

**«DIACETILO REDUCTASA DE TEJIDOS ANIMALES;
PURIFICACION Y ESTUDIOS CINETICOS DE LA
PROCEDENTE DE HIGADO BOVINO»**

por Roberto Martín Sarmiento

INDICE

I. INTRODUCCION.—I.1.—Metabolismo del diacetilo y la acetoína. 1.—Síntesis biológica del diacetilo y la acetoína. Precursores. Síntesis de acetoína y diacetilo vía acetatolactato. Síntesis vía condensación de acetaldehído libre-acetaldehído activado. Síntesis vía condensación de acetaldehído activado y acetil CoA.—2. Utilización biológica de la acetoína y el diacetilo.—3. Papel biológico de la síntesis de acetoína y diacetilo.—I.2. El diacetilo como componente del aroma natural de la leche y productos lácteos.—I.3. El diacetilo como componente perjudicial del aroma de otros alimentos.—I.4. Métodos de determinación de acetoína y diacetilo.—I.5. Diacetilo reductasa.—II. MATERIAL, METODOS Y PRODUCTOS (GENERAL).—II.1. Material y reactivos.—Procedencia de los productos químicos y bioquímicos utilizados. Agua desionizada y destilada. Pesadas. Determinaciones de pH. Homogeneizaciones tisulares y rupturas celulares. Centrifugaciones. Liofilizaciones. Diálisis. Columnas cromatográficas. Determinaciones espectrofotométricas y colorimétricas. Determinaciones manométricas.—II.2. Métodos.—I. Purificación de la acetoína.—2. Determinaciones de proteína.—Método del biuret. Digestión ácida y neslerización. Extinción a 280 - 260 m μ .—3. Determinaciones de diacetilo. Método de Owades y Jakovac.—4. Método de Westerfeld para la determinación de la suma de acetoína y diacetilo.—5. Determinaciones de actividad diacetilo reductasa.—III. DETERMINACION COLORIMETRICA DE ACETOINA Y DIACETILO.—III.1. Introducción.—III.2. Métodos.—III.3. Resultados.—1. Estudio comparativo de los métodos de Owades y Jakovac y de White y col. para la determinación de diacetilo. Método de White y col. a) Obtención de una gráfica patrón. b) Reproductibilidad de las determinaciones. Método de Owades y Jakovac. a) Obtención de la gráfica patrón. b) Reproductibilidad de las determinaciones. c) Recuperación del diacetilo tras la destilación. d) Influencia de la acetoína en las determinaciones de diacetilo.—2. Determinación de la suma de acetoína y diacetilo. Método de Westerfeld. Reproductibilidad de las determinaciones. Curso temporal de la reacción. Influencia de la temperatura de incubación sobre las determinaciones. Influencia de la concentración de creatina, α -naftol y sosa.—3. Determinación de acetoína y diacetilo en mezclas de ambos compuestos. Determinación de diacetilo por el método de Owades y Jakovac y acetoína descontando los valores

correspondientes al diacetilo de los obtenidos por la técnica de Westerfeld. Separación del diacetilo por destilación en corriente de nitrógeno y determinación de diacetilo en los destilados y acetoína en los residuos.—III.4. Discusión.—IV. PURIFICACION Y PESO MOLECULAR DE LA DIACETILO REDUCTASA DE HIGADO DE TERNERA.—IV.1. Introducción.—IV.2. Material y métodos.—IV.3. Resultados.—1. Experiencias previas. Actividad diacetilo reductasa en órganos y tejidos de diversas especies animales. Estabilidad de la actividad diacetilo reductasa en los extractos acuosos de hígado de ternera.—2. Purificación: estudios preliminares. Extracción con acetona. Precipitación de las proteínas por acidificación con ácido acético. Precipitación por acidificación con ácido clorhídrico. Precipitación con sulfato de protamina. Precipitación con acetona. Precipitación con sulfato amónico. Fraccionamiento por adsorción en gel de fosfato cálcico. Cromatografías de intercambio iónico en DEAE-celulosa. Cromatografías de filtración molecular en Sephadex G-100. Determinación del peso molecular de la diacetilo reductasa.—3. Método de purificación.—IV.4. Discusión.—V. NATURALEZA DE LA REACCION CATALIZADA: ESTEQUIOMETRIA, ESPECIFICIDAD DE SUBSTRATOS Y NECESIDAD DE CO-FACTORES.—V.1. Introducción.—V.2. Material y métodos.—V.3. Resultados.—1. Estequometría. Experiencias previas. Reducción del diacetilo, oxidación del NADH y producción de acetoína. Reversibilidad.—2. Especificidad de substratos.—3. Participación de cofactores. Influencia de diversos quelantes sobre la actividad diacetilo reductasa. Efectos de la diálsis.—V.4. Discusión.—VI. DISTRIBUCION INTRACELULAR.—VI.1. Introducción.—VI.2. Material y métodos.—VI.3. Resultados.—1. Distribución intracelular de la actividad diacetilo reductasa en el hígado de ternera.—2. Experiencias con hígado de paloma. Comprobación de la aplicabilidad del método de fraccionamiento descrito por Mahler y Cordes, para la obtención de fracciones subcelulares de hígado de paloma. Distribución intracelular de la actividad diacetilo reductasa en el hígado de paloma.—VI.4. Discusión.—VII. ESTUDIOS CINETICOS.—VII.1. Introducción.—VII.2. Métodos.—VII.3. Resultados.—1. Experiencias previas.—Estabilidad de las preparaciones enzimáticas.—2. Influencia de la concentración de enzima sobre la actividad diacetilo reductasa.—3. Influencia del pH sobre la actividad.—4. Efectos de la temperatura sobre la actividad. Cálculo de la constante de activación de la reacción y del coeficiente de temperatura.—5. Influencia de la concentración de diacetilo y NADH. Cálculo de las constantes de equilibrio de la reacción.—6. Inhibición por los productos. Inhibición por el NAD.—Inhibición por la acetoína. Inhibición por la acetoína en presencia de NAD.—VII.4. Discusión.—VIII. DISCUSION GENERAL.—CONCLUSIONES.—BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO I

INTRODUCCION

El metabolismo del diacetilo (2,3 butanodiona) y la acetoína (acetilmethylcarbinol, AMC) constituye un campo de interés común para los bioquímicos y los tecnólogos de los alimentos. Su importancia bioquímica radica fundamentalmente en la complejidad de su ruta biosintética, que presenta gran variedad de mecanismos y ramificaciones posibles, y en la aparente discrepancia de la misma con las directrices generales del metabolismo de los hidratos de carbono, del que forma parte en el sentido más

amplio. Esta característica podría hacer pensar en una ruta sin sentido biológico si no tuviese una difusión tan amplia entre las bacterias, levaduras y tejidos animales y vegetales.

Su interés tecnológico deriva de la naturaleza fuertemente aromática del diacetilo y de sus repercusiones, beneficiosas en algunos casos y perjudiciales en otros, sobre el *bouquet* de la leche y de ciertos productos fermentados y zumos de frutas.

I.1. METABOLISMO DEL DIACETILO Y LA ACETOINA.

Existe todavía gran confusionismo acerca de los mecanismos de formación y utilización del acetilmethylcarbinol y diacetilo, en especial de este último, debido tanto a la escasez de métodos de análisis adecuados como a la complejidad de las rutas metabólicas implicadas. La mayor parte de la información disponible al respecto deriva de estudios relacionados con la biosíntesis de acetoína, cuyas diversas etapas están, hasta cierto punto, bien dilucidadas. Sin embargo, los conocimientos actuales referentes a la producción de diacetilo, a la utilización de éste y de la acetoína y al papel que ambos desempeñan en los sistemas biológicos, presentan numerosos puntos oscuros. En las páginas siguientes se recogen los aspectos más interesantes de las investigaciones realizadas hasta el momento en este campo.

I. 1.1. SÍNTESIS BIOLÓGICA DEL DIACETILO Y LA ACETOINA

Se ha demostrado que existen, por lo menos, tres vías diferentes de síntesis de acetoína, una de las cuales, y tal vez las tres, conduce también a la producción de diacetilo. La primera de ellas fue descrita por JUNI (1952, a) en *Aerobacter aerogenes* y ha venido siendo considerada como el mecanismo general de formación de acetoína por las bacterias. El mismo autor (JUNI, 1952, b) puso de manifiesto la existencia de otra vía en la levadura de la cerveza y en extractos tisulares de corazón de cerdo, por lo que se ha generalizado su designación de ruta de síntesis en las levaduras y tejidos animales.

La distinción entre dos mecanismos biosintéticos distintos, uno para bacterias y otro para levaduras y tejidos animales, no será utilizada aquí por considerar que desaconsejan su empleo la demostración de la existencia de numerosas excepciones a este planteamiento: bacterias y levaduras que utilizan ambas rutas o la que corresponde al otro grupo (LEWIS y

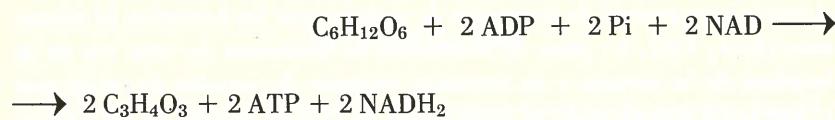
WEINHOUSE, 1958; DE LEY, 1959; SEITZ y col, 1963 a; CHUANG y COLLINS, 1968) y la reciente descripción por SPECKMAN y COLLINS (1968, b) de una nueva ruta común a ambos tipos de microorganismos.

1.1.1. *Precursors.*

La mayor parte de los microorganismos que sintetizan acetona son capaces de producirla en medios de cultivo que contienen glucosa como única fuente de hidratos de carbono, por lo que se postuló que el acetilmethylcarbinol y el diacetilo proceden de las hexosas. Esta hipótesis fue puesta en duda al observarse que diversos microorganismos que no sintetizan AMC a partir de los azúcares, sí lo hacen al añadir al medio citrato, piruvato o lactato, y que, en algunos casos, la síntesis de AMC en presencia de estos substratos puede suceder incluso en ausencia de hidratos de carbono (DE LEY, 1959; BUSSE y KANDLER, 1961; HARVEY y COLLINS, 1963).

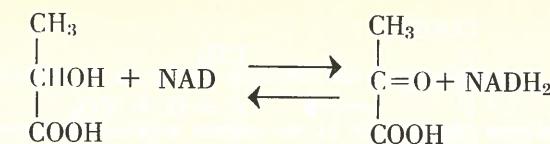
Durante algún tiempo ha sido frecuente considerar precursor al citrato, dado que su adición a los cultivos estimula la formación de diacetilo y acetona. Sin embargo las investigaciones de JUNI (1952 a y b) y posteriormente las de SPECKMAN y COLLINS (1968 b) han puesto de manifiesto que tanto la acetona como el diacetilo proceden, en todas las rutas biosintéticas conocidas, del ácido pirúvico, un compuesto que ocupa una posición clave en el metabolismo de los hidratos de carbono, de los que se origina vía la glicolisis anaerobia a través de una serie de reacciones que pueden resumirse así:

(Ec. I.1)



Esto aclara la intervención de los azúcares en la síntesis de AMC y diacetilo y los efectos que sobre la misma tiene el ácido láctico, que puede ser oxidado a pirúvico mediante una reacción reversible catalizada por la lactato deshidrogenasa, un enzima ampliamente difundido entre las bacterias

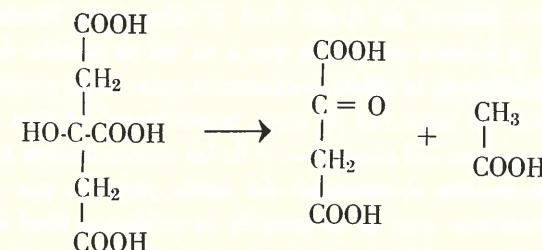
(Ec. I.2)



La participación del citrato y oxaloacetato, que ya había sido anteriormente intuida por VAN BEYNUM y PETTE (1939) fue dilucidada por DAGLEY y DAWES en 1953 como resultado de sus investigaciones sobre la utilización del citrato en *Aerobacter aerogenes*, posteriormente completadas en otros microorganismos por WHEAT y AJL (1955 a y b), CLARKE y MEADOW (1959) y HARVEY y COLLINS (1961, 62), entre otros.

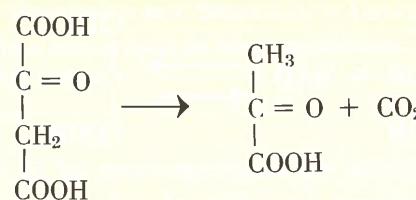
De sus estudios se deduce que el paso del citrato al interior de la célula es dependiente de la actuación de un sistema inductible de transporte (citrato permeasa) muy similar a la β -galactosido permeasa descrita en *E. coli* por RICKEMBERG y col (1956), que está regulado por la acumulación intracelular del citrato. Este citrato intracelular se disocia a oxaloacetato y acetato en una reacción catalizada por la citritasa (citrato: oxaloacetato-lisasa, E. C. 4. 1. 3. 6) y activada por los iones magnesio.

(Ec. I.3)



El ácido oxaloacético producido es descarboxilado por la oxaloacetato descarboxilasa (oxaloacetato: carboxi-lisasa, E. C. 4. 1. 1. 3) dando lugar a la producción de piruvato y anhídrido carbónico.

(Ec. I.4)



BUSSE y KANDLER (1961) han demostrado que la participación del piruvato en la síntesis de acetoina y diacetilo es independiente de que éste proceda del citrato o de los azúcares. Se ha sugerido (SEITZ y col, 1963a) que el ácido pirúvico procedente del citrato podría ser más eficaz en este sentido que el formado a partir de los hidratos de carbono, pero esta posibilidad, teóricamente difícil de sostener, no ha sido investigada hasta el momento. Por otra parte, HARVEY y COLLINS (1963) interpretaron sus resultados experimentales obtenidos con *S. diacetilactis* considerando que la producción de AMC y diacetilo, al menos en cantidades apreciables, requiere la existencia de un exceso de piruvato, entendiéndose por exceso más del que puede ser metabolizado por las demás rutas de utilización del ácido pirúvico.

Estos datos permiten explicar los efectos sobre la formación de diacetilo y acetilmethylcarbinol de los distintos compuestos que han sido formulados como precursores: dependen de su capacidad de producir más ácido pirúvico del que se utiliza en la producción de etanol, acetato, lactato, propionato, síntesis de Acetyl CoA y otras rutas biosintéticas importantes para la síntesis celular, lo que a su vez es función de las características metabólicas de la célula —existencia o no de las correspondientes permeasas, grado de actividad de éstas, importancia relativa de las diferentes vías de consumo del piruvato— y de las circunstancias ambientales: aerobiosis, que facilita el consumo del ácido pirúvico por el ciclo de KREBS, o anaerobiosis, que, al no permitir la oxidación final de los intermediarios del mismo, dificulta el funcionamiento de este ciclo; fase de crecimiento, con el consiguiente empleo de buena parte del piruvato para la síntesis celular, o vegetativa; acidez o alcalinidad del medio, etc.

El piruvato parece ser el único precursor directo de la síntesis de AMC y diacetilo, al menos en las levaduras y en la mayor parte de las bacterias. Se ha descrito (SINGER y PENSKY, 1952) que en el germen de trigo

puede ser substituido como tal por el acetaldehído, pero mucho menos eficazmente.

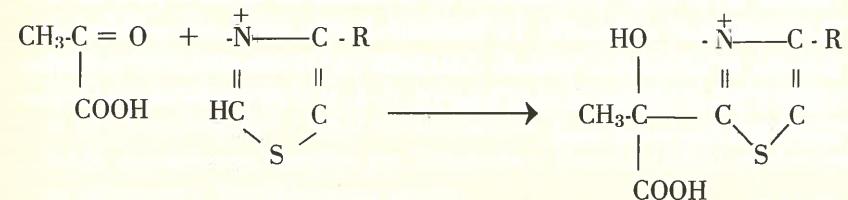
1.1.2. Síntesis de acetoina y diacetilo vía acetatolactato

Los primeros trabajos acerca de la síntesis de acetilmethyl-carbinol mediante la formación de ácido α -acetoláctico como compuesto intermedio, fueron realizados en 1947 por WATT y KRAMPITZ, que sugirieron que el acetatolactato procedía de la condensación de acetaldehído y ácido pirúvico. Las investigaciones posteriores, especialmente las de JUNI (1952, a), confirmaron parcialmente esta hipótesis, mostrando que la producción de acetoina y diacetilo se efectúa en dos etapas: a) producción de acetato-lactato a partir del piruvato, y b) descarboxilación de éste para dar lugar a diacetilo y AMC.

La primera de estas etapas está catalizada por el sistema piruvato oxidasa y requiere la presencia de pirofosfato de tiamina —difosfotiamina, TPP, DPT, o cocarboxilasa—, siendo activada por iones magnesio. La reacción transcurre del siguiente modo:

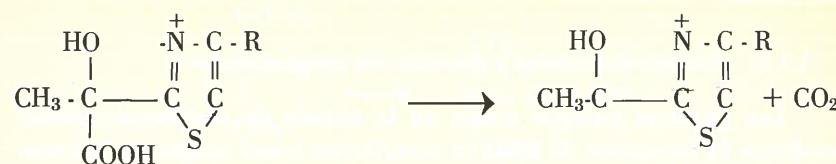
Bajo la acción de la piruvato oxidasa, una molécula de ácido pirúvico forma un primer intermediario uniéndose al carbono 2 del anillo tiazólico del pirofosfato de tiamina, que es muy reactivo (HOLZER y BEAUCAMP, 1961; KRAMPITZ y col, 1961).

(Ec. I.5)



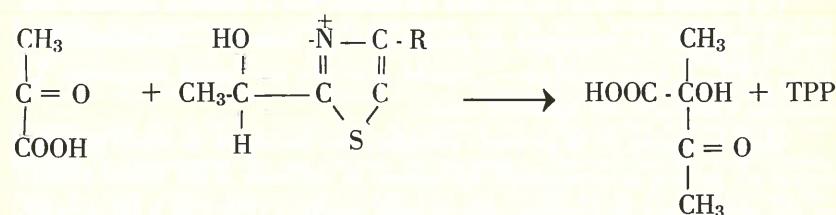
Este compuesto - piruvato activado o α - lactil - 2 - TPP - es muy inestable, por lo que sufre una rápida descarboxilación con formación de acetaldehído activado - α - hidroxietil - 2 - TPP - y liberación de anhídrido carbónico.

(Ec. I.6)



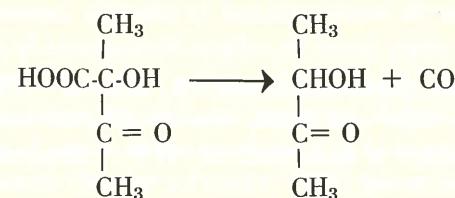
Una molécula de acetaldehido activado se condensa con otra de piruvato preeexistente. El grupo acetaldehido se transfiere al piruvato, con lo que se libera de TPP dando lugar a la producción de ácido α -acetoláctico.

(Ec. I.7)



La segunda etapa es la descarboxilación del acetatolactato —que también actúa como intermediario en la síntesis de valina— para dar acetilmethylcarbinol y diacetilo. La descarboxilación del ácido acetoláctico a acetona es enzimática, estando catalizada por la acetatolactato descarboxilasa ó 2-acetolactato carboxi-liasa (E. C. 4. 1. 1. 5) y activada por la presencia de iones manganeso.

(Ec. I.8)

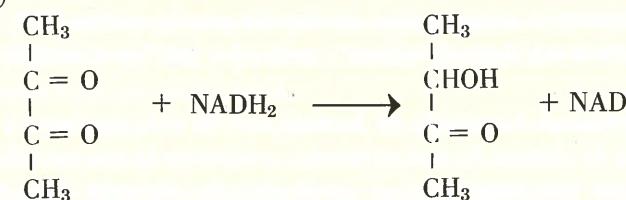


La mayor parte de los investigadores admiten que, en presencia de iones de hierro, cobre o aluminio (DE MAN, 1959), a partir del ácido acetoláctico se produce espontáneamente diacetilo por un proceso no conocido que se describe como una descarboxilación oxidativa. COLLINS y su escuela han investigado este problema en diversas especies de bacterias y levaduras, concluyendo que el diacetilo no procede del acetatolactato en ninguno de los microorganismos por ellos estudiados (SPECKMAN y COLLINS, 1968 b; CHUANG y COLLINS, 1968) y atribuyendo las afirmaciones en sentido contrario de otros investigadores a dificultades en los métodos de determinación. Sin embargo SUOMALAINEN y RONKAINEN (1968) han comprobado utilizando técnicas de cromatografía gaseosa, que hasta el momento son las más resolutivas, la conversión espontánea del ácido acetoláctico y su éster etílico en diacetilo, incluso en atmósfera de nitrógeno. Según ambos autores, la reacción es más rápida a medida que aumenta la temperatura y se ve favorecida por la existencia de un pH ligeramente ácido, condición ésta que coincide con observaciones anteriores de que un cierto incremento de la ácidez estimula la síntesis de diacetilo en los medios de cultivo.

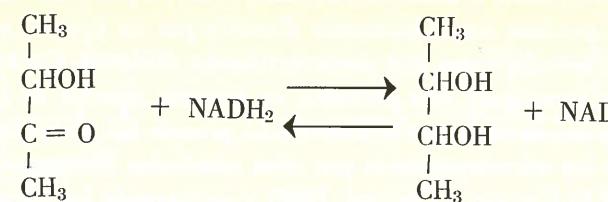
Se ha postulado también la formación de diacetilo por oxidación de la acetona, pero MICHAELIAN y HAMMER (1939) han explorado esta posibilidad en diversos cultivos lácteos y bajo una gran variedad de condiciones experimentales, demostrando que la producción de diacetilo no tiene lugar en ellos por esta vía. Por otra parte, PORTNO (1966) puso claramente de manifiesto que tampoco es así como se origina en las levaduras.

Sea cual fuere su origen, el diacetilo puede reducirse enzimáticamente a AMC (Ec. I.9) y éste a butilénglico (Ec. I.10) en reacciones que están catalizadas respectivamente por la diacetilo reductasa (acetoina: NAD oxidoreductasa, E. C. 1. 1. 1. 5) y por la butilénglico deshidrogenasa (2 - 3 butilénglico : NAD oxidoreductasa, E. C. 1. 1. 1. 4), dos enzimas NAD- dependientes descritas por STRECKER y HARARY (1954) en *Aerobacter aerogenes* y *Staphylococcus aureus*.

(Ec. I. 9)



(Ec. I. 10)



La segunda reacción es reversible, como han demostrado los trabajos de STRECKER y HARARY y posteriormente los de SEITZ y col. (1963 a). Con respecto a la primera, la demostración de que el diacetilo no se produce a partir de la acetoina, implica su irreversibilidad en las condiciones fisiológicas; aunque SEBECK y RANDLESS (1952) han descrito, en especies del género *Pseudomonas* crecidas en presencia de butilénglicol, la oxidación de éste a acetoina y diacetilo, otros investigadores han puesto de manifiesto en diversas bacterias y levaduras que la reducción del diacetilo a AMC por la diacetilo reductasa es, a efectos prácticos, irreversible (SEITZ y col., 1963 a; SOUMALAINEN y LINNAHALME, 1966), aún a concentraciones muy elevadas de acetoina y NAD (STRECKER y HARARY, 1954).

Es evidente que el conocimiento de los mecanismos de síntesis de diacetilo por esta ruta es todavía insuficiente y precisa nuevos estudios.

1.1.3. Síntesis vía condensación de acetaldehído activado y acetaldehído libre

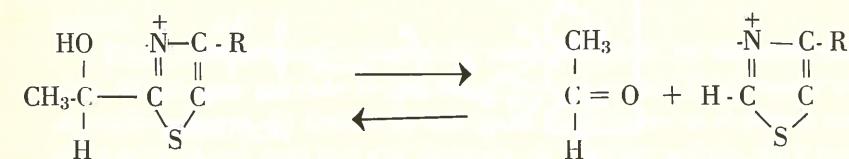
La síntesis de acetoina por condensación de acetaldehído activado y acetaldehído libre fue puesta de manifiesto por JUNI (1952, b) en levaduras y tejidos animales, comprobándose posteriormente que esta ruta también opera en algunos tejidos vegetales (SINGER y PENSKY, 1952) y bacterias [*Pseudomonas* (DE LEY, 1959); *S. diacetilactis* 18 - 16 (SEITZ y col., 1963 a); *E. coli* (CHUANG y COLLINS, 1968)]. La producción de AMC por este mecanismo tiene lugar en una sola etapa como resultado de una serie de reacciones concatenadas catalizadas por un enzima TPP - dependiente, la piruvato descarboxilasa, y activadas por iones metálicos divalentes.

Las primeras reacciones de la serie son en todo similares a las que conducen a la síntesis de acetoláctato, excepto en lo que se refiere a los enzimas que las catalizan: en presencia de piruvato descarboxilasa

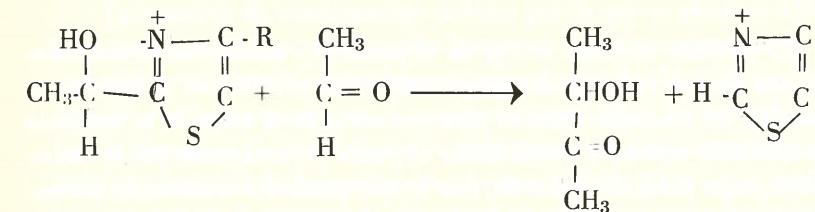
(α -carboxilasa ó 2 - oxoácido carboxilasa, E. C. 4. 1. 1. 1.) el ácido pirúvico se une por su carbono α al carbono 2 del anillo tiazólico del pirofosfato de tiamina (Ec. I. 5, pág. 133) dando lugar a la formación de un compuesto muy lúbil, el piruvato activado ó α -lactil - 2 - TPP. El piruvato activado se descarboxila, transformándose en acetaldehído activado, que es estable (Ec. I. 6, pág. 134).

A partir de este punto, la síntesis de ácido acetoláctico por el sistema piruvato oxidasa y la de acetoina por la α -carboxilasa difieren notablemente. Las α -carboxilasas catalizan la liberación reversible de acetaldehído a partir del acetaldehído activado (Ec. I. 11) y la condensación acilóica del aldehído acético libre y el ligado al pirofosfato de tiamina para dar lugar a acetilmethylcarbinol. (Ec. I. 12).

(Ec. I. 11)



(Ec. I. 12)



JUNI (1961) ha estudiado la formación de acetoina por preparaciones purificadas de piruvato descarboxilasa procedentes de levadura de panadería, estableciendo los siguientes hechos experimentales:

(I) La formación de acetoina por estas preparaciones enzimáticas requiere la presencia de TPP y piruvato. No hay producción si el ácido pirúvico se sustituye por acetaldehído.

(II) En presencia de TPP y piruvato, la adición a la mezcla de reacción de cantidades crecientes de acetaldehído, hasta obtener concentraciones superiores a 0,02 M, no afecta de un modo significativo a la síntesis

de AMC, pero inhibe la descarboxilación del piruvato no competitivamente.

Para explicar estos resultados, JUNI propone un mecanismo de dos puntos para la α -carboxilasa de las levaduras, que se representa esquemáticamente en la figura 1.

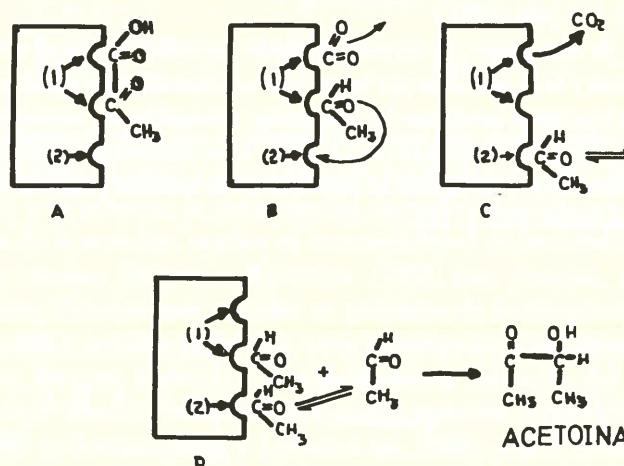


Figura 1.—Esquema de un mecanismo de dos puntos para la α -carboxilasa (Juni, 1961).

El piruvato activado se fija en el punto (1) estableciendo dos enlaces, uno por el carbono del grupo carboxilo y otro por el carbono α (paso A). Al descarboxilarse el piruvato activado el resto de la molécula (acetaldehido activado) queda unido al punto (1) solamente por el carbono del grupo aldehído (paso B), con lo que puede ser transferido irreversiblemente al punto (2) (paso C) donde se disocia reversiblemente a acetaldehido libre. La producción de acetona se debe a la condensación del acetaldehido libre con el acetaldehido-TPP que está ligado en el punto (1) y no con el unido al punto (2).

Este esquema parece suficiente para comprender la incapacidad de sintetizar acetona a partir del acetaldehido y el efecto inhibidor de éste en la descarboxilación del piruvato: (A) No se produce AMC con acetaldehido libre y pirofosfato de tiamina como precursores porque, aún cuando se forma acetaldehido-TPP en el punto (2), éste no puede ser transferido al punto (1), que es el único capaz de realizar la condensación. (B) Por otra parte, la presencia en el medio de reacción del aldehido acético libre

provoca el bloqueo parcial del punto (2) por acumulación en éste de acetaldehido-TPP, lo que dificulta el tránsito desde el punto (1). Como al estar ocupado éste no puede fijarse en él una nueva molécula de piruvato, el entorpecimiento en la transferencia de (1) a (2) origina un descenso en la velocidad de fijación del ácido pirúvico y de su descarboxilación.

Es preciso destacar que esta explicación de la inhibición por el aldehido acético sólo es válida si se admite que el punto (1) no está saturado de acetaldehido-TPP, porque si lo estuviese la adición de más aldehido acético no podría crear una acumulación superior a la preexistente. Sin embargo el propio JUNI ha demostrado que, a concentraciones de acetaldehido a las que el efecto inhibidor de la descarboxilación está aún lejos de su máximo, la síntesis de acetona ha alcanzado ya la velocidad más alta posible, lo que supone que la concentración de los substratos en los puntos de reacción es suficiente para saturar todas las moléculas del enzima.

Estas consideraciones resultarán más inteligibles en términos cinéticos. El piruvato activado se descarboxila en el punto (1) liberando acetaldehido activado. El destino de éste queda ya decidido en el primer punto: si se condensa aquí con una molécula de aldehido acético, dará lugar a la formación de acetona; de lo contrario, será rápidamente transferido al punto (2) y finalmente pasará a acetaldehido y TPP.

La reacción de condensación acílica por la que se produce AMC debería ser, en este caso, mucho más lenta que la de transferencia (si fuese más rápida se lograría antes el exceso para el paso de (1) a (2) que para la síntesis), lo que supone que, a concentraciones bajas de acetaldehido libre, la formación de éste debe ser cuantitativamente más importante. A medida que aumenta la concentración de acetaldehido libre en el medio, lo hace también la formación de acetona hasta alcanzar una velocidad constante y disminuye la producción de acetaldehido, que incluso llega a anularse totalmente cuando la concentración en el medio es suficientemente alta. En este momento el piruvato se usa únicamente para la formación de AMC y la adición de más aldehido acético ya no debe afectar a la descarboxilación, cuya inhibición es solamente un efecto secundario de la que sufre la síntesis de acetaldehido.

El mecanismo que se ha descrito conduce a la formación de acetaldehido y acetona, pero no a la de diacetilo. Puesto que no parece que el AMC pueda oxidarse espontáneamente, la síntesis de diacetilo por esta ruta tendría que realizarse mediante el funcionamiento de la diacetilo re-

ductasa en el sentido acetoina-diacetilo, lo que no parece probable (véase página 136).

CHUANG y COLLINS (1968) estudiaron la producción de AMC y diacetilo en *E. coli* y tres estirpes de *Sch. cerevisiae*, en las que opera la vía de condensación de acetaldehído libre y activado. *E. coli* y dos de las tres estirpes de *Saccharomyces* no formaron diacetilo en cantidades detectables, pero la tercera sí lo hizo, pero utilizó la ruta condensación de acetaldehído-TPP y Acetil-CoA (véase apartado siguiente).

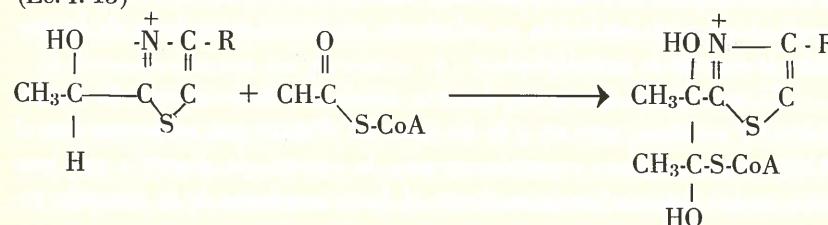
1.1.4. Síntesis vía condensación acetaldehído activado-acetil-CoA

SPECKMAN y COLLINS (1968, b), estudiando la formación de diacetilo y acetoina por *Streptococcus diacetilactis* y *Leuconostoc citrovorum*, observaron que los extractos celulares dializados producían a partir de piruvato y en presencia de pirofosfato de tiamina e iones magnesio, AMC, pero no diacetilo, mientras que los extractos no dializados sintetizaban cantidades considerables de ambas sustancias. Estos resultados y otros obtenidos en estudios realizados con acetilmethylcarbinol y piruvato marcados con carbono - 14 permitieron concluir que, en los microorganismos estudiados, la producción de acetoina y diacetilo sigue distintas rutas. El acetil-CoA parecía estar implicado en la síntesis de diacetilo, puesto que los extractos dializados lo producían si a la mezcla de reacción se añadía el citado coenzima, pero no en la de acetoina, a cuya síntesis no afectaba.

Posteriormente, experiencias con acetilcoenzima A marcado probaron que el diacetilo en *S. diacetilactis* y *L. citrovorum* procede de la condensación del acetaldehído activo, formado a partir del piruvato en presencia de TPP (ecuaciones I, 5 y I. 6, págs. 133 y 134) con acetil-CoA mediante un mecanismo para el que SPECKMAN y COLLINS proponen las siguientes etapas:

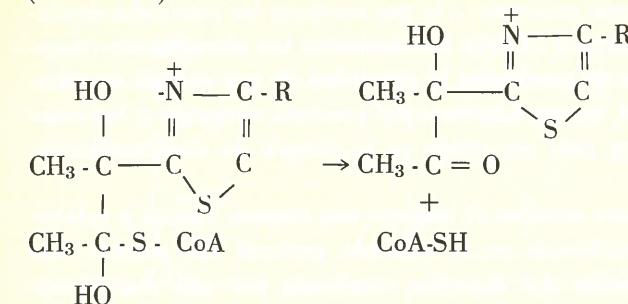
El acetaldehido - TPP se condensa con el acetil coenzima A, dando lugar a un complejo acetaldehido - TPP - acetil CoA.

(Ec. I, 13)



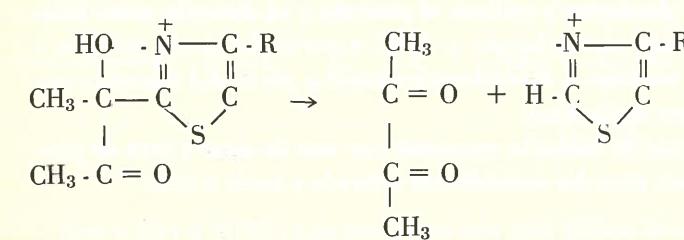
Del citado complejo se libera en una primera etapa coenzima A.

(Ec. I. 14)



y en una segunda etapa se disocian el diacetilo y el TPP.

(Ec. I. 15)



Esta ruta no conduce directamente a la formación de acetoina, pero puede producirla si opera en conjunción con la reducción enzimática del diacetilo, en presencia de NADH, por la diacetilo reductasa (ecuación I. 9, pág. 135).

Hasta el momento se tienen pocos datos acerca de la distribución de la citada vía, pero CHUANG y COLLINS (1968) han demostrado que se da tanto en bacterias como en levaduras.

I.1.2. UTILIZACIÓN BIOLÓGICA DE LA ACETOINA Y EL DIACETILO

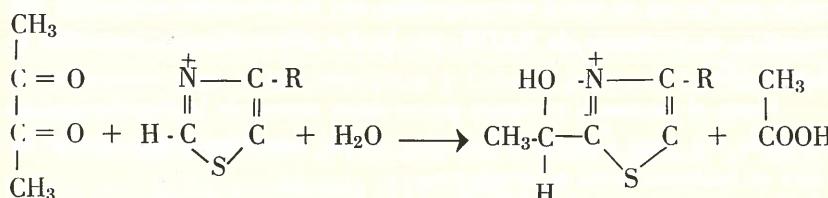
Un aspecto muy interesante del metabolismo del diacetilo y la acetoina es el que se refiere a su utilización en los sistemas biológicos, en algunos de los cuales se sitúan entre los principales productos de la fermentación de los azúcares. DE LEY (1959) ha demostrado que algunas estirpes de *Aerobacter racens*, *A. pastorianum* y *A. ascendens* cultivadas en un me-

dio que contenía lactato como principal fuente de carbono, convierten la mayor parte de este substrato en acetoína —hasta el 74 % del máximo teórico en los casos más extremos—, lo que confirma los resultados similares obtenidos por FRATEUR (1950). Rendimientos tan elevados son excepcionales, pero ponen de manifiesto la necesidad de que existan mecanismos que permitan el aprovechamiento del piruvato sustraído a las rutas metabólicas generales para ser usado en la síntesis de acetilmethylcarbinol y diacetilo.

Los conocimientos actuales al respecto son escasos. GREEN y colaboradores (1947) describieron en el músculo pectoral del palomo una reacción de dismutación del diacetilo, catalizada por una diacetil-mutasa TPP-dependiente, mediante la cual el diacetilo se disocia en acetoina y ácido acético. Posteriormente SCHWEET y col (1951) y JUNI y HEYM (1956) probaron que este enzima era idéntico a la piruvato oxidasa: ambos precisan pirofosfato de tiamina como cofactor, son activados por iones metálicos divalentes y utilizan el piruvato y el diacetilo como substratos, produciendo acetolactato y AMC a partir del ácido pirúvico y ácido acético y acetoina o diacetilmethylcarbinol a partir del diacetilo, mediante el siguiente mecanismo:

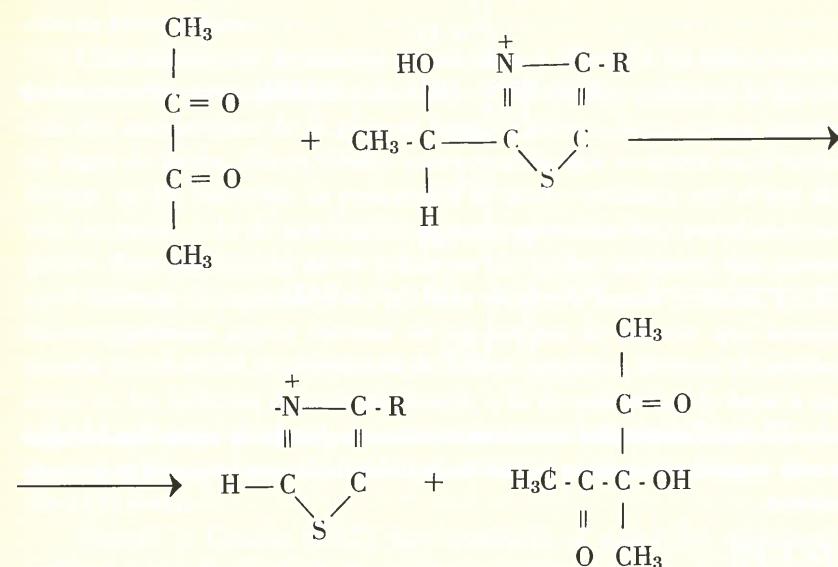
Una molécula de diacetilo reacciona con una de agua y otra de pirofosfato de tiamina, para dar acetaldehído activado y ácido acético.

(Ec. I. 16).



El acetaldehido - TPP puede seguir dos caminos: si la concentración de diacetilo es baja se disocia en TPP y aldehído acético libre, con el que se condensa dando lugar a la producción de acetoina (Ec. I. 12, pág. 137). Si la concentración de diacetilo es alta reacciona con éste, formándose un nuevo cetol —diacetilmethylcarbinol— y liberándose TPP (Ec. I. 17).

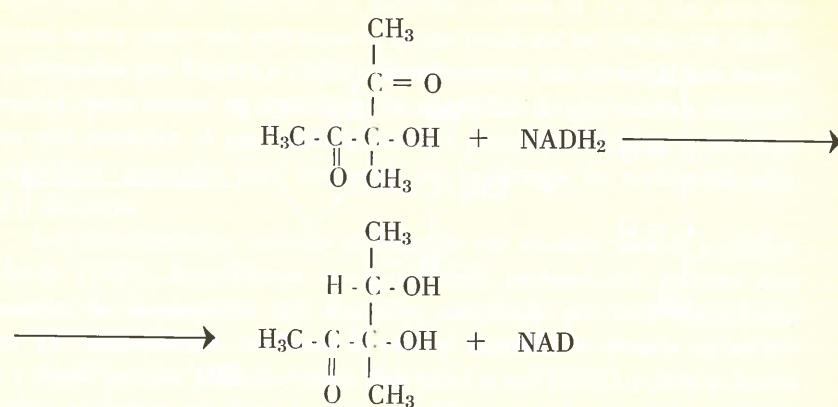
(Ec. I. 17)



JUNI y HEYM (1955) han propuesto una ruta cíclica de utilización de butilénglico, acetona y diacetilo como resultado de sus investigaciones en *Micrococcus ureae* y otros microorganismos que son capaces de crecer en medios que contienen 2-3 butanodiol y AMC como única fuente de energía. El funcionamiento de esta ruta requiere un cierto grado de aerobiosis, probablemente para reoxidar el difosfopiridinucleótido que se reduce en cada vuelta del ciclo, y su resultado final es la conversión de diacetilo, acetona y butanodiol en ácido acético, que puede incorporarse al ciclo de KREBS a través de la formación de acetaldehído y acetil-CoA.

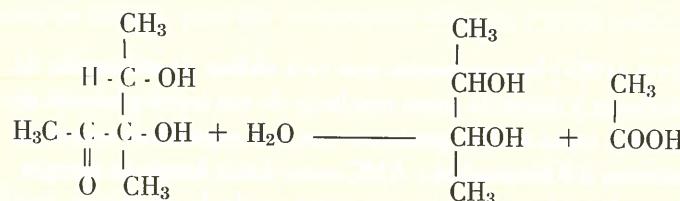
La vía propuesta por JUNI y HEYM implica la oxidación, acoplada a la reducción de NAD, del butilenglicol a acetona y de ésta a diacetilo, en reacciones catalizadas por la butilénglicol deshidrogenasa y la diacetilo reductasa respectivamente (Ec. I. 9, pág. 135 y Ec. I. 10, pág. 136), y la dismutación del diacetilo a diacetilmethylcarbinol con liberación de una primera molécula de acetato (Ec. I. 16, pág. 142 y Ec. I. 17). El diacetilmethylcarbinol es reducido a acetilbutanodiol, con la oxidación concomitante de NADH_2 .

(Ec. I. 18)



El acetilbutanodiol reacciona con una molécula de agua, dando lugar a una segunda de acetato y otra de butilenglicol, con lo que el ciclo recomienza.

(Ec. I. 19)



Esta ruta cíclica ofrecería interesantes posibilidades de utilización del diacetilo y la acetoina, si existiera en los sistemas biológicos algún procedimiento que permitiera la conversión de acetilmethylcarbinol en diacetilo, sin lo cual el ciclo no podría completarse. En la página 135 y siguientes se han tratado algunos aspectos de este tema, sobre el que volverá a insistirse en el apartado I. 5.

I.1.3. PAPEL BIOLÓGICO DE LA SÍNTESIS DE ACETOINA Y DIACETILO.

Otro aspecto que ha recibido poca atención en el metabolismo de la acetoina y el diacetilo es el que se refiere a su significado biológico. Es posible que desempeñen un papel secundario, pero resulta extremadamente

improbable que la síntesis de productos que pueden llegar a ser mayoritarios en determinadas fermentaciones y cuyas rutas metabólicas son tan variadas y difundidas en los reinos animal y vegetal, carezca de una función de cierto relieve.

Clásicamente, la formación de acetoina y diacetilo ha sido considerada como un mecanismo para controlar el pH externo mediante la desviación del metabolismo de la glucosa hacia la síntesis de productos neutros en lugar de ácidos (GALE, 1948), interpretación que se apoya en el hecho de que, en las bacterias, la producción de ácido, estimada por el test del rojo de metilo, y la de acetilmethylcarbinol, suelen presentar una correlación negativa. Esta explicación no es válida en los tejidos animales, que poseen otros sistemas de regulación del pH más eficaces y menos costosos. En los microorganismos podría tratarse de un sistema de recurso que actuase cuando la velocidad de formación de ácidos orgánicos durante el metabolismo de los hidratos de carbono excede a la de oxidación de éstos a anhídrido carbónico y agua, pero este supuesto no concuerda con el hecho de que, aunque en menor cantidad, también se produce acetoina y diacetilo a pH neutro.

HARVEY y COLLINS (1963) han estudiado el papel del acetilmethylcarbinol y el citrato en *S. diacetilactis*, concluyendo que la síntesis de AMC actúa como un mecanismo de detoxificación para retirar el piruvato intracelular en exceso. Su estirpe de *S. diacetilactis* crecía en medios con lactosa como fuente de hidratos de carbono, pero no producía diacetilo y acetoina más que añadiendo citrato al cultivo. Según HARVEY y COLLINS, la adición de citrato origina un incremento de piruvato en el interior de la célula, lo que se traduce en una aceleración de la síntesis celular; puesto que el ingreso del citrato no está regulado metabólicamente, llega un momento en que se crea un exceso de piruvato, el cual es utilizado en su totalidad para la formación de acetilmethylcarbinol y diacetilo.

Se acepta universalmente que la síntesis de AMC y diacetilo en cantidades apreciables requiere la acumulación intracelular de piruvato, pero la interpretación que HARVEY y COLLINS dan a sus experiencias es discutible: sólo demuestran que en sus condiciones experimentales la suma del citrato utilizado para la síntesis celular y la empleada para la producción de acetoina da cuenta de la totalidad del citrato consumido, pero no que las células produzcan acetoina únicamente cuando todas las demás posibles rutas de utilización del piruvato funcionan a concentración infinita de éste.

La producción de acetilmethylcarbinol y diacetilo por los microorganismos es un mecanismo propio de gérmenes capaces de crecer facultativamente en aerobiosis y en anerobiosis. Como es sabido, estos microorganismos en condiciones de aerobiosis reoxidan los cofactores, reducidos por los sistemas de producción de energía, por la cadena respiratoria con el resultado final de la transferencia al oxígeno del medio de los átomos de hidrógeno retirados y formación de agua. En anaerobiosis, las bajas tensiones de oxígeno dificultan el funcionamiento de la cadena respiratoria y estos microorganismos se ven obligados a buscar otros procedimientos de oxidación de los coenzimas que les son imprescindibles para que la combustión continúe, incluso a expensas de un peor aprovechamiento de las fuentes de energía; con este fin transforman, por ejemplo, el piruvato en lactato, con obtención de una molécula de NAD por otra de ácido pirúvico gastado, o el acetaldehído —que en aerobiosis se usa para la síntesis de acetil CoA— en etanol, con el mismo resultado.

El ácido láctico y el etanol no se pierden: quedan acumulados en el medio y pueden ser utilizados cuando la vuelta a las condiciones de aerobiosis permita el funcionamiento en sentido inverso de los enzimas responsables de su producción, con la consiguiente reposición de los substratos empleados. Sin embargo, las posibilidades de estos mecanismos de reoxidación de los piridín-nucleótidos no son ilimitadas, viéndose frenados por la propia acumulación de lactato y etanol respectivamente, lo que se refleja en un descenso de la capacidad de reoxidación de los coenzimas que dificulta la utilización del piruvato para la formación de acetil-CoA y el funcionamiento del ciclo de Krebs.

