezcla que no se adsorban y después extraído del gel. En las condiciones en que el enzima no se adsorbe, se pueden retirar de la mezcla todas las demás proteínas que sí lo hagan, por centrifugación, eliminando el sedimento.

En el primer caso, la técnica que se utiliza consiste en poner la disolución en presencia de una cantidad de gel suficiente para retener toda la proteína inactiva que se adsorbe antes que el enzima; retirar el gel de la muestra por centrifugación y añadir al sobrenadante más adsorbente, hasta que quede retenida toda la actividad y recuperar ésta por centrifugación. El enzima adsorbido puede eluirse más tarde alterando el pH, o aumentando la fuerza iónica (dispersando el gel en tampones de concentración creciente). A veces se utilizan disoluciones de sulfato amónico para extraer el enzima, pero este método tiene el inconveniente de que es necesario dializar luego la muestra para retirar el sulfato amónico, y muchos enzimas pierden estabilidad en la diálisis.

3) *Fraccionamiento por electroforesis*

Si a una disolución protéica heterogénea se le aplica un campo eléctrico, suele producirse una migración diferencial de las proteínas disueltas que depende de la carga neta de las proteínas que es a su vez función del pH. Así pueden conseguirse fracciones protéicas más o menos purificadas. Últimamente ha cobrado gran importancia este método de purificación, inicialmente utilizado sólo con fines analíticos, desde que se utilizan procedimientos de alto voltaje y geles de poliácridamida como soporte.

La electroforesis de zona en gel de almidón ha sido utilizada para aislar a pequeña escala los enzimas en las últimas fases de su purificación. Este método tiene serias dificultades, sobre todo al tratar de eluir el enzima del gel, por lo que es mucho más utilizada con fines analíticos.

4) Cromatografía en columna

Un método muy útil para purificar los enzimas consiste en el empleo de técnicas de cromatografía en columna, basadas según los casos en la filtración molecular, en la adsorción y en el intercambio iónico.

a) *Cromatografía de filtración molecular.*—Determinación de pesos moleculares. Este método consiste en la separación de las distintas proteínas, de acuerdo con el tamaño de su molécula. Se utilizan como soporte en estas cromatografías geles tridimensionales inertes de polisacáridos (Sephadex).

Las moléculas de una dimensión superior a los poros de los granos de Sephadex, no pueden penetrar en ellos y circulan por su superficie, saliendo de la columna las primeras. Las moléculas más pequeñas son capaces de penetrar por los poros del gel, con lo que se retrasa su salida. El orden de elución es, pues, inverso al tamaño de la molécula.

Esta propiedad es el fundamento también de un método de determinación del peso molecular.

El tipo apropiado de Sephadex para la determinación del peso molecular, depende de las dimensiones de la molécula enzimática. Cada Sephadex separa las proteínas incluidas en un rango determinado de peso molecular. Las proteínas de un peso molecular por encima del límite de este rango (límite de exclusión) son excluidas totalmente del gel y se eluyen normalmente en un volumen de elución semejante al volumen vacío del lecho del gel.

En la figura 7 se representa la relación existente entre los K_{av} y el peso molecular, a escala logarítmica, de proteínas en diferentes tipos de Sephadex.

Se observa que las líneas se curvan claramente cerca de los límites de exclusión de cada tipo de Sephadex.

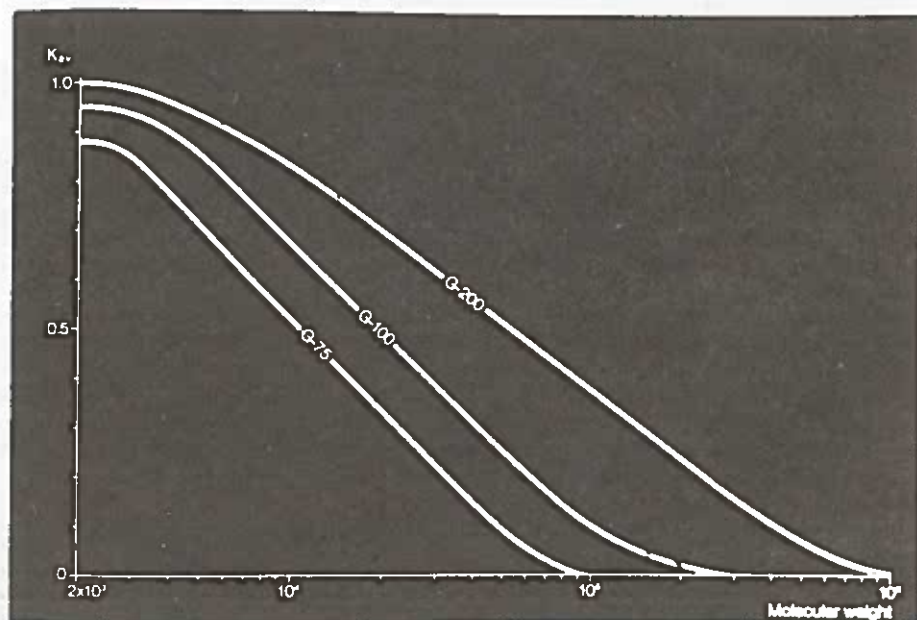


Figura 7.—Relación entre los K_{av} (escala lineal) y el peso molecular (escala logarítmica). Tomado de Sephadex gel filtration theory and practice, PHARMACIA FINE CHEMICALS.

Para estudiar el comportamiento de una disolución protéica en una columna de filtración o tamizado molecular, se hace uso de la expresión:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

en la que K_{av} es el coeficiente de reparto de las moléculas entre el interior y el exterior de los granos del gel, cuando se ha alcanzado el equilibrio; V_e es el volumen de elución de la molécula correspondiente, igual a los mls. eluidos desde que se aplicó a la columna hasta que alcanza la concentración máxima en el eluido; V_t es el volumen total del lecho del gel y V_o es el volumen de elución de una sustancia que quede completamente excluida del gel (volumen vacío).

Las representaciones de los K_{av} de proteínas de parecida configuración en función del logaritmo de sus pesos moleculares, da una línea recta de pendiente negativa, lo que permite determinar el peso molecular de una proteína problema por interpolación en dicha gráfica, después de haber calculado los parámetros K_{av} , V_o , V_t y V_e a partir de los resultados experimentales.

b) *Cromatografía de adsorción en columna.*—Para este propósito no se utilizan normalmente los mismos geles que para el fraccionamiento por absorción descrita ya, sino materiales especiales como ciertas mezclas de celulosa con fosfato cálcico, o derivados de éste, como la hidroxiapatita que puede ser utilizada en columnas, con la adición de materiales granulares.

c) *Cromatografía de intercambio iónico.*—El producto más utilizado para la purificación de proteínas por este tipo de cromatografía es la dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa). Existen otros que también son aplicables a este fin, aunque menos frecuentemente, como la carboximetilcelulosa (CM-celulosa) y resinas de intercambio iónico, como la amberlita IRC-50.

III.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación del gel de fosfato cálcico.

Se siguió el método descrito por KEILIN y HARTREE (1938).

Obtención de extractos acuosos de órganos y tejidos.

Se consiguieron a partir de animales recién sacrificados, preparando un homogeneizado con cinco volúmenes de agua destilada fría (0-2°C), en un homogeneizador de cuchillas M.S.E. El vaso del homogeneizador fue recubierto con una camisa de hielo para evitar el calentamiento de la muestra. Los extractos fueron filtrados a través de cuatro capas de gasa, y centrifugados a 105.000 × g durante 100 minutos, en una ultracentrífuga refrigerada «Spinco L-50».

Determinación de proteína

Se realizaron, en general, por la técnica del biuret, descrita por CHANCE y REDFERN (1961). En las muestras en que el contenido protéico era muy bajo se calculó a partir de sus extinciones a 280 y 260 m (WARBURG y CHRISTIAN, 1941) o siguiendo el método de determinación de Nitrógeno de JOHNSON (JOHNSON, 1941) y aplicando el factor de conversión 6,25.

Determinaciones de Citocromo C.

Se efectuaron basándose en la extinción del mismo a 414 m μ .

Determinaciones de actividad diacetilo reductasa.

Se efectuaron empleando el método espectrofotométrico descrito en metodología general.

Determinaciones de actividad lactato deshidrogenasa.

Se llevaron a efecto siguiendo los cambios en la extinción a 340 m μ , en el sistema siguiente:

Cubeta muestra:

Tampón fosfato pH 7, 0,1 M	2,83 mls
Piruvato sódico (2,5 mgr/ml)	0,1 mls
NADH (10 mgr/ml)	50 μ ls
Preparación enzimática comercial	20 μ ls

Cubeta referencia:

Lo mismo, excepto la preparación enzimática que se substituyó por agua destilada.

Cromatografías de filtración molecular en gel de Sephadex.

Hidratación de gel.—Se realizó dejando reposar el gel en 250 volúmenes de agua destilada (P/V) a temperatura ambiente, durante tres días, en el caso del Sephadex G-100 y cuatro días en el de G-200. Antes de ser aplicados en las columnas se mantuvieron en un baño de agua hirviendo durante unos minutos, con el fin de eliminar las burbujas de aire.

Preparación de la columna.—Se utilizaron columnas Quickfit K 15-90 de flujo directo y K 25-45 de flujo invertido. Las columnas se dispusieron verticalmente con una desviación de la verticalidad inferior a un 1 %, en una cámara frigorífica a 0-4°C.

Aplicación del gel hidratado.—El gel fue vertido en la columna con la ayuda de un embudo y haciendo que se deslizase por la pared interna de la columna, para evitar en lo posible que se formasen burbujas de aire. Se dejó empaquetar durante 12 horas a la misma presión hidrostática que después iba a ser utilizada en las cromatografías. Antes de cada carrera se hizo circular un total de seis volúmenes vacíos del eluyente para asegurar el equilibrio.

Elución.—El eluyente se dejó fluir de una manera continua, mediante los dispositivos de las figuras 8 y 9. Se consideró como presión hidrostática la diferencia de nivel entre la superficie de eluyente en el embudo de vidrio y la boca de tubo

de salida hacia el colector. Las fracciones fueron recogidas en un colector «LKB».

Aplicación de las muestras.—En las columnas de «flujo directo», las muestras, a las que se añadió sacarosa para aumentar su densidad, se depositaron cuidadosamente sobre la superficie del gel, por medio de una pipeta capilar de punta curvada en ángulo recto (figura 8). En las de «flujo invertido» las muestras se aplicaron

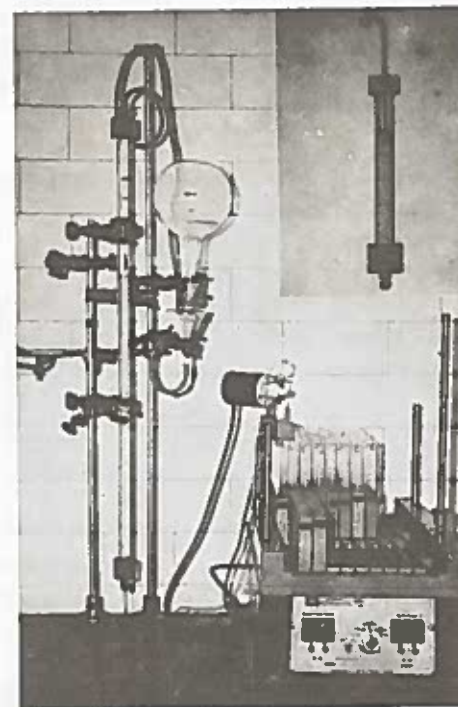


Figura 8.—Dispositivo utilizado para las cromatografías de filtración molecular (flujo directo). Recuadro superior: aplicación de las muestras.

fuera de la columna, en el tubo de conducción del eluyente; se detuvo, mediante una pinza, el flujo del mismo durante cierto tiempo y en su lugar se hizo fluir la muestra tal y como aparece en la figura 9 recuadro superior.

Calibración de las columnas para la determinación del peso molecular.

Para conocer el comportamiento de una disolución protéica en una columna de filtración molecular, es necesario definir los siguientes parámetros y, en cada caso concreto, conocer su valor:

V_t = Volumen total del gel hidratado, que se calcula a partir del diámetro interior de la columna y de la altura del lecho del gel.

V_e = Volumen de elución, que corresponde a los mls de eluido medidos desde la aplicación de la muestra en la columna hasta que ésta alcanza la concentración máxima en el eluido.

V_o = Volumen vacío (espacio que queda entre las partículas del gel) que se midió determinando el volumen de elución del dextrano azul, sustancia que por su elevado peso molecular (2×10^6) queda completamente excluida del gel.



Figura 9.—Dispositivo de flujo invertido para las cromatografías de filtración molecular. Recuadro superior: aplicación de las muestras.

III.3. RESULTADOS

III.3.1. Purificación: Estudios preliminares

MARTÍN y BURGOS (1970) han demostrado que en el hígado de paloma la actividad diacetilo reductasa se encuentra distribuida fundamentalmente en la fracción soluble, por lo que se consideró conveniente, como primera etapa de purificación, eliminar la mayor parte de la proteína de las fracciones particuladas, por centrifugación a $105.000 \times g$ durante 100 minutos.

En las experiencias descritas por los citados autores, se utiliza como medio de suspensión sacarosa 0,25 M, dada la necesidad de emplear un medio isotónico para mantener en lo posible las partículas subcelulares en su estado natural; sin embargo, con fines de purificación, esta precaución no es necesaria. Por otra parte, suspender las muestras en agua tiene, al menos teóricamente, una ventaja, y es que, al ser el medio menos viscoso, la sedimentación de las partículas deberá producirse más rápidamente.

Con el fin de comprobar si existían diferencias notables entre la extracción del enzima en sacarosa 0,25 M. y en agua y posterior centrifugación a $105.000 \times g$ durante 100 minutos, se realizaron los siguientes experimentos:

3.1.1. Homogeneizaciones con agua y con sacarosa 0,25 M

Se prepararon dos fracciones de 50 gramos de hígado de paloma. A partir de una de ellas se hizo un homogeneizado con cinco volúmenes de agua destilada fría ($0 - 2^\circ\text{C}$). De la otra se obtuvo un homogeneizado con cinco volúmenes de sacarosa 0,25 M, mediante las técnicas que se describen en III.2. Al término de estas operaciones se determinó la actividad diacetilo reductasa y la proteína de ambos homogeneizados.

3.1.2. Eliminación de fracciones particuladas por centrifugación

Los extractos obtenidos en el experimento anterior fueron centrifugados a $105.000 \times g$ durante 100 minutos, en una ultracentrífuga refrigerada. El sobrenadante de esta centrifugación fue analizado para determinar la actividad diacetilo reductasa y la proteína. Los resultados aparecen en la tabla 1.

TABLA 1
Comparación entre los rendimientos obtenidos por extracción acuosa y con sacarosa 0,25 M. de la actividad diacetilo reductasa antes y después de la centrifugación

	Proteína total	Actividad por mgr. de proteína ¹	Actividad total ¹	Rendimiento % ²
Homogeneizado en H ₂ O	8.220	25	206.500	
Sobrenadante de la centrifugación a $105.000 \times g$, 100 min.	2.151	95	204.400	98,8
Homogeneizado en sacarosa 0,25 M.	7.925	23,4	185.445	89,8
Sobrenadante de la centrifugación a $105.000 \times g$, 100 min.	3.070	60,1	184.500	89,3

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

² En términos del homogeneizado acuoso.

3.1.3. Precipitación con acetona

A 16 mls del sobrenadante obtenido de la centrifugación de los homogeneizados acuosos de hígado de paloma, se añadieron otros 16 mls de acetona comercial a -15°C , lentamente y agitando para que se distribuyese homogéneamente el agente precipitante en el medio. Una vez añadida toda la acetona, se dejó reposar la suspensión unos diez minutos, rodeada de un baño de hielo. Al cabo de este tiempo, la suspensión fue centrifugada a $12.000 \times g$ durante quince minutos, en una centrifuga refrigerada. El depósito resultante de esta centrifugación se resuspendió en tres mililitros de agua destilada fría, y se analizaron en él la actividad enzimática y la proteína. Al sobrenadante se le añadió más acetona y se obtuvieron así sucesivamente los sedimentos de las fracciones precipitados entre 1-1,5, 1,5-2, 2-2,5, 2,5-3,3-3,5, 3,5-4, y 4-4,5 volúmenes de acetona por volumen inicial de muestra.

Los datos de actividad total, actividad específica y proteína en los depósitos de las fracciones obtenidas se recogen en la tabla 2.

TABLA 2
Purificación de un extracto acuoso (1/5) por fraccionamiento con acetona

Fración precipitada entre (vols. acetona/vols. extracto)	Actividad total ¹	Rendimiento %	Proteína total (mgr.)	Actividad por mgr. de proteína ¹	Factor de enriquecimiento ²
original	25.840	—	272	95	—
0 - 1	10.450	40,40	220	47,5	0,5
1 - 1,5	2.600	10,1	26	100	1,05
1,5 - 2	3.028	11,7	4,5	673	7,08
2 - 2,5	2.744	10,6	4	686	7,2
2,5 - 3	1.330	5,1	3,8	350	3,7
3 - 3,5	500	1,9	2	250	2,63
3,5 - 4	315	1,2	1,8	175	1,8
4 - 4,5	90	0,3	1,08	84	0,88
Recuperación total		81,4 %	97,7 %		

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

² Respecto a la actividad de la muestra original.

3.1.4. Precipitación con sulfato amónico

Las posibilidades de purificación de la diacetilo reductasa de hígado de paloma mediante la precipitación fraccionada con sulfato amónico se estudió en experimentos como el que se describe, en el que se investigó la actividad diacetilo reductasa en las fracciones que precipitan a concentraciones de sulfato amónico comprendidas entre el 0 y el 100 % de saturación.

Se suspendieron 130 mgrs de liofilizado de la fracción protéica, que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona, en 20 mls de agua destilada fría ($0-2^{\circ}\text{C}$) y se centrifugaron a $105.000 \times g$ durante 10 minutos, con el fin de clarificar la muestra. A partir de 20 mls del sobrenadante se obtuvieron las fracciones que figuran en la tabla 3, del siguiente modo: la disolución enzimática se mantuvo en un baño de hielo, agitándose mientras se le iba añadiendo, de una disolución de sulfato amónico saturada la cantidad necesaria para llevar la concentración de éste al 20 % de saturación. La suspensión se mantuvo en reposo durante 30 minutos a la temperatura de $0-2^{\circ}\text{C}$ y más tarde se centrifugó a $105.000 \times g$ durante 15 minutos. El depósito resultante de esta centrifugación fue recogido en agua destilada, para realizar en él las determinaciones de actividad y proteína.

Al sobrenadante se le añadieron nuevas cantidades de la disolución saturada de sulfato amónico, bajo las mismas condiciones hasta lograr una concentración del 40 % de saturación en la muestra. Del mismo modo se obtuvieron las restantes fracciones, excepto la precipitada entre el 80-100 %, ya que para obtener el 100 % de saturación se añadió sulfato amónico sólido.

El volumen a añadir de la disolución saturada de sulfato amónico por 100 ml. de muestra se calculó, en cada caso, por la fórmula:

$$V = \frac{S_2 - S_1}{1 - (S_2/100)}$$

en la que S_1 es el tanto por ciento de saturación de sulfato amónico en la preparación y S_2 el tanto por ciento que se pretende.

Los resultados de este experimento aparecen en la tabla 3.

TABLA 3
Precipitación con sulfato amónico de un extracto acuoso de polvo acetónico

Fraciones	Proteína total (mgrs.)	Actividad total ¹	Actividad por mgr. de proteína ¹
original sin precipitar	106	74.840	706
0 - 20 %	16,2	0	0
20 - 40	23,7	13.200	557
40 - 60	31,2	7.305	234,1
60 - 80	26,8	2.391	89,2
80 - 100	13,2	1.432	108
Recuperación	100 %	32,9 %	

¹ nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

3.1.5. Precipitación por sulfato de protamina

Con objeto de comprobar las posibilidades de purificación de nuestras preparaciones por precipitación con sulfato de protamina, se disolvieron 30 mgrs de liofilizado de la fracción protéica que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona, en 20 mls de agua destilada fría. De esta suspensión se recogieron 15 mls para pipetarlos a cinco tubos de ensayo (3 mls en cada tubo). A cada uno de ellos se le fueron añadiendo volúmenes de una disolución de sulfato de protamina al 0,2 %, que representaban el 5 %, 10 %, 15 %, 20 % y 30 % del total. Los tubos se dejaron reposar durante 10 minutos en un baño de hielo y se centrifugaron a $12.000 \times g$ durante 10 minutos, en una centrifuga refrigerada, el sobrenadante obtenido en cada tubo fue analizado para determinar la proteína (método del biuret) y la actividad diacetilo reductasa. Los resultados de este experimento se recogen en la tabla 4.

TABLA 4
Precipitación por sulfato de protamina

Fraciones ²	Proteína total	Actividad total ¹	Actividad por mgr. de proteína ¹
0,01 %	3,66	2.250	614,7
0,02 %	3,09	1.414,8	457,8
0,03 %	2,94	856,8	291,3
0,04 %	2,85	558	187,5
0,06 %	2,70	0	0
Testigo	3,9	2.476,8	635,1

¹ nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

² Sobrenadante del tubo, al que se añadieron volúmenes de la disolución del sulfato de protamina al 0,2 % adecuados para lograr las concentraciones de sulfato de protamina que se indican.

3.1.6. Fraccionamiento por adsorción en gel de fosfato cálcico

Se preparó una suspensión en agua destilada fría, del liofilizado de la proteína que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona. De esta suspensión se tomaron seis muestras de 10 mililitros, a las que se añadió 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, y 4 mililitros de gel de fosfato cálcico respectivamente, agitando durante 10 minutos.

Pasado este tiempo, el gel se retiró mediante centrifugación, a $10.000 \times g$ durante diez minutos, manteniendo la temperatura a 0-4°C. En el sobrenadante se determinó la actividad diacetilo reductasa y la proteína (por extinción a 280 y 260 mμ).

Los resultados se recogen en la tabla 5.

TABLA 5
Fraccionamiento por adsorción en gel de fosfato cálcico, de un liofilizado de la fracción protéica que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona

Sobrenadante de adsorción por vols. de gel	Proteína total	Actividad total ¹	Rendimiento %	Actividad por mgr. de proteína ¹	Factor de enriquecimiento	Proteína adsorbida	Actividad adsorbida ¹
Testigo	9	5.280	—	576,6	—	—	—
0,1	4,8	2.600	49,2	541,6	0,94	4,2	2.680
0,25	2,4	1.950	36,9	812,4	1,41	6,6	3.330
0,5	1,5	1.100	20,8	733,3	1,27	7,5	4.180
1	1,2	840	15,9	700	1,21	7,8	4.440
2	0,9	380	7,2	422,2	0,73	8,1	4.900
4	0,6	—	—	—	—	8,4	5.280

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

3.1.7. Cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-100

El desarrollo de una cromatografía de filtración molecular requiere varias horas, durante las cuales los enzimas se hallan expuestos a la inactivación. Se consideró por ello necesario hacer un estudio previo de la estabilidad del enzima en diversos sistemas.

Estabilidad de la diacetilo reductasa en diferentes medios a lo largo del tiempo

Se disolvió cierta cantidad de liofilizado de la proteína que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona en 7,5 mls de agua destilada fría (0-2°C). La suspensión se aclaró mediante centrifugación a 30.000 r.p.m. durante 10 minutos. Del sobrenadante se tomó 1 ml que se añadió a otros 4 mls de tampón fosfato 0,625 M pH 6,1,

TABLA 6
Estabilidad de la diacetilo reductasa en diversos medios

Medios	Actividad a 0 horas ¹	Actividad a 1 hora ¹	Actividad a 4 horas ¹	Actividad a 10 horas ¹	Actividad a 24 horas ¹
H ₂ O	198	215	210	100	50
Tampón fosfato bisódico monopotásico 0,5 M. pH 6.	—	219	216	140	61
Id. 0,1 M.	233	210	160	70	50
Id. 1 M.	190	190	192	190	180
Sacarosa 0,25 M.	250	260	250	190	150
Sacarosa 1,5 M.	280	280	278	280	270

¹ Actividad diacetilo reductasa en nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

con lo que se logró una concentración final 0,5 M; lográndose una concentración de 0,2 M. El mismo procedimiento se utilizó en el tampón 0,125 M (0,1 M final).

Por otra parte se disolvieron unos mgrs del mismo liofilizado en tampón fosfato bisódico-monopotásico 1 M y en sacarosa 1,5 M.

Las muestras se mantuvieron a la temperatura de 0-4°C y su actividad fue ensayada a los tiempos que se indican en la tabla 6 y la figura 10.

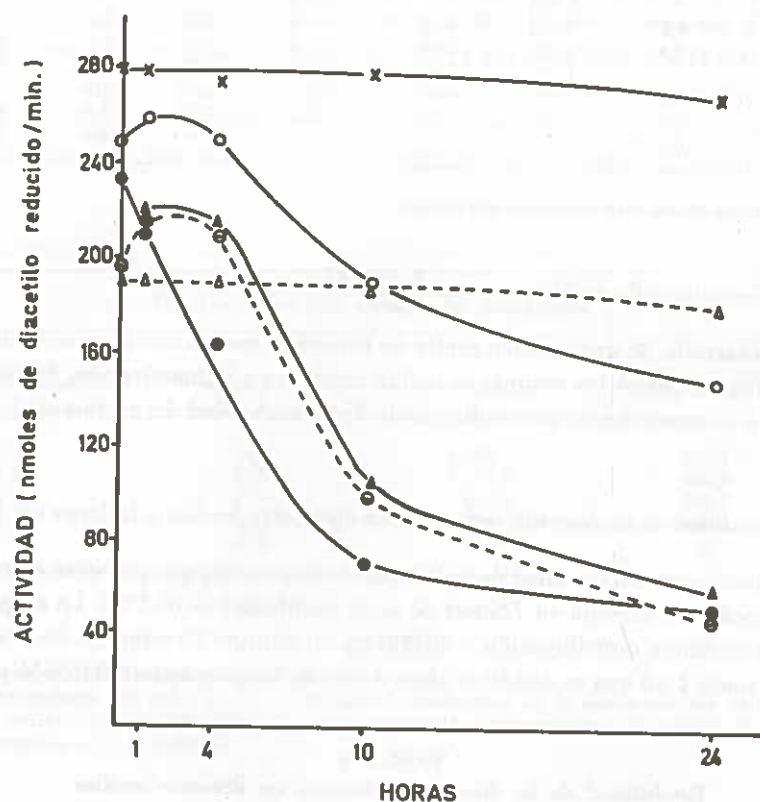


Figura 10.—Estabilidad de la diacetilo reductasa de hígado de paloma en liofilizados de la fracción precipitada entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona. Medios de disolución: (▲—▲) H₂O; tampón fosfato pH 6,1: (●—●) 0,1 M; (○—○) 0,5 M; (×—×) 1 M; Sacarosa: (○—○) 0,25 M; (△—△) 1,5 M.

A la luz de esta experiencia previa se consideró inicialmente suficiente la protección conferida por la sacarosa 0,20 M que podía ofrecer, para la purificación, la ventaja, frente a los tampones de fosfato, de eliminar el posible efecto desnaturante que las sales ejercen durante la congelación, ya que se pretendía después liofilizar la muestra.

Experimento 1

Paso por Sephadex G-100 de la diacetilo reductasa de hígado de paloma en sacarosa 0,20 M.

Se suspendieron 50 mgrs de liofilizado acetónico en 3,5 mls de sacarosa 0,20 M. La muestra se clarificó por centrifugación a 105.000 × g durante 10 minutos y se filtró el sobrenadante a través de una capa de papel de filtro ordinario. Después de tomar una alícuota de 0,25 mls para determinar proteína y actividad en ella, se cromatografió el resto (2,75 mls) a través de una columna K 25-45 empaquetada con Sephadex G-100 en sacarosa 0,20 M de las siguientes características: Altura del lecho del gel 26,5 centímetros; volumen total ocupado por el gel 130,6 centímetros cúbicos y volumen vacío 77 mililitros.

La cromatografía se efectuó en una cámara frigorífica a la temperatura de 0-4°C y a una presión hidrostática de 18 cms.

Se recogieron fracciones de 2,2 mililitros, en las que se analizó la proteína por extinción a 280 y 260 mμ y la actividad diacetilorreductasa espectrofotométricamente.

TABLA 7
Resultados de la cromatografía en Sephadex G-100 de un extracto acuoso de polvo acetónico en sacarosa 0,20 M.

N.º tubo	Proteína total	Actividad total ¹	Rendimiento	Actividad por mgr. de proteína ¹	Factor de enriquecimiento
46	0	0	0	0	0
47	0,15	0	0	0	0
48	0,21	0	0	0	0
49	0,90	125	0,58	325	0,14
50	0,14	233,7	1,07	205	0,24
51	0,99	336	1,5	340	0,43
52	0,53	508	2,33	960	1,14
53	0,90	630	0,9	700	0,83
54	1,00	650	2,99	650	0,77
55	0,96	423	1,94	545	0,64
56	0,99	396	1,82	400	0,47
57	1,05	372,6	1,70	355	0,42
58	1,17	232	1,06	200	0,24
59	1,11	166	0,76	150	0,18
60	1,08	140,4	0,6	130	0,15
61	0,87	78,3	0,36	90	0,1
62	0,75	35,5	0,16	50	0,06
63-70	7,00	0	—	0	—
Testigo	25,8	21.745	—	842,7	—
Recuperación	77,5 %		19,7 %		

¹ nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

Los resultados obtenidos, que se recogen en la tabla 7 y figura 11, muestran que la recuperación de la actividad fue muy escasa, del orden del 20 %.

Elevar la concentración de sacarosa en el medio de elución ofrecía numerosos inconvenientes derivados de la lentitud, con que por efecto de la viscosidad se desarrollan las cromatografías a concentraciones altas de sacarosa en el eluyente y de la dificultad de aplicación de la muestra. Se decidió por ello ensayar el comportamiento de la diacetilo reductasa durante la cromatografía y posterior liofilización de las muestras, en tampón fosfato bisódico monopotásico 1 M pH 6,1.

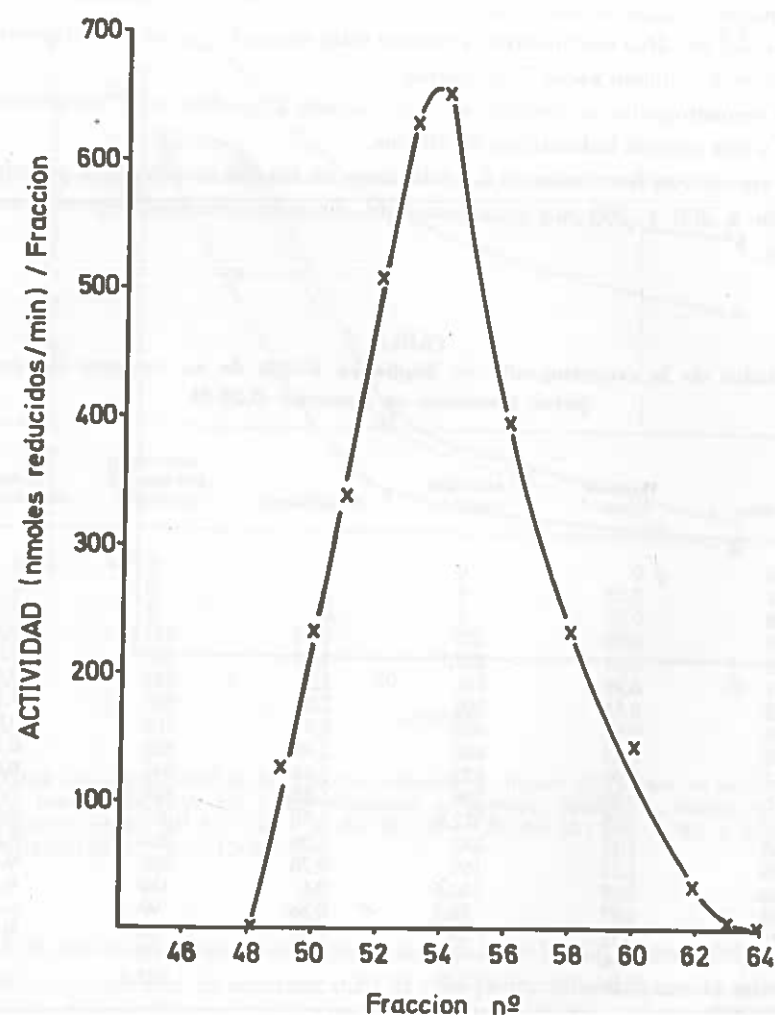


Figura 11.—Cromatografía en Sephadex G-100 de la fracción que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona. Eluyente, sacarosa 0,2 M. Fracciones de 2,2 mls.

Experimento 2

Paso por Sephadex G-100 de diacetilo reductasa de hígado de paloma en tampón fosfato bisódico monopotásico 1 M pH 6,1.

Se realizó en la misma columna y en condiciones idénticas a las descritas; el gel fue pues equilibrado con tampón fosfato bisódico monopotásico 1 M pH 6,1 y la muestra eluida en el mismo tampón. Se cromatografiaron 2 mls, perfectamente claros, de una suspensión de liofilizado de la proteína que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona. Una alícuota se conservó a 0-2°C para determinar proteína por el método de Johnson y actividad por el método espectrofotométrico.

En la tabla 8 y figura 12 aparecen los resultados de este experimento. La recuperación fue del 91 % de la actividad y del 93 % de la proteína.

Se liofilizaron conjuntamente los tubos 29, 30 y 31 por un lado, en los que la actividad específica era unas siete veces superior a la de la muestra original, y por otro los 28, 32 y 33, en los que la actividad específica era aproximadamente 4,5 veces superior a la testigo. Analizados tras la liofilización volvió a medirse la actividad específica, que no varió.

TABLA 8
Desarrollo de la cromatografía en Sephadex G-100 de un extracto acuoso de liofilizado de la proteína que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona

N.º tubo	Proteína total	Actividad específica	Actividad total	% de la actividad total
21	0	0	0	0
22	0,18	13,7	25	0,19
23	0,25	20	50	0,38
24	0,27	33,3	90	0,69
25	0,25	480	120	0,91
26	0,17	2.176	370	2,81
27	0,20	2.800	560	4,24
28	0,20	4.400	880	6,65
29	0,19	6.000	1.140	8,67
30	0,19	7.000	1.330	10,1
31	0,21	6.170	1.295	9,85
32	0,25	4.680	1.170	8,9
33	0,27	4.000	1.080	8,25
34	0,32	2.781	894	6,7
35	0,35	1.928	674	5,15
36	0,37	1.621	600	4,55
37	0,40	1.200	480	3,65
38	0,41	792	325	2,44
39	0,40	450	170	1,21
40 a 55	9,00	450	851	6,45
Testigo	14,6	900	13.140	91 %
Recuperación	95 %			

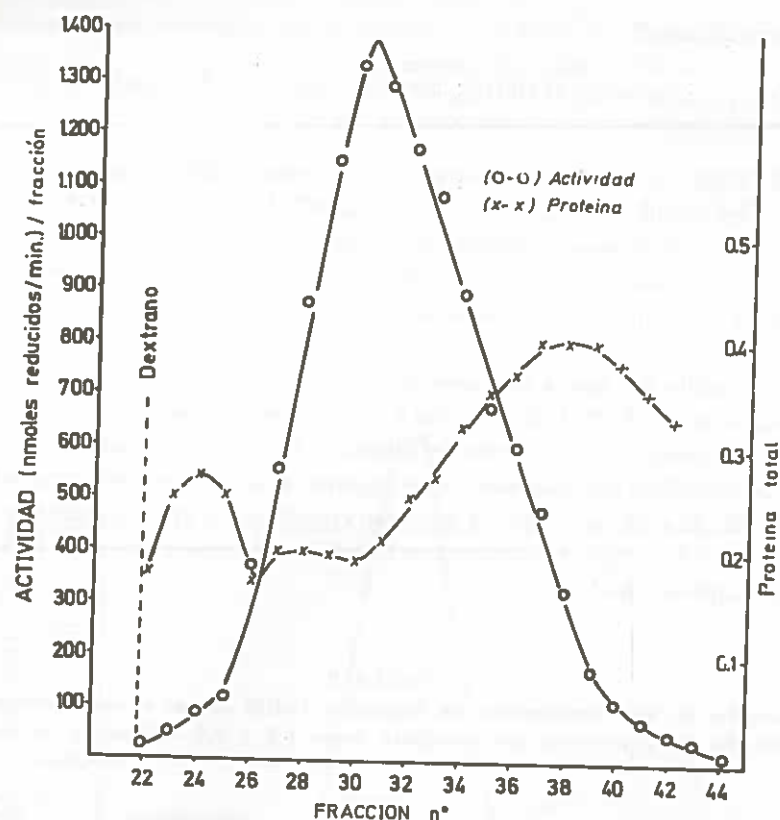


Figura 12.—Cromatografía en Sephadex G-100 de la fracción que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona. Eluyente, tampón fosfato 1 M. pH 6,1. Volumen vacío = 55 mls.

El polvo liofilizado fue conservado a -22°C y analizado periódicamente durante tres meses, observándose que la actividad permanecía constante.

III.3.2. Determinación del peso molecular

Las experiencias realizadas para la purificación de nuestras preparaciones, en gel de Sephadex G-100, mostraron que la actividad se eluía en una banda con un máximo muy aproximado al del dextrano azul. Se consideró por tanto que la diacetilo reductasa de hígado de paloma debería quedar casi excluida y tener un peso molecular superior a 100.000.

Para evitar posibles errores en la determinación del peso molecular derivados de la falta de linealidad entre el tamaño molecular y el K_{av} en la zona próxima al límite de exclusión del gel (véase gráfica 7), se decidió utilizar el tipo G-200 de Sephadex.

3.2.1. Cromatografía en Sephadex G-200 de diacetilo reductasa y otras proteínas de peso molecular conocido.

A través de una columna de $1,5 \times 90$ cms, empaquetada con gel de Sephadex G-200, de las siguientes características: Altura del lecho del gel, 44,8 cms; volumen total ocupado por el gel, 79,3 cc; volumen vacío, 22 cc. Se cromatografiaron por separado: Dextrano azul, gamma globulina, lactato deshidrogenasa, seroalbúmina de bóvido, ovoalbúmina, quimotripsina y citocromo C de caballo, con los que fue cargándose sucesivamente la columna, ordenados de acuerdo con el peso molecular (de mayor a menor), y dejando pasar entre una y otra carga un volumen igual al volumen vacío. Se volvió a medir el volumen vacío con dextrano azul (no observándose variación alguna) y se cromatografió entonces una muestra de liofilizado de polvo acetónico como portadora de diacetilo reductasa.