La síntesis de acetoina y diacetilo podría suponer un mecanismo similar que tendría mayor importancia a medida que el funcionamiento de las otras rutas de oxidación de los cofactores fueron perdiéndola. En un principio, el rápido consumo del piruvato hacia el ciclo de Krebs y las rutas del ácido láctico y acetaldehído-ethanol no permite una abundante producción de acetoina. Cuando la competencia de las otras vías se hace escasa y se acumula ácido pirúvico y acetaldehído, se crean unas condiciones muy favorables a la síntesis de acetilmethylcarbinol y diacetilo que, incluso, podría llegar a predominar sobre todas las demás rutas de utilización del piruvato. La reducción del diacetilo a AMC y de éste a butilénglico, con la correspondiente oxidación de NADH, suministra a los microorganismos el NAD necesario y cada vez más escaso. Si se reponen las condiciones de aerobiosis, el diacetilo, el butilénglico y la acetoina po-

drían pasar al ciclo de Krebs a través del ciclo del butanodiol, siempre que los microorganismos dispongan de algún procedimiento para oxidar la acetoina. Este planteamiento supone que la síntesis de AMC y diacetilo es un mecanismo utilizado por los anaerobios facultativos para reoxidar los piridín-nucleótidos que está regulado por la concentración de piruvato intracelular. DE LEY (1959) ha descrito en *Aerobacter aerogenes* cultivado en un medio con lactato como única fuente de energía que la aireación acelera la síntesis de acetoina, lo que parece poco acorde con la anterior interpretación; sin embargo este hecho no es, probablemente, más que el resultado del efecto activador de la aireación sobre la oxidación del lactato a piruvato catalizada por la lactato deshidrogenasa, que es un enzima dependiente del NAD.

I.2. EL DIACETILO COMO COMPONENTE DEL AROMA NATURAL DE LA LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS.

La importancia del diacetilo como componente del aroma de la leche y ciertos productos lácteos es bien conocida. Se encuentra en la leche fresca en proporciones en torno a 0,01 — 0,02 partes por millón (BENNETT y col. 1965; SCANLAN, 1967), contribuyendo a darle su olor característico. Es el elemento dominante en el aroma de las mantequillas (ALAIS, 1965) y uno de los principales responsables del *bouquet* típico de ciertos quesos, en particular de los de pasta fresca (ALAIS, 1965) y de los de tipo Cheddar (ERNSTROM, 1965). Su presencia en estos productos es consecuencia de las actividades metabólicas de ciertos microorganismos, especialmente *Leuconostoc citrovorum* y *S. diacetilactis*.

En la producción de ciertos tipos de queso y en la de mantequilla se busca siempre favorecer la síntesis de diacetilo durante la fase de maduración, sembrando la leche o nata con fermentos productores de diacetilo, procurando un pH ácido e incluso añadiendo compuesto que favorezcan su formación, como el ácido cítrico.

I.3. EL DIACETILO COMO COMPONENTE PERJUDICIAL DEL AROMA DE OTROS ALIMENTOS.

Si en unos alimentos el diacetilo es deseable como componente destacado de su «aroma» natural, en otros constituye un gran problema. La presencia del diacetilo en las cervezas que presentan la alteración del aroma conocida como «olor a mantequilla» fue demostrada ya en el año

1903 (CLAUSSEN, 1903), aunque no fue identificado éste como el causante directo de tal perturbación hasta mucho más adelante (WEST y col., 1952). El «olor a mantequilla» es en la actualidad un grave problema de la industria cervecera porque los nuevos métodos de producción del «wort», el ritmo acelerado de fabricación y la introducción de métodos de fermentación continua han creado condiciones favorables a la formación de diacetilo. Agrava la situación la marcada tendencia del mercado hacia el consumo de cervezas ligeras, de aroma más suave, ya que, al desaparecer el efecto enmascarante de otras sustancias aromáticas más fuertes, el «olor a mantequilla» se hace más perceptible.

Los productores de cerveza sólo han logrado éxitos parciales en el control de esta alteración del aroma y casi siempre a expensas de la eficacia de la producción. La formación de diacetilo en la cerveza se ha atribuido a gérmenes de los géneros *Pediococcus* (CLAUSSEN, 1903) y *Streptococcus* (SHIMWELL y KIRKPATRICK, 1939) y, más recientemente, al *Lactobacillus pastorianus*, una bacteria que se encuentra con frecuencia contaminando la cerveza durante la fase de maduración (BURGER y col., 1957). Sin embargo, el descubrimiento de que el propio *Saccharomyces cerevisiae* puede sintetizar diacetilo como subproducto de la fermentación del «wort» (BURGER y col., 1957; KATO y NISHIKAWA, 1960-61; CHUANG y COLLINS, 1968) descarta la posibilidad de resolver el problema mediante la puesta en práctica de medidas rigurosas encaminadas a impedir la contaminación microbiana durante el proceso productivo.

La prolongación del período de fermentación secundaria asegura una eliminación más completa del diacetilo, que es consumido lentamente por los propios microorganismos (PACK y col., 1964), pero la puesta en práctica de este procedimiento se refleja en un incremento considerable de los costes de producción. A veces se recurre también a resembrar la cerveza ya fermentada con levadura fresca, pero la autolisis de las levaduras puede producir otros aromas desfavorables en el producto acabado.

Se han ensayado otros métodos: basándose en que la valina inhibe la síntesis de diacetilo por *Saccharomyces cerevisiae*, PORTNO (1966) y LEWIS (1968) han propuesto evitar su producción añadiendo este aminoácido a los medios de fermentación. Tal procedimiento encarece el proceso y, por otra parte, no existen pruebas suficientes de que la inhibición por la valina sea un fenómeno universal, lo que supone que no puede descartarse la posibilidad de que los gérmenes contaminantes sintetizan diacetilo.

Las más recientes investigaciones en torno a la eliminación del «olor a mantequilla» en la cerveza van encaminadas al uso de preparaciones enzimáticas de origen microbiano capaces de reducir el diacetilo producido durante la fermentación a acetona, mediante una reacción acoplada a la oxidación del NADH (BAVISOTTO y col., 1964; TOLLS y col., 1970). THOMPSON y col., (1970) han demostrado la validez del procedimiento comprobando la desaparición de todo el diacetilo contenido en cervezas enriquecidas artificialmente en éste (0,45 p. p. m.), tras cuatro días de incubación a 5.º C. en presencia del enzima, difosfopiridin nucleótido reducido y un sistema adecuado para regenerarlo una vez oxidado. Los propios autores concluyen, sin embargo, que son necesarias nuevas investigaciones para establecer la aplicabilidad del método, dadas las dificultades encontradas para mantener la estabilidad del enzima en las condiciones de pH bajo y elevado contenido alcohólico propias de la cerveza.

Problemas similares se han descrito en algunos tipos de vinos y en ciertos zumos de frutas, en particular en concentrados congelados de cítricos (BIESEL y col., 1954; MURDOCK, 1964, 67, 68), lo que les confiere un interés muy directo para la Tecnología de los Alimentos de nuestro país. Existen muy pocos datos al respecto. FORNACHON y LLOYD (1965) y PILONE y col. (1966) han demostrado que diversas especies de bacterias lácticas son capaces de producir diacetilo en el vino, sin que pueda descartarse la posibilidad de que el propio *Saccharomyces* lo sintetice como subproducto de fermentación. Como es de suponer, la solución a estos problemas debe seguir una marcha paralela a la de las alteraciones del aroma en las cervezas.

De lo expuesto en las páginas anteriores, se deduce el indudable interés tecnológico del desarrollo de técnicas adecuadas de determinación de diacetilo y acetona, así como del conocimiento profundo de la diacetilo reductasa y de la existencia de nuevas fuentes de la misma.

I.4. METODOS DE DETERMINACION DE ACETOINA Y DIACETILO

Una buena parte de las dificultades en las investigaciones relacionadas con el metabolismo de la acetona y el diacetilo han derivado de la falta de métodos de determinación adecuados que reúnan las condiciones de permitir la estimación cuantitativa de diacetilo y AMC sin interferencias mutuas en muestras en las que ambos estén presentes y de ser muy específicos —puesto que han de ser usados en medios de composición muy heterogénea—, precisos y suficientemente sensibles.

Métodos de esta naturaleza tienen también gran interés tecnológico, dado el papel desempeñado por el diacetilo como producto aromático en diversos alimentos, de lo que se ha tratado en los apartados I.2 y I.3.

El método más antiguo para la determinación de diacetilo es el descrito por LEMOIGNE (1920), posteriormente modificado por VAN NIEL (1927) y más tarde por MICHAELIAN y colaboradores (1933), consistente en la reacción del diacetilo con hidroxilamina en presencia de una sal de níquel con producción de un precipitado rojo de níquel-dimetilgioxima que se mide gravimétricamente. Es éste un procedimiento muy específico, pero muy laborioso y sólo útil para determinar cantidades relativamente grandes de diacetilo. STOTZ y RABORG (1943) han introducido una nueva modificación que evita este último inconveniente, aunque a expensas de complicar aún más el análisis: el precipitado de níquel-dimetilgioxima se oxida con bromo y el níquel resultante se estima colorimétricamente en presencia de exceso de dimetilgioxima. Este procedimiento permite determinar cantidades de diacetilo de hasta 10 μ grs. por muestra.

Se han diseñado otros métodos colorimétricos basados en la reacción del diacetilo con hidroxilamina para formar dimetilgioxima y en la posterior valoración de ésta. PRILL y HAMMER han descrito una técnica fundamentada en la determinación de un dimetil gioximato ferroso producido por la reacción de la dimetilgioxima con amoníaco y una sal de hierro (PRILL y HAMMER, 1938); de ésta deriva la de OWADES y JAKOVAC (1963), que por su sencillez y gran sensibilidad —hasta 10 μ grs./muestra— es la más utilizada actualmente para la determinación de diacetilo en cervezas y mantequillas. El método de WHITE, KRAMPITZ y WERKMAN (1946) se basa en la condensación de la dimetilgioxima con urea (FEARON, 1939) en presencia de un ácido fuerte con formación de un compuesto de color amarillo, probablemente un derivado del tipo de las quinoxalinas; aunque muy específico y sensible en el rango de 10 a 100 p.p.m. tiene el inconveniente de ser poco reproductible, lo que obliga a emplear patrones internos en cada serie de análisis.

También puede determinarse diacetilo por reacción de éste con derivados del 0 - diaminobenceno (diamino bencidina, generalmente) en presencia de ácidos fuertes, lo que da lugar a la formación de un color amarillo (PIEN y col., 1936, 1937). Esta técnica es sensible hasta concentraciones de 1 - 10 p.p.m. pero las determinaciones pueden quedar notablemente falseadas por la interacción de la diaminobencidina con otros compuestos que posean grupos carbonilos (PACK y col., 1964 b).

El acetilmethylcarbinol no es positivo a la reacción con los derivados del 0 - diaminobenceno ni a la formación de dimetilgioxima por condensación con hidroxilamina, por lo que este tipo de técnicas no permiten su valoración a menos que sea previamente oxidado a diacetilo con cloruro férrico y ácido sulfúrico; sin embargo, este procedimiento sólo es utilizable en muestras exentas de piruvato y lactato, parte de los cuales se transforman en diacetilo durante el tratamiento (WESTERFELD, 1945). El análisis colorimétrico de acetona superando estos inconvenientes requiere el uso de métodos como el de WESTERFELD (1945) o el de SOKATCH y GUNSALES (1957), que son adaptaciones para el uso como técnica cuantitativa del test de Voges Proskauer modificado por O'MEARA (1931) y BARRIT (1936). Estas técnicas determinan la suma de acetona y diacetilo y están basadas en la oxidación en medio alcalino del acetilmethylcarbinol a diacetilo y en la reacción de éste con grupos guanidínicos, dando lugar a la aparición de un color rosa. Estos métodos son muy sensibles —hasta 0,2 p.p.m.—, de realización simple y de gran especificidad.

LEES y JAGO (1970) han propuesto un método basado en la formación de las semicarbazonas del diacetilo y el AMC y su determinación espectrofotométrica en la zona ultravioleta, pero las numerosas limitaciones de este procedimiento lo hacen poco adecuado en la práctica.

Para la determinación de diacetilo pueden utilizarse técnicas polarográficas, como las descritas por SHIKATA y TACHI (1930), ADKINS y Cox (1938), SEMERANO y POLACZEK (1940) y, más recientemente, por FERREN y col (1967) para su aplicación en muestras de mantequila. Estos métodos, que tienen su fundamento en la reducción de uno de los grupos carbonilo del diacetilo y en la medición de los cambios en la corriente de difusión, son muy específicos y permiten valoraciones entre 3 y 30 p.p.m. Su mayor inconveniente es que el voltaje de polarización del diacetilo se ve muy afectado por el pH, lo que complica las determinaciones, por lo que suelen preferirse los métodos colorimétricos.

La introducción de técnicas de cromatografía en fase gaseosa constituye la aportación más reciente a la determinación de diacetilo y acetona. Sus principales ventajas derivan de que permite determinaciones simultáneas y muy seguras de AMC y diacetilo, que quedan perfectamente diferenciados en los cromatogramas, en el rango de partes por millón si se usa un detector de ionización de llama y aún de partes por mil millones con detectores de captura electrónica (SCANLAN y LINDSAY, 1968), sensibilidad ésta muy lejos del alcance de cualquier otro tipo de métodos. Sus

desventajas proceden de la carestía de los materiales, de que los ensayos han de realizarse individualmente y requieren tiempos de análisis relativamente largos y de que las muestras deben estar exentas de agua, que podría estropear las columnas, lo que exige el uso de adsorbentes de escasa afinidad por el agua, como el carbón vegetal activado (JENNINGS y NURSTEN, 1967) o, en el caso del diacetilo, que es muy volátil, utilizar para el ensayo los vapores liberados por la muestra a analizar (MORGAN y DAY, 1965) con la consiguiente pérdida de precisión y sensibilidad.

Aun con estos inconvenientes, la cromatografía en fase gaseosa con detector de captura electrónica es la técnica de elección cuando se precisa una gran especificidad o cuando las concentraciones son sumamente débiles. Los métodos de WESTERFELD y de OWADES y JAKOVAC son los más empleados por su sencillez y sensibilidad para el análisis de series largas de muestras que contengan AMC y/o diacetilo en cantidades no inferiores a 0,2 p.p.m.

Para determinar con precisión y por separado diacetilo y acetoina en muestras que contienen ambos, debe recurrirse a la cromatografía gaseosa o a la separación por otros métodos de estos dos compuestos antes del ensayo. SPECKMAN y COLINS (1968) han diseñado al respecto una técnica de cromatografía en columna de intercambio aniónico y en el Capítulo III de esta tesis se describe el desarrollo de un método basado en la destilación del diacetilo bajo corriente de nitrógeno y posterior análisis de éste en los destilados y de acetoina en los residuos de destilación.

1.5. DIACETILO REDUCTASA

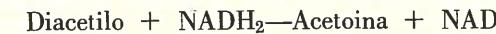
De lo expuesto en el apartado (I.1) de esta introducción, se desprende que los conocimientos actuales acerca del metabolismo y papel biológico del diacetilo y la acetoina distan mucho de ser completos. Los mecanismos de síntesis del acetilmethylcarbinol parecen estar suficientemente aclarados, pero no así los del diacetilo ni los procedimientos de utilización de ambos y del butilénglico, sin lo cual resultaría muy difícil dar un significado biológico a estas rutas. Está plenamente probado que la condensación de acetaldehído activado y acetil-coenzima A, da lugar a la formación de diacetilo; sin embargo no se conoce con seguridad si éste puede proceder de la oxidación del AMC y aún existen ciertas dudas de que se produzca por descarboxilación oxidativa del acetatolactato. Por otra parte, sin la existencia en los sistemas biológicos de algún procedimiento más o me-

nos directo de oxidar la acetoina a diacetilo, ni podría actuar el ciclo del butilénglico tal como es descrito por JUNI y HEYM (1955), ni tendría gran significación el hecho de que la dismutación a acetato y diacetilmethylcarbinol permita el aprovechamiento parcial del diacetilo, puesto que éste se produce en cantidades muy inferiores a las de acetoina (véase *verbi gratia* DE LEY, 1959).

El conocimiento de las propiedades enzimáticas y cinéticas de la diacetilo-reductasa (acetoina deshidrogenasa, acetoina: NAD óxido-reductasa E. C. 1.1.1.5.) es fundamental para aclarar estos problemas, la mayor parte de los cuales giran en torno a las posibilidades de oxidación del AMC a diacetilo. Puesto que no parece que esta oxidación ocurra espontáneamente en los sistemas biológicos, es preciso pensar en una reacción enzimática, probablemente catalizada por la acetoina deshidrogenasa, con simultánea reducción de NAD a NADH₂ (Ec. I. 9., página 135).

Este enzima ofrece, además de su interés puramente bioquímico, una gran importancia en la Tecnología de los Alimentos, ya que cataliza la transformación de un compuesto fuertemente aromático, como es el diacetilo, en otro carente de olor, la acetoina. Como se ha expuesto en (I. 2) y (I. 3) el diacetilo es uno de los principales componentes del aroma característico de diversos productos lácteos y en otros alimentos, especialmente en la cerveza, da lugar al desfavorable «olor a mantequilla» que constituye un problema muy actual de la industria cervecería dada la tendencia hacia el consumo de cervezas ligeras, en las que esta alteración es más perceptible. En las industrias lácteas suele buscarse favorecer la acumulación de diacetilo en los medios de fermentación; en cervecería se intenta impedirla. A este respecto, SEITZ y col., (1962, 1963 b) han propuesto el uso en lactología de estirpes seleccionadas carentes de actividad diacetilo reductasa y más recientemente (TOLLS y col., 1970; THOMPSON y col., 1970) se ha postulado el empleo por las industrias cerveceras de preparaciones enzimáticas capaces de reducir el diacetilo a acetoina. En el mismo sentido podría ser interesante el conocimiento de las posibilidades de activación e inhibición del enzima que cataliza la citada reacción.

La primera referencia directa a la existencia de la diacetilo reductasa fue hecha por STRECKER y HARARY en el año 1954. Los citados autores estudiaron este enzima en extractos de *Staphylococcus aureus* y establecieron la estequiometría de la reacción en los siguientes términos:



En contra de lo que se suponía a partir de los datos obtenidos por SEBECK y RANDLES (1952) en bacterias del género *Pseudomonas* capaces de utilizar el butilénglico como fuente de energía, las preparaciones obtenidas por STRECKER y HARARY no catalizaban el funcionamiento de la reacción en el sentido inverso ni aún en presencia de concentraciones elevadas de acetoina y NAD. En este mismo sentido se han expresado posteriormente SEITZ y col. (1963, a) y SPECKMAN y COLINS (1968, b) tras sus investigaciones en *S. diacetilactis* y *L. citrovorum*.

SEITZ y col., (1963, b) han realizado un estudio muy completo de la distribución de la diacetilo reductasa en microorganismos pertenecientes a los grupos de los psicrófilos, coliformes, estreptococos lácticos y diversas estirpes del género *Leuconostoc*, que demuestra que este enzima está ampliamente difundido entre las bacterias.

Hasta el momento no hay referencias a su presencia en otros sistemas biológicos, por lo que viene siendo considerado un enzima típicamente bacteriano. Sin embargo, durante la preparación de glucosa deshidrogenasa (E. C. 1.1.1. 47) por el método de STRECKER y KORKES (1952) en el laboratorio de la cátedra de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de León se hicieron algunas observaciones que permitieron sospechar la presencia de diacetilo reductasa en tejidos animales.

Las experiencias que se recogen en esta tesis doctoral forman parte de un amplio plan de trabajo dirigido al estudio de la biosíntesis de diacetilo y acetoina y sus mecanismos de regulación. En ella se desarrolla un método de determinación colorimétrica de diacetilo y acetoina en mezclas de ambos, basado en los de WESTERFELD (1945) y OWADES y JAKOVAC (1963), que ha facilitado la demostración de la existencia de diacetilo reductasa en diversos tejidos de procedencia animal y se describen la purificación y algunas propiedades enzimáticas, cinéticas y biológicas de las preparaciones obtenidas a partir de hígado de ternera.

CAPITULO II

MATERIAL, METODOS Y PRODUCTOS (GENERAL)*

II.1. MATERIAL Y REACTIVOS.

A lo largo de los experimentos descritos en esta tesis y salvo indicaciones en sentido contrario, se utilizaron productos químicos calidad reactivo de las marcas comerciales Merck, Schuchardt, BDH y similares. La acetoina (BDH) fue purificada previamente mediante lavado con éter etílico (deshidratado y libre de peróxidos), por haberse comprobado que contenía restos de diacetilo.

Todos los productos bioquímicos fueron suministrados por Boehringer, excepto las muestras de proteínas utilizadas en la determinación de pesos moleculares, que procedían de Calbiochem.

Las disoluciones acuosas se prepararon en agua desionizada en un desmineralizador «SETA» y posteriormente destilada en vidrio.

Las pesadas de precisión se efectuaron en balanzas analíticas «Sartorius» modelos «2.400» y «2.600».

Para las determinaciones de pH se empleó un pHmetro «Radiometer pH M. 28».

Las homogeneizaciones tisulares se realizaron con ayuda de un homogeneizador de cuchillas «M. S. E.». Este mismo instrumento fue usado para efectuar algunas rupturas celulares, aunque en los experimentos de fraccionamiento subcelular se utilizó un homogeneizador tipo «Potter Elvehjem». Las sonicaciones se llevaron a cabo en un aparato de ultrasonidos «M. S. E.» modelo «60».

Las centrifugaciones de las preparaciones enzimáticas y las implicadas en el fraccionamiento subcelular se efectuaron en una ultracentrifugadora refrigerada «Spinco L-50» (Beckman). Para las centrifugaciones ordinarias se empleó una centrifugadora «Martin Christ» modelo «Universal-Junior 33.000».

Las liofilizaciones se realizaron en un aparato tipo «Quickfit» equipado con una bomba de alto vacío «Edward» modelo «ED-35» y dos condensadores de nieve carbónica-acetona.

* La metodología especial utilizada en cada serie de experiencias será descrita en el capítulo correspondiente.

Las diálisis se llevaron a cabo en cámara frigorífica a 0-4°C, utilizando tubo «Visking» de 2,5 cm. de diámetro.

Para las cromatografías en DEAE (Whatman) y en gel de Sephadex (Pharmacia) se usó una columna cromatográfica «K 15/90» (Pharmacia).

Las determinaciones espectro-fotométricas fueron efectuadas en un espectrofotómetro de doble haz «Beckman D-B» provisto de registrador automático modelo «lin-log» con expansor de escala (Beckman); en las determinaciones de actividades enzimáticas la cámara del espectrofotómetro fue termostatada conectando al bloque de las cubetas un ultratermostato «Colora» modelo «N». Las determinaciones colorimétricas se realizaron en este mismo instrumento o en un colorímetro «Bauch & Lomb» modelo «Spectronic-20».

Para las determinaciones manométricas se empleó un aparato de Warburg «Braun» modelo «V. 85».

II.2. METODOS

II.2.1. PURIFICACIÓN DE LA ACETOINA.

Se realizó, en líneas generales, siguiendo el método descrito por WESTERFELD (1945). Las muestras de acetona se trituraron en mortero de porcelana, en el que fueron lavadas con éter etílico deshidratado y libre de peróxidos (que se obtuvo por tratamiento con alambre de sodio y destilación en presencia de hierro reducido) y el producto se filtró a través de una capa de papel de filtro ordinario. El depósito fue retriturado y lavado dos veces más por el mismo procedimiento.

Las muestras de acetona ya purificadas fueron liberadas a vacío de los residuos de éter etílico y almacenadas en un congelador a -15°C dentro de un desecador con cloruro cálcico.

II.2.2. DETERMINACIONES DE PROTEINA.

2.2.A. *Método del biuret. Técnica de Chance y Redfearn (1961).*

Reactivos.—a) Biuret.—1,5 gr. de $\text{SO}_4\text{Cu. 5H}_2\text{O}$, 6 gr. de tartrato sódico-potásico, 30 gr. de soda y 1 gr. de yoduro potásico disueltos en 1 litro de agua destilada.

b) Solución acuosa de colato sódico al 40 por ciento.

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 mgrs. de proteína, y el volumen se llevó a 3 mls. con agua destilada. Después de 30 minutos de reposo se leyó la absorbancia a 540 m μ contra un blanco sin proteína y los resultados se refirieron a la gráfica patrón de la figura 2., que se obtuvo a partir de una solución de ovoalbúmina de concentración conocida.

La turbidez de las muestras se eliminó, cuando fue necesario, añadiendo dos gotas de la solución de colato sódico.

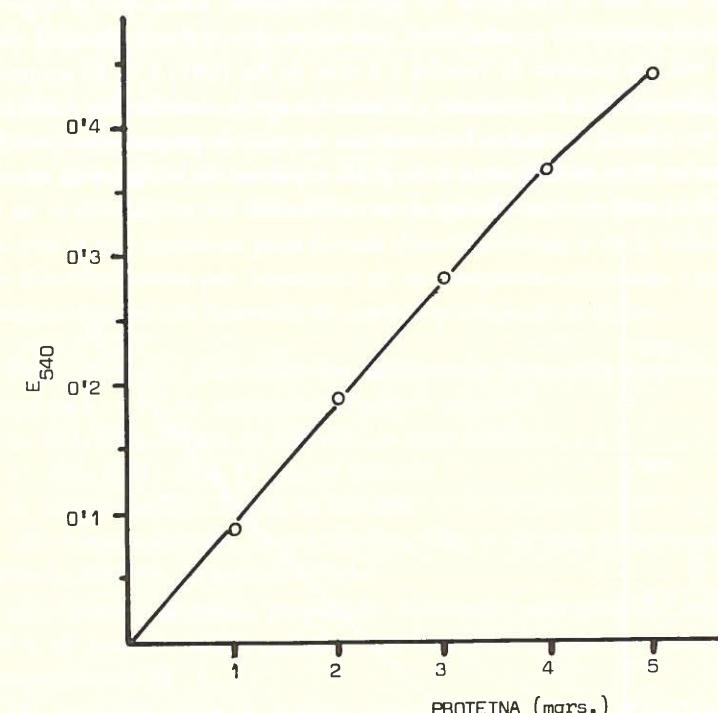


Figura 2.—Gráfica patrón para las determinaciones de proteína por el método del biuret (proteína: ovoalbúmina).

2.2.B. *Digestión ácida y neslerización.*

Se llevó a cabo siguiendo el método de Johnson (1941).

Reactivos: Acido sulfúrico concentrado.

Agua oxigenada de 30 volúmenes

Reactivos de Nessler: 4 grs. de IK, 4 grs. de I₂ Hg y 1,75 grs. de goma arábiga diluidos en un litro de agua destilada.

Na (OH) 4 N.

Técnica.—Las muestras problema se transfirieron, por triplicado, a tubos de ensayo en cantidades adecuadas para las determinaciones (entre 0,060 y 0,63 mgrs. de proteína) y se desecaron en una estufa a 100-110° C (3-5 horas). Una vez secas fueron digeridas a la llama de un mechero de Bunsen con 0,2 mls. de ácido sulfúrico concentrado; se trataron a continuación con dos o tres gotas de agua oxigenada, hasta que el digerido quedó transparente, y se añadieron, por este orden, 4,8 mls. de agua destilada, 2 mls. de reactivo de Nessler y 3 mls. de Na (OH) 4 N. El contenido de los tubos se agitó fuertemente y se midió luego la absorbancia a 490 m μ contra un blanco con todos los reactivos excepto la preparación proteica.

Las lecturas se refirieron a la gráfica patrón de la figura 3, que fue obtenida a partir de una solución de ovoalbúmina.

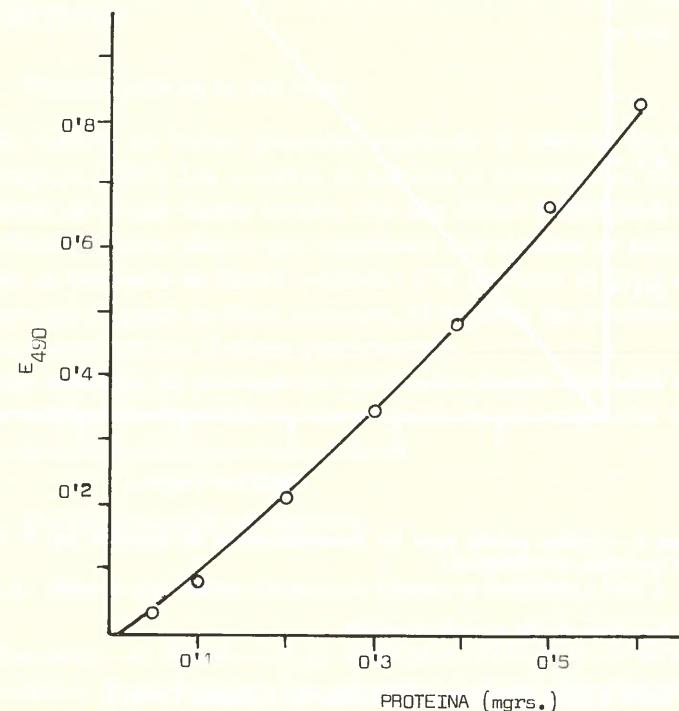


Figura 3.—Gráfica patrón para las determinaciones de proteína por el método de Johnson (proteína: ovoalbúmina).

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

En las preparaciones cuyo contenido protéico quedaba por debajo del límite señalado para los otros dos métodos descritos y en las que interesaba conservar la muestra, la proteína se determinó espectrofotométricamente por la absorbancia de las soluciones a 280 y 260 m μ de longitud de onda, haciendo uso de la siguiente fórmula:

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

II.2.3. DETERMINACIONES DE DIACETILO. MÉTODO DE OWADES y JAKOVAC.

Salvo indicación expresa en sentido contrario, las determinaciones de diacetilo se realizaron por la técnica de OWADES y JAKOVAC (1963) según la descripción de la misma de PACK y col. (1964 b). El método se basa en la destilación del diacetilo a un recipiente que contiene hidroxilamina, con la que reacciona para formar dimetilgioxima, y en la valoración de la dimetilgioxima por formación de un compuesto coloreado (dimetilgioximato ferroso) en presencia de amoníaco y una sal de hierro.

Reactivos.—(1) *Hidroxilamina tamponada*, preparada mezclando en proporción 2 : 4 : 1 las siguientes soluciones acuosas:

- PO₄ HK₂, 33 grs. en 100 mls. de agua destilada.
- NH₂ (OH). HCl, 11 grs. en 250 mls.
- Acetato sódico, 35 grs. en 100 mls.

(2) *Acetona fosfato*: 29 grs. de PO₄ HK₂ y 40 mls. de acetona pura diluidos en 200 mls. de agua destilada.

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

(4) *Solución ácida de sulfato ferroso*: 5 grs. de Fe SO₄. 7H₂O en 100 mls. de solución acuosa de ácido sulfúrico al 1 por ciento. Este reactivo ha de ser preparado de nuevo frecuentemente, antes de que comience a aparecer un ligero color amarillo.

Técnica.—Las destilaciones se realizaron utilizando el dispositivo de la figura 4, diseñado en el laboratorio en que se ha desarrollado esta tesis (I. MEDARDE; tesis doctoral, en preparación). Las muestras (con un contenido en diacetilo entre 1 y 50 μ grs.) se transfirieron al tubo (I),

que fue sumergido en un baño termostático a 65° C. El diacetilo presente en las preparaciones fue arrastrado, mediante una corriente de nitrógeno con un flujo de 100-150 mls./min. durante 90-120 minutos, al tubo (II), siendo recogido en éste con un ml. de la solución de hidroxiamina tamponada.

Cuando se dio por finalizada la destilación, el tubo (II) se colocó en un baño a 75° C durante 10 minutos y, 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 solución ácida de sulfato ferroso, agitando inmediatamente después. El volumen se ajustó a 5 mls. con la solución de fosfato bipotásico al 33 por ciento y la intensidad de coloración resultante se midió a 530 m μ , comparando las lecturas con las de la gráfica de la figura 7 (pág. 168).

Aunque los resultados obtenidos por esta técnica han mostrado ser muy reproducibles, en todas las determinaciones de diacetilo efectuadas en los experimentos descritos en esta tesis se incluyeron, como mínimo, dos patrones internos.

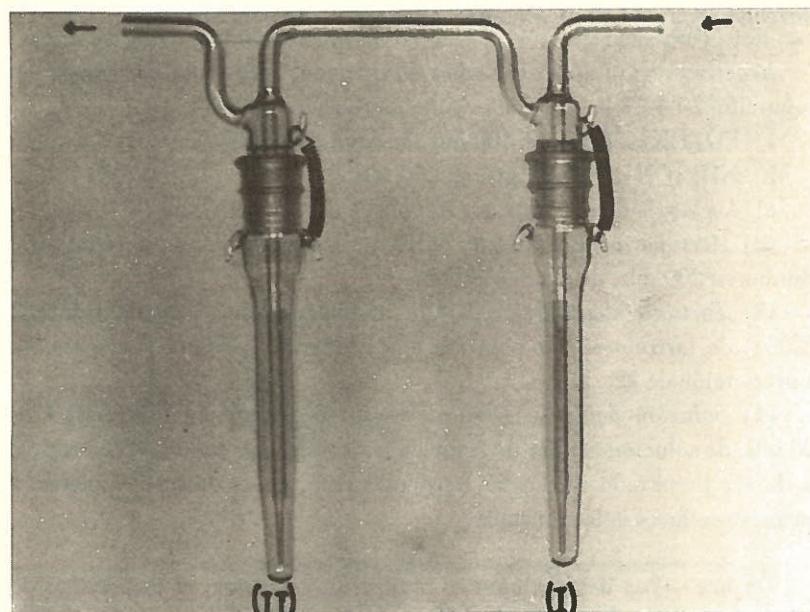


Figura 4.—Dispositivo utilizado para las destilaciones de diacetilo por el método de OWADES y JAKOVAC.

II.2.4. MÉTODO DE WESTERFELD PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SUMA DE ACETOINA Y DIACETILO (WESTERFELD, 1945).

El método, que deriva de la modificación de BARRITT (1936) al test original de VOCES-PROSKAUER, se basa en la oxidación con un álcali de la acetoina a diacetilo y en la reacción en medio básico de éste 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 m μ .

Reactivos.—(1) Creatina al 0,5 % en agua destilada. (2) Solución de α -naftol al 5 por ciento en sosa 2,5 N. Este reactivo ha de ser preparado inmediatamente antes de su uso.

Técnica.—A cinco mililitros de preparación, con un contenido entre 1 y 15 μ mgrs. de acetoina o diacetilo, se añadieron, por este orden, 1 ml. de creatina y 1 ml. de la solución de naftol en sosa. Salvo indicación expresa en contrario, las lecturas de la absorbancia a 530 m μ se efectuaron, contra un blanco con los reactivos, al cabo de 15 minutos en las muestras que contenían diacetilo y de 90 minutos en las de acetoina.

En todas las series de análisis se incluyeron patrones internos con cantidades conocidas de acetoina y/o diacetilo, a cuyas lecturas se refirieron las de las muestras.

II.2.5. DETERMINACIONES DE LA ACTIVIDAD DIACETILO REDUCTASA.

Se efectuaron espectrofotométricamente, siguiendo a lo largo del tiempo los cambios en la absorbancia a 340 m μ debidos a la oxidación del NADH a NAD. Este procedimiento se basa en los siguientes hechos experimentales, que quedarán establecidos en los capítulos V y VII de esta tesis:

(1) Por cada mol de diacetilo reducido a acetoina por acción de la diacetilo reductasa, se oxida uno de NADH.

(2) La acetoina no inhibe la reacción, incluso a concentraciones de 240 μ moles en 3 mls.

Los extractos tisulares y las preparaciones poco purificadas tienen, además de actividad diacetilo reductasa, actividades enzimáticas NADH-deshidrogenasa y butilénglico deshidrogenasa capaces de oxidar el NADH. Las interferencias de estos enzimas en los ensayos, se eliminaron mediante el siguiente sistema de análisis:

Cubeta referencia.—Tampón fosfato bisódico-monopotásico pH 6,1, 0,05 M; diacetilo 12 μ moles; NADH 0,6 μ moles; acetoina, 6 μ moles; preparación enzimática. Volumen, 3 mls.

Cubeta muestra.—Como la anterior, omitiendo el diacetilo.

Las determinaciones de diacetilo reductasa en preparaciones purificadas y exentas de actividad NADH deshidrogenasa y butilénglicol deshidrogenasa se llevaron a cabo omitiendo la acetoina en ambas cubetas.

CAPITULO III

DETERMINACION COLORIMETRICA DE ACETOINA Y DIACETILO

III.1. INTRODUCCION

La escasez de técnicas adecuadas para la determinación de acetoina y diacetilo en muestras que contienen ambos ha dificultado considerablemente la elucidación de la existencia de rutas metabólicas independientes para uno y otro compuesto.

Se han utilizado diversos procedimientos para la realización de estos ensayos. Clásicamente han sido efectuados estimando la concentración de diacetilo por el método de WHITE y col. (1946) y la de acetoina descontando los valores correspondientes al diacetilo a los obtenidos por la técnica de WESTERFELD (1945). SPECKMAN y COLLINS (1968, a) han propuesto la separación de los dos compuestos por cromatografía en columna de intercambio aniónico, previa a la determinación de los mismos por el método de WESTERFELD, pero el proceso es lento y poco apto para el análisis de largas series de muestras. Por otra parte, las técnicas de cromatografía en fase gaseosa, que permiten la determinación simultánea de acetoina y diacetilo, presentan inconvenientes derivados de la necesidad de realizar extracciones con disolventes no miscibles con el agua y de que el análisis de las muestras ha de ser realizado individualmente.

Los experimentos descritos en este capítulo estuvieron dirigidos a la obtención de un sistema de valoración de acetoina y diacetilo en mezclas de ambos a concentraciones del orden de partes por millón adaptado a nuestras necesidades, que era necesario para comprobar las relaciones entre estos dos metabolitos durante la acción de la diacetilo reductasa. En el curso de los mismos se hizo énfasis en el estudio de ciertos aspectos de la reacción de WESTERFELD por ser ésta prácticamente la única utilizable para la determinación directa de acetoina por métodos colorimétricos. En nuestras manos, siguiendo escrupulosamente la técnica descrita por su autor, no era posible lograr determinaciones con el grado de precisión requerido. Las investigaciones sobre la reacción de WESTERFELD no van pues encaminadas a otra cosa que al logro de un método suficientemente preciso de determinación, sin que se pretendiese una investigación sistemática de la cinética o el mecanismo de la reacción.

III.2. METODOS.

III.2.1. DETERMINACIÓN DE DIACETILO POR EL MÉTODO DE WHITE, KRAPPMITZ Y WERKMAN.

Se basa en la reacción de la hidroxilamina y el diacetilo para formar dimetilgioxima, que reacciona con la urea en presencia de un ácido fuerte para dar lugar a un compuesto de color amarillo cuya naturaleza no se conoce, pero que parece tratarse de un derivado del tipo de las quinoxalinas.

Reactivos.—Solución acuosa de urea al 3 por ciento.

Solución acuosa de hidroxilamina al 1 por ciento.

Sulfúrico-fosfórico.—90 mls. de ácido fosfórico y 30 mls. de ácido sulfúrico mezclados mediante fuerte agitación.

Técnica.—Se transfirieron a tubos de ensayo hasta 2 mls. de muestra con un contenido en diacetilo no superior a 50 μ grs. y se añadieron, por este orden, 1 ml. de la solución de urea, 1 ml. de la de hidroxilamina y 2 mls. de la mezcla de ácido sulfúrico y fosfórico.

El volumen se ajustó a 6 mls. con agua destilada y los tubos se sumergieron luego en un baño de agua hirviendo durante 35-40 minutos, transcurridos los cuales se enfriaron y se midió la densidad óptica a 470 m μ contra un blanco, igualmente tratado, en el que se omitió la muestra. Las lecturas se hicieron antes de transcurridas las cuatro horas siguientes a la retirada del baño, para evitar la decoloración por efecto de la luz.

III.2.2. OTRAS DETERMINACIONES DE DIACETILO Y ACETOINA.

Las determinaciones de diacetilo por el método de OWADES y JAKOVAC se efectuaron como se describe en el capítulo II.

La suma de acetoina y diacetilo se determinó por el método de WESTERFELD siguiendo el procedimiento que se recoge en la metodología general. Las soluciones de naftol en sosa fueron preparadas inmediatamente antes de cada serie de análisis.

III.3. RESULTADOS.

III.3.1. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS MÉTODOS DE OWADES Y JAKOVAC Y DE WHITE Y COL. PARA LA DETERMINACIÓN DE DIACETILO.

Los experimentos que se describen a continuación fueron realizados para comparar la sensibilidad y reproductibilidad de los métodos de determinación de diacetilo de WHITE y col. (1946) y de OWADES y JAKOVAC (1963).

3.1.1 *Método de White y Col.*

1.1.a. *Obtención de una gráfica patrón.*

Se prepararon dos soluciones acuosas de 2,45 y 19,6 μ grs. de diacetilo/ml. a partir de las cuales se tomaron muestras conteniendo entre 0,98 y 39,2 μ grs., que fueron transferidas (por duplicado) a tubos de ensayo con tapón esmerilado. Tanto los tubos como los matraces en que se prepararon las disoluciones patrón de diacetilo se mantuvieron tapados para evitar la evaporación de éste, que es muy volátil.

Los resultados de las determinaciones por el método de WHITE y col. se resumen en la tabla 1 y se representan en la figura 5.

1.1.b. *Reproductibilidad de las determinaciones.*

Experimento 1.—Con el fin de comprobar la reproductibilidad de las valoraciones obtenidas mediante esta técnica, se repitió la experiencia descrita en el apartado anterior tras la preparación de nuevas disoluciones de diacetilo.

TABLA I
Determinación de diacetilo por el método de White y col.

Diacetilo en muestra (μ grs.)	Absorbancia a 470 m μ
0,98	0,000
1,96	0,009
4,9	0,036
9,8	0,105
19,6	0,322
39,2	0,780

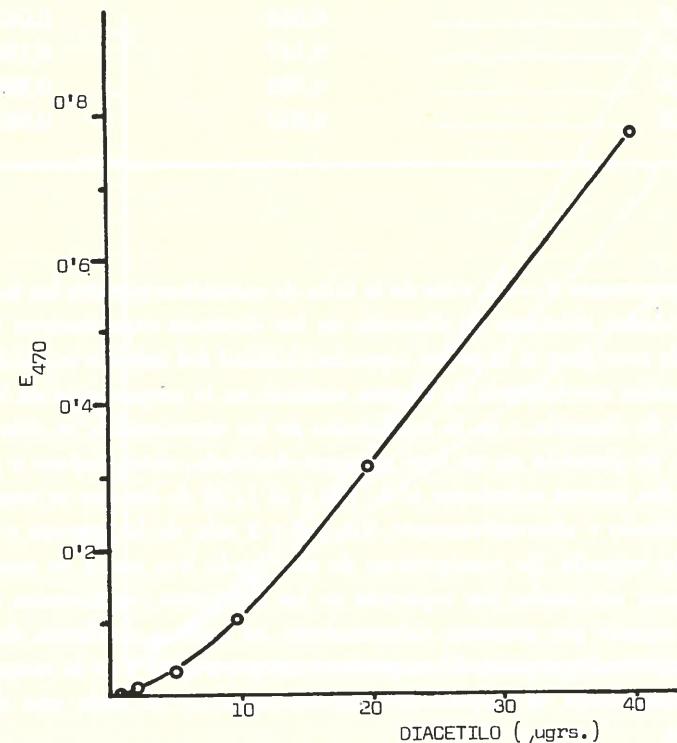


Figura 5.—Determinación de diacetilo por el método de WHITE y col. Relación entre la concentración de diacetilo y la absorbancia a 470 m μ .

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 2.

TABLA II
Reproductibilidad de las determinaciones de diacetilo por el método de White y col. (I).

Diacetilo en muestra (μ grs.)	Absorbancia a 470 m μ
0,98	0,00
1,96	0,025
4,9	0,044
9,8	0,147
19,6	0,383
39,2	0,832

Experimento 2.—En vista de la falta de coincidencia entre las lecturas de cantidades idénticas de diacetilo en los distintos experimentos y con objeto de averiguar si la pobre reproductibilidad del método se debía a la introducción involuntaria de alguna variante en la preparación de las soluciones de diacetilo o en la realización de las experiencias, se diluyeron 0,5 mls. de diacetilo en un litro de agua destilada, obteniéndose a partir de ésta dos nuevas soluciones al 1/100 y al 1/20 de las que se tomaron, por triplicado y alternativamente, 0,4, 0,8 y 2 mls. de la primera y 0,8 y 1,6 de la segunda. Se consiguieron de este modo tres series de muestras que fueron analizadas por separado en las siguientes condiciones: agitación, 1 minuto por muestra; calentamiento en baño a ebullición durante 40 minutos; refrigeración, 15 minutos en nevera a 3° C y en la oscuridad. Estas condiciones se respetaron rigurosísimamente en cada una de las muestras.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3 y se representan en la gráfica de la figura 6.

TABLA III
Reproductibilidad del método de White y col. (II) Determinación de diacetilo en tres series de muestras.*

Diacetilo en muestra (μ grs.)	Absorbancia a 470 m μ		
	Serie A	Serie B	Serie C
1,96	0,044	0,034	0,042
3,92	0,083	0,074	0,077
9,8	0,147	0,132	0,146
19,6	0,396	0,277	0,311
39,2	0,996	0,579	0,776

* Las muestras fueron preparadas a partir de las mismas soluciones de diacetilo, y los análisis se efectuaron en las siguientes condiciones: Agitación 1 min.; calentamiento en baño a ebullición, 40 min.; refrigeración, 15 min. en nevera a 3° C y en la oscuridad.

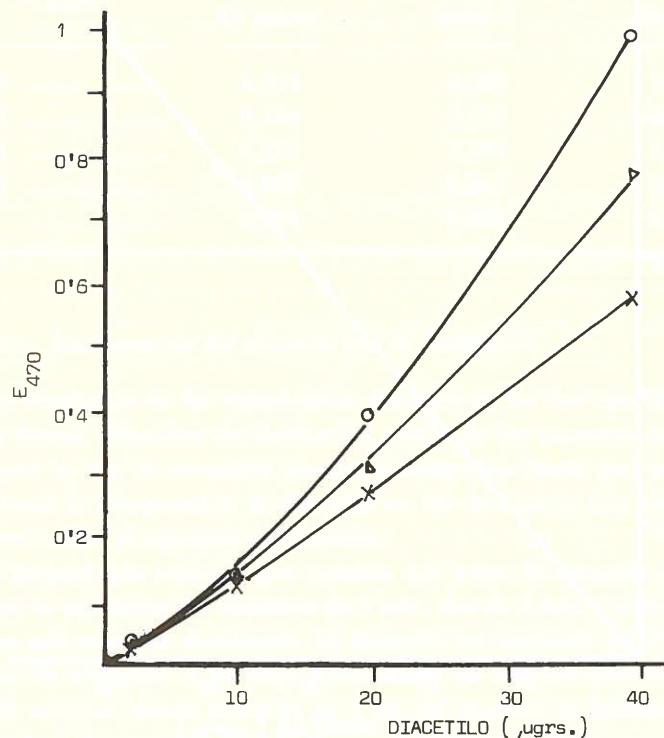


Figura 6.—Método de WHITE y col.: Relación entre la absorbancia a 470 m μ y la concentración de diacetilo en tres series iguales de muestras tratadas en idénticas condiciones experimentales.

3.1.2. Método de Owades y Jakovac.

1.2.a. Obtención de la gráfica patrón.

A partir de una solución de diacetilo ($24,5 \mu$ grs/ml.) en el reactivo de hidroxilamina tamponada (preparado como se describe en la metodología general) se obtuvieron, por triplicado, muestras con un contenido en diacetilo de 9,8, 19,6, 29,4, 39,2 y 49μ grs. El volumen se ajustó a 2 mls. con el reactivo de hidroxilamina y se determinó el diacetilo por el método de OWADES y JAKOVAC, sin destilación previa, con los resultados que se representan en la gráfica de la figura 7.

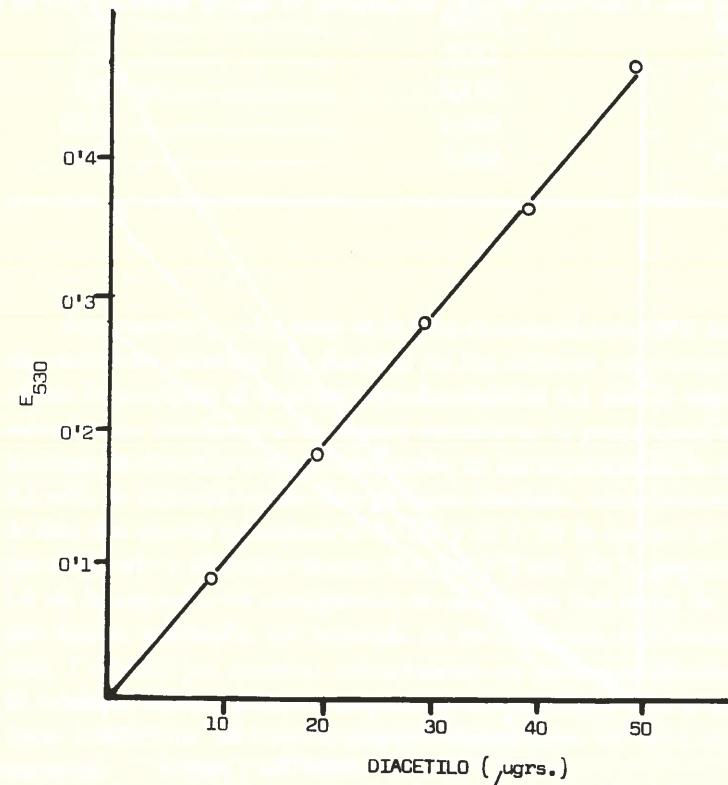


Figura 7.—Gráfica patrón para las determinaciones de diacetilo por el método de OWADES y JAKOVAC.

1.2.b. Reproductibilidad de las determinaciones.

El experimento descrito anteriormente se repitió dos veces en días sucesivos preparando de nuevo todos los reactivos, incluidas las soluciones de diacetilo. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 4 donde se comparan con los de la gráfica patrón, mostrando que las determinaciones por este método son muy reproducibles.

TABLA IV
Reproductibilidad de las determinaciones de diacetilo por el método de Owades y Jakovac.

Diacetilo en muestra (μ grs.)	Absorbancia a 530 m μ (media de tres réplicas)		
	Gr. patrón	Expto. 1	Expto. 2
9,8	0,074	0,080	0,081
19,6	0,154	0,154	0,156
29,4	0,233	0,241	0,230
39,2	0,307	0,305	0,305
49	0,394	0,390	0,388

1.2.c. Recuperación del diacetilo tras la destilación.

Los resultados de las experiencias descritas en los dos apartados anteriores fueron obtenidos sin destilación previa de las muestras de diacetilo, por lo que se consideró necesario comprobar hasta qué punto es satisfactoria la recuperación de diacetilo en los destilados. Con este objeto se llevó a cabo el siguiente experimento:

Se preparó una solución que contenía $4,8 \mu$ grs. de diacetilo por ml., de la que se pipetaron dos muestras de 5 mls., dos de 2 mls. y otras dos de 1 ml. en seis tubos de destilación. El diacetilo fue destilado a $65^\circ C$ bajo corriente de nitrógeno a un flujo aproximado de 100-150 mls./min. durante 90 minutos, siendo recogido en 1 ml. del reactivo de hidroxilamina tamponada y determinado por la técnica de OWADES y JAKOVAC como se indica en la metodología general. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 5.

TABLA V

Recuperación del diacetilo en los destilados.¹

Diacetilo en muestra (μ grs.)	Recuperado en destilado (μ grs.)	% recuperación
4,8	4,5	94
4,8	5	104
9,6	9,8	102
9,6	9,5	99
24	23,4	97,5
24	23,8	99
Media		99,2

¹ Destilación bajo corriente de nitrógeno (flujo 100 - 150 mls./min.) a 65° C durante 90 minutos.

1.2.d. *Influencia de la acetoina en las determinaciones de diacetilo.*

Con objeto de comprobar si la presencia de acetoina podría interferir en las determinaciones de diacetilo por el método de OWADES y JAKOVAC, se realizaron los dos experimentos siguientes:

En el primero de ellos se prepararon tres muestras que contenían 3, 1 y 0,1 mgrs. de acetoina, dos con 0,1 mgrs. de acetoina y 20 μ grs. de diacetilo y otras dos con 20 μ grs. de diacetilo; se les añadieron, sin destilación previa de las muestras, los reactivos propios del método y se midió la extinción a 530 m μ . Las muestras que contenían sólo acetoina no tomaron coloración alguna y en las que contenían acetoina y diacetilo se obtuvieron valores idénticos a los de las que sólo contenían diacetilo y plenamente concordantes con los de la gráfica patrón. Por lo tanto la acetoina ni da la reacción ni interfiere con la del diacetilo.

En el segundo se estudió la posibilidad de que la acetoina pudiera oxidarse a diacetilo durante la destilación. Dos muestras que contenían 0,1 mgrs. de acetoina en 5 mls. de agua fueron destiladas en las condiciones habituales. Las determinaciones de diacetilo en el destilado dieron resultados negativos.

III.3.2. DETERMINACIÓN DE LA SUMA DE ACETOINA Y DIACETILO.

MÉTODO DE WESTERFELD.

3.2.1.—A partir de una solución acuosa de diacetilo que contenía 4,9 μ grs./ml. y otra de acetoina (5 μ grs./ml.) se transfirieron, por duplicado, a tubos de ensayo graduados con tapón esmerilado, cuatro muestras con 0,98, 4,9, 9,8 y 14,7 μ grs. de diacetilo y otras cuatro con 1,5, 10 y 15 μ grs. de acetoina. El volumen se ajustó a 5 mls con agua, añadiéndose a continuación los reactivos propios del método de WESTERFELD.

Las lecturas de la absorbancia a 530 m μ se efectuaron, siguiendo las indicaciones del autor de la técnica, 10 minutos después de añadido el último reactivo en las muestras que contenían diacetilo y 60 minutos en las de acetoina, con los resultados que se recogen en la figura 8.

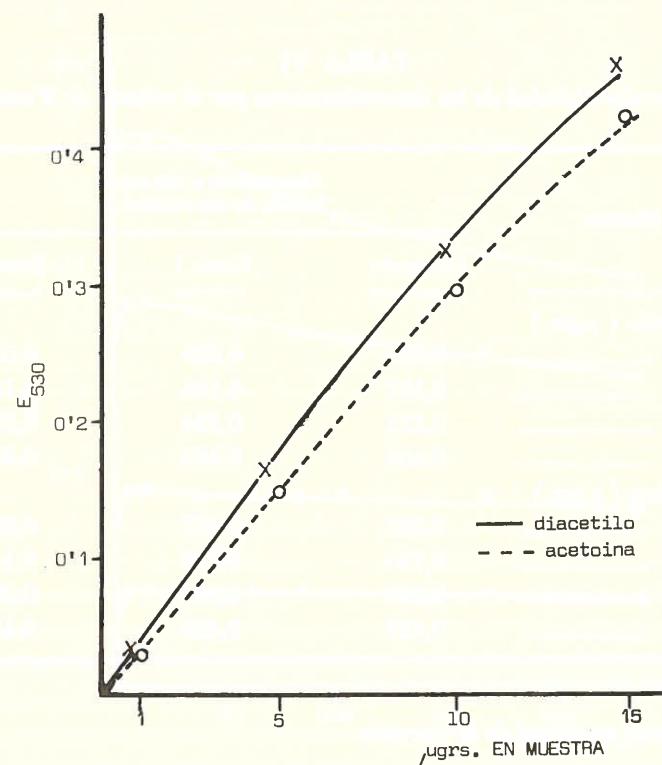


Figura 8.—Método de Westerfeld. Relación entre la concentración de acetoina o diacetilo y la absorbancia a 530 m μ .

3.2.2. Reproductibilidad de las determinaciones

El anterior experimento se repitió dos veces en días sucesivos, preparándose de nuevo los reactivos y las soluciones de acetona y diacetilo. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 6, en la que se comparan con las lecturas de la gráfica patrón.

Aunque los resultados obtenidos en estos experimentos parecían señalar que las determinaciones de acetona y diacetilo por esta técnica son muy reproducibles, se introdujeron patrones internos en todos los análisis. Pudo comprobarse así que, con cierta frecuencia, los valores obtenidos en la determinación de cantidades conocidas de acetona y diacetilo se apartan considerablemente de los esperados a partir de esta tabla, por lo que se consideró conveniente estudiar algunos aspectos de la cinética de la reacción.

TABLA VI
Reproductibilidad de las determinaciones por el método de Westerfeld.

Muestra	Absorbancia a 530 m μ (media de dos réplicas)		
	Gr. patrón	Expto. 1	Expto. 2
Diacetilo (μgrs.)			
0,98	0,036	0,039	0,033
4,9	0,167	0,166	0,164
9,8	0,323	0,324	0,329
14,7	0,460	0,465	0,469
Acetona (μgrs.)			
1	0,032	0,057	0,027
5	0,150	0,150	0,147
10	0,295	0,304	0,300
15	0,423	0,425	0,437

3.2.3. Curso temporal de la reacción.

A cuatro muestras de acetona y cuatro de diacetilo, con sus correspondientes duplicados, que contenían 15, 10, 5 y 2,5 μ grs. en 5 mls.

de agua destilada, se añadió 1 ml. de creatina al 0,5 por ciento y se pipetó 1 ml. de la solución del naftol en sosa a intervalos de 30 segundos; las muestras se agitaron y fueron colocadas en un baño termostático a 20° C. Al cabo de 11 minutos se midió la absorbancia a 530 m μ contra un blanco con todos los reactivos, excepto acetona o diacetilo, en el mismo orden en que habían sido pipetados los tubos y manteniendo entre cada lectura 30 segundos de intervalo. Las lecturas se repitieron periódicamente hasta los 240 minutos, considerando el tiempo transcurrido como la diferencia entre el momento en que se empezó a pipetar el último reactivo y el comienzo de las lecturas de la serie.

Los resultados obtenidos se representan en las gráficas de las figuras 9 y 10, en las que puede comprobarse que las muestras que contenían diacetilo alcanzan ya a los 11 minutos su coloración máxima; a partir de

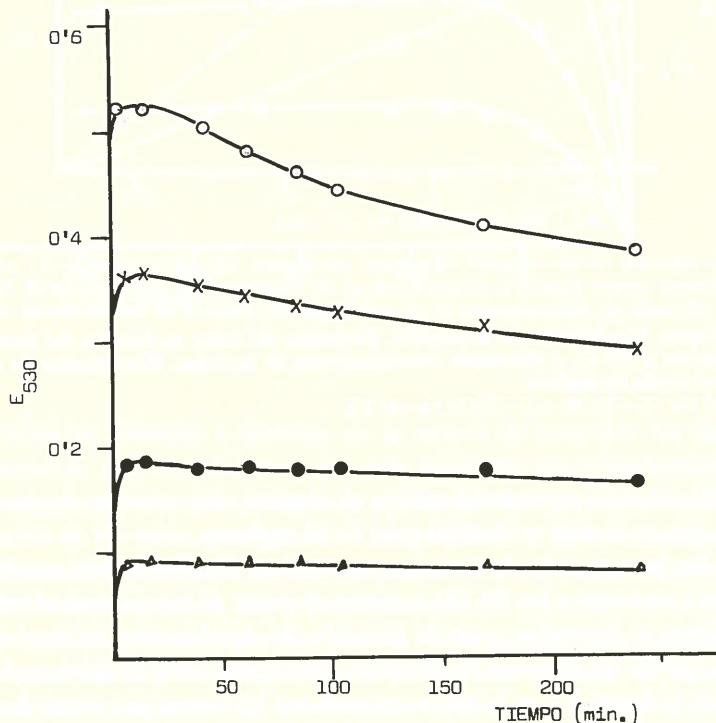


Figura 9.—Evolución del color en función del tiempo de incubación a 20° C., a diferentes concentraciones de diacetilo. μ grs. de diacetilo en el medio de análisis: (o—o) 15; (X—X) 10; (●—●) 5; (Δ—Δ) 2,5.

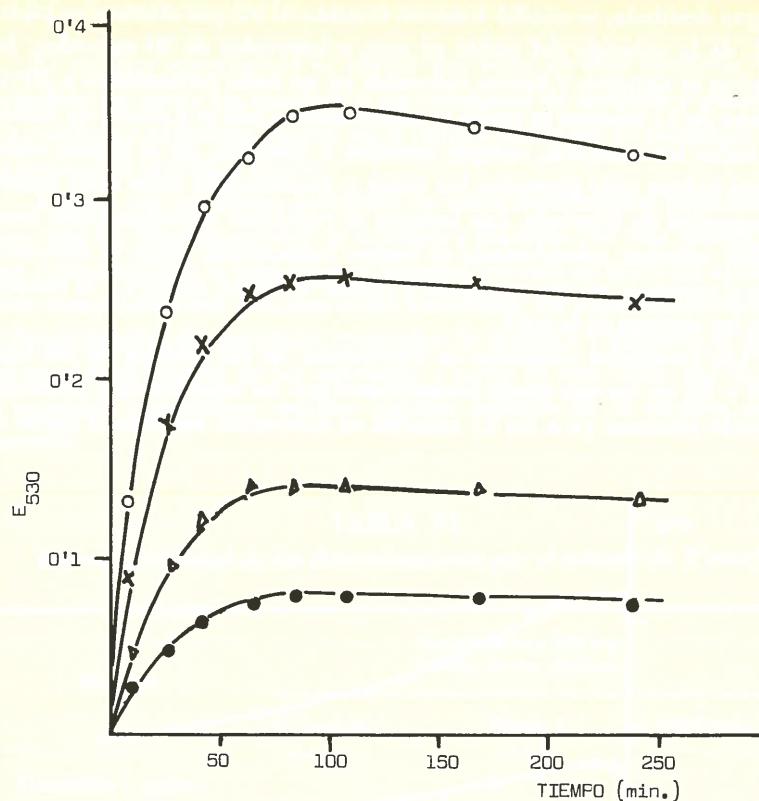


Figura 10.—Método de Westerfeld. Evolución del color en función del tiempo de incubación a 20° C., a diferentes concentraciones de acetoina. Microgramos de acetoina en el medio de análisis: (○—○) 15; (X—X) 10; (Δ — Δ) 5; (●—●) 2,5.

los 30 minutos, aproximadamente, se observa una reacción de decoloración, que ya es muy evidente al cabo de 45 minutos.

En las muestras de acetoina, en cambio, la absorbancia máxima se alcanza en torno a los 90-120 minutos. A partir de este momento también comienza a descender, pero la reacción de decoloración es mucho más lenta que en las muestras de diacetilo. Esto resulta muy evidente en la gráfica de la figura 11, en la que se representan los tantos por ciento de decoloración al cabo de cuatro horas sobre las absorbancias máximas teóricas (obtenidas de las gráficas 9 y 10 por extrapolación a «tiempo cero» de los valores experimentales) en función del logaritmo decimal de la

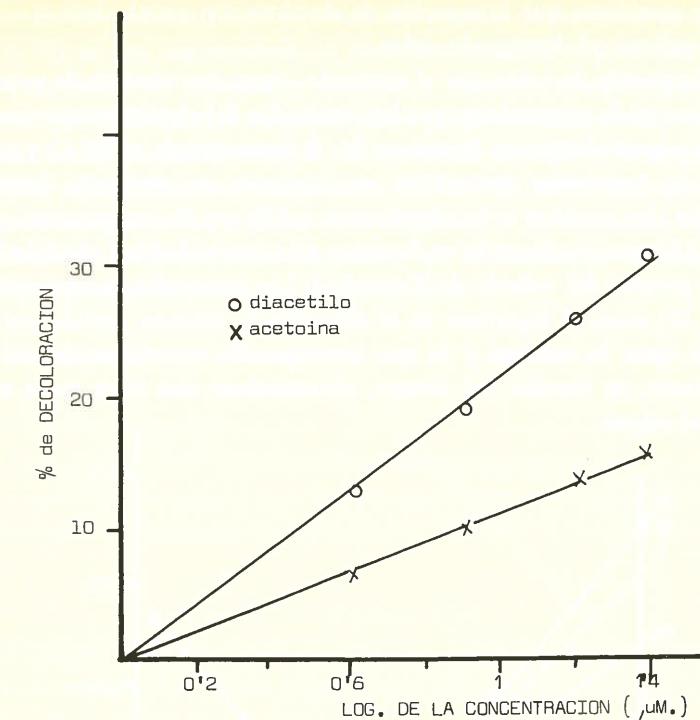


Figura 11.—Desaparición del compuesto coloreado formado en la reacción de Westerfeld. Representación de porcentaje de la decoloración a tiempo «cero» perdido al cabo de cuatro horas, en función del logaritmo de la concentración de diacetilo o acetoina.

concentración de diacetilo o acetoina en la mezcla de reacción: las dos representaciones dan líneas rectas, con una pendiente aproximadamente dos veces mayor para la que corresponde al diacetilo que para la acetoina.

A partir de los datos que figuran en las gráficas 9 y 10 se ha estudiado el orden correspondiente a las dos reacciones de decoloración utilizando el método de integración. Las representaciones del logaritmo de la absorbancia máxima teórica partido por la determinada experimentalmente dan, en función del tiempo, curvas parabólicas en lugar de líneas rectas como cabría esperar si la decoloración siguiese una cinética de primer orden y tampoco son lineales las representaciones, para una cinética de segundo orden, de la decoloración partido por el producto de la absorbancia máxima por la residual, en función del tiempo. Estos resultados

ponen de manifiesto que la reacción de decoloración no obedece a ecuaciones de primero ni de segundo orden.

La formación de color, por el contrario, sigue una cinética de primer orden, como pudo comprobarse por los resultados del siguiente experimento: en un espectrofotómetro Beckman D - B termostatado a 20° C. y provisto de un registrador automático, se siguieron, en continuo, durante 15 minutos, los cambios en la absorbancia a 530 m μ de una muestra que contenía 15 μ grs. de diacetilo en 5 mls. y a la que se habían añadido los reactivos propios del método de Westerfeld. Los resultados se representaron (fig. 12) como el logaritmo de la absorbancia máxima partido por la diferencia entre la máxima y la que correspondió experimentalmente a cada instante, en función del tiempo, obteniéndose una línea recta que pasa por el origen.

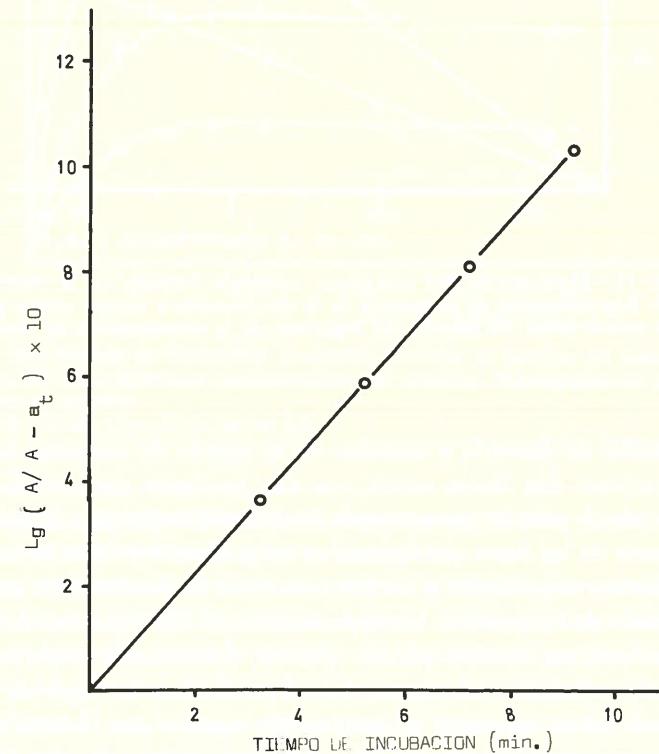


Figura 12.—Método de Westerfeld: reacción de coloración. Representación del logaritmo de la absorbancia máxima partido por la diferencia entre la máxima y la que corresponde a cada momento, en función del tiempo de incubación a 20° C.

En las gráficas 13 y 14 (obtenidas a partir de los datos de las figuras 9 y 10) se han representado la absorbancia a 530 m μ en función de la concentración de acetona y diacetilo a distintos tiempos; puede observarse que la linearidad va perdiéndose progresivamente, como corresponde al hecho de que la reacción de formación de color y la de pérdida del mismo siguen distintos mecanismos. En vista de estos resultados y de los que se recogen en las gráficas de las figuras 9 y 10, se decidió efectuar las lecturas de las muestras de diacetilo a los 15 minutos de incubación y las de las muestras de acetona a los 90 minutos.

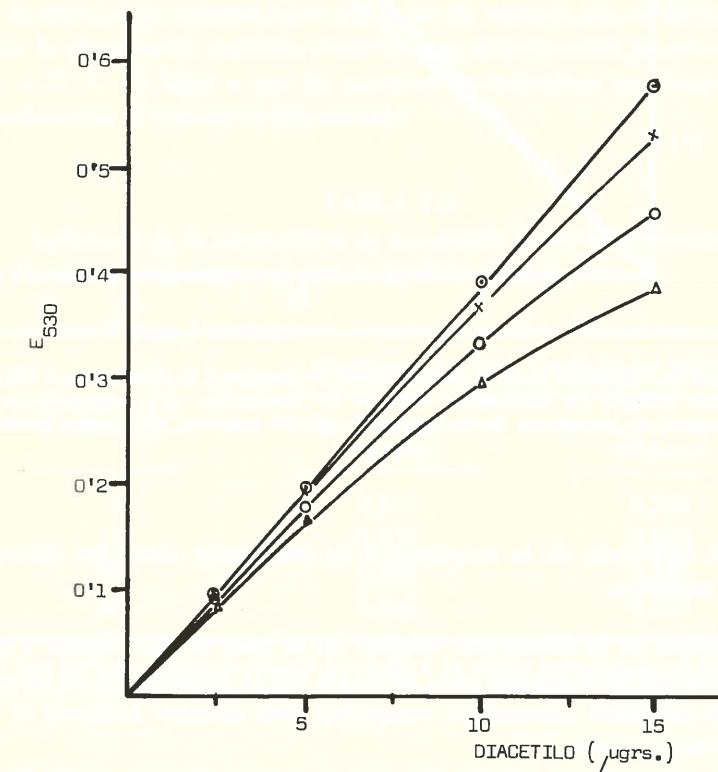


Figura 13.—Relación entre la concentración de diacetilo y la absorbancia a 530 m μ a distintos tiempos de incubación. Período de incubación: (◎) extrapolación a tiempo «cero» de los valores de la figura 9; (X) 15 minutos; (O) 90 minutos; (Δ) cuatro horas.

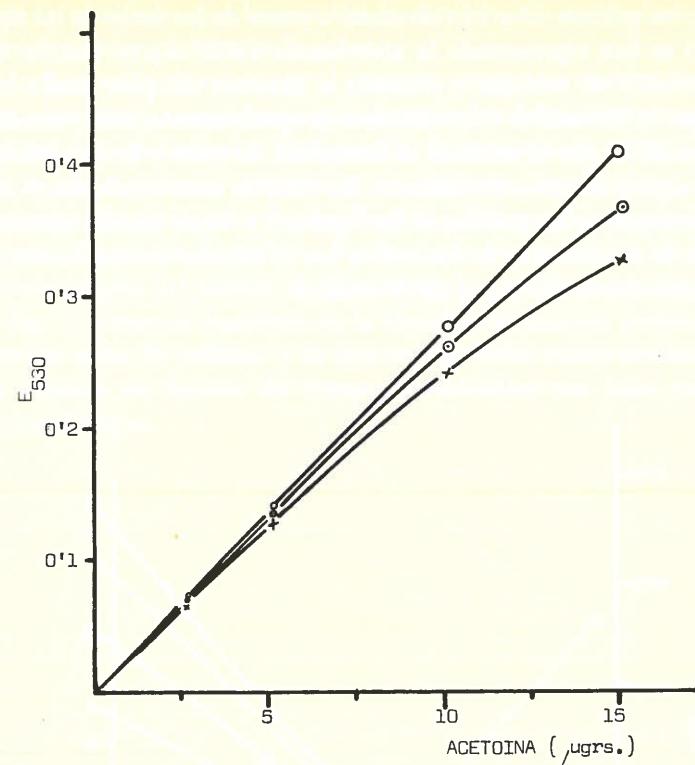


Figura 14.—Relación entre la concentración de acetoina y la absorbancia a 530 m μ a distintos tiempos de incubación. Período de incubación: (O) extrapolación a tiempo «cero» de los valores de la figura 10; (◎) 90 minutos; (X) cuatro horas.

3.2.4. Influencia de la temperatura de incubación sobre las determinaciones.

Aunque en la descripción original no se hace alusión alguna a que las determinaciones puedan estar afectadas por la temperatura de incubación, se consideró conveniente comprobar este extremo mediante el siguiente experimento:

Se prepararon ocho muestras que contenían 10 μ mgrs. de diacetilo/5 mls., ocho de acetoina 10 μ grs./5 mls. y ocho blancos con 5 mls. de agua destilada, siendo dispuestas en cuatro series cada una de las cuales constaba de dos muestras de diacetilo, dos muestras de acetoina y dos

blancos. Tras añadir los reactivos, las cuatro series se incubaron a 5, 15, 25 y 35° C. Las lecturas, contra un blanco incubado a la misma temperatura, se efectuaron a los 15 minutos para las muestras de diacetilo y a los 90 minutos para las de acetoina.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 7, mostrando que los cambios en la temperatura de incubación, entre 5 y 35° C no afectan significativamente a las determinaciones de diacetilo, pero sí a las de acetoina; al cabo de 90 minutos de incubación, las muestras que se mantuvieron a 15° y 25° C dan lecturas de absorbancia a 530 m μ superiores a las de las incubadas a 35° y mucho mayores que las de las que lo fueron a 5° C. Parece evidente que, a la temperatura de 5° C, la marcha de las reacciones que conducen a la formación de color y a la pérdida del mismo a partir de la acetoina se retrasan tanto que a los 90 minutos aún no se ha alcanzado la absorbancia máxima, mientras que la aceleración de estos procesos a 35° C. da lugar a que las muestras se encuentren en plena fase de decoloración al término de este período.

TABLA VII
Influencia de la temperatura de incubación sobre las determinaciones de diacetilo y acetoina por el método de Westerfeld.

Temperatura de incubación (°C)	Absorbancia a 530 m μ (media de dos réplicas)	
	Muestras de diacetilo (10 μ mgrs.)	Muestras de acetoina (10 μ grs.)
5	0,310	0,265
15	0,307	0,360
25	0,304	0,355
35	0,308	0,319

Las lecturas, contra un blanco incubado a la misma temperatura, se efectuaron a los 15 minutos para las muestras de diacetilo y a los 90 minutos para las de acetoina.

3.2.5. Influencia de la concentración de creatina, *a*-naftol y sosa.

Los efectos de los cambios en la concentración de cada uno de los reactivos fueron estudiados con el siguiente planteamiento:

Se prepararon tres series de seis muestras cada una, tres de diacetilo (10 μ grs. en 5 mls.) y tres de acetona (10 μ grs. en 5 mls.). A las muestras de cada serie se añadieron cantidades fijas de dos de los reactivos (las de la técnica estandard) y variables del otro entre la mitad y el doble de la que recomienda el autor del método. En todos los casos la reacción se inició por la adición de la solución de α -naftol, considerándose este momento como «tiempo cero». La marcha de las reacciones se siguió determinando periódicamente la absorbancia a 530 m μ contra un blanco con las mismas cantidades de reactivos en el que se omitió la acetona y el diacetilo.

Como se muestra en la figura 15, los cambios en la concentración de creatina dentro de los límites anteriormente citados no afectan significativamente a la coloración. Las variaciones en el contenido en α -naftol,

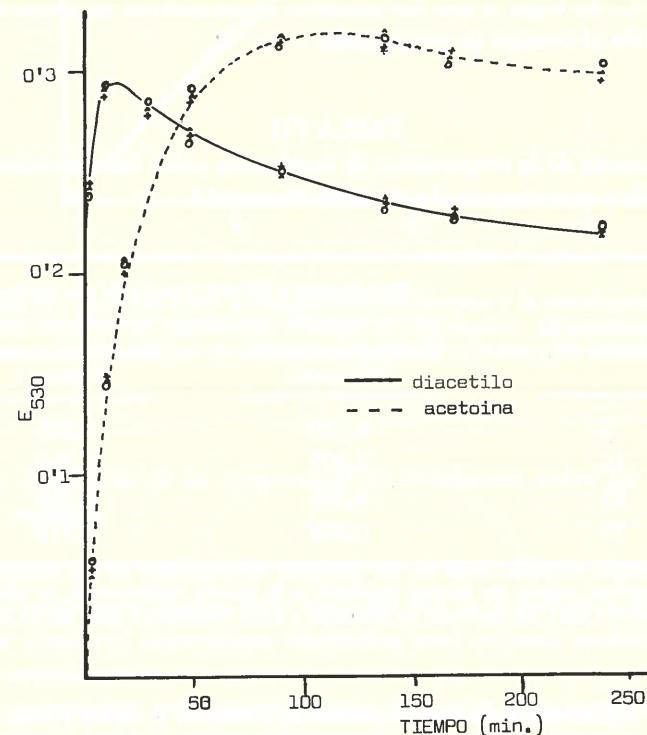


Figura 15.—Reacción de Westerfeld. Influencia de la concentración de creatina: evolución del color a lo largo del tiempo. Miligramos de creatina en el medio de análisis (7 mls.): (O) 2,5; (X) 5; (Δ) 10.

por el contrario, tienen un efecto muy acusado, tanto sobre la absorbancia máxima como sobre la velocidad de la reacción de formación de color (fig. 16), que aumentan a medida que lo hace la concentración de este

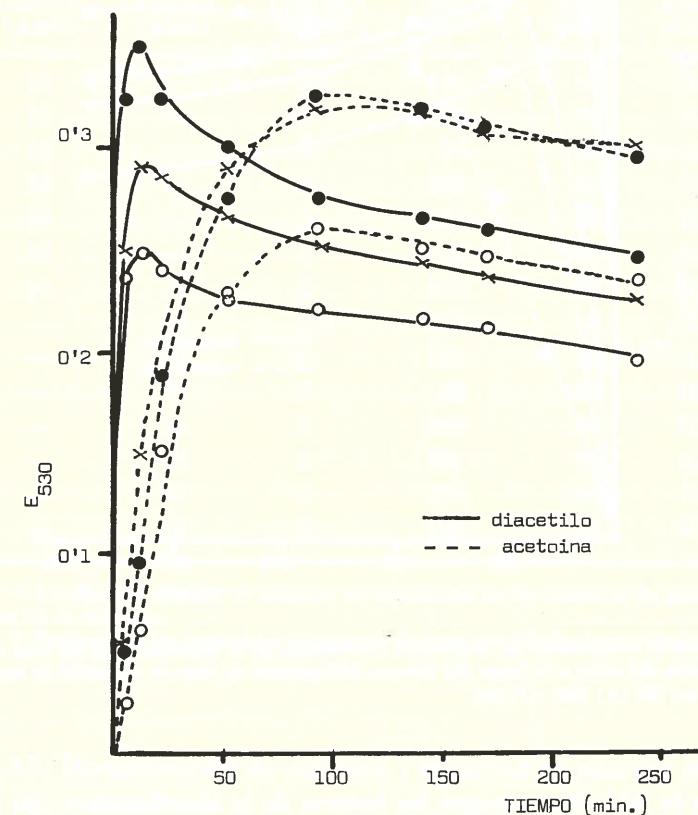


Figura 16.—Reacción de Westerfeld. Influencia de la concentración de α -naftol: evolución del color a lo largo del tiempo. Miligramos de α -naftol en el medio de análisis (7 mls.): (O) 25; (X) 50; (●) 100.

reactivo. En la figura 17 se representan los resultados obtenidos a concentraciones variables de hidróxido sódico: la marcha de la reacción es más rápida cuanto mayor es la cantidad de sosa presente, lo que resulta muy notorio en las muestras de acetona, y la intensidad máxima de coloración tiene un óptimo a las concentraciones de sosa habitualmente utilizadas.

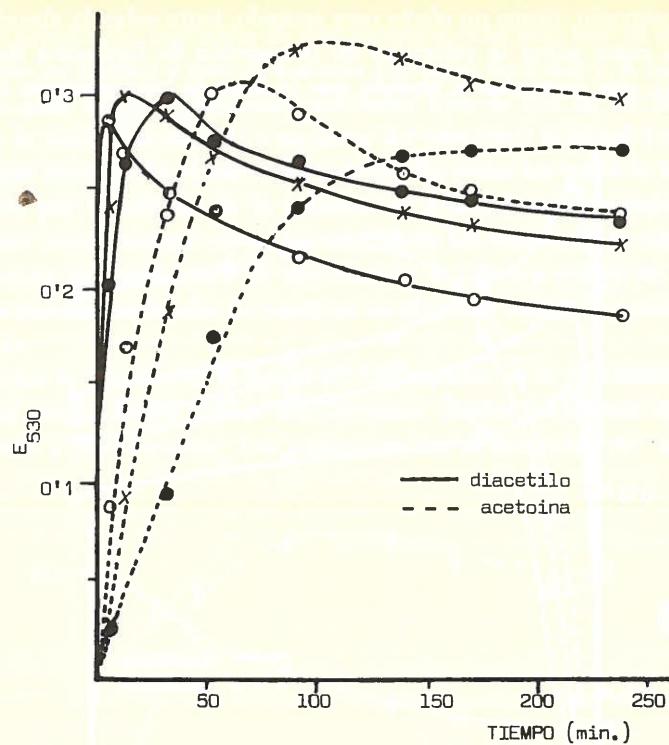


Figura 17.—Reacción de Westerfeld. Influencia de la concentración de sosa sobre la evolución del color a lo largo del tiempo. Miligramos de sosa en el medio de análisis (7 mls): (●) 50; (X) 100; (O) 200.

En la tabla 8 se recogen las lecturas de la absorbancia a $530 \text{ m}\mu$ de las muestras de diacetilo a los 15 minutos y de las de acetoina a los 90 minutos, poniendo de manifiesto que los cambios introducidos en las concentraciones de sosa y α -naftol dan lugar a que las lecturas se devíen notablemente de las correspondientes a los testigos tratados con las concentraciones estandard de estos reactivos.

TABLA VIII
Influencia de la concentración de creatina, α -naftol y sosa sobre las determinaciones de diacetilo y acetoina por el método de Westerfeld.

Diacetilo (μ grs.)	Acetoina (μ grs.)	Creatina (mgrs.)	Sosa (mgrs.)	Naftol (mgrs.)	Absorbancia a $530 \text{ m}\mu$ ¹
10	—	2,5	100	50	0,300
10	—	10	100	50	0,300
10	—	5	50	50	0,264
10	—	5	200	50	0,265
10	—	5	100	25	0,252
10	—	5	100	100	0,348
10	—	5	100	50	0,305 ²
—	10	2,5	100	50	0,320
—	10	10	100	50	0,320
—	10	5	50	50	0,235
—	10	5	200	50	0,290
—	10	5	100	25	0,255
—	10	5	100	100	0,325
—	10	5	100	50	0,320 ²

¹ Lecturas al cabo de 15 minutos de incubación en las muestras de diacetilo y de 90 en las de acetoina.

² Testigos con las cantidades «standard» de reactivos. Media de tres réplicas.

III.3.3. DETERMINACIÓN DE ACETOINA Y DIACETILO EN MEZCLAS DE AMBOS COMPUESTOS.

3.3.1. Determinación de diacetilo por el método de Owades y Jakovac y acetoina descontando los valores correspondientes al diacetilo de los obtenidos por la técnica de Westerfeld.

Las determinaciones colorimétricas de acetilmethylcarbinol y diacetilo en mezclas en las que coexisten ambos compuestos suelen realizarse determinando el diacetilo por alguno de los métodos derivados de la reacción de éste con hidroxilamina para formar dimetilglicoxima, como el de WHITE y col. o el de OWADES y JAKOVAC (véase v. g. DE LEY, 1959) y acetoina descontando los valores correspondientes al diacetilo presente a las de

terminaciones de la suma de ambos por la técnica de WESTTERFELD. Sin embargo, los resultados obtenidos en las experiencias descritas en el apartado 3.2.3. de este capítulo hicieron dudar de la validez de las determinaciones efectuadas por este procedimiento. Con objeto de comprobar este extremo se llevó a cabo el siguiente experimento:

A partir de dos soluciones madre que contenían, una 50 μ grs. de diacetilo por ml. y la otra 50 μ grs. de acetoina/ml. se prepararon: A) Cuatro muestras que contenían acetoina y diacetilo en las siguientes concentraciones por ml.: 5 μ grs. y 10 μ grs.; 10 μ grs. y 5 μ grs.; 10 μ grs. y 20 μ grs.; 20 μ grs. y 10 μ grs. B) Tres muestras que contenían 2,5, 5 y 10 μ grs. de diacetilo por mililitro. C) Tres conteniendo 2,5, 5 y 10 μ grs. de acetoina/ml.

Utilizando la técnica de WESTERFELD se determinó, con dos réplicas, la suma de acetoina y diacetilo en 0,5 mls. de las muestras de la serie «A» y en un ml. de las de las series «B» y «C», efectuándose las lecturas 90 minutos después de ser añadido el último reactivo. En la tabla 9 fi-

TABLA IX

Método de Westerfeld, comparación entre las determinaciones de la suma de acetoina y diacetilo y las correspondientes a los análisis por separado de los mismos.

μ grs. en muestra		Absorb. a 530 m μ (1)	Absorb. teórica. (2)	Absorb. real/ Absorb. teórr. (%)
Acetoina	Diacetilo			
2,5	—	0,080	—	—
5	—	0,150	—	—
10	—	0,279	—	—
—	2,5	0,073	—	—
—	5	0,136	—	—
—	10	0,245	—	—
2,5	5	0,197	0,216	91
5	2,5	0,206	0,223	92
5	10	0,360	0,395	91
10	5	0,375	0,415	90

¹ Media de dos réplicas. Lecturas a los 90 minutos.

² Suma de las absorbancias que corresponden al diacetilo y la acetoina presentes determinados por separado.

guraron los resultados de estos análisis. Puede observarse que la absorbancia a 530 m μ de las muestras que contienen acetoina y diacetilo es, en todos los casos, inferior a la suma de las que corresponden a las determinaciones por separado del acetilmethylcarbinol y el diacetilo presentes.

En el procedimiento de ensayo que está siendo estudiado estos errores en la suma total se reflejan exclusivamente en los valores atribuidos a la acetoina, puesto que los correspondientes al diacetilo se obtienen por el método de OWADES y JAKOVAC. A partir de los resultados de los análisis por la técnica de WESTERFELD (tabla 8) se obtuvo, representando la densidad óptica a 530 m μ en función de la concentración de diacetilo en las muestras de la serie «B» y de acetoina en las de la serie «C», una gráfica patrón para cada uno de estos dos compuestos. Siguiendo el método de OWADES y JAKOVAC se determinaron las cantidades de diacetilo presentes en las muestras que contenían éste y acetoina (Serie «A»), por triplicado y sin destilación previa; refiriendo estos valores a la gráfica patrón para el diacetilo (obtenida de las determinaciones de la serie «B» por la técnica de WESTERFELD) se calculó la absorbancia teóricamente correspondiente a éste en las determinaciones de la suma de diacetilo y acetoina, por diferencia la correspondiente al acetilmethylcarbinol y, comparando los resultados con los de la gráfica patrón para la acetoina, la concentración teórica de ésta en las muestras.

TABLA X

Determinación de diacetilo por el método de OwaDES y Jakovac y acetoina descontando los valores correspondientes al diacetilo de los obtenidos por la técnica de Westerfeld.

μ grs./ml. de muestra		μ grs./ml determinados		Recuperación de acetoina (%)
Diacetilo	Acetoina	Dia. ¹	Acet. ²	
5	10	4,9	8,8	88
10	5	10	3,6	72
10	20	10,3	16,9	85
20	10	20,4	7	70

¹ Valorado por el método de OWADES y JAKOVAC, sin destilación previa; media de tres réplicas.

² Descontando los valores de diacetilo a las determinaciones de la suma de éste y acetoina por el método de WESTERFELD.

En la tabla 10 se presentan los resultados globales de la experiencia, que ponen de manifiesto que las estimaciones de acetoina resultaron notablemente falseadas, en mayor grado cuanto menor es la proporción de ésta respecto al diacetilo en el medio de análisis.

3.3.2. Separación de la acetoina y el diacetilo por destilación en corriente de nitrógeno y determinación de diacetilo en los destilados y acetoina en los residuos.

El experimento descrito anteriormente puso de manifiesto la inaplicabilidad de ese procedimiento a nuestras condiciones de trabajo, en las que es necesario determinar con precisión acetoina y diacetilo en mezclas en las que el diacetilo puede ser el componente mayoritario. Se consideró entonces la posibilidad de evitar las interferencias mutuas en los análisis por el método de WESTERFIELD retirando el diacetilo del medio por destilación y determinando éste en el destilado y acetoina en el residuo. A este fin se eligieron la técnica de destilación y determinación de diacetilo descrita por OWADES y JAKOVAC (1963) y el método de WESTERFIELD para el análisis de acetoina, efectuándose los siguientes experimentos para comprobar la validez del sistema:

3.3.2.a. Recuperación de diacetilo en los destilados y acetoina en los residuos de destilación.

Puesto que ya se había demostrado anteriormente que la acetoina no es positiva al método de OWADES y JAKOVAC ni se oxida a diacetilo durante la destilación por la técnica descrita por los mismos autores (véase el apartado 3.1.2. de este capítulo), se llevó a cabo el siguiente experimento para comprobar si parte de la acetoina podría ser arrastrada durante la destilación o, dada la inestabilidad de este tipo de compuestos, destruirse por la prolongada exposición a las temperaturas relativamente elevadas que requiere ésta:

Se preparó una solución de diacetilo que contenía 20 μ grs./ml. y otra de acetoina a la misma concentración, a partir de las cuales se transfirieron a seis tubos de destilación de los descritos en la metodología general, las siguientes muestras: tubos 1 y 2, 30 μ grs. de diacetilo; tubos 3 y 4, 30 μ grs. de diacetilo y 30 μ grs. de acetoina; tubos 5, 6 y 7, 5, 10 y 15 μ grs. de acetoina respectivamente. El volumen se ajustó a 5 mililitros

Las muestras contenidas en los tubos 1, 2, 3 y 4 se destilaron a 65° C bajo corriente de nitrógeno con un flujo aproximado de 150 mls./min. durante 90 minutos, recogiéndose el diacetilo en un mililitro del reactivo de hidroxilamina tamponada preparado como se describe en el capítulo II. Cuando se dio por finalizada la destilación se determinó el diacetilo en los destilados, refiriendo los resultados a los de las muestras 1 y 2, que se utilizaron como patrones internos, y a la gráfica patrón de la figura 7. En una alícuota de los residuos de destilación se determinó la acetoina por el método de WESTERFIELD, comparando los valores obtenidos con los correspondientes al análisis simultáneo de los tubos 5, 6 y 7. Los resultados figuran en la tabla 11.

TABLA XI
Recuperación del diacetilo en los destilados y acetoina en los residuos de destilación.¹

μ grs. en muestra		Diacetilo en los destilados		Acetoina en los residuos	
Acetoina	Diacetilo	(μ grs.)	Recup. (%)	(μ grs.)	Recup. (%)
—	30	30,2	100,7	0	—
—	30	29,6	98,7	0	—
30	30	29,2	97,3	31,2	104
30	30	29,8	99,3	29,6	98,7

¹ Destilación a 65° C bajo corriente de nitrógeno a un flujo de 150 mls/minuto. El diacetilo en los destilados se determinó por el método de OWADES y JAKOVAC y la acetoina en los residuos por el de WESTERFIELD.

3.3.2.b. Determinación de acetoina y diacetilo en preparaciones biológicas.

La aplicación del procedimiento que está siendo estudiado al ensayo de actividad diacetilo reductasa en preparaciones poco purificadas y al análisis de acetoina y diacetilo en medios de cultivo, presenta el inconveniente de que la proteína presente enturbia las muestras y no permite el empleo de métodos colorimétricos a menos que sea previamente retirada del medio. Con este fin se estudiaron diversos sistemas, de los que se eligió

la precipitación de las mismas por hidróxido de cinc según la técnica descrita por HALPERN y UMBARGER (1959), efectuándose el siguiente experimento para comprobar si la introducción de esta variante podría afectar a las determinaciones:

Se recogieron, por centrifugación a $3.000 \times g$ durante 10 minutos, células de *S. diacetilactis* cultivadas en 500 mls. de caldo lactosado a 25°C durante 36 horas y se lavaron tres veces con tampón fosfato bisódico-monopotásico 0,3 M pH 7, siendo recogidas en 15 mls. del mismo tampón y sonificadas en un aparato de ultrasonidos M. S. E. modelo «60» durante 15 minutos. Se prepararon también las siguientes soluciones en agua destilada: diacetilo 20 $\mu\text{grs./ml}$; acetona 20 $\mu\text{grs./ml}$; sulfato de cinc 1 N. e hidróxido sódico 1 N.

A partir de estas preparaciones se obtuvieron las siguientes muestras en un volumen de 5 mls: tubos 1 y 2, 30 $\mu\text{grs.}$ de diacetilo y 2 mls. de sonicado celular; tubos 3 y 4, 30 $\mu\text{grs.}$ de acetona, 30 $\mu\text{grs.}$ de diacetilo y 2 mls. de sonicado; tubos 5, 6 y 7, 5, 10 y 15 $\mu\text{grs.}$ de acetona respectivamente y 2 mls. de sonicado. A cada una de ellas se añadieron 0,5 mls. de sulfato de cinc 1 N. y 0,5 de hidróxido sódico 1 N.

Las muestras de los tubos 1, 2, 3 y 4 se destilaron en las condiciones habituales y en los destilados se determinó el diacetilo por el método de OWADES y JAKOVAC, refiriendo las lecturas a la gráfica patrón de la figura 7

TABLA XII

Determinación de acetona y diacetilo en un sonicado celular precipitado con hidróxido de cinc (Halpern y Umbarger, 1959). Recuperación del diacetilo en los destilados y acetona en los residuos de destilación.¹

$\mu\text{grs. en muestra}$		Diacetilo en los destilados		Acetona en los residuos	
Acetona	Diacetilo	($\mu\text{grs.}$)	Recup. (%)	($\mu\text{grs.}$)	Recup. (%)
—	30	29,7	99	0	—
—	30	30	100	0	—
30	30	29,5	98,3	31	103,3
30	30	31,1	103,6	30,6	102

¹ Destilación a 65°C bajo corriente de nitrógeno a un flujo de 150 mls./minuto. El diacetilo en los destilados se determinó por el método de OWADES y JAKOVAC y la acetona en los residuos por el de WESTERFELD.

y a las de las muestras 1 y 2, que se utilizaron como patrones internos. Los residuos de destilación se centrifugaron durante 10 minutos a $10.000 \times g$; en una alícuota del sobrenadante se determinó la acetona por el método de WESTERFELD, comparando los valores obtenidos con los correspondientes a los tubos 5, 6 y 7.