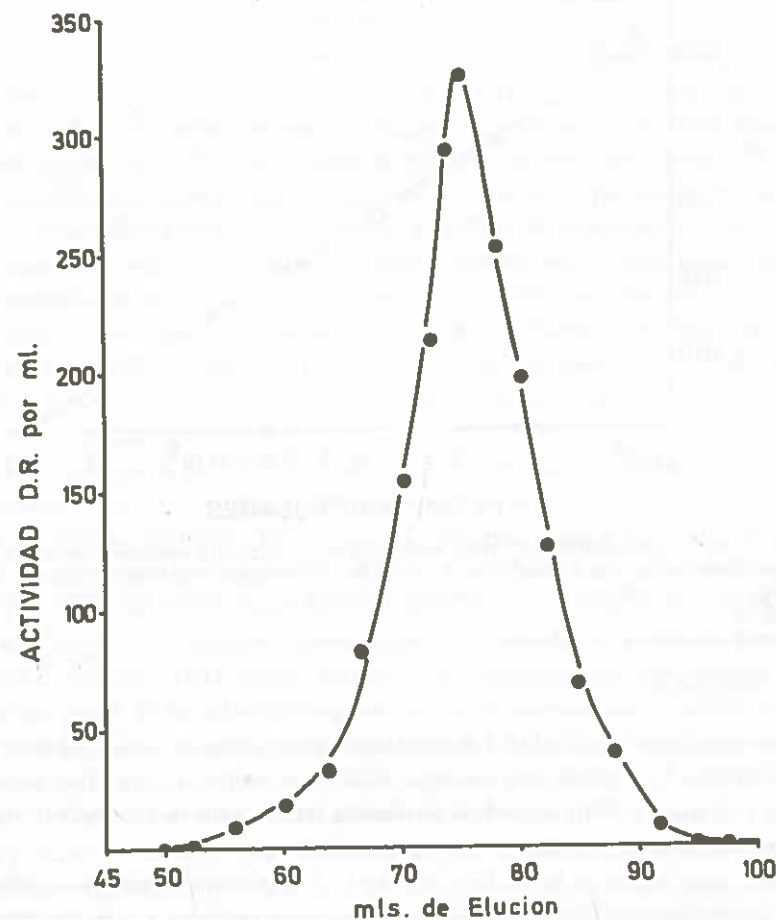


Figura 13.—Cromatografía de la fracción que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona en Sephadex G-200. Eluyente, tampón fosfato 1 M. pH 6,1.

La cromatografía se efectuó a 0-4°C. La presión hidrostática utilizada fue de 12 cms y el tampón de fosfato bisódico monopotásico 1 M pH 6,1. El eluido se recogió en fracciones de 2,5 mililitros.

En la figura 13 se observa el perfil de elución de la diacetilo reductasa en Sephadex G-200 y en la figura 14 la representación gráfica de los K_{av} en función del peso molecular a escala logarítmica.

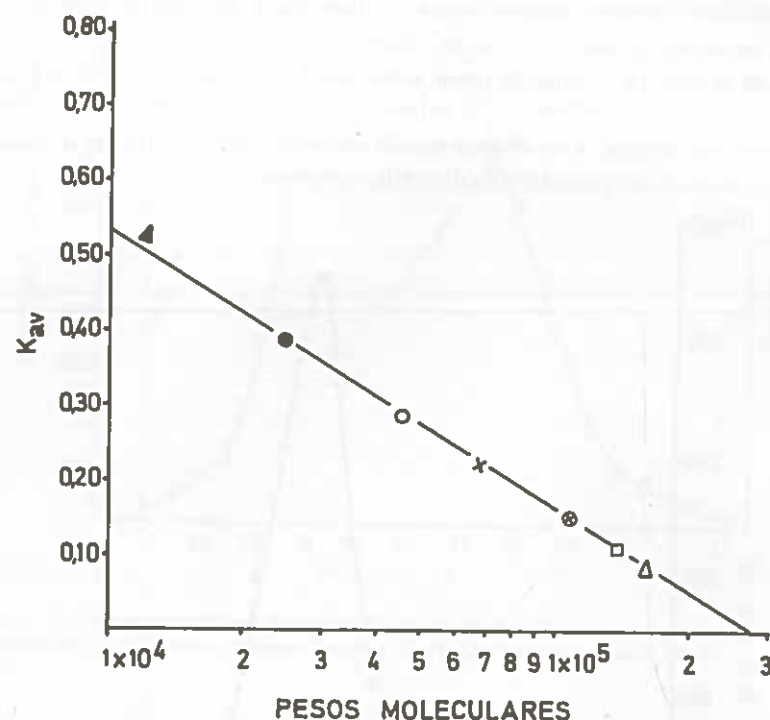


Figura 14.—Determinación del peso molecular de la diacetilo reductasa de hígado de paloma por filtración en gel de Sephadex G-200. (▲) Citocromo C; (●) quimotripsina; (○) ovoalbúmina; (×) seroalbúmina; (◇) diacetilo reductasa; (□) lactato deshidrogenasa; (△) y γ -globulina.

III.4. DISCUSIÓN

Los resultados de la tabla 1 demuestran que la extracción en agua destilada es más eficaz que la lograda con sacarosa 0,20 M y confirman las observaciones de MARTÍN y BURCOS (1970) sobre la distribución intracelular de la diacetilo reductasa de hígado de paloma. La eliminación de la fracción particulada representa por tanto un primer paso eficaz en la purificación de la diacetilo reductasa de hígado de paloma, lográndose con ello multiplicar por un factor próximo a 4 la actividad específica con recuperaciones de alrededor de un 100 %.

El comportamiento de la diacetilo reductasa de hígado de paloma frente a la

acetona difiere de la procedente de hígado de bóvido. MARTÍN (1971) logra mediante el tratamiento con acetona de los hígados de bóvido la actividad específica más alta en las fracciones protéicas que precipitan por la adición entre 1 y 1,5 volúmenes de acetona. Con 1,5 vol de acetona precipita prácticamente la totalidad del enzima. Tratando igual el hígado de paloma, la adición de 1,5 vol de acetona no precipita más de un 50 % de su diacetilo reductasa, lográndose actividades específicas máximas en la fracción protéica obtenida entre 2 y 2,5 volúmenes de acetona. Recogiendo las fracciones precipitadas entre 1,5 y 2,5 volúmenes se logra multiplicar por 7,1 la actividad específica, recuperando un 22 % de la actividad total.

La precipitación con sulfato amónico resulta ineficaz; produce pérdidas muy considerables de la actividad total y no permite mejorar en ningún caso la actividad específica de los precipitados acetónicos. También en este sentido la diacetilo reductasa de hígado de paloma difiere claramente de la de hígado de bóvido, que no es inactivada por la precipitación con sulfato amónico.

La precipitación por sulfato de protamina, de gran utilidad en la purificación de la diacetilo reductasa bacteriana (STRECKER y HARARY, 1954), no ha resultado eficaz en la de la diacetilo reductasa de hígado de paloma; un 66 % de esta última precipita ya con un 0,03 % de sulfato de protamina; este comportamiento sugiere que se trata de una proteína ácida y es otra característica que la diferencia del enzima de hígado de ternera, menos sensible al sulfato de protamina (MARTÍN, 1971).

Tampoco la adsorción con gel de fosfato cálcico parece muy eficaz, al menos en la posterior purificación de los precipitados acetónicos obtenidos entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona; la proteína y la actividad diacetilo reductasa son adsorbidas de un modo muy similar y aunque podría multiplicarse la actividad específica por un factor de 1,5, el enriquecimiento resulta mínimo si se tiene en cuenta que el rendimiento es sólo de un 38 %.

La cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-100 resulta en cambio considerablemente útil, a diferencia de lo que ocurre con la diacetilo reductasa de hígado de bóvido (MARTÍN, 1971). Es, sin embargo, preciso realizarla en tampón fosfato bisódico monopotásico 1 M pH 6,1, dada la inestabilidad del enzima en agua, o en concentraciones bajas de sacarosa, o tampón fosfato, y las dificultades de utilizar en el paso por Sephadex disoluciones concentradas de sacarosa. Mediante el paso por Sephadex G-100 pueden obtenerse enriquecimientos que suponen la multiplicación por 7 de la actividad específica con recuperaciones próximas al 30 %.

Por todo ello se propone para la purificación de la diacetilo reductasa a partir de hígado de paloma el siguiente método, que se ejemplariza en la tabla 9 con los resultados obtenidos a partir de 200 gramos de muestra.

Método de purificación

- 1) Obtención de un homogeneizado en cinco volúmenes de agua destilada (0-4°C) mediante trituración con un homogeneizador de cuchillas.

TABLA 9

Purificación de la diacetilo reductasa a partir de 200 grs. de hígado de paloma

	Proteína total	Actividad total ¹	Actividad por mg. de proteína ¹	Factor de enriquecimiento	Rendimiento % ²
Homogeneizado	30.000	750.000	25	—	—
Sobrenadante de centrifugación a 105.000 × g.	7.692	730.740	95	3,8	97,4
Precipitado entre 1,5 y 2,5 vls. de acetona	220	148.500	675	27	19,8
Extracción acuosa del liofilizado acetónico	143	121.550	850	34	16,2
Cromatografiado en Sephadex G-100	5,9	37.623	6.310	252,4	5

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.² Respecto del homogeneizado original.

2) Eliminación de la fracción particulada por centrifugación a 105.000 × g durante 100 minutos, en una centrifuga refrigerada.

3) Adición al extracto de 1,5 volúmenes de acetona a —15°C y centrifugación a 12.000 × g durante 10 minutos, en una centrifuga refrigerada; descartar el precipitado y añadir al sobrenadante más acetona, hasta aumentar la concentración de ésta en el medio a 2,5 volúmenes por volumen de muestra, centrifugación y recogida del precipitado y liofilización del mismo. (Puede el liofilizado conservarse varios meses a —15°C sin pérdida apreciable de actividad).

4) Resuspensión del liofilizado en tampón fosfato bisódico monopotásico pH 6,1, 1 M, clarificación del sobrenadante por centrifugación a 105.000 × g durante quince minutos y cromatografía en una columna de Sephadex G-100, utilizando como eluyente el mismo tampón.

La diacetilo reductasa de hígado de paloma es, como la de hígado de bóvido y la procedente de las bacterias (SPECKMAN 1969, BRYN et al 1971, BURGOS y MARTÍN 1972), muy lábil, de manera que para los estudios de cinética enzimática resulta imprescindible estabilizar las disoluciones, manteniéndolas en concentraciones de sacarosa 1,5 M.

De la figura 14 se deduce que el peso molecular de la diacetilo reductasa es del orden de 110.000. BURGOS y MARTÍN (1972) sugieren la existencia, al menos, de dos formas moleculares distintas en la de hígado de bóvido, una de peso molecular 26.000 y otra de peso molecular 72.000 (monómero y trímero) en equilibrio probablemente regulado por la fuerza iónica del medio. GABRIEL et al (1971) obtienen también por cromatografía en CM Sephadex no menos de dos picos de actividad.

En este trabajo no se ha observado ningún fenómeno similar. Las condiciones experimentales en las que se ha determinado el peso molecular son desfavorables, de acuerdo con la hipótesis de Martín y Burgos, a la formación del trímero. Si la

diacetilo reductasa de hígado de paloma se comportara del mismo modo, sería necesario admitir que la forma monomérica tiene un peso molecular de 110.000, lo que representaría una diferencia muy considerable entre los dos enzimas. La forma de la gráfica 13 no deja lugar a dudas respecto a la no existencia de dos estados de asociación del enzima a la molaridad del tampón utilizado, frente a lo que ocurre en la de hígado de bóvido. No se puede descartar sin embargo la posibilidad de que se trate de un tetrámero y de que el equilibrio monómero-polímero obedezcan a constantes diferentes a las que lo regulan en la procedente de hígado de bóvido.

CAPITULO IV

ESTEQUIOMETRIA DE LA REACCION CATALIZADA. ESPECIFICIDAD DE SUBSTRATOS. REVERSIBILIDAD. COFACTORES E INHIBICION POR SUSTANCIAS NO ANALOGAS DE LOS SUBSTRATOS

IV.1. INTRODUCCIÓN

Existen dos razones fundamentales que obligan, en un estudio de la naturaleza de esta tesis, a comprobar la estequiometría de la reacción considerada. De un lado, la existencia en las aves de más de una reacción que transforma el diacetilo en acetoina, la diacetilo reductasa, a la que se refiere este trabajo, y la diacetilo mutasa descrita por GREEN y col. (1947) y posteriormente identificada con la piruvato oxidasa por SCHWEET y col. (1951) y JUNI y HEYM (1956). De otro lado, la presencia en las preparaciones no purificadas de tejidos animales de otros enzimas que catalizan reacciones NADH-dependientes, cuya actividad podría oscurecer la interpretación de los datos cinéticos que se proyectaba obtener y a los que se refieren los capítulos siguientes a este.

El estudio de la especificidad de substratos resulta también sumamente conveniente si se tiene en cuenta que:

a) Existe cierta discrepancia entre los datos publicados para la/s diacetilo reductasa/s de hígado de rata (GABRIEL y col. 1971) e hígado de bóvido (BURGOS y MARTÍN, 1972). Mientras los primeros autores sugieren que el enzima de hígado de rata podría ser primariamente específico para substratos distintos del diacetilo, los últimos presentan datos que demuestran que el de hígado de ternera tiene una gran especificidad hacia el mismo.

b) Los dos grupos admiten que sus preparaciones utilizan como donadores de hidrógeno tanto el NADH como el NADPH, pero no han investigado si ambas actividades corresponden a dos diacetilo reductasas, una NADH y otra NADPH dependientes.

c) Las descripciones hasta ahora conocidas de las diacetilo reductasas y butilenglicol deshidrogenasas animales concuerdan en afirmar que se trata de dos enzimas distintos; en el mundo de los microorganismos, sin embargo, STRECKER y HARARY (1954) admiten también la existencia de dos enzimas diferentes que catalizan uno la reducción de diacetilo a acetoina y otros la de acetoina a butilenglicol, pero JUNI y HEYM (1957) y BRYN y col. (1971) afirman que un solo enzima cataliza ambas reacciones.

Los estudios de la estequiometría de la reacción y la especificidad de substratos con preparaciones muy purificadas, como las que se obtienen por el procedimiento descrito en el capítulo III de esta tesis, pueden contribuir a aclarar algunas de estas discrepancias.

Si se exceptúan los datos obtenidos por GABRIEL y col. (1971) con preparaciones poco purificadas de hígado de rata, todos los autores que hasta ahora han estudiado la reacción catalizada por la diacetilo reductasa concuerdan en que es irreversible. Desde un punto de vista teórico, sin embargo, resulta sumamente difícil admitir la irreversibilidad de cualquier reacción enzimática, por lo que se ha considerado conveniente reexaminar también este extremo con las preparaciones de hígado de paloma.

IV.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Determinaciones de NADH, diacetilo y acetoína

El NADH se determinó espectrofotométricamente por su extinción a 340 m μ . Para las determinaciones de acetoína se utilizó el método de WESTERFELD (1945) con inclusión de patrones internos. Para las de diacetilo, la técnica de OWADES y JAKOVAC (1963) sin destilación previa; en los experimentos encaminados al estudio de la reversibilidad en presencia de cantidades elevadas de acetoína, se siguió la modificación descrita por MARTÍN y BURGOS (1972).

Determinación de actividades enzimáticas

Diacetilo reductasa.—Fue determinada por la técnica que se describe en el capítulo II.

Butilénglicol deshidrogenasa.—Se midió por análisis espectrofotométrico de los cambios en la extinción a 340 m μ , del siguiente modo:

Cubeta muestra: Preparación enzimática. Tampón fosfato bisódico monopotásico pH 6,1, 0,15 μ moles, acetoína 30 μ moles y NADH 0,6 μ moles. Volumen total, 3 mls.

Cubeta referencia: Los mismos reactivos en igual cantidad, con omisión de la preparación enzimática.

NADH deshidrogenasa.—La actividad NADH deshidrogenasa fue calculada también por los cambios de extinción a 340 m μ debidos a la oxidación del NADH a NAD.

IV.3. RESULTADOS

IV.3.1. Estequiometría

La estequiometría de la reacción se estudió sobre preparaciones parcialmente purificadas por precipitación acetónica. Fue por ello necesario comprobar que carecían de actividad butilénglicol deshidrogenasa y NADH oxidasa que podrían oscurecer los resultados.

a) *Demostración de la ausencia de actividad butilénglicol deshidrogenasa y NADH oxidasa en las preparaciones enzimáticas.*

Se preparó para ello un extracto acuoso del liofilizado del producto del fraccionamiento acetónico, en el cual se ensayaron las actividades butilénglicol deshidrogenasa y NADH oxidasa, tal como se indica en el apartado 2 de este capítulo.

En los ensayos espectrofotométricos no se apreció ningún cambio en la absorbancia a 340 m μ durante los 15 minutos en que se mantuvieron las mezclas en el bloque de cubetas del espectrofotómetro.

b) *Relación entre el consumo de diacetilo y NADH y la producción de acetoína.*

Se preparó una disolución de diacetilo, que contenía 38,4 μ moles en 10 mls de agua destilada (determinada por el método de Owades y Jakovac), y otra de NADH en tampón fosfato bisódico monopotásico pH 6,1, 0,05 M de igual molaridad que la de diacetilo, calculada por su extinción a 340 m μ .

En los 10 mls de solución de NADH se suspendieron 13 mgrs de liofilizado del producto del fraccionamiento acetónico, al que se refiere el apartado a) y se vertieron, junto con los 10 mls de la disolución de diacetilo, en un frasco de 50 mililitros, que se cerró herméticamente con un tapón de goma fácilmente perforable y se sumergió en un baño termostático a 25°C, anotándose el tiempo.

A lo largo del experimento se retiraron periódicamente muestras de 1 ml con una jeringa de precisión (Hamilton). En 0,5 mls se midió la concentración de NADH por su extinción a 340 m μ , longitud de onda en la que no absorben prácticamente ni el diacetilo ni la acetoína, y en los otros 0,5 mls se determinó la de diacetilo por el método de Owades y Jakovac.

Al cabo de 80 minutos se había consumido todo el diacetilo y todo el NADH. En el residuo se determinó acetoína por el método de Westerfeld.

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 10 y muestran que por cada mol de diacetilo reducido se oxida uno de NADH y se produce uno de acetoína. En la figura 15 se puede observar el paralelismo existente entre la reducción de un substrato y la oxidación del otro.

TABLA 10
Reducción del diacetilo, oxidación del NADH y producción de acetoína

Tiempo (min.)	DIACETILO		NADH		μ moles de acetoína producidos
	Residual (μ moles)	Consumido (μ moles)	Residual (μ moles)	Consumido (μ moles)	
0	38,4	0	38,4	0	(—)
3	20,6	17,8	20,6	17,8	(—)
6	14,7	23,7	12,8	25,6	(—)
12	8,4	30	7,4	31	(—)
20	3,3	35,1	3,2	35,2	(—)
39	1,3	37,1	1,2	37,2	(—)
60	0,6	37,8	0,2	38,2	(—)
80	0	38,4	0	38,6	39,1

(—) No determinados.

Condiciones de ensayo: Volumen total, 20 mls; temperatura, 25°C; pH 6,1; preparación 13 mgrs de la fracción protéica que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona.

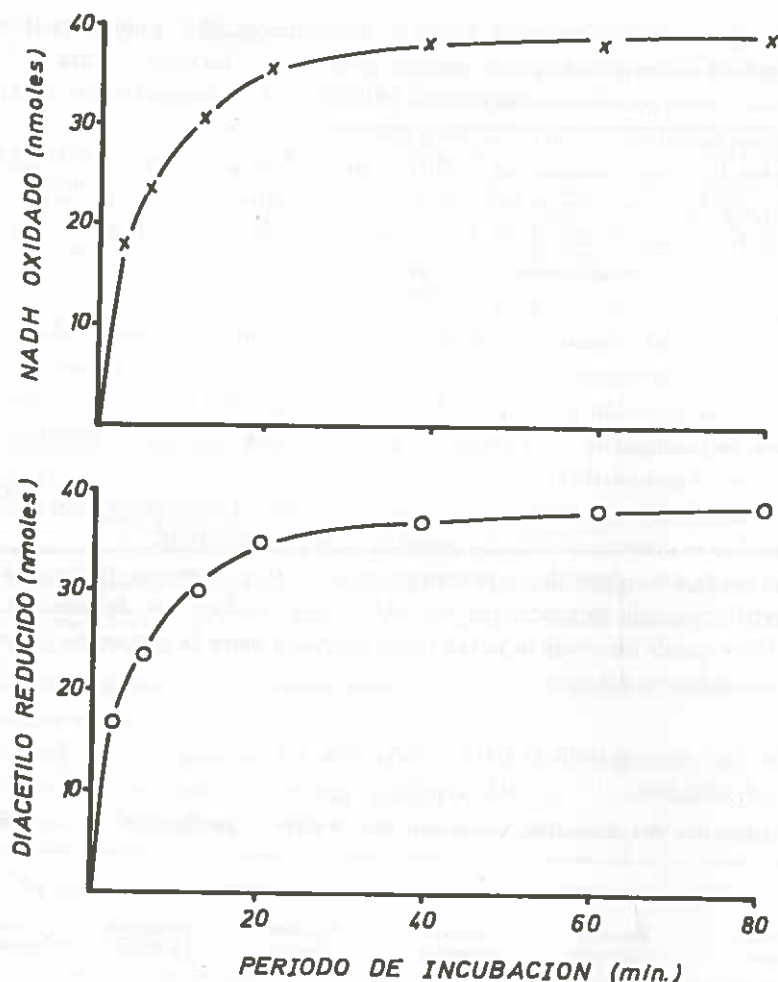


Figura 15.—Estequiometría de la reacción: Reducción del diacetilo y oxidación del NADH en función del tiempo. Preparación, liofilizado de la fracción que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona (13 mgrs./20 mls.)

IV.3.2. Reversibilidad

A partir de preparaciones con una actividad en el sentido de diacetilo a acetoína de 240 nmoles de diacetilo reducidos por minuto se midió la actividad en el sentido inverso por el incremento de absorbancia a 340 m μ que produce la reducción de NAD a NADH.

Condiciones de ensayo:

Cubeta muestra: Tampón fosfato bisódico monopotásico pH 6,1, 0,15 μ moles, acetoína y NAD variables (60, 120, 370, 720 y 15, 30 μ moles respectivamente).

Como preparación enzimática se utilizó liofilizado de la fracción protéica que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona. Volumen total en la cubeta, 3 mls.

Cubeta referencia: Como la anterior omitiendo la acetoína.

Durante los diez minutos que duró el ensayo no se registró ningún cambio en la absorbancia a 340 m μ , a pesar de utilizar concentraciones de acetoína hasta 24 veces más elevadas que las de diacetilo habitualmente usadas en los ensayos y de NAD hasta 50 veces superiores a las de NADH. Las muestras se incubaron durante 12 horas a 24°C. Las determinaciones de diacetilo por el método de Owades y Jakovac (sensible a 0,15 μ moles/muestra) frente a un blanco sin enzima, fueron en todos los casos negativas.

Las mismas preparaciones fueron incubadas durante 12 horas a 0°C en presencia de metasulfato de fenazina (0,5 mgr), nitroazul de tetrazolio (1 mg) 12 μ moles de acetoína y 15 μ moles de NAD en 4 mls de tampón pirofosfato sódico 0,5 M pH 9, siguiendo el procedimiento descrito por Gabriel y col. (1971). Una alícuota sin enzima fue incubada en las mismas condiciones y utilizada como testigo. El diacetilo fue determinado por el método de OWADES y JAKOVAC, modificado por MARTÍN y BURGOS (1972), detectándose pequeñas cantidades de diacetilo en los blancos sin enzima (alrededor de 0,18 μ moles/muestra) y significativamente mayores en las muestras (0,49 μ moles).

IV.3.3. Especificidad de sustratos

Se ha estudiado la especificidad de la reacción para el sustrato aceptor de H, sustituyendo el diacetilo por sustancias químicamente análogas. La actividad fue seguida por los cambios de absorbancia a 340 m μ que produce la oxidación del NADH a NAD, utilizando el sistema descrito en II.2.5.

La especificidad para el donador de H se estudió sustituyendo en el método ordinario de ensayo el NADH por el NADPH.

Los resultados de este experimento ponen de manifiesto que el diacetilo no puede ser sustituido por ninguna de las sustancias ensayadas; en cambio, sí puede sustituirse el NADH por el NADPH, aunque la actividad enzimática disminuye en un 32 % (tabla 11).

Se utilizó como preparación enzimática una suspensión de liofilizado de la proteína que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona.

3.3.1. Actividad diacetilo reductasa con NADH y NADPH en las distintas etapas de purificación

Los resultados del experimento anterior ponen de manifiesto que las preparaciones enzimáticas purificadas por precipitación acetónica utilizan también el NADPH como donador de H en la reacción catalizada por la diacetilo reductasa, aunque con menor eficacia. Este hecho obliga a pensar en dos posibilidades: a) exis-

tencia de dos sistemas enzimáticos distintos que reducen el diacetilo y usan como donador de H uno el NADH y otro el NADPH; b) que se trate de un solo sistema enzimático que utilice indistintamente ambos donadores de H.

TABLA 11
Especificidad de sustratos

Sustancias análogas del sustrato (10 mM)	Sustrato donador de H. (0,2 mM)	Actividad ¹
Diacetilo	NADH	254
Hexano - 2 - 5 - diona	"	0
Acetona	"	0
Acetil acetona.	"	0
Dietyl - cetona	"	0
Acetoína	"	0
α - cetoglutarato	"	0
Diacetilo	NADPH	172,8

¹ nmoles de NADH oxidados por minuto.

Se consideró, por lo tanto, conveniente comprobar la evolución de las actividades NADH y NADPH dependientes en las distintas etapas de purificación, para lo que se procedió del siguiente modo:

Se trituraron 8 grs. de hígado de paloma en un homogeneizador de cuchillas M. S. E. con 40 mls de agua destilada. El homogeneizado resultante se filtró a través de 4 capas de gasa. En una alícuota del filtrado se analizó la actividad diacetilo reductasa con NADH y NADPH, según se ha descrito.

10 mls de homogeneizado acuoso se centrifugaron a 105.000 \times g. durante 100 minutos y se retiró una alícuota del sobrenadante para determinar igualmente la actividad diacetilo reductasa con NADH y NADPH. El resto del sobrenadante de la centrifugación anterior se precipitó con 1,5 volúmenes de acetona y se centrifugó a 10.000 \times g durante 15 minutos. El depósito se descartó y al sobrenadante se añadió más acetona, hasta una concentración de 2,5 volúmenes/vol de medio. El precipitado fue recogido por centrifugación, liofilizado y analizado del mismo modo que las preparaciones anteriores.

Unos mgrs de este liofilizado se pasaron por una columna de Sephadex G-100 de las mismas características que las descritas en el apartado 3.1.7. del capítulo III, ensayándose la actividad diacetilo reductasa en aquellos tubos en que era suficientemente alta como para que las determinaciones fuesen fidedignas.

Todas las operaciones para la obtención de las muestras se realizaron a temperatura de 0-4°C.

Los resultados obtenidos figuran en la tabla 12.

TABLA 12
Actividad diacetilo reductasa con NADH y NADPH en las distintas etapas de purificación

Etapas	Actividad con NADH ¹	Actividad con NADPH ¹	Relación NADH/NADPH
Homogeneizado acuoso	25	17,9	1.39
Centrifugación a 105.000 \times g. durante 100 minutos	90	64,2	1.4
Fracción acetónica entre 1,5 y 2,5 vol./vol. muestra	125,5	110	1.385
Paso por Sephadex G-100	23,5	43	0.53

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

IV.3.4. Participación de cofactores

Gran número de oxidorreductasas, como la D-hidroxiácido deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa y butilénlicol deshidrogenasa, utilizan iones metálicos como cofactores y son por tanto inactivadas por diálisis o adición de diversos agentes quelantes.

Con objeto de comprobar si la diacetilo reductasa de hígado de paloma precisa o no de cofactores metálicos, se realizaron las experiencias que se describen en los siguientes apartados.

3.4.1. Efectos de la diálisis

Se suspendieron 5 mgrs de polvo acetónico en 10 mls de tampón fosfato bisódico-monopotásico 1 M pH 6,1. Cinco mls de suspensión enzimática se dializaron en un tubo de celofán «Visking»; la diálisis se realizó, en continuo, a 0-4°C contra 5 litros del mismo tampón a un flujo de 500 mls/hora. Los otros 5 mls de preparación se utilizaron como testigo, manteniéndose durante todo el experimento a la misma temperatura que la muestra.

Cuando se dio por finalizada la diálisis se analizó la actividad diacetilo reductasa en 0,5 mls del dializado y en otros 0,5 de la preparación testigo. Los resultados obtenidos mostraron que no hubo pérdida de actividad por la diálisis.

3.4.2. Influencia de diversos quelantes sobre la actividad diacetilo reductasa

Se preparó una suspensión de liofilizado acetónico en tampón fosfato 0,1 M pH 6,1 (0,25 mg/ml) de la que se pipetaron fracciones de 1,5 mls a dos series de tubos de ensayo que contenían, unos 0,5 mls de agua destilada y otros 0,5 mls de una disolución de diacetilo en agua destilada (60 μ moles/ml). Se añadieron a continuación 0,5 mls de una de las siguientes soluciones quelantes: EDTA, ácido

oxálico, pirofosfato sódico, cupferrón, tiourea y ácido salicílico, a la concentración de 6×10^{-3} M.

Cada una de las muestras se mantuvo durante 30 minutos en un baño de hielo, al cabo de los cuales se añadieron 0,6 μ moles de NADH y 30 μ moles de diacetilo a las muestras que no lo contenían previamente, se ajustó el volumen a 3 mls con agua destilada y se determinó espectrofotométricamente la actividad diacetilo reductasa. Durante el experimento se realizaron tres controles, en los que la disolución de quelante fue sustituida por agua destilada.

No se observaron diferencias significativas entre la actividad diacetilo reductasa de las muestras incubadas en presencia y en ausencia de diacetilo. En la tabla 13 se recogen los valores medios de las determinaciones de actividad.

3.4.3. Inhibición por el ácido salicílico

A) Características de éste como inhibidor reversible

El examen de los resultados de la tabla 13 y los obtenidos en las experiencias de diálisis puso de manifiesto la conveniencia de establecer la naturaleza de la inhibición por el ácido salicílico. Al objeto de dar a los datos cinéticos el tratamiento correcto, se investigó antes la naturaleza reversible o irreversible de la inhibición; para ello se realizaron tres tipos de experimentos: 1) Estudio de la incubación en presencia del inhibidor; 2) influencia de la dilución sobre la actividad enzimática de preparaciones incubadas con inhibidor y 3) comparación de la actividad antes y después de la diálisis de muestras tratadas con el inhibidor.

TABLA 13
Influencia de algunos quelantes sobre la actividad diacetilo reductasa

	Concentración final	Actividad ¹	% de la actividad control
Control		180	
EDTA	1×10^{-3} M.	180	100
Acido oxálico	"	145	80,5
Pirofosfato sódico	"	180	100
Cupferrón	"	152	84,4
Tiourea	"	175	97,2
Acido salicílico	"	110	61,1

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

Experimento 1. Efectos de la incubación

A 3 mls de una disolución de polvo acetónico en sacarosa 1,5 M se añadieron otros 3 de una disolución (6 mM) de inhibidor en el mismo disolvente. La mezcla

se incubó a 0°C. Se ensayaron 0,5 mls de la preparación de enzima-inhibidor a los tiempos que aparecen en la gráfica 16.

Una muestra patrón sin inhibidor se mantuvo en las mismas condiciones y se efectuaron controles de actividad a lo largo del tiempo, para compensar cualquier pérdida de actividad, si la hubiera, o para constatar la estabilidad de la misma.

Los resultados obtenidos aparecen representados en la figura 16.

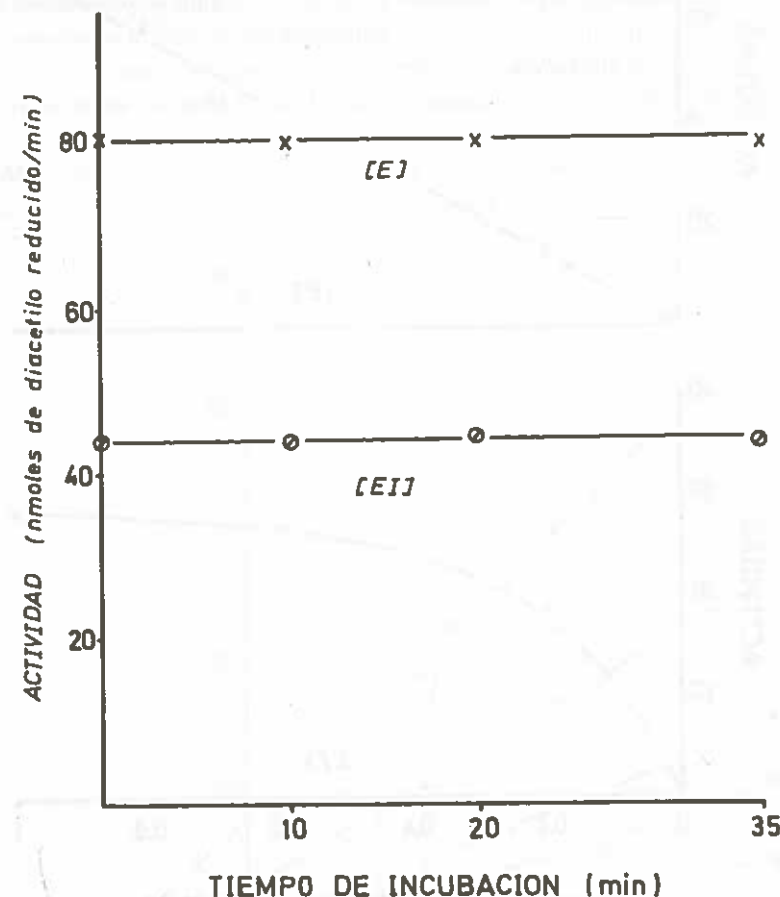


Figura 16.—Inactivación de la diacetilo reductasa de hígado de paloma por el ácido salicílico (3 mM.). Efectos de la incubación a 0°C.

Experimento 2. Efectos de la dilución sobre la actividad en preparaciones incubadas en presencia y en ausencia de ácido salicílico.

La muestra de enzima-inhibidor fue incubada a 0°C, durante 35 minutos. Transcurrido este tiempo, se analizaron 1, 0,8, 0,6, 0,4 y 0,2 mililitros de la preparación en un volumen final de 3 mililitros.

El mismo proceder se siguió simultáneamente en un blanco sin inhibidor. Los resultados de los análisis se representan en la gráfica 17.

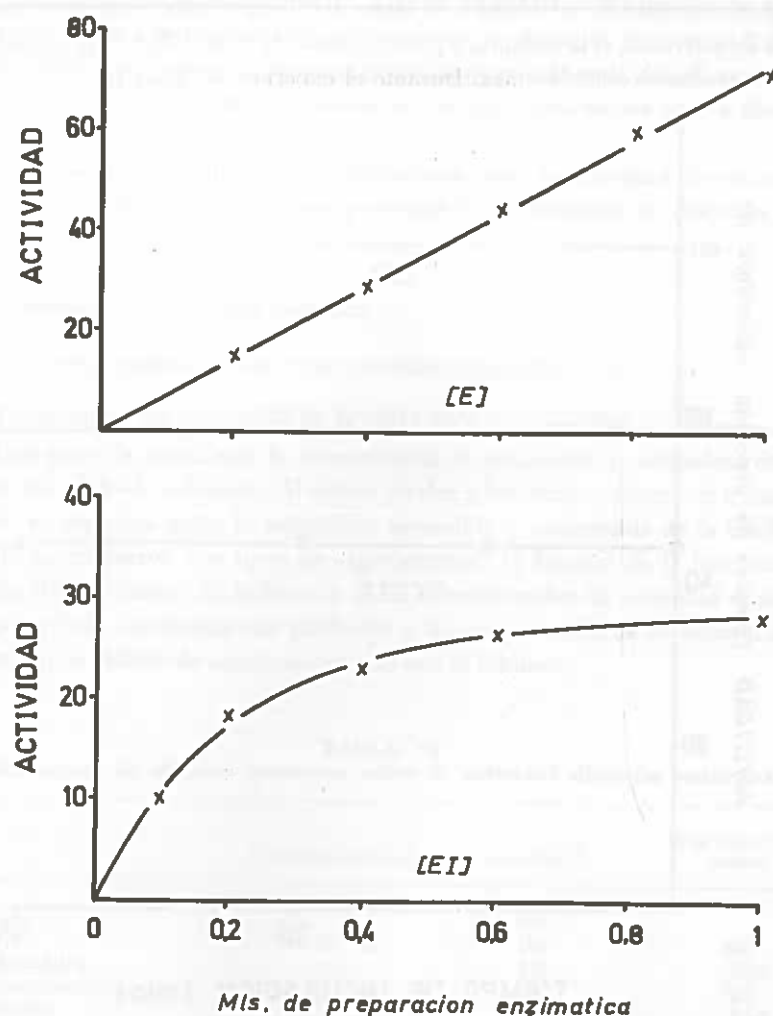


Figura 17.—Efecto de la dilución sobre la actividad diacetilo reductasa de preparaciones enzimáticas incubadas 35 min. a 0°C. en ausencia (E) y en presencia (EI) de ácido salicílico 3 mM.

Experimento 3. Diálisis

Un ml de la preparación enzima-inhibidor en sacarosa 1,5 M se transfirió a un tubo «Visking» y se dializó contra 100 volúmenes de sacarosa 1,5 M. La diálisis fue discontinua, cambiando dos veces el líquido de diálisis en un período de 9 horas. Al cabo de este tiempo se analizó la actividad enzimática de la preparación dializa-

da y de una muestra sin inhibidor, mantenida durante el mismo tiempo en circunstancias idénticas. La preparación inicial presentaba un porcentaje de inhibición del 64 %. Tras la diálisis se recuperó el 100 % de la actividad control.

B) Estudio cinético de la inhibición por el ácido salicílico

El mecanismo de inhibición del ácido salicílico respecto al diacetilo y al NADH ha sido estudiado utilizando las siguientes concentraciones de sustratos e inhibidor. *Efecto inhibidor sobre el diacetilo:* Concentración de NADH 0,2 milimolar diacetilo variable entre 0,8 mM y 5 mM, ácido salicílico variable entre 0,625 y 5 mM. *Efecto inhibidor sobre el NADH:* Diacetilo fijo 5 mM, NADH variable entre 0,10 mM y 0,40 mM e inhibidor variable entre 0,625 y 5 mM.

La concentración exacta de las disoluciones de diacetilo se comprobaron colo-

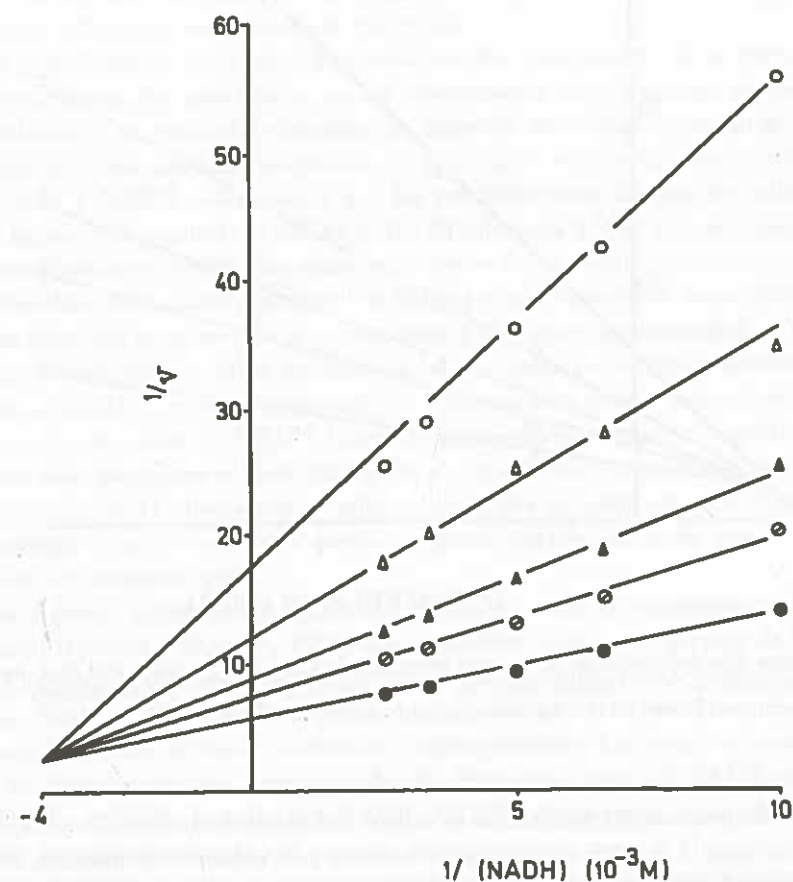


Figura 18.—Inhibición de la diacetilo reductasa de hígado de paloma por el ácido salicílico. Representación de $1/v$ (nmoles/min.) en función de $1/(NADH)$. Concentraciones de ácido salicílico: (O-O) 5 mM; (Δ - Δ) 2,5 mM; (\blacktriangle - \blacktriangle) 1,25 mM; (\emptyset - \emptyset) 0,625 mM; (\bullet - \bullet) 0.

rimétricamente por el método de OWADES y JAKOVAC y las de NADH por su extinción a 340 m μ .

Los ensayos de actividad se realizaron en las condiciones habituales de T^a, pH y molaridad del tampón.

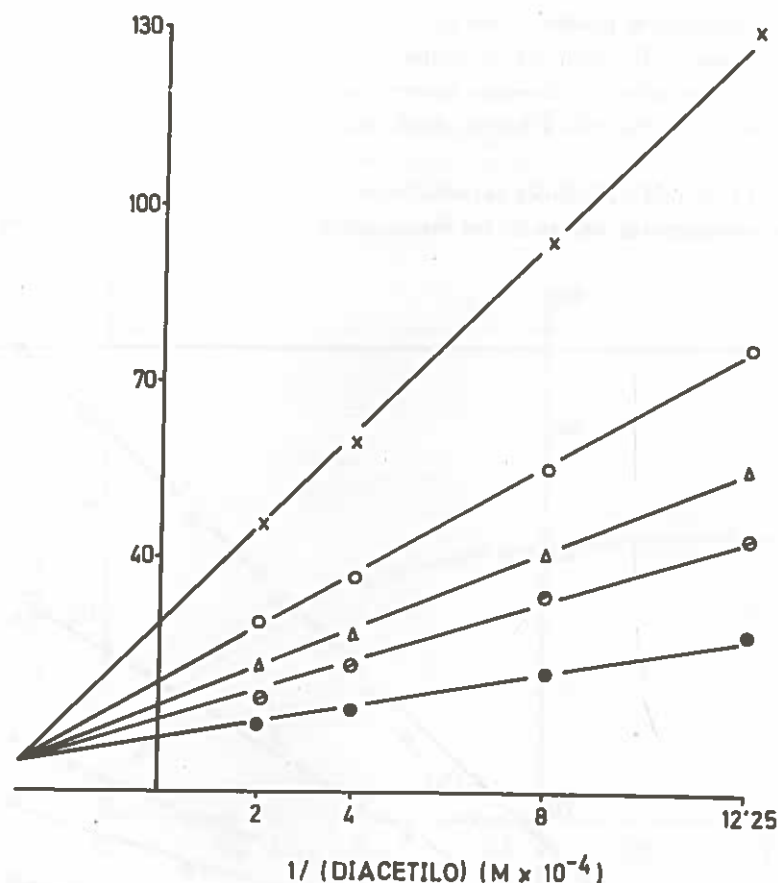


Figura 19.—Inhibición de la diacetilo reductasa de hígado de paloma por el ácido salicílico. Representación de $1/v$ (nmoles/min.) en función de $1/(\text{Diacetilo})$. Concentraciones de ácido salicílico: (x-x) 5 mM; (O-O) 2.5 mM; (Δ - Δ) 1.25 mM; (\emptyset - \emptyset) 0.625 mM; (\bullet - \bullet) 0.

Como preparación enzimática se utilizó liofilizado de la fracción protéica que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona por volumen de muestra, disuelto en sacarosa 1,5 M.

Los resultados de este experimento han sido representados por el método gráfico de FLORINI y VESTLING, tal y como aparecen en las figuras 18 y 19.

IV.4. DISCUSIÓN

El examen de la tabla 10 y de la figura 15 deja pocas dudas respecto a la naturaleza de la reacción estudiada. Las preparaciones utilizadas no tienen actividad acetato deshidrogenasa que pudiera inducir a error en la interpretación de los resultados si operase en conjunción con el sistema diacetilo mutasa (véase MARTÍN, 1971), por el que el único esquema imaginable que da cuenta de los cambios en la concentración de diacetilo, NADH y acetoína, es la reacción diacetilo reductasa:



De la tabla y figura citadas puede deducirse directamente también que en las condiciones del ensayo la reacción se comporta como irreversible, pues no se alcanza un equilibrio detectable de substratos y productos; desaparecen de la mezcla de reacción la totalidad del diacetilo y el NADH y se llega a concentraciones de productos correspondientes a una conversión mol a mol.

La posibilidad de que el equilibrio estuviese muy desplazado a favor del sentido diacetilo-acetoína fue investigada en los experimentos descritos bajo el título de reversibilidad. Los resultados obtenidos en ausencia de colorantes ponen de manifiesto que si la reacción fuese reversible, el equilibrio se establecía a concentraciones de diacetilo y NADH indetectables por los procedimientos de análisis utilizados, siendo la razón de equilibrio (NADH)/(HAD) inferior a 1/600 y la de (diacetilo)/(acetoína) inferior a 1/400. Los datos procedentes de las incubaciones en presencia de metasulfato de fenazina y nitroazul de tetrazolio sugieren que la imposibilidad de detectar actividad en el sentido inverso se debe a los valores mínimos de K_{eq} , puesto que demuestran que en estas condiciones se da cierta conversión enzimática de acetoína a diacetilo, probablemente porque el metasulfato de fenazina y el nitroazul de tetrazolio reoxidan en NADH formado manteniendo siempre el equilibrio en términos más favorables al funcionamiento de la reacción en sentido inverso. GABRIEL y col. (1971) observaron el mismo efecto con preparaciones de hígado de rata, pero el valor de sus datos queda, en cierta medida, reducido por la escasa pureza de sus preparaciones.

La diacetilo reductasa de hígado de paloma es, como la procedente de hígado de bóvido (BURCOS y MARTÍN, 1972) muy específica respecto al aceptor de Hidrógeno: El diacetilo (2-3 butanodiona) no puede ser sustituido como sustrato por la acetona, butilenglicol (2-3 butanodiol), dietilcetona (pentano-3-ona), acetilacetona (pentano-2-4-diona), hexano-2-5-diona o α -cetoglutarato. Las preparaciones utilizadas admiten en cambio como donador de Hidrógeno tanto el NADH como el NADPH. La relación de actividad NADH/NADPH dependiente es constante a lo largo de las primeras etapas del proceso de purificación, pero se altera durante el paso por Sephadex G-100, lo que constituye un dato en favor de la existencia en nuestras preparaciones de dos formas enzimáticas distintas.

La diálisis contra tampón fosfato 1 M. pH 6,1 y la filtración en gel de Sephadex

G-100 utilizando como eluyente el mismo tampón (véase apartado III.3.1.7.) no inactivan perceptiblemente al enzima, lo que demuestra que, de ser necesario algún cofactor metálico para la actividad, debe estar muy fuertemente ligado a la proteína, formando un metaloenzima. Como tal se comportan muchas otras deshidrogenasas dependientes del NAD, como la alcohol deshidrogenasa de levaduras (VALLEE y HOCH, 1955), de hígado equino (VALLEE y HOCH, 1957) y de hígado humano (WARTBURG y VALLEE, 1963; BETHUNE y col., 1963), la lactato deshidrogenasa de músculo de conejo (VALLEE y WACKER, 1956), la malato deshidrogenasa de corazón de cerdo (HARRISON, 1963) y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de diversos orígenes (KELETI y col., 1962).

Los estudios de inhibición con quelantes muestran que, a la concentración de 1 mM, el EDTA, el pirofosfato sódico y la tiourea no inhiben la reacción diacetilo reductasa, pero sí el ácido salicílico (40 %) y en menor grado el ácido oxálico (20 %) y el cupferrón (15 %). Este efecto inhibitor puede no ser debido a una acción quelante propiamente dicha, puesto que no existe relación entre las constantes de estabilidad de los posibles quelatos y los porcentajes de inhibición observados (véase DAWSON y col., 1969, págs. 423-434). Se ha descrito, por ejemplo, que el ácido oxálico inhibe competitivamente a la lactato deshidrogenasa de músculo cardíaco y a la succinato deshidrogenasa (DAWSON y col., 1962, pág. 157); el ácido salicílico inhibe a la D-aminoácido oxidasa por tres mecanismos que nada tienen que ver con su acción quelante, compitiendo simultáneamente con el coenzima, con el sustrato y con el propio enzima, lo que «presenta un buen ejemplo de una situación que es probablemente más común de lo que generalmente se cree» (WEBB, 1963, pág. 90).

Las experiencias realizadas para comprobar el tipo de inhibición de la actividad diacetilo reductasa por el ácido salicílico muestran que: a) el efecto inhibitor es completo a «tiempo cero», sin cambios apreciables en los siguientes 30 minutos de incubación; b) la dilución de las muestras incubadas con inhibidor da representaciones no lineales de la velocidad en función de la concentración de enzima; c) la inhibición desaparece por completo y fácilmente al retirar el ácido salicílico por diálisis; d) las representaciones de la inversa de la actividad diacetilo reductasa obtenida a concentración fija de NADH o diacetilo y variable de ácido salicílico y diacetilo o NADH, en función de 1/(sustrato variable) o de la concentración de inhibidor, dan en todos los casos líneas rectas, que se cortan en el segundo cuadrante.

Estos resultados corresponden a los que cabe esperar de una inhibición reversible no-competitiva, pero también podrían ser debidos a la interacción del quelante con algún ión metálico imprescindible para la actividad enzimática, siempre que el equilibrio se alcance muy rápidamente y la constante de estabilidad del complejo metal inhibidor sea muy baja. Aunque estas características son muy poco concordantes con un efecto de quelación, no puede descartarse que la diacetilo reductasa sea un metaloenzima, lo que por otra parte requeriría estudios en un amplio rango de pH; se conocen casos, como los de la catalasa y la peroxidasa, en los que la

eliminación del ión metálico, imposible a pH neutro, es fácil en medio ácido; lo mismo sucede con la α -amilasa, en la que el EDTA no es capaz de arrancar el Ca a pH 7-9, pero sí a pH 4 u 11 (FISCHER y STEIN, 1960).

Se concluye, por tanto, que la diacetilo reductasa de hígado de paloma no requiere la adición de cofactores metálicos, pero no se descarta que en la reacción que cataliza participe algún catión ligado muy fuertemente a la fracción protéica y no retirable por diálisis ni por filtración en Sephadex G-100.

CAPITULO V.

PARAMETROS CINETICOS Y TERMODINAMICOS: MECANISMO DE REACCION

V.1. INTRODUCCIÓN

La propiedad más esencial de los enzimas es la catálisis de ciertas reacciones bioquímicas. A diferencia de las reacciones químicas más comunes, las bioquímicas suelen verse afectadas no sólo por la concentración de sustratos y productos, sino también y más profundamente, por la presencia de una molécula protéica específica, el enzima, que idealmente no se altera a consecuencia de la reacción global.

Los estudios cinéticos constituyen uno de los instrumentos más poderosos con que cuenta la Bioquímica, tanto para elucidar el mecanismo y las propiedades de las reacciones enzimáticas, como para evaluar su importancia biológica.

En el curso temporal de una reacción enzimática se pueden distinguir dos períodos cinéticamente fundamentales: En la fase inicial, generalmente muy corta (período preestacionario) la concentración de los complejos enzima-sustrato asciende desde cero hasta alcanzar un valor máximo que permanece constante durante un intervalo de tiempo relativamente breve (período estacionario). Aunque el estudio de la cinética del período preestacionario puede proporcionar datos muy valiosos, el investigador se enfrenta en él con graves problemas instrumentales para la detección de intermediarios y la determinación cuantitativa de los cambios en la concentración de los mismos a lo largo del tiempo, que todavía no han podido ser resueltos en un buen número de reacciones enzimáticas. Estos problemas son de dos tipos fundamentales: La necesidad de disponer de un sistema analítico, capaz de distinguir entre enzimas y sustratos libres y en forma de complejos y la dificultad de registrar los cambios de concentración en intervalos de tiempo extremadamente breves (generalmente del orden de milisegundos).

El estudio del estado estacionario es menos exigente en estos dos aspectos, por lo que la mayor parte de los datos cinéticos de las reacciones enzimáticas que han sido (y están siendo) obtenidos, se refieren a este período.

La dificultad operatoria fundamental con que se tropieza en estos estudios radica en la necesidad de efectuar la medida de la velocidad de la reacción, antes de que los cambios en la concentración de sustratos y productos modifiquen las condiciones de estado estacionario, determinando las llamadas velocidades iniciales. En este sentido, velocidades iniciales de estado estacionario, deben entenderse todos los resultados referentes a actividades enzimáticas expuestos en esta tesis, salvo indicación en contrario.

La velocidad de las reacciones enzimáticas está influida por diversos parámetros experimentales, entre los que cabe citar como más importante la concentración de sustratos y enzima, la temperatura, el pH, la presencia de activadores e inhibidores y la constante dieléctrica y fuerza iónica del medio. En este capítulo se estudian los efectos de algunos de estos parámetros sobre la actividad diacetilo reductasa.

A) Concentración de enzima

En la mayoría de los casos la velocidad de una reacción enzimática es proporcional a la concentración de enzima, obedeciendo a la expresión $V = K(E)$. En la práctica esta relación se cumple sólo bajo condiciones ideales: ausencia de activadores e inhibidores, concentración suficiente de sustrato/s para no actuar limitando la velocidad y método adecuado de estimación de ésta.

Las representaciones de V en función de (E) cuando estas condiciones se cumplen deberán dar líneas rectas que pasen por el origen.

B) Concentración de sustrato

En las reacciones monosustrato los efectos de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial vienen dados por la ecuación de MICHAELIS y MENTEN, basada en el supuesto de que el sustrato forma un complejo con el enzima que se disocia rápida e irreversiblemente a enzima libre y producto.

(Ec. V.1.)

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + K_m/s}$$

donde V_{\max} es la velocidad máxima, que suele alcanzarse a concentración infinita de sustrato, y K_m la constante de MICHAELIS, operacionalmente definida como la concentración de sustrato, a la que la velocidad de reacción es la mitad de la máxima.

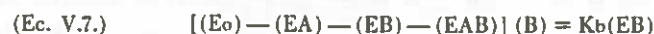
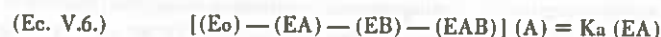
Redistribuciones de esta ecuación permiten obtener representaciones lineales para el cálculo de V_{\max} y K_m , tales como las de HANES (1932), LINEWEAVER-BURK (1934) y HOFSTEE (1959).

La mayor parte de las reacciones enzimáticas, como la catalizada por la diacetilo reductasa son del tipo $A + B = P + Q$, en las que intervienen dos sustratos, lo que exige la utilización de otros tratamientos.

La mecánica de MICHAELIS ha sido aplicada por HALDANE (1930) a reacciones enzimáticas con dos sustratos que forman complejos ternarios con el enzima (E) , de acuerdo con los siguientes equilibrios:



con estas cuatro ecuaciones de equilibrio:



en las que E_0 representa la concentración total de enzima, (EA) , (EB) y (EAB) la concentración de complejos binarios y ternarios y K_a , K_b , K'_a y K'_b las correspondientes constantes de disociación.

Las concentraciones de los complejos vienen dadas por las siguientes ecuaciones:

(Ec. V.10.)

$$(EAB) = \frac{(EA)(B)}{K'_b} = \frac{(EB)(A)}{K'_a}$$

(Ec. V.11.)

$$(EA) = \frac{(E)(A)}{K_a} = \frac{(EAB)K'_b}{(B)}$$

(Ec. V.12.)

$$(EB) = \frac{(E)(B)}{K_b} = \frac{(EAB)K'_a}{(A)}$$

(Ec. V.13.)

$$(E) = \frac{(EA)K_a}{(A)} = \frac{(EB)K_b}{(B)} = \frac{(EAB)K'_bK_a}{(A)} = \frac{(EAB)K'_aK_b}{(B)}$$

donde (E) es la concentración de enzima libre.

En el supuesto de que la etapa limitante de la velocidad sea la disociación de los complejos ternarios (EAB) , la velocidad será proporcional a la concentración de los citados complejos.

(Ec. V.14.)

$$v = K(EAB)$$

donde K representa la constante de velocidad.

La concentración total de enzima es igual a la suma de las concentraciones de las distintas formas en que se encuentra.

(Ec. V.15.)

$$(E_0) = (EAB) + (EA) + (EB) + (E)$$

Dividiendo la ecuación V.14 por la concentración total de enzima:

(Ec. V. 16.)

$$\frac{v}{(E_0)} = \frac{K(EAB)}{(EAB) + (EA) + (EB) + (E)} = \frac{K(EAB)}{(EAB) + \frac{(EAB)K'_b}{(B)} + \frac{(EAB)K'_a}{(A)} + \frac{(EAB)K'_aK'_b}{(A)(B)}}$$

y eliminando los términos (EAB) se obtiene:

(Ec. V.17.)

$$\frac{v}{(E_0)} = \frac{K}{1 + \frac{K'_b}{(B)} + \frac{K'_a}{(A)} + \frac{K'_aK'_b}{(A)(B)}}$$

despejando v en la ecuación anterior resulta:

(Ec. V.18.)

$$v = \frac{K(E_0)}{1 + \frac{K'_b}{(B)} + \frac{K'_a}{(A)} + \frac{K'_aK'_b}{(A)(B)}}$$

A concentración infinita de los dos sustratos, todo el enzima estará en forma de complejo ternario. Luego (E_0) es el valor máximo que puede tomar (EAB) y

(Ec. V.19.)

$$K(E_0) = V_{\max}$$

La Ec. V.18. puede escribirse entonces como

(Ec. V.20)

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_b}{(B)} + \frac{K_a}{(A)} + \frac{K_a K_b}{(A)(B)}}$$

Esta ecuación contiene tres de las cuatro constantes de equilibrio; la cuarta está relacionada con las otras tres por la ecuación:

(Ec. V.21.)

$$K_a K_b = K'_a K_b$$

Para cualquier concentración fija de B variando la concentración de A se obtendrá una curva de velocidad del tipo de la de MICHAELIS, representada por la ecuación V.22.

(Ec. V.22.)

$$v = \frac{V(B)/K_b + (B)}{1 + 1/(A) \frac{K_a K_b + K'_a (B)}{K_b + (B)}}$$

en la que la afinidad aparente por (A) depende de la concentración de B.

El valor de la velocidad máxima y de las cuatro constantes de equilibrio de una reacción bisubstrato se puede obtener, por tanto, mediante el método gráfico de FLORINI y VESTLING (1957): Representando $1/v$ en función de $1/(B)$, a concentración constante del substrato A se obtiene una línea recta que corta el eje de ordenadas en $1/V_a$ (velocidad máxima a la concentración fija de A). Por este camino se pueden obtener una serie de valores $1/V_a$, variando la concentración de A, que representados en función de $1/(A)$ dan una línea recta que corta el eje de abscisas en $-1/K'_a$ y al de ordenadas en $1/V_{\max}$. Las rectas de las representaciones de $1/V$ en función de $1/(B)$, a diferentes valores de (A), se cortan en un punto situado en $1/(B) = -1/K_b$. El punto de intersección de las rectas de la representación de $1/v$ en función de $1/(A)$, a diferentes valores de (B), corresponde a $1/(A) = -1/K_a$. Los datos de $1/(B)$ permiten calcular K_b y V_{\max} .

El tratamiento cinético de Haldane sólo es válido para reacciones enzimáticas en que participan dos substratos, cuya combinación con el enzima se haga al azar y en las que la etapa limitante de la velocidad sea la disociación de los complejos ternarios EAB a productos. Otras reacciones enzimáticas siguen modelos cinéticos distintos, algunos de los cuales dan lugar a ecuaciones de velocidad idénticas a la ecuación V.20 (véase Discusión del presente capítulo).

C) Temperatura

La investigación del efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción proporciona numerosos datos, tanto sobre la eficacia del enzima en el cumplimiento de su función específica, como sobre la propia reacción.

Los cambios de temperatura afectan al enzima de muchos modos, que cabe clasificar en los siguientes apartados fundamentales:

- 1.—Efectos sobre la estabilidad del enzima y/o los substratos.
- 2.—Efectos sobre el pH del tampón.
- 3.—Efectos sobre la actividad enzimática propiamente dicha (afinidad por los substratos e inhibidores y constante de velocidad).

Los estudios sobre el efecto de la temperatura que en esta tesis se describen, se limitan al apartado 3, ya que la influencia sobre la estabilidad del enzima y los substratos es enormemente dependiente de las constantes del medio y el grado de purificación del enzima y aportan pocos datos de interés general, sólo son válidos para las condiciones experimentales en que se obtienen; además, en estos experimentos el pH del tampón usado no es apreciablemente afectado por los cambios de temperatura.

Los efectos de la temperatura sobre la velocidad de transformación de los substratos en productos puede expresarse cuantitativamente de varias maneras: Q_{10} , energía de activación (E_a), incremento entalpía (ΔH), incremento de energía libre (ΔF) e incremento de entropía (ΔS).

El Q_{10} , incremento en la velocidad de reacción al aumentar 10°C . la temperatura, aunque muy usado en biología, ofrece escaso valor, por cuanto es dependiente de la temperatura y sólo válido en el rango de T° para el que ha sido calculado, que debe ser expresamente indicado.

La energía de activación puede determinarse basándose en la ecuación derivada de la Ley de Arrhenius.

(Ec. V.23.)

$$\ln K = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

en la que K es la constante de velocidad de la reacción, R la constante de los gases, T la temperatura absoluta y A una constante empírica (el llamado factor de frecuencia o factor de Arrhenius).

E_a puede obtenerse representando el logaritmo de K o el logaritmo de V a concentración constante de enzima en función de $1/T$, ya que la pendiente de la recta obtenida vale $-E_a/R$.

El cálculo del cambio de entalpía, energía libre y entropía puede efectuarse basándose en la teoría de las velocidades absolutas de reacción. De la expresión general de la velocidad de reacción formulada de acuerdo con la citada teoría se puede derivar la ecuación:

(Ec. V.24.)

$$2.3 \log \frac{k}{T} = 2.3 \log \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT}$$

(Véase WHITAKER, 1972).

donde k_B es la constante de Boltzmann y h la constante de Plank.

Representando $2.3 \log k/T$ en función de $1/T$ se obtendrá por tanto una línea recta, cuya pendiente vale $-\Delta H/R$.

Si se conoce la concentración del enzima puede calcularse ΔF a partir de la constante específica de velocidad (k).

(Ec. V.25.)

$$\Delta F = -RT \ln \frac{kh}{k_B T}$$

ΔS puede obtenerse de acuerdo con las leyes generales de la termodinámica, a partir de la expresión $\Delta F = \Delta H - T\Delta S$.

V.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Preparaciones enzimáticas.—Se utilizaron liofilizados de la fracción proteica que precipita entre 1.5 y 2.5 volúmenes de acetona, obtenidos como se describe en III.3.1.3.

Determinación de la actividad enzimática.—Se siguió la técnica espectrofotométrica descrita en el Capítulo II, introduciendo las modificaciones de las condiciones experimentales, cuya influencia en la velocidad de reacción se pretendió estudiar.

V.3. RESULTADOS

3.1. Relación entre concentración de enzima y actividad diacetilorreductasa (Test de linealidad)

Se realizaron dos experiencias. En una de ellas se tomaron 5 mgrs. de liofilizado, que se disolvieron en 5 mls. de agua destilada. En la otra, la misma cantidad de polvo acetónico se disolvió en 5 mls. de sacarosa 1,5 M. Las velocidades de la reacción se determinaron a concentraciones variables entre 0,2 y 1 ml. de disolución enzimática, en 3 mls. de volumen final con la concentración standard de tampón, sustrato y coenzima. Los resultados se recogen en la figura 20, a y b. En ambos casos la actividad resultó ser función lineal de la concentración de enzima.

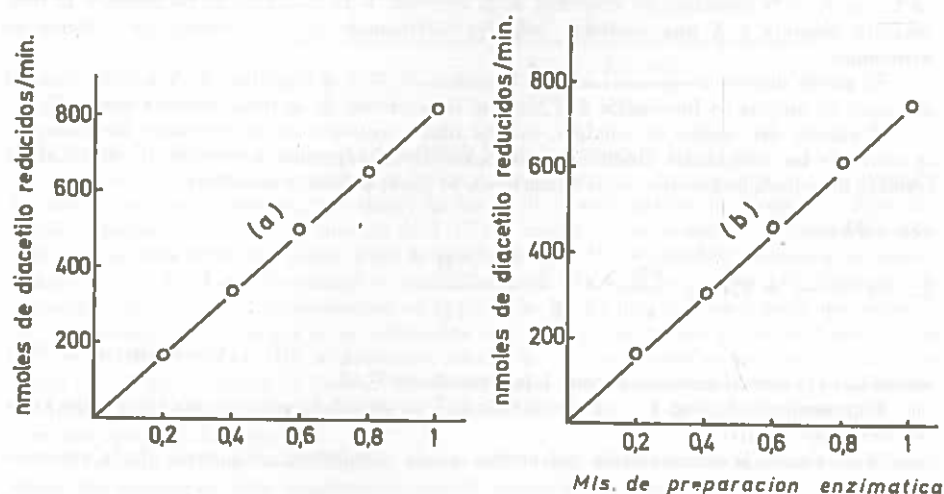


Figura 20.—Test de linealidad de las preparaciones enzimáticas utilizadas. (a) En sacarosa 1,5 M; (b) en agua destilada.

3.2. Influencia de la concentración de sustratos sobre la actividad diacetilorreductasa

La influencia de la concentración de diacetilo y NADH sobre la velocidad de la reacción se estudió en los rangos 0,312—60 mM y 0,10-0,40 mM, respectivamente.

La marcha experimental seguida para la realización de estos estudios fue la siguiente: Se preparó una disolución 120 mM de diacetilo en agua destilada, a partir de la cual se consiguieron, por dilución, las concentraciones deseadas. Asimismo

se preparó otra disolución 2,4 mM de NADH, cuya concentración se precisó espectrofotométricamente, midiendo su extinción a 340 mμ. A partir de ella se prepararon por dilución las concentraciones deseadas.

La preparación enzimática se disolvió en sacarosa 1,5 M. y se mantuvo en baño de hielo a lo largo de todo el experimento.

Con el fin de comprobar que la actividad se mantenía constante durante el tiempo que duraron los ensayos, se intercalaron periódicamente ocho controles a la concentración 10 mM de diacetilo y 0,20 mM de NADH.

Los ensayos se efectuaron a las concentraciones de sustratos que aparecen en las figuras 21 y 22.

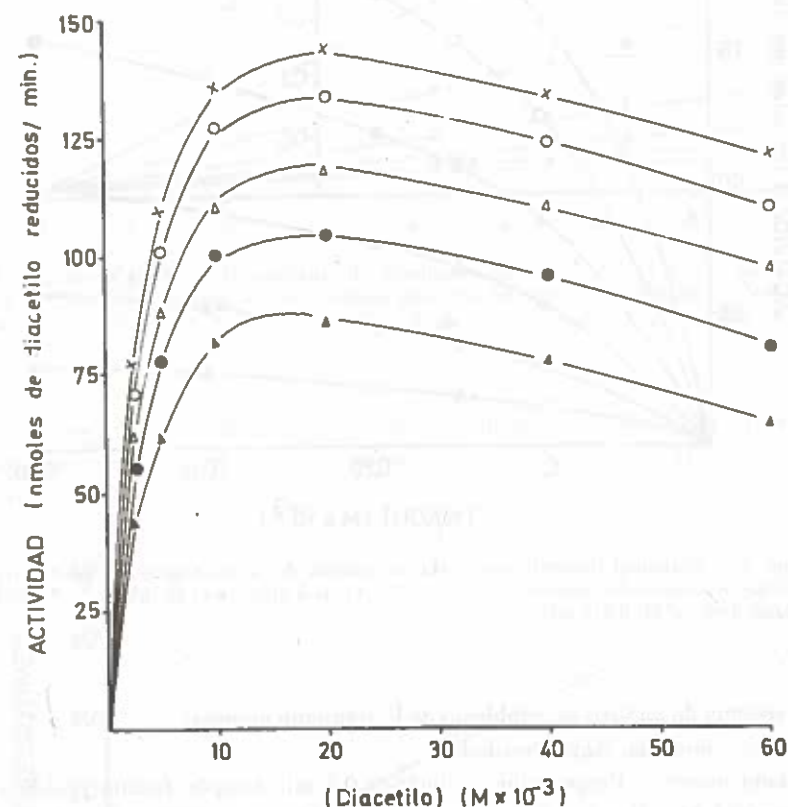


Figura 21.—Actividad diacetilorreductasa en función de la concentración de diacetilo a diferentes concentraciones de NADH: (x-x) 0,40 mM; (O-O) 0,30 mM; (△-△) 0,20 mM; (●-●) 0,15 mM; (▲-▲) 0,10 mM.

Con objeto de conseguir que la temperatura de ensayo (25°C) se alcanzase ya en el tiempo 0, los reactivos, excepto la preparación enzimática, se mantuvieron a una temperatura superior a la correspondiente de análisis, calculada para compensar el descenso consiguiente a la adición del enzima a 0°C a la mezcla de reacción.

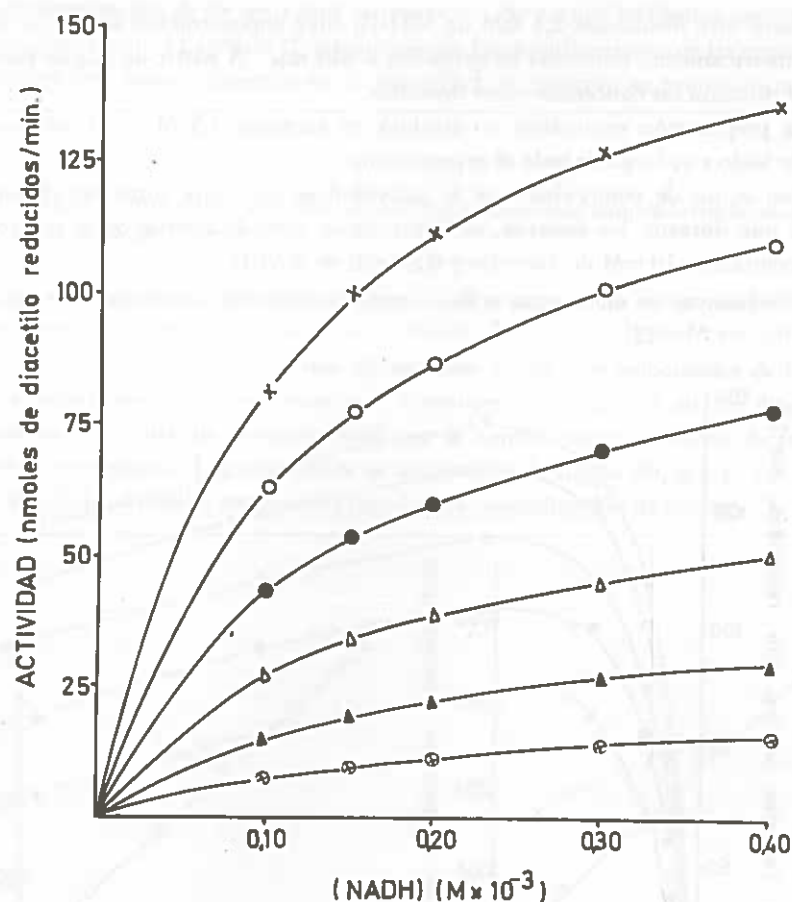


Figura 22.—Actividad diacetil reductasa en función de la concentración de NADH a diferentes concentraciones de diacetil: (x-x) 10 mM; (O-O) 5 mM; (●-●) 2.5 mM; (△-△) 1.25 mM; (▲-▲) 0.625 mM; (Ø-Ø) 0.312 mM.

El sistema de análisis se estableció de la siguiente manera:

Cubeta referencia: Agua destilada.

Cubeta muestra: Preparación enzimática 0,5 ml., tampón fosfato bisódico monopotásico 0,1 M. pH 6,1, 1,5 ml., diacetil variable entre 0,312 y 60 mM, NADH variable entre 0,10 y 0,40 mM. Volumen total 3 mls.

Los resultados obtenidos se reflejan en las figuras 21 y 22. Se observa claramente en la representación a concentración variable de diacetil y fija de NADH una inhibición por el propio sustrato, que empieza a niveles de 30 mM y se hace más patente a 60 mM; mientras que en la representación a concentración fija de diacetil y variable de NADH se puede comprobar que a la concentración más alta de NADH utilizada no se ha llegado todavía a la velocidad máxima. Las limitacio-

nes del aparato utilizando en la linealidad de la relación concentración de NADH extinción a 340 m μ impidieron el empleo de concentraciones más altas.

Las inversas de las velocidades iniciales se representaron en función de la inversa de la molaridad de NADH a concentración constante de diacetil (figura 23),

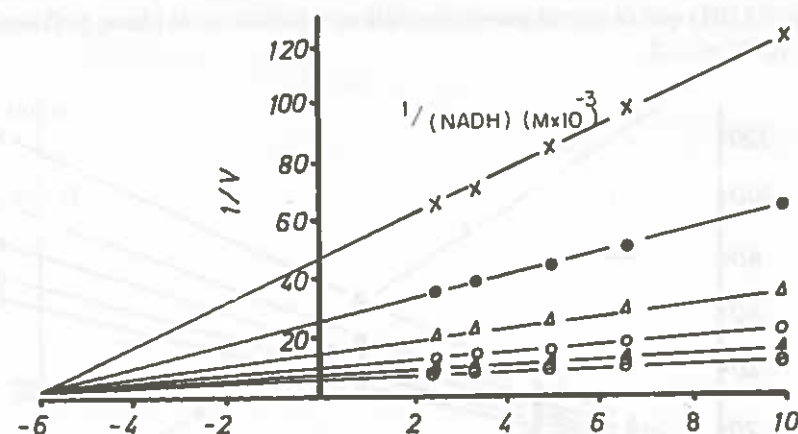


Figura 23.—Cálculo de la constante de disociación para el NADH, a 25°C y pH 6,1, por el método de Florini y Vestling. Representación primaria de $1/v$ en función de $1/(NADH)$. Concentraciones de diacetil (mM): (Ø-Ø) 10; (▲-▲) 5; (O-O) 2,5; (△-△) 1,25; (●-●) 0,625; (x-x) 0,312.

obteniéndose varias rectas, una por cada concentración de diacetil, cuyas prolongaciones se cortan por encima del eje de abscisas en el punto $1/(NADH) (M \times 10^{-3}) = -6,11$.

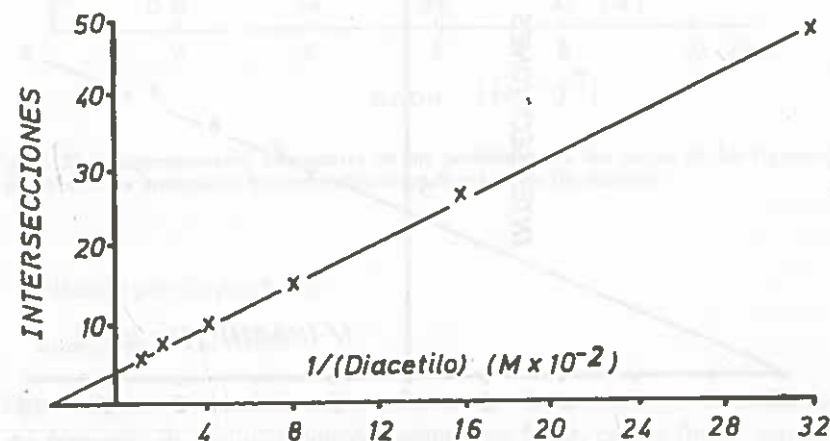


Figura 24.—Cálculo de la constante de Michaelis para el diacetil a 25°C. y pH 6,1. Representación secundaria de las intersecciones con el eje de ordenadas de las rectas de la fig. 23, en función de $1/(Diacetil)$.

Las intersecciones de estas rectas con el eje de ordenadas representadas en función de las inversas de la concentración de diacetilo (fig. 24) dan otra recta, cuya prolongación corta el eje horizontal en $1/(\text{Diacetilo}) (M \times 10^{-2}) = -3,54$.

Las inversas de las velocidades iniciales en función de las inversas de la concentración de diacetilo dan también una familia de rectas, (una por cada concentración de NADH) que se cortan por encima del eje abscisas en el punto $1/(\text{Diacetilo}) (M \times 10^{-2}) = -2$.

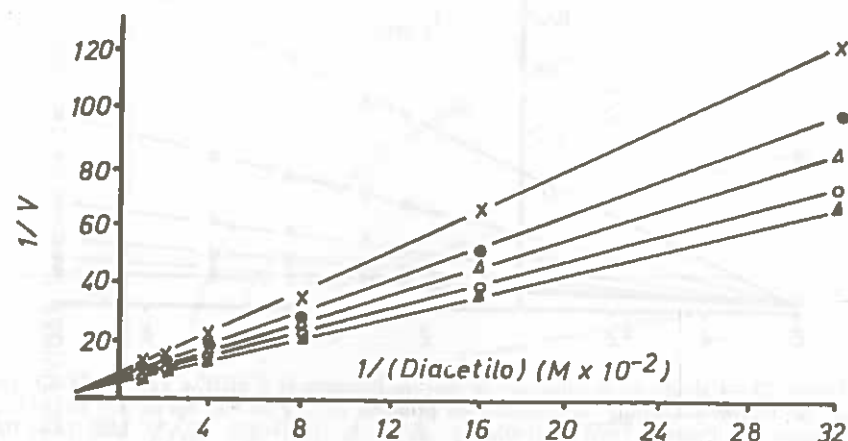


Figura 25.—Cálculo de la constante de disociación para el diacetilo a 25°C. y pH 6,1. Representación primaria de $1/v$ en función de $1/(\text{Diacetilo})$. Concentraciones de NADH (mM): (Δ - Δ) 0,40; (O-O) 0,30; (∇ - ∇) 0,20; (\bullet - \bullet) 0,15; (x-x) 0,10.