Los resultados obtenidos, que se recogen en la tabla 12, ponen de manifiesto que las determinaciones no se ven afectadas por la presencia de hidróxido de cinc en las muestras y que las recuperaciones de acetona y diacetilo son satisfactorias.

III.4. DISCUSIÓN

Según la descripción de sus autores, la técnica de WHITE, KRAMPITZ y WERKMAN (1946) permite el análisis de diacetilo a concentraciones entre 10 y 100 p. p. m. con resultados muy reproductibles, aunque «la intensidad de la coloración no es exactamente proporcional a la concentración». En nuestros experimentos la sensibilidad del método se ha revelado superior —entre 2,5 y 20 p. p. m., de 5 a 40 $\mu\text{grs.}$ en 2 mls. de muestra— pero las determinaciones han resultado poco reproductibles aun controlando cuidadosamente las condiciones de trabajo, lo que coincide con las observaciones de DE LEY (1959).

El método de OWADES y JAKOVAC (1963) permite la determinación directa de 5 a 50 $\mu\text{grs./muestra}$ de diacetilo. La sensibilidad de ambos métodos es, por tanto, muy similar, pero la destilación de las muestras permite concentrar el diacetilo y analizar preparaciones de concentración muy inferior a las utilizables para las determinaciones por el método de WHITE y col. La reproductibilidad de los resultados es plenamente satisfactoria, con recuperaciones de diacetilo en los destilados del orden del $99,5 \pm 2,5$ por ciento. La acetona no interfiere con el diacetilo en los análisis directos ni se oxida a diacetilo durante la destilación en las condiciones descritas.

Para la determinación colorimétrica de acetona se emplea casi universalmente la técnica de WESTERFELD (1945) o algunas de sus variantes, reacción a la que es igualmente positivo el diacetilo. Este método permite el análisis de muestras de diacetilo o acetona a la concentración de 0,2 a 3 p. p. m. (de 1 a 15 $\mu\text{grs.}$ en muestra de 5 mls.), pero los resultados no han sido muy reproductibles debido, en parte, a la escasa estabilidad de la coloración ya que simultáneamente con la reacción de formación del color

tiene lugar otra de decoloración. Tanto el desarrollo del color como la pérdida del mismo son más rápidos cuando el substrato es diacetilo que cuando es acetoina, determinando la combinación de ambas reacciones que la máxima intensidad de color se alcance, a la temperatura de 20° C., hacia los 15 minutos de incubación en las muestras de diacetilo y a los 90 en las de acetoina. La temperatura, especialmente en los análisis practicados sobre la acetoina, afecta considerablemente al balance establecido entre las dos reacciones, por lo que es muy conveniente prestar atención al control preciso de la temperatura o elegir un momento distinto de lectura según la temperatura de incubación de las muestras.

Por otra parte, de los tres reactivos que intervienen en la reacción sólo la creatina puede variarse —al menos entre la mitad y el doble de las concentraciones recomendadas por el autor del método— sin afectar a las lecturas. Las variaciones tanto en la concentración de sosa como de α -naftol se traducen en modificaciones considerables de la evolución del color a lo largo del tiempo y/o de los valores de la absorbancia máxima, lo que dificulta notablemente la obtención de resultados idénticos en series diferentes de determinaciones porque las soluciones de α -naftol en sosa han de ser preparadas inmediatamente antes de su uso.

La absorbancia de las muestras no es nunca una función lineal exacta de la concentración de acetoina y diacetilo (hasta 15 μ grs./muestra) y si las lecturas se efectúan a lo largo del tiempo las representaciones de la absorbancia en función de la concentración van alejándose progresivamente de la linearidad. En cambio sí son lineales las representaciones de las absorbancias obtenidas por extrapolación a tiempo cero de las gráficas de evolución del color, lo que demuestra que la falta de linearidad de las gráficas patrón se debe a las interferencias de la reacción de decoloración.

Se recomienda por todo ello modificar el método de WESTERFELD en los siguientes sentidos: a) preparar una gráfica patrón con cada serie de análisis; b) incubar las muestras a 20°C.; y c) efectuar las lecturas al cabo de 15 minutos de incubación en las muestras de diacetilo y de 90 en las de acetoina.

Las lecturas de la coloración desarrollada por el diacetilo y la acetoina en las determinaciones por el método de WESTERFELD de muestras que contienen ambas sustancias dan siempre valores inferiores a la suma de los obtenidos en los análisis por separado de cantidades idénticas a las que componen la muestra, lo que se debe tanto a la falta de linearidad

de las representaciones de la absorbancia en función de la concentración de AMC o diacetilo, como al hecho de que la reacción de decoloración no sigue el mismo curso en las muestras de diacetilo que en las de acetoina. Por lo tanto, las determinaciones de acetoina descontando la absorbancia correspondiente al diacetilo de la total (diacetilo más acetoina) valorada por el método de WESTERFELD (véase DE LEY, 1959) no son válidas a menos que la concentración de AMC en las muestras sea muy superior a la de diacetilo y puedan despreciarse las interferencias de éste en los análisis.

Para evitar estos inconvenientes se propone un procedimiento basado en separar el diacetilo de las muestras por destilación a 65° C bajo corriente de nitrógeno y determinar la acetoina por el método de WESTERFELD en los residuos de destilación y el diacetilo en los destilados por la técnica de OWADES y JAKOVAC. Este sistema permite efectuar determinaciones a niveles de hasta 0,2 p. p. m. con recuperaciones de acetoina del orden del $102 \pm 1,8$ por ciento y es aplicable al análisis de preparaciones biológicas que contienen proteínas en suspensión precipitando éstas con hidróxido de cinc según la técnica de HALPERN y UMBARGER (1959).

Con el mismo objeto que el procedimiento aquí estudiado, SPECKMAN y COLLINS (1968, a) han descrito una técnica para la separación de la acetoina y el diacetilo por cromatografía en columna de intercambio iónico, aparecida en la bibliografía después de haber sido realizados los experimentos que se describen en este capítulo. El método aquí propuesto es más rápido y simple y mucho más fácilmente adaptable al análisis simultáneo de grandes series de muestras.

CAPITULO IV

PURIFICACION Y PESO MOLECULAR DE LA DIACETILO REDUCTASA DE HIGADO DE TERNERA.

IV.—1. INTRODUCCION

Los enzimas se encuentran en la naturaleza en mezclas complejas, generalmente en células que contienen centenares de enzimas distintos,

por lo que el estudio particular de cada uno de ellos requiere su purificación previa. Es cierto que en algunos casos es posible estudiar determinadas propiedades de un enzima en preparaciones no purificadas, siempre que se disponga de un método de ensayo suficientemente específico, pero casi siempre otros enzimas también presentes en los análisis atacarán a los substratos, a los productos o al enzima mismo.

Los primeros intentos serios de purificación de preparaciones enzimáticas comenzaron hacia el año 1922 y ya en el 1926 SUMNER describió una técnica para la obtención de un enzima en estado cristalino, la ureasa (urea amidohidrolasa, E. C. 3.5.1.5).

El proceso de purificación va precedido de la extracción del enzima, lo que suele requerir la ruptura de las membranas celulares, a menos que éste sea segregado al medio. Entre los métodos que pueden aplicarse con este fin figuran la trituración de los tejidos en homogeneizadores de vidrio o de cuchillas, la sonicación y la extracción con ciertos solventes, como la acetona. Este último procedimiento tiene además la ventaja de que, con frecuencia, el polvo resultante puede ser almacenado sin pérdida de actividad, aunque algunos enzimas son muy poco estables en estas condiciones. En ciertos casos, especialmente cuando se trabaja con levaduras, el único método aplicable en gran escala es la autolisis, permitiendo que los propios enzimas intracelulares destruyan las membranas.

La purificación consiste en una serie de fraccionamientos mediante los cuales la proteína enzimática que se desea purificar se separa del resto de los componentes de extracto. Con este objeto se han utilizado diversos procedimientos, pero en la actualidad la mayor parte de las purificaciones se efectúan haciendo uso de un número relativamente limitado de técnicas que la experiencia ha revelado particularmente eficaces. Las más importantes son:

(1) *Precipitación*

Los enzimas son proteínas, generalmente provistas de un grupo prostético (que determina su mecanismo de acción) ligado permanentemente o no a la fracción proteica de la molécula, y en solución se comportan como tales.

Las proteínas son sustancias anfóteras que contienen, por lo tanto, grupos cargados positiva y negativamente, cuyo balance depende fundamentalmente del pH del medio. La solubilidad de una proteína en el

agua es consecuencia de las interacciones establecidas entre sus grupos ionizables y las moléculas del disolvente. Por otra parte, en una solución de proteínas se dan también interacciones electrostáticas entre las propias moléculas proteicas, con una intensidad directamente proporcional al producto de las cargas e inversamente al cuadrado de la distancia y a la constante dieléctrica del medio, según la conocida fórmula:

(Ec. IV. 1).

$$F = e^+ \cdot e^- / D \cdot r^2$$

Si dominan las interacciones proteína-proteína, las moléculas proteicas forman agregados y finalmente precipitan.

En estos principios se basan diversas técnicas de fraccionamiento:

(a) Precipitación fraccionada por cambios de pH. En general, las proteínas presentan un mínimo de solubilidad en su punto isoeléctrico. Aunque éste no es uno de los métodos de fraccionamiento más importantes, suele ser conveniente como primera etapa de la purificación acidificar el medio hasta valores en torno a pH 5, siempre que las características de la proteína enzimática lo permitan, y eliminar el precipitado por centrifugación, con lo que se retira la mayor parte de los nucleoproteídos.

(b) Precipitación fraccionada por disolventes orgánicos.—El efecto precipitante de los disolventes orgánicos, como el etanol o la acetona, se debe a su baja constante dieléctrica, por lo que su adición al medio favorece las interacciones proteína-proteína.

Este tipo de técnicas constituye uno de los principales métodos de fraccionamiento, con la limitación de que la mayor parte de los enzimas son inactivados por los disolventes orgánicos a la temperatura ambiente, lo que obliga a tomar precauciones especiales. Las muestras han de estar sumergidas en un baño de hielo o en una salmuera débil durante la adición del disolvente, que a su vez se mantiene a temperaturas en torno a -15°C y, salvo casos muy especiales, la separación del precipitado requiere el uso de centrífugadoras refrigeradas.

(c) Precipitación fraccionada por sales.—La presencia de sales en una precipitación acuosa afecta en diversas formas a la solubilidad de las proteínas: de un lado, la dissociación de la sal en sus correspondientes iones aumenta el número de grupos cargados en el medio y la solubilidad de las proteínas tiende a incrementarse, pero la actividad de agua disminuye a medida que aumenta la concentración salina, hasta que se al-

canza un punto en que las interacciones proteína-proteína superan a las que se establecen entre las moléculas proteicas y el agua.

Cada proteína tiende a precipitar en un intervalo de fuerza iónica definido que depende, para cada especie proteica, del pH y la temperatura del medio, de la naturaleza de la sal y de la propia concentración de la proteína.

La sal más empleada para los fraccionamientos por precipitación es el sulfato amónico, tanto por su gran solubilidad en agua como por carecer de efectos nocivos sobre la mayoría de los enzimas.

(d) Desnaturalización fraccionada por calentamiento.—Este procedimiento es útil para la purificación de proteínas relativamente poco sensibles a la acción del calor, lo que se ve favorecido por el hecho de que, con frecuencia, la presencia del substrato ejerce un efecto estabilizante específico sobre el enzima. Aunque no es una técnica de uso general, puede ser muy conveniente someter a las preparaciones a un tratamiento térmico inmediatamente inferior al necesario para desnaturalizar el enzima en presencia o no de su substrato y eliminar el precipitado por centrifugación.

(2) Adsorción fraccionada

El adsorbente más utilizado es el gel de fosfato cálcico, aunque también se emplean el gel de alúmina, el carbón vegetal y algunos otros. Este método puede ser aplicado de dos formas distintas. Si el enzima no se adsorbe, el tratamiento puede servir para retirar de la solución enzimática gran parte de los materiales no deseados. Si es adsorbido, podrá así ser separado de otros componentes de la solución que no lo son y posteriormente extraído del adsorbente.

En este segundo caso, el más frecuente, la técnica a utilizar consiste en agitar la solución, en condiciones y en proporción previamente determinadas por experiencias piloto, en presencia de la cantidad necesaria de gel para retener toda la proteína inactiva que es adsorbida antes de que lo haga el enzima, retirar el gel de la muestra por centrifugación, añadir más adsorbente hasta que quede retenida toda la actividad y recuperar éste por el mismo procedimiento empleado anteriormente. La extracción del enzima adsorbido se efectúa dispersando el gel en tampones de concentración creciente o, si este tratamiento es insuficiente, en soluciones de sulfato amónico, que puede ser retirado posteriormente de las preparaciones por diálisis siempre que la estabilidad del enzima lo permita.

(3) Fraccionamiento por electroforesis preparativa.

La preparación de fracciones proteicas por electroforesis se basa en la migración diferencial de las proteínas hacia uno de los polos cuando se las somete a la acción de un campo eléctrico. El sentido y la velocidad de migración dependen de la carga neta de la molécula y, puesto que a su vez la carga neta es dependiente del pH del medio, las posibilidades teóricas del método son casi infinitas. Este tipo de técnicas han comenzado a tomar importancia recientemente, desde que se ha introducido el uso de procedimientos de electroforesis del alto voltaje y de geles de poliacrilamida como soporte, pero el elevado coste de los materiales que se requieren ha limitado, hasta cierto punto, su extensión.

(4) Cromatografía en columna

Cuando las muestras ya han sido parcialmente purificadas suelen conseguirse muy buenos resultados mediante el uso de técnicas de cromatografía en columna, cuya principal limitación radica en que su capacidad de carga es relativamente escasa. La separación se basa, en los distintos casos, en la adsorción, el intercambio iónico, la filtración molecular o la combinación de estos efectos.

(a) Cromatografía de adsorción en columna.—Se emplean principalmente ciertas formas de gel de fosfato cálcico mezcladas con materiales granulares, como la celulosa, o derivados de éste, como el gel de hidroxiapatita.

(b) Cromatografía de intercambio iónico.—El producto más utilizado para la purificación de proteínas por este tipo de cromatografía es la dietil-aminoethyl-celulosa (DEAE-celulosa). Aunque menos frecuentemente, también son aplicables a este objeto la carboximetil-celulosa (CM-celulosa) y diversas resinas de intercambio iónico, en particular la amberlita IRC-50.

(c) Cromatografía de filtración molecular. Determinación de pesos moleculares.—Los soportes que se utilizan para cromatografías de filtración molecular son geles porosos tridimensionales de polisacáridos (Sephadex). Estos métodos se basan en el principio de que las moléculas más pequeñas son capaces de penetrar en el interior de los poros del gel, en los que son retenidas, con el resultado de que si hacemos fluir una solución de proteínas a través de un lecho de gel, se eluirán más rápidamente cuanto menor sea el número de partículas que tengan que atravesar, es decir, cuanto mayor sea su tamaño molecular.

Esta propiedad constituye también el fundamento del uso de la filtración en geles porosos para la determinación de pesos moleculares. Considerando un gel de características definidas y constantes, el coeficiente de reparto de las moléculas de una proteína entre el interior y el exterior de las partículas cuando se haya alcanzado el equilibrio es función inversa de su tamaño. Este coeficiente (K_{av}) se calcula experimentalmente haciendo uso de la expresión:

(Ec. IV. 2)

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

en que V_e es el volumen de elución de la proteína correspondiente a los mililitros eluidos desde el momento en que se aplicó la muestra hasta que el soluto problema alcanza su concentración máxima en el eluido; V_t representa el volumen total ocupado por el lecho del gel, y V_o —volumen vacío—el volumen interparticular, que puede ser determinado midiendo el volumen de elución de una sustancia que, por su gran tamaño molecular, sea completamente excluida del gel.

En ausencia de efectos de adsorción o interacción electrostática entre el cromatografiado y el gel, que son muy poco frecuentes, las representaciones de los K_{av} correspondientes a proteínas de idéntica o muy parecida configuración y determinados en las mismas condiciones experimentales, en función del logaritmo de sus pesos moleculares da, dentro de ciertos límites impuestos por el tamaño y forma de la proteína y las características del gel, una línea recta de pendiente negativa, lo que permite determinar el peso molecular de proteínas de tamaño desconocido por interpolación en las gráficas obtenidas con proteínas de peso molecular conocido.

IV. 2.—MATERIAL Y METODOS.

Determinaciones de proteína

Se efectuaron por su extinción a 280 y 260 m μ (WARBURG y CHRISTIAN, 1941) y por la técnica de biuret descrita por CHANCE y REDFEARN (1961).

Determinaciones de actividad diacetilo reductasa

Se llevaron a cabo mediante el método espectrofotométrico que se describe en la metodología general.

Preparación de extractos acuosos de órganos y tejidos.

Los diferentes órganos y tejidos fueron obtenidos de animales recién sacrificados y, en los casos en que fue necesario, se transportaron al laboratorio en baños de hielo. A partir de ellos se preparó un homogeneizado en 10 volúmenes de agua destilada fría (0 - 4° C.) con un homogeneizador de cuchillas M. S. E.

Obtención de polvo acetónico de hígado de ternera.

Las muestras de hígado fresco se consiguieron en el Matadero Municipal de León y fueron decapsuladas y trituradas con el homogeneizador de cuchillas en presencia de 10 volúmenes de acetona a -15° C. El homogeneizado se agitó durante 15 minutos y se filtró a vacío a través de una capa de papel de filtro. La operación se repitió con el precipitado recogido y el polvo final resultante fue cuidadosamente comprimido entre dos capas de papel de filtro para eliminar en lo posible la acetona y almacenado en un congelador a -15° C.

Preparación de extractos acuosos de polvo acetónico.

El polvo acetónico se suspendió en los volúmenes de agua destilada que se citan en la descripción de cada experiencia mediante 30 minutos de agitación con un agitador mecánico, manteniendo frías las muestras por inmersión en baño de hielo.

La fracción insoluble se eliminó por centrifugación a 12.000 \times g durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada. El sobrenadante se filtró a través de dos capas de papel de filtro.

Liofilización de las fracciones precipitadas con acetona.

La proteína que precipita entre los rangos de concentración acetónica citados en la descripción de cada experiencia fue depositada por centrifugación a 12.000 \times g durante 10 minutos y redisuelta en unos 15 mls. de agua destilada fría. La solución fue congelada por inmersión en un baño de acetona saturada con nieve carbónica y liofilizada en el sistema descrito en la metodología general.

Preparación de gel de fosfato cálcico.

Se efectuó a partir de cloruro cálcico y fosfato trisódico, siguiendo la técnica de KEILIN y HARTREE (1938).

Cromatografías de intercambio iónico en DEAE-cellulosa.

Las cromatografías de intercambio iónico fueron realizadas en DEAE-22 y DEAE-32 ((Whatman).

Preparación de las columnas—El DEAE se suspendió en 25 volúmenes de ácido clorhídrico 0,5 N. en cuyo medio se dejó reposar durante 30 minutos. El sobrenadante fue eliminado por decantación y el depósito lavado en un embudo de Büchner con agua desionizada hasta que el elu-

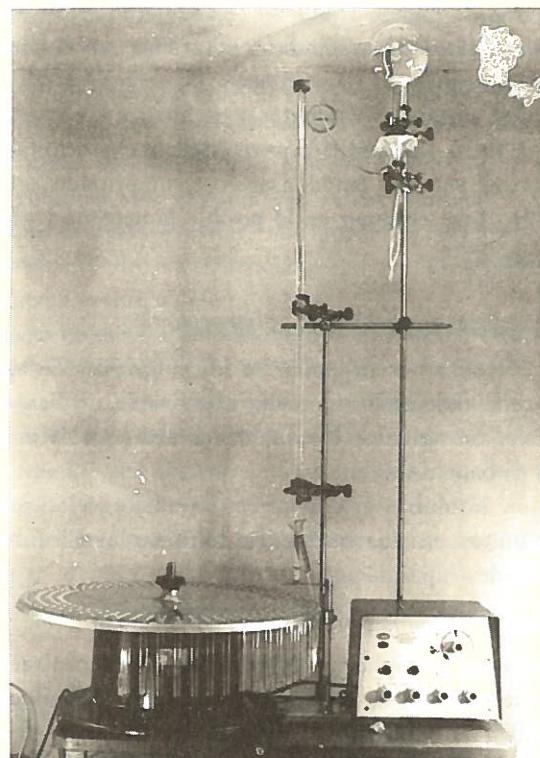


Figura 18.—Dispositivo utilizado para las cromatografías de intercambio iónico y las de filtración molecular.

yente alcanzó un pH de 4; se suspendió entonces el DEAE en otros 25 volúmenes de sosa 0,5 N. Tras otro período de reposo de 30 minutos se retiró el sobrenadante y se lavó el depósito resultante hasta alcanzar un pH de 8. Las partículas finas se eliminaron por sucesivas operaciones de

suspensión y decantación. Finalmente el DEAE se lavó con tampón fosfato, bisódico monopotásico pH 6,3 0,025 M. hasta que el pH del eluido se igualó al del tampón, se suspendió en unos 100 mls. del mismo buffer y se vertió en la columna cromatográfica dispuesta verticalmente en una cámara fría (0 — 5° C).

Aplicación de las muestras.—A través de la columna así preparada se dejó circular durante 24 horas tampón fosfato 0,025 M. pH 6,3 para asegurar el equilibrio. Transcurrido este período se colocó en la superficie del DEAE un disco de papel de filtro, sobre el cual y mediante una pipeta capilar se aplicaron cuidadosamente las muestras, evitando perturbar el lecho cromatográfico.

Elución.—Se hizo uso del dispositivo que se muestra en la figura 18. Como presión hidrostática se consideró la diferencia de altura entre la superficie del eluyente en el embudo de vidrio y la boca del tubo de salida de la columna, despreciando las pequeñas diferencias debidas a la densidad de los eluyentes.

Recogida de fracciones.—Se empleó un colector de fracciones «LKB» modelo «Radirac 3403 b».

Cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-100.

Preparación de la columna.—Se dejó hidratar el Sephadex durante tres días a la temperatura ambiente en unos 100 volúmenes de agua destilada (p/v). El sobrenadante se retiró por decantación y el depósito fue vertido en una columna cromatográfica en las mismas condiciones descritas para las cromatografías en DEAE. El gel se dejó empaquetar durante 12 horas a la presión hidrostática que se utilizó durante las cromatografías subsiguientes.

Elución.—Se siguió el mismo procedimiento que se ha descrito para las cromatografías de intercambio iónico.

Aplicación de las muestras.—Se añadió a las preparaciones cantidad suficiente de sacarosa para formar una solución muy densa que se aplicó sobre la superficie del gel mediante una pipeta capilar de punta curvada en ángulo recto. Las muestras quedaron así depositadas sobre el lecho del gel, formando una capa claramente separada por su densidad del resto del líquido de la columna.

Determinación del volumen vacío.—Se consideró como tal el volumen de elución del dextrano azul (Pharmacia), que por su elevado peso molecular — 2×10^6 — es completamente excluido del Sephadex G × 100.

IV. 3. RESULTADOS.

IV. 3.1. EXPERIENCIAS PREVIAS.

3.1.1. Actividad diacetilo reductasa en órganos y tejidos de diversas especies animales.

Se investigó la distribución de la actividad diacetilo reductasa en órganos y tejidos procedentes de diversas especies animales para averiguar cuál sería más adecuado como material de partida. Con este objeto se ob-

TABLA XIII

Distribución de la actividad diacetilo reductasa en órganos y tejidos de diversas especies animales.

Extracto ¹	Actividad específica ²
<i>Rata</i>	
Hígado	3,4
Riñón	1
Corazón, cerebro, músculo y bazo.....	No detectada
<i>Conejo</i>	
Hígado	2
Riñón	1,6
Músculo y bazo	No detectada
<i>Ternera</i>	
Hígado	2,5
<i>Paloma</i>	
Hígado	25
Riñón	15
Músculo esquelético	8,1
Corazón	3,4
Cerebro	2,8
<i>Gallina</i>	
Hígado	18

¹ Extractos acuosos (5 vols. agua/vol. de tejido).

² En nmoles de diacetilo reducidos/min./mgr. de proteína.

tuvieron, en días sucesivos, los extractos acuosos (cinco volúmenes de agua por volumen de tejido) cuya procedencia figura en la tabla 13, en los que se determinó la actividad diacetilo reductasa mediante la técnica espectrofotométrica descrita en la metodología general y la proteína por el método del biuret.

Los resultados obtenidos figuran en la tabla 13. Aunque la actividad específica más alta fue la determinada en el hígado de paloma, se ha preferido partir del hígado de ternera dada la mayor facilidad de obtención de los grandes volúmenes de muestra que requieren los procesos de purificación.

3.1.2. Estabilidad de la actividad diacetilo-reductasa en los extractos acuosos de hígado de ternera.

La estabilidad de los enzimas en las preparaciones brutas de órganos y tejidos suele ser poco satisfactoria, lo que constituye un inconveniente para la purificación de los mismos. Se investigó por ello cómo afectaba a la actividad diacetilo reductasa el almacenamiento a refrigeración y congelación:

A partir de 10 grs. de hígado de ternera fresco se preparó un extracto en 100 mls. de agua destilada. Una alícuota fue congelada y conservada a -15°C durante 24 horas, al cabo de las cuales se descongeló en un baño de agua a 4°C y se analizó su actividad diacetilo reductasa. El resto del extracto se almacenó a 0°C ., efectuándose determinaciones de actividad a tiempo cero y al cabo de 4, 10 y 24 horas.

En la tabla 14 se recogen los resultados obtenidos.

TABLA XIV
Estabilidad de la actividad diacetilo reductasa en los extractos acuosos de hígado de ternera (10 vol. de agua/vol. de tejido).

Período de almacenamiento (horas).	Temperatura de almacenamiento ($^{\circ}\text{C}$)	Actividad ¹ por ml. de muestra.	% de pérdida de actividad
0	0	18	—
4	»	16,9	6,1
10	»	15,7	12,7
24	»	15,1	16,1
24	-15	14,2	21

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

VI. 3.2. PURIFICACIÓN: ESTUDIOS PRELIMINARES.

3.2.1. Extracción con acetona.

En vista de los resultados de los experimentos anteriores, se consideró conveniente averiguar si podían conseguirse rendimientos aceptables mediante la extracción con acetona y si la estabilidad durante el almacenamiento del enzima obtenido en estas condiciones sería satisfactoria.

Se tomaron dos fracciones de 20 grs. de hígado de ternera fresco. A partir de una de ellas se preparó un extracto en 10 volúmenes de agua destilada, obteniéndose de la otra un polvo acetónico y un extracto del mismo en 5 volúmenes de agua destilada, mediante las técnicas que se describen en el apartado IV. 2 de este capítulo; terminadas estas operaciones se midieron los volúmenes correspondientes a ambos extractos y se determinó la actividad diacetilo reductasa y la proteína.

Los resultados de esta experiencia figuran en la tabla 15, poniendo de manifiesto que la extracción con acetona es equivalente en rendimiento a la acuosa con la ventaja de que se obtiene mayor actividad específica. En vista de ello se consideró conveniente la obtención sistemática de polvo acetónico como primera etapa de purificación de todas las muestras de hígado.

Todas las preparaciones de polvo acetónico obtenidas se conservaron en un congelador a -15°C , habiéndose comprobado repetidas veces durante la realización de esta tesis que la estabilidad de la actividad diacetilo

TABLA XV
Comparación entre los rendimientos obtenidos por extracción acuosa y acetónica de la actividad diacetilo-reductasa.

	Actividad ¹ por ml.	Proteína (mgrs.) por ml.	Activ. por mgr. proteína	Volumen total (mls.)	Activ. ¹ total ²
Extracción acuosa	16,6	7,2	2,3	205	3.403
Extracción acetónica	56,1	13,7	4,1	63	3.543

¹ En nmoles de diacetilo reducido por minuto.

² En 20 grs. de hígado. Los extractos acuosos se obtuvieron en 10 volúmenes de agua destilada. La extracción acetónica se llevó a cabo con 10 volúmenes de acetona/vol. de hígado y del polvo resultante se obtuvo un extracto en 5 volúmenes de agua.

reductasa en estas condiciones es muy elevada: no se han observado pérdidas significativas de actividad en períodos de almacenamiento de hasta tres meses.

En las experiencias descritas en este capítulo puede comprobarse que la actividad específica de los extractos acuosos de polvo acetónico es muy variable (entre 4 y 9 nmoles de diacetilo reducidos/minuto/mgr. de proteína), lo que se debe tanto a la variabilidad de la actividad específica de la muestra original como a las condiciones de extracción, que han mostrado ser muy críticas.

3.2.2. Precipitación de las proteínas por acidificación con ácido acético.

Con objeto de determinar si la precipitación por acidificación podría ser útil como procedimiento de purificación, se llevó a cabo el siguiente experimento:

Se preparó un extracto acuoso de 20 grs. de polvo acetónico en 5 volúmenes de agua destilada, a partir del cual se obtuvieron seis muestras de 10 mls., de las cuales una se conservó como testigo y las otras cinco fueron acidificadas a pH 5, 4,8, 4,6, 4,2 y 4, respectivamente, con ácido acético al 10 por ciento en agua. Las preparaciones se dejaron reposar, sumergidas en baño de hielo, durante 4 horas, reajustándose el pH a los 30, 90 y 180 minutos con la misma solución de acético para compensar la progresiva pérdida de acidez.

TABLA XVI
Precipitación de las proteínas del extracto acuoso de polvo acetónico de hígado de ternera por acidificación con ácido acético.

Sobrenadante de la precipitación a pH	Actividad ¹ por mgr. de proteína	Actividad ¹ total
5	2,07	285,6
4,8	2,31	276,5
4,6	2,03	252,5
4,4	1,59	196,7
4,2	1,64	201,6
Testigo	6,42	848

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

Al cabo de 4 horas se eliminaron los precipitados por centrifugación a $12.000 \times g$ durante 10 minutos. El pH de los sobrenadantes se ajustó a 6,1 con sosa 2,5 N y se determinó la actividad diacetilo reductasa y la proteína, por el método del biuret, en las distintas preparaciones.

Los resultados de esta experiencia, que figuran en la tabla 16, demuestran la inaplicabilidad de la técnica estudiada para la purificación de las preparaciones de diacetilo reductasa, puesto que se aprecia una fuerte pérdida de actividad no imputable a cambios en el pH de ensayo, ya que las muestras habían sido previamente neutralizadas.

3.2.3. Precipitación por acidificación con ácido clorhídrico.

Puesto que no es muy probable que un enzima que, como se indica en el capítulo VII, tiene un pH óptimo de 6,1 precipite ya en su mayor parte a pH 5, los datos obtenidos en el experimento anterior hicieron sospechar que el ion acetato inhibía la reacción, de lo que ya se tenían referencias indirectas procedentes de los resultados de otros análisis dirigidos a determinar las condiciones más favorables de ensayo. En consecuencia, se decidió repetir la experiencia descrita en 3.2.2., sustituyendo el ácido acético por ácido clorhídrico 1/10 N.; los efectos de la precipitación en medio ácido se estudiaron en un rango de pH más elevado, entre 4,5 y 5,5.

En la tabla 17 se recogen los resultados obtenidos. Aunque en los sobrenadantes de la precipitación a pH 5,5 y 5,25 las pérdidas de actividad son de escasa consideración, la eficacia de la técnica estudiada como método

TABLA XVII

Precipitación de las proteínas del extracto acuoso de polvo acetónico de hígado de ternera por acidificación con ácido clorhídrico.

Sobrenadante de la precipitación a pH	Actividad ¹ por mgr. de proteína	Actividad ¹ total
5,5	8,6	1.020,5
5,25	8,1	983,6
5	7	854,6
4,75	5,5	721
4,5	2,2	380,4
Testigo	6,7	1.056

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

de purificación es muy dudosa, puesto que la actividad específica apenas resulta multiplicada por un factor de 1,3 en el caso más favorable.

3.2.4. Precipitación con sulfato de protamina.

La precipitación con sulfato de protamina es muy útil en la purificación de las preparaciones de diacetilo reductasa bacteriana por la técnica de STECKER y HARARY (1954), por lo que se consideró conveniente comprobar sus posibilidades de aplicación a la purificación de nuestras muestras.

Con este objeto se obtuvieron unos 50 mls. de extracto acuoso de polvo acetónico (5 mls. de agua destilada/gr. de polvo acetónico), de los que 40 fueron utilizados en la realización de esta experiencia y el resto conservados como testigo en baño de hielo. Los 40 mls. de extracto fueron colocados en un recipiente refrigerado mediante una camisa de hielo y agitados con un agitador magnético mientras se añadía lentamente un 8 por ciento de su volumen (3,2 mls.) de una solución de sulfato de protamina al 0,2 por ciento. La suspensión resultante se dejó reposar durante 10 minutos y se centrifugó a $12.000 \times g$ 10 minutos en una centrifuga refrigerada. El depósito se descartó.

Una alícuota del sobrenadante (1,5 mls.) se conservó en baño de hielo para la determinación de proteína y actividad diacetilo reductasa;

TABLA XVIII

Precipitación con sulfato de protamina de las proteínas del extracto acuoso de polvo acetónico de hígado de ternera.

Sobrenadante. Fracción ¹	Actividad ² total	Proteína total (mgrs.)	Actividad ² por mgr. de proteína
0 - 8 %	5.436,6	672,4	8
8 - 12 %	4.934,1	622,1	7,95
12 - 16 %	4.615,8	580,2	7,95
16 - 20 %	4.281,6	553	7,7
20 - 30 %	3.198,7	523,6	6,1
Testigo	5.456	720	7,6

¹ Los porcentajes se refieren a los volúmenes añadidos de una solución al 0,2 por ciento de sulfato de protamina por 100 volúmenes de extracto acuoso de polvo acetónico.

² En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

al resto se le añadió la cantidad necesaria de la solución de sulfato de protamina para que la citada solución estuviese en proporción de un doce por ciento respecto al extracto acuoso original. Tras 10 minutos de reposo, el precipitado fue eliminado por centrifugación. Se conservó una alícuota del sobrenadante y al resto se le añadió más sulfato de protamina.

Por sucesivas aplicaciones de este procedimiento, se obtuvieron muestras de los sobrenadantes correspondientes a las fracciones 0 - 8 %, 8 - 12 %, 12 - 16 %, 16 - 20 %, 20 - 30 % en las que se analizó la proteína (método del biuret) y la actividad diacetilo reductasa.

En la tabla 18 se recogen los resultados de las determinaciones de actividad específica, actividad total y proteína total, calculadas para un volumen inicial de extracto de 40 mls. y corregidas teniendo en cuenta los volúmenes que fueron retirados para la realización de los ensayos.

3.2.5. Precipitación por acetona.

En una cámara frigorífica a 0 - 4º C. se añadieron a 20 mls. de un extracto de polvo acetónico en 4 volúmenes de agua destilada, 0,25

TABLA XIX
Purificación de un extracto acuoso (1/4) de polvo acetónico por precipitación fraccionada con acetona.

Fracción precipitada entre (vols. acetona / vol. extracto)	Actividad ¹ total	Proteína total (mgrs.)	Actividad ¹ por mgr. proteína
0 - 0,25	68,4	15,9	4,3
0,25 - 0,4	278,7	86,5	3,22
0,4 - 0,55	528,2	77	6,86
0,55 - 0,7	570,5	66,8	8,54
0,7 - 0,85	298,8	19,4	15,4
0,85 - 1	284,6	9,7	29,2
1 - 1,5	729,5	9,7	75,55
1,5 - 2,5	25,9	4	6,63
	2.784,6	289	
Testigo	2.602,5	302	8,6
Recuperación	106,9 %	95,7 %	

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

volúmenes de acetona comercial a -15º C., lentamente y agitando la muestra con un agitador magnético para conseguir una distribución homogénea del agente precipitante en la solución. Terminada la adición de acetona, la suspensión se dejó reposar durante 15 minutos en un baño de salmuera a -4º C. y se centrifugó en una centrífuga refrigerada a 12.000 \times g durante 10 minutos.

El depósito resultante se suspendió en unos pocos mililitros de agua destilada fría (0 - 4º C) y se conservó en un baño de hielo. Al sobrenadante se le fue añadiendo sucesivamente más acetona, y se obtuvieron así los sedimentos de las fracciones 0,25 - 0,4 volúmenes, 0,4 - 0,55, 0,55 - 0,7, 0,7 - 0,85, 0,85 - 1, 1 - 1,5 y 1,5 - 2,5.

Los datos de actividad específica proteína total y actividad total en los depósitos de las fracciones obtenidas se recogen en la tabla 19. Puede observarse que se consigue un considerable incremento de la actividad específica en el depósito de la fracción 1 - 1,5, que se multiplica por un factor de aproximadamente 9, con un rendimiento en torno al 30 por ciento.

3.2.6. Precipitación con sulfato amónico.

En los dos experimentos que se describen a continuación se ha estudiado la distribución de la actividad diacetilo reductasa en las fracciones proteicas que precipitan a concentraciones de sulfato amónico entre 0 y 100 por ciento de saturación.

Experimento 1.

A partir de 100 mls. de extracto acuoso de polvo acetónico en cuatro volúmenes de agua destilada se obtuvieron las fracciones que figuran en la tabla 20 mediante la siguiente técnica:

El extracto fue colocado en un baño de hielo y agitado con un agitador magnético, mientras se le añadía, lentamente, la cantidad necesaria de una solución saturada de sulfato amónico para llevar la concentración de éste en la preparación hasta un 30 por ciento de saturación; el volumen a añadir por cada 100 mls. de muestra se calculó haciendo uso de la fórmula:

$$(Ec. IV. 3)$$

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

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

La suspensión se dejó reposar 30 minutos en el baño y se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 10 minutos. El depósito se recogió en tampón fosfato 0,1 M pH 6,1 y al sobrenadante se le añadió de nuevo solución saturada de sulfato amónico, en idénticas condiciones, hasta una concentración de 40 por ciento saturación en la muestra. Por el mismo procedimiento se obtuvieron las demás fracciones, excepto el precipitado entre el 90 y el 100 por ciento para lo que se añadió sulfato amónico sólido.

Los resultados obtenidos figuran en la tabla 20, mostrando que, aunque las recuperaciones de actividad y proteína son satisfactorias y la mayor parte de la actividad se recoge en los depósitos del 40 al 70 por ciento, el incremento de actividad específica que podría obtenerse es pequeño.

TABLA XX
Precipitación con sulfato amónico: Fraccionamiento del extracto acuoso de polvo acetónico.

Depósito de la fracción	Proteína total (mgrs.)	Actividad ¹ total	Actividad ¹ por mgr. de proteína
0 - 30 % saturac.	126,7	147,9	1,2
30 - 40 % »	147,8	1.064,2	7,2
40 - 45 % »	231,8	1.845,1	8
45 - 50 % »	245,7	2.125,3	8,6
50 - 55 % »	232	3.480	15
55 - 60 % »	214,4	2.208,3	10,3
60 - 65 % »	178,6	1.916,4	10,7
65 - 70 % »	113,4	1.443,6	12,7
70 - 80 % »	95	1.108,6	11,6
80 - 90 % »	89	203,8	2,3
90 - 100 % »	64,4	0	0
	1.638,8	15.538,2	
Muestra original	1.660	14.608	8,8
Recuperación....	99 %	106 %	

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

Experimento 2.

En 10 mls. de tampón fosfato 0,1 M pH 6,1 se preparó una suspensión de unos 40 mgrs. de liofilizado de la fracción que precipita entre 0,9 y 1,5 volúmenes de acetona y fue centrifugada a $24.000 \times g$ durante 10 minutos, con lo que se obtuvo un sobrenadante transparente. A partir de 6 mls. de esta muestra se obtuvieron, mediante el procedimiento descrito en el experimento anterior, los depósitos de las fracciones 0 - 30 %, 30 - 40 %, 40 - 50 %, 50 - 60 %, 60 - 70 % y 70 - 100 % de saturación, que fueron recogidos en tampón fosfato 0,1 M. pH 6,1, y en los que se analizó la proteína y la actividad diacetilo reductasa.

Los resultados de este experimento se recogen en la tabla 21.

TABLA XXI
Precipitación con sulfato amónico: Fraccionamiento de la proteína previamente precipitada a concentraciones de acetona entre 0,9 y 1,5 volúmenes.

Depósito de la fracción	Proteína total (mgrs.)	Actividad ¹ total	Actividad por mgr. de proteína
0 - 30 % saturación	1,5	69,3	46,2
30 - 40 % »	2	124,4	62,2
40 - 50 % »	5,8	529,5	91,3
50 - 60 % »	5,8	510,4	88
60 - 70 % »	3,4	106,8	31,4
70 - 100 % »	3,4	110,2	32,3
	21,9	1.450,9	
Muestra original	21,7	1.467,9	67,8
Recuperación	101 %	99 %	

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

3.2.7. Fraccionamiento por adsorción en gel de fosfato cálcico.

Cuatro muestras de una suspensión en agua destilada de liofilizado de la proteína precipitada entre 0,9 y 1,5 volúmenes de acetona fueron agitados durante 15 minutos en presencia de 0,01, 0,025, 0,05 y 0,1 volúmenes (p/v) de gel de fosfato cálcico.

Transcurrido este tiempo el gel se retiró mediante centrifugación a $12.000 \times g$ durante 10 minutos; en el sobrenadante se determinó la proteína presente (por el método del biuret) y la actividad diacetilo reductasa, con los resultados que se recogen en la tabla 22.

TABLA XXII

Fraccionamiento por adsorción en gel de fosfato cálcico a partir de una preparación purificada por precipitación entre 0,9 y 1,5 volúmenes de acetona.

Fracción	Proteína total (mgrs.)	Actividad ¹ total	Actividad ¹ por mgr. de proteína
Sobrenadante de adsorción con (volúmenes de gel).			
0,01	12,8	1.384	108,6
0,025	11,2	1.192	106,4
0,05	7	652	95,8
0,1	2,6	192	73,8
Muestra original	16,5	1.384	84,4

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

En la citada tabla puede observarse que en el sobrenadante de la adsorción con 0,1 volúmenes de fosfato cálcico solamente se detecta un 13,8 por ciento de la actividad original, lo que supone que el 86,2 por ciento restante debería haber sido arrastrado con el gel. Se intentó recuperar la actividad adsorbida resuspendiendo éste en tampón fosfato bisódico monopotásico pH 6,1 0,0025 M. y depositándolo nuevamente por centrifugación, sin que pudiera detectarse actividad diacetilo reductasa alguna en los ensayos efectuados con el sobrenadante. Este proceder se repitió con tampón fosfato del mismo pH y molaridad 0,005 M, 0,01 M, 0,025 M, 0,05 M, 0,2 M y 0,5 M, con idéntico resultado negativo. En vista de estas dificultades se descartó el empleo de este método para la purificación de nuestras preparaciones.

3.2.8. Cromatografías de intercambio iónico en DEAE-celulosa.

La cromatografía en columna de DEAE suele dar muy buenos resultados para el fraccionamiento de muestras parcialmente purificadas. Las experiencias que se describen a continuación se realizaron para determinar hasta qué punto podría resultar conveniente a aplicación de esta técnica para la purificación de nuestras preparaciones.

8.1. Cromatografía en DEAE-32.

Se preparó una columna de DEAE-32 de 1,5 cms. de diámetro con un lecho de 45,5 cms. de altura que fue equilibrada con tampón fosfato bisódico monopotásico pH 6,3 0,025 M. durante 24 horas. En 3,5 mls. de este mismo tampón se suspendieron unos 70 mgrs. de liofilizado de la fracción acetónica 1 — 1,3 y las partículas insolubles se eliminaron por centrifugación a $32.000 \times g$ durante 20 minutos. Tres mililitros del sobrenadante de esta centrifugación se colocaron en la columna de DEAE y fueron eluidos sucesivamente, por este orden, con 125 mls. de tampón fosfato bisódico monopotásico pH 6,3 0,025 M, 150 mls. de tampón 0,1 M y 100 mls. más del mismo buffer 0,5 M. La presión hidrostática fue de 100 cms. y el flujo de 16 mls./hora.

El eluido se recogió en fracciones de 3,8 mls., en las que se determinó la proteína, por su extinción a 280 y 260 m μ y la actividad diacetilo reductasa.

La marcha de la cromatografía se recoge en la figura 19 y en la tabla 23. Puede apreciarse que, aunque la recuperación de proteína tras la cromatografía fue satisfactoria —96%— solamente se recogió el 16 por ciento de la actividad, en dos bandas eluidas con tampón 0,025 M. y 0,1 M. que representan, respectivamente, el 13,5 y el 2,5 por ciento de la original.

La pérdida de actividad se achacó a la escasa estabilidad del enzima en tampón fosfato de baja molaridad (véase capítulo VII). Puesto que, a pesar de la mala recuperación, en algunas fracciones se había conseguido un grado de purificación estimable, se consideró conveniente repetir la experiencia empleando como soporte DEAE-22 que, por ser más fibroso que el DEAE-32, permite que el flujo sea más rápido —y, en consecuencia, la cromatografía más breve— aunque la separación suele ser peor.

TABLA XXIII

Desarrollo de la cromatografía en DEAE-32 del extracto acuoso del liofilizado de una preparación purificada por precipitación entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona.

Tubo n.º	Proteína total (mgrs.)	Actividad ¹ total.	Actividad ¹ específica (Act./mgr. prt.)	Recuperación actividad (%)
15	0,68	21,1	31	0,2
16	0,72	126	175	1,3
17	0,47	178,6	380	1,8
18	0,49	252	514,3	2,6
19	0,48	230,4	480	2,4
20	0,36	195,1	542	2
21	0,3	129,5	431,6	1,3
22	0,33	47,7	144,4	0,5
23	0,30	28,9	96,2	0,3
24	0,33	29	87,9	0,3
25	0,22	30	136,7	0,3
26	0,4	25	62,5	0,3
27	0,3	16	53,3	0,2
.....				
47	0,08	38	475	0,4
48	0,11	55,5	503,5	0,6
49	1,41	54	38,3	0,6
50	1,13	45,6	40,3	0,5
51	0,65	28,5	43,8	0,3
52	0,49	7,6	15,5	0,1
Muestra original	41	1.548,4 9.692	236,4	16 %

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

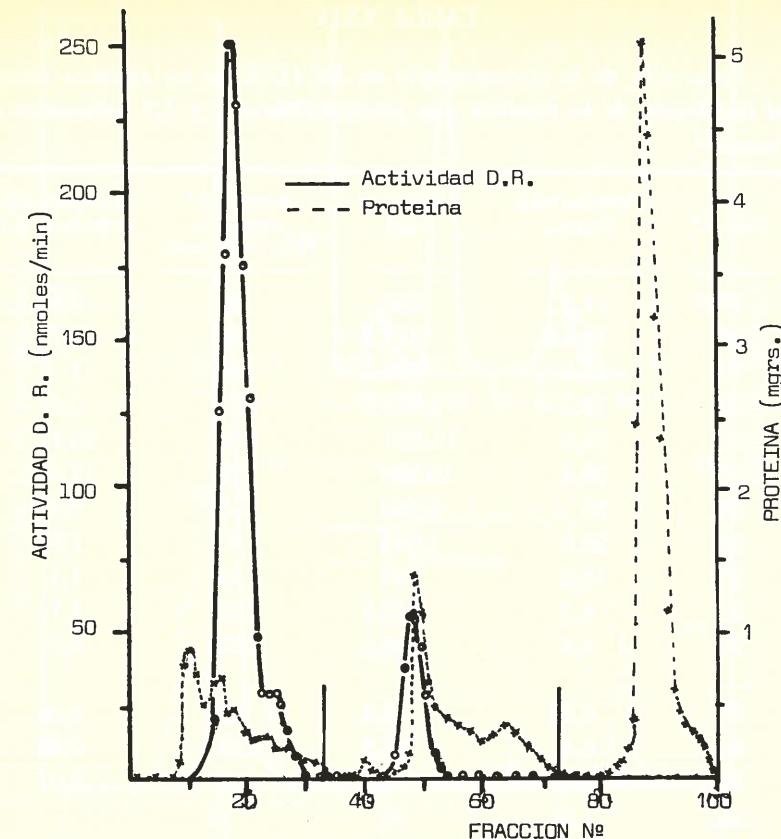


Figura 19.—Cromatografía en DEAE-32 de la fracción que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona. Eluyentes: fracciones 0-33, tampón fosfato pH 6,3, 0,025 M.; 33-73, id. 0,1 M.; 72-100, id. 0,5 M.