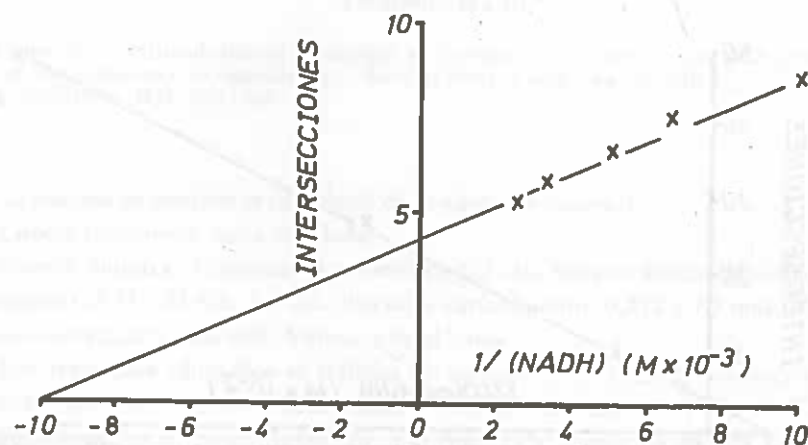


Figura 26.—Cálculo de la constante de Michaelis para el NADH a 25°C. y pH 6,1. Representación secundaria de las intersecciones con el eje de ordenadas de las rectas de la fig. 25, en función de $1/(\text{NADH})$.

Las intersecciones de estas rectas con el eje de ordenadas, representadas en función de la inversa de la concentración de NADH (fig. 26), dan otra recta que corta el eje de abscisas en $1/(\text{NADH}) (M \times 10^{-3}) = -10$.

En la figura 27 se representan las pendientes de las rectas primarias de las figuras 23 y 25 en función de las inversas de la concentración del sustrato fijo a que corresponden; puede observarse que se obtienen dos rectas paralelas.

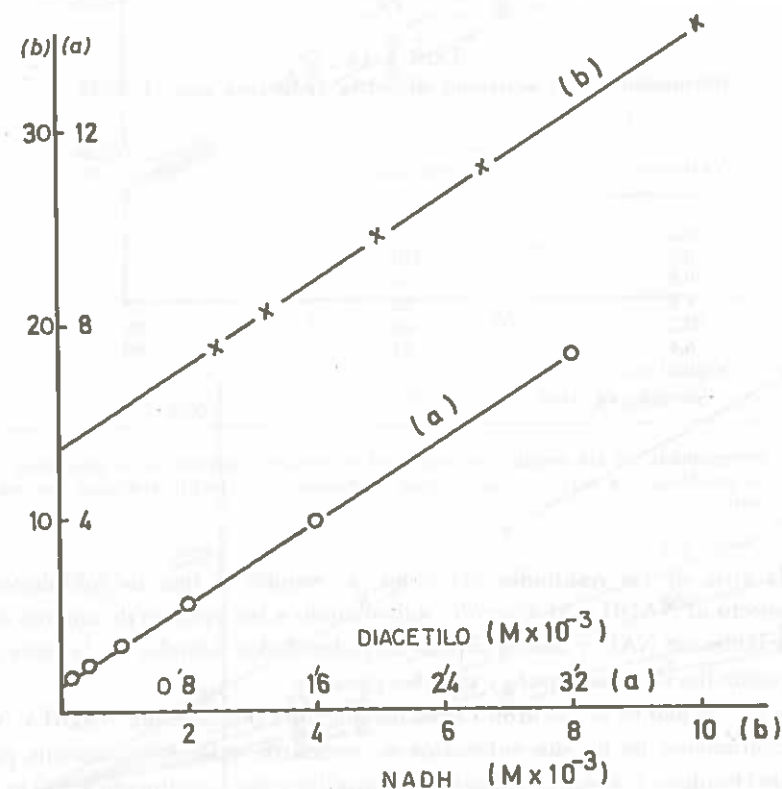


Figura 27.—Representación secundaria de las pendientes de las rectas de las figuras 23 y 25, en función de las inversas de las concentraciones de sustrato fijo variable.

3.3. Inhibición por los productos

3.3.1. Inhibición por el NAD

Se estudió la actividad diacetilo reductasa en las condiciones standard de ensayo en presencia de distintas concentraciones de NAD, con el fin de comprobar si este producto inhibía la reacción enzimática.

Los análisis se realizaron del siguiente modo:

Cubeta muestra: Preparación enzimática 0,5 ml., diacetilo (20 mM) en tampón fosfato bisódico monopotásico 0,1 M pH 6,1, 1,5 ml.; NAD (a concentración variable) 0,5 ml. y NADH 1,2 mM, 0,5 ml.

Cubeta referencia: Se sustituyó la disolución de NAD por agua destilada y la de diacetilo por el tampón disolvente.

En la tabla 14 se recogen los porcentajes de inhibición a las concentraciones de NAD indicadas en la misma.

TABLA 14
Inhibición de la actividad diacetilo reductasa por el NAD

NAD (mM)	Actividad diacetilo reductasa ¹	Porcentaje de inhibición %
0,2	173	11
0,4	170	13
0,8	166	15
1,6	56	72
3,2	40	80
6,4	23	90
Original sin inhibidor	193	—

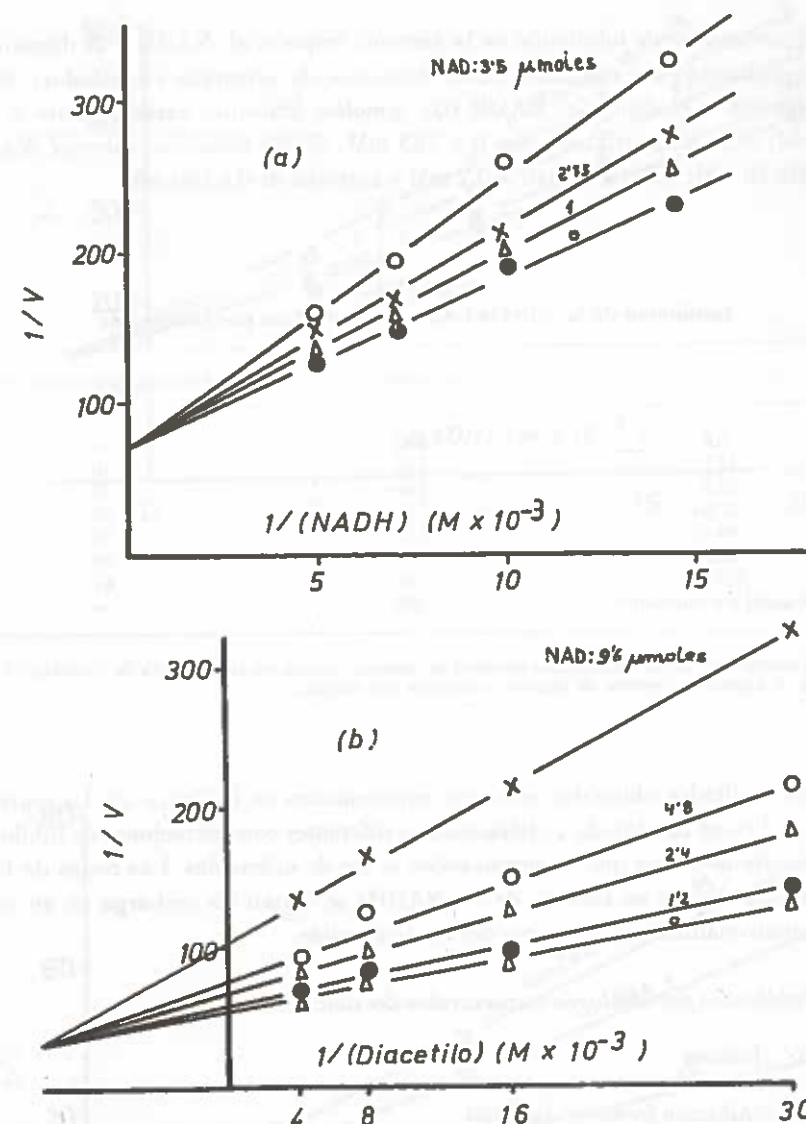
¹ Determinada en las condiciones standard de ensayo, excepto en la presencia de inhibidor. La actividad se expresa en nmoles de diacetilo reducido por minuto

A la vista de los resultados obtenidos, se estudió el tipo de inhibición del NAD respecto al NADH y al diacetilo, adicionando a las mezclas de análisis cantidades variables de NAD y determinando las velocidades iniciales de la reacción a concentración fija de un sustrato y variable del otro.

Con este objeto se prepararon varias disoluciones de diacetilo, NADH y NAD; las concentraciones de los dos sustratos se precisaron colorimétricamente, por el método de Owades y Jakovac, en el caso del diacetilo y por la extinción a 340 m en el de NADH. Los ensayos de actividad se realizaron a pH 6,1 en tampón fosfato bisódico monopotásico 0,05 M y a las concentraciones siguientes de sustrato e inhibidor: *Inhibición frente al NADH*: diacetilo 10 mM; NADH variable entre 0,15 y 0,6 moles; NAD variable entre 0 y 3,5 μ moles. *Inhibición frente al diacetilo*: NADH 0,6 μ moles; diacetilo variable entre 3,9 y 31,2 μ moles y NAD variable entre 0 y 9,6 μ moles.

Los resultados obtenidos se representan gráficamente en la figura 28.

Las rectas obtenidas por cada concentración de inhibidor, representando la inversa de la velocidad en función de la inversa de la concentración de NADH se cortan sobre el eje de ordenadas y la representación de $1/v$ en función de $1/(\text{Diace-tilo})$ a concentración constante de NAD se cortan en el segundo cuadrante, por encima del eje de abscisas.



El mecanismo de inhibición de la acetoina respecto al NADH y al diacetilo se estudió utilizando las siguientes concentraciones de sustrato e inhibidor: *Efecto inhibidor sobre el diacetilo*: NADH 0,6 μ moles; diacetilo, variable entre 3,12 y 24,5 mM; acetoina, variable entre 0 y 753 mM. *Efecto inhibidor sobre el NADH*: Diacetilo 10 mM; NADH de 0,07 a 0,2 mM y acetoina de 0 a 188 mM.

TABLA 15
Inhibición de la actividad diacetilo reductasa por la acetoina

Acetoina (mM)	Actividad ¹	Porcentaje inhibición (%)
5,8	190	—
11,7	162	10
23,5	158	12
47,07	140	22
94,15	117	35
188,3	89	50
376,6	59	67
Original sin inhibidor	180	—

¹ Determinada en las condiciones standard de ensayo, excepto en la presencia de inhibidor. La actividad se expresa en nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

Los resultados obtenidos aparecen representados en la figura 29. La representación de $1/v$ en función de $1/(\text{Diacetilo})$ a diferentes concentraciones de inhibidor, da una serie de rectas que se cortan sobre el eje de ordenadas. Las rectas de la representación de $1/v$ en función de $1/(\text{NADH})$ se cortan sin embargo en un punto del segundo cuadrante, por encima del eje de abscisas.

3.4. Inhibición por análogos estructurales del diacetilo

A) Acetona

1) Inhibición frente al diacetilo

Siguiendo el proceder descrito para la inhibición por la acetoina, se estudió el posible efecto inhibidor de la acetona, variando las concentraciones de esta sustancia en el medio de análisis entre 42,5 y 340 mM y las de diacetilo entre 0,8 y 5 mM, manteniendo fija la de NADH (0,2 mM).

En la figura 30 se representa $1/v$ en función de $1/(\text{Diacetilo})$ lo que da una familia de rectas (una por cada concentración de acetona), que se cortan sobre el eje de ordenadas, y en la figura 31 los mismos datos en función de la concentración de acetona, obteniéndose otra familia de rectas que convergen en el segundo cuadrante.

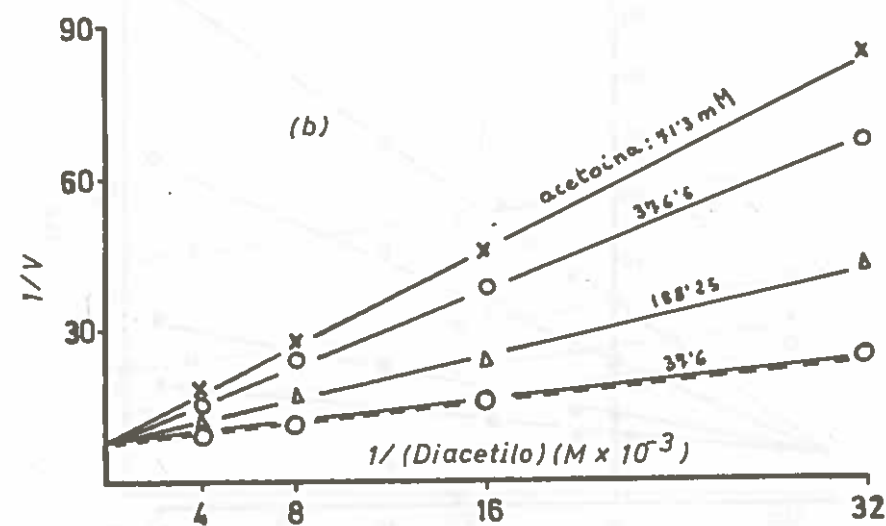
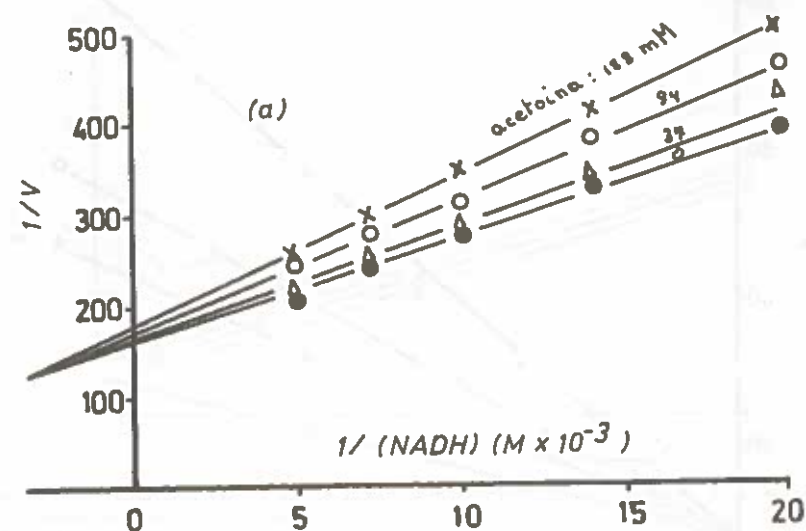


Figura 29.—Inhibición por la acetoina. (a) Representación de $1/v$ en función de $1/(\text{NADH})$ a las concentraciones de inhibidor que se indican; concentración de diacetilo 10 mM. (b) Representación de $1/v$ en función de $1/(\text{Diacetilo})$ a concentraciones variables de acetoina; concentración de NADH: 0,2 mM.

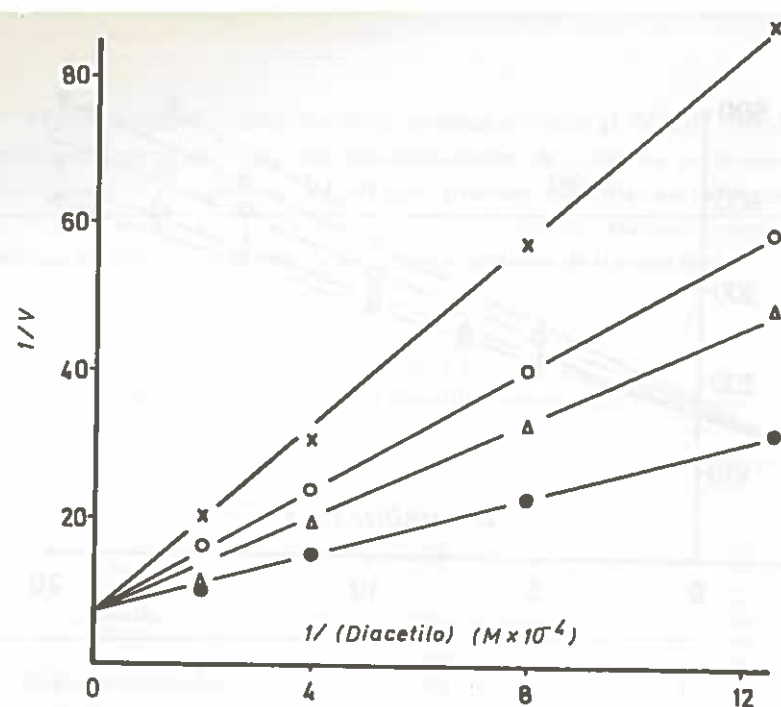


Figura 30.—Inhibición por la acetona. Representación de $1/v$ en función de $1/(\text{Diacetilo})$. Concentración de NADH: 0,2 mM. Concentraciones de acetona: (x-x) 340 mM; (O-O) 170 mM; (Δ - Δ) 85 mM; (●-●) 42,5 mM.

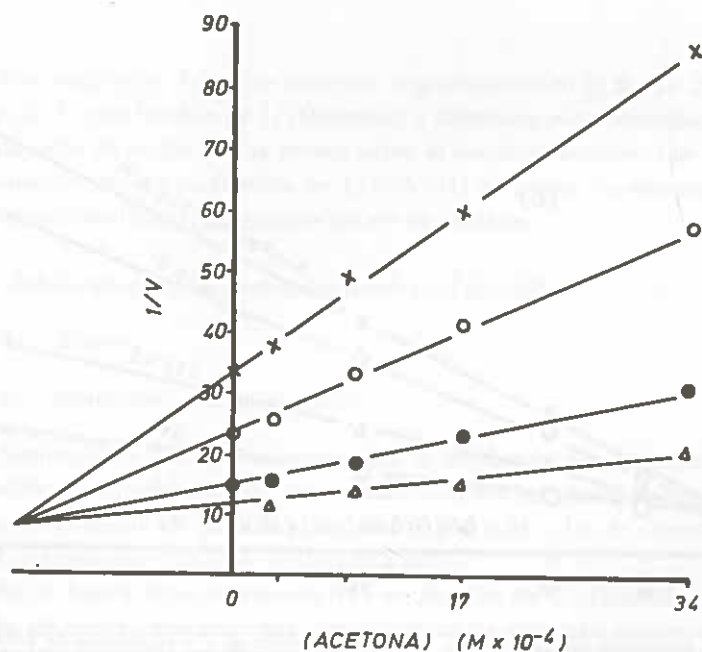


Figura 31.—Inhibición por la acetona. Representación de $1/v$ en función de la concentración de acetona a diferentes concentraciones de diacetilo: (x-x) 0,8 mM; (O-O) 1,25 mM; (●-●) 2,5 mM; (Δ - Δ) 5 mM. Concentración de NADH: 0,2 mM.

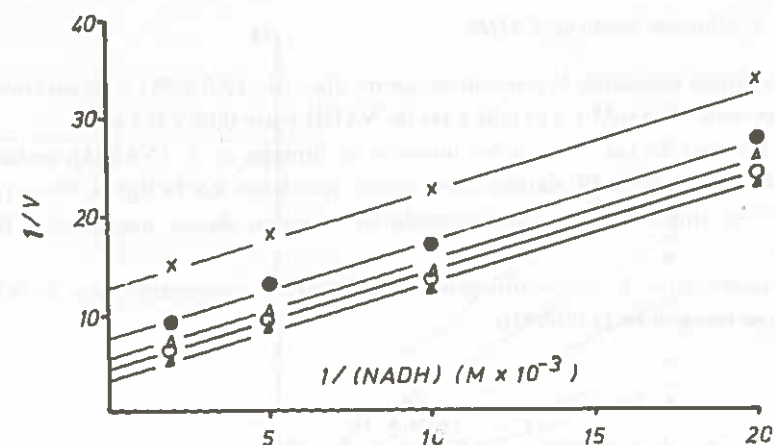


Figura 32.—Inhibición por la acetona. Representación de $1/v$ en función de la inversa de la concentración de NADH. Concentración de diacetilo: 2,5 mM. Id. de acetona: (x-x) 340 mM; (●-●) 170 mM; (Δ - Δ) 85 mM; (O-O) 42,5 mM; (\blacktriangle - \blacktriangle) 0.

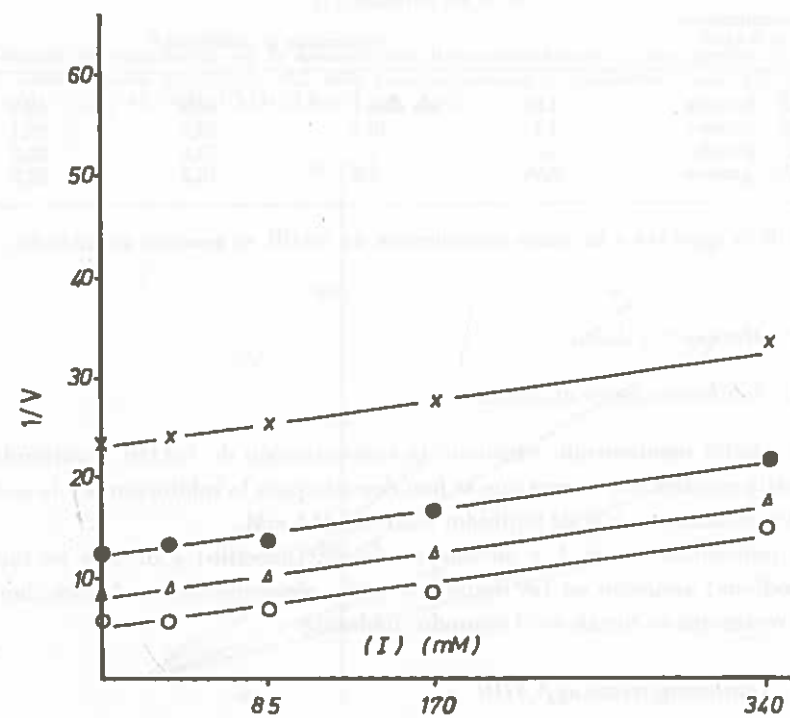


Figura 33.—Inhibición por la acetona. Representación de $1/v$ en función de la concentración de acetona a diferentes concentraciones de NADH: (x-x) 2,5 mM; (●-●) 5 mM; (Δ - Δ) 10 mM; (O-O) 20 mM. Concentración de diacetilo: 2,5 mM.

2) Inhibición frente al NADH

Se mantuvo constante la concentración de diacetilo (2,5 mM) y se variaron las de acetona entre 12,5 mM y 340 mM y las de NADH entre 0,05 y 0,4 mM.

Las inversas de las velocidades iniciales en función de $1/(\text{NADH})$, se han representado en la figura 32, dando líneas rectas paralelas. En la figura 33 se representa $1/v$ en función de la concentración de acetona, dando nuevamente líneas paralelas.

Los porcentajes de inhibición obtenidos a distintas concentraciones de NADH y acetona se recogen en la tabla 16.

TABLA 16
Porcentajes de inhibición por la acetona a diferentes concentraciones de NADH e inhibidor

Concentraciones de inhibidor	0,0425 M	0,085 M	0,17 M	0,34 M
Concentraciones de NADH	Porcentajes de inhibición ¹			
1,2 μmoles	1,08	16	34,8	60,1
0,6 μmoles	1,1	10,4	28,9	49,1
0,3 μmoles	3,7	7,7	23,4	42,2
0,15 μmoles	0,96	5,8	13,2	28,2

¹ % de la actividad a la misma concentración de NADH en ausencia de inhibidor.

B) Hexano 2-5 diona

1) Inhibición frente al diacetilo

Se estudió manteniendo constante la concentración de NADH y variando las de diacetilo en idénticos rangos que se han descrito para la inhibición por la acetona frente a este sustrato, y la de inhibidor entre 0 y 166 mM.

La representación de $1/v$ en función de $1/(\text{Diacetilo})$ y de $1/v$ en función (Hexanodiona) aparecen en las figuras 34 y 35, respectivamente. Ambos dan una serie de rectas que se cortan en el segundo cuadrante.

2) Inhibición frente al NADH

Fue estudiada a concentración constante de diacetilo (2,5 mM), variando la de NADH entre 0,05 y 0,4 mM y la de inhibidor entre 0 y 166 mM.

Las inversas de las velocidades iniciales en función de $1/(\text{NADH})$ y Hexano-

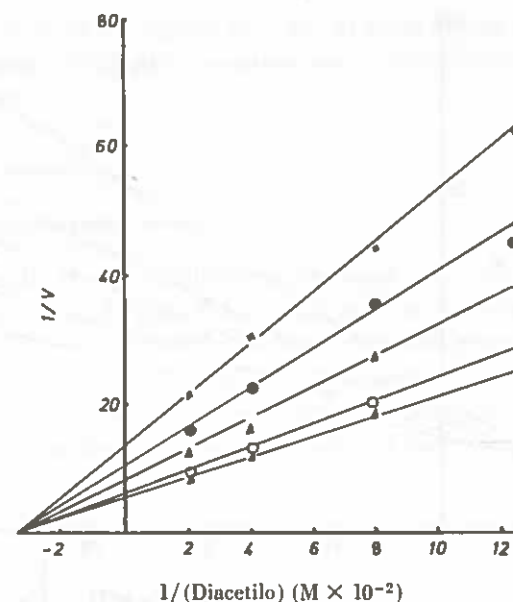


Figura 34.—Inhibición por la hexanodiona. Representación de $1/v$ en función de $1/(\text{Diacetilo})$. Concentración de NADH: 0,2 mM. Concentraciones de inhibidor: (x-x) 175 mM; (●-●) 87,5 mM; (△-△) 43,7 mM; (O-O) 21,8 mM; (▲-▲) 0.

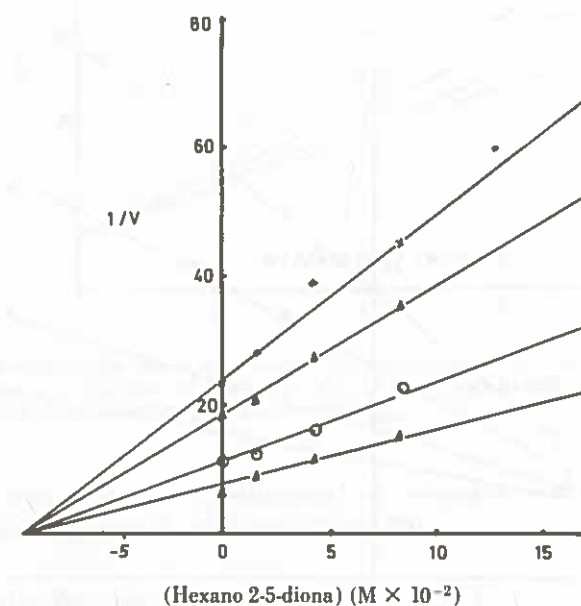


Figura 35.—Inhibición por la hexanodiona. Representación de $1/v$ en función de la concentración de inhibidor a concentraciones variables de diacetilo: (x-x) 0,8 mM; (△-△) 1,25 mM; (O-O) 2,5 mM; (▲-▲) 5 mM. Concentración de NADH: 0,2 mM.

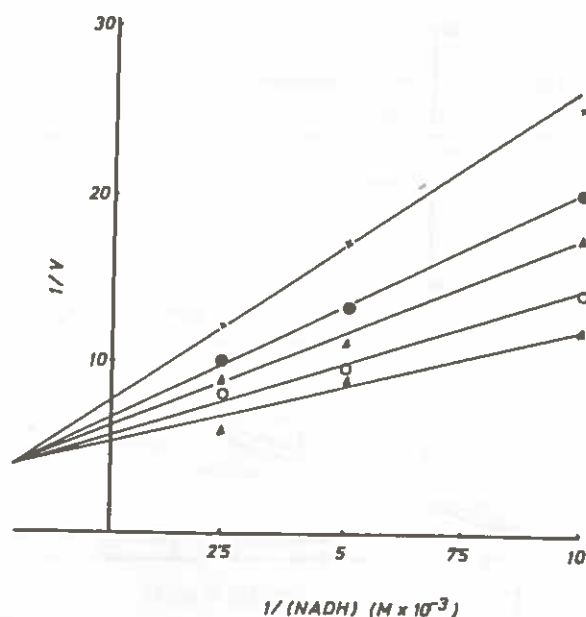


Figura 36.—Inhibición por la hexanodiona. Representación de $1/v$ respecto a $1/(NADH)$. Concentración de diacetilo: 10 mM. Concentraciones de hexanodiona: (x-x) 175 mM; (●-●) 87,5 mM; (△-△) 43,7 mM; (○-○) 21,8 mM; (▲-▲) 0.

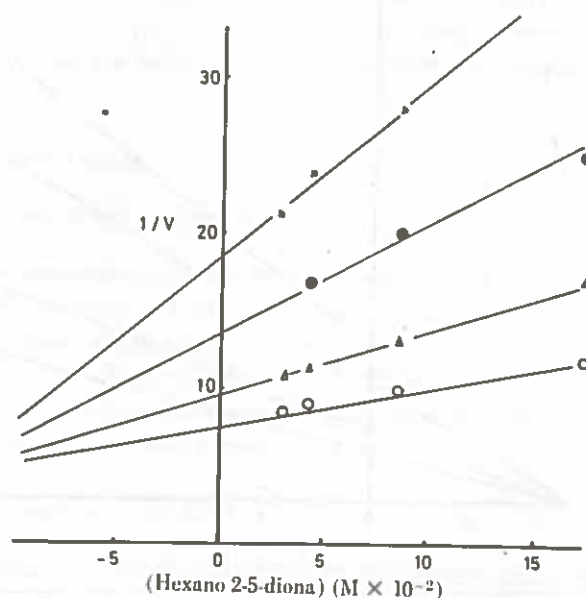


Figura 37.—Inhibición por la hexanodiona. Representación de $1/v$ en función de la concentración de inhibidor a concentraciones variables de NADH: (x-x) 2,5 mM; (●-●) 5 mM; (△-△) 10 mM; (○-○) 20 mM. Concentración de diacetilo: 2,5 mM.

diona se representan en las figuras 36 y 37. Al igual que en el estudio del patrón de inhibición frente al diacetilo, se obtiene una serie de rectas que se cortan en el segundo cuadrante.

C) Dietil cetona

1) Inhibición frente a diacetilo

Para el estudio de esta inhibición se mantuvo constante la concentración del sustrato donador de Hidrógeno NADH (0,2 mM) se variaron las concentraciones de diacetilo e inhibidor entre 0,025 y 5 mM y 0 y 20 mM, respectivamente.

Las representaciones de las inversas de la velocidad de reacción en función de la inversa de la concentración de diacetilo dan un grupo de rectas que convergen sobre el eje de ordenadas (figura 38). Sin embargo las rectas obtenidas en la repre-

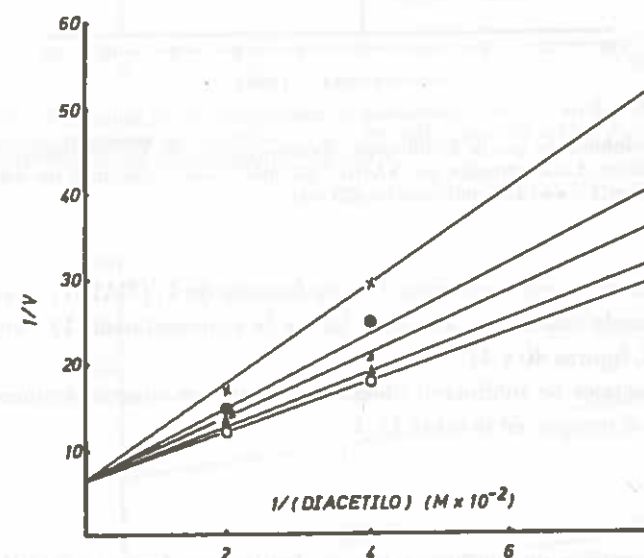


Figura 38.—Inhibición por la dietilcetona. Representación de $1/v$ en función de $1/(DIACETILO)$ a distintas concentraciones de inhibidor: (x-x) 20 mM; (●-●) 10 mM; (▲-▲) 5 mM; (△-△) 2,5 mM; (○-○) 0. Concentración de NADH: 0,2 mM.

sentación $1/v$ en función de [dietilcetona] no convergen en el mismo punto, sino en otro situado en el segundo cuadrante (figura 39).

2) Inhibición frente a NADH

En este estudio permaneció constante la concentración de diacetilo (2,5 mM) y se variaron las de NADH e inhibidor entre 2,5 y 20, y 0 y 20 mM, respectivamente.

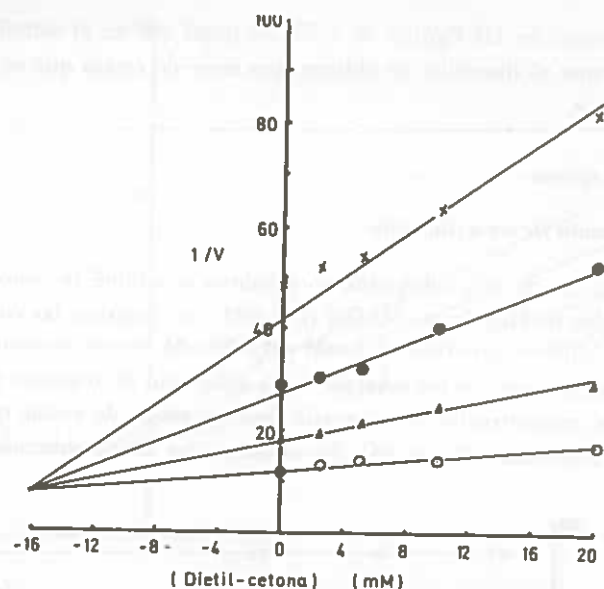


Figura 39.—Inhibición por la dietilcetona. Representación de $1/v$ en función de la concentración de inhibidor. Concentración de NADH: 0,2 mM. Concentraciones de diacetilo: (O-O) 5 mM; (\blacktriangle - \blacktriangle) 2,5 mM; (\bullet - \bullet) 1,25 mM; (x-x) 0,625 mM.

Las rectas de la representación $1/v$ en función de $1/(\text{NADH})$ se cortan en un punto del segundo cuadrante, así como las de la representación $1/v$ en función de $[\text{dietilcetona}]$, figuras 40 y 41.

Los porcentajes de inhibición obtenidos a distintas concentraciones de NADH y dietilcetona se recogen en la tabla 17.

TABLA 17
Porcentajes de inhibición por la dietilcetona frente a NADH

Concentración de inhibidor	2,5 mM	5 mM	10 mM	20 mM
Concentración de NADH	Porcentajes de inhibición ¹			
1,2 μ moles	1,7	11,9	26,9	40,1
0,6 μ moles	1,5	8,3	18,4	32,8
0,3 μ moles	0,89	6	13	25,6
0,15 μ moles	0,9	5,2	11,1	19,2

¹ % de la actividad a la misma concentración de NADH en ausencia de inhibidor.

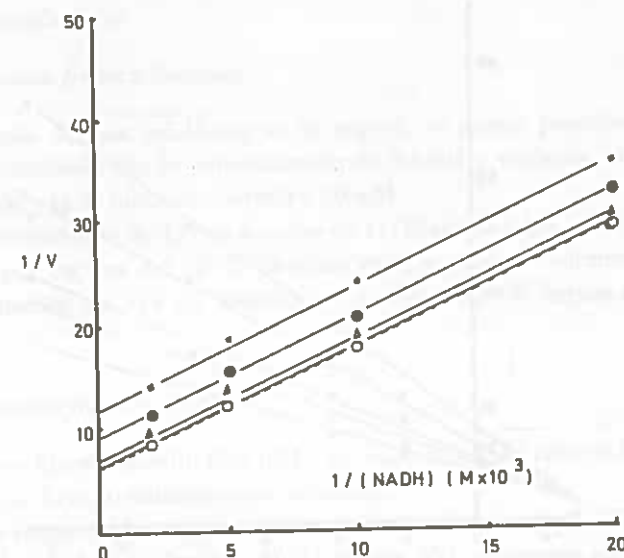


Figura 40.—Inhibición por la dietilcetona. Representación de $1/v$ en función de $1/(\text{NADH})$ a diferentes concentraciones de inhibidor: (x-x) 20 mM; (\bullet - \bullet) 10 mM; (\triangle - \triangle) 5 mM; (\bullet - \bullet) 2,5 mM; (O-O) 0. Concentración de diacetilo: 2,5 mM.

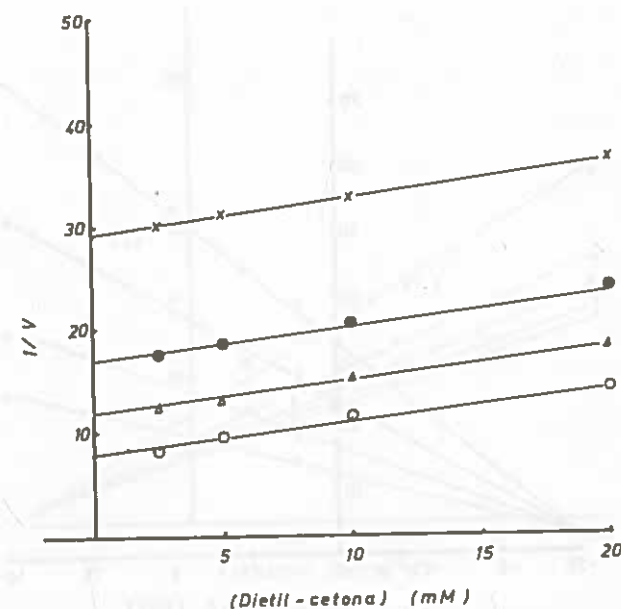


Figura 41.—Inhibición por la dietilcetona. Representación de $1/v$ en función de (inhibidor). Concentración de diacetilo: 10 mM. Concentraciones de NADH: (O-O) 0,20 mM; (\triangle - \triangle) 0,10 mM; (\bullet - \bullet) 0,05 mM; (x-x) 0,025 mM.

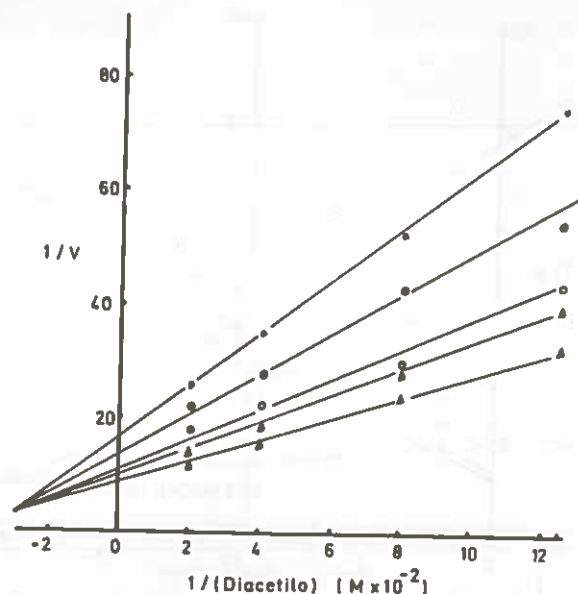


Figura 42.—Inhibición por el α -cetoglutarato. Representación de $1/v$ en función de $1/(\text{Diacetilo})$ a diferentes concentraciones de inhibidor: (x-x) 10 mM; (•-•) 5 mM; (O-O) 2,5 mM; (Δ-Δ) 1,25 mM; (Δ-Δ) 0. Concentración de NADH: 0,2 mM.

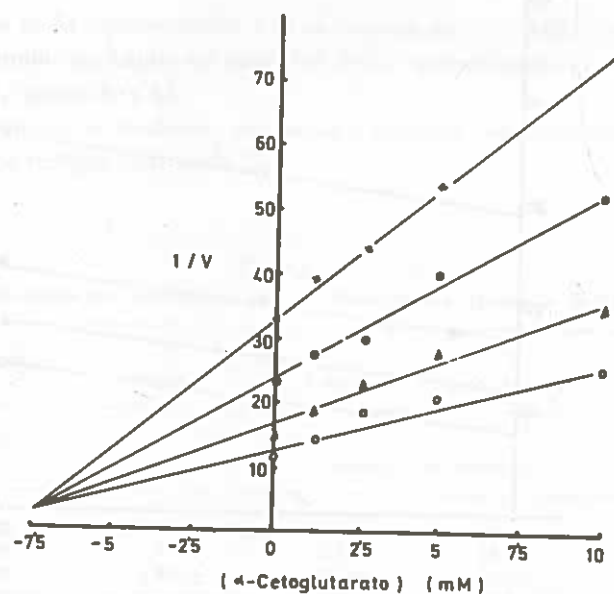


Figura 43.—Inhibición por el α -cetoglutarato. Representación de $1/v$ en función de (inhibidor) a varias concentraciones de diacetilo: (x-x) 5 mM; (•-•) 2,5 mM; (Δ-Δ) 1,25 mM; (O-O) 0,8 mM. Concentración de NADH: 0,2 mM.

D) α -cetoglutarato

1) Inhibición frente a diacetilo

En el estudio de esta inhibición se ha seguido el mismo proceder que en los anteriores, manteniendo fija la concentración de NADH y variando la de diacetilo entre 0,8 y 5 mM y la de inhibidor entre 0 y 10 mM.

Las representaciones de $1/v$ en función de $1/(\text{Diacetilo})$ dan una serie de rectas que se cortan por encima del eje de abscisas en el segundo cuadrante (figura 42) en la representación de $1/v$ en función de (I) las rectas se cortan en el mismo segundo cuadrante (figura 43).

2) Inhibición frente a NADH

Se mantuvo fijo el diacetilo (2,5 mM). Se varió el NADH entre 0,15 y 0,40 mM y el inhibidor en el rango anteriormente indicado.

Tanto las rectas de la representación de $1/v$ en función de $1/(\text{NADH})$ (figura 44), como las de $1/v$ en función de (I) (figura 45), convergen en un punto del segundo cuadrante.

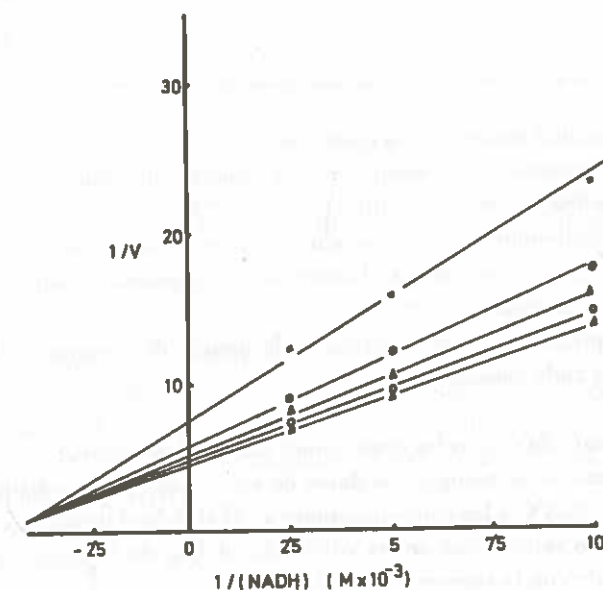


Figura 44.—Inhibición por el α -cetoglutarato. Representación de $1/v$ en función de $1/(\text{NADH})$. Concentración de diacetilo: 2,5 mM. Concentraciones de α -cetoglutarato: (x-x) 10 mM; (•-•) 5 mM; (Δ-Δ) 2,5 mM; (O-O) 1,25 mM; (▲-▲) 0.

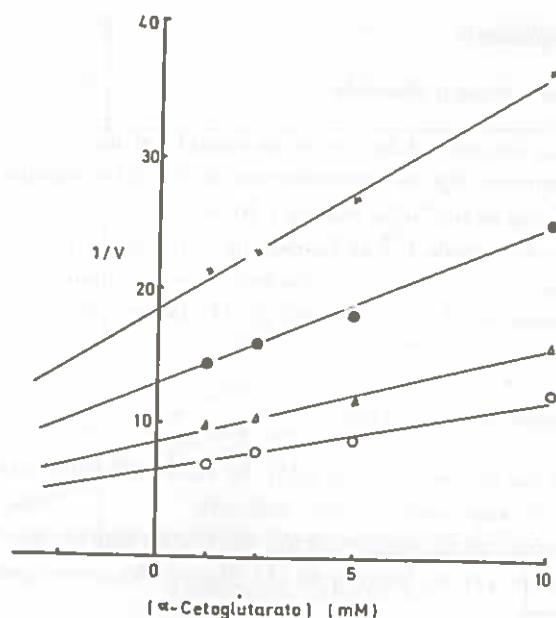


Figura 45.—Inhibición por el α -cetoglutarato. Representación de $1/v$ en función de la concentración de inhibidor a diferentes concentraciones de NADH: (O-O) 0,4 mM; (Δ - Δ) 0,2 mM; (●-●) 0,1 mM; (x-x) 0,05 mM. Concentración de diacetilo: 2,5 mM.

3.5. Cálculo de los parámetros termodinámicos

La temperatura de análisis se controló:

a) Termostatando la cámara de las cubetas, del espectrofotómetro, por el procedimiento descrito en el capítulo III.

b) Preincubando los reactivos a una temperatura más elevada que la de ensayo, calculada teniendo en cuenta el descenso de la misma consiguiente a la adición de la disolución enzimática a 0°C.

c) Comprobando la temperatura de la mezcla de reacción en la cubeta antes y al término de cada ensayo.

1.º Cálculo de Q_{10} en las condiciones standard de ensayo.

En la figura 46 se recogen los datos de velocidad inicial a distintas temperaturas, entre 5,5 y 35,5°C a las concentraciones y pH standard de ensayo.

A partir de estos datos se ha calculado el Q_{10} de la reacción entre 15°C y 25°C, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$Q_{10} = \frac{V_{25}}{V_{15}} = \frac{229,2}{116} = 1,975$$

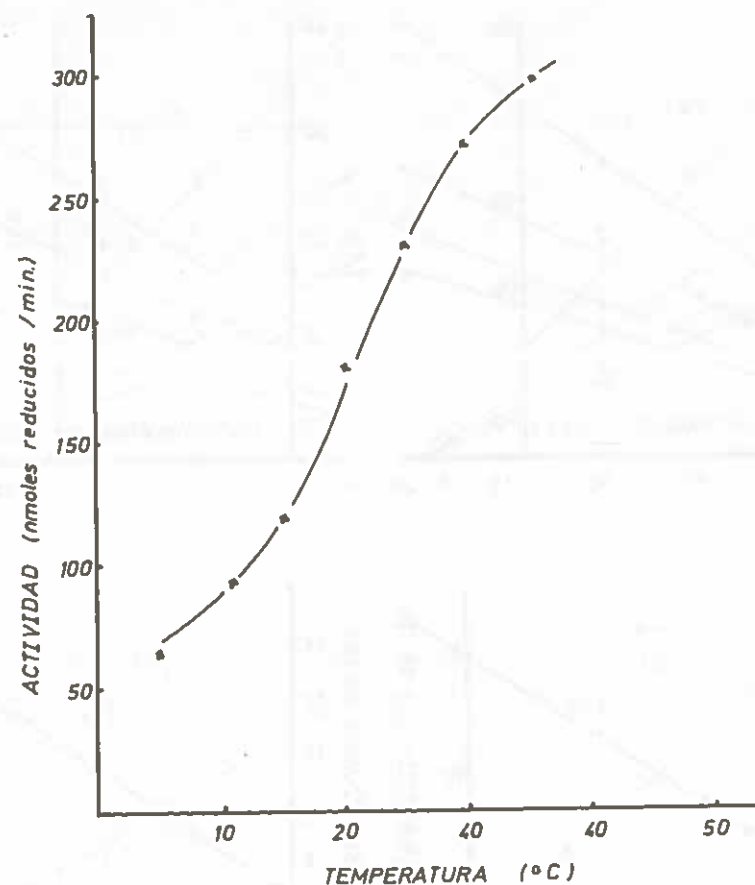


Figura 46.—Influencia de la temperatura sobre la actividad diacetilo reductasa. Condiciones de análisis: Tampón fosfato 0,05 M. pH 6,1; diacetilo, 30 μ moles; NADH 0,6 μ moles y volumen total 3 mls.

2.º Cálculo de la energía de activación (E_a).

La energía de activación se calculó a partir de los valores de velocidad máxima obtenidos midiendo a 11, 17, 21, 25 y 30°C las velocidades iniciales de reacción a concentraciones variables de ambos substratos (desde 0,025 a 5 mM de diacetilo y desde 0,05 a 0,40 mM de NADH).

Los datos obtenidos se representaron por el método gráfico de Florini y Vestling, figuras 17, 48, 19, 50 y 51.

Para lograr actividades fácilmente mensurables a todas las temperaturas, fue necesario utilizar en cada caso distintas concentraciones de enzima. Las velocidades máximas así obtenidas fueron multiplicadas por el factor adecuado para convertirlas en los valores correspondientes a una concentración fija de enzima. Este factor

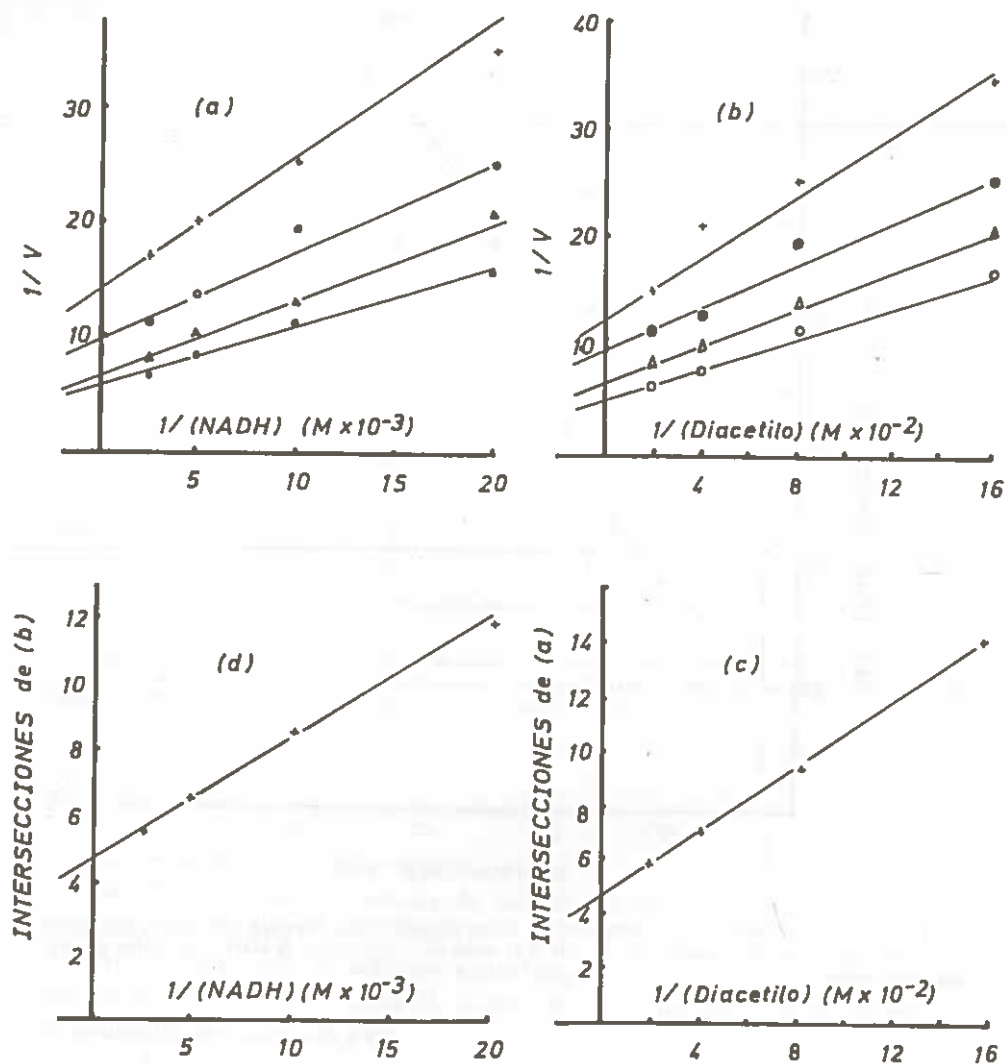


Figura 47.—Cálculo de la V_{\max} de reacción a 11°C. (pH 6,1) por el método gráfico de Florini y Vestling. Representaciones primarias (arriba) y secundarias.

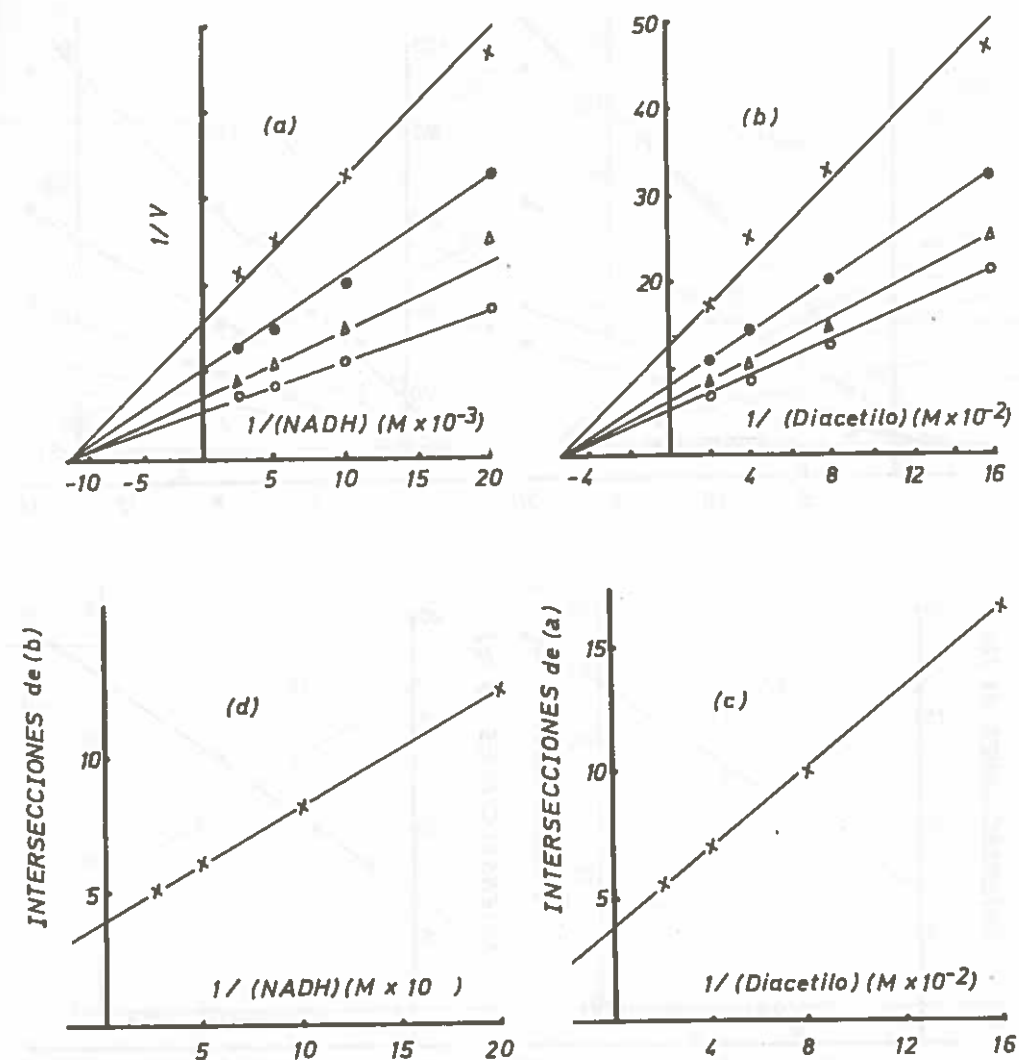


Figura 48.—Cálculo de la velocidad máxima de reacción a 17°C. (pH 6,1) por el método gráfico de Florini y Vestling. Representaciones primarias (a y b) y secundarias (c y d).

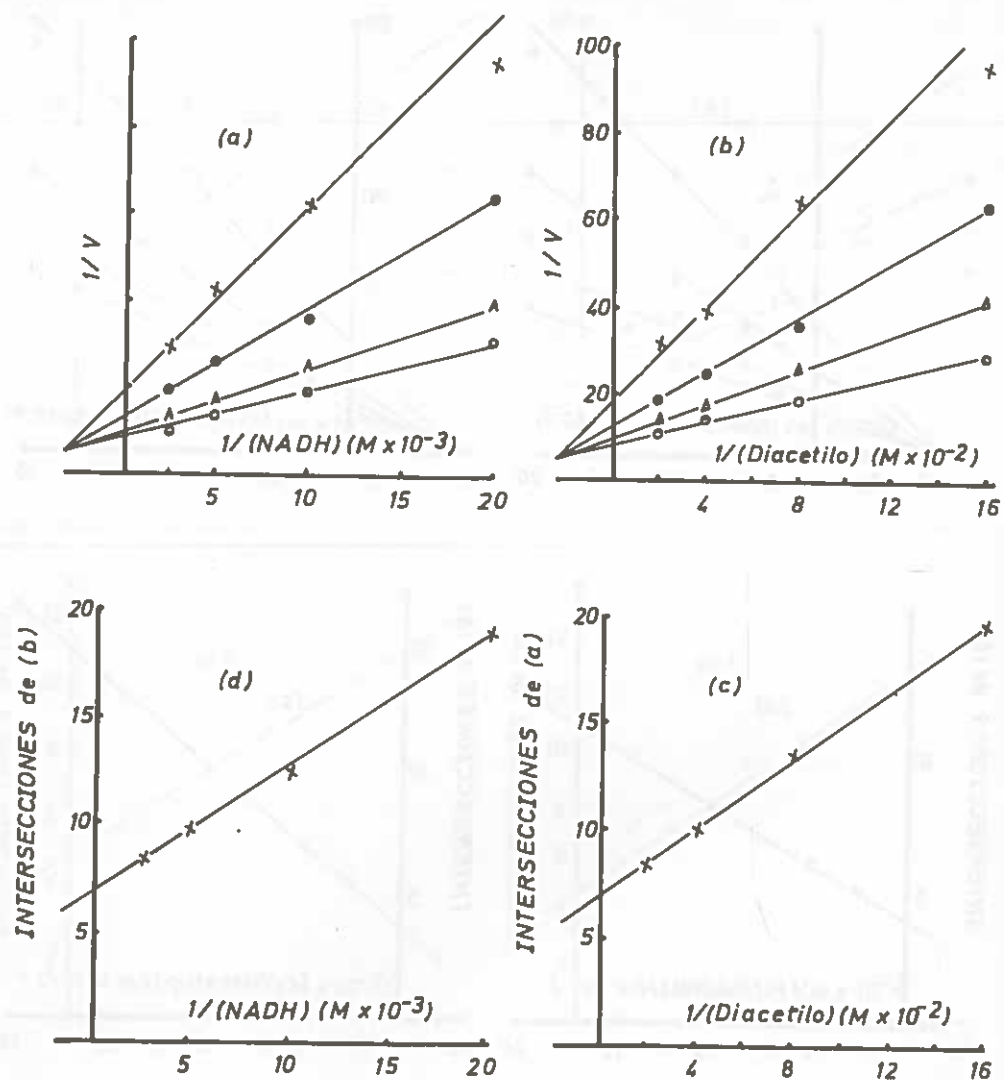


Figura 49.—Cálculo de la velocidad máxima de reacción a 21°C. (pH 6.1) por el método gráfico de Florini y Vestling. Representaciones primarias (a y b) y secundarias (c y d).

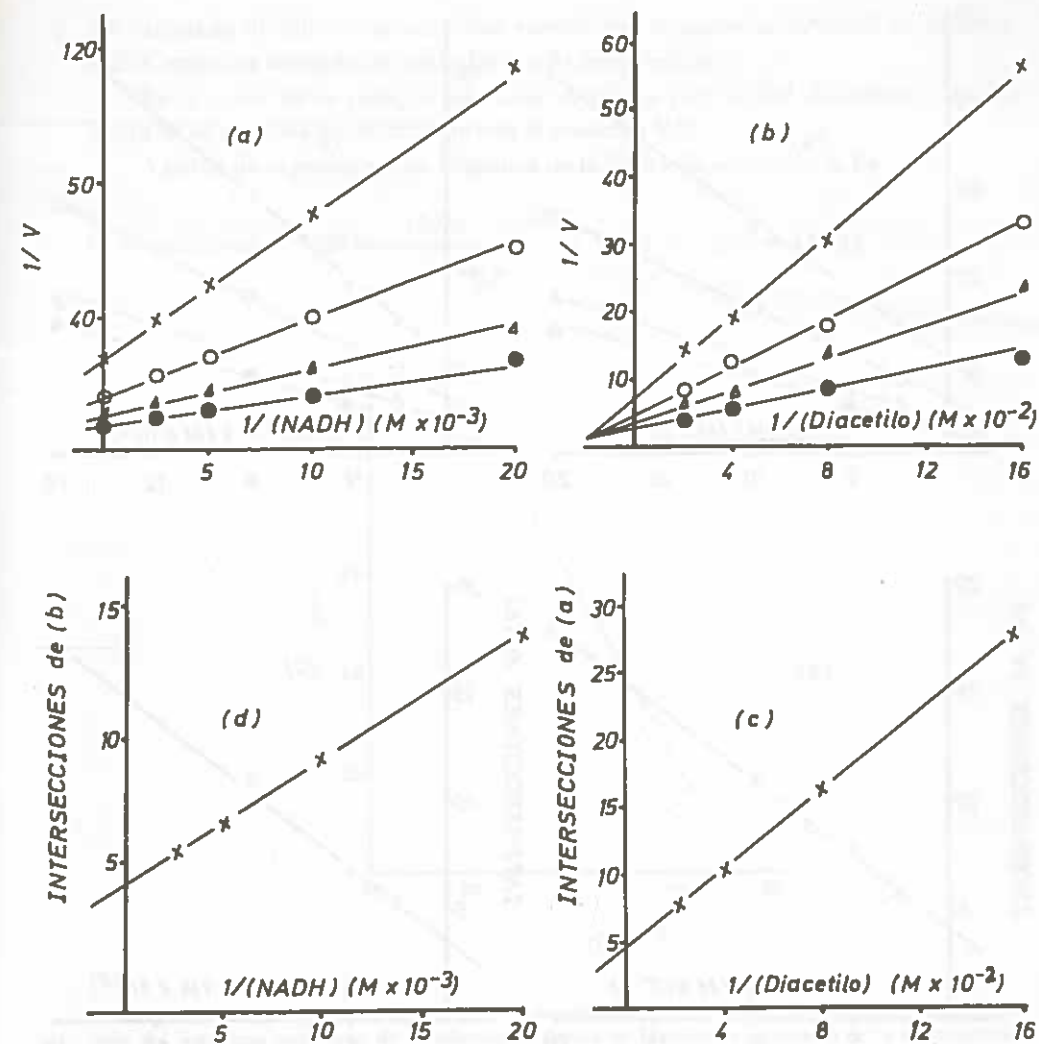


Figura 50.—Cálculo de la velocidad máxima de reacción a 25°C. (pH 6.1) por el método gráfico de Florini y Vestling. Representaciones primarias (arriba) y secundarias.

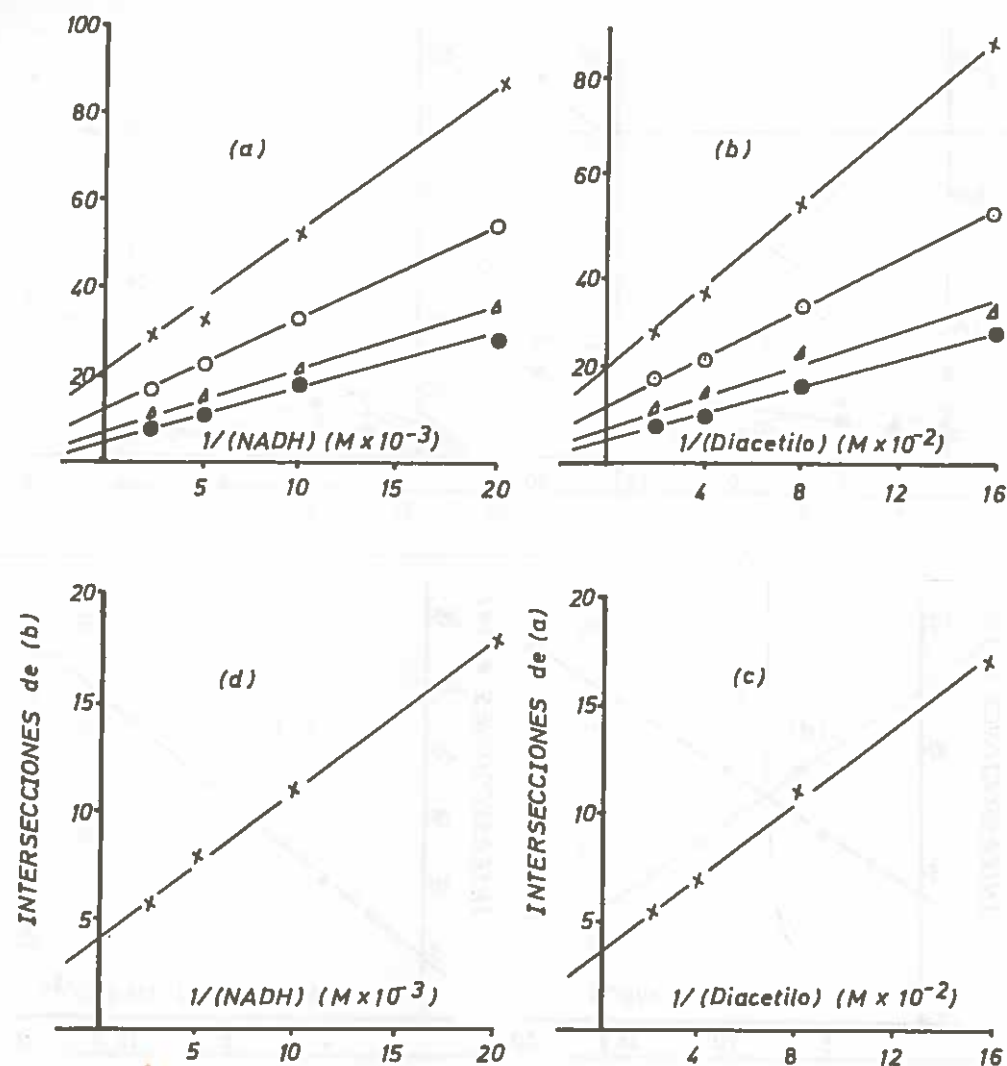


Figura 51.—Cálculo de la velocidad máxima de reacción a 30°C. (pH 6,1) por el método gráfico de Florini y Vestling. Representaciones primarias (arriba) y secundarias.

fue calculado dividiendo la velocidad control (en condiciones standard de ensayo) a 25°C entre las velocidades controles a cada temperatura.

En la tabla 18 se recogen los datos obtenidos por unidad de enzima y en la figura 52 se representan de acuerdo con la ecuación V.23.

A partir de la pendiente de la gráfica de la figura 52 se calculó la E_a .

$$E_a = \text{pendiente} \times 1,98 = \frac{(6,66 - 5,28)}{0,2} \times 1.000 \times 1,98 = 13,721$$

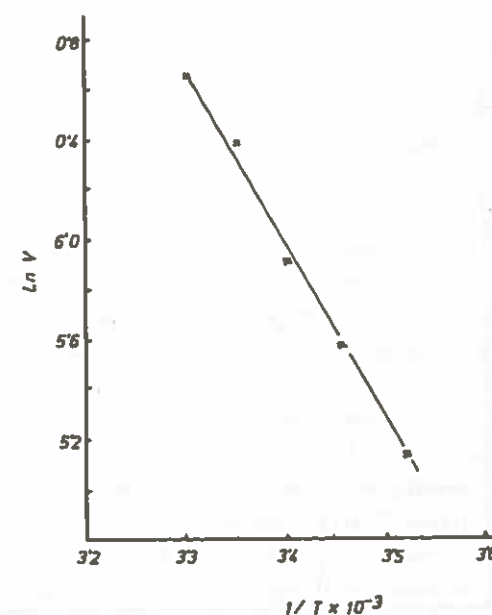


Figura 52.—Cálculo de la energía de activación de la reacción al pH óptimo. Representación del logaritmo neperiano de la velocidad máxima en función de la inversa de la temperatura absoluta.

3.º Cálculo de ΔH

Los datos de la tabla 18 se representan de acuerdo con la ecuación V.24 en la figura 53.

A partir de la pendiente de la recta obtenida se calculó el cambio de entalpía (ΔH).

$$\Delta H = \text{pendiente} \times 2 = 6,750 \times 1,98 = 13,365 \text{ cal/mol.}$$

TABLA 18
Efectos de la temperatura sobre los parámetros cinéticos de la reacción

T, °K	T, °C	Factor de corrección de V _{máx}	1/T, °K × 10 ⁻³	V _{máx} corregida	Ln V _{máx}
284,16	11	0,79	3,52	173,9	5,15
289,66	17	1,10	3,45	268,2	5,58
294,16	21	2,58	3,4	372	5,92
298,16	25	2,8	3,35	597	6,39
303,16	30	3,05	3,3	788,2	6,66

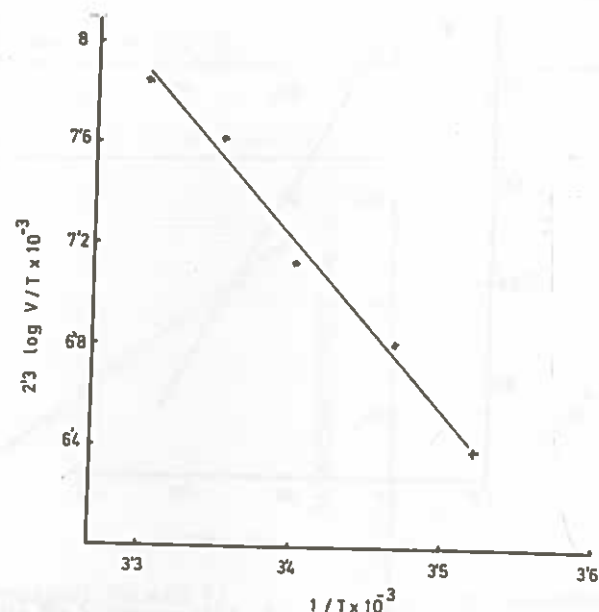


Figura 53.—Cálculo de ΔH de la reacción a pH óptimo.

V.4. DISCUSIÓN

4.1. Test de linealidad

La linealidad de las representaciones de V en función de (E) demuestran la ausencia de inhibidores internos en las preparaciones enzimáticas y en las disoluciones de sacarosa utilizadas para estabilizar el enzima en algunos experimentos.

Aunque las experiencias relativas a la inhibición por análogos estructurales del diacetilo prueban que las concentraciones elevadas de acetona ejercen una inhibición competitiva para el diacetilo y incompetitiva para el NADH, es obvio que la

etapa de liofilización reduce a cero o a concentraciones despreciables su presencia en las preparaciones obtenidas por fraccionamiento acetónico. No obstante se comprobó sistemáticamente la ausencia de inhibidores en todas las preparaciones utilizadas.

4.2. Mecanismo de reacción

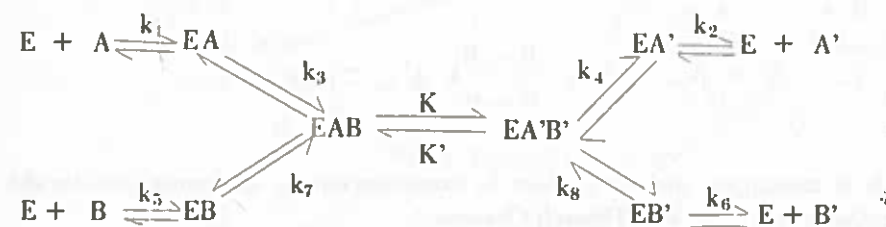
El mecanismo de la reacción catalizada por la diacetilo reductasa de hígado de paloma ha sido estudiado por los siguientes métodos: (I) Análisis de las variaciones de la velocidad inicial respecto a la concentración de sustratos. (II) Patrón de inhibición: a) por los productos y b) por los análogos del diacetilo.

1.—Análisis de las variaciones de la velocidad en función de la concentración de sustratos.

Se han descrito numerosos mecanismos para las reacciones bisustrato. Una primera clasificación de los mismos los divide en (CLELAND, 1963): a) secuenciales, en los que ambos sustratos se ligan al enzima antes de la liberación de ningún producto; b) no secuenciales, que no cumplen esta condición; estos mecanismos no obedecen nunca a la ecuación de velocidad V_{20} (página 340).

Tampoco todos los mecanismos secuenciales siguen la citada ecuación. La convergencia de las rectas obtenidas en las representaciones de la inversa de la velocidad inicial de la reacción diacetilorreductasa en función de la inversa de la concentración de cada uno de los sustratos, descarta los mecanismos no secuenciales y limita la discusión a los secuenciales que obedecen la ecuación de velocidad antes citada. Tres mecanismos generales (incluyendo o no formas modificadas del enzima) obedecen a esta ecuación: 1) de fijación de sustratos al azar y equilibrio rápido; 2) de fijación de sustratos ordenada y 3) de Theorell-Chance.

1) *Mecanismos al azar*.—Los sustratos no siguen un orden obligatorio de fijación al enzima, de tal modo que los complejos ternarios enzima-sustrato A-sustrato B pueden proceder indistintamente de la fijación del sustrato A a los complejos binarios enzima-sustrato B o de la fijación del sustrato B a los complejos enzima-sustrato A.

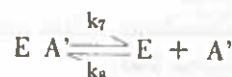
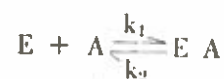


Los mecanismos al azar dan representaciones doblemente inversas no lineales, ya que responden a ecuaciones de velocidad complejas, que incluyen términos cuadrados. Sin embargo, estos términos se eliminan en las reacciones en que la velocidad está limitada por la interconversión de los complejos ternarios y se alcanza

rápido el equilibrio entre las etapas individuales intermedias. En este caso, que es el más general, se cumple la ecuación V.20.

2) *Mecanismos ordenados*.—Se caracterizan porque uno de los substratos, el llamado «substrato conductor», se combina con el enzima mucho más rápidamente que el otro, de tal modo que en realidad hay un orden obligatorio de fijación al enzima y sólo existe una vía para la formación de los complejos ternarios.

Estos mecanismos pueden presentar algunas variantes. En la mayor parte de la bibliografía y en esta tesis la denominación de «mecanismo ordenado» se refiere al modelo.



en el que la etapa limitante de la velocidad es la ruptura de los complejos ternarios a productos, como ocurre en las reacciones catalizadas por gran número de deshidrogenasas dependientes del NAD y NADP. Si además el mecanismo incluye la isomerización de las formas estables del enzima, se le denomina «isoordenado».

3) *Mecanismo de Theorell-Chance*.—Es un tipo de mecanismo ordenado, en el que k_5 es mucho mayor que k_7 , k_4 mucho mayor que k_2 , ($k_5 + k_7$) mucho mayor que k_6 y ($k_2 + k_4$) mucho mayor que k_3 . Esto origina que las concentraciones de los complejos ternarios sean muy bajas, de modo que el primer producto, P, parece formarse directamente del substrato B, por interacción con el complejo E A, y que la etapa limitante de la velocidad sea la disociación de los complejos binarios enzima-segundo producto.



Si el mecanismo incluye también la isomerización de las formas estables del enzima, se le denomina «iso-Theorell-Chance».

II.—Patrón de inhibición.

Los inhibidores reversibles pueden deprimir la actividad enzimática de diversos modos:

a) Combinándose exclusivamente con la(s) misma(s) forma(s) del enzima con que lo hace el substrato variable y afectando por tanto a la pendiente y no a las intersecciones de las representaciones doblemente inversas ($1/v$ en función de $1/(S)$) (inhibición competitiva).

b) Combinándose con una forma del enzima distinta a aquella con la que se combina el substrato variable y no unida a ésta por etapas reversibles (inhibición acompetitiva) cinéticamente diagnosticada basándose en que sólo afecta a la intersección con el eje de ordenadas de las citadas representaciones y no a la pendiente de las mismas.

c) Combinándose con formas del enzima distintas a aquellas con las que lo hace el substrato variable, pero separadas de éstas por etapas reversibles o simultáneamente con formas a las que sí se une el substrato variable y otras a las que no se liga (inhibición no competitiva). En este caso se ven afectadas, tanto las pendientes, como las intersecciones.

II.—a) Inhibición por los productos.

Las representaciones de $1/v$ en función de la inversa de la molaridad de uno de los substratos a concentración fija no saturante del otro y variable de acetoina o NAD demuestran que la acetoina inhibe la reacción competitivamente respecto al diacetilo y no competitivamente respecto al NADH: el NAD lo hace competitivamente respecto al NADH y no competitivamente respecto a la acetoina.

Las normas de Cleland (1963, b) predicen para los mecanismos discutidos aquí los patrones de inhibición por los productos que figuran en la tabla 19. Nuestros resultados experimentales eliminan cuatro de los cinco mecanismos incluidos en la citada tabla y dejan como único posible el de Theorell-Chance. Sin embargo, MARTÍN y BURGOS (1972) han señalado que este mismo patrón puede corresponder también a un mecanismo al azar de equilibrio rápido, en el que se formen dos complejos ternarios abortivos, enzima-acetoina-NADH y enzima-diacetilo-NAD, según el esquema:

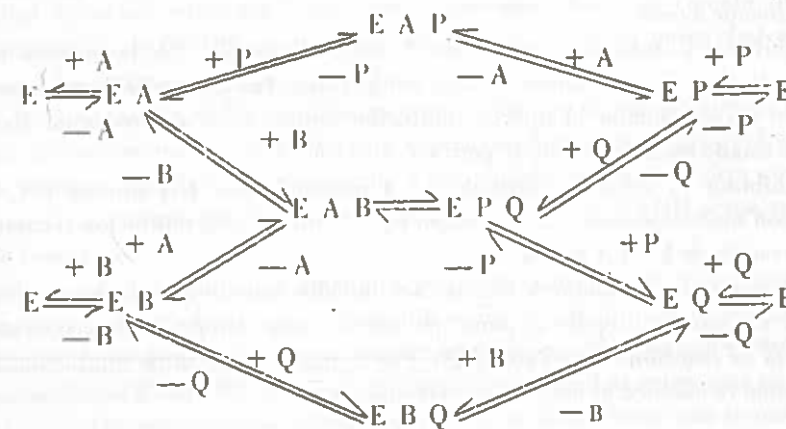


TABLA 19
Patrón de inhibición por los productos de los mecanismos secuenciales que rigen la ecuación de velocidad V.20.