8.2. Cromatografía en DEAE-22.

En 7 mls. de tampón fosfato/bisódico monopotásico 0,025 M pH 6,3, se suspendieron unos 800 miligramos de liofilizado acetónico 1 - 1,3 y la muestra fue centrifugada 20 minutos a 32.000 × g. Cinco mililitros del sobrenadante fueron cromatografiados en las mismas condiciones del experimento anterior, excepto en que la columna estaba empaquetada con DEAE-22; la elución se efectuó, sucesivamente con 100 mls. de tampón fosfato pH 6,3 0,025 M. y 75 mls. más del mismo tampón 0,5 M y el flujo fue de unos 45 mls./hora. Se recogieron fracciones de aproximadamente 2,5 mls.

TABLA XXIV

Desarrollo de la cromatografía en DEAE-22 de un extracto acuoso del lisofilitizado de la fracción que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona.

Tubo n. ^o	Proteína total (mgrs.)	Actividad ¹ total	Actividad ¹ específica (Act./mgr. prot)	Recuperación actividad (%)
17	11,3	240	21	0,4
18	18,44	412,5	22	0,7
19	18,1	626,5	34	1
20	13,2	3.458,5	262	5,6
21	24,6	15.320	618	25,1
22	39,4	10.880	278	17,9
23	36	5.940	165	9,8
24	26,6	1.044	40	1,7
25	15,8	840	53	1,4
26	6,3	647,5	102	1,1
27	4,4	538,5	122	0,9
.....				
45	0,44	34,4	82	0,06
46	0,4	51,2	128	0,08
47	0,47	45,3	91	0,07
.....				
54	2,2	262,5	117	0,4
55	0,6	22	37	0,04
.....				
66	3,2	78,6	25	0,12
67	9,2	44,3	10	0,07
68	4,4	42,6	10	0,07
		40.528,4		66,7
Muestra original	310	60.880	198	

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

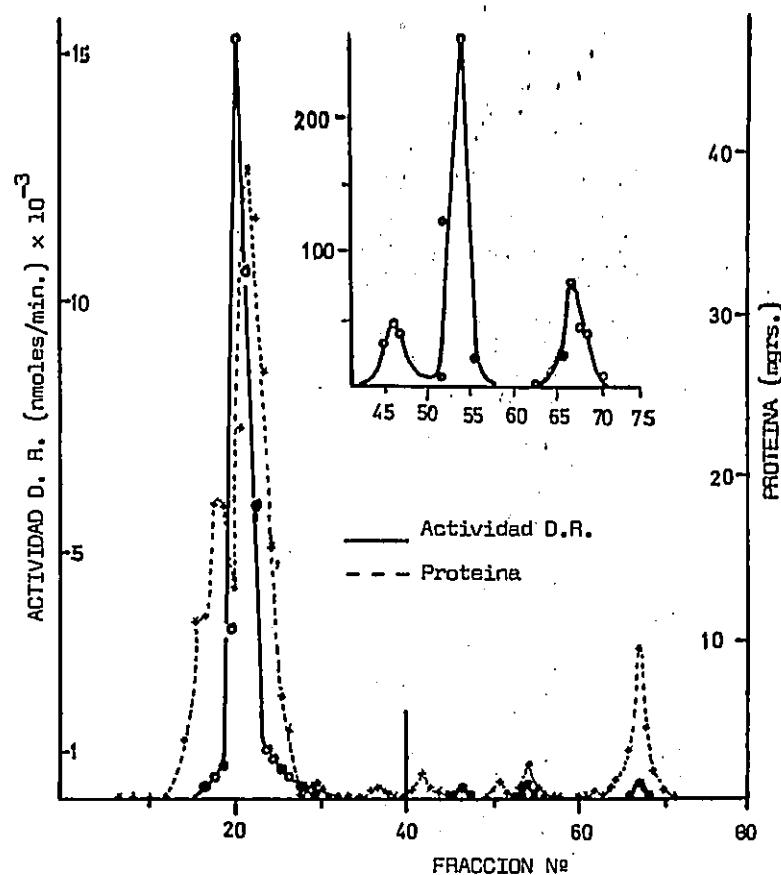


Figura 20.—Cromatografía en DEAE-22 de la fracción que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona. Eluyentes: fracciones 0-40, tampón fosfato pH 6,3 0,025 M.; 40-71, id. 0,5 M. Gráfica interna: ampliación 1 × 27 de la actividad D. R. de las fracciones 40-71.

En la figura 20 y tabla 24 se recogen los resultados obtenidos, mostrando que la recuperación de actividad es ahora mucho más satisfactoria (66,7 %), eluyéndose ésta en una banda principal, que incluye el 99 por ciento del total recogido, y otras tres secundarias. En una de las fracciones de la banda principal —tubo 21— la actividad específica se ha multiplicado por 3,1 con un rendimiento del 25 por ciento.

3.2.9. Cromatografías de filtración molecular en Sephadex G-100. Determinación del peso molecular de la diacetilo reductasa.

Experimento 1.

Esta experiencia fue diseñada, en principio, para la obtención de datos acerca de las posibilidades de la cromatografía en gel de Sephadex como técnica de fraccionamiento para la purificación de nuestras preparaciones. Con este objeto se suspendieron unos 50 mgrs. de liofilizado de la fracción acetónica 1 - 1,5 en 3 mls. de tampón fosfato bisódico monopotásico 0,5 M pH 6,3. La suspensión fue clarificada por centrifugación a $32.000 \times g$ durante 20 minutos y cromatografiada a través de una columna de $1,5 \times 90$ cms., empaquetada con Sephadex G - 100 en tampón fos-

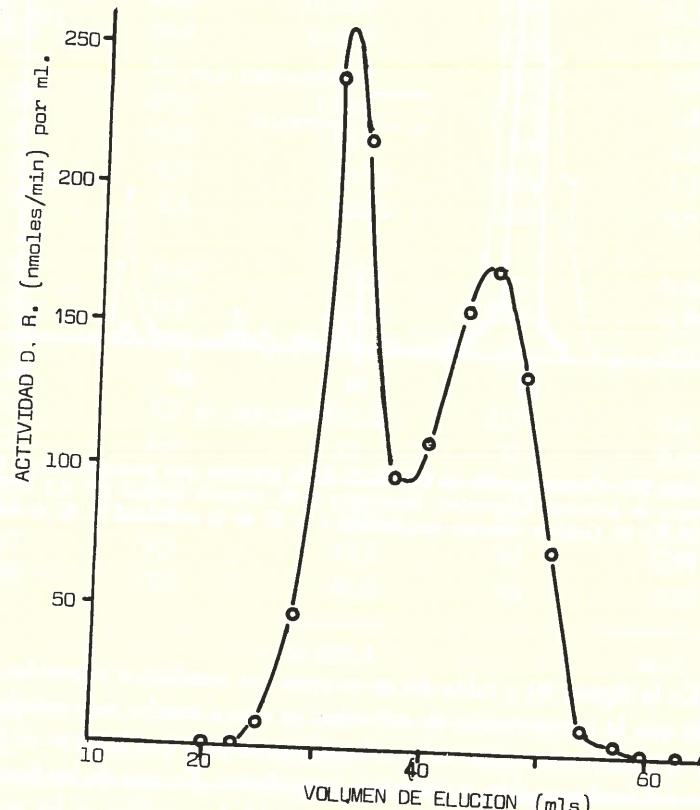


Figura 21.—Cromatografía en Sephadex G-100 de la fracción que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona. Eluyente, tampón fosfato pH 6,3 0,5 M.

fato bisódico monopotásico 0,5 M pH 6,3, de las siguientes características: Altura del lecho del gel, 46,5 cms. Volumen total ocupado por el gel, $81,84 \text{ cm}^3$ ($46,5 \text{ cms.} \times 0,75^2 \times 3,14$). Volumen vacío, 19,2 mls.

La cromatografía se efectuó en una cámara frigorífica a $0 - 4^\circ \text{C}$., a presión hidrostática de 10 cms. y utilizando como eluyente tampón fosfato 0,5 M pH 6,3.

El eluido se recogió en fracciones de aproximadamente 3 mls. en las que se analizó la proteína, por su extinción a 280 y $260 \text{ m}\mu$, y la actividad diacetilo reductasa.

Los resultados obtenidos se representan en la figura 21. A pesar de que la marcha de la cromatografía ha sido satisfactoria, con recuperaciones del 97 por ciento de la proteína y de 85 por ciento de la actividad, solamente en dos de las fracciones —tubos 12 y 13— se obtiene un incremento apreciable de la actividad específica, 2,5 veces superior a la original, mientras que la actividad recuperada en ambas muestras no representa más que el 29 por ciento de la total.

En el cromatograma de la figura 21 puede observarse también que la actividad es eluida en dos bandas, con máximos de elución a los 31,5 mls. y a los 44,5 mls. aproximadamente, siendo sus K_{av} 0,195 y 0,405. A partir de estos valores se calculó el peso molecular de las proteínas enzimáticas eluidas en las dos zonas, cromatografiando en la misma columna ovoalbúmina, quimotripsina y citrocromo C de caballo, cuyos pesos moleculares son ya conocidos, y comparando sus K_{av} con los que se habían determinado para la diacetilo reductasa (fig. 22).

Calculados por este procedimiento, los pesos moleculares correspondientes a las dos bandas de actividad diacetilo reductasa fueron de 76.000 para la más rápida y 26.000 para la más lenta.

Estos resultados sugieren la posibilidad de que la diacetilo reductasa se encuentre en forma de agregados de unidades monoméricas, correspondiendo la de peso molecular 26.000 a un monómero y la de 76.000 a un trímero y, puesto que el equilibrio entre los distintos grados de asociación suele estar regulado por la fuerza iónica del medio, se decidió obtener más datos al respecto efectuando otras cromatografías con eluyentes de diferentes fuerzas iónicas.

Experimento 2.

En la misma columna y en idénticas condiciones a las descritas en el experimento anterior, excepto en que el gel fue equilibrado con tampón

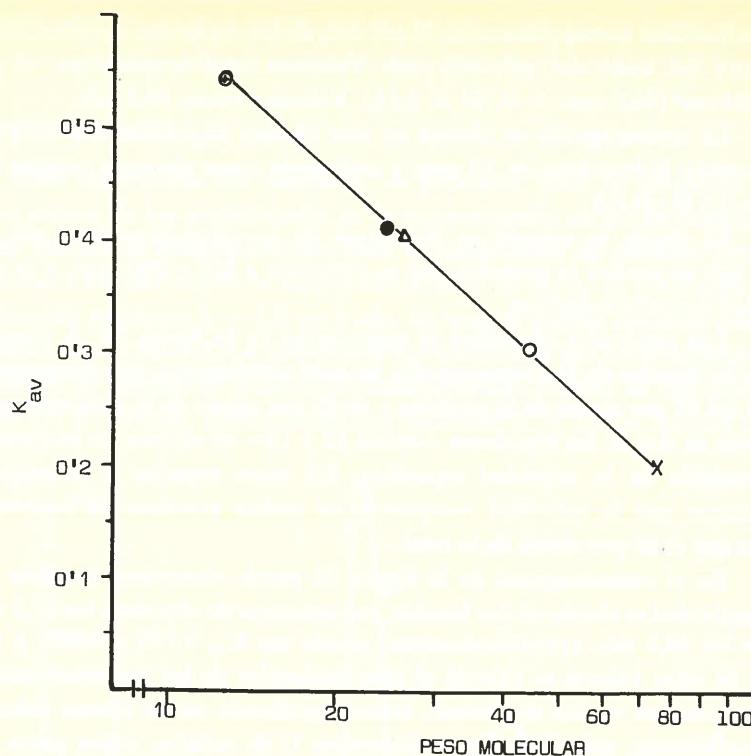


Figura 22.—Cálculo del peso molecular de la diacetilo reductasa por cromatografía en Sephadex G-100. Representación de los K_{av} en función del logaritmo del peso molecular. (⊕) Citocromo «c». (●) Quimotripsina. (○) Ovoalbúmina. (ΔX) Diacetilo reductasa.

fosfato bisódico monopotásico 0,05 M. pH 6,3 y la muestra eluida con el mismo tampón, se cromatógrafió una suspensión de unos 40 mgrs. de liofilizado de la fracción acetónica 1 — 1,5 en 2 mls. del citado buffer previamente clarificada por centrifugación.

Se obtuvo así el cromatograma de la figura 23, mostrando que la actividad es ahora eluida en una sola banda cuyo máximo, en torno a 35 mls., está situado en las proximidades del correspondiente a la banda más rápida en la cromatografía anterior aunque ligeramente desplazado hacia la zona en que se eluye la más lenta.

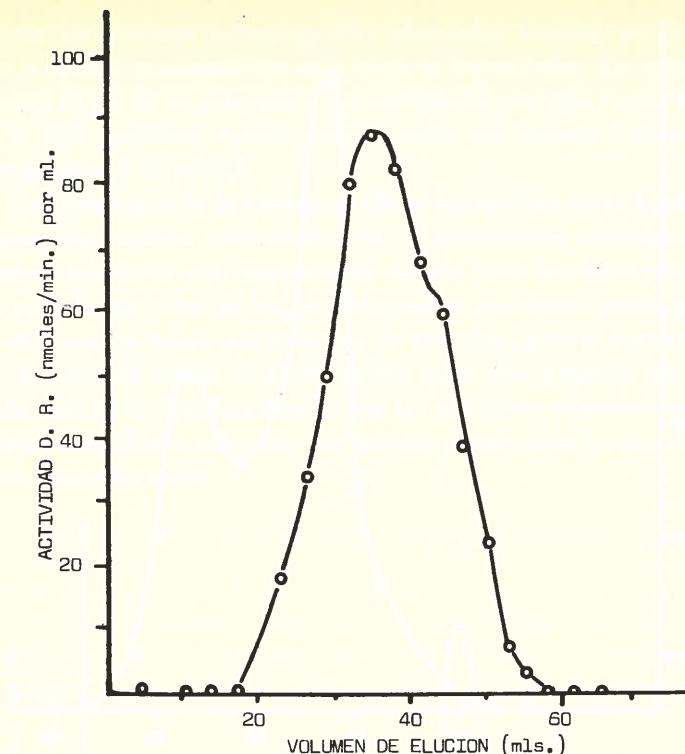


Figura 23.—Cromatografía en Sephadex G-100 de la fracción que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona. Eluyente, tampón fosfato pH 6,3 0,05 M.

Experimento 3.

Los resultados del experimento anterior parecían apoyar la hipótesis de que el equilibrio entre las dos formas de asociación podría estar regulado por la molaridad del eluyente y, en consecuencia, por su fuerza iónica. Para confirmar estos datos se realizó un nuevo experimento, utilizando como eluyente tampón fosfato bisódico monopotásico 0,1 M pH 6,3 y 0,7 M respecto a cloruro sódico, cuya fuerza ional es semejante a la del eluyente del primer experimento pero correspondiendo en su mayor parte al Cl Na.

Con este objeto se equilibró el gel con tampón fosfato de las características citadas, haciendo pasar por la columna empleada en los experimentos anteriores un volumen de éste equivalente a unas 15 veces el vo-

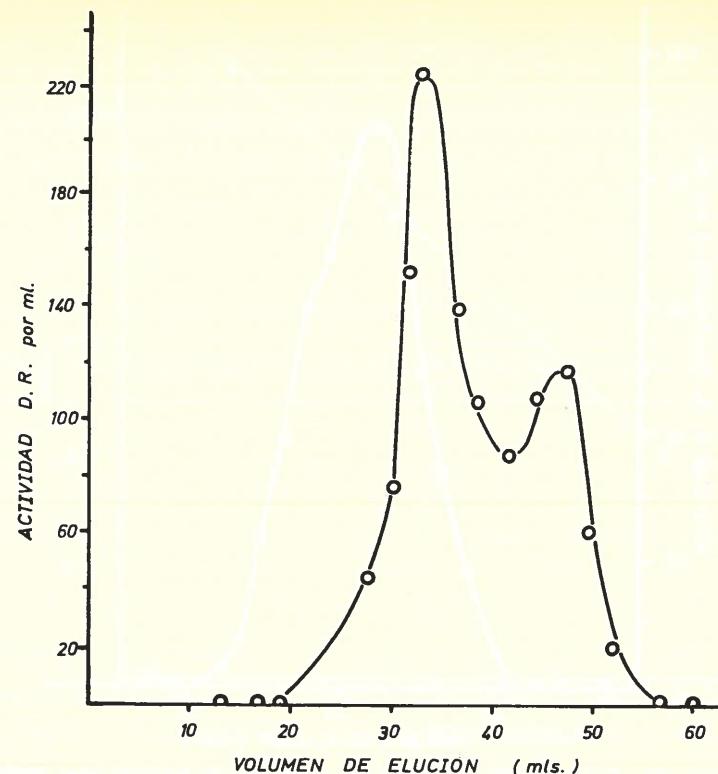


Figura 24 (a).—Cromatografía en Sephadex G-100 de la fracción que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona. Eluyente, tampón fosfato pH 6,3 0,1 M. y 0,7 M. respecto a cloruro sódico.

lumen vacío. En el mismo tampón fue suspendida y eluida la preparación enzimática (unos 60 mgrs. de liofilizado acetónico 1 — 1,5 en 2 mls., clasificada mediante centrifugación).

Los resultados de esta experiencia se representan en la gráfica de la figura 24 (a), en la que nuevamente puede apreciarse la existencia de dos picos de actividad cuyos volúmenes de elución son de 32 y 45 mls. aproximadamente.

Experimento 4.

Después de la experiencia descrita anteriormente se hizo necesario reempaquetar el gel, puesto que el progresivo taponamiento del mismo

durante las diversas cromatografías efectuadas terminó por reducir el flujo a niveles incompatibles con nuestras necesidades. En consecuencia se retiró el gel de la columna y fue substituido por otro recién hidratado que se dejó equilibrar durante toda la noche con tampón fosfato bisódico monopotásico 1 M. pH 6,3.

Los resultados de la cromatografía se representan en la figura 24 (b). Aunque los cambios introducidos en las condiciones experimentales no permiten establecer una comparación directa entre los datos recogidos en esta experiencia y los de los cromatogramas anteriores, puede apreciarse que aparecen de nuevo dos máximos de actividad, pero el correspondiente a la banda más rápida es ahora cuatro veces más pequeño que el de la banda más lenta. Esto concuerda con las anteriores observaciones acerca de que el equilibrio entre las dos bandas parece estar controlado por la fuerza iónica del medio.

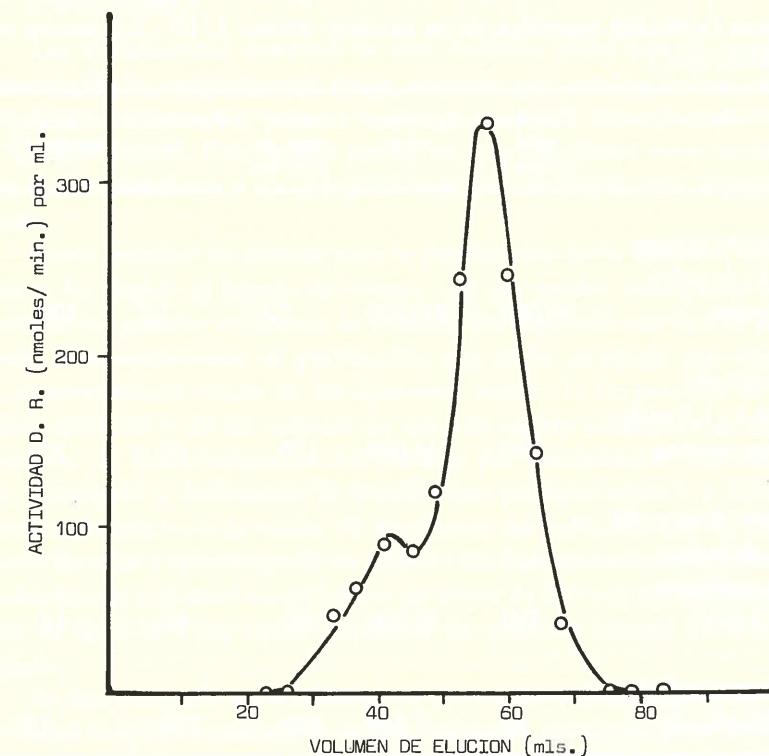


Figura 24 (b).—Cromatografía en Sephadex G-100 de la fracción que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona. Eluyente, tampón fosfato pH 6,3, 1 M.

IV. 3.3. METODO DE PURIFICACION

En vista de los resultados obtenidos en las experiencias previas que se han descrito anteriormente, se consideró como método más adecuado para la purificación del enzima el siguiente:

(1) Extracción con 10 volúmenes de acetona; el polvo resultante puede ser almacenado en un congelador a -15°C . al menos durante tres meses sin pérdida apreciable de actividad.

(2) Obtención de un extracto del polvo acetónico en cuatro volúmenes de agua destilada fría ($0 - 4^{\circ}\text{C}$).

(3) Adición al extracto de un volumen de acetona a -15°C y centrifugación a $12.000 \times g$ durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada.

TABLA XXV

Purificación de la diacetilo reductasa a partir de 1 Kg. de hígado de ternera (actividad específica de su extracto acuoso 1/10 : 2,5 nmoles reducidos/min.).

Etapa	Proteína total (mgrs.)	Actividad ¹ total	Activ. ¹ mgr. de proteína	Purificación (2)	Rendimiento (%)
Extracto acuoso					
(1/4) de polvo acetónico	36.000	200.000	5,5	2,2	100
Precipitado entre 1 - 1,3 volúmenes acetona					
	260	44.000	170	60	22
Extrac. acuoso del liof. de la fracción acetónica 1 - 1,3 vol.					
	180	36.000	200	80	18
Cromatografiado en DEAE - 22					
	12	7.440	620	250	3,7

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

² Relativa a la del extracto acuoso del tejido original.

rada. Filtración del sobrenadante a través de dos capas de papel de filtro hasta que quede perfectamente transparente, adición de más acetona hasta elevar la concentración de ésta en el medio a 1,3 volúmenes por volumen de extracto original y recogida del precipitado por centrifugación. El precipitado puede ser liofilizado y almacenado en un desecador a -15°C ; en estas condiciones la actividad es estable al menos durante un mes.

(4) Cromatografía en DEAE - 22.—El liofilizado se suspende en unos 10 volúmenes de tampón fosfato bisódico monopotásico 0,025 M pH 6,3. La suspensión se centrifuga a $32.000 \times g$ durante 20 minutos y el sobrenadante se cromatografía en una columna de DEAE - 22 utilizando como eluyente tampón fosfato pH 6,3 0,025 M.

En la tabla 25 se resumen la marcha experimental y los resultados obtenidos por este procedimiento.

IV. 4. DISCUSION

Los experimentos descritos en este capítulo, junto con el establecimiento de la estequiometría de la reacción que cataliza (véase capítulo V), demuestran por primera vez la presencia de diacetilo reductasa en el reino animal. Este enzima parece ser más abundante entre las aves que en los mamíferos y en el hígado más que en ningún otro órgano o tejido.

Como material de partida para la purificación de la diacetilo reductasa se ha elegido el hígado de ternera, del que pueden conseguirse con facilidad los grandes volúmenes de muestra que requieren este tipo de procesos. El procedimiento de purificación que se ha mostrado más eficaz en nuestras manos consta de las siguientes etapas: 1) Preparación de un polvo acetónico y de un extracto de éste con cuatro volúmenes de agua destilada. 2) Fraccionamiento del extracto por precipitación con acetona, recogiendo y liofilizando la fracción que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de ésta/vol. de medio. 3) Extracción del liofilizado con 10 volúmenes de agua y cromatografía en DEAE - 22. Este procedimiento permite multiplicar la actividad específica por un factor de 250 con un rendimiento neto en torno al 4 por ciento respecto a los extractos acuosos (1/10) de hígado.

Se han ensayado otros métodos de extracción y fraccionamiento. La actividad diacetilo reductasa se extrae fácilmente con agua, pero es poco estable en los extractos acuosos brutos. La extracción con acetona es tan eficaz como la acuosa, con la ventaja de que la actividad en el polvo ace-

tónico resultante, almacenado a $-15^{\circ}\text{C}.$, es estable al menos durante tres meses; además, la extracción acuosa del polvo acetónico logra actividades específicas que duplican aproximadamente a las de los extractos acuosos directos, sin duda a causa de que buena parte de las proteínas tisulares extractibles con agua son insolubilizadas por el tratamiento con acetona.

A diferencia de lo que ocurre con los extractos microbianos (STRECKER y HARARY, 1954), la precipitación con sulfato de protamina, que suele utilizarse para la eliminación de los ácidos nucléicos y proteínas ácidas (en razón de la gran basicidad de las protaminas), carece de utilidad para la purificación de la diacetilo reductasa en los extractos acuosos de polvo acetónico. Tampoco resulta eficaz la acidificación de estos extractos, puesto que el enzima comienza a precipitar a niveles de pH próximos a 5, antes de que lo haga la mayor parte de la proteína no activa.

Los resultados obtenidos en los fraccionamientos con sulfato amónico muestran que la diacetilo reductasa precipita en su mayor parte entre el 40 y el 70 por ciento de saturación, cifras que se asemejan bastante a las que dan STRECKER y HARARY (1954) para el enzima de origen bacteriano en extractos de *Staphylococcus aureus* y BRYN y col. (1971) para los de *Aerobacter aerogenes*. La precipitación fraccionada de los extractos acuosos de polvo acetónico permitiría multiplicar por 1,4 la actividad específica con recuperaciones de actividad total entre un 65 y un 70 por ciento, recogiendo la fracción que precipita entre el 50 y el 80 por ciento de saturación; aplicada esta técnica sobre preparaciones parcialmente purificadas por precipitación con acetona, podría multiplicarse la actividad específica por 1,3 con un rendimiento del orden del 75 por ciento en la fracción que se recoge entre el 40 y el 60 por ciento de saturación. En el método de purificación propuesto no se ha intercalado esta etapa por la necesidad de dializar las muestras antes de aplicarlas a las columnas de DEAE y la imposibilidad de efectuar esta diálsis sin pérdida de actividad, a menos que se utilice como agente dializante tampón fosfato pH 6,1 0,5 M. (véase capítulo V) lo que, naturalmente, no resuelve el problema.

La adsorción en gel de fosfato cálcico sólo podría ser útil para la purificación de nuestras preparaciones haciendo uso del hecho de que una parte (relativamente pequeña) de la proteína se adsorbe antes que la diacetilo reductasa. La recuperación de la actividad adsorbida exigiría el empleo de un medio con una fuerza iónica muy alta que haría, una vez más, imprescindible la diálsis antes del paso por DEAE.

La cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-100 ha mostrado ser menos eficaz como técnica de purificación de la diacetilo reductasa que la de intercambio iónico en DEAE - 22. Sin embargo ha permitido efectuar algunos estudios con respecto al tamaño molecular del enzima: los resultados obtenidos utilizando como eluyente tampón fosfato pH 6,1 0,5 M., donde se observa que la actividad se eluye en dos bandas a las que corresponden pesos moleculares (calculados por comparación con proteínas de peso molecular conocido) de 26.000 y 76.000, y el hecho de que la proporción relativa de las mismas cambie con la fuerza iónica del eluyente, sugieren que la diacetilo reductasa de hígado de ternera se encuentra en dos estados de asociación al menos, un monómetro y un trímero, cuyo equilibrio viene gobernado por la fuerza iónica del medio.

CAPITULO V

NATURALEZA DE LA REACCION CATALIZADA: ESTEQUIOMETRIA, ESPECIFICIDAD DE SUBSTRATOS Y NECESIDAD DE COFACTORES

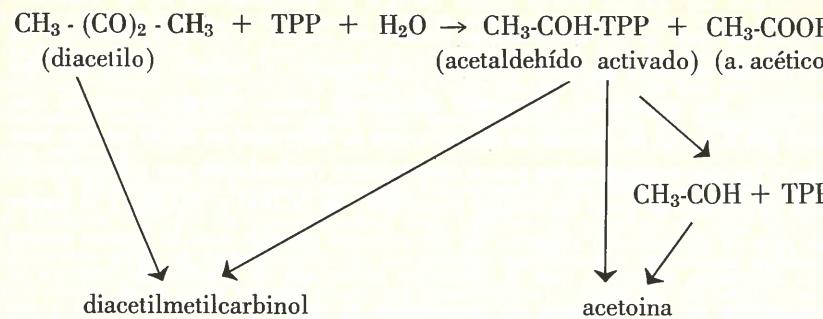
V. 1. INTRODUCCION.

Es norma general en Enzimología que para probar que la ecuación cinética que describe una reacción representa el mecanismo que realmente opera, es condición indispensable que sea la única que lo explica. Hasta el momento se conocen dos reacciones enzimáticas que conducen a la producción de acetona a partir del diacetilo:

La primera de éstas fue puesta de manifiesto en el músculo pectoral y otros tejidos del palomo y conejo por GREEN y col. (1947), que la atribuyeron a la actuación de una diacetilo mutasa posteriormente identificada por SCHWEET y col. (1951) y JUNI y HEYM (1956) con la piruvato oxidasa. Este enzima cataliza diversas reacciones de condensación acilóica, entre ellas la que da lugar a la síntesis de acetolactato a partir del piruvato y la dismutación del diacetilo a ácido acético y acetona o diacetilmethylcarbinol, utilizando como coenzima pirofosfato de tiamina y como cofactores iones metálicos divalentes.

La estequometría de esta reacción es la siguiente (Ec. V. 1):

(Ec. V.1).



El diacetilo puede también reducirse enzimáticamente a acetoina mediante la actuación de la diacetilo reductasa (Acetoina : NAD oxido-reductasa E. C. 1. 1. 1. 5), un enzima descrito por STRECKER y HARARY (1954) en *Aerobacter aerogenes* que está ampliamente difundido entre las bacterias (SEITZ y col., 1963 b). La diacetilo reductasa es NADH dependiente, no precisa cofactores (SEITZ y col., 1963 a) y se muestra fundamentalmente irreversible en su funcionamiento (STRECKER y HARARY, 1954; SEITZ y col., 1963; SPECKMAN y COLLINS, 1968 b), aun cuando los datos en sentido contrario obtenidos por SEBECK y RANDLES (1952) en bacterias de género *Pseudomonas* capaces de utilizar el butilénglico como única fuente de energía han suscitado cierta controversia al respecto.

Esta reacción viene descrita por la ecuación:

(Ec. V. 2)



Los resultados de nuestras experiencias previas mostraron que la desaparición de diacetilo iba acompañada por la oxidación concomitante de NADH a NAD, apuntando claramente hacia la intervención de una diacetilo reductasa. Sin embargo, existen otros esquemas teóricos a los que podría corresponder esta situación, por lo que se consideró imprescindible establecer la estequiometría de la reacción. En el presente capítulo se recogen también otros estudios relacionados con la misma, tales como el funcionamiento de la reacción en el sentido acetoina-diacetilo, la especificidad de substratos y la participación de cofactores.

V.2. MATERIAL Y METODOS.

Diálisis

Se llevaron a cabo a 0-4°C en cámara frigorífica. Como membrana semipermeable se empleó tubo de celofán «Visking».

Determinación de acetoina, diacetilo y NADH

Para las determinaciones de acetoina se utilizó la técnica de WES-TERFELD y para las de diacetilo la de OWADES y JAKOVAC (véase capítulo II). El NADH fue determinado espectrofotométricamente por su extinción a $340 \text{ m}\mu$, utilizando como coeficiente de extinción molar $\xi = 6.220$.

Determinación de actividades enzimáticas.

Diacetilo reductasa.

Fue determinada mediante la técnica espectrofotométrica descrita en la metodología general.

NADH deshidrogenasa inespecífica.

Se efectuó espectrofotométricamente, siguiendo a lo largo del tiempo los cambios en la absorbancia a $340\text{ m}\mu$. El sistema de análisis establecido fue el siguiente:

Cubeta referencia: Tampón fosfato bisódico monopotásico pH 6,1 0,05 M., NADH 0,6 μ moles, preparación enzimática. Volumen final: 3 mls.

Cubeta muestra: Como la anterior, omitiendo la preparación.

Butilénglicol deshidrogenasa.

La reducción de acetona a butilénglico fue estimada mediante el análisis espectrofotométrico de la oxidación concomitante del NADH a NAD. Con el fin de descontar la actividad NADH-deshidrogenasa inespecífica se empleó la siguiente técnica:

Cubeta referencia: Tampón fosfato bisódico monopotásico 0,05 M. pH 6,1; NADH 0,6 μ moles; acetoina, 12 μ moles; preparación enzimática. Volumen 3 mls.

Cubeta muestra: Como la anterior, omitiendo la acetoina.

Determinaciones manométricas.

Las constantes de los sistemas matraz-manómetro se calcularon a partir de la fórmula:

(Ec. V. 3)

$$K = \frac{V_g (273/T) + V_f \alpha}{P_0}$$

siendo T la temperatura de ensayo en grados Kelvin, V_f el volumen de la fase líquida (3 mls.), α la constante de solubilidad a la temperatura de ensayo del gas que se mide y P_0 la presión normal en milímetros del líquido de Brodie (10.000). V_g , el volumen de la fase gaseosa, se calculó descontando el volumen de la fase líquida al volumen total, determinado por el método del peso de mercurio hasta la división 150 mm. del manómetro.

El consumo de oxígeno y la producción de anhídrido carbónico se midieron por el «método directo». La producción de ácido se determinó a partir del anhídrido carbónico liberado tamponando el medio de análisis con un buffer de bicarbonato sódico.

V. 3 RESULTADOS.

V. 3.1. ESTEQUIOMETRÍA

3.1.1. Experiencias previas.

Actividad NADH oxidasa y butilénglico deshidrogenasa en las preparaciones de diacetilo reductasa.

El establecimiento de la estequiométría de esta reacción y la realización de algunos de los estudios cinéticos proyectados requieren que las preparaciones enzimáticas estén exentas de actividad NADH oxidasa y butilénglico deshidrogenasa que podrían alterar notablemente los resultados. Se consideró, por lo tanto, conveniente comprobar la evolución de las citadas actividades en las distintas etapas de purificación, con cuyo objeto se obtuvieron las siguientes suspensiones enzimáticas:

Extracto acuoso de hígado de ternera: en un homogeneizador de cuchillas «M. S. E.» se trituraron, mediante cinco golpes de 30 segundos con intervalos de otros 30 segundos de reposo, 10 grs. de hígado de ternera, procedentes de un animal recién sacrificado, en 100 mls. de agua destilada fría (0 – 4° C.). Durante la trituración las muestras fueron refrigeradas sumergiendo el vaso del homogeneizador en una salmuera a –3° C.

Los triturados fueron centrifugados a 12.000 × g durante 10 minutos en una centrífuga Spinco L - 50 refrigerada.

Extracto acuoso de polvo acetónico: Se preparó un extracto en 4 volúmenes de agua destilada fría como se ha descrito en el capítulo IV. Centrifugación: 12.000 × g. durante 10 minutos. El depósito fue descartado.

Suspensión de liofilizado de la fracción acetónica 1 – 1,3 : 4 mgrs. de liofilizado por mililitro de agua destilada.

Cromatografiado en DEAE — 22 : 1 mgr./ml. de agua destilada.

TABLA XXVI

Actividad NADH deshidrogenasa inespecífica y butilénglico deshidrogenasa en preparaciones de las diferentes etapas de purificación.

Preparación	Actividad ¹ / 0,5 mls. preparación			% respecto a la actividad diacetilo reductasa.	
	Diacetilo reductasa	NADH desh.	Butiléngli- col desh.	NADH desh.	Butiléngli- col desh.
Ext. acuoso de hí- gado (1/10)	20	5	2	25	10
Ext. acuoso de pol- vo acetónico (1/4)	50	7,5	5	15	10
Suspensión del lio. fracción prec. 1-1,3 vol. acet. (4 mgr. / ml.)	280	- ()	- ()	0	0
Sol. acuosa del cro- matograf. en DEAE-22 (1 mgr/ml)	320	- ()	- ()	0	0

¹ En nmoles de NADH oxidados por minuto.

() Se registró la actividad durante 10 minutos sin que pudiera apreciarse ningún cambio significativo en la absorbancia.

En 0,5 mls. de estas preparaciones se determinaron las actividades NADH oxidasa, butilénglico deshidrogenasa y dicetilo reductasa.

Los resultados obtenidos, que se recogen en la tabla 26, muestran que las actividades butilénglico deshidrogenasa y NADH oxidasa, proporcionalmente importantes en los extractos de las etapas iniciales de la purificación, han sido eliminadas en la fracción que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona y en el cromatografiado en DEAE-22.

Consumo de oxígeno, producción de gas y de ácidos.

El posible consumo de oxígeno y la producción de ácidos y de gas durante la reacción se determinó manométricamente en un respirómetro de Warburg. Con este fin se mezclaron, en un matraz de Warburg cerrado y conectado a un barómetro, todos los reaccionantes en tampón fosfato 0,05 M. pH 6,1 (tampón bicarbonato pH 6,1 para las determinaciones de producción de ácidos), registrándose los cambios de presión en el interior del respirómetro durante 30 minutos. En las muestras destinadas a medir el consumo de oxígeno se dispuso en el pocillo central un trozo de papel de filtro de 2 × 2,5 cm. de diámetro convenientemente plegado e impregnado con 0,2 mls. de sosa al 40 %, para absorber el anhídrido carbónico que podría ser producido.

Se prepararon soluciones acuosas de dicetilo (24 μ moles/ml.), NADH (7 μ moles/ml.), NaOH al 40 %, tampón fosfato bisódico monopotásico pH 6,1 y tampón bicarbonato, que fueron pipetados en los recipientes principales y pocillos centrales de 12 matraces de Warburg en las cantidades adecuadas para dar las concentraciones que figuran en la tabla 27.

En el sistema se incluyó también un termobarómetro para evitar el posible error debido a las variaciones de presión atmosférica o a las fluctuaciones de la temperatura el baño y, puesto que el hipotético cambio gaseoso podría ser independiente de la oxidación del NADH, dos muestras en que se omite éste para cada una de las determinaciones.

A cada uno de los recipientes laterales se transfirieron 0,5 mls. de una suspensión de 30 mgrs. de liofilizado de la fracción acetónica 1 - 1,3 en 10 mls. de agua destilada fría. Inmediatamente después se cerraron los compartimentos laterales con sus respectivos tubos previamente engrasados y los matraces se conectaron a sus correspondientes manómetros, siendo a continuación sumergidos en el baño del aparato de Warburg. La temperatura se reguló a 25° C. y la agitación a 145 golpes por minuto.

TABLA XXVII
Hoja de protocolo para la determinación del consumo de oxígeno y la producción de anhídrido carbónico y de ácidos.

	Muestra n.º	Recipiente principal	Pocillo central	Recipiente lateral
CONSUMO DE OXIGENO	1 y 2	Tampón fosfato pH 6,1 0,05 M ¹ NADH 3,5 μ moles Dicetilo 12 μ moles	0,2 mls. de Na (OH) al 40 %	0,5 mls. de prepa- ración enzimá- tica ²
	3 y 4	Como anterior omitiendo el NADH	— íd.	íd.
	5 y 6	Tampón fosfato pH 6,1 0,05 M ¹ NADH 3,5 μ moles dicetilo 12 μ moles	— íd.	0,5 mls. de prepa- ración enzimá- tica ²
PRODUCCION DE CO ₂	7 y 8	Como anterior omitiendo el NADH	— —	íd.
	9 y 10	Tampón de bicarbonato sódico pH 6,1; NADH 2,5 μ moles; dicetilo 12 μ moles	— —	0,5 mls. de prepa- ración enzimá- tica ²
	11 y 12	Como anterior omitiendo el NADH	— —	íd.
PRODUC- CION DE ACIDOS	13	3 mls. de agua destilada	— —	—
TERMOMA- ROMETRO				

¹ Calculado para dar esa molaridad después de mezclar con el recipiente lateral.

² Preparación enzimática: 30 mgrs. de liofilizado de la fracción acetónica en 10 mls. de agua destilada.

³ Calculado para dar ese pH después de mezclar con el recipiente lateral.

Las muestras se mantuvieron así durante 10 minutos para conseguir el equilibrio de las fases, transcurridos los cuales se mezcló el contenido del recipiente lateral con el del compartimento principal, anotándose a partir de este momento los niveles alcanzados por las columnas externas de todos los manómetros a intervalos de 3 minutos durante media hora, al término de cuyo período se suspendieron las lecturas.

Los datos obtenidos pusieron de manifiesto que no hubo consumo de oxígeno ni producción de gas ni de ácido durante los análisis, tanto en ausencia como en presencia de NADH. Estos resultados podrían ser debidos a que la reacción no hubiese tenido lugar o a que fuese tan lenta que no pudiera ser detectada manométricamente; con objeto de comprobar este extremo se determinó el NADH residual en las muestras que lo contenían inicialmente, resultando ser, por término medio, 1,1 μ moles en las muestras con tampón fosfato y 1,7 μ moles en las que contenían tampón bicarbonato sobre 3,5 μ moles puestos.

3.1.2. Reducción del diacetilo, oxidación del NADH y producción de acetoina.

Se obtuvo una solución de diacetilo cuya concentración exacta se determinó por el método de OWADES y JAKOVAC, resultando ser de 8,6 μ moles en 30 mls. de tampón fosfato 0,1 M. pH 6,1, y otra de NADH a la misma molaridad (calculada por su extinción a 340 m μ) que la de diacetilo. Como preparación enzimática se utilizó, dada la necesidad de que las muestras carecieran de actividad NADH deshidrogenasa y butilén-glicol deshidrogenasa, un liofilizado de la fracción proteica que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona.

En 30 mls. de la solución de NADH se suspendieron 20 mgrs. de liofilizado. La suspensión fue vertida en un frasco de vidrio de 100 mls. de capacidad, al que se transfirieron a continuación 30 mls. de la solución de diacetilo. Inmediatamente después se cerró con un tapón de goma fácilmente perforable, se sumergió en un baño termostático a 25° C. y se anotó el tiempo.

A lo largo del experimento se tomaron con una jeringa varias muestras de 2 mls., en uno de los cuales se determinó la concentración de NADH y en el otro la de diacetilo por la técnica de OWADES y JKOVAC, sin destilación previa (véase metodología general); este método, muy específico, no es sensible a la acetoina incluso a niveles superiores a 10 μ moles/ml.,

como quedó establecido en el capítulo III, lo que permitió seguir la transformación de diacetilo durante la reacción sin interferencias. Los análisis del NADH se efectuaron por su extinción a 340 m μ ; a esta longitud de onda y a las concentraciones utilizadas en esta experiencia, prácticamente no absorben la acetoina ni el diacetilo.

Al cabo de 120 minutos se habían consumido ya todo el diacetilo y todo el NADH. Se suspendió entonces la incubación y, en una aliquota del residuo, se determinó la acetoina presente por el método de WESTERFELD, comparando las lecturas con las correspondientes a dos patrones internos de composición conocida.

En la tabla 27 y figura 24 se resumen los resultados obtenidos, mostrando el paralelismo existente entre la oxidación del NADH, la reducción del diacetilo y la producción de acetoina; por cada mol de diacetilo reducido se oxida uno de NADH y se produce uno de acetoina.

Esta estequiométría coincide exactamente con la que corresponde a la diacetilo reductasa (Ec. V. 2.).

TABLA XXVII

Estequiometría de la reacción: reducción del diacetilo, oxidación del NADH y producción de acetoina.

Tiempo (minutos)	μ moles de diacetilo reducidos	μ moles de NADH oxidados	μ moles de acetoina producidos
7	1,5	1,6	No determinados
11	2,1	2,1	»
17	3,4	3,4	»
40	6,1	6	»
72	7,7	7,6	»
90	8,2	8,2	»
100	8,6	8,6	8,6

Condiciones de ensayo: Volumen total, 60 mls.; temperatura, 25° C.; pH 6,1 (tampón fosfato bisódico-monopotásico 0,05 M.); preparación, 20 mgrs. de liofilizado de la fracción acetónica 1-1,3.

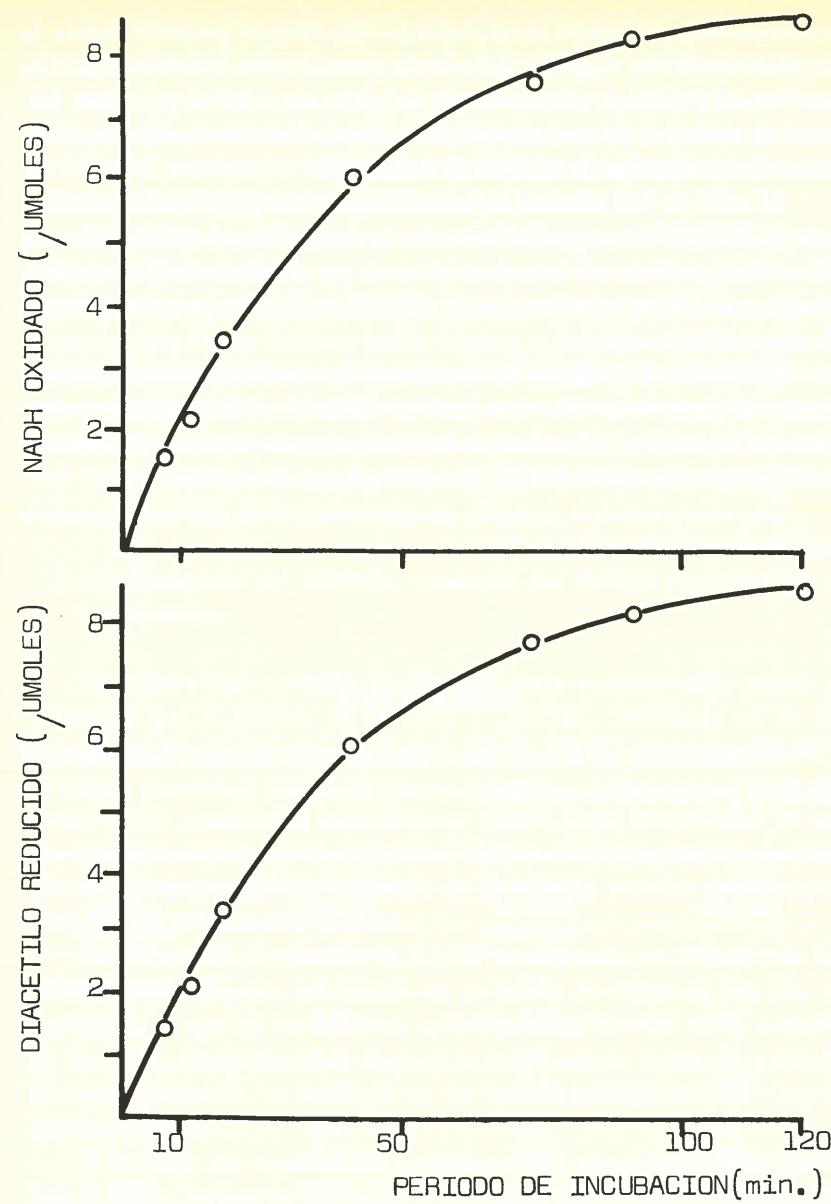


Figura 25.—Representación gráfica de la reducción del diacetilo y la oxidación del NADH en función del tiempo.

3.1.3. Reversibilidad.

La reducción enzimática del diacetilo por las preparaciones de diacetilo reductasa de origen bacteriano ha sido descrita como un proceso reversible por unos autores e irreversible por otros. En el experimento anterior los dos substratos se consumieron totalmente, comportamiento que es el que corresponde a un sistema irreversible. Sin embargo cabía la posibilidad de que, siendo reversible, el equilibrio estuviese muy desplazado en el sentido de los productos de la reacción descrita por la ecuación V. 2, por lo que se decidió comprobar si el sistema podía operar en sentido inverso y en qué condiciones de concentración de acetoína y NAD.

Se estableció para ello el siguiente esquema experimental, basado en el incremento de la absorbancia a 340 m μ que produce la reducción del NAD a NADH:

Cubeta muestra: 0,5 mls. de preparación enzimática (unos 2 mgrs. de liofilizado acetónico/ml. de agua destilada); tampón fosfato 0,05 M. pH 6,1; acetoína y NAD variables (véase tabla 28). Volumen, 3 mls.

Cubeta referencia: Como la anterior, omitiendo la acetoína.

TABLA XXVIII
Reversibilidad de la reacción.

Mezcla de reacción		nmoles de NAD reducidos por minuto.
Acetoína (μmoles)	NAD (μmoles)	
12	0,6	0
120	0,6	0
12	6	0
120	6	0
12	12	0
120	12	0
360	30	2
720	30	3

Condiciones de ensayo: Temperatura, 25° C.; pH 6,1 en tampón fosfato 0,05 M. La actividad en el sentido diacetilo-acetoína en el mismo volumen (0,5 mls.) de la preparación fue de 129 nmoles de diacetilo reducidos/min.

En la experiencia se incluyó también un testigo mediante la determinación, por la técnica habitual, de la actividad en el sentido diacetilo-acetona.

Como se recoge en la tabla 28, solamente en los ensayos efectuados a concentraciones muy elevadas de NAD y acetona pudo registrarse un ligero cambio en la absorbancia a 340 m μ , por otra parte tan pequeño que no podía ser considerado como prueba evidente de la existencia de actividad. Con objeto de aclarar este extremo, se incubó a 25° C. una muestra con 0,5 mls. de suspensión enzimática, tampón fosfato 0,05 M. pH 6,1, 30 μ moles de NAD y 720 μ moles de acetona, en un volumen de 3 mls., durante 12 horas. Transcurrido este tiempo se determinó el diacetilo presente en ésta por el método de OWADES y JAKOVAC, con resultado negativo.

V. 3.2. ESPECIFICIDAD DE SUBSTRATOS

Se ha estudiado la especificidad de substratos sustituyendo el diacetilo y el NADH por otras sustancias químicas o biológicamente próximas. La velocidad de la reacción con los distintos substratos se determinó siguiendo espectrofotométricamente a 340 m μ la oxidación de los piridínucleótidos utilizados como donadores de hidrógeno. Para ello se estableció el siguiente sistema de análisis:

Cubeta referencia: Tampón fosfato bisódico-monopotásico 0,05 M. pH 6,1; coenzima, 0,6 μ moles; substrato, 12 μ moles; preparación enzimática 0,5 mls. de una suspensión en agua destilada de liofilizado de la fracción proteica que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona (unos 3 mgrs./ml.). Volumen total, 3 mls.

Cubeta muestra: Como la anterior, omitiendo la preparación.

Los resultados obtenidos, que figuran en la tabla 29, ponen de manifiesto que el diacetilo no es reemplazable como substrato por ningún otro de los ensayados, pero si el NADH, que pudo ser substituido por el NADPH.

En vista de ello se comprobó (mediante la técnica espectrofotométrica descrita en el apartado 3.1.3. de este capítulo) la reversibilidad de la reacción utilizando NADP (30 μ moles) en lugar de NAD y con una concentración de acetona de 720 μ moles en los 3 mls. de muestra. Como en el caso anterior, se apreció cierto cambio en la absorbancia a 340 m μ ,

TABLA XXIX
Especificidad de substratos.

Substrato ¹	Mezcla de reacción		Actividad (nmoles de coen- zima oxidados/min.) en 0,5 mls. de preparación
		Coenzima ²	
Diacetilo		NADH	152,8
Acetona		»	0
Dietilcetona		»	0
Hexanodiona		»	0
Piruvato		»	0
Oxaloacetato		»	0
α -cetoglutarato		»	0
Acetato		»	0
Diacetilo		NADPH	173,4

¹ 12 μ moles en 3 mls. de mezcla de reacción.

² 0,6 μ moles en 3 mls. de mezcla.

Como preparación enzimática se utilizó una suspensión de liofilizado de la fracción que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona (unos 3 miligramos de liofilizado por ml. de agua destilada).

pero las determinaciones de diacetilo en la mezcla de reacción tras 12 horas de incubación a 25° C. dieron nuevamente resultados negativos.

V. 3.3. PARTICIPACIÓN DE COFACTORES.

Se conocen una gran variedad de reacciones enzimáticas activadas por iones metálicos, entre ellas la mayor parte de las condensaciones, que suelen requerir iones magnesio y manganeso, y un buen número de oxi-doreducciones catalizadas por enzimas dependientes del NAD, como la lactato deshidrogenasa y la alcohol deshidrogenasa, que utilizan el cinc como activador. SEITZ y COL. (1963a) han señalado que en la reducción del diacetilo por la diacetilo reductasa de origen bacteriano no participan iones metálicos como cofactores; sin embargo existe la posibilidad de que el enzima de origen animal siga otros mecanismos.

Influencia de diversos quelantes sobre la actividad diacetilo-reductasa.

Los efectos de los quelantes sobre la actividad diacetilo-reductasa fueron estudiados como sigue:

Se preparó una suspensión de liofilizado acetónico en tampón fosfato pH 6,1 0,1 M. (0,5 miligramos/ml.) de la que se pipetaron periódicamente fracciones de 1,5 mls. en tubos de ensayo que contenían 0,5 mls. de una solución de diacetilo en agua destilada (24 μ moles/ml.) y otros 0,5 mls. de una solución 6×10^{-3} M. de uno de los siguientes quelantes: EDTA, ácido salicílico, pirofosfato sódico, tiourea, cupferrón y ácido oxálico. Cada una de las muestras fue mantenida durante 10 minutos en un baño de hielo, transcurridos los cuales se añadieron 0,6 μ moles de NADH en 0,5 mls. de agua destilada y se determinó espectrofotométricamente la actividad diacetilo reductasa. Durante la experiencia se efectuaron tres controles, que sufrieron idéntico tratamiento, en los que la solución quelante fue sustituida por 0,5 mls. de agua destilada.

Excepto en el caso del ácido salicílico, que inhibe la reacción en casi un 40 %, no se observó, a las concentraciones utilizadas, ningún efecto significativo de los demás quelantes sobre la actividad diacetilo reductasa (tabla 30).

TABLA XXX

Influencia del EDTA, ácido salicílico, pirofosfato sódico, tiourea, cupferrón y ácido oxálico sobre la actividad diacetilo reductasa.¹

	Actividad diacetilo reductasa en nmoles reducidos/minuto	% de la actividad control
Control	69,5	—
EDTA	70	100,7
Ácido salicílico	42,5	61,5
Pirofosfato sódico	64,3	92,5
Ácido oxálico	67,6	97,1
Cupferrón	73,7	106
Tiourea	72,2	103,8

¹ Concentración de quelante en el ensayo 10^{-3} M.

Efectos de la diálisis.

Experimento 1.

Se preparó un extracto acuoso de polvo acetónico en 4 volúmenes de agua destilada fría. Tres mililitros de este extracto se transfirieron a un tubo «Visking», cuyos extremos se cerraron con dos trozos de bramante ordinario, y se dializaron en una cámara frigorífica a 0 — 4° C. contra 20 volúmenes de agua destilada durante 4 horas; al término de este período se retiró el líquido de diálisis —que se concentró a vacío hasta unos 2 mls.— y fue sustituido por otros 100 volúmenes de agua destilada contra los que continuó el intercambio durante 20 horas más. Otros dos mls. de suspensión enzimática fueron utilizados como testigo y se conservaron durante todo el experimento en las mismas condiciones de temperatura que la muestra.

Cuando se dió por finalizada la diálisis, se ensayó la actividad diacetilo reductasa en 0,5 mls. de dializado y en la misma cantidad de la preparación testigo, lo que puso de manifiesto una pérdida de actividad de aproximadamente un 40 % en la muestra sometida a diálisis. Se intentó recuperar la actividad añadiendo a la mezcla de reacción 1 ml. de dializante concentrado, con el resultado de que la pérdida fue aún mayor: alrededor de un 52 %.

Se pensó entonces que podría existir algún inhibidor en el bramante utilizado para cerrar los tubos de diálisis. Con objeto de determinar la cuantía de esta hipotética inhibición se dejó macerar durante una noche en 10 mls. de agua destilada un trozo de éste de tamaño parecido al del usado en la experiencia descrita; se ensayó la actividad diacetilo reductasa en 0,5 mls. de un extracto acuoso de polvo acetónico recién preparado y se repitió el análisis en presencia de 1 ml. del extracto. Se apreció de este modo un descenso en la velocidad de reacción en torno a un 16 %, suficiente para explicar la pérdida de actividad al añadir el concentrado del primer cambio de dializante, pero que no justificaba la de la muestra sometida a diálisis.

Experimento 2.

Estos resultados hicieron pensar que la pérdida de actividad podría ser debida a la inactivación del enzima durante la diálisis, por lo que se

deceñó ensayar como dializantes otros agentes que pudieran darle mayor estabilidad.

Con este objeto se prepararon siete muestras de 5 ml. de un extracto acuoso de polvo acetónico en 4 volúmenes de agua destilada, de las que una fue utilizada como testigo y las otras seis dializadas, en las mismas condiciones que en el experimento anterior, contra uno de los siguientes medios: agua destilada, tampón fosfato bisódico monopotásico pH 6,1 0,05 M., 0,2 M. y 0,5 M., tampón fosfato 0,05 M. pH 6,1 con cisteína 1×10^{-3} M y glutatión reducido 1×10^{-3} M. Al término de la dialización se midieron los volúmenes de los dializados y se analizó la actividad diacetilo reductasa, con los resultados que se recogen en la tabla 31.

Como en el caso anterior se apreció una fuerte pérdida de actividad en el dializado contra agua. De los demás dializantes ensayados, el tampón fosfato 0,5 M. resultó ser el más protector, con una pérdida que puede

TABLA XXXI

Efectos de la dialización¹ frente a agua, glutatión 10^{-3} M., tampón fosfato pH 6,1 0,05, 0,2 y 0,5 M. y cisteína 10^{-3} M. en tampón fosfato pH 6,1 0,05 M., sobre la actividad diacetilo reductasa.

Dializado contra:	Actividad total en la muestra (μ moles diac. reduc./min.)	% de pérdida de actividad respecto al testigo
Agua destilada	155,4	45,5
Glutatión 10^{-3} M.	0	100
Tampón fosfato pH 6,1 0,05 M.	174,6	38,8
Tampón fosfato pH 6,1 0,2 M.	220,2	22,8
Tampón fosfato pH 6,1 0,5 M.	273,9	4
Cisteína 10^{-3} M. en T. fosfato pH 6,1 0,05 M.	168	41,1
Testigo	285	—

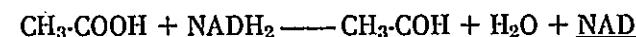
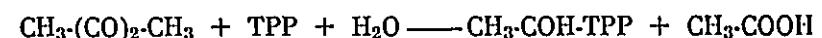
¹ Las dializaciones se efectuaron durante 4 horas contra 20 volúmenes y 20 horas más contra 100 volúmenes, en cámara frigorífica a 0-4° C.

ser considerada nula puesto que era dentro del margen de error del método.

V. 4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que no existe intercambio gaseoso ni producción de ácidos durante la reacción y que por cada mol de diacetilo reducido se oxida uno de NADH y se produce uno de acetona. La única posibilidad, y muy remota, de que estos resultados pudiesen corresponder a la dismutación del diacetilo por la piruvato oxidasa sería que el ácido acético liberado en la primera fase de la reacción fuese transformado rápidamente y en su totalidad a acetaldehido mediante la intervención de la acetato deshidrogenasa dependiente del NADH y que todo el aldehido acético producido reaccionase con el acetaldehido activado para dar acetona, con lo que la estequiometría, globalmente considerada, sería idéntica a la esperable de la actuación de una diacetilo reductasa.

(Ec. V. 4)



El planteamiento expuesto requeriría que las preparaciones tuvieran una actividad acetato deshidrogenasa tan grande que todo el ácido acético fuese transformado inmediatamente a acetaldehido, antes de que, en presencia de tampón bicarbonato, pudiese dar lugar a la liberación de CO_2 . Sin embargo, los datos que se recogen en el apartado V. 3.2. ponen de manifiesto que no se cumple esta condición, por otra parte muy difícil de sostener teóricamente, puesto que no pudo detectarse actividad acetato deshidrogenasa alguna en suspensiones de liofilizados de la fracción recogida entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona similares a las que se utilizaron en el establecimiento de las relaciones entre el consumo de diacetilo y NADH y la producción de acetona. Por lo tanto se descarta totalmente la intervención del sistema diacetilo mutasa, con lo que la estequiometría de la reacción únicamente puede corresponder a la de la catalizada por la diacetilo reductasa (Ec. V. 2).

El sistema ha mostrado ser irreversible aún a concentraciones de hasta 0,01 M. respecto al NAD y 0,24 M. respecto a la acetoina. Los ligeros cambios en la absorbancia a 340 m μ observados en los ensayos realizados a concentraciones de substratos muy elevadas han de ser debidos a artefactos de la técnica, puesto que, tras 12 horas de incubación, no pudo detectarse diacetilo alguno en las muestras utilizando el método de OWADES y JAKOVAC que es sensible a éste a niveles de hasta 0,05 μ moles. Estos resultados coinciden con los publicados por STRECKER y HARARY (1954), SEITZ y COL. (1963, a) y SPECKMAN y COLLINS (1968, b) acerca de la diacetilo reductasa de origen bacteriano.

Los enzimas varían ampliamente en su especificidad, no siendo infrecuentes los que presentan incluso estereoespecificidad, ni los que pueden aceptar como substratos un amplio grupo de sustancias más o menos afines. La diacetilo reductasa es muy específica con respecto al diacetilo (2-3 butano-diona) que no puede ser reemplazado, pese a su semejanza estructural, por la acetona, dietilcetona (pentano-3-ona), acetilacetona (pentano-2-4-diona), hexanodiona (hexano-2-5-diona), piruvato, oxaloacetato o α -cetoglutarato. Los requisitos estructurales son pues mucho más estrictos que la presencia de un grupo cetónico en la proximidad de otros metílicos o de dos grupos cetónicos.

Respecto al otro substrato, la diacetilo reductasa es mucho menos exigente y puede utilizar como coenzima tanto el NADH como el NADPH. En este sentido no ofrece un comportamiento anormal: la L-glutamato deshidrogenasa y la glucosa deshidrogenasa hepática tienen la misma capacidad de utilizar ambos piridin-nucleótidos, aunque en el reino animal abundan menos estas oxido-reductasas que las específicas para uno de ellos (véase DIXON y WEBB, 1964).

Los extractos brutos muestran actividad frente a la acetoina como substrato pero no las preparaciones purificadas, lo que deja claramente establecido que, en el hígado de bóvido, la diacetilo reductasa y la butilénglicol deshidrogenasa son dos enzimas distintos y separables siguiendo el método de purificación empleado en esta tesis.

Entre las bacterias, en cambio, esta dualidad no está tan clara. STRECKER y HARARY (1954) obtuvieron preparaciones parcialmente purificadas de *Aerobacter aerogenes* en las que la relación entre las actividades diacetilo reductasa y butilénglicol deshidrogenasa variaba ampliamente en las diferentes etapas de la purificación, lo que interpretaron como claro indicio de la existencia de dos sistemas enzimáticos distintos. BRYN,

HETLAND y STORMER (1971) creen haber demostrado lo contrario en el mismo microorganismo, al comprobar un cociente constante entre ambas actividades tras haber multiplicado la actividad específica inicial por un factor de 124, momento en el que afirman haber obtenido una preparación homogénea a juzgar por su comportamiento electroforético. De hecho, el trabajo de BRYN y col. presenta varias lagunas de consideración: no han demostrado, por ejemplo, que la proteína detectada en los electroferogramas posea actividad enzimática y resulta muy difícil de creer que la diacetilo reductasa-butilénglicol deshidrogenasa represente el 0,8 % de la proteína celular total, como ellos deducen.

Al igual que la diacetilo reductasa de procedencia bacteriana (SEITZ y col, 1963, a) la de hígado de ternera no requiere activadores metálicos ni cofactores dializables adicionales. La pérdida de actividad durante la diáisisis en los casos en que se ha detectado, hay que atribuirla a la escasa estabilidad del enzima en soluciones de baja fuerza iónica (véase capítulo VII). Tampoco la inhibición por el ácido salicílico tiene necesariamente que interpretarse como indicio de la exigencia de cofactores metálicos (cobre o hierro, probablemente); ésto sería difícil de armonizar con la falta absoluta de actividad inhibidora exhibida por el resto de los agentes de quebradura que también complejan el hierro y el cobre (cupferrón, pirofosfato sódico, ácido oxálico, EDTA, etc.). De otra parte, es bien sabido que los efectos inhibidores del ácido salicílico suelen ser sumamente complejos, habiéndose descrito casos, como en la D-aminoácido oxidasa, en los que inhibe la reacción por tres mecanismos simultáneos que nada tienen que ver con su efecto quelante: compitiendo con el enzima, compitiendo con el substrato y formando complejos con el coenzima.

CAPITULO VI

DISTRIBUCION INTRACELULAR

VI. 1. INTRODUCCION

El conocimiento preciso de las propiedades bioquímicas de un enzima incluye el estudio de su localización intracelular. La elucidación del papel que desempeña en el conjunto de la fisiología celular exige conocer si se halla o no ligado a algún orgánulo celular y en qué medida.

Para alcanzar este objetivo suelen utilizarse dos tipos de técnicas: 1) las histo y citoquímicas, complejas y con frecuencia laboriosas; 2) las de disruptión y fraccionamiento celular.

El segundo tipo de técnicas se ha convertido durante los últimos años, tras los trabajos de los pioneros CLAUDE, HOGEBOON, SCHNEIDER, PALADE, DE DUVE y ANDERSON relativos a la separación centrífuga de los orgánulos, en una técnica bioquímica standard. En esencia el método consta de dos etapas: 1) desintegración mecánica de los tejidos en un homogeneizador de cuchillas tipo Waring Blender, ultraturrax, etc., en un homogenizador de vidrio con émbolo del mismo material o de teflón, o en un mortero con alúmina o arena lavada; 2) centrifugación y ultracentrifugación en un medio de soporte próximo a la isotonicidad, generalmente sacarosa 0,25 M.

La velocidad de sedimentación es directamente proporcional al campo G, definido en términos relativos a la fuerza centrífuga por la ecuación (VI. 1).

(Ec. VI. 1)

$$G = w^2 \cdot r = r \cdot \frac{4\pi^2 (r.p.m.)^2}{3.600}$$

siendo «w» la velocidad angular, «r» la distancia de la partícula al eje de rotación y «r.p.m.» las revoluciones por minuto a que gira el rotor.

El tiempo necesario para sedimentar una partícula esférica desde la parte superior a la inferior de un tubo de centrífuga viene dado por la expresión:

(Ec. VI. 2)

$$t = \frac{9}{2} \cdot \frac{\mu}{(w \cdot rp)^2} \cdot \frac{R_s}{(dp - d)} \cdot \ln \frac{R_s}{R_f}$$

donde « μ » es la viscosidad del medio, «rp» el radio de la partícula «dp» y «d» las densidades de la partícula y del medio, respectivamente, y « R_s » y « R_f » las distancias respectivas de la superficie y el fondo del tubo al eje del rotor.

El tiempo requerido para la sedimentación de una partícula es pues inversamente proporcional al cuadrado de su radio y a la diferencia entre su densidad y la del medio.

En los esquemas de ultracentrifugación del tipo del que se utiliza aquí, se eliminan primero los residuos celulares y células no rotas, luego los núcleos, que son muy densos y las partículas de mayor tamaño, seguidos de mitocondrias y lisosomas, microsomas (fragmentos de los retículos liso y rugoso) y ribosomas libres.

El esquema específico de un fraccionamiento celular para un determinado tejido de una especie no es siempre válido para otro tejido o el mismo tejido de una especie muy alejada de aquella para la que se diseñó el esquema inicial, porque sus orgánulos pueden no tener la misma densidad ni igual tamaño. La aplicación de un determinado esquema de fraccionamiento a un nuevo tipo de tejido o en una especie en la que este esquema no ha sido suficientemente comprobado debe ir acompañado de la determinación en las fracciones aisladas de los llamados enzimas o sustancias marcadoras, para las que ya ha sido demostrada su localización definitiva en un tipo concreto de partícula. Cada fracción obtenida queda así definida e identificada en términos bioquímicos.

En las experiencias descritas en este capítulo se pretendió averiguar la localización intracelular de la diacetilo reductasa en hígado de ternera e hígado de paloma aplicando una técnica de fraccionamiento por ultracentrifugación.

VI. 2. MATERIAL Y METODOS

Obtención de fracciones subcelulares de hígado de ternera y paloma.

Las fracciones subcelulares fueron obtenidas por un procedimiento basado en el descrito por MAHLER y CORDES (1968); los lisosomas se separaron de la fracción mitocondrial siguiendo la técnica de WANG (1969).

Las muestras de hígado se obtuvieron de animales recién sacrificados, siendo mantenidas en hielo durante el breve espacio de tiempo transcurrido entre la muerte del animal y la obtención de los homogeneizados tisulares y sometidas a la siguiente marcha experimental:

Se trituraron, con una picadura de husillo «Elma n.º 0», entre 20 y 100 grs. de hígado convenientemente decapsulado; el triturado fue homogeneizado en un Potter —Elvehjem en presencia de tres volúmenes de una solución 0,32 M. en sacarosa, 0,02 M. en tris — clorhídrico pH 7,5 y 3 mM. en Cl_2Mg . El homogeneizado se filtró a través de tres capas de gasa y cada 12,5 mls. del filtrado se diluyeron a 20 mls. con sacarosa 0,25 M. Todas estas operaciones se realizaron en una cámara frigorífica a 0 — 4.º C.

El homogeneizado fue centrifugado en una ultracentrífuga «Spinco L - 50» según el esquema de la figura 26. Los depósitos así obtenidos se resuspendieron en sacarosa 0,25 M. y se conservaron en baño de hielo hasta el momento en que se efectuaron los análisis.

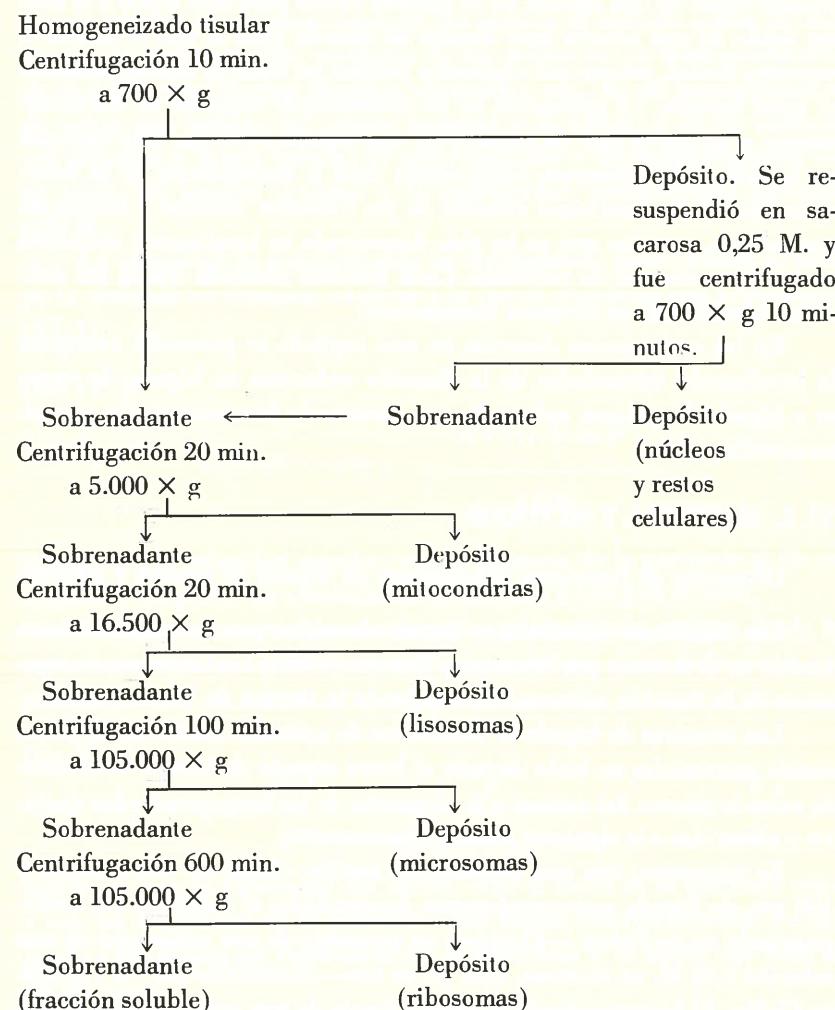


Figura 26.—Marcha experimental seguida para la obtención de fracciones subcelulares.

Determinaciones.

Proteína.

Se llevaron a cabo por la modificación del método colorimétrico de JHONSON para la determinación de nitrógeno (JHONSON, 1941).

Actividad diacetilo reductasa.

Se siguió la técnica descrita en la metodología general.

Lactato deshidrogenasa.

Fue determinada en el sentido piruvato-lactato siguiendo los cambios en la absorbancia a 340 m μ debidos a la oxidación concomitante de NADH a NAD. El método de ensayo utilizado fue el siguiente:

Cubeta referencia: tampón fosfato pH 7 0,13 M., 2,5 mls.; NADH, 0,2 mgrs.; piruvato sódico, 4,4 mgrs.; preparación enzimática, 0,2 mls. Volumen total, 3 mls.

Cubeta muestra: como la anterior, omitiendo la preparación.

Diaforasa.

Se efectuaron, según la técnica recomendada por ERNSTER (1967), como la diferencia entre la actividad NADH - colorante reductasa inespecífica total y la insensible al dicumarol. La reducción del colorante fue registrada espectrofotométricamente a 600 m μ , estableciéndose el sistema de análisis como sigue:

Cubeta referencia: tampón de Tris 0,02 M. pH 7,5; NADH, 0,6 moles; diclorofenol-indofenol, 1,2 μ moles. Volumen total, 3 mls.

Cubeta muestra:—como la anterior más 0,1 ml. de preparación enzimática.

Los ensayos se repitieron añadiendo a la cubeta muestra 3 nmoles de dicumarol. La actividad diaforasa se calculó por la diferencia entre las velocidades de reacción en ausencia y en presencia de éste.

Actividad succinato-citocromo c reductasa

Se determinó observando el incremento de absorbancia a 550 m μ en el siguiente sistema de análisis:

Cubeta referencia.—Tampón fosfato pH 7,4 0,1 M., 2 mls. Citocromo c, 0,1 μ moles. Cianuro potásico, 6 μ moles. Preparación enzimática, 0,2 mls. Volumen total, 3 mls.

Cubeta muestra.—Como la anterior más 0,2 μ moles de succinato sódico.

Ubiquinona.

Se empleó la modificación de HOFFMANN y col. (1964) al método de HUMPHREY y REDFEARN: a dos mls. de las preparaciones se añadieron cuatro de metanol y, tras agitar durante 30 segundos en un agitador de tubos, 5 mls. de éter de petróleo 40° C - 60° C. Las muestras fueron agitadas nuevamente durante 60 segundos y centrifugadas a 3.000 \times g 10 minutos, con lo que se separaron dos capas de las que la superior (éter de petróleo) se recogió con una pipeta de Pasteur. A la inferior se añadieron otros 5 mls. de éter de petróleo, repitiéndose las operaciones descritas. La capa superior de la centrifugación fue retirada y unida a la anterior.

A la suma de ambas se añadieron 3 mls. de metanol del 95 % y las muestras fueron nuevamente agitadas y centrifugadas, descartándose la capa inferior. La superior se agitó en presencia de una solución de tricloruro de hierro en etanol (5 mgrs. por ml.) y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente, al término de los cuales se le añadieron 2 mls. de agua destilada. Tras un minuto de agitación, la capa superior se recogió por centrifugación; el éter de petróleo se eliminó a vacío y el residuo se disolvió en etanol para espectrofotometría.

La cantidad de ubiquinona presente en la muestra se calculó por la diferencia entre los espectros oxidado y reducido (con unos pocos cristales de borohidruro) según el método de CRANE y col. (1959).

VI. 3. RESULTADOS.

VI. 3.1. DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DE LA ACTIVIDAD DIACETILO REDUCTASA EN EL HÍGADO DE TERNERA.

Experimento 1.

A partir de 25 grs. de hígado de ternera fresco, se obtuvieron, en las condiciones descritas en el apartado VI. 2, 110 mls. de homogeneizado del que se prepararon las siguientes fracciones subcelulares según el

esquema de centrifugación de la figura 26: núcleos y restos celulares, núcleos purificados (resuspendiendo la fracción núcleos y restos celulares en una solución 2,4 M. en sacarosa y 1 M. en Cl_2Mg y centrifugando durante 60 minutos a 50.000 \times g.), fracción mitocondrial (mitocondrias y lisosomas obtenidos como una fracción única a 7.000 \times g 10 minutos), microsomas, ribosomas y fracción soluble. En alícuotas de estas preparaciones se determinó la proteína y la actividad diacetilo reductasa, con los resultados que figuran en la tabla 32 referidos al total de cada una de las fracciones.

En la citada tabla puede observarse que la actividad se distribuye fundamentalmente entre las fracciones mitocondrial y soluble.

TABLA XXXII

Distribución intracelular de la actividad diacetilo reductasa en el hígado de ternera (I).

Fracción	Proteína total (mgrs.)	Actividad ¹ total	Actividad ¹ por mgr. de prot.	% de la actividad total recuperada
Núcleos y restos celulares.	1.105,6	652	0,6	5,1
Núcleos puros	—(2)	0	0	0
Mitocondrias y lisosomas	1.532,3	4.270	2,8	32,8
Microsomas	524,9	1.397	2,6	10,8
Ribosomas	387,6	623	1,6	4,8
Soluble	1.863,4	6.030	3,2	46,5
	5.413,8	12.972		
Homogeneizado total	5.747	12.346	2,2	
Recuperación %	94,2	105,1		

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

² No determinada.

Experimento 2.

La experiencia descrita anteriormente se repitió a partir de 80 grs. de hígado de ternera, de los que se obtuvieron 340 mls. de homogeneizado. Puesto que el experimento anterior puso de manifiesto que una parte importante de la actividad total estaba distribuida en la fracción mitocondrial, se consideró conveniente separar ésta en preparaciones de mitocondrias y lisosomas por el método de WANG (1969). Por otra parte y en vista de que, como era de esperar, no se había detectado actividad diacetilo reductasa alguna en los núcleos purificados, se prescindió de obtener muestras de éstos.

En consecuencia, el homogeneizado fue fraccionado, según el esquema de la figura 26, en núcleos y restos celulares, mitocondrias, lisosomas, microsomas, ribosomas y fracción soluble, en las que se ensayó la proteína y la actividad diacetilo reductasa.

Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 33.

TABLA XXXIII

Distribución intracelular de la actividad diacetilo reductasa en hígado de ternera (II).

Fracción	Proteína total (mgrs.)	Actividad ¹ total	Actividad ¹ por mgr. de prot.	% de la actividad total recuperada.
Núcleos y restos celulares.	2.346,5	5.537	2,4	9,8
Mitocondrias	3.088	11.080	3,6	19,5
Lisosomas	1.117	8.337	7,4	14,7
Microsomas	1.590,8	7.736	4,9	13,6
Ribosomas	1.308,1	2.322	1,8	4,4
Soluble	4.565,4	21.550	4,8	37
	14.008,2	56562		
Homogeneizado total	16.150	57.728	3,8	
Recuperación %	86,7	97,9		

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

Experimento 3

Siguiendo la misma técnica que se utilizó en el experimento anterior, se fraccionaron 80 mls. de un homogeneizado de 20 gr. de hígado de ternera fresco. Los resultados de los análisis de actividad diacetilo reductasa y proteína efectuados en las distintas fracciones figuran en la tabla 34, mostrando, como en las otras dos experiencias ya descritas, que la actividad está distribuida entre la fracción particulada, concentrándose principalmente en las mitocondrias, y la soluble.

TABLA XXXIV
Distribución intracelular de la actividad diacetilo reductasa en hígado de ternera (III).

Fracción	Proteína total (mgrs.)	Actividad ¹ total.	Actividad ¹ por mgr. de prot.	% de la actividad total recuperada
Núcleos y restos celulares	747,5	338	0,5	3,6
Mitocondrias	783,8	1.724	2,2	17,8
Lisosomas	278,6	805	2,9	8,3
Microsomas	349,3	507	1,4	5,3
Ribosomas	252,5	830	3,3	8,6
Soluble	1.283,4	5.377	4,2	56,1
	3.695,1	9.581		
Homogeneizado total	4.096	10.240	2,5	
Recuperación %	90,2	93,6		

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

V. 3.2. EXPERIENCIAS CON HÍGADO DE PALOMA.

3.2.1. *Comprobación de la aplicabilidad del método de fraccionamiento descrito por Mahler y Cordes para la obtención de fracciones subcelulares de hígado de paloma.*

El método de fraccionamiento seguido en las experiencias hasta ahora descritas fue diseñado para la obtención de preparaciones subcelulares de hígado de mamíferos, por lo que no podía asegurarse que fuese igualmente

aplicable en los fraccionamientos a partir de hígado de paloma. En consecuencia se consideró necesario comprobar este extremo mediante el uso de marcadores.

A partir de 110 mls. de homogeneizado de hígado de paloma (25 grs.) se obtuvieron, siguiendo la técnica habitual, preparaciones de mitocondrias más lisosomas, microsomas, ribosomas y fracción soluble. En todas ellas se analizó la ubiquinona presente y las actividades lactato deshidrogenasa, succinato-citocromo c reductasa y diaforasa, según los métodos que se describen en VI. 2. Los resultados obtenidos —tabla 35— mostraron que la concordancia entre la distribución esperable de estos marcadores —(mitocondrias: ubiquinona y succinato-citocromo c reductasa; microsomas: diaforasa; soluble: lactato deshidrogenasa)— y la determinada experimentalmente es muy satisfactoria, demostrando que el método de fraccionamiento estudiado es también válido para la obtención de fracciones subcelulares de hígado de paloma.

TABLA XXXV

Distribución de la ubiquinona y de las actividades diaforasa, lactato deshidrogenasa y succinato-citocromo C reductasa en hígado de paloma.

Fracción	% del total recuperado			
	Lactato deshidrogenasa	Diaforasa	Succinato cit. C red.	Ubiquinona
Mitocondrias más lisosomas	—	34	89	77
Microsomas	1	57	10	23
Ribosomas	32	6	1	—
Soluble	67	3	—	—

3.2.2. Distribución intracelular de la actividad diacetilo reductasa de hígado de paloma.

Experimento 1.

Una muestra de 30 grs. de hígado procedente de cuatro palomas y recogida inmediatamente después del sacrificio, fue triturada, homogenei-

zada y centrifugada en las condiciones habituales. Se obtuvieron así las fracciones núcleos y restos celulares, núcleos puros, fracción mitocondrial, microsomas, ribosomas y fracción soluble, en las que se determinó la proteína y la actividad diacetilo reductasa.

Los resultados de esta experiencia —tabla 36— muestran que, a diferencia de lo observado en los experimentos con hígado de ternera, la actividad se distribuye fundamentalmente en la fracción soluble.

TABLA XXXVI
Distribución intracelular de la actividad diacetilo reductasa en hígado de paloma (I).

Fracción	Proteína total (mgrs.)	Actividad ¹ total	Actividad ¹ por mgr. de prot.	% de la actividad total recuperada
Núcleos y restos celulares	1.104,4	310	0,3	0,2
Núcleos puros	—(2)	0	0	0
Mitocondrias y lisosomas	1.637,6	758	0,5	0,4
Microsomas	674,4	383	0,6	0,2
Ribosomas	612,4	23.344	38,1	12,8
Soluble	1.737,6	158.094	92,5	86,4
	5.766,4	182.889		
Homogeneizado total	6.660	160.704	24,1	
Recuperación %	87,3	113,8		

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

² No determinada.

Experimento 2.

A partir de 24 gr. de hígado de paloma se obtuvieron 110 mls. de homogeneizado que fueron fraccionados en núcleos y restos celulares, mitocondrias, lisosomas, microsomas, ribosomas y fracción soluble.

Los resultados de los análisis de las preparaciones subcelulares figuran en la tabla 37.

TABLA XXXVII

Distribución intracelular de la actividad diacetilo reductasa en hígado de paloma (II).

Fracción	Proteína total (mgrs.)	Actividad total ¹	Actividad por mgr. de prot.	% de la actividad total recuperada
Núcleos y restos celulares	1.187,5	480	0,4	0,34
Mitocondrias	1.163,5	2.248	1,9	1,6
Lisosomas	309,4	435	1,4	0,31
Microsomas	495	0	0	0
Ribosomas	414,5	10.242	24,2	7,3
Soluble	1.306,5	126.999	97	90,4
	4.876,4	140.405		
Homogeneizado total	4.812,5	130.020	28,1	
Recuperación %	101,3	110,8		

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

Experimento 3.

Los experimentos anteriores se repitieron con 80 mls. de homogeneizado obtenidos de 20 grs. de hígado de paloma, con los resultados de la tabla 38 que confirman los obtenidos en las experiencias ya descritas en el sentido de que la actividad diacetilo reductasa se distribuye fundamentalmente en la fracción soluble de las células hepáticas de paloma.

VI. 4. DISCUSION

Con excepción de los núcleos, la diacetilo reductasa se encuentra en el hígado de ternera localizada en todas las fracciones subcelulares. Alrededor del 50 % de la actividad total se recupera en la fracción soluble y el resto es arrastrado con las partículas. De ellas la mayor parte de la actividad se distribuye en las mitocondrias y los lisosomas (en conjunto alrededor del 30 % de la total), pero también dan cuenta de la mayor parte de la proteína de las fracciones particuladas. Considerado en términos de actividad específica, la fracción soluble manifiesta consistente y constante-

TABLA XXXVIII

Distribución intracelular de la actividad diacetilo reductasa en hígado de paloma (III).

Fracción	Proteína total (mgrs.)	Actividad total ¹	Actividad por mgr. de prot.	% de la actividad total recuperada
Núcleos y restos celulares	752,5	413	0,5	0,55
Mitocondrias	1.317,6	965	0,7	1,3
Lisosomas	200,3	394	1,5	0,55
Microsomas	889,9	0	0	0
Ribosomas	408,9	4.750	11,6	6,6
Soluble	1.058,2	65.445	61,6	91
	4.628,4	71.967		
Homogeneizado total	4.400	67.680	15,4	
Recuperación %	105,2	106,3		

¹ En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

mente una concentración del enzima pero no así las fracciones particuladas, por lo que no parece que pueda hablarse de una localización específica en ninguna partícula.

En el hígado de paloma, por el contrario, alrededor del 90 % de la actividad total se recupera en la fracción soluble, en la que la actividad específica se multiplica aproximadamente por un factor de 4 con respecto al homogeneizado total. Solamente el 10 % de la actividad es arrastrada con las fracciones particuladas y de éstas en su inmensa mayoría se observa localizada en los ribosomas. En el hígado de paloma la diacetilo reductasa es pues un enzima característico de la fracción soluble, distribución que coincide con la de algunas otras deshidrogenasas dependientes de los piridinucleótidos, como la lactato deshidrogenasa, y con la de los enzimas que participan en la glicolisis.

En ambas especies, por tanto, la diacetilo reductasa se encuentra localizada fundamentalmente en la fracción soluble, aunque la distribución de la actividad total en las distintas fracciones es bastante diferente en el hígado de ternera que en el de paloma. La desigual distribución en el

hígado de las dos especies examinadas no puede considerarse como una característica anormal; de hecho SOLOMON (1959) y WANG (1969) han observado incluso desplazamientos en la localización intracelular de ciertos enzimas en el hígado de animales de una misma especie en distintos estados de desarrollo y es frecuente observar alteraciones en la distribución de acuerdo con el estado fisiológico del hígado (BROWN y col., 1965).

La presencia del enzima fundamentalmente en la fracción soluble concuerda con la hipótesis de STRECKER y HARARY (1954) de que la diacetilo reductasa y la butilénglico deshidrogenasa podrían constituir en el metabolismo microbiano un mecanismo de reoxidación de los piridinucleótidos. Dado el papel desempeñado por el sistema NAD-NADH en la glicolisis y la localización subcelular de los enzimas glicolíticos, parece razonable asumir que la fracción soluble es la localización más apta para desempeñar una función de esta naturaleza en los animales superiores.

CAPITULO VII

ESTUDIOS CINETICOS

VII. 1. INTRODUCCION.

Tal vez la característica más esencial y distintiva de las reacciones bioquímicas frente a las más comunes en la química orgánica es que las primeras están catalizadas enzimáticamente, lo que significa la introducción en el sistema de un nuevo participante, además de los habituales substrato/s y producto/s, cuya actuación permite que estas reacciones transcurran a una velocidad compatible con las necesidades biológicas. Los estudios cinéticos constituyen el medio más importante, y con frecuencia el único, para conocer cómo realizan los enzimas esta función y en qué modo se ve afectada su actividad por las condiciones del entorno. Este tipo de estudios permite además determinar cuáles son las condiciones más adecuadas para el ensayo de la actividad enzimática.

En ausencia de activadores o inhibidores, las principales características que determinan la velocidad de una reacción enzimática son el

pH y temperatura del medio, la concentración de enzima y la concentración de substrato/s.

(1) En general, los enzimas son activos solamente en un rango de pH limitado y en la mayor parte de los casos se observa la existencia de un óptimo definido a ambos lados del cuál la actividad decrece, dando a las gráficas en que se representa la velocidad de la reacción en función del pH su típica forma más o menos acampanada. Estos efectos son debidos fundamentalmente a cambios en la configuración de la molécula enzimática, que se manifiestan sobre la afinidad de los grupos activos hacia los substratos o productos e incluso sobre la propia estabilidad del enzima.

(2) La velocidad de las reacciones químicas aumenta con la temperatura, porque aumenta también la proporción de moléculas con la energía necesaria para reaccionar. ARRHENIUS estableció experimentalmente que la representación del logaritmo neperiano de la constante de velocidad en función de la inversa de la temperatura absoluta es una línea recta, cuya pendiente es la energía de activación de la reacción dividido por la constante de los gases, en números negativos.

Esta ley es de validez general para las reacciones elementales, pero la relación entre $\ln K$ y $1/T$ sólo es lineal en un rango relativamente estrecho de temperaturas puesto que con ella cambian tanto los reaccionantes como la estructura de la disolución, con lo que también cambia la naturaleza de la reacción. En el caso concreto de las reacciones enzimáticas, la desnaturación proteica por efecto de la temperatura limita aún más el intervalo de cumplimiento de la ley. Para este tipo de reacciones, y en términos generales, la linearidad suele conservarse entre una temperatura ligeramente superior a la de congelación, antes de que el cambio de estado provoque una alteración notable en las condiciones de actuación de los reaccionantes, y unos 30°C.

(3) En condiciones ideales, con substrato/s suficiente/s para no actuar como factores limitantes y ausencia de activadores o inhibidores, dos moléculas de enzima que actúen independientemente en una solución transformarán el doble de substrato en un tiempo dado que una sola molécula. La velocidad será, por tanto, proporcional a la concentración enzimática correspondiendo a la expresión.

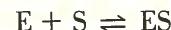
(Ec. VII. 1)

$$v = K \cdot (E)$$

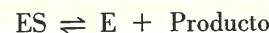
en la que K es la constante de velocidad y (E) la concentración de enzima. Las representaciones de « v » en función de (E) deben dar líneas rectas que pasan por el origen y, de hecho, esto es lo que se encuentra experimentalmente en la gran mayoría de los casos.

(4) La concentración de substratos (DIXON y WEBB, 1964) es uno de los factores más importantes que determinan la velocidad de las reacciones enzimáticas. En casi todos los casos, cuando la velocidad se representa en función de la concentración de substrato se obtiene una hipérbola rectangular, como cabría esperar si el proceso dependiese de una simple disociación cuando uno de los disociados permanece constante. MICHAELIS y MENTEN (1913), adoptando la proposición de HENRI (1902) de que el enzima forma un complejo con su substrato que se escinde para dar lugar a enzima libre y producto, expusieron una teoría que implica una disociación de este tipo en la que se basan la mayor parte de los estudios de cinética enzimática y que puede describirse como un proceso en dos etapas:

(Ec. VII. 2.)



(Ec. VII. 3)



Si representamos por « s » la concentración de substrato, por « e » la concentración *total* de enzima y por « p » la del complejo enzima-substrato, la concentración de enzima *libre* será $(e - p)$ y la constante de equilibrio de la reacción VII. 2 será:

(Ec. VII. 4).

$$K_s = \frac{(e - p)s}{p}$$

Si la reacción VII. 3 es mucho más lenta que VII. 2 —de modo que ES permanezca en equilibrio con E y S — la concentración del complejo enzima-substrato vendrá dada por la reordenación de la ecuación VII. 4 en la forma:

(Ec. VII. 5)

$$p = \frac{e \cdot s}{K_s + s}$$

En las condiciones expuestas anteriormente la etapa VII. 3 actúa como limitante de la velocidad de la reacción que, en consecuencia, vendrá determinada por la ecuación:

(Ec. VII. 6)

$$v = K \cdot p$$

donde K es la constante de velocidad de la disociación de ES . Substituyendo el valor de « p » en VII. 5,

(Ec. VII. 7)

$$v = \frac{K \cdot e}{1 + \frac{K_s}{s}}$$

Cuando la concentración de substrato es muy grande en comparación con K_s , « v » será igual a $K \cdot e$ e igual a la velocidad máxima, obtenida cuando el enzima está saturado con substrato. Representando esta velocidad máxima como V , tendremos:

(Ec. VII. 8)

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_s}{s}}$$

que es la conocida ecuación de MICHAELIS. La reordenación de la misma en la forma:

(Ec. VII. 9)

$$(V - v) (K_s + s) = V \cdot K_s$$

coincide con la ecuación de la hipérbola rectangular, teniendo en cuenta que, a concentración fija de enzima, V es constante.

Las gráficas de velocidad en función de la concentración de substrato, para una determinada reacción enzimática, están por lo tanto definidas por dos magnitudes, V y K_s , siendo K_s la constante de equilibrio de la reacción VII. 2 y V la velocidad máxima de la reacción a una concentración dada de enzima.

V y K_s pueden ser determinadas experimentalmente por diversos procedimientos. Si se representa « v » en función de « s » la curva obtenida corresponde a una sección de una hipérbola rectangular, como se ha indicado. A medida que « s » va creciendo lo hace también « v », hasta alcanzar un máximo en que el aumento en la concentración de substrato ya no afecta a la velocidad de la reacción, que es entonces « V ». En las condiciones prefijadas de que la concentración del complejo enzima-substrato permanezca constante y que « v » esté limitada por la disociación del citado complejo, K_s equivale a la constante de MICHAELIS (K_m), operacionalmente definida como la concentración de substrato cuando la velocidad de la reacción es la mitad de la máxima, puesto que en la ecuación VII. 8 « v » será igual a $V/2$ cuando « s » lo sea a K_s .

En la práctica, la principal dificultad para calcular la constante de equilibrio por este procedimiento radica en conseguir concentraciones de substrato suficientemente altas para alcanzar el valor real de V . Este inconveniente puede ser soslayado mediante el método de representación propuesto por LINEAWAVER y BURK (1934). Las gráficas de $1/v$ en función de $1/s$, deben dar una línea recta, correspondiente a la ecuación VII.8 reorganizada en la forma:

(Ec. VII. 10)

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V \cdot s} + \frac{1}{V}$$

y esta línea recta cortará el eje de abscisas en el punto $-1/K_s$ y el de ordenadas en $1/V$, como puede comprobarse haciendo, respectivamente $1/v = 0$ y $1/s = 0$ en la ecuación VII. 10.