Mecanismo	Inhibidor	Substrato variable ¹			
		A		B	
		Insaturado con B	Saturado con B	Insaturado con A	Saturado con A
Ordenado	A'	C	C	NC	O
	B'	NC	AC	NC	NC
Iso-ordenado	A'	NC	NC	NC	AC
	B'	NC	AC	NC	NC
Theorell-Chance	A'	C	C	NC	O
	B'	NC	O	C	C
Iso-Theorell-Chance	A'	NC	NC	NC	AC
	B'	NC	O	C	C
Al azar de equilibrio rápido	A' o B'	C	O	C	O

¹ Los substratos son designados como A y B, de acuerdo con el orden de adición al enzima.

² A' y B' son los productos de A y B respectivamente.

Las normas de CLELAND (1963b) predicen para este mecanismo el siguiente patrón de inhibición (Q y P son los productos de A y B, respectivamente).

Inhibidor Q, substrato variable A: Q reacciona con E y EB, las mismas formas del enzima con las que reacciona A. La inhibición es, por tanto, competitiva. La saturación con el substrato fijo (B) reduce a cero la concentración de estado estacionario de E, pero no la de EB, dando nuevamente inhibición competitiva.

Inhibidor Q, substrato variable B: B reacciona con E, pero no con EB. La inhibición será no competitiva. La saturación con el substrato fijo (A) elimina la inhibición por Q, puesto que el nivel de estado estacionario de E y EB es reducido esencialmente a cero.

Inhibidor P, substrato variable B: P reacciona con E y EA, las mismas formas con que lo hace B, y la inhibición será competitiva. Las concentraciones saturantes de A no hacen cambiar el tipo de inhibición porque sólo será reducido a cero el nivel de estado estacionario de E, pero no el de EA.

Inhibidor P, substrato variable A: A reacciona con E y no con EA, dando inhibición no-competitiva. La saturación con B elimina esta inhibición rebajando la concentración de E y EA a cero.

Estos efectos inhibidores han de ser lineales, puesto que ninguna combinación de vía muerta precede al punto de adición para inhibición de producto en la secuencia de reacción (CLELAND, 1963). Por lo tanto el patrón de inhibición de este mecanismo es idéntico al del de Theorell-Chance.

Además, en ausencia de P o Q no se forman complejos ternarios abortivos y la velocidad inicial deberá obedecer también a la ecuación V.20. Así pues, el mecanismo de Theorell-Chance y el de fijación al azar con dos complejos ternarios abortivos y equilibrio rápido no pueden ser distinguidos por análisis de las variaciones de la velocidad inicial en función de la concentración de substratos ni por el patrón de inhibición por los productos (MARTÍN y BURGOS, 1972).

II.—b) Inhibición por análogos del diacetilo.

Los estudios realizados muestran que el α -cetoglutarato y la hexano-2,5-diona inhiben la reacción no-competitivamente para los dos substratos. Este patrón de inhibición es poco específico y puede ser explicado en términos de cualquiera de los dos modelos en discusión, admitiendo, entre otras, alguna de las siguientes posibilidades: (a) Los inhibidores se fijan simultáneamente a formas del enzima con las que reacciona el diacetilo y a otras con las que reacciona el NADH; (b) Se fijan en un punto próximo al centro activo modificando la estructura de éste; (c) Se unen a la vez al centro activo y a un punto próximo. Estos dos últimos supuestos darían lugar a que los inhibidores reaccionasen con todas las formas del enzima que participan en la reacción.

La acetona y la dietilcetona (pentano-3-ona) son inhibidores acompetitivos para el NADH (figuras 32 y 40) y competitivos (figuras 30 y 38) para el diacetilo, comportándose por tanto como análogos cinéticos de éste. La aplicación de las normas de CLELAND (1963b) para inhibiciones de vía muerta predice que este patrón sólo puede ser debido a que los inhibidores se fijan exclusivamente a los complejos binarios enzima-NADH y no a ninguna otra de las formas enzimáticas participantes.

Es especialmente interesante para la discusión del mecanismo de la reacción recalcar que los esquemas de inhibición por la acetona y dietilcetona exigen que estos análogos del diacetilo no reaccionen con el enzima libre. Esta predicción se ve confirmada por los resultados experimentales de las tablas 16 y 17: Cualquiera que sea el mecanismo que se considere, a concentración fija de diacetilo e inhibidor, el nivel de estado estacionario del enzima libre debe disminuir cuando aumenta la concentración de NADH en el medio; en cambio, a mayor molaridad de NADH mayor es el porcentaje de inhibición observado.

Por ampliación de las condiciones para la fijación de los inhibidores análogos, puede deducirse que el diacetilo sólo reacciona con el complejo enzima-NADH. Este requisito conduce necesariamente a un modelo ordenado y deja como único posible a un mecanismo de Theorell-Chance, en el que el NADH actúa como substrato conductor.

Para que los resultados obtenidos pudiesen corresponder a un mecanismo al azar, sería preciso admitir que el diacetilo se fija a más formas del enzima que sus análogos (puesto que en un mecanismo de este tipo reaccionaría con el enzima libre, además de con E-NADH), lo que es muy poco probable: Las exigencias estructurales para los substratos son más estrictas que para los inhibidores, por lo que no es de esperar mayor selectividad en la fijación de la acetona y dietilcetona que en la del

diacetilo. Esta limitación ha de sumarse a las propias de un mecanismo al azar como el que aquí se discute (MARTÍN, 1972): (a) Adición de sustratos sin orden obligatorio, lo que requiere valores similares de sus respectivas constantes de fijación; (b) formación de dos complejos ternarios de vía muerta; (c) que se alcance rápidamente el equilibrio, para lo cual todas las etapas han de ser muy rápidas, excepto la interconversión de los complejos ternarios no abortivos.

Puede concluirse, por tanto, que este modelo no tiene apoyo experimental suficiente y que la reducción del diacetilo por el enzima de hígado de paloma sigue un mecanismo de Theorell-Chance; el sustrato conductor es el coenzima, como en la mayor parte de las reacciones ordenadas (véase MAHLER y CORDES, 1971, pág. 254).

4.3. Constantes cinéticas

De los puntos de convergencia de las rectas primarias que representan la inversa de la velocidad inicial en función de la inversa de la concentración de sustrato variable, se han obtenido las siguientes constantes cinéticas:

$$K_{\text{NADH}} = 1,62 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$K_{\text{diacetilo}} = 50 \times 10^{-4} \text{ M}$$

y de los puntos de corte con el eje de abscisas de las representaciones secundarias (intersecciones en función de $1/(\text{sustrato fijo variable})$).

$$K'_{\text{NADH}} = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$K'_{\text{diacetilo}} = 31 \times 10^{-4} \text{ M}$$

La validez de los datos obtenidos está corroborada por los siguientes procedimientos:

a) En una reacción que obedece a la ecuación seguida por ésta, $K'b/Ka$ debe ser igual a $Kb/K'a$. Esta igualdad se cumple dentro de un margen razonable, ya que

$$1,62 \times 10^{-4} \times 31 \times 10^{-4} = 1 \times 10^{-4} \times 50 \times 10^{-4}$$

b) La altura en que se cortan las rectas primarias debe ser la misma para las representaciones en función de la inversa de uno u otro sustrato.

$$y = \frac{1}{V} \left(1 - \frac{K'a}{Ka} \right) = \frac{1}{V} \left(1 - \frac{K'b}{Kb} \right)$$

Esta condición se cumple en las gráficas de las figuras 23 y 25.

c) Las dos rectas obtenidas en las representaciones secundarias de las intersecciones en función de la inversa de la concentración de sustrato cortan al eje vertical en el mismo punto (la inversa de la velocidad máxima).

d) Representando las pendientes de las rectas primarias en función de la inversa de las concentraciones de sustrato fijo a las que se obtuvieron, se consiguen dos rectas, cuya pendiente vale $K'b/K'a/V$ y que por lo tanto deben ser paralelas. En la figura 27 puede verse el paralelismo de las correspondientes a los experimentos en que se basan los cálculos de las constantes cinéticas, lo que demuestra que esta condición se cumple también.

El valor calculado para K'_{NADH} es idéntico al descrito por MARTÍN y BURGOS (1972) para la diacetilo reductasa de hígado de ternera, pero el de $K_{\text{diacetilo}}$ es dos órdenes de magnitud superior. Esto quiere decir que su afinidad por el diacetilo es menor que la del enzima de hígado de ternera, lo que puede no ser óbice para que ambos funcionen en condiciones ordinarias a un nivel de eficacia similar, puesto que parece probable que la concentración tisular de diacetilo sea, como la de acetoina (WESTERFELD, 1945), mucho más elevada en paloma que en los mamíferos.

No es posible compararlos con los correspondientes a otros sistemas biológicos, pues los estudios cinéticos referentes a los mismos, que se encuentran en la bibliografía (BRANEN y KEENAN, 1970; GABRIEL, 1971) son incompletos y sólo dan K_m aparentes, que pueden estar muy equivocados si la concentración de enzima fijo no es saturante.

4.4. Parámetros termodinámicos

Los cambios en la temperatura afectan a los distintos equilibrios que se dan en las reacciones enzimáticamente catalizadas.

La mejor manera de eliminar los efectos de estas modificaciones de las condiciones de equilibrio sobre la velocidad de reacción, es saturar el enzima con los sustratos y cofactores (si los hubiera) a todas las temperaturas estudiadas, o calcular la $V_{\text{máx}}$. Ante la imposibilidad de alcanzar concentraciones saturantes de ambos sustratos, se siguió el segundo procedimiento.

La energía de activación obtenida, 13.700 cal/mol es del mismo orden que la calculada para el enzima de hígado de ternera por BURGOS y MARTÍN (1972), lo que indica que ambos enzimas son igualmente eficaces en la catálisis de la reacción; queda dentro del rango habitual de los valores que se dan en las reacciones enzimáticas (SIZER, 1943 y GUTFREUND, 1968).

El valor de ΔH (13.300 cal/mol) obtenido está naturalmente, muy próximo al de la energía de activación, dado que ambos valores están relacionados por la expresión:

$$E_a = \Delta H + RT$$

ΔF no puede calcularse con precisión, por cuanto no es posible conocer la velocidad específica, en tanto no se disponga de un procedimiento que permita determinar el grado de pureza de las preparaciones. Suponiendo, sin embargo, que las preparaciones con actividad específica de 6.000 unidades/miligramo de proteína

fueran totalmente puras, las 229,2 unidades utilizadas para el cálculo de ΔH corresponderían a 38 μ grs. de enzima, equivalentes a 0,344 nmoles (p. m. de la diacetilo reductasa de hígado de paloma = 110.000; véase Capítulo III). El valor de $V_{\text{máx}}$ a 25°C es de 597 nmoles de diacetilo reducidos por minuto y, puesto que $V_{\text{máx}} = K(E)$ (pág. 92), $K = 1.735,4 \text{ min}^{-1} = 28,9 \text{ sec}^{-1}$. Aplicando este valor a la ecuación V.25, se obtiene que $\Delta F = 15.380 \text{ cal/mol}$.

El supuesto básico para este cálculo no está, desde luego, suficientemente sustanciado, pero teniendo en cuenta el enriquecimiento logrado (algo más de 250 veces) y la purificación que generalmente se consigue en los enzimas, es muy difícil que las preparaciones con esta actividad tengan una pureza inferior a un 5-10 % y ciertos datos obtenidos por electroforesis en gel de almidón sugieren que la pureza de las preparaciones de actividad específica 6.000 unidades/mgr proteína es considerablemente más alta; en estas condiciones el error máximo cometido al alcanzar K un valor de diez a veinte veces superior, sería de 8-11 %, respectivamente. El valor del cambio de energía libre es, pues, en cualquier caso positivo, como era de esperar, y próximo a 15 Kcal.

El cambio de entropía calculado a partir de estos datos:

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta F}{T} = \frac{13.360 - 15.380}{298} = -6.8 \text{ cal/mol/}^{\circ}\text{C}$$

podría variar de acuerdo con las cifras citadas entre este valor y $-1 \times \text{cal/mol/}^{\circ}\text{C}$, en cualquier caso un valor negativo y próximo a 0.

La irreversibilidad del sistema en las condiciones standard de ensayo no está, por tanto, justificada por los parámetros termodinámicos de la reacción, por lo que la etapa limitante de la velocidad deberá ser distinta en el sentido directo que en el inverso. Esta misma conclusión podría deducirse de la simple consideración de que la reacción sigue un mecanismo de Theorell-Chance, pues en él la etapa limitante debe venir dada por la ruptura del complejo E-NAD para el sentido diacetilo-acetoína y del complejo E-NADH para el acetoína-diacetilo. Sin embargo, de las relaciones de equilibrio que se dan en el mecanismo de Theorell-Chance puede deducirse que

$$a) \quad K_2 = \frac{K_a K_s}{K'_a}; \quad K_5 = \frac{V_{\text{máx}}}{(E)}$$

por tanto

$$b) \quad K_2 = \frac{K_a V_{\text{máx}}}{K'_a (E)}$$

y

$$c) \quad K_2 (E) = \frac{K_a V_{\text{máx}}}{K'_a} = V'_{\text{máx}}$$

definiendo $V_{\text{máx}}$ y $V'_{\text{máx}}$ las velocidades máximas en el sentido directo e inverso respectivamente. Puesto que K_a es mayor que K'_a , de la ecuación c) se deduce que $V'_{\text{máx}}$ debe ser mayor que $V_{\text{máx}}$, lo que exige que K_2 sea mayor que K_7 . Por tanto tampoco la disociación del complejo E-NADH puede ser la causa responsable de la aparente irreversibilidad del sistema, lo que obliga a admitir que lo es la escasa afinidad del enzima por la acetoína; (esta conclusión se halla hasta cierto punto confirmada experimentalmente por la elevada K_i que muestra la acetoína) y/o una gran dificultad en la transferencia de Hidrógeno desde la acetoína al NAD.

CAPITULO VI

EFFECTOS DEL pH SOBRE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA REACCION

VI.1. INTRODUCCIÓN

La actividad enzimática se ve afectada por el pH del medio; un enzima suele ser activo sólo dentro de un rango limitado de concentración de hidrogeniones. La descripción más elemental de los efectos del pH sobre el enzima es la que dan los perfiles de pH (representación de la actividad en función del pH, manteniendo constantes el resto de los parámetros que afectan a la velocidad de reacción) en los que se observa un pH óptimo. El perfil de pH y el pH óptimo son, sin embargo, muy poco informativos; tienen sólo el valor de parámetros operacionales, pues dependen de la temperatura, naturaleza y concentración del tampón, fuerza iónica del medio, pureza de las preparaciones enzimáticas, etc.

La multiplicación por un factor de 5 de la concentración del catión Mn^{++} es, por ejemplo, capaz de producir un desplazamiento de dos unidades todo el perfil de pH de la fosfatasa alcalina de la mucosa intestinal de los bóvidos (MORTON, 1957).

Los efectos del pH sobre la actividad enzimática son consecuencia de la influencia ejercida sobre: a) La estabilidad del enzima; b) La afinidad del enzima por el (los) sustrato(s) y c) La velocidad máxima de la reacción.

El pH influye sobre la estabilidad del enzima afectando a las estructuras secundarias, terciaria y/o cuaternaria de la molécula proteica. La estabilidad de un enzima frente al pH se ve con frecuencia modificada por la presencia o ausencia de cofactores y sustratos, por la temperatura, la concentración del tampón, fuerza iónica y constante dieléctrica del medio.

Para poder interpretar los datos obtenidos en experimentos cinéticos encaminados a estudiar los efectos del pH sobre la actividad catalítica y a aclarar por tanto qué grupos del centro activo del enzima participan en la reacción y como interaccionan con los sustratos, resulta imprescindible determinar previamente la estabilidad del enzima frente al pH en experiencias cuidadosas realizadas en condiciones idénticas o tan próximas como sea posible.

Los efectos del pH sobre la actividad catalítica del enzima son consecuencia de cómo afectan a la ionización de los grupos prototrópicos, generalmente localizados en las cadenas laterales de los aminoácidos de su centro activo, que a su vez pueden estar implicados: a) En el mantenimiento de su configuración; b) en la fijación del sustrato y c) en su transformación en producto.

Un estudio completo de los efectos del pH sobre la actividad catalítica de los enzimas es sumamente laborioso, incluso en las reacciones monosustrato más simples, ya que el pH influye sobre la ionización 1) del enzima libre, 2) del sustrato, 3) del complejo enzima-sustrato y 4) del complejo enzima producto. Son, por ello, muy pocas las veces que se han llevado a cabo estudios en los que se determinen todos los grupos de ionización implicados en el proceso catalítico, limitándose en general a la determinación de los correspondientes a la etapa limitante de velocidad.

En una reacción bisubstrato, como en el caso de la diacetilo reductasa, que sigue además un mecanismo (el de Theorell-Chance) bastante complejo, las dificultades se ven considerablemente aumentadas y en nuestro caso más aún, si se tiene en cuenta la imposibilidad práctica de medir velocidades de reacción a concentraciones de saturación de ninguno de los dos substratos ni la actividad en el sentido inverso.

Los efectos del pH sobre la actividad diacetilo reductasa hasta ahora estudiados (BRANEN y KEENAN, 1970; GABRIEL y col., 1971; BURGOS y MARTÍN, 1972) se limitan a la determinación de los perfiles de pH en las condiciones standard de ensayo; estos datos son, por supuesto, válidos sólo para las condiciones en que fueron obtenidos y carecen de cualquier valor, salvo el puramente operacional.

Las experiencias que en este capítulo se describen fueron diseñadas en orden a estudiar los efectos del pH sobre la estabilidad del enzima, las constantes de equilibrio de la reacción y la velocidad máxima. De los resultados obtenidos se infiere la posibilidad de participación de determinados grupos en la actividad enzimática. Tales diferencias derivan de los pK hallados para las distintas formas del enzima. Es preciso, sin embargo, tener en cuenta la gran sensibilidad que la ionización de un grupo prototrópico ofrece frente a las condiciones ambientales; en una proteína (un enzima) el pK de determinado grupo puede verse notablemente desplazado a consecuencia del entorno hidrofóbico creado por las cadenas laterales de los aminoácidos neutros y aromáticos, o de la concentración de cargas positivas o negativas; por ello la participación de determinados grupos en el proceso catalítico deducida basándose exclusivamente en los pK determinados por métodos cinéticos, sólo puede ser sugerida, aunque, por supuesto, con una alta probabilidad de certidumbre.

VI.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Preparaciones enzimáticas

Se utilizó liofilizado de la fracción protéica que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona.

Preparación de reactivos

Se preparó una disolución madre con una cantidad de diacetilo medida por pesada, a partir de la cual se obtuvieron las subdiluciones que se citan en la descripción de cada experimento. La concentración exacta de diacetilo en la disolución madre se comprobó por el método colorimétrico de OWADES y JAKOVAC.

Por el mismo procedimiento se prepararon las disoluciones de NADH, cuya concentración real se determinó espectrofotométricamente por su extinción a 340 mμ.

Determinaciones de la actividad diacetilo reductasa.

Se realizaron por el procedimiento espectrofotométrico standard, salvo que el tampón usado fue preparado con fosfato bipotásico monopotásico (0,05 M. en el ensayo) y pH variado lo mismo que la concentración de substrato, como requería el tipo de estudio realizado.

Cálculo de las constantes de equilibrio y velocidad máxima

Los valores de las constantes y de la velocidad máxima a cada pH se obtuvieron a partir de los datos experimentales representándolos gráficamente por el método de FLORINI y VESTLING.

En cada experimento de pH se realizaron controles de actividad a pH 6,1 en condiciones standard de ensayo, con el fin de medir con precisión la cantidad de enzima utilizado. Los valores de velocidad máxima obtenidos a cada pH se refirieron a una concentración de enzima de 100 unidades en las condiciones normales de ensayo.

VI.3. RESULTADOS

3.1. Influencia del pH sobre actividad enzimática

Los efectos de la concentración de iones H sobre la actividad diacetilo reductasa fueron estudiados en un rango de pH calculado entre pH 5 y 8, en tampón fosfato 0,05 M final en el medio de análisis, midiendo la actividad a intervalos de 0,2 unidades de pH. En los puntos de pH 5, 5,2 y 5,4 se comprobó el pH final al añadir el resto de los reactivos, dada la escasa capacidad tamponante del fosfato a esos niveles. Resultó ser de 5,15 para el supuesto de 5, de 5,35 para el de 5,2 y de 5,45 para el de 5,4.

Como preparación enzimática se utilizó liofilizado de la fracción protéica que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona, disuelto en sacarosa 1,5 M. A lo largo del experimento se fueron tomando controles midiendo la actividad al pH standard de ensayo.

Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la figura 53 a.

3.2. Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática

Fue estudiada de la siguiente forma: Se suspendieron 2 mg. de preparación enzimática en 10 ml. de sacarosa 1,5 M. A partir de esta suspensión se fueron pipetando en diversos momentos muestras de 0,5 ml. en tubos de ensayo, que contenían 1,5 ml. de tampón fosfato bipotásico monopotásico 0,1 M. de distintos pH, desde pH 5 a pH 8 y 1 ml. de agua destilada; cada tubo fue incubado a 25°C. durante cinco minutos, pasado este tiempo, se tomó un ml. de la muestra y se ensayó la actividad diacetilo reductasa de acuerdo con el siguiente esquema:

Cubeta muestra.—Un ml. de la solución enzimática previamente incubada, 0,5 ml. de una disolución de tampón fosfato 0,2 M. más diacetilo 10 mM; 0,3 ml. de sacarosa 1,66 mM., 0,5 ml. de NADH (0,2 mM) agua destilada o ácido fosfórico 0,05 M en la cantidad necesaria para llevar el pH a 6,1.

Cubeta referencia.—Agua destilada.

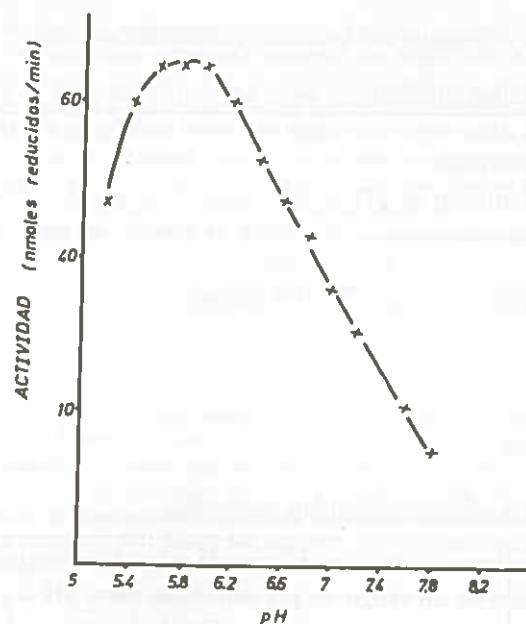


Figura 53a.—Influencia del pH sobre la actividad diacetilato reductasa. Condiciones de ensayo: Tampón fosfato 0,05 M.; diacetilo, 10 mM; NADH 0,2 mM; preparación enzimática, liofilizado de la fracción que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona.

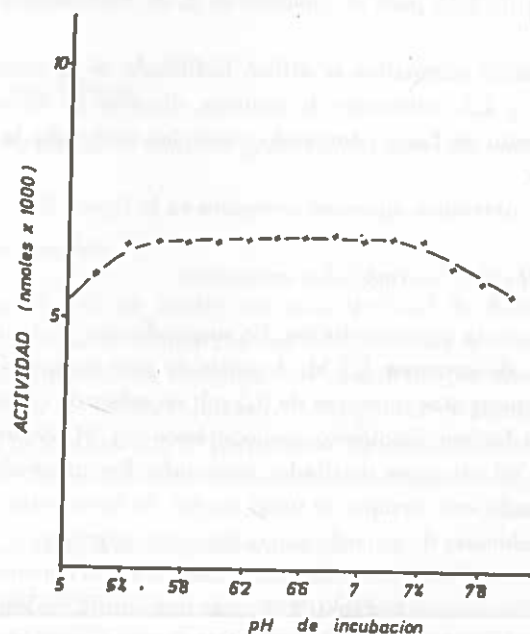


Figura 53b.—Influencia del pH sobre la estabilidad de la diacetilato reductasa en liofilizados de la fracción que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes de acetona disueltos en sacarosa 1,5 M. Las preparaciones enzimáticas se incubaron a los pH indicados, durante 5 min. a 25°C.

Mientras tenía lugar la incubación de una muestra a 25°C en el resto de la disolución inicial se mantuvo a 0°C.

Durante el experimento se intercalaron testigos para comprobar si se producía pérdida de actividad con el tiempo.

Los resultados obtenidos se recogen en la figura 53 b, donde puede comprobarse que se mantiene la actividad prácticamente sin variaciones en todo el rango de pH utilizado, a pesar de que el período de incubación del enzima a cada uno de los pH es considerablemente más largo que el tiempo normal de realización de los análisis.

3.3. Efectos del pH sobre los parámetros cinéticos de la reacción

pH 5,1.—Siguiendo el esquema experimental expuesto en el apartado VI.2, se estudió la velocidad de reacción a pH 5,1, frente al siguiente rango de concentraciones de sustratos: NADH 0,30; 0,20; 0,15 y 0,10 mM y de diacetilo 10; 5; 2,5 y 1,25 mM. Se suprimió en este caso el punto 20 mM de diacetilo en las representaciones, porque se comprobó la existencia de cierta inhibición por el propio sustrato.

El valor de las constantes cinéticas se obtuvo a partir de las representaciones doblemente inversas (figura 54 a y b) de las intersecciones de las rectas obtenidas en dichas representaciones en función de $1/\text{sustrato}$ (figura 55 a y b).

$K_{\text{diacetilato}}$ 5,26 mM; K_{NADH} $1,47 \times 10^{-4}$ M; $K'_{\text{diacetilato}}$ 2,06 mM; K'_{NADH} $0,58 \times 10^{-4}$ M.

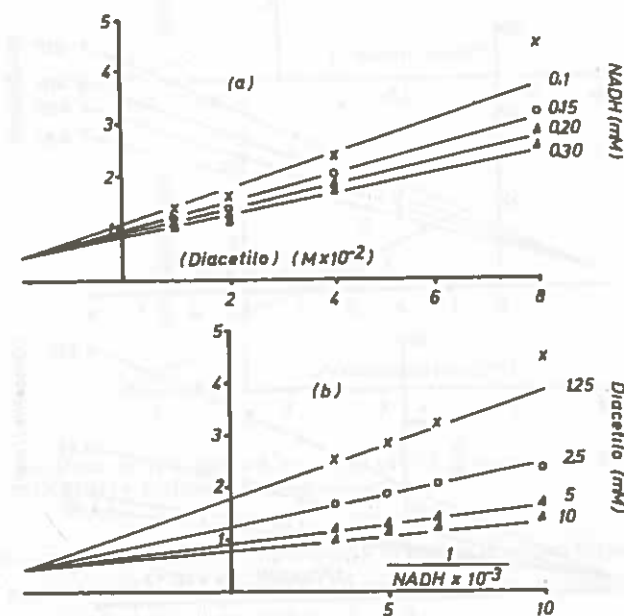


Figura 54.—Cálculo de $K_{\text{diacetilato}}$ (a) y K_{NADH} (b) a pH 5,1, por el método gráfico de FLORINI y VESTLING.

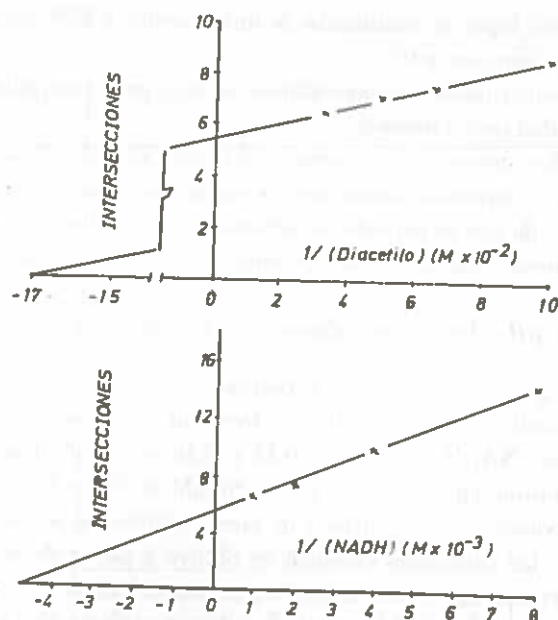


Figura 55.—Cálculo de K'_{NADH} y $K'_{\text{diacetilo}}$ a pH 5,1. Intersecciones de la figura 54 (a y b) en función de $1/(\text{NADH})$ y $1/(\text{Diacetilo})$, respectivamente.

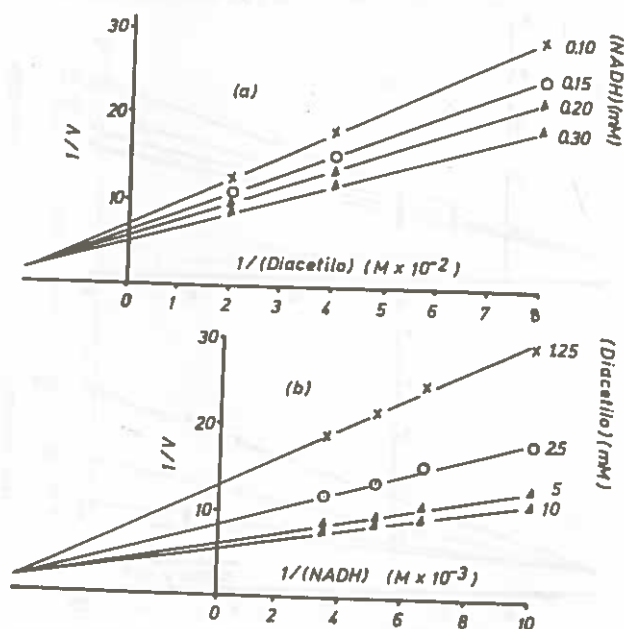


Figura 56.—Cálculo de $K_{\text{diacetilo}}$ (a) y K_{NADH} (b) a pH 5,4, por el método gráfico de FLORINI y VESTLING.

La velocidad control a pH 6,1 de la que se partió para realizar el experimento fue de 138,3 m μ moles de diacetilo reducidos por min. en la muestra ensayada (0,5 ml. de preparación enzimática) y la $V_{\text{máx}}$ resultante de 183. El valor de la $V_{\text{máx}}$ corregida para 100 unidades de enzima es de 132,3.

pH 5,4.—Los valores de los parámetros cinéticos de la reacción a este pH fueron estudiados utilizando las mismas concentraciones de sustratos que en el experimento anterior.

De las representaciones $1/v$ en función de $1/\text{Diacetilo}$ y de $1/v$ en función de $1/(\text{NADH})$ (figura 56 a y b) se obtuvieron las constantes de disociación, cuyos valores son los siguientes: $K_{\text{diacetilo}} = 5,13 \text{ mM}$ y $K_{\text{NADH}} = 1,49 \times 10^{-4} \text{ M}$. Las constantes de Michaelis para ambos sustratos, determinadas por medio de las representaciones de la figura 57 a y b dan los valores $K'_{\text{diacetilo}} = 2,7 \text{ mM}$ y $K'_{\text{NADH}} = 0,58 \times 10^{-4} \text{ M}$. La velocidad control a pH 6,1 utilizada en este experimento fue de 136,8 m μ moles de diacetilo reducidos por min. y la máxima obtenida de 234. La velocidad máxima corregida para 100 unidades es de 171.

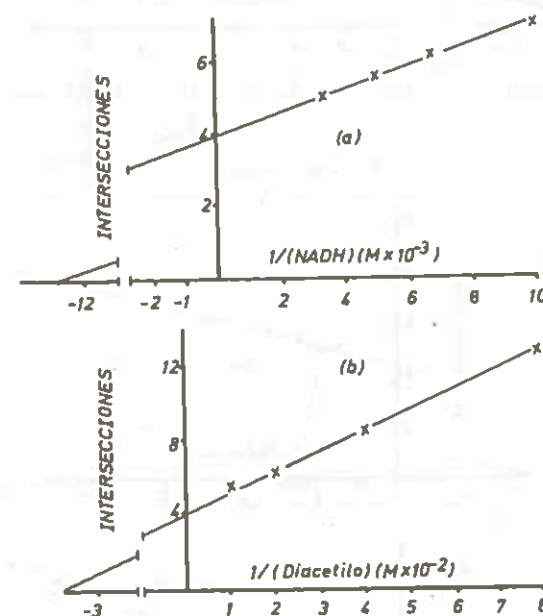


Figura 57.—Cálculo de K'_{NADH} y $K'_{\text{diacetilo}}$ a pH 5,4. Intersecciones de la figura 56 (a y b) en función de $1/(\text{NADH})$ y $1/(\text{Diacetilo})$, respectivamente.

pH 5,9.—Se amplió en esta experiencia el rango de concentraciones de NADH, añadiendo el punto 0,10 mM, manteniéndose las mismas concentraciones de diacetilo que en los experimentos precedentes.

Los resultados han sido representados gráficamente en las figuras 58 a y b y 59 a y b, a partir de las cuales se obtuvieron las 4 constantes de equilibrio de la

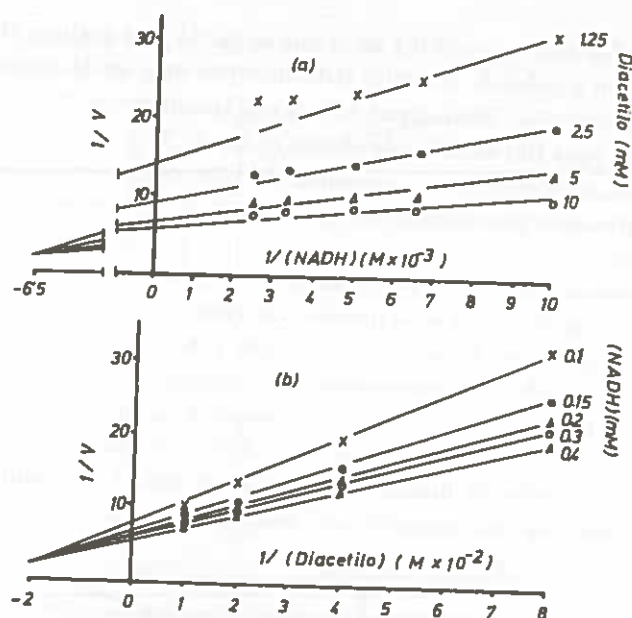


Figura 58.—Cálculo de K_{NADH} (a) y $K_{diacetyl}$ (b) a pH 5.9, por el método gráfico de FLORINI y VESTLING.

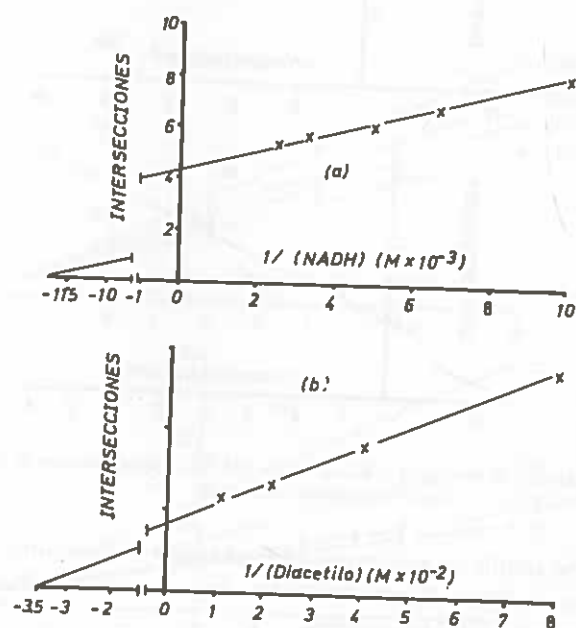


Figura 59.—Cálculo de K'_{NADH} y $K'_{diacetyl}$ a pH 5.9. Intersecciones de la figura 58 (a y b) en función de $1/(Diacetyl)$ y $1/(NADH)$, respectivamente.

reacción y la $V_{m\acute{a}x}$, siendo sus valores los siguientes: $K_{diacetyl} = 5 \text{ mM}$; $k_{NADH} \approx 1,54 \times 10^{-4} \text{ M}$; $K'_{diacetyl} = 2,81 \text{ mM}$ y $K'_{NADH} = 0,87 \times 10^{-4} \text{ M}$.

La velocidad máxima resultó ser de 238, partiendo de una velocidad control a pH 6,1 de 115,2. La velocidad máxima corregida es pues 206.

pH 6,3.—Este experimento se llevó a cabo siguiendo la misma marcha experimental que en los anteriormente descritos. La velocidad control a pH 6,1 de la que se partió para la consecución de esta experiencia fue de 121 μmoles de diacetyl reducidos por min. Los resultados representados gráficamente por el método de FLORINI y VESTLING, figuras 60 a y b y 61 a y b, han servido para determinar el valor de las constantes a este pH, que son: $K_{diacetyl} = 4,3 \text{ mM}$; $K_{NADH} = 1,64 \times 10^{-4} \text{ M}$; $K'_{diacetyl} = 3 \text{ mM}$ y $K'_{NADH} = 1,16 \times 10^{-4} \text{ M}$. La $V_{m\acute{a}x}$ obtenida fue de 243 y la $V_{m\acute{a}x}$ corregida 210,7.

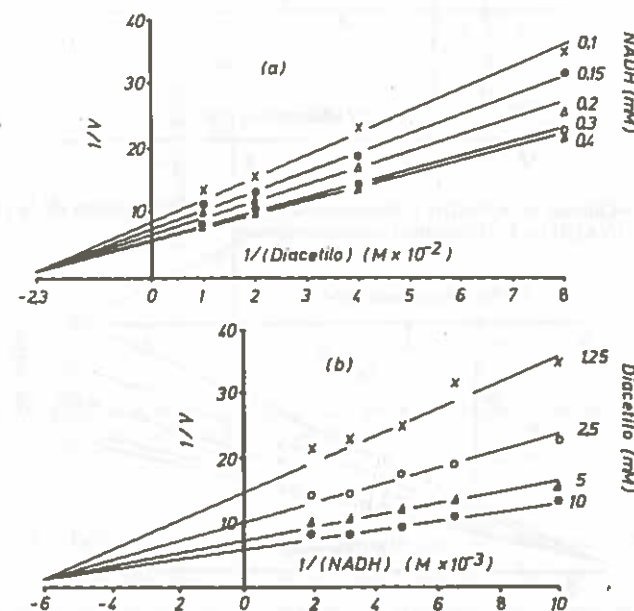


Figura 60.—Cálculo de $K_{diacetyl}$ (a) y K_{NADH} (b) a pH 6.3 por el método gráfico de FLORINI y VESTLING.

pH 6,7.—Se intentó en esta experiencia aumentar las concentraciones de diacetyl hasta 20 mM, comprobándose por medio de las representaciones directas (V en función de S que esta concentración de sustrato ejercía ya un apreciable efecto inhibitor. Se decidió pues continuar con las mismas concentraciones con que se venía trabajando.

Los resultados que aparecen representados en la fig. 62 a y b permiten calcular el valor de las constantes cinéticas a este pH: $K_{diacetyl} = 3,65 \text{ mM}$; $K_{NADH} = 1,9 \times 10^{-4} \text{ M}$; $K'_{diacetyl} = 2,64 \text{ mM}$ y $K'_{NADH} = 1,35 \times 10^{-4} \text{ M}$.

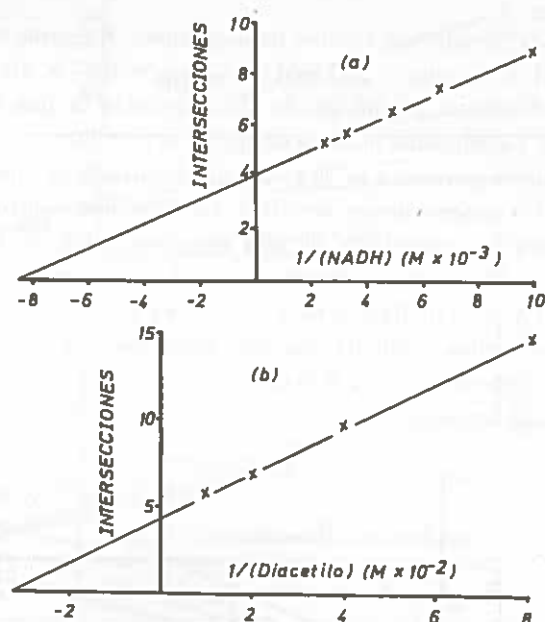


Figura 61.—Cálculo de K'_{NADH} y $K'_{\text{diacetilo}}$ a pH 6,3. Intersecciones de la figura 60 (a y b) en función de $1/(\text{NADH})$ y $1/(\text{Diacetilo})$, respectivamente.

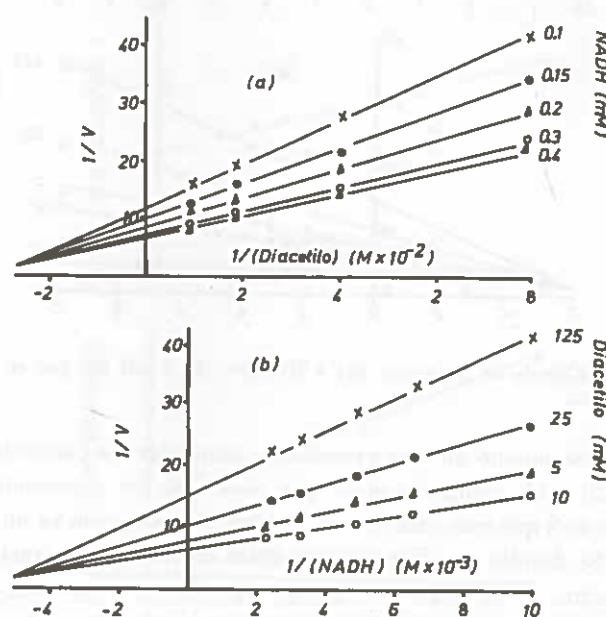


Figura 62.—Cálculo de $K_{\text{diacetilo}}$ (a) y K_{NADH} (b) a pH 6,7 por el método gráfico de FLORINI y VESTLING.

El punto de corte con el eje de ordenadas en las representaciones 63 a y b es $1/V \approx 4,92$, siendo por tanto la $V_{\text{máx}}$ 203; considerando que la velocidad control utilizada fue de 103,9 y la $V_{\text{máx}}$ corregida 195,3.

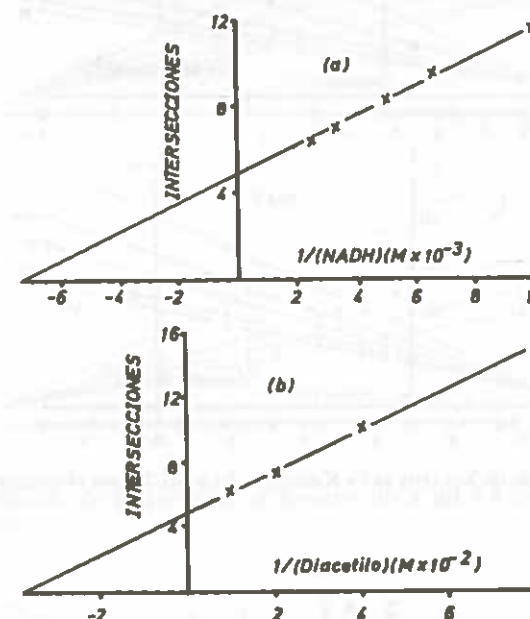


Figura 63.—Cálculo de K'_{NADH} y $K'_{\text{diacetilo}}$ a pH 6,7. Intersecciones de la figura 62 (a y b) en función de $1/(\text{NADH})$ y $1/(\text{Diacetilo})$, respectivamente.

pH 7,1.—La falta de inhibición a este pH por la concentración 20 mM de diacetilo nos permitió utilizar este punto para disponer de una recta más en las representaciones gráficas de los resultados, lo que supone mayor seguridad en el cálculo de las constantes cinéticas y de la $V_{\text{máx}}$. Como hasta este pH no se ha hecho evidente el descenso en la actividad máxima, se utilizó una cantidad de enzima semejante a la de los experimentos procedentes, 104,7 unidades. El valor de las constantes obtenido en las representaciones de las figuras 64 a y b y 65 a y b es el siguiente: $K_{\text{diacetilo}} = 3 \text{ mM}$; $K_{\text{NADH}} = 1,98 \times 10^{-1} \text{ M}$; $K'_{\text{diacetilo}} = 2,12 \text{ mM}$ y $K'_{\text{NADH}} = 1,42 \times 10^{-1} \text{ M}$. $V_{\text{máx}} = 149$; $V_{\text{máx}}$ corregida para 100 unidades de enzima 142,2.

pH 7,4.—En la experiencia anterior se observó ya un descenso claro en el valor de la $V_{\text{máx}}$. Se decidió por ello utilizar mayor cantidad de enzima, aproximadamente 162,4 unidades. Las concentraciones de sustratos no se variaron respecto a los experimentos hasta ahora descritos.

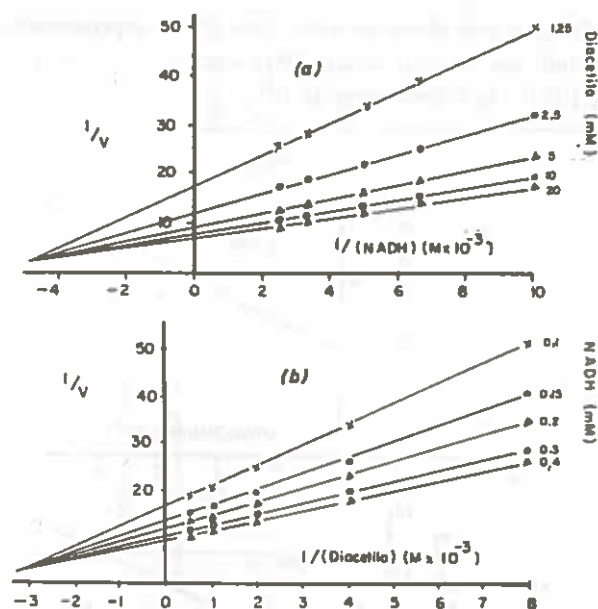


Figura 64.—Cálculo de K_{NADH} (a) y $K_{diacetilo}$ (b) a pH 7,1 por el método gráfico de FLORINI y VESTLING.

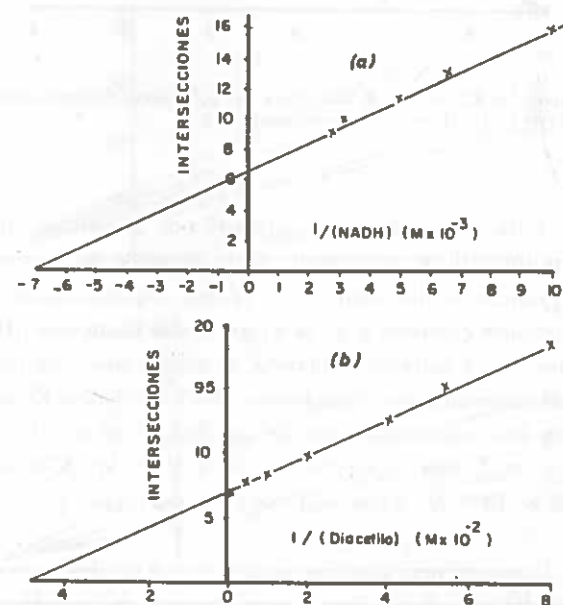


Figura 65.—Cálculo de K'_{NADH} y $K'_{diacetilo}$ a pH 7,1. Intersecciones de la figura 64 (a y b) en función de $1/(Diacetilo)$ y $1/(NADH)$, respectivamente.

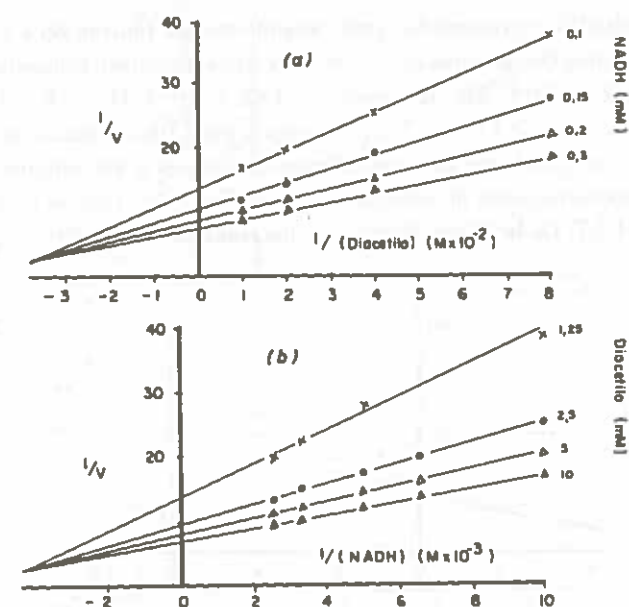


Figura 66.—Cálculo de $K_{diacetilo}$ (a) y K_{NADH} (b) a pH 7,4 por el método gráfico de FLORINI y VESTLING.

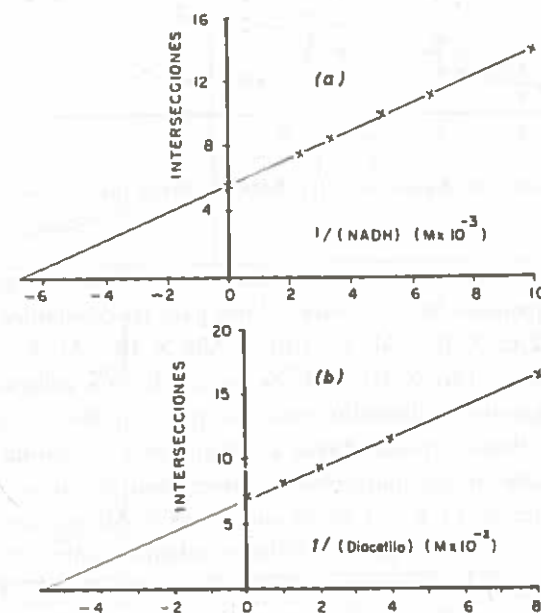


Figura 67.—Cálculo de K'_{NADH} y $K'_{diacetilo}$ a pH 7,4. Intersecciones de la figura 66 (a y b) en función de $1/(NADH)$ y $1/(Diacetilo)$, respectivamente.

Los resultados representados gráficamente en las figuras 66 a y b y 67 a y b ofrecen los valores de las constantes y de la V_{\max} siguientes: $K_{\text{diacetilo}} = 2,67 \text{ mM}$; $K_{\text{NADH}} = 2,42 \times 10^{-4} \text{ M}$; $K'_{\text{diacetilo}} = 1,62 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $K'_{\text{NADH}} = 1,45 \times 10^{-4} \text{ M}$. La V_{\max} fue de 178 y la V_{\max} corregida para 100 unidades de enzima 109,6.

pH 7,7.—Al igual que en experimentos anteriores y sin ninguna variante respecto a las concentraciones de sustratos, se estudiaron los valores de los parámetros cinéticos a pH 7,7. De la representación de los resultados obtenidos (figuras 68 a y b

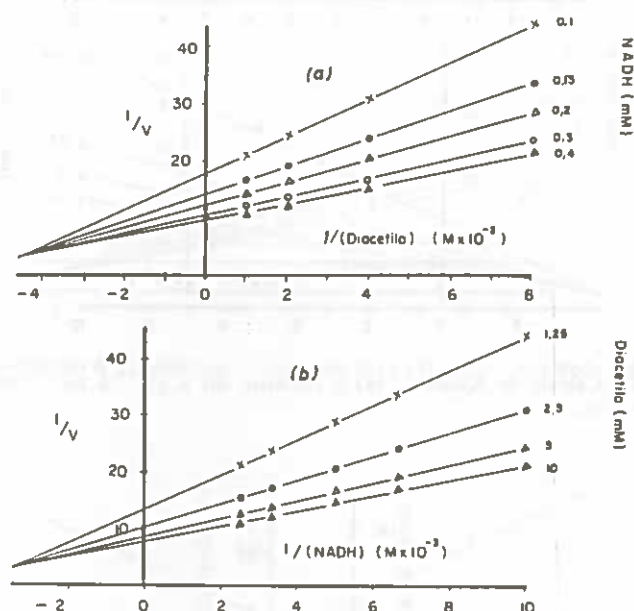


Figura 68.—Cálculo de $K_{\text{diacetilo}}$ (a) y K_{NADH} (b) a pH 7,7 por el método gráfico de FLORINI y VESTLING.

y 69 a y b) de los ensayos espectrofotométricos, por el método gráfico de FLORINI y VESTLING, se calcularon los siguientes valores para las constantes y la V_{\max} .

$K_{\text{diacetilo}} = 2,15 \times 10^{-3} \text{ M}$; $K_{\text{NADH}} = 2,86 \times 10^{-4} \text{ M}$; $K'_{\text{diacetilo}} = 1,26 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $K'_{\text{NADH}} = 1,67 \times 10^{-4} \text{ M}$. Se partió de una velocidad control a pH 6,1 de 195,7 m μmoles de diacetilo reducidos por min. Se consiguió una V_{\max} de 148 y se calculó la V_{\max} correspondiente a 100 unidades de enzima en 75,6.

pH 8.—El valor de las constantes de disociación fue tomado de las representaciones de la figura 70 a y b y el de las constantes de MICHAELIS de las representaciones de la figura 71 a y b y a partir de ellos se calculó el valor de V_{\max} .

Estos valores son los siguientes: $K_{\text{diacetilo}} = 1,88 \times 10^{-3} \text{ M}$; $K_{\text{NADH}} = 3,3 \times 10^{-4} \text{ M}$; $K'_{\text{diacetilo}} = 0,84 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $K'_{\text{NADH}} = 1,47 \times 10^{-4} \text{ M}$. Se utilizó una cantidad de enzima que daba una velocidad inicial, a pH 6,1, de 251,15 m μmoles de diacetilo reducidos por minuto.

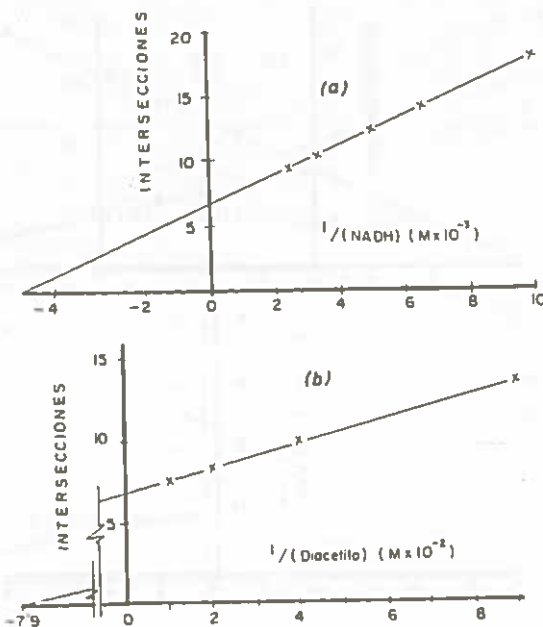


Figura 69.—Cálculo de K'_{NADH} y $K'_{\text{diacetilo}}$ a pH 7,7. Intersecciones de la figura 68 (a y b) en función de $1/(\text{NADH})$ y $1/(\text{Diacetilo})$, respectivamente.

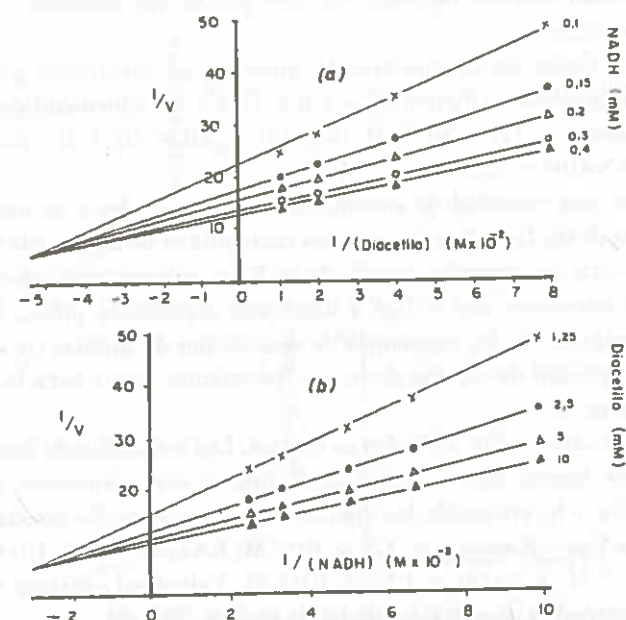


Figura 70.—Cálculo de $K_{\text{diacetilo}}$ (a) y K_{NADH} (b) a pH 8, por el método gráfico de FLORINI y VESTLING.

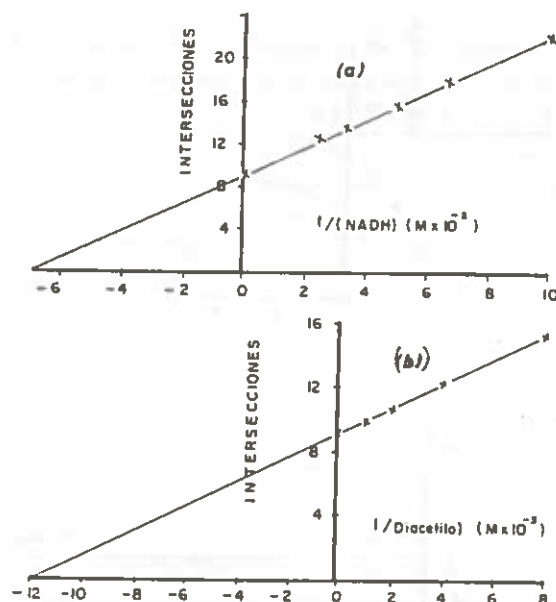


Figura 71.—Cálculo de K'_{NADH} y $K'_{\text{diacetilo}}$ a pH 8. Intersecciones de la figura 70 (a y b) en función de $1/(\text{NADH})$ y $1/(\text{Diacetilo})$, respectivamente.

La velocidad máxima obtenida fue 109, por lo que equivale a 43,4 para 100 unidades de enzima.

pH 8,3.—Como en el experimento anterior, se calcularon gráficamente las constantes de equilibrio (figuras 72 a y b y 73 a y b), obteniéndose los siguientes valores: $K_{\text{diacetilo}} = 1,8 \times 10^{-3} \text{ M}$; $K_{\text{NADH}} = 3,8 \times 10^{-4} \text{ M}$; $K'_{\text{diacetilo}} = 0,72 \times 10^{-3} \text{ M}$; $K'_{\text{NADH}} = 1,51 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Se utilizó una cantidad de enzima de 266,12 unidades y se obtuvo una velocidad máxima de 66. La velocidad máxima corregida es de 24,8 a este pH.

pH 8,5.—La disminución rápida de la $V_{\text{máx}}$ que se venía observando en los experimentos anteriores, nos obligó a hacer una experiencia piloto, basándonos en el valor aproximado de las constantes de disociación de MICHAELIS esperadas para averiguar la cantidad de enzima de la que deberíamos partir para la realización de este experimento.

Decidimos utilizar 536 unidades de enzima. Los resultados de los ensayos espectrofotométricos fueron representados gráficamente como aparecen en las figuras 74 a y b y 75 a y b, arrojando los siguientes valores para las constantes reales de equilibrio y la $V_{\text{máx}}$: $K_{\text{diacetilo}} = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$; $K_{\text{NADH}} = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $K'_{\text{diacetilo}} = 0,49 \times 10^{-3} \text{ M}$; $K'_{\text{NADH}} = 1,55 \times 10^{-4} \text{ M}$. Velocidad máxima = 80 y velocidad máxima corregida para 100 unidades de enzima, 14,9.

pH 8,6.—Se utilizaron 900 unidades de enzima. Los valores de las constantes de equilibrio se calcularon en:

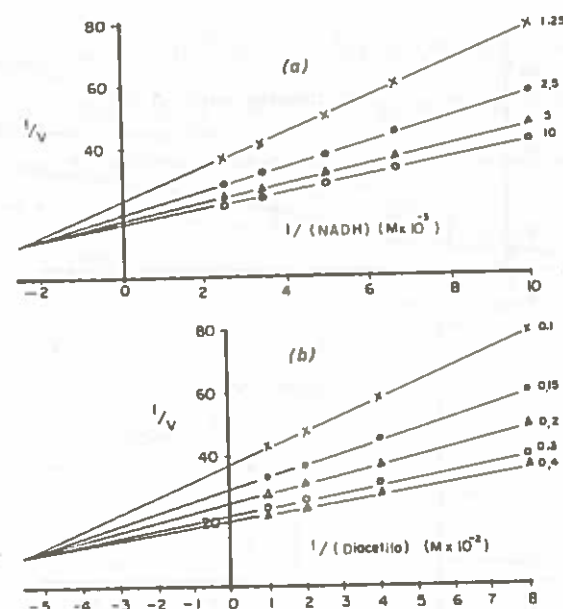


Figura 72.—Cálculo de K_{NADH} (a) y $K_{\text{diacetilo}}$ (b) a pH 8,3 por el método gráfico de FLORINI y VESTLING.

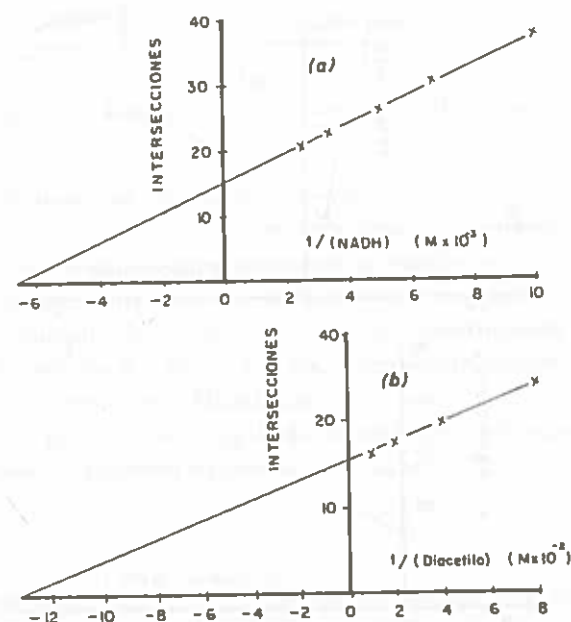


Figura 73.—Cálculo de K'_{NADH} y $K'_{\text{diacetilo}}$ a pH 8,3. Intersecciones de la figura 72 (a y b) en función de $1/(\text{Diacetilo})$ y $1/(\text{NADH})$, respectivamente.

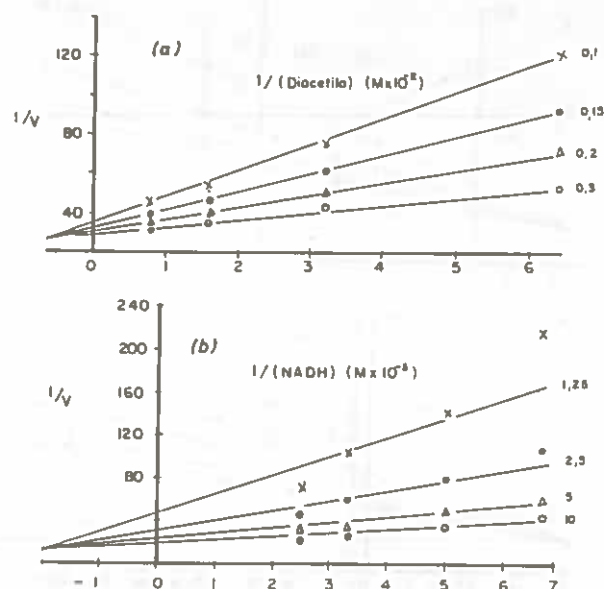


Figura 74.—Cálculo de $K_{\text{diacetilo}}$ (a) y K_{NADH} (b) a pH 8,5 por el método gráfico de FLORINI y VESTLING.

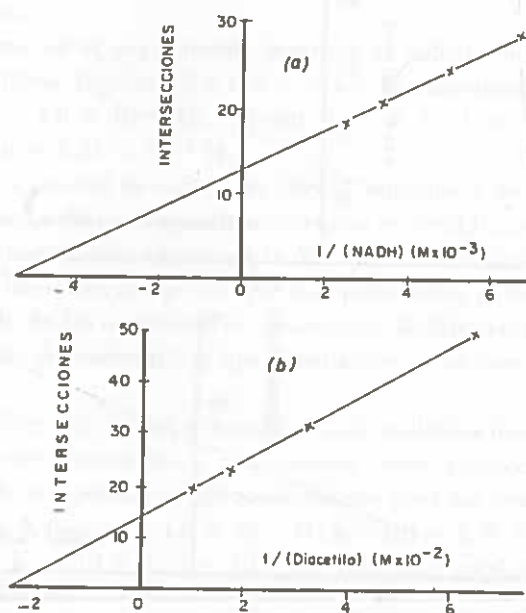


Figura 75.—Cálculo de K'_{NADH} y $K'_{\text{diacetilo}}$ a pH 8,5. Intersecciones de la figura 74 (a y b) en función de $1/(\text{NADH})$ y $1/(\text{Diacetilo})$, respectivamente.

$$K_{\text{diacetilo}} = 1,75 \times 10^{-3} \text{ M.} \quad K_{\text{NADH}} = 6,35 \times 10^{-4} \text{ M.}$$

$$K'_{\text{diacetilo}} = 0,415 \times 10^{-3} \text{ M.} \quad K'_{\text{NADH}} = 1,5 \times 10^{-4} \text{ M.}$$

y el de la $V_{\text{máx}}$ en 125, siendo la velocidad máxima corregida para 100 unidades de enzima, 13,9.

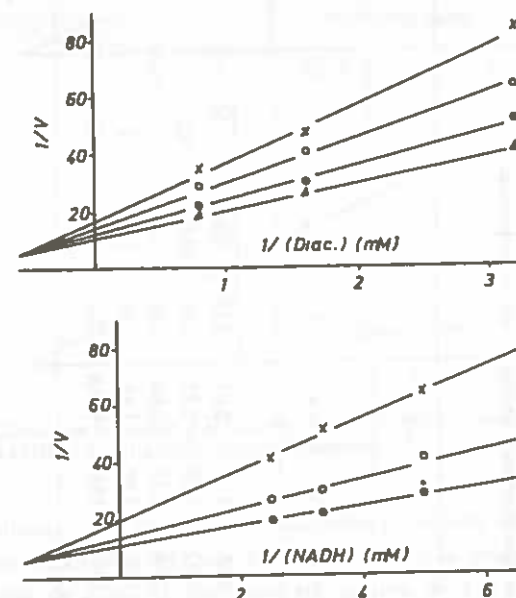


Figura 76.—Cálculo de $K_{\text{diacetilo}}$ (a) y K_{NADH} (b) a pH 8,6 por el método gráfico de FLORINI y VESTLING.

La validez de todas las determinaciones realizadas en el estudio descrito anteriormente fue comprobada mediante el procedimiento de representar las pendientes de las rectas obtenidas en las representaciones primarias en función de la inversa de la molaridad de uno y otro sustrato; las rectas son paralelas.

También se cumple, dentro de un margen de aproximación razonable, que, en cada caso, el producto $K'_a K_b = K'_b K_a$, como cabría esperar si la cinética de la reacción fuese del tipo de la de MICHAELIS.

Los resultados generales del estudio de los efectos del pH sobre los parámetros cinéticos de la reacción aparecen representados en la tabla 20.

VI.4. DISCUSIÓN

Perfil de pH.—El perfil de pH a las concentraciones de sustratos y tampón habitualmente usados, ofrece la forma observada en la mayoría de los enzimas, con una rama ascendente y otra descendente, casi simétricas. El pH óptimo se halla entre 5,8 y 6,2.

TABLA 20
Efectos del pH sobre los parámetros cinéticos de la reacción

	pH											
	5,1	5,4	5,9	6,3	6,7	7,1	7,4	7,7	8	8,3	8,5	8,6
K _{diac.} (mM)	5,26	5,13	5	4,3	3,65	3	2,67	2,15	1,88	1,8	1,6	1,75
K _{NADH} ($M \times 10^{-4}$)	1,47	1,49	1,54	1,64	1,9	1,98	2,42	2,86	3,3	3,8	5	6,35
K' _{diac.} (mM)	2,06	2,7	2,81	3	2,64	2,12	1,62	1,26	0,94	0,72	0,49	0,41
K' _{NADH} ($M \cdot 10^{-4}$)	0,58	0,79	0,87	1,16	1,35	1,42	1,45	1,67	1,47	1,51	1,55	1,5
V _{máx}	132,3	171	206	210,7	195,3	142,2	109,6	75,6	43,4	24,75	14,9	13,9

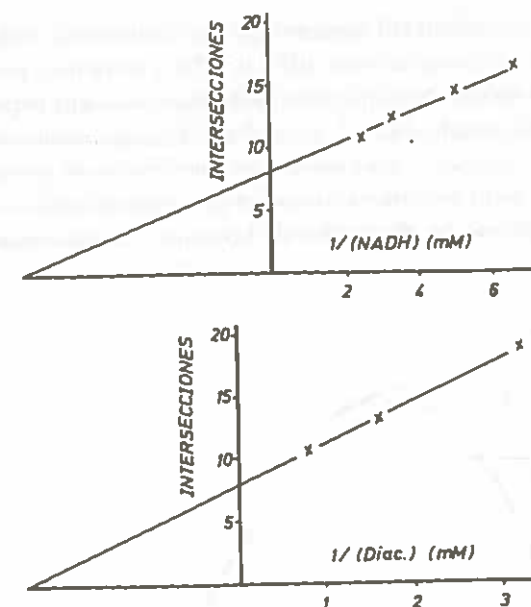


Figura 77.—Cálculo de K'_{NADH} y K'_{diacetilo} a pH 8,6. Intersecciones de la figura 76 (a y b) en función de 1/(NADH) y 1/(Diacetilo), respectivamente.

Los pH óptimos para la actividad diacetilo reductasa hasta ahora publicados son muy diversos BRANEN y KEENAN (1970) dan para la reacción catalizada por el enzima procedente de *Lactobacillus casei* un óptimo de 4,5. SPECKMAN (1969) da, en cambio, un pH óptimo para la reacción catalizada por el enzima procedente de la cepa 18-16 de *Streptococcus diacetilactis* de 6,2. Las diacetilorreductasas de origen animal dan todas ellas óptimos en torno a pH 6 (GABRIEL *et al*, 1971 y BURGOS y MARTÍN, 1972).

En los dos casos en que se ha publicado hasta ahora un perfil de pH completo (BRANEN y KEENAN y BURGOS y MARTÍN) se observa la presencia de más de un pico, a diferencia de lo hallado en los experimentos descritos en este capítulo. Pese a que las condiciones y marcha experimentales utilizadas por BURGOS y MARTÍN son muy similares a las aquí usadas, no es fácil decidir si las discrepancias observadas en el perfil de pH reflejan diferencias reales en la estructura o mecanismo de acción del enzima; curiosamente, en experiencias no publicadas llevadas a cabo en el mismo laboratorio en el que se han efectuado los aquí descritos, ha podido observarse que las preparaciones parcialmente purificadas por precipitación acetónica, obtenidas a partir de la fracción soluble de hígado de bóvido ofrecen el mismo perfil de pH descrito por BURGOS y MARTÍN (1972), pero las purificadas por el mismo procedimiento a partir de mitocondrias, lisosomas y microsomas, aunque presentan dos picos de actividad similares, son más activos a pHs más bajos (HERRERO, 1973, comunicación personal).

Los estudios de estabilidad demuestran que la diacetilo reductasa de hígado de paloma es totalmente estable entre pH 5,4 y 7,4 y se ve muy poco afectada entre los pHs de 5 a 5,4 y de 8 a 10, lo que pone ya de manifiesto que el perfil experimental de pH refleja fundamentalmente los efectos de la concentración de hidrogeniones sobre la actividad catalítica. Esta observación queda además plenamente confirmada comparando el perfil experimental con el calculado a partir de la ecuación de velocidad, aplicando a cada pH el valor de las constantes cinéticas halladas para el mismo (figura 78).

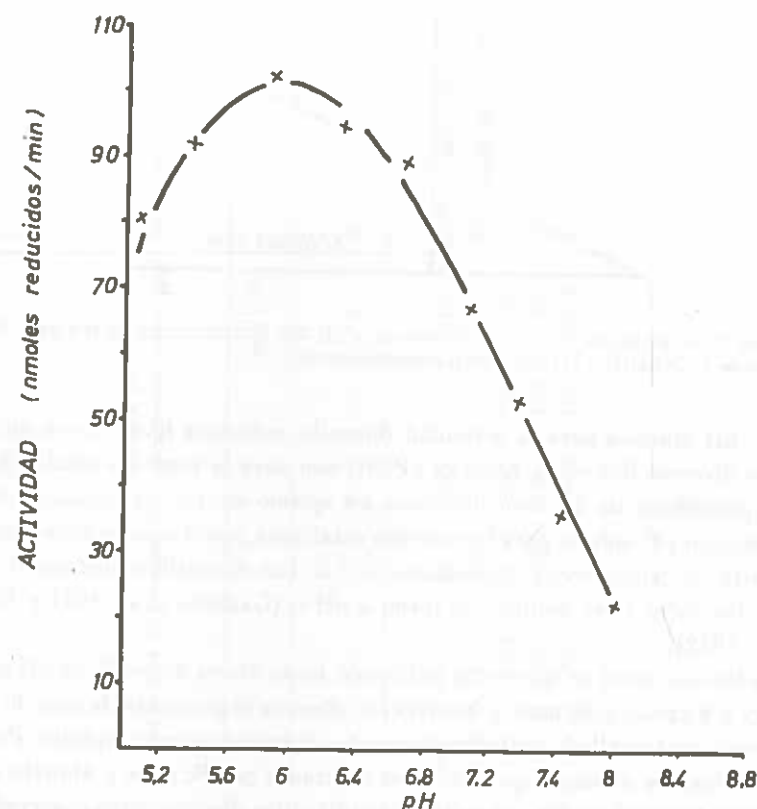


Figura 78.—Perfil de pH teórico calculado para las concentraciones standard de diacetilo y NADH, aplicando los valores de las constantes cinéticas obtenidos a cada pH a la ecuación V.20.

El análisis de los datos que figuran en la tabla 20 demuestran que:

- 1.—La afinidad por el diacetilo es mínima a pH óptimo y aumenta tanto hacia el lado ácido como hacia el alcalino.
- 2.—La afinidad por el NADH disminuye a medida que el pH aumenta hasta aproximadamente 6,5, a partir del cual se mantiene constante en un valor mínimo, y
- 3.—La velocidad máxima alcanza su valor más alto en la zona de pH óptimo.

El perfil de pH observado es consecuencia de la combinación de los tres efectos; refleja fundamentalmente el influjo que la concentración de hidrogeniones ejerce sobre la velocidad máxima, atenuado por la influencia sobre la afinidad por los substratos: Los efectos sobre la afinidad por el NADH y por el diacetilo son en gran medida antagónicos a los ejercicios sobre la velocidad máxima.

Variaciones de las constantes de velocidad y equilibrio con el pH.—Cualquier interpretación de los datos experimentales obtenidos en los estudios cinéticos de los efectos del pH sobre las constantes de velocidad y equilibrio, requiere la consideración del mecanismo seguido por la reacción.

En el capítulo V se ha demostrado que la reacción catalizada por la diacetilo reductasa de hígado de paloma sigue un mecanismo de Theorell-Chance, en el que el NADH actúa como substrato conductor. La etapa limitante de la velocidad es pues la liberación del coenzima oxidado a partir del complejo E-NAD. Los resultados experimentales se interpretan a continuación, basándose en este mecanismo. Aplicando el método descrito por Dixon (1953) a esta reacción, la dependencia respecto del pH de los parámetros cinéticos viene dada por las ecuaciones:

(Ec. VI.1.)

$$\log. V_{\text{máx.}} = \log. \bar{V}_{\text{máx.}} + \text{pf}^{-}\text{E-NAD}$$

(Ec. VI.2.)

$$\log \frac{V_{\text{máx.}}}{K'_{\text{NADH}}} = \log \frac{\bar{V} / f_{\text{E-NAD}}}{\bar{K}_{\text{NADH}} \times f_{\text{E}}^{-} \times f_{\text{NADH}}^{-} / f_{\text{E-NAD}}^{-}}$$

Esta ecuación puede transformarse así:

(Ec. VI.3.)

$$\begin{aligned} \log. \frac{V_{\text{máx.}}}{K'_{\text{NADH}}} &= \log. \bar{V}_{\text{máx.}} + \text{pf}^{-}\text{E-NAD} \cdot \log. \bar{K}'_{\text{NADH}} \cdot \log. f_{\text{E}}^{-} - \\ &- \log. f_{\text{NADH}}^{-} + \log. f_{\text{E-NAD}}^{-} = \log. \frac{\bar{V}_{\text{máx.}}}{\bar{K}'_{\text{NADH}}} + \text{pf}^{-}\text{E-NAD} + \\ &+ \text{pF}_{\text{E}} + \text{pf}^{-}_{\text{NADH}} - \text{pf}^{-}_{\text{E-NAD}} = \log \frac{V_{\text{máx.}}}{\bar{K}'_{\text{NADH}}} + \text{pf}^{-}_{\text{E}} + \text{pf}^{-}_{\text{NADH}} \end{aligned}$$

(Ec. VI.4.)

$$\log. \frac{V_{\text{máx.}}}{K'_{\text{diacetilo}}} = \log. \frac{\bar{V}_{\text{máx.}}}{\bar{K}_{\text{diacetilo}}} + \text{pf}^{-}\text{E-NADH} + \text{pf}^{-}_{\text{diacetilo}}$$

(Ec. VI.5.)

$$\log. V'_{\text{máx}} = \log. \bar{V}'_{\text{máx.}} + \text{pf}^{-}\text{E-NADH}$$

en las que pf^- es el logaritmo negativo de las apropiadas funciones de pH de Michaelis y $K'_{\text{diacetilo}}$, K'_{NADH} , $V_{\text{máx}}$ y $V'_{\text{máx}}$ los parámetros de la ecuación independiente del pH, es decir, los valores alcanzados por $K'_{\text{diacetilo}}$, K'_{NADH} , $V_{\text{máx}}$ y $V'_{\text{máx}}$ cuando el enzima (y sus formas) y el sustrato se hallan en el estado de ionización óptimo para la reacción.