Aunque las representaciones doblemente inversas son las más utilizadas para la determinación de V y K_s , estos valores pueden ob-

tenerse por otros procedimientos. Si se hace figurar « s »/« v » en función de « s » se obtiene una línea recta de pendiente $1/V$ que corta el eje de ordenadas en K_s/V (HANES, 1932) y que corresponde a la ecuación que se obtiene multiplicando VII . 10 por « s ».

(Ec. VII. 11.)

$$\frac{s}{v} = \frac{K_s}{V} + \frac{s}{V}$$

También puede emplearse el método de WOOLF (1932), representando v en función de « v »/« s » según la ecuación:

(Ec. VII. 12)

$$v = V - \left(K_s \cdot \frac{v}{s} \right)$$

que puede obtenerse reordenando la ecuación VII. 8. La correspondiente recta corta el eje de ordenadas en V , y tiene como pendiente $-K_s$.

La teoría clásica de MICHAELIS es aplicable solamente a los casos que implican la participación de un solo substrato. La mayor parte de las reacciones enzimáticas son, sin embargo, del tipo $A + B = C + D$, en el cual intervienen dos substratos, y ello obliga a utilizar otros modelos para los estudios cinéticos. La mecánica de MICHAELIS ha sido aplicada por HALDANE a las reacciones en que el enzima y los dos substratos forman complejos ternarios, suponiendo que se establecen cuatro equilibrios:

(Ec. VII. 13) $E + A \rightleftharpoons EA$

(Ec. VII. 14) $E + B \rightleftharpoons EB$

(Ec. VII. 15) $EA + B \rightleftharpoons EAB$

(Ec. VII. 16) $EB + A \rightleftharpoons EAB$

Siendo las cuatro ecuaciones de equilibrio correspondientes:

(Ec. VII. 17) $(e \cdot p_a \cdot p_b \cdot p) \cdot a = K_a p_a$

(Ec. VII. 18) $(e \cdot p_a \cdot p_b \cdot p) \cdot b = K_b p_b$

(Ec. VII. 19) $p_a \cdot b = K'_b p$

(Ec. VII. 20) $p_b \cdot a = K'_a p$

donde a , b , p , p_a y p_b son las concentraciones de A, B, EAB, EA y EB respectivamente, y K_a , K_b , K'_b y K'_a las respectivas constantes de los cuatro equilibrios. La velocidad será proporcional a la concentración de EAB, luego

$$(Ec. VII. 21) \quad v = K \cdot p$$

Eliminando los términos p de estas ecuaciones, se obtiene:

$$(Ec. VII. 22)$$

$$v = \frac{K \cdot e}{1 + \frac{K'_a}{a} + \frac{K'_b}{b} + \frac{K_a \cdot K'_b}{a \cdot b}}$$

Esta ecuación contiene solamente tres de las cuatro constantes de equilibrio, puesto que la cuarta es redundante y está relacionada a las otras tres por la ecuación:

$$(Ec. VII. 23) \quad K_a \cdot K'_b = K'_a \cdot K_b$$

Para cualquier concentración constante de B, las variaciones en la concentración de A darán una curva del tipo de la de MICHAELIS representada por la ecuación:

$$(Ec. VII. 24)$$

$$v = \frac{K_e \cdot b / (K'_a + b)}{(1 + \frac{K_a \cdot K'_b + K'_a \cdot b}{K'_b + b}) \cdot a}$$

en la que se observa que la afinidad aparente por A es dependiente de la concentración de B.

Las cuatro constantes de equilibrio pueden ser obtenidas por el método gráfico de FLORINI y VESTLING (1957) o por el DALZIEL (1957) que es similar. La representación de $1/v$ en función de $1/b$ a concentración fija de A, dará una línea recta que corta el eje de ordenadas en $1/V_a$. Utilizando diferentes concentraciones de A se obtienen así una serie de valores de $1/V_a$ (la velocidad máxima de la reacción a la concentración de A utilizada) que, representados en función de $1/a$

dan una línea recta que corta el eje de abscisas en $-1/K'_a$. Las rectas de las gráficas originales de $1/v$ en función de $1/b$ para varios valores de A se cortan en un punto situado en $1/b = -1/K_b$. Por el mismo procedimiento, el punto de intersección de las rectas correspondientes a la representación de $1/v$ en función de $1/a$ a distintos valores de B corresponde a $1/a = -1/K_a$ y los datos de $1/V_b$ representados en función de $1/b$ permitirán calcular K'_b .

El esquema expuesto anteriormente y las ecuaciones de él resultantes son válidas para aquellas reacciones que impliquen la participación de dos substratos que se combinan con el enzima sin un orden obligatorio y en las cuales la disociación del complejo ternario enzima-substrato A -substrato B es tan lenta que actúa realmente como la etapa limitante de la velocidad. Sin embargo, estas condiciones no se cumplen en todos los casos. Muchas reacciones enzimáticas siguen modelos cinéticos distintos del anterior, algunos de los cuales dan lugar a ecuaciones de velocidad idénticas a la VII.22, en las que sólo cambia el significado de las constantes. En la discusión del presente capítulo se tratarán algunos mecanismos de reacción a los que pudiera corresponder la actuación de la diacetilo reductasa.

Además de los ya citados existen otros muchos factores que afectan a la forma de las curvas de velocidad de las reacciones enzimáticas. Puede, por ejemplo, inhibirse la reacción por la acumulación de los productos, descender notablemente el grado de saturación del enzima con el substrato a medida que transcurre la reacción o inactivarse alguno de los reaccionantes a la temperatura o el pH de ensayo. Normalmente todas estas complicaciones pueden evitarse si los ensayos de velocidad se efectúan antes de que estos factores comiencen a actuar, determinando velocidades iniciales. En este sentido deben entenderse todos los resultados referentes a actividades enzimáticas expuestos en esta tesis, salvo cuando se indica expresamente lo contrario.

VII. 2. METODOS

Preparaciones enzimáticas.

Salvo indicación expresa se utilizaron liofilizados de la fracción que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona, que se obtuvieron como se indica en el capítulo IV.

Determinaciones de actividad diacetilo reductasa.

Se siguió la técnica general descrita en el capítulo II, con las variaciones correspondientes al tipo de preparación enzimática utilizada. Las modificaciones introducidas en el medio de análisis o en las condiciones de ensayo durante la realización de los experimentos se especificarán en cada caso.

VII. 3. RESULTADOS.

VII. 3.1. EXPERIENCIAS PREVIAS.

3.1.1. Estabilidad de las preparaciones enzimáticas.

La actividad diacetilo reductasa en las preparaciones de la fracción acetónica 1 — 1,3 es relativamente poco estable cuando éstas se suspenden en agua destilada, lo que representa un grave inconveniente para la realización de estudios cinéticos, por lo que se decidió comprobar la estabilidad en otros medios de suspensión.

Con este objeto se suspendieron 30 mgrs. de liofilizado de la fracción acetónica 1 — 1,3 en 0,7 mls. de agua destilada, pipetándose a partir de esta suspensión cinco muestras de 0,1 mls. con las que se prepararon nuevas suspensiones en los siguientes medios: sacarosa 1,5 M., tampón fosfato bisódico monopotásico pH 6,1 1 M. y 0,5 M., diacetilo 0,02 M. y agua destilada. Volumen final de cada una de las preparaciones: 5 mls.

Las muestras se conservaron a 0° C. en un baño de hielo, tomándose alícuotas para el ensayo de actividad diacetilo reductasa inmediatamente después de preparadas las suspensiones, a las 4 horas, a las 11 horas y a las 23 horas. En todas las determinaciones de actividad se ajustó la molaridad del tampón fosfato en el medio de análisis a 0,2 M.

Los resultados obtenidos se recogen en la figura 27, donde puede comprobarse que las suspensiones en sacarosa 1,5 M. y en tampón fosfato 0,5 M. mantienen su actividad prácticamente sin variaciones durante todo el experimento, frente a una pérdida de aproximadamente el 16 % al cabo de 4 horas y de casi el 40 % a las 23 horas en las muestras suspendidas en agua. Aún cuando la presencia de sus substratos suele favorecer la estabilidad de los enzimas, el diacetilo ha dado resultados negativos como agente estabilizante.

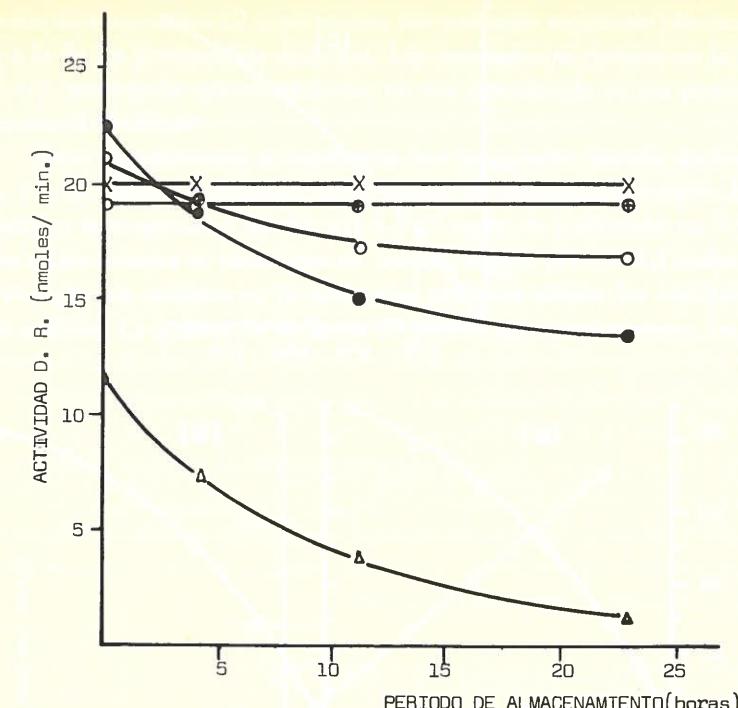


Figura 27.—Estabilidad de la actividad diacetilo reductasa en liofilizados de la fracción que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona, suspendidos en distintos medios: (X) Sacarosa 1,5 M. (●) Agua. (○) Tampón fosfato pH 6,1 1 M. (⊕) Id., 0,5 M. (△) Diacetilo 0,02 M.

VII. 3.2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA SOBRE LA ACTIVIDAD DIACETILO REDUCTASA.

La proporcionalidad entre la concentración de enzima y la actividad diacetilo reductasa se estudió utilizando muestras de liofilizados de la fracción acetónica 1 — 1,3. En el primero de los ensayos realizados se tomaron 5 mgrs. de un liofilizado —marcado F 2. 2. 70— que fueron suspendidos en 5 mls. de sacarosa 1,5 M., determinándose a continuación las velocidades iniciales de reacción a concentraciones variables —entre 0,1 y 1 mls./3 mililitros de medio de análisis— de esta preparación. Los resultados experimentales se representan en la figura 28 (a).

Las gráficas de esta naturaleza suelen atribuirse a la presencia de un inhibidor en las preparaciones enzimáticas. Con objeto de liberar las

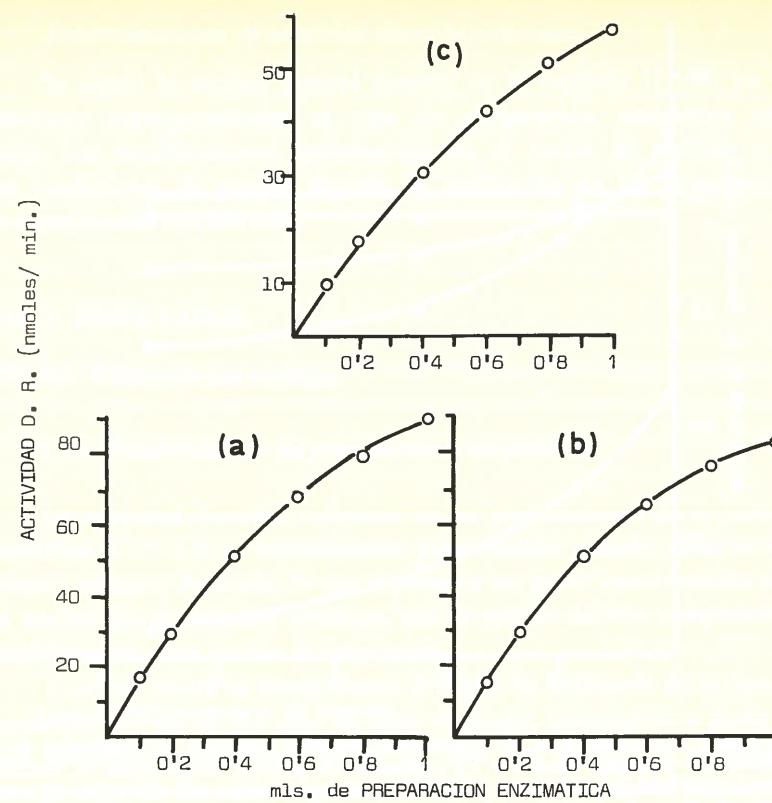


Fig. 28.—Presencia de un inhibidor interno en algunas preparaciones enzimáticas (I). Relación entre actividad y concentración de enzima (prep. liofilizado fracción acetónica, lote F. 2.2.70). Medio de suspensión: (a) Sacarosa 1,5 M. (b) Id. y dializado contra el mismo medio. (c) Agua.

muestras de un hipotético inhibidor dializable se suspendieron en 5 mls. de sacarosa 1,5 M. 5 mgrs. del mismo liofilizado empleado en el experimento anterior y se dializaron a 0 — 2°C. frente a 25 volúmenes del mismo medio de suspensión durante 14 horas y contra otros 50 volúmenes durante 4 horas más. Al término de la dialización se procedió a efectuar los ensayos en las mismas condiciones que en la experiencia antes descrita. En la figura 28 (b) se representan gráficamente los datos obtenidos, que demuestran que el hipotético inhibidor interno no es dializable en las condiciones experimentales utilizadas.

La posibilidad de que el inhibidor estuviera presente en la propia solución de sacarosa se estudió sustituyéndola por agua destilada como

medio de suspensión. El experimento fue realizado siguiendo idéntica pauta a la de los previamente descritos. Los resultados se recogen en la figura 28 (c), mostrando que el inhibidor no era introducido en las preparaciones con el disolvente.

Estos experimentos se repitieron con una nueva partida de liofilizado (A 15. 3. 70), utilizando como medio de suspensión tampón fosfato bisódico monopotásico 0,5 M. pH 6,1 (5 mgrs. de liofilizado en 5 mililitros). Los ensayos se efectuaron en tampón fosfato pH 6,1 0,2 molar, para evitar que los cambios en la molaridad pudiesen alterar los resultados de los análisis. La gráfica de la figura 29 (a), en que se representan los datos

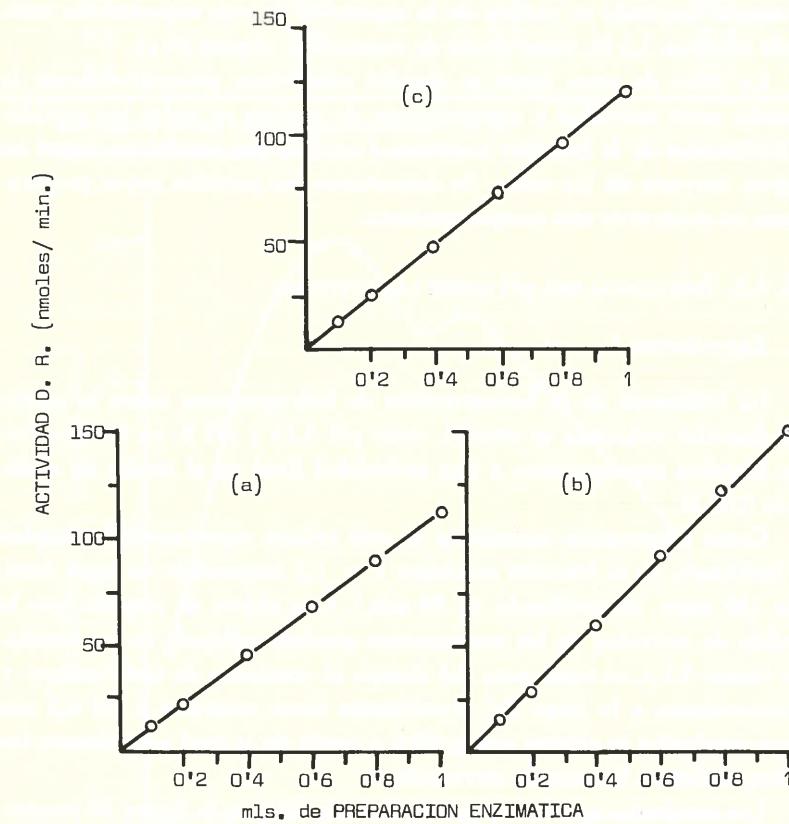


Figura 29.—Presencia de un inhibidor interno en algunas preparaciones enzimáticas (II). Relación observada normalmente entre la concentración de enzima y la actividad. Medio de suspensión: (a) Tampón fosfato 0,5 M. pH 6,1. (b) Agua. (c) Sacarosa 1,5 M.

obtenidos, muestra que la actividad es función lineal de la concentración de enzima en el rango utilizado.

Los resultados de este experimento parecían indicar que en la nueva partida no existía modificador alguno, lo que a su vez reforzaba la hipótesis de la presencia de un inhibidor interno en el liofilizado F. 2. 2. 70. Con el fin de comprobar estas posibilidades, 5 mgrs. de liofilizado de la partida A. 15. 3. 70 se suspendieron en 5 mls. de agua destilada y se determinó, en las condiciones habituales, la actividad diacetilo reductasa a concentración variable de enzima, con los resultados que se recogen en la figura 29 (b). Como en el caso anterior, la actividad fue función lineal de los mililitros de preparación enzimática en la mezcla de reacción. El mismo resultado se obtuvo de la repetición de este experimento utilizando sacarosa 1,5 M, como medio de suspensión. (figura 29 c).

En vista de estos datos se decidió comprobar sistemáticamente la relación entre actividad y concentración de enzima en todas las partidas de liofilizados de la fracción acetónica 1 - 1,3, que resultó ser lineal en la gran mayoría de los casos. Se descartaron las partidas cuyas preparaciones no mostraron este comportamiento.

VII. 3.3. INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD.

Experimento 1.

La influencia de la concentración de hidrogeniones sobre la actividad diacetilo reductasa se estudió, entre pH 5,15 y pH 8, en tampón fosfato bisódico monopotásico a una molaridad final en el medio de análisis de 0,05 M.

Como preparación enzimática en este primer experimento se empleó un liofilizado de la fracción acetónica 1 - 1,3 suspendido en agua destilada (40 mgrs. de liofilizado en 20 mls.). Con objeto de impedir que la pérdida de actividad de las suspensiones quedase reflejada en los resultados (véase 3.1.), se tomó nota del tiempo al comienzo de cada ensayo y se intercalaron a lo largo del experimento cinco controles a pH 6,2 con cuyos resultados se obtuvo una gráfica a partir de la cual se aplicaron los correspondientes factores de corrección.

Los resultados que se recogen en la tabla 39 y en la figura 30 mostraron la existencia de dos picos de actividad, uno a pH 6,1 aproximadamente y otro a pH 6,8, siendo la relación de altura entre ambos picos de: actividad a pH 6,8/act. pH 6,1 = 0,89. Estos resultados podrían ser debidos

TABLA XXXIX
Influencia del pH sobre la actividad diacetilo reductasa en preparaciones de la fracción que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona.

pH ¹ de ensayo	Actividad ² /0,5 mls. de preparación	pH ¹ de ensayo	Actividad ² /0,5 mls. de preparación
5,15	29,2	6,8	87,4
5,55	79,7	7	83,4
5,8	89,7	7,2	73,7
6	100,1	7,4	71,1
6,2	96,4	7,6	66,2
6,4	90,6	7,8	58,8
6,6	83,9	8	47,2

¹ En tampón fosfato bisódico monopotásico 0,05 M.

² En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

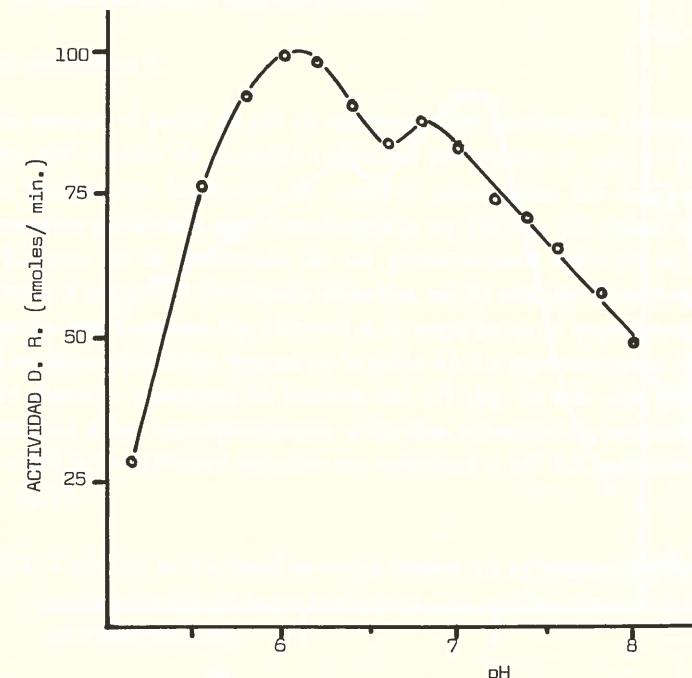


Figura 30.—Perfil de pH de la actividad diacetilo reductasa en la fracción que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona.

a la existencia en la muestra de dos enzimas que catalicen la misma reacción y tengan un pH óptimo distinto, por lo que se decidió estudiar esta posibilidad comprobando el perfil de pH en las diferentes etapas de purificación.

Experimento 2.

La experiencia descrita anteriormente se repitió empleando como preparación enzimática un extracto acuoso del polvo acetónico obtenido como se ha descrito en el capítulo IV. Estas muestras tienen actividades butilénglico deshidrogenasa y NADH oxidasa, que fueron descontadas por el procedimiento habitual que se cita en la metodología general.

En la tabla 40 y en la figura 31 se representan los resultados obtenidos. Como en el experimento anterior, el perfil de pH muestra un pico de actividad a pH 6,1 y otro a pH 6,8; su relación de altura es: actividad a pH 6,8/actividad a pH 6,1 = 0,925.



Figura 31.—Perfil de pH de la actividad diacetilo reductasa en extractos acuosos (1/4) de polvo acetónico.

TABLA XL
Influencia del pH sobre la actividad diacetilo reductasa en extractos acuosos (1/4) de polvo acetónico.

pH ¹ de ensayo	Actividad ² /0,5 mls. de preparación	pH ¹ de ensayo	Actividad ² /0,5 mls. de preparación
5,4	24	6,6	41,3
5,5	26,9	6,8	42,7
5,65	28,8	7	41,3
5,75	34,6	7,2	39,4
5,8	37	7,4	38,4
6	45,6	7,6	37
6,2	46,1	7,8	35,6
6,4	44,1	8	34,1

¹ En tampón fosfato bisódico monopotásico.

² En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

Experimento 3.

Se estudió el perfil de pH en muestras muy purificadas (actividad específica 600 nmoles de diacetilo reducidos por minuto y mgr. de proteína en las condiciones habituales de ensayo) procedentes del liofilizado de una muestra purificada por cromatografía en DEAE - 22 (véase capítulo IV). Excepto en la naturaleza de las preparaciones enzimáticas utilizadas (unos 4 mgrs. del liofilizado disueltos en 20 mls. de agua destilada), la marcha experimental fue idéntica a la seguida en el experimento 1.

Los datos obtenidos figuran en la tabla 41. La representación de la actividad diacetilo reductasa en función del pH (fig. 32) da una gráfica en todo similar a las correspondientes a las dos experiencias anteriores, con picos a pH 6,1 y 6,8 cuya relación es: actividad a pH 6,8/actividad a pH 6,1 = 0,915.

VII. 3.4. EFECTOS DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD. CÁLCULO DE LA CONSTANTE DE ACTIVACIÓN DE LA REACCIÓN Y DEL COEFICIENTE DE TEMPERATURA.

Se estudiaron mediante el ensayo de actividad diacetilo reductasa a distintas temperaturas, entre 3,5 y 38,5° C., que se controlaron haciendo

TABLA XLI

Influencia del pH sobre la actividad diacetilo reductasa en preparaciones purificadas por cromatografía en DEAE-22.

pH ¹ de ensayo	Actividad ² /0,5 mls de preparación ³	pH ¹ de ensayo	Actividad ² /0,5 mls. de preparación
5,15	22	6,8	41,4
5,55	30,5	7	37,8
5,8	39,8	7,2	33,4
6	42,7	7,4	29
6,2	45,4	7,6	25,8
6,4	42,6	7,8	21,3
6,6	38,7	8	17,5

¹ En tampón fosfato bisódico monopotásico 0,05 M.

² En nmoles de diacetilo reducidos por minuto.

³ Unos 4 mgrs. de liofilizado (A. E. 600 nmoles de diacetilo reducidos/minuto/mgr. de proteína) disueltos en 20 mls. de agua destilada.

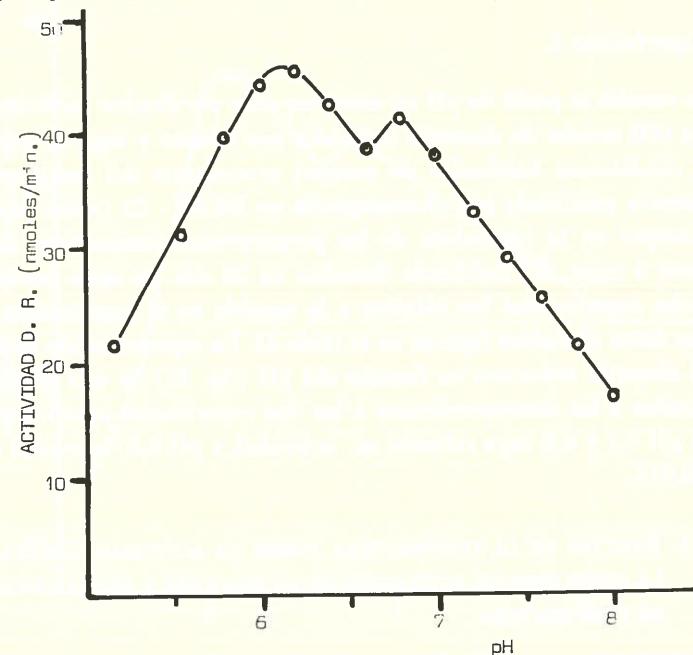


Figura 32.—Perfil de pH de la actividad diacetilo reductasa en liofilizados de la fracción acetónica 1 - 1,3 purificados por cromatografía en DEAE-22.

circular agua termostatada en un ultratermostato «Colora» modelo «N», entre la doble pared de la cámara de un espectrofotómetro Beckman D-B.

La determinación fidedigna de actividades iniciales requiere que la temperatura de las muestras se mantenga sin cambios durante el ensayo. Para que se cumpla esta condición suele recurrirse a ajustar a la temperatura del análisis la de los reactivos ya antes de ser mezclados, de modo que las condiciones de trabajo se hayan alcanzado ya desde el tiempo cero. Sin embargo esta técnica no pudo ser aplicada en este caso dada la inestabilidad de la diacetilo reductasa cuando es expuesta durante largo tiempo a las temperaturas relativamente elevadas que requiere la realización de este experimento.

Para evitar este inconveniente las preparaciones enzimáticas (5 mgrs. de liofilizado de la fracción acetónica 1 - 1,3 suspendidos en 6 mls. de sacarosa 1,5 M.) se conservaron en un baño de hielo y las soluciones de diacetilo y NADH y el tampón fosfato se mantuvieron durante unos 10 minutos en un baño termostático «Retostat» regulado a una temperatura superior a la correspondiente de análisis, calculada para compensar el descenso consiguiente a la adición del enzima a la mezcla de reacción. Una vez que la temperatura de estos reactivos alcanzó la del baño se pipetaron, en las proporciones habituales, en un tubo con tapón esmerilado que fue sumergido en el baño durante otros dos minutos. Se añadieron a continua-

TABLA XLII
Efectos de la temperatura sobre la actividad diacetilo reductasa.
Cálculo de la constante de activación.

Temperatura de análisis (grados C.)	nmoles diac. reducidos/minuto/0,5 mls. preparación.	ln activ. en nmoles diacetilo reducidos min.	Temp. de análisis °Kelvin	1×10^3 T.K
38,5	153,6	5,03695	311,5	3,210
35,5	146,4	4,98361	306,5	3,263
29	124,8	4,82831	302	3,311
24,8	91,2	4,51305	297,8	3,358
20,1	60	4,09434	293,1	3,411
15,5	41,8	3,73290	288,5	3,465
10	27,3	3,30689	283	3,533
3,5	13	2,56495	276,5	3,616

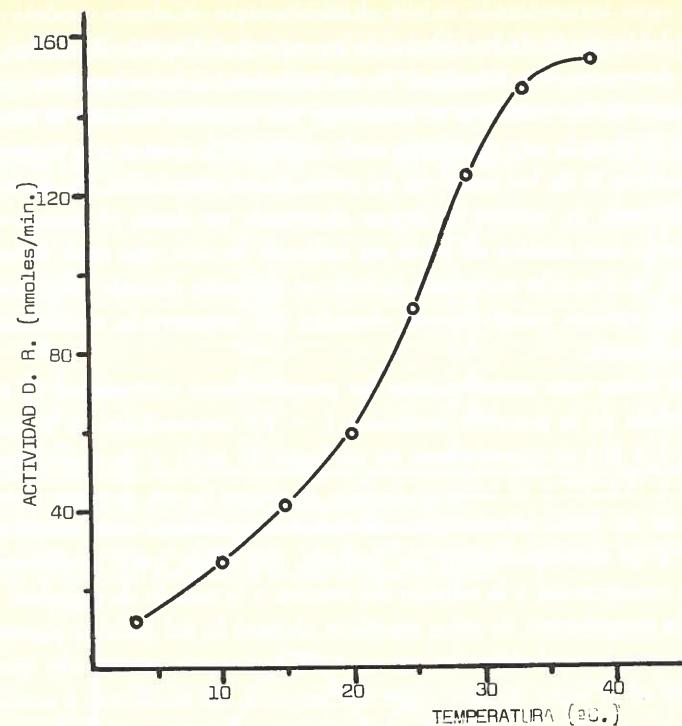


Figura 33.—Influencia de la temperatura sobre la velocidad de la reacción catalizada por la diacetilo reductasa. Condiciones de análisis: Tampón fosfato 0,05 M. pH 6,1; diacetilo, 12 μ moles; NADH, 0,6 μ moles; volumen total, 3 mls.

ción 0,5 mls. de preparación enzimática; las muestras se transfirieron rápidamente a las cubetas del espectrofotómetro y se registró el consumo de NADH durante dos minutos. Para los ensayos efectuados a temperatura inferior a la ambiente los baños se refrigeraron con hielo triturado.

Al terminar cada ensayo se recomprobó la temperatura de las mezclas de reacción con un termómetro de mercurio graduado en décimas de grado centígrado.

En los cuadros 1.^o y 2.^o de la tabla 42 se recogen los datos obtenidos.

La representación de la velocidad de reacción en función de la temperatura en grados centígrados —figura 33— produce una curva típicamente sigmoida.

Cálculo del coeficiente de temperatura.

El coeficiente de temperatura entre 5 y 25° C. se ha calculado a partir de los datos de la gráfica 33. En este rango la velocidad de la reacción se hace aproximadamente 2,5 veces mayor por cada 10 grados de aumento de la temperatura, valor que fue calculado a partir de la fórmula:

$$Q_{10^{\circ}}(5 - 25) = \frac{V_{25^{\circ}}}{V_{5^{\circ}}} = \frac{93,5}{15} = 2,5$$

Cálculo de la constante de activación.

Para el cálculo de la energía de activación (E) se representó gráficamente el logaritmo neperiano de la velocidad en función de la inversa de la temperatura absoluta a partir de los datos que figuran en los cuadros 3.^o y 5.^o de la tabla 42. Puede observarse en esta gráfica (fig. 34) que se

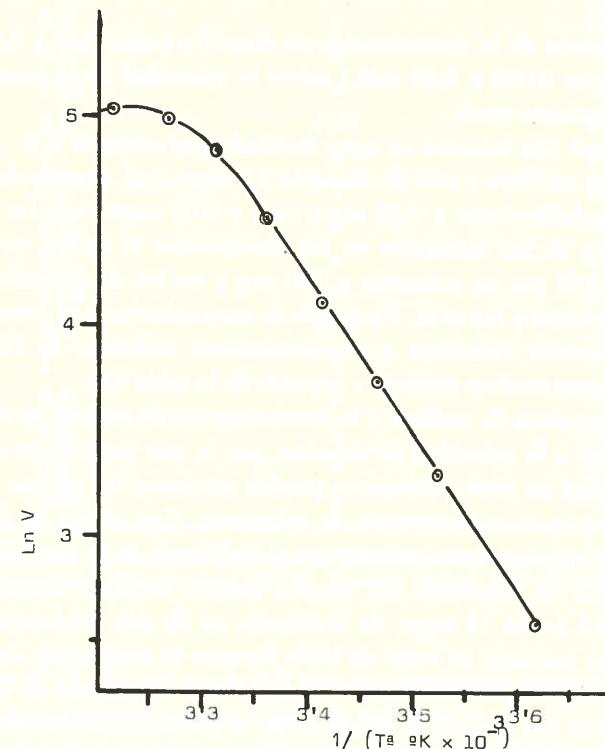


Figura 34.—Influencia de la temperatura sobre la actividad diacetilo reductasa. Representación utilizada para el cálculo de la constante de activación.

cumple la ley de ARRHENIUS entre 3,5° y 28 – 30° C; en este intervalo la representación de $\ln V$ en función de $1/T \text{ } ^\circ\text{K}$ es una línea recta cuya pendiente permitió calcular la energía de activación a partir de la expresión:

(Ec. VII. 25).

$$E = \frac{d(\ln V)}{d(1/T \text{ } ^\circ\text{K})} \cdot R$$

en la que R es la constante de los gases. El valor obtenido fue de $E = 14.400$ calorías por mol.

VII. 3.5. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE DIACETILO Y NADH. CÁLCULO DE LAS CONSTANTES DE EQUILIBRIO DE LA REACCIÓN.

La influencia de la concentración de diacetilo (entre 0,05 y 3,9 mM.) y NADH (entre 0,058 y 0,23 mM.) sobre la velocidad de la reacción se estudió del siguiente modo:

Se preparó una solución en agua destilada que contenía 0,7, μ moles de NADH por mililitro y otra de diacetilo 2,5 mgrs./ml. a partir de la cual se hicieron subdiluciones a 0,25 mgrs./ml. y 0,05 mgrs./ml. La concentración exacta de los substratos en las soluciones se midió, en el caso de la de NADH por su extinción a 340 m μ y en las de diacetilo por el método de OWADES y JAKOVAC. Partiendo de estas soluciones se determinó la actividad diacetilo reductasa a concentraciones variables de NADH y diacetilo (véanse cuadros primero y segundo de la tabla 43).

La temperatura de análisis y la concentración de enzima en el medio afectan mucho a la velocidad de reacción, por lo que variaciones relativamente pequeñas en estos parámetros pueden oscurecer los efectos debidos a los cambios en la concentración de substratos. Con objeto de dar estabilidad a las preparaciones enzimáticas, el liofilizado de la fracción acetónica 1 – 1,3 se suspendió en tampón fosfato bisódico monopotásico 0,5 M. pH 6,1 (unos 13 mgrs. de liofilizado en 20 mls. de tampón) y la suspensión se mantuvo en baño de hielo durante la realización de los ensayos. A lo largo del experimento se comprobó la constancia de la actividad enzimática por unidad de volumen de la preparación efectuando seis controles a concentraciones de NADH de 0,23 mM. y diacetilo 3,3 mM. La molaridad del tampón en los medios de análisis se mantuvo en su valor

TABLA XLIII
Influencia de la concentración de substratos sobre la actividad diacetilo reductasa.

Concentración diacetilo (M $\times 10^{-3}$)	Concentración NADH (M $\times 10^{-4}$)	Actividad en nmoles de diacetilo reducidos/min.
3,9	2,33	36,3
1	»	34,0
0,4	»	31,8
0,2	»	27,4
0,1	»	23
0,05	»	16,3
3,9	1,74	33,5
1	»	28,5
0,4	»	26,2
0,2	»	22,8
0,1	»	19,5
0,05	»	13,7
3,9	1,17	26,5
1	»	24
0,4	»	22,4
0,2	»	18,4
0,1	»	14,5
0,05	»	10,2
3,9	0,58	19,6
1	»	17,6
0,4	»	16,3
0,2	»	13,2
0,1	»	10,3
0,05	»	6,6

Condiciones de ensayo.—Preparación enzimática, 0,2 mgrs. de liofilizado de la fracción acetónica. Temperatura, 25° C. Tampón fosfato, 0,05 M. pH 6,1. Volumen 3 mls.

habitual (0,05 M.) utilizando 0,3 mls. de preparación enzimática en un volumen de tres mililitros de la mezcla de reacción.

Todos los ensayos se realizaron a 25° C., regulándose la temperatura en el interior de la cámara espectofotométrica mediante un ultratermos-

tato «Colora» modelo «N». Para conseguir que la temperatura de análisis se hubiese alcanzado ya a tiempo cero se tomaron las mismas precauciones que en la experiencia descrita en el apartado VII. 3.4.

Los resultados de este experimento, que se recogen en la tabla 43, se han representado gráficamente en las figuras 35 y 36. Como puede comprobarse, las gráficas de actividad a concentración variable de un substrato y fija del otro tienen, en el rango de concentraciones estudiado, la forma típica de ramas de hipérbola, que es la que cabe esperar en una reacción enzimática que cumpla la ecuación general de velocidad (Ec. VII. 22).

Cálculo de las constantes de equilibrio.

A partir de los datos que figuran en la tabla 43 se representaron, siguiendo el método de FLORINI y VESTLING, las inversas de las velocidades iniciales en función de la molaridad del diacetilo a concentraciones cons-

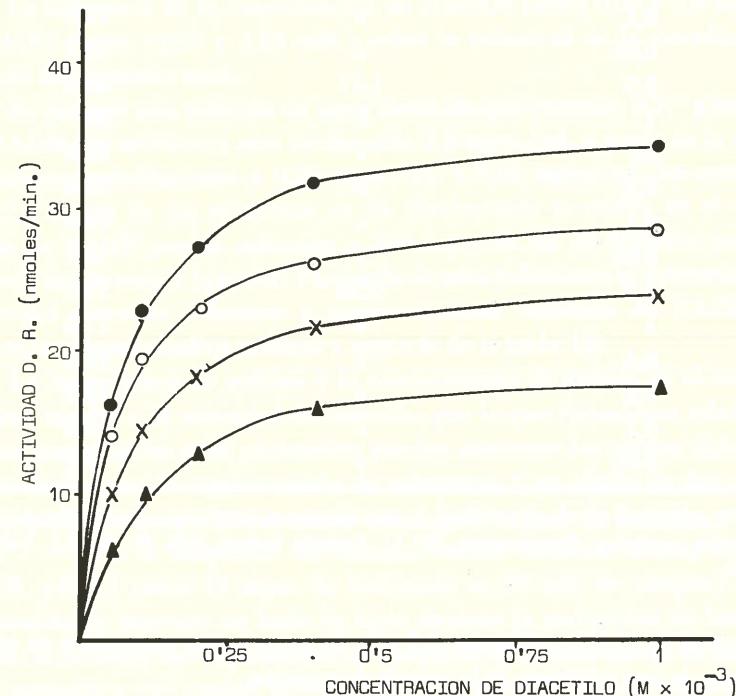


Figura 35.—Influencia de la concentración de diacetilo sobre la actividad diacetilo reductasa. Concentración de NADH ($M \times 10^{-4}$): (▲) 0,58; (X) 1,17; (○) 1,74; (●) 2,33.

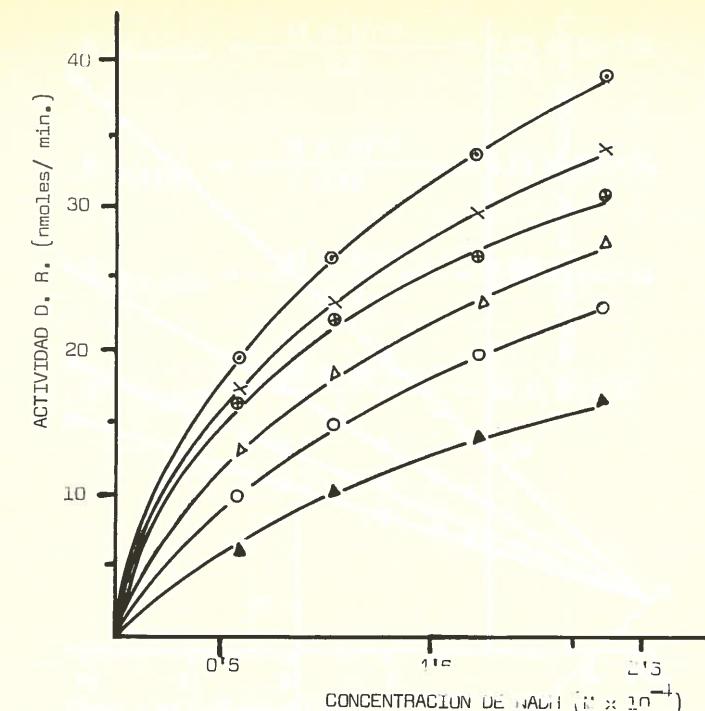


Figura 36.—Influencia de la concentración de NADH sobre la actividad diacetilo reductasa. Concentración de diacetilo ($M \times 10^{-3}$): (▲) 0,05; (○) 0,1 (△) 0,2; (○) 0,4; (+) 1; (○) 1,17; (●) 3,9.

tantes de NADH (fig. 37). Se obtuvieron así una serie de rectas, una para cada concentración de NADH, cuyas prolongaciones se cortan por encima del eje de abscisas en el punto situado en:

$$1/(\text{diacetilo } M \times 10^{-3}) = -8,2 = -1/K_{\text{diacetilo}}$$

Las intersecciones de estas rectas con el eje de ordenadas, representadas en función de la inversa de la concentración de NADH dan otra recta (fig. 38); la prolongación de la misma corta el eje horizontal en:

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

En la figura 39 se muestra la representación gráfica de la inversa de la velocidad en función de las inversas de la concentración de NADH a molaridades constantes de diacetilo, las prolongaciones de las rectas

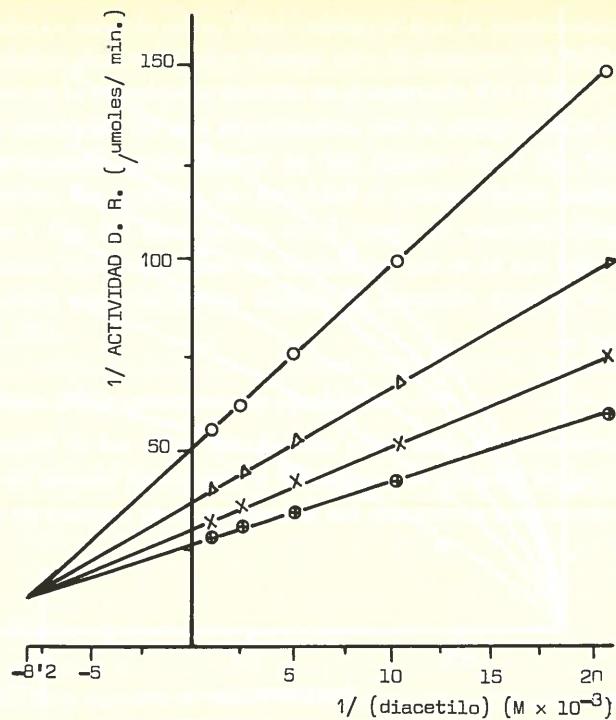


Fig. 37.—Cálculo de la constante de disociación para el diacetilo por el método de Florini y Vestling. Representación «primaria» de la inversa de la actividad en función de la inversa de la concentración de diacetilo. Concentración de NADH ($M \times 10^{-4}$): (O) 0,58; (Δ) 1,17 (\times) 1,74: (\oplus) 2,33.

resultantes se cortan por encima del eje de las abscisas, en un punto correspondiente a:

$$1/(NADH \ M \times 10^{-4}) = -0,32 = -1/K_{NADH}$$

y sus intersecciones con el eje vertical representadas en función de la inversa de la concentración de diacetilo —figura 4— dan una nueva recta que prolongada hasta la línea base la corta en:

$$1/(diacetilo \ M \times 10^{-3}) = -25,1 = -1/K'_{diacetilo}$$

Se obtuvieron así las cuatro constantes de equilibrio de la reacción con los siguientes resultados:

$$K_{diacetilo} = \frac{M \times 10^{-3}}{8,2} = 1,22 \times 10^{-4} \text{ M.}$$

$$K_{NADH} = \frac{M \times 10^{-4}}{0,32} = 3,12 \times 10^{-4} \text{ M.}$$

$$K'_{diacetilo} = \frac{M \times 10^{-3}}{25,1} = 3,98 \times 10^{-5} \text{ M.}$$

$$K'_{NADH} = \frac{M \times 10^{-4}}{1} = 10 \times 10^{-5} \text{ M.}$$

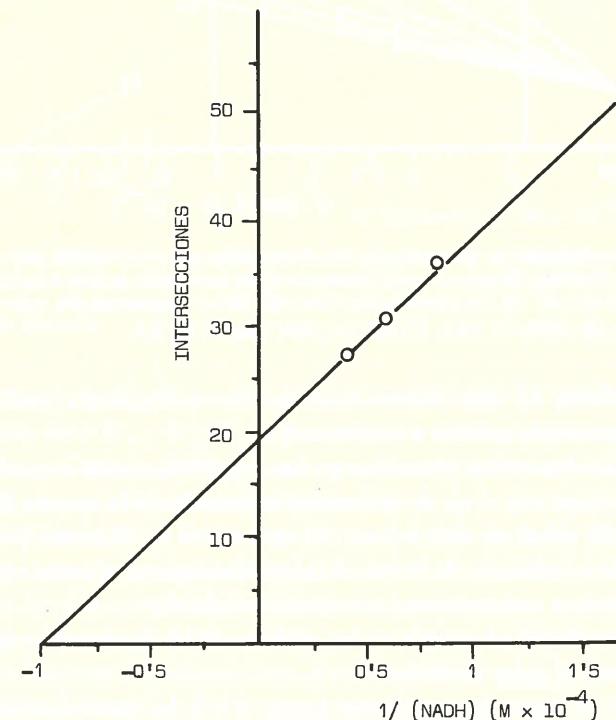


Fig. 38.—Cálculo de la constante de Michaelis para el NADH por el método de Florini y Vestling. Representación «secundaria» de las intersecciones con el eje de ordenadas de las rectas de la figura 37, en función de la inversa de la concentración de NADH.