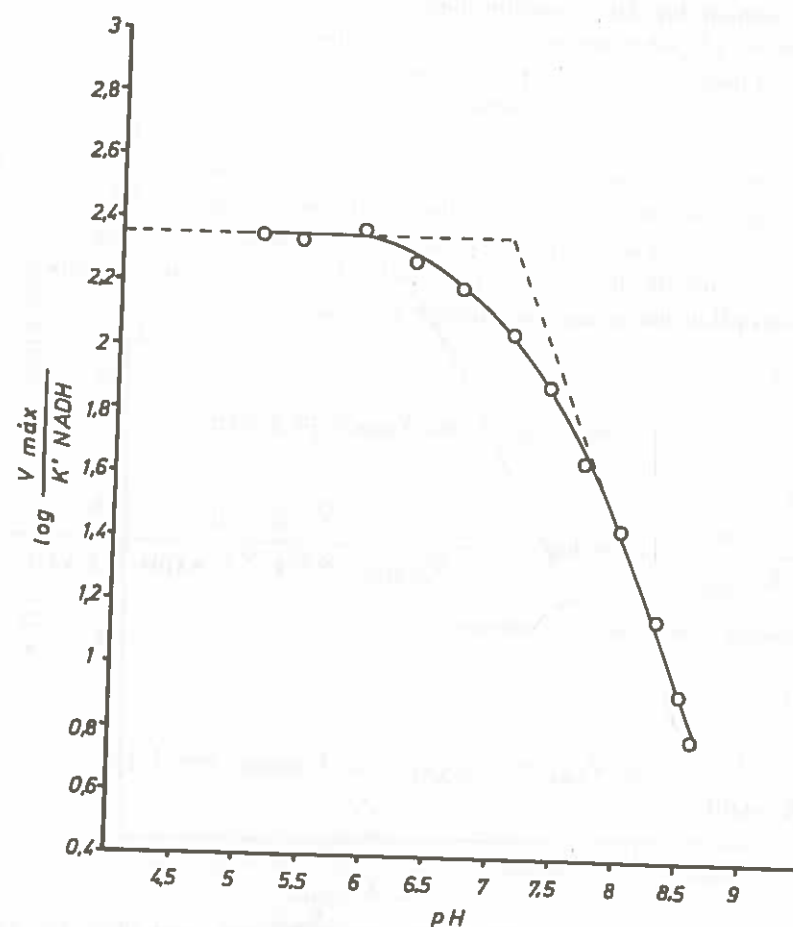


Figura 79.—Determinación del pK de grupos ionizables en el enzima libre. Representación del $\log (V_{\text{máx}}/K'_{\text{NADH}})$ en función del pH.

La velocidad máxima de la reacción en sentido inverso (V') que no ha podido determinarse experimentalmente dada la irreversibilidad a efectos prácticos del sistema, se ha obtenido a partir de las ecuaciones.

(Ec. VI.6.)

$$V'_{\text{máx}} = K_2 (E)$$

$$K_2 = \frac{K_{\text{NADH}} V_{\text{máx}}}{K'_{\text{NADH}} (E)}$$

$$V'_{\text{máx}} = \frac{K_{\text{NADH}} V_{\text{máx}}}{K'_{\text{NADH}}}$$

Siendo K_2 la constante de velocidad de la disociación del complejo E-NADH en E y NADH. Los demás términos ya han sido definidos.

Las representaciones de $\log. \frac{V}{K'_{\text{NADH}}}$ en función del pH deben permitir por

tanto la obtención de los pK del enzima libre y NADH en los puntos de corte de las líneas rectas, cuya pendiente debe ser un número entero, tangentes a las ramas de la gráfica. Estos puntos deben distar en vertical del punto de inflexión log. de 2, y de log. de 3 en el caso que coincidan dos pK (para más detalles véase DIXON y WEBB, 1964).

Del mismo modo las representaciones de $\log. \frac{V_{\text{máx}}}{K'_{\text{diacetilo}}}$ y las de V' , ambas en función del pH deberían dar los pK del complejo E-NADH y del diacetilo (si fuera ionizable). Las de V en función del pH darán los pK del complejo E-NAD.

En la figura 79 se representa $\log. \frac{V_{\text{máx}}}{K'_{\text{NADH}}}$ en función del pH; para la

confección de esta gráfica los valores de V se han tomado de la figura 81, al objeto de eliminar en lo posible los errores experimentales. Las líneas de pendiente 0 y -1 se cortan a pH 7.7,1; dado que en el rango de pH estudiado no pueden esperarse interferencias provocadas por la ionización de algún grupo en la molécula del coenzima, como se prueba por titulación de una muestra del mismo con NaOH (véase gráfica 80). Este pH corresponde a un pK del enzima libre, que concuerda con el esperable de un grupo imidazol de la histidina.

La representación de $\log. V_{\text{máx}}$ en función del pH (figura 81) permite obtener un punto de corte de las líneas de pendiente 0 y -1 en 7,3, que representa un pK del complejo E-NAD. La relativa concordancia con este pK del complejo enzima NAD sugiere que el grupo de pK = 7 del enzima libre está implicado en la liberación del coenzima oxidado a partir del complejo E-NAD.

Dada la apariencia simétrica de la representación de la figura 81, cabe suponer la existencia de otro pK en torno a 4,9 que, a pesar del desplazamiento del pK esperable de la asociación con el coenzima, correspondería muy probablemente al

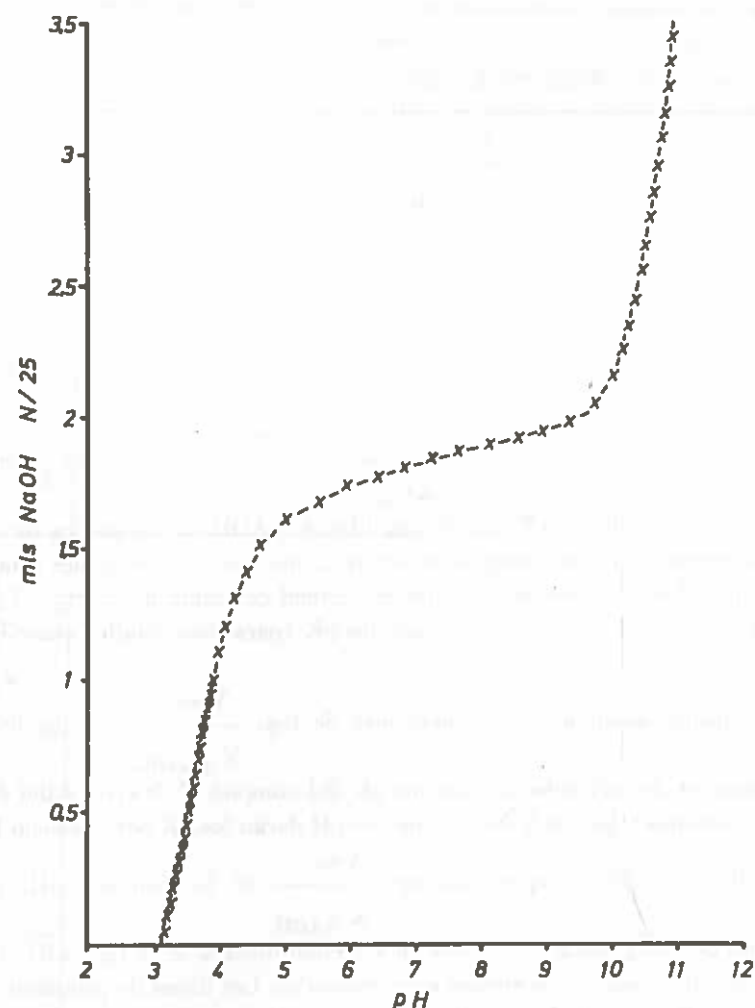


Figura 80.—Curva de titulación del NAD con Na(OH) N/25.

grupo carboxílico de la cadena lateral de un resto de ácido aspártico o glutámico. Este pK no se observa en las representaciones de $\log. \frac{V}{K'_{\text{NADH}}}$, lo que se considera debido a que en el enzima libre está en una región de pH ligeramente más ácida no explorada.

La representación de $\log. \frac{V_{\text{máx}}}{K'_{\text{diacetilo}}}$ (figura 80) muestra un pK a pH 7,8-7,9, que ha de corresponder al complejo E-NADH, puesto que el diacetilo no es

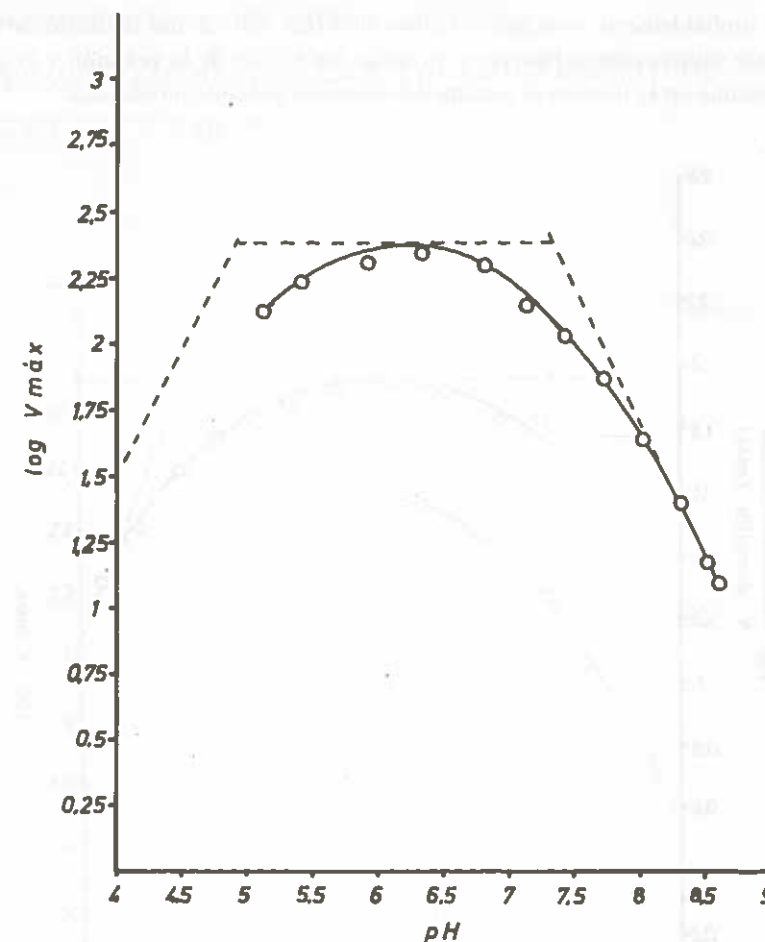


Figura 81.—Cálculo del pK de grupos ionizables en el complejo E-NAD. Representación de $\log V_{\text{máx}}$ en función del pH.

ionizable; un valor muy similar, pK 7,7-7,8, y también referido al mismo complejo, se obtiene de la representación de $\log. V'$ respecto al pH (figura 83). Puesto que en las representaciones que dan el (los) pK del enzima libre no aparece más que uno en esta zona, lo lógico es suponer que está desplazado 0,7 ó 0,8 unidades por la fijación del NADH.

Las gráficas en las que se representa $\log. (V/K'_{\text{diacetilo}})$ en función del pH permiten también suponer nuevamente la existencia de otro pK hacia pH 4,9, que ya se ha atribuido a un grupo carboxilo libre no terminal y en este caso referido al complejo E-NADH.

En resumen, se considera que en la actividad catalítica deben participar por lo menos dos grupos ionizables, uno de pK — 4,9 y otro de pK 7-7,1, que corres-

ponden probablemente a un grupo carboxílico (no α) y a uno imidazol de la histidina. Este último parece intervenir en todas las etapas de la reacción y el primero como mínimo en la fijación al enzima del coenzima oxidado o reducido.

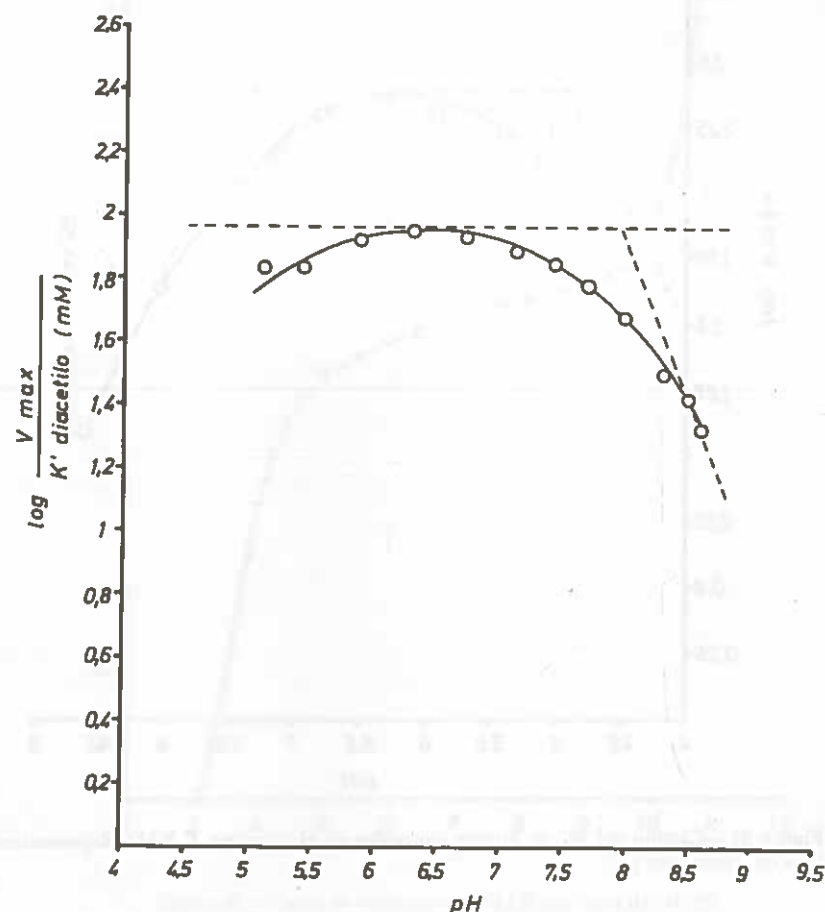


Figura 82.—Cálculo del pK de grupos ionizables en el complejo E-NADH. Representación de $\log (V_{max}/K' \text{ diacetilo})$ en función del pH.

En una reacción de la naturaleza de la aquí considerada, en la que la etapa determinante de la velocidad no es la catalítica propiamente dicha, es de esperar que la protonación de un grupo prototípico desplace su pK hacia el lado alcalino y la ionización hacia el ácido. El desplazamiento del segundo pK a valores más altos en el complejo E-NADH que en el enzima libre y en E-NAD indica, por tanto, que la fijación del NADH va acompañada de la incorporación de un protón al enzima, que se libera durante la oxidación del NADH a NAD.

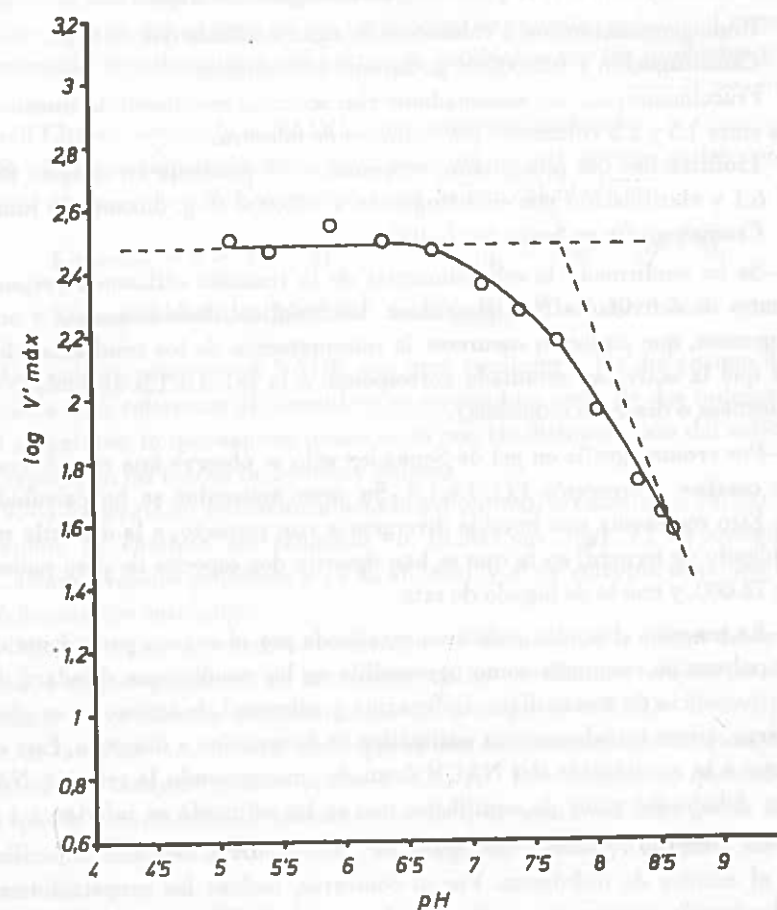
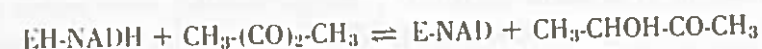


Figura 83.—Cálculo del pK de grupos ionizables en el complejo E-NADH. Representación de $\log V'_{max}$ en función del pH. Los valores de V_{max} se han obtenido de la ecuación VI.6.

Un esquema similar se ha propuesto para un grupo histidina de la lactato deshidrogenasa (WINER y SCHWERT, 1958) y para un grupo tiol de la alcohol deshidrogenasa (DALZIEL, 1963).

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

1.—Se ha diseñado un método para la purificación de la diacetilo reductasa de hígado de paloma, con el que se logra un rendimiento del 5 % con un factor de enriquecimiento superior a 250, que consta de las siguientes etapas:

- Homogeneización con 5 volúmenes de agua destilada fría (0-4°C).
- Centrifugación a $105.000 \times g$ durante 100 minutos.
- Fraccionamiento del sobrenadante con acetona, recogiendo la fracción que precipita entre 1,5 y 2,5 volúmenes por volumen de muestra.
- Liofilización del precipitado, suspensión del producto en tampón fosfato 1 M pH 6,1 y clarificación por centrifugación a $105.000 \times g$ durante 15 minutos.
- Cromatografía en Sephadex G-100.

2.—Se ha confirmado la estequiometría de la reacción utilizando preparaciones carentes de actividades NADH-oxidasas, butilén-glicol deshidrogenasa y acetato deshidrogenasa, que pudieran oscurecer la interpretación de los resultados, demostrándose que la actividad estudiada corresponde a la EC. 1.1.1.5. (acetoína: NAD deshidrogenasa o diacetilo reductasa).

3.—Por cromatografía en gel de Sephadex sólo se observa una especie enzimática que catalice la reacción EC. 1.1.1.5. Su peso molecular se ha calculado en 110.000. Esto representa una notable divergencia con respecto, a la diacetilo reductasa de hígado de ternera, en la que se han descrito dos especies de peso molecular 26.000 y 72.000, y con la de hígado de rata.

4.—La reacción diacetilo reductasa catalizada por el enzima procedente de hígado de paloma se comporta como irreversible en las condiciones standard de ensayo. En presencia de metasulfato de fenazina y nitroazul de tetrazolio se observa, sin embargo, cierta transformación enzimática de la acetoína a diacetilo. Este efecto se atribuye a la reoxidación del NADH formado, manteniendo la relación NADH/NAD por debajo del valor de equilibrio, que se ha estimado es inferior a 1/600.

5.—La diacetilo reductasa de hígado de paloma ofrece una gran especificidad respecto al aceptor de hidrógeno. Por el contrario, incluso las preparaciones más purificadas pueden utilizar como donador tanto el NADH como el NADPH. La relación de actividades NADH y NADPH dependientes se mantiene constante durante las primeras etapas de purificación, pero se altera durante el paso por Sephadex, lo que sugiere la posibilidad de que las dos actividades correspondan a enzimas distintos.

6.—No se requiere la adición de cofactores metálicos para que las preparaciones del enzima estudiado sean plenamente activas, pero las experiencias realizadas con agentes de quelación no descartan la posibilidad de que la diacetilo reductasa

de hígado de paloma sea un metaloenzima. Algunos de los quelantes más eficaces no ejercen efecto inhibitorio alguno, y las características de la inhibición por el que muestra mayor actividad inhibitoria, el ácido salicílico, pueden interpretarse en diversos sentidos: El efecto inhibitorio es prácticamente instantáneo, se atenúa por dilución, desaparece por completo tras una diálisis relativamente breve y cinéticamente se muestra no-competitivo respecto a los dos sustratos. El ácido salicílico podría, pues, inhibir por quelación, formando un complejo inactivo enzima-metal-quelante con una constante de estabilidad muy baja.

7.—A partir del análisis de las variaciones de la velocidad inicial respecto a la concentración de sustratos y del patrón de inhibición por los productos y los análogos del diacetilo, se concluye que la reacción catalizada sigue el mecanismo de Theorell-Chance, actuando el NADH como sustrato conductor.

8.—Las constantes cinéticas de la reacción, al pH óptimo en las condiciones standard de ensayo y a 25°C de temperatura, se han calculado en:

$$K_{\text{diacetilo}} = 5 \times 10^{-3} \text{ M.} \quad K_{\text{NADH}} = 1,62 \times 10^{-4} \text{ M.}$$

$$K'_{\text{diacetilo}} = 3,1 \times 10^{-3} \text{ M.} \quad K'_{\text{NADH}} = 1 \times 10^{-4} \text{ M.}$$

Los valores relativos al NADH son muy similares a los del enzima de hígado de ternera. Los referentes al diacetilo son, en cambio, cerca de dos órdenes de magnitud superiores, lo que supone relacionado con las distintas tasas del sustrato que cabe esperar en los tejidos de bóvido y paloma.

9.—La energía de activación al citado pH óptimo, se calculó en 13.700 cal/mol. El cambio de entalpía fue estimado en 13.300 cal./mol. El de energía libre a 25°C alcanza valores próximos a 15 Kcal./mol. y el de entropía se estima entre —1 y —6,8 unidades entrópicas.

Del bajo valor de cambio de entropía se deduce que la causa de la irreversibilidad, a efectos prácticos, de la reacción en las condiciones ordinarias de ensayo, no radica en la barrera termodinámica de la etapa $E + \text{NAD} \rightarrow E\text{-NAD}$. Por otra parte, de las relaciones de equilibrio que se dan en el mecanismo de Theorell-Chance se infiere que tampoco está en la fase $E\text{-NADH} \rightarrow E + \text{NADH}$, lo que obliga a concluir que la irreversibilidad aparente se debe a la escasa afinidad por la acetoína o, menos probablemente, a dificultades en la transferencia de hidrógeno desde la acetoína al NAD.

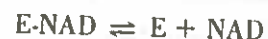
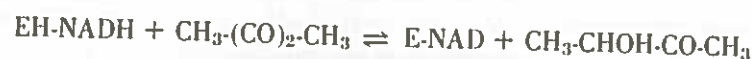
10.—La reacción catalizada por la diacetilo reductasa de hígado de paloma muestra, en las condiciones ordinarias de ensayo, un perfil de pH con un solo pico, situado entre 5,8 y 6,2. Este perfil refleja fundamentalmente los efectos de la concentración de hidrogeniones sobre la actividad catalítica. Representa de modo primordial la acción ejercida sobre la velocidad máxima, atenuada por la influencia sobre la afinidad por los sustratos que es, en gran medida, antagónica a la anterior.

El perfil indicado difiere de los hasta ahora publicados para diacetilo reductasas de otras procedencias, todos los cuales muestran más de un pico.

RESUME

11.—De los estudios de las variaciones de las constantes cinéticas con el pH se deduce que en la actividad catalítica deben participar por lo menos dos grupos ionizables, uno de pK 4,9 y otro de pK 7,7,1, que se atribuyen a un grupo carboxílico no α y a un grupo imidazol de la histidina, respectivamente. El último parece intervenir en todas las etapas de la reacción y el primero, como mínimo, en la fijación del coenzima oxidado o reducido al enzima.

12.—El desplazamiento del segundo pK a valores más altos en el complejo E-NADH que en el enzima libre y en el E-NAD, indica que la fijación del NADH va acompañada de la incorporación al enzima de un protón, que se libera durante la oxidación del NADH a NAD, de acuerdo con el siguiente esquema:



8. RESUMEN

La diacetilo-reductasa de hígado de paloma ha sido purificada por un procedimiento que comprende la precipitación acetónica de los extractos acuosos ultra-centrifugados y la cromatografía en gel de Sephadex. Con este método se obtiene un 5 % de la actividad total con un aumento de 250 veces la actividad específica sobre la original.

Estas preparaciones enzimáticas son muy específicas para uno de los sustratos: el diacetilo, el cual no puede ser reemplazado por otras sustancias similares, pero no para el otro el NADH, que puede ser sustituido por el NADPH. La actividad tiene su pH óptimo entre 5,8 y 6,2 y no necesita iones metálicos.

La energía de activación a pH óptimo se ha calculado en 13.700 cal/mol. El cambio de entalpía en 13.300 cal/mol. La energía libre a 25°C es de 15 Kcal/mol y la entropía próxima a cero.

El peso molecular se ha calculado por filtración en Sephadex y es de 110.000.

Se ha efectuado un amplio estudio para explicar el mecanismo de la reacción, concluyendo que ella sigue un mecanismo Theorell Chance en el que el sustrato conductor es el NADH.

De los estudios de las variaciones de las constantes cinéticas con el pH se deduce que en la actividad catalítica deben participar por lo menos dos grupos ionizables uno de pK 4,9 y otro de pK 7,7,1, que se atribuyen a un grupo carboxílico no α y a un grupo imidazol de la histidina.

Le diacétyl-réductase de foie de pigeon a été purifié, par un procédé comprenant la précipitation avec de la acétone d'extraits aqueux ultra-centrifuges et la chromatographie sur gel de Sephadex. Par cette méthode on obtient un 5 sur 100 de l'activité totale avec une augmentation de 250 fois l'activité spécifique sur l'originale.

Ces préparations enzymatiques sont très spécifiques pour l'un des sustrats: le diacétyl, lequel ne peut pas être remplacé par d'autres substances similaires; mais elles ne le sont pas pour l'autre: le NADH, que peut être remplacé par le NADPH. L'activité enzymatique a son maximum a pH 5,8-6,2 et n'a pas besoin d'ions métalliques.

L'énergie d'activation à pH optimum on l'a calculé en 13.700 cal/mol. Le changement d'enthalpie en 13.300 cal/mol. L'énergie libre à 25°C c'est de 15 Kcal/mol et l'entropie à peu près zéro.

Le poids moléculaire a été calculé par filtration sur Sephadex en 110.000.

On a effectué une ample étude pour exprimer le mécanisme de la réaction, en concluant qu'elle suit un mécanisme Theorell-Chance et le substrat conducteur c'est le NADH.

Des études sur les variations des constants cinétiques avec le pH on déduit que dans l'activité catalytique doivent participer au moins deux groupes ionisés l'un de pK 4,9 et l'autre de pK 7,7,1 que s'attribuent à un groupe carboxylique «non α » et à un groupe imidazole de la histidine respectivement.

SUMMARY

The diacetyl-reductase of pigeon liver has been purified by a procedure including acetonic precipitation of the ultracentrifuged aqueous extracts and Sephadex gel chromatography. By this method, a 5 % of the total activity is recovered, and specific activity increased 250 fold.

The enzymatic preparations are very specific for one of the substrates, diacetyl, which cannot be replaced by any of the analogue substances tried, but not for the other substrate, NADH, which can be substituted by NADPH.

The optimum enzymatic activity is at pH 5.8-6.2, no metal ions being needed.

The activation energy at its optimum pH has been found to be 13.700 cal/mol. The enthalpy change was 13.300 cal/mol; the free energy at 25°C was 15 Kcal/mol and the entropy, close to zero.

Molecular weight as determined by Sephadex gel filtration was 110.000.

A comprehensive study has been carried-out to explain the reaction mechanism. It has found to be a Theorell-Chance's in which the driving substrate is NADH.

From the studies on the variations of the kinetic constants with pH, it is deduced that two ionizable groups, at least, participate on the catalytic activity. Its pK's were found to be 4.9 and 7.7.1 and are attributed respectively to a «non- α » carboxylic group and to the imidazol group of histidine.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Prof. Dr. don Justino Burgos González, Catedrático de Bioquímica y Tecnología de los Alimentos y al Prof. adjunto de esta asignatura Dr. don Roberto Martín Sarmiento por la dirección conjunta de esta tesis doctoral y por su orientación y enseñanzas recibidas durante mi permanencia en este laboratorio.

Al Prof. Dr. don Benito Moreno García, Catedrático de Bromatología, por su comprensión al liberarme con frecuencia de otras funciones que hubieran retrasado la escritura y presentación de esta tesis.

Asimismo agradezco la colaboración que me han prestado D.^a M.^a del Camino Ubón Marín, don Francisco Sala Trepal y don Angel Román Anastasio en la confección de las gráficas que aparecen en este trabajo.

A mis queridos compañeros de laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

- BARRITT, M. M. (1963): *J. Parh. and Bact.* **42**, 441.
 BETHUNE, J. L., WARTHURG, J. P. y VALLEE, B. L. (1963): Absts 145 th Meeting Am. Chem. Soc., 100 c.
 BRANEN, A. L. y KEENAN, T. W. (1970): *Can. J. Microbiol.*, **16**, 947.
 BRYN, K., HETLAND, O. y STORMER, F. (1971): *Eur. J. Biochem.*, **18**, 166.
 BURGOS, J. y MARTÍN, R. (1970): X Reunión de la S.E.B.
 BURGOS, J. y MARTÍN, R. (1972): *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 261.
 CLELAND, W. W. (1963 a): *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104.
 CLELAND, W. W. (1963 b): *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 188.
 CHANCE, B. y REDFEARN, E. R. (1961): *Biochem. J.* **80**, 632.
 CHUANG, L. F. y COLLINS, E. B. (1968): *J. Bact.*, **95**, 2083.
 DALZIEL, K. (1963): *J. Biol. Chem.*, **238**, 2850.
 DAWSON, J. y HULLIN, R. P. (1954 a): *Biochem. J.* **57**, 177.
 DAWSON, J. y HULLIN, R. P. (1954 b): *Biochem. J.* **57**, 180.
 DAWSON, R. M. C., ELLIOTT, D. C., ELLIOTT, W. H. y JONES, K. M. (1962): *Data for Biochemical Research*. Oxford University Press London, 1.^a ed., pág. 157.
 DAWSON, R. M. C., ELLIOTT, D. C., ELLIOTT, W. H. y JONES, K. M. (1969): *Data for Biochemical Research*. Oxford University Press, London, 2.^a ed., págs. 423-434.
 DE LEY, J. (1959): *J. Gen. Microbiol.* **21**, 352.
 DE MAN, J. C. (1959): *Rec. Trav. Chim.* **78**, 480.
 DIXON, M. (1953): *Biochem. J.*, **55**, 161.
 DIXON, M. y WEBB, E. C. (1964): *Enzymes*. Longmans, London, 2.^a ed., págs. 137 y 138.
 DOISY, E. A. y WESTERFELD, W. W. (1943): *J. Biol. Chem.* **149**, 229.
 FISCHER, E. H. y STEIN, E. A. (1960): «Amylases», en *The Enzymes* (P. D. Boyer, M. Lardy y K. Myrbäck, eds.) Academic Press, New York, **4**, 324.
 FLOHRI, J. R. y VESTLING, C. S. (1957): *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 575.
 FRATEUR, J. (1950): *Cellule* **53**, 287.
 GABRIEL, M. A., JABARA, H. y AL-KHALIDI, V. A. S. (1971): *Biochem. J.*, **124**, 793.
 GALE, E. F. (1948): Citado en HARVEY, R. J. y COLLINS, E. B. (1963). *J. Bact.* **86**, 1301.
 GLOCK, G. y McLEAN, P. (1955): *Biochem. J.*, **61**, 388.
 GREEN, D. E. (1952): *Science* **115**, 661.
 GREEN, D. E., STUMPF, P. K. y ZARUDNAYA, K. (1947): *J. Biol. Chem.*, **167**, 811.

- GREEN, D. E., WESTERFELD, W. W., VENNESLAND, B. y KNOX, W. E. (1942): *J. Biol. Chem.* **145**, 69.
 GREENBERG, L. A. (1943): *J. Biol. Chem.* **147**, 11.
 GUTERFUND, H. (1968): *Introducción al estudio de los enzimas*. Ediciones Omega, Barcelona. Págs. 73-74.
 HALDANE, J. B. S. (1930): *Enzymes*. Longmans, London, pág. 83.
 HANES, C. S. (1932): *Biochem. J.*, **26**, 1406.
 HARRISON, J. M. (1963): *Fed. Proc.*, **22**, 493.
 HARVEY, R. J. y COLLINS, E. B. (1963): *J. Bact.* **86**, 1301.
 HOLZER, H. y BEAUCAMP, K. (1961): *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 225.
 HOFSTEE, B. H. J. (1959): *Nature*, **184**, 1296.
 JOHNSON, J. M. (1941): *J. Biol. Chem.* **137**, 575.
 JUNI, E. (1952 a): *J. Biol. Chem.* **195**, 715.
 JUNI, E. (1952 b): *J. Biol. Chem.* **195**, 727.
 JUNI, E. (1961): *J. Biol. Chem.* **236**, 2302.
 JUNI, E. y HEYM, G. A. (1955): *J. Bacteriol.*, **71**, 425.
 JUNI, E. y HEYM, G. A. (1956): *J. Biol. Chem.* **218**, 365.
 JUNI, E. y HEYM, G. A. (1957): *J. Bacteriol.* **74**, 757.
 KELLIN, D. y HARTREE, E. F. (1938): *Proc. Roy. Soc. B.* **124**, 397.
 KELETI, T., GYORGYI, S., TELEDDI, M. y ZALUSKA, H. (1962): *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **22**, 11.
 KRAMPITZ, L. O., SUZUKI, I. y GRENLI, G. (1961): *Fed. Prot.* **20**, 971.
 KREBS, H. A. y PERKINS, J. R. (1970): *Biochem. J.*, **118**, 635.
 LEMOIGNE, M. y MONGUILLON, P. (1930): *Compt. Rend. Acad.*, **191**, 80.
 LINNEVEAVER, H. y BURK, D. (1934): *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658.
 MAGEE, P. T. y DE ROBICHON-SZILMAISTER, H. (1968): *Eur. J. Biochem.* **3**, 507.
 MAHLER, H. R. y CORDES, E. H. (1971): *Química Biológica*. Ediciones Omega, Barcelona. Pág. 254.
 MARTÍN, R. (1971): *An. Fac. Vet. León*, **17**, 127.
 MARTÍN, R. y BURGOS, J. (1970): *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 356.
 MARTÍN, R. y BURGOS, J. (1972): *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 13.
 MICHAELIAN, M. B. y HAMMER, B. W. (1973): *Iowa Agr. Expt. Sta. Bull.* **167**, 205.
 MORTON, R. K. (1957): *Biochem. J.*, **65**, 674.
 OWADES y JAKOVAC, J. A. (1963): *Mod. Brew. Age*, **67**, 63.
 OWADES, J. L., MARESKA, L. y RUBIN, G. (1959): *Amer. Soc. Brew. Chem. Proc.* **22**.
 PACK, M. Y., SANDINE, W. E., ELLIKER, P. R., DAY, E. A. y LINDSAY, R. C. (1964): *J. Dairy Sci.* **47**, 981.
 PORTNO, E. D. (1966): *J. Inst. Brew.* **72**, 193.
 SCHMALFUSS, H. (1930): *Z. Physiol. Chem.*, **188**, 279.
 SCHMALFUSS, H., HINSCH, W. y SCHMALFUSS, H. (1934): *Z. Physiol. Chem.*, **227**, 247.
 SCHMALFUSS, H., SCHAAKE, H. y BARTHMEYER, H. (1931): *Z. Physiol. Chem.*, **200**, 169.
 SCHWEET, R. S., FULD, M., CHESLOCK, K. Y., y PAUL, M. H. (1951): En «Phosphorus metabolism» (MacElroy, W. D. y Glass, B., eds.). Johns Hopkins Press, Baltimore, vol. I, pág. 246.
 SEBECK, O. K. y RANDLESS, C. I. (1952): *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 373.
 SEITZ, E. W., SANDINE, W. E., ELLIKER, P. R. y DAY, E. A. (1963 a): *Can. Jour. Microbiol.* **9**, 431.
 SEITZ, E. W., SANDINE, W. E., ELLIKER, P. R. y DAY, E. A. (1963 b): *J. Dairy Sci.*, **46**, 186.
 SINGER, T. P. y PENSKY, J. (1952): *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 316.
 SIZER, I. W. (1943): *Adv. in Enzym.*, **3**, 35.
 SPECKMAN, R. A. (1969): Comunicación personal.
 SPECKMAN, R. A. y COLLINS, E. B. (1968): *J. Bacteriol.* **95**, 174.
 STRECKER, H. J. y HARARY, I. (1954): *J. Biol. Chem.*, **211**, 263.
 SUOMALAINEN, H. y RONKAINEN, P. (1968): *Nature*, **220**, 792.
 VALLEE, B. L. y HOCH, F. L. (1955): *Proc. Natl. Acad. Sci.* **41**, 327.
 VALLEE, B. L. y HOCH, F. L. (1957): *J. Biol. Chem.* **225**, 185.
 VALLEE, B. L. y WACKER, W. E. C. (1956): *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1771.
 WARBURG, O. y CHRISTIAN, W. (1941): *Biochem. Zeitschrift*, **310**, 384.
 WARTHURG, J. P. y VALLEE, B. L. (1963): Absts. 145 th Meeting Am. Chem. Soc., 100 c.
 WEBB, J. L. (1963): *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Academic Press, N. Y., vol. I, pág. 90.
 WESTERFELD, W. W. (1945): *J. Biol. Chem.* **161**, 495.
 WESTERFELD, W. W. y BERG, R. L. (1943): *J. Biol. Chem.*, **148**, 523.
 WHITAKER, J. R. (1972): *Principles of enzymology for the food sciences*. Marcel Dekker Inc., N. Y., pág. 336.
 WINER, A. D. y SCHWERT, G. W. (1958): *J. Biol. Chem.*, **231**, 1065.