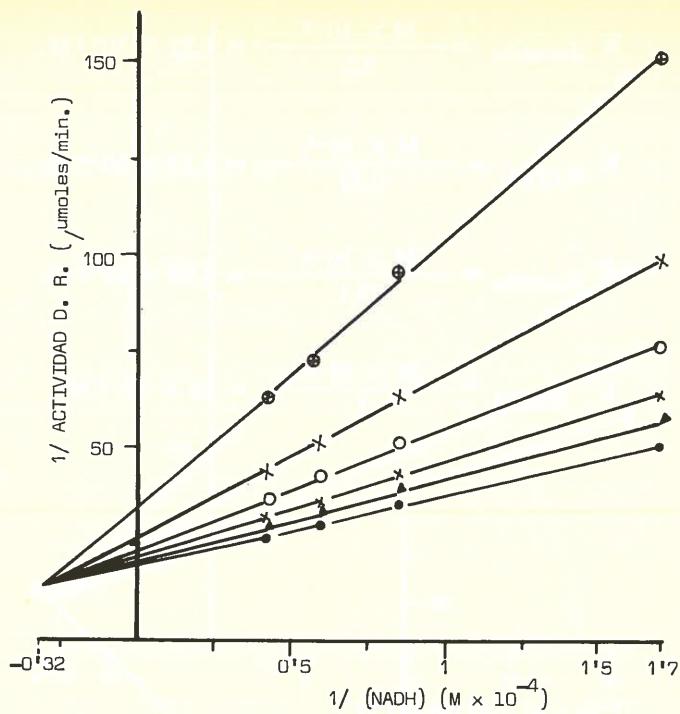


Fig. 39.—Cálculo de la constante de disociación para el NADH por el método de Florini y Vestling. Representación primaria de la inversa de la actividad en función de la inversa de la concentración de NADH. Concentración de diacetilo ($M \times 10^{-3}$): (⊕) 0,05; (×) 0,1; (○) 0,2; (×) 0,4; (▲) 1; (●) 3,9.

La validez de estas determinaciones fue comprobada mediante los procedimientos que se citan a continuación:

(1) Las dos rectas obtenidas en las representaciones secundarias de las intersecciones con el eje de ordenadas en función de la inversa de la concentración de substrato deben cortar el eje vertical en el mismo punto, que corresponde a la inversa de la velocidad máxima que se alcanza cuando los dos substratos se encuentran a concentración infinita.

Esta condición se cumple en las gráficas de las figuras 38 y 40, en las que $1/V$ tiene el valor de 19,5.

(2) Si en lugar de representar frente a $1/b$ las intersecciones de las rectas primarias con el eje vertical a (a) variable se hacen figurar las pendientes de las mismas, debe obtenerse otra recta que cortará el eje de ordenadas en un punto igual a K'_a/V para la representación en función de la

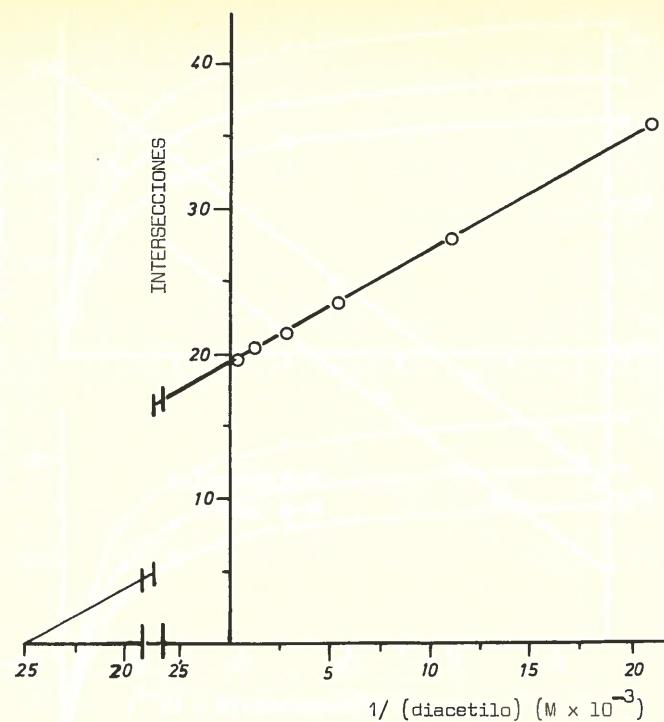


Fig. 40.—Cálculo de la constante de Michaelis para el diacetilo por el método de Florini y Vestling. Representación «secundaria» de las intersecciones con el eje de ordenadas de las rectas de la figura 39, en función de la inversa de la concentración de diacetilo.

inversa de (b) y K'_b/V para la de la inversa de (a). La pendiente de ambas rectas será $K_a \cdot K'_b/V$, y por lo tanto las dos deben ser paralelas (MAHLER y CORDES, 1968). Como puede comprobarse en la figura 41 (1) y (2) estas condiciones también se cumplen.

(3) Si la cinética de la reacción es del tipo de la de MICHAELIS, el complejo ternario enzima-substrato a -substrato b debe estar en equilibrio con los dos complejos binarios y con los substratos y el enzima libre, por lo que el producto de K_a por K'_b debe ser igual al producto de K_b por K'_a . En nuestras determinaciones el producto de $K_{\text{diacetilo}}$ por K'_{NADH} , es aproximadamente igual a K_{NADH} por $K'_{\text{diacetilo}}$.

(4) Los valores experimentales coinciden razonablemente con los teóricos aplicando los parámetros obtenidos al desarrollo de la ecuación general de velocidad de las reacciones enzimáticas en que participan dos

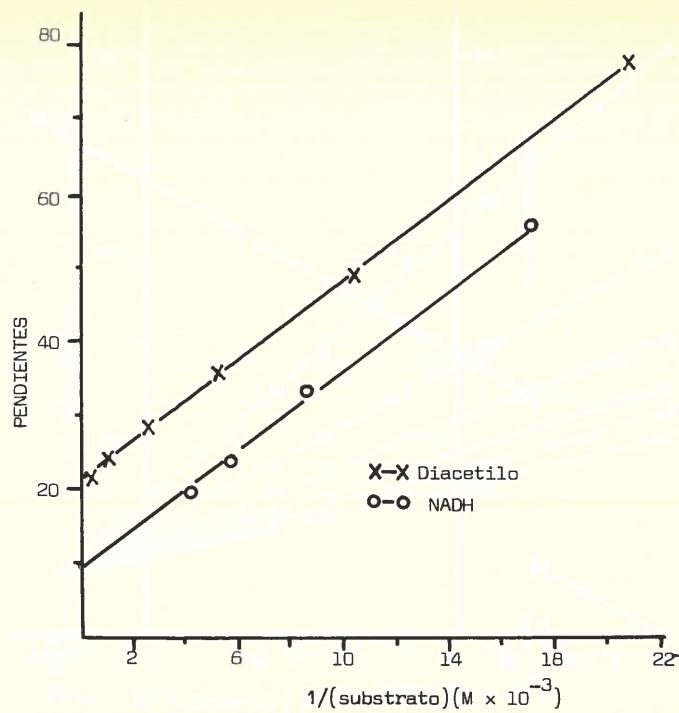


Fig. 41.—Representación «secundaria» de las pendientes de las rectas «primarias» en función de las inversas de las concentraciones de substratos.

substratos (Ecuación VII. 22). En la figura 42 se ofrece una comparación entre gráficas teóricas y experimentales de velocidad en función de la concentración de substratos.

VII. 3.6. INHIBICIÓN POR LOS PRODUCTOS.

3.6.1. Inhibición por el NAD.

Los mecanismos de inhibición del NAD respecto al NADH y al diacetilo han sido estudiados determinando los efectos de la adición a las mezclas de análisis de cantidades variables de NAD sobre las velocidades iniciales de reacción a concentración fija de un substrato y variable del otro.

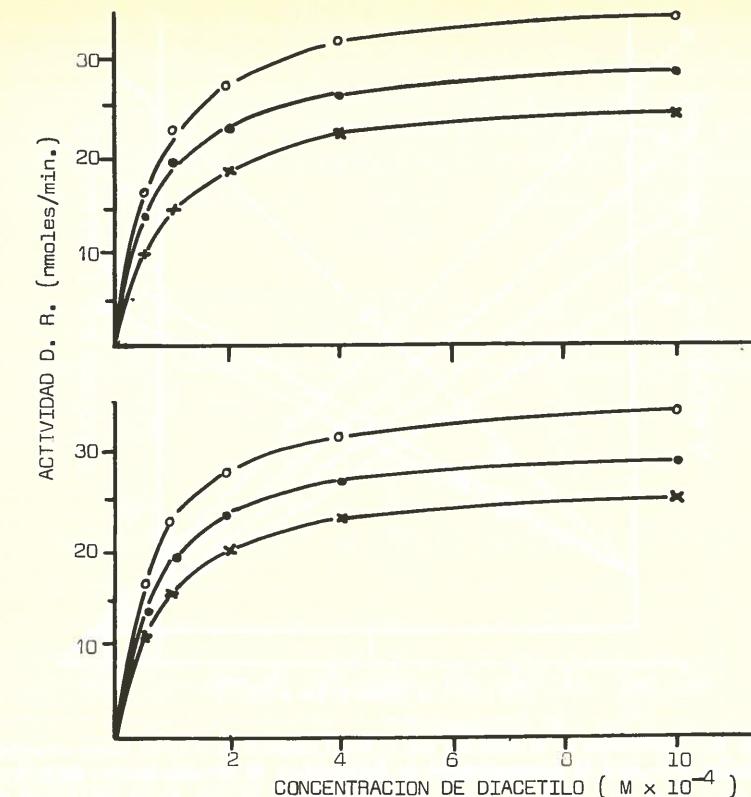


Fig. 42.—Comparación entre los resultados experimentales y los valores teóricos calculados aplicando los parámetros obtenidos al desarrollo de la ecuación general de velocidad (Ec. VII. 22). Superior: experimental. Inferior: teóricos. Concentración de NADH ($M \times 10^{-4}$): (\times) 1,17; (\bullet) 1,74; (\circ) 2,33.

Con este objeto se prepararon diversas soluciones de diacetilo, NADH y NAD, cuya molaridad se comprobó por el método de OWADES y JAKOVAC para las de diacetilo y por su extinción a 340 y 260 μ m para las de NADH y NAD, respectivamente. Los ensayos espectrofotométricos de actividad se efectuaron a pH 6,1 en tampón fosfato bisódico-monopotásico 0,05 M. y a las siguientes concentraciones de substratos e inhibidor: efecto inhibidor sobre el diacetilo: NADH 0,6 μ moles; NAD, variable entre 0 y 10 μ moles; diacetilo, variable entre 0,2 y 6 μ moles. Efecto inhibidor sobre el NADH: diacetilo 12 μ moles; NAD, variable entre 0 y 10 μ moles; NADH, variable entre 0,15 y 0,6 μ moles. Para el control de la temperatura y de la constancia de la actividad enzimática durante el experimento se

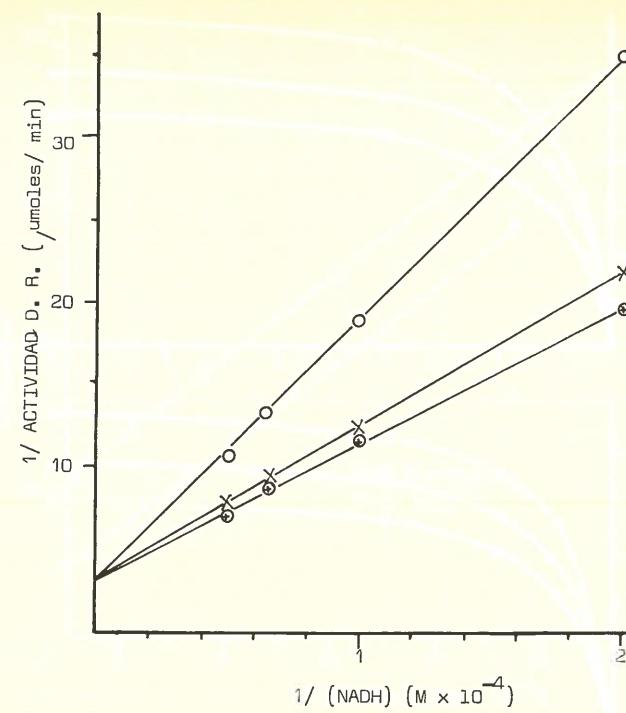


Fig. 43.—Inhibición de la reacción por el NAD respecto al NADH. Concentración de diacetilo: 4×10^{-3} M. Concentración de NAD ($M \times 10^{-3}$): (○) 0; (×) 0,83; (⊕) 3,32.

tomaron las mismas precauciones que en la experiencia anterior. Como preparación enzimática se utilizó una suspensión de liofilizado de la fracción acetónica 1 - 1,3 en tampón fosfato 0,5 M. pH 6,1 (6 mgrs. de liofilizado por mililitro).

Con los resultados de los análisis se obtuvieron las gráficas de las figuras 43 y 44. La representación de la inversa de la velocidad en función de la inversa de la concentración de NADH a molaridad constante de diacetilo da una serie de rectas, una para cada una de las concentraciones de NAD utilizadas, que se cortan en el eje de ordenadas, y la representación de $1/v$ en función de $1/(diacetilo)$ otra serie de rectas que se unen sobre el eje de abscisas, poniendo de manifiesto que el NAD es inhibidor competitivo respecto al NADH y no competitivo respecto al diacetilo.

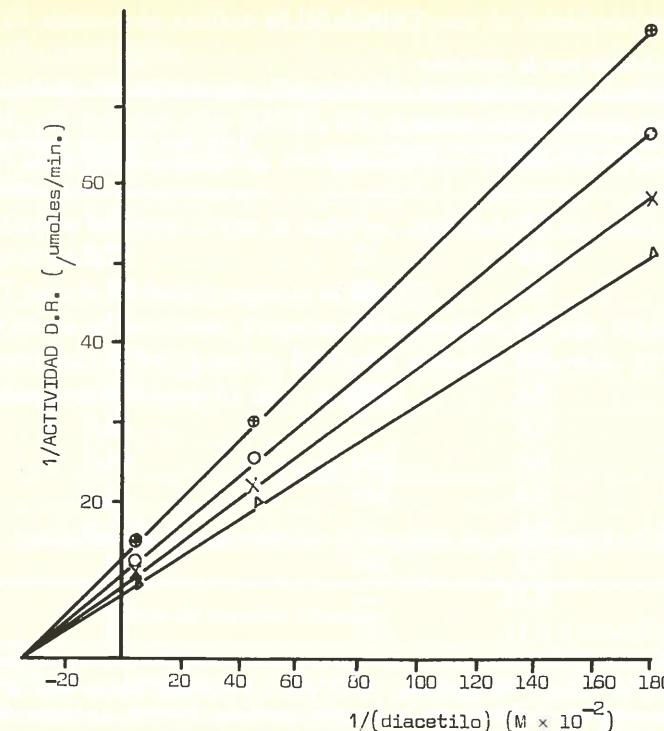


Fig. 44.—Inhibición de la reacción por el NAD respecto al diacetilo. Concentración de NADH: $0,2 \times 10^{-3}$ M. Concentración de NAD ($M \times 10^{-3}$): (Δ) 0; (×) 0,83; (○) 1,66; (⊕) 3,32.

6.3.2. Inhibición por la acetoina.

En la tabla 44 se recogen los resultados, obtenidos en diferentes series experimentales, de determinaciones de actividad diacetilo reductasa efectuadas a varias concentraciones de diacetilo, NADH y acetoina. Estos datos demuestran que la acetoina no inhibe significativamente la reacción incluso en proporciones doscientas veces superiores a las del diacetilo y cuatrocientas veces superiores a las de NADH.

3.6.3. Inhibición por la acetoina en presencia de NAD.

La no inhibición de la reacción por la acetoina demuestra la escasa o nula afinidad del enzima libre por este producto. Sin embargo es posible,

TABLA XLIV

Inhibición por la acetoina

Mezcla de reacción (μ -moles)			Actividad diacetilo reductasa en moles de diacet. reduc./min.
Diacetilo	NADH	Acetoina	
12	0,6		57,5
12	0,6	12	57,5
12	0,6	60	55
12	0,6	120	57
12	0,6	—	192
12	0,6	240	189
12	0,6	—	42,5
12	0,6	240	44,5
12	0,6	240	44,5
12	0,6	—	121,5
12	0,6	240	122
12	0,15	—	46,5
12	0,15	240	48

Condiciones de ensayo: Temperatura, 25°C; pH, 6,1 (tampón fosfato 0,05 M.); preparación enzimática, liofilizado de la fracción acetónica 1—1,3. Acetoina, diacetilo y NADH, variables. Volumen, 3 mls.

como de hecho ocurre en algunos mecanismos de reacción, que la fijación de uno de los productos al enzima aumente la afinidad por el otro, en cuyo caso la acetoina podría mostrar un efecto inhibidor en presencia de cantidades suficientemente elevadas de NAD para mantener inmovilizada una considerable cantidad de enzima en forma de complejo binario enzima-NAD.

Para estudiar esta posibilidad se prepararon las soluciones adecuadas de reactivos, cuyas concentraciones se ajustaron a las deseadas midiéndolas por el método de OWADES y JAKOVAC y por su absorbancia a 340 y 260 μ para las de diacetilo, NADH y NAD, respectivamente; la de acetoina se calculó por pesada. Como preparación enzimática se utilizó una suspensión de 40 mgrs. de liofilizado de la fracción acetónica 1-1,3 en 10 mls. de tampón fosfato bisódico monopotásico 0,5 M. pH 6,1; para comprobar la estabilidad de la misma se efectuaron seis controles de actividad a lo largo del experimento.

El sistema de análisis se estableció, para la inhibición respecto al diacetilo, como sigue:

Cubeta de referencia: Preparación enzimática en tampón fosfato 0,5 M. pH 6,1, 0,3 mls. NADH, 0,6 μ moles. Diacetilo, variable entre 1,2 y 12 μ moles. Acetoina, variable entre 0 y 230 μ moles. NAD, 12 μ moles.

Cubeta muestra: Como la anterior, omitiendo la suspensión enzimática y el NAD.

Y para la inhibición respecto al NADH:

Cubeta de referencia: Preparación enzimática, 0,3 mls. NADH, variable entre 0,15 y 0,6 μ moles. NAD, 12 μ moles. Diacetilo, 12 μ moles. Acetoina, variable entre 0 y 230 μ moles.

TABLA XLV

Inhibición de la reacción por la acetoina en presencia de NAD.

Mezcla de reacción (μ -moles)			Actividad diacetilo reductasa en nmoles de diacet. reduc./min.
NADH	Diacetilo	NAD	Acetoina
0,6	12	—	— 245
0,6	12	12	— 129
0,6	4	»	— 58
0,6	1,2	»	— 27
0,6	12	»	230 126
0,6	4	»	230 57
0,6	1,2	»	230 31
0,6	12	»	115 134
0,6	4	»	115 56
0,6	1,2	»	115 28
0,6	12	»	— 130
0,3	»	»	— 95
0,15	»	»	— 49,5
0,6	»	»	230 128
0,3	»	»	230 88,7
0,15	»	»	230 51,2

Cubeta muestra: Como la anterior, omitiendo la preparación y el NAD.

La temperatura de ensayo (25° C) se controló tomando las mismas precauciones que en los experimentos descritos anteriormente.

Los resultados obtenidos figuran en la tabla 45. Como puede observarse, la acetona tampoco mostró ningún efecto inhibidor en presencia de NAD.

VII. 4. DISCUSION

En la mayor parte de las experiencias efectuadas, las velocidades iniciales resultaron ser función lineal de la concentración de enzima en las mezclas de reacción, al menos entre los márgenes utilizados habitualmente en los ensayos. Sin embargo pudo comprobarse que en algunas determinaciones llevadas a cabo con suspensiones de liofilizado de polvo acetónico no se seguía este comportamiento, mostrando las representaciones gráficas un descenso en la pendiente correlativo al incremento en la concentración de enzima.

La falta de linearidad en las representaciones gráficas de la actividad en función de la concentración de enzima se deben, en general, a: 1) Equilibrio de la reacción muy desplazado hacia el sentido inverso, de tal modo que el sistema resultase inhibido por la presencia de pequeñas cantidades de productos. 2) Insuficiente concentración de substratos en la mezcla de reacción. 3) Presencia de un inhibidor en las preparaciones enzimáticas. Las dos primeras posibilidades, que conducirían a una determinación incorrecta de las velocidades iniciales con mayor error cuanto más rápida sea la reacción (y en consecuencia cuanto mayor sea la concentración de enzima en el medio) fueron descartadas por los siguientes hechos experimentales: (a) En el capítulo V ha quedado establecido que la reacción es esencialmente irreversible y, por lo tanto, su equilibrio es muy favorable al funcionamiento de la reacción en el sentido diacetilo-acetona. (b) La acetona no inhibe la reacción y el NAD sólo lo hace perceptiblemente a concentraciones muy superiores a las del NADH. (c) Las gráficas obtenidas en los registros de actividad en función del tiempo dan líneas rectas al menos durante un período apreciable (superior a 30 segundos en las determinaciones más rápidas) lo que demuestra que en este espacio se mantienen las velocidades iniciales. (d) La actividad fue función lineal de la concentración de enzima en otras experiencias realizadas empleando la misma té-

nica determinativa; estos resultados prueban que las condiciones de ensayo son adecuadas.

Por tanto, es evidente la presencia de un inhibidor en los sistemas que presentaban este comportamiento anormal. La persistencia de la inhibición al cambiar el medio de suspensión de las preparaciones enzimáticas demuestra que el inhibidor se encuentra en el propio liofilizado y la imposibilidad de retirarlo por diálisis, que pone de manifiesto que es una sustancia de un tamaño considerable o que forma un complejo muy fuerte con el enzima, obliga a comprobar sistemáticamente su ausencia en todas las partidas.

Se han comprobado los efectos de la concentración de hidrogeniones sobre la actividad diacetilo reductasa. Las representaciones gráficas de las velocidades iniciales de reacción en función del pH del medio de análisis han puesto de manifiesto la existencia de un máximo de actividad a pH 6,6,2 y un pico secundario a pH 6,8, con una relación de altura entre ambos de act. a pH 6,8/act. a pH 6,1 aproximadamente igual a 0,9.

Estos resultados plantean la posibilidad de que en el hígado de ternera existan dos especies enzimáticas distintas capaces de catalizar la reducción de diacetilo a acetona acoplada a la oxidación del NADH y NAD. Sin embargo, el hecho de que este perfil de pH se repita en las muestras procedentes de las diferentes etapas de purificación, con relaciones de altura entre ambos picos aproximadamente constantes, hace poco probable esta posibilidad; aunque no pueda descartarse totalmente la existencia de dos diacetilo reductasas, sería muy difícil que las dos presentasen la misma sensibilidad a la acetona e idéntica respuesta a la cromatografía en DEAE, características que dependen de factores tan complejos como son el tamaño y la configuración molecular, el número de grupos polares y el balance y distribución de cargas positivas y negativas.

Los resultados obtenidos podrían interpretarse más fácilmente admitiendo la existencia de una sola especie de diacetilo reductasa con dos centros activos diferentes por unidad enzimática o incluso la participación de dos aminoácidos distintos en el mismo centro activo.

La actividad diacetilo reductasa crece ininterrumpidamente en el rango de 3,5 a 38,5° C. en que se estudió el efecto de la temperatura, sin que a los 38,5 C. se haya alcanzado la llamada «temperatura óptima», valor que no ha sido investigado puesto que, al depender tanto de la energía de activación de la reacción como de la inactivación del enzima a tem-

peraturas elevadas, sólo es válido en las condiciones experimentales utilizadas y carece de significado práctico.

Los efectos de la temperatura sobre la velocidad de las reacciones se deben a que al aumentar ésta aumenta correlativamente la proporción de moléculas con la energía necesaria para reaccionar. El cálculo de la energía de activación da una idea de la barrera termodinámica que tienen que salvar las moléculas de los substratos para convertirse en productos y la comparación entre las energías de activación de la reacción en ausencia y en presencia del enzima refleja la eficacia de éste para reducir la citada barrera, modificando los enlaces que han de romperse con el fin de que la reacción transcurra más fácilmente.

Este dato es de gran interés cinético, pero sólo ha podido ser obtenido excepcionalmente puesto que la mayor parte de las reacciones enzimáticas no se efectúan espontáneamente, o lo hacen tan lentamente que resulta muy difícil realizar determinaciones correctas de velocidad, como ocurre con la propia reducción del diacetilo a acetona en presencia de NADH. En cambio, sí se conocen los valores de energía de activación correspondientes a un gran número de reacciones enzimáticas que, en conjunto, caen dentro del intervalo de 1.000 a 25.000 calorías/mol., situándose los valores más frecuentes en torno a 10.000 cal/mol (véase SIZER, 1943; GUTFREUND, 1968), a los que se aproxima la energía de activación de la reducción enzimática del diacetilo, que hemos calculado en 14.400 cal/mol.

El Q_{10} de la reacción, entre 5 y 25°C., se ha estimado en 2,5, valor que puede ser considerado normal. Debe recordarse que el uso de coeficientes de temperatura es solamente un método aproximado para indicar el efecto de ésta sobre la velocidad de reacción, la cual no es función lineal de la temperatura en grados centígrados como se desprende de la ecuación VII. 26, derivada de la ley de ARRHENIUS.

(Ec. VII. 26)

$$K = A \cdot e^{-E/RT}$$

en la que K es la constante de velocidad, A , el factor de frecuencia total de encuentros entre las moléculas de los reaccionantes, E la energía de activación, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta.

Las representaciones primarias de la inversa de las velocidades iniciales de reacción en función de la inversa de la concentración de un substrato a molaridad fija del otro dan líneas rectas que se cortan por encima

de la línea base y las representaciones secundarias de las intersecciones de éstas con el eje de ordenadas dan a su vez dos nuevas rectas. A partir de estas representaciones se han calculado los siguientes valores para las constantes de equilibrio de la reacción.

$$K_{\text{diacetilo}} = 1,22 \times 10^{-4} \text{ M.}$$

$$K_{\text{NADH}} = 3,12 \times 10^{-4} \text{ M.}$$

$$K'_{\text{diacetilo}} = 3,98 \times 10^{-5} \text{ M.}$$

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

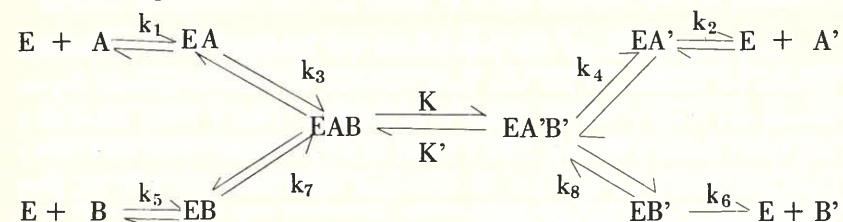
que caen dentro del rango en que suelen encontrarse los de las óxido-reducciones catalizadas por enzimas dependientes de los piridín-nucleóticos (véase v. g. DALZIEL, 1962; BRAGG, 1965).

La constante de velocidad ($K = V/e$) no ha podido ser determinada por desconocerse la concentración de enzima. Sin embargo sí es conocida « V », la velocidad máxima a la concentración de enzima utilizada en la experiencia, lo que ha permitido comprobar la concordancia entre los valores experimentales y los teóricos obtenidos del desarrollo de la ecuación general de velocidad VII. 22. También se cumple aproximadamente la ecuación VII. 23, según la cual:

$$K_a \times K'_b = K_b \times K'_a$$

Estos resultados excluyen como posibles mecanismos de la reacción todos aquellos que no vienen descritos por la ecuación general de velocidad y dejan como modelos más probables los siguientes:

a) *Mecanismo al azar*, en el que los complejos ternarios enzima-substrato A-substrato B proceden indistintamente de la fijación del substrato «B» a los complejos binarios enzima-subs. «A» o de la fijación del substrato «A» a los complejos binarios enzima-substrato «B», correspondiendo al esquema.



Estos modelos dan lugar a ecuaciones de velocidad complejas que incluyen términos cuadrados, por lo que las representaciones doblemente inversas no son lineales. Sin embargo estos términos se eliminan en las reacciones en que la interconversión de los complejos ternarios es tan lenta que actúa como limitante de la velocidad. En este caso, que es el más general, se cumple la ecuación VII. 22 y los parámetros cinéticos representan:

$$V = K \cdot e$$

$$K_a = k_1; K_b = k_5$$

$$K'_a = k_7; K'_b = k_3$$

para la reacción en el sentido $A + B = A' + B'$, y

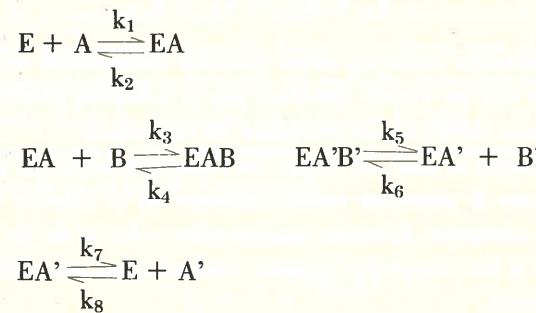
$$V' = K' \cdot e$$

$$K_a' = k_2; K_b' = k_6$$

$$K'_a' = k_8; K'_b' = k_4$$

para el sentido $A' + B' = A + B$

b) *Mecanismo ordenado*.—En este tipo de mecanismo uno de los substratos se combina con el enzima libre mucho más rápidamente que el otro, de tal modo que en realidad sólo existe una vía para la formación de los complejos ternarios.

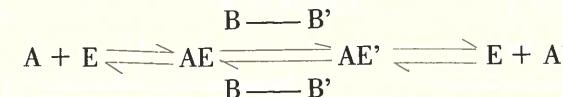


Entre las reacciones más importantes que obedecen a este mecanismo figuran las catalizadas por una gran variedad de deshidrogenasas dependientes del NAD y NADP (véase v. g. DALZIEL, 1962 y 1963; MAHLER y col, 1962; RAVAL y WOLFE, 1962 y 1963; ZEWE y FROMM, 1962; WRATTEN y CLELAND, 1963). La ecuación de velocidad viene dada por VII. 22, pero las constantes cinéticas son ahora:

$$\begin{array}{l} k_1 = \frac{V}{e \cdot K'a} \quad k_2 = \frac{V \cdot K_a}{e \cdot K'a} \quad k_3 = \frac{V}{e \cdot K'b} (1 + \frac{k_4}{k_5}) \\ k_4 = \frac{V \cdot k_2}{k_2 e - V} \quad k_5 = \frac{V \cdot k_7}{k_7 e - V} \quad k_6 = \frac{V}{e \cdot K'b} (1 + \frac{k_5}{k_4}) \\ k_7 = \frac{V \cdot K_a'}{e \cdot K'a'} \quad k_8 = \frac{V'}{e \cdot K'a'} \end{array}$$

en que V representa la velocidad máxima en el sentido $A + B = A' + B'$ y V' la velocidad máxima en el sentido inverso. La característica más esencial que permite distinguir este mecanismo es, como se deduce del esquema anterior, que solamente A , el llamado «substrato conductor» (que tiene que ser obligatoriamente el primero en interaccionar con el enzima) y no B , es inhibido competitivamente por su propio producto.

c) *Mecanismo de Theorell-Chance*.—Es una variante del anterior, en 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 , lo que origina que las concentraciones de los complejos ternarios sean muy bajas, de modo que el primer producto, B' , 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.



Este mecanismo se distingue experimentalmente porque las representaciones doblemente inversas tienen la forma habitual, pero el producto A' (y no B') compite con el substrato A y B' (y no A') con B .

La irreversibilidad experimental de la diacetilo reductasa hace imposible la evaluación de la totalidad de las constantes de velocidad, que exige efectuar determinaciones en los dos sentidos de la reacción, por lo que los datos obtenidos son insuficientes para poder distinguir con seguridad cuál es el mecanismo que realmente opera entre los tres que se han señalado.

Las pruebas de inhibición por los substratos han demostrado que la producida por el NAD es competitiva respecto al NADH y no competitiva respecto al diacetilo, lo que significa que el NAD se fija al enzima en el mismo punto que el NADH. La acetoína, en cambio, no muestra ningún efecto inhibidor sobre la reacción tanto en presencia como en ausencia de NAD y en el amplio rango de concentraciones utilizadas.

Estos resultados concuerdan con los que corresponden a un orden obligatorio de disociación del complejo enzima-producto A'- producto B', lo que descarta la posibilidad de que la reacción siga un sistema al azar, a menos que se admita, y es extremadamente improbable, que se siguen mecanismos diferentes para la formación y para la ruptura de los complejos ternarios. El substrato conductor en este sistema de orden obligatorio será el NADH, el único que es inhibido competitivamente por su propio producto, y las constantes de velocidad tendrán el significado:

$$k_1 = \frac{V}{e \cdot K' \text{ NADH}} = \frac{V}{e (1 \times 10^{-3} \text{ M})} = \frac{V}{e \cdot 100} \mu \text{M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$$

$$k_2 = \frac{V}{e} \cdot \frac{K' \text{ NADH}}{e \cdot K' \text{ NADH}} = \frac{V}{e} \cdot \frac{3,12 \times 10^{-4} \text{ M}}{1 \times 10^{-4} \text{ M}} = 3,12 \cdot \frac{V}{e} \text{ sec}^{-1}$$

$$k_3 = \frac{V}{e \cdot K' \text{ diacetilo}} \cdot \frac{k_4}{k_5} = \frac{V}{e \cdot 40} \cdot \frac{k_4}{k_5} \mu \text{M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$$

$$V' \cdot k_2 = \frac{V' \cdot k_2}{V' (3,12 \cdot V/e)}$$

$$k_4 = \frac{k_2 e - V'}{3,12 \cdot V - V'} = \frac{V \cdot k_7}{V \cdot k_7}$$

$$k_5 = \frac{V'}{k_7 e - V} \quad k_6 = \frac{V}{e \cdot K' \text{ acetoína}} \cdot \frac{k_5}{k_4}$$

$$k_7 = \frac{V \cdot K' \text{ NAD}}{e \cdot K' \text{ NAD}} \quad k_8 = \frac{V}{e \cdot K' \text{ NAD}}$$

siendo V y V' las velocidades máximas de reacción en el sentido directo e inverso, respectivamente, expresadas en $\mu\text{moles/segundo}$.

La ausencia de efectos inhibidores por la acetoína tampoco es concordante con lo que cabía esperar en un mecanismo del tipo del de THEORELL

CHANCE, pero este esquema podría ser válido admitiendo que el complejo binario enzima-NAD tiene muy poca afinidad por el citado producto. El mecanismo de THEORELL CHANCE se caracteriza porque las concentraciones de los complejos ternarios durante la reacción son muy bajas y la velocidad está limitada por la disociación de los complejos binarios E - A' para el sentido directo y E - A para el inverso, de tal modo que $k_7 = V/e$ y $k_2 = V'/e$ (DALZIEL, 1962). Aplicando a estas ecuaciones los valores experimentales obtenidos, tendremos:

$$k_1 = \frac{V}{e \cdot 100} \mu \text{M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$$

$$k_2 = 3,12 \frac{V}{e} \text{ sec}^{-1} = \frac{V'}{e} \text{ y } V' \text{ iguala por tanto a } 3,12 \text{ V.}$$

$$k_3 = \frac{V}{e \cdot 40} \cdot \frac{k_4}{k_5} = \frac{V}{e \cdot 40} \cdot \frac{V'}{V \cdot k_7/e - V} = \frac{V'}{V \cdot k_7/e - V}$$

$$k_3 = \frac{V}{e \cdot 40} \cdot \frac{3,12 V \cdot 3,12 (V/e)/3,12(V - V)}{V \cdot \frac{V}{e}/(V - V)} = \frac{V}{e \cdot 40} (1 + 3,12)$$

$$4,12 V$$

$$k_3 = \frac{V}{e \cdot 40} \mu \text{M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$$

$k_4 = \text{Infinito}$

$k_5 = \text{Infinito}$.

$$k_6 = \frac{V'}{e \cdot K'_b} \cdot \frac{k_5}{k_4} = \frac{V'}{e \cdot K'_b} \cdot \frac{V}{e \cdot K'_b} \cdot \frac{V \cdot \frac{V}{e}/(V - V)}{3,12 (V \cdot \frac{V}{e}/V - V)} = \frac{V \cdot \frac{V}{e}/(V - V)}{V}$$

$$k_6 = \frac{3,12 V}{e \cdot K'_b} \cdot 1,32 = \frac{4,12 V}{e \cdot k'_b} \mu \text{M}^{-1} \text{ sec}^{-1}; \quad k_7 = \frac{V}{e} \text{ sec}^{-1}$$

Se cumple que $k_4 \gg k_2$, $(k_4 + k_2) \gg k_3$, $k_5 \gg k_7$ y $(k_5 + k_7) \gg k_6$, pero la aplicación de este esquema exigiría en el caso que nos ocupa que V , la velocidad máxima en el sentido diacetilo-acetona, fuese 3,12 veces menor que V' a idéntica concentración de enzima. Esta condición no parece compatible con el hecho de que no pudo obtenerse actividad apreciable alguna en el sentido inverso aún utilizando concentraciones de acetona y NAD hasta 0,25 M y 0,01 M., respectivamente, pero teóricamente es admisible que la afinidad por la acetona pueda ser tan escasa que 0,25 M. estuviese aún lejos del valor de su constante de MICHAELIS.

Los resultados obtenidos señalan, por lo tanto, que la reacción sigue un curso ordenado —al que, por otra parte, obedecen la mayor parte de los sistemas catalizados por deshidrogenasas dependientes de los piridín nucleótidos— pero no permiten discernir con absoluta seguridad si opera un mecanismo de orden obligatorio clásico (que es lo más probable), en que la concentración de los complejos ternarios es alta y la velocidad está limitada por la interconversión de los citados complejos, o la variante de THEORELL-CHANCE.

CAPITULO VIII

DISCUSION GENERAL

VIII. DISCUSION GENERAL.

Algunos de los resultados expuestos en los capítulos anteriores plantean la posibilidad de que en el hígado de ternera haya más de una especie enzimática con actividad diacetilo reductasa. En favor de esta hipótesis se pueden citar los siguientes hechos:

(1) Los perfiles de pH muestran la existencia de dos picos de actividad, a pH 6-6,2 y a pH 6,8.

(2) Intracelularmente la diacetilo reductasa se halla localizada fundamentalmente en la fracción soluble, pero las fracciones particuladas (en especial mitocondrias y lisosomas) dan cuenta también de una proporción considerable de la actividad.

(3) Las cromatografías en Sephadex G-100, utilizando como eluyentes tampones fosfato de fuerza iónica en torno a 0,7, dan dos bandas de actividad claramente diferenciadas.

(4) En las cromatografías en DEAE-22 la actividad se eluye en cuatro bandas y en dos en las efectuadas en DEAE-32.

Sin embargo estos datos no tienen que ser interpretados necesariamente como demostrativos de la heterogeneidad de la diacetilo reductasa en el hígado de bóvido, puesto que:

(a) La relación entre la actividad a pH 6,1 y 6,8 se mantiene constante a lo largo de las distintas etapas de purificación, lo que obliga a admitir que, de no tratarse de una sola especie enzimática, las dos hipotéticas especies presentan idéntico comportamiento frente a los sistemas de fraccionamiento utilizados, y esto es muy poco probable.

(b) Aunque no es infrecuente que los sistemas enzimáticos localizados en más de una fracción intracelular tengan características bioquímicas y catalíticas distintas, también es cierto que en la inmensa mayoría de los casos una misma especie enzimática se recupera en varias fracciones, incluso los llamados enzimas marcadores (véase MAHLER y CORDES, 1968, págs. 393-404).

(c) La proporción relativa de la actividad recuperada en las dos zonas de elución en las cromatografías en Sephadex varía con la fuerza iónica del eluyente y a determinadas fuerzas iónicas sólo se recoge una banda, lo que constituye un valioso argumento en favor de la existencia de una sola especie enzimática en distintos grados de asociación.

(d) En las cromatografías en DEAE casi la totalidad de la actividad diacetilo reductasa se recupera en una sola banda.

El balance de los argumentos citados en los apartados anteriores favorece a la hipótesis de la existencia de una especie única de diacetilo reductasa en el hígado de ternera, que está poderosamente reforzada por el comportamiento homogéneo frente a todas las demás técnicas de fraccionamiento utilizadas; tal vez el dato más significativo en este sentido venga representado por la respuesta uniforme en los estudios cinéticos, muy en especial en los relacionados con los efectos de la concentración de substratos sobre la velocidad de reacción y en cierta medida por la influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática.

El conjunto de datos que se recogen en los distintos capítulos pone de manifiesto la existencia de ciertas propiedades comunes a la diacetilo reductasa de hígado de ternera y a la de origen bacteriano: 1) Comporta-

miento frente al sulfato amónico. 2) No necesidad de cofactores. 3) Incapacidad de catalizar la reacción en el sentido acetoina-diacetilo. Aunque existen muy pocos datos relativos al enzima microbiano para decidir si se trata o no de especies enzimáticas de igual o similar naturaleza, al menos con respecto al sistema descrito por BRYN, HETLAND y STORMER (1971) las diferencias son manifiestas en cuanto a su especificidad: al contrario de lo que ocurre en los extractos de *A aerogenes* fraccionados por el método de BRYN y col. nuestras preparaciones purificadas no tienen actividad butilénglico deshidrogenasa que, en el hígado de bovino, es un enzima distinto y separable de la diacetilo reductasa. Parece también claro que en los tejidos animales es menos abundante que en los sistemas microbianos, aún admitiendo ciertas reservas en lo que se refiere a la concentración celular calculada por BRYN y col.

Uno de los problemas que complica considerablemente los estudios cinéticos de la diacetilo reductasa es el carácter irreversible a todos los efectos prácticos del sistema. Teóricamente no es admisible una reacción cinética irreversible en términos absolutos; sin embargo parece indudable que en condiciones fisiológicas la diacetilo reductasa sólo puede operar en el sentido diacetilo-acetoina: las concentraciones de acetoina y NAD normalmente presentes en los tejidos de los mamíferos son mucho más bajas que las máximas utilizadas en nuestros experimentos sin que pudiera observarse producción de diacetilo. WESTERFELD (1945) da cifras de acetoina en sangre del orden de 0,2 mM. y las de NAD se hallan en torno a 0,1 mM (LEVITAS y col., 1947).

La razón más probable de esta irreversibilidad, en vista de los resultados que figuran en el capítulo VII de esta tesis, es la escasa o nula afinidad del enzima libre y del complejo enzima-NAD por la acetoina, sin que pueda descartarse la participación en el mismo sentido de la etapa de conversión de los complejos ternarios E - A' - B' en E - A - B, cuya constante de velocidad no ha podido ser determinada precisamente por el carácter irreversible de la reacción.

La presencia de este enzima en los tejidos animales y el hecho de haberse detectado actividad butilénglico deshidrogenasa en el hígado de ternera abren un amplio campo de especulación en torno al papel desempeñado por las rutas metabólicas en las que participan la acetoina y el diacetilo.

Se desconocen los mecanismos de producción de diacetilo en los tejidos animales e incluso si es sintetizado por éstos. La presencia de al menos dos

enzimas que lo metabolizan, la diacetilo mutasa de GREEN y col. (1947) —actualmente identificada con la piruvato oxidasa (SCHWEET y col. (1951); JUNI y HEYM (1956)— y la diacetilo reductasa, en especial este último, sugieren la existencia de alguna ruta que conduzca a su síntesis en los animales. No parece acorde con el sentido económico de los sistemas biológicos que se produzca un enzima tan altamente específico y ampliamente distribuido como la diacetilo reductasa si no va a tener posibilidad de actuar por falta de substrato.

Teniendo en cuenta las afirmaciones de JUNI (1952, b) relativas a la no participación del acetato-lactato en la síntesis de acetoina en los tejidos animales, que se forma por condensación del acetaldehído libre y el acetaldehído activado, y admitiendo con la mayoría de los autores que la acetoina no se oxida a diacetilo en los sistemas biológicos, parece que la única ruta posible para la producción de diacetilo es la condensación de acetaldehído activado y acetil-CoA (SPECKMAN y COLLINS, 1968, b). En la síntesis por este camino, a partir de dos moléculas de piruvato se produce una de diacetilo, cuya reducción a butilénglico oxida dos moléculas de NADH a NAD. Como quiera que para la síntesis de acetil-CoA a partir de piruvato se reduce una molécula de NAD, el balance global de la ruta es la oxidación de una molécula de NADH por cada dos de piruvato gastado y el acúmulo de una sustancia probablemente inocua.

En situaciones de anaerobiosis parcial provocada por insuficiencia accidental de riego sanguíneo (por un exceso de trabajo, por ejemplo) esto permitiría seguir metabolizando carbohidratos vía glicolisis y tendría a reducir el acúmulo de lactato y piruvato que no pudiera ser canalizado hacia el ciclo de KREBS para ser finalmente oxidado en conjunción con la cadena respiratoria. La ubicación intracelular de la diacetilo reductasa parece sumamente adecuada para el desempeño de esta función.

De otro lado, la localización preferentemente hepática de este enzima podría sugerir funciones de otra naturaleza. KREBS y PERKINS (1970) han intentado hallar un significado a la presencia de una gran actividad alcohol deshidrogenasa en el hígado de los mamíferos, pese a que en la mayoría de ellos sólo se encuentran trazas de su substrato. Sin embargo, mediante una técnica enzimática de determinación, demuestran que en la sangre de la vena porta de las ratas son normales concentraciones del orden del 0,045 mM. de etanol, producto, al menos en gran parte, del metabolismo de la flora microbiana intestinal.

Es bien sabido que algunos de los microorganismos del tubo digestivo de aves y mamíferos son buenos productores de diacetilo. Parece, por tanto, bastante razonable prever la presencia de cantidades notables de éste en la sangre de la vena porta y, puesto que de la estructura de su molécula cabe deducir un poder tóxico considerable, no es improbable que la diacetilo reductasa juegue en el hígado un papel detoxicante similar al del alcohol deshidrogenasa.

Si se demostrase en los tejidos animales la existencia de un sistema de síntesis de diacetilo, este papel podría verse ampliado a los casos en los que el aporte de lactato, y por tanto piruvato, sobrepasara las posibilidades de consumo de éste.

CONCLUSIONES

1.—Se propone un nuevo procedimiento para el análisis de acetoina y diacetilo en muestras de ambos compuestos basado en la separación del diacetilo por destilación a 65° C. bajo corriente de nitrógeno y en la determinación de éste por el método de OWADES y JAKOVAC en los destilados y de la acetoina en los residuos de destilación por la técnica de WESTERFELD modificada en los siguientes sentidos: a) Incubar las muestras a 20° C. b) Preparar una gráfica patrón para cada serie de determinaciones. c) Efectuar las lecturas a los 90 minutos de incubación.

Este procedimiento permite efectuar determinaciones a niveles de hasta 0,2 p. p. m. con recuperaciones de diacetilo del 99,5 % \pm 2,5 y de acetoina de 102 % \pm 1,8. Su sensibilidad y precisión son comparables a las del método descrito por SPECKMAN y COLLINS (1968, a) y a las de las técnicas de cromatografía gaseosa con detector de llama, teniendo sobre éstos la ventaja de ser más simple y mucho más fácilmente adaptable al análisis simultáneo de largas series de muestras.

2.—Por primera vez se demuestra la existencia de diacetilo reductasa en el reino animal. Mediante técnicas colorimétricas y espectrofotométricas se ha detectado actividad diacetilo reductasa en diversos órganos y tejidos de varias especies de aves y mamíferos entre los que parece tener una amplia difusión, aunque debe ser menos abundante en las células animales que en las bacterias a juzgar por las cifras calculadas por BRYN y col. (1971) en *Aerobacter aerogenes* y por los datos de actividad

específica de los extractos brutos publicados para ésta y otras especies bacterianas por STRECKER y HARARY (1954) y SEITZ y col., (1963, b).

3.—Para la purificación de la diacetilo reductasa de hígado de bovino se propone el siguiente procedimiento: 1) Preparación de un polvo acetónico. 2) Extracción de éste con cuatro volúmenes de agua. 3) Precipitación fraccionada entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona (referidos al extracto acuoso de polvo acetónico) y liofilización del precipitado. 4) Extracción del liofilizado con 10 volúmenes de agua. 5) Cromatografía en DEAE-22 eluyendo con tampón fosfato pH 6,3 0,025 M.

Siguiendo esta técnica se consigue multiplicar la actividad específica por un factor de 250 con rendimientos del orden del 4 por ciento, referidos a los extractos acuosos 1/10 de hígado.

Los liofilizados de la fracción que precipita entre 1 y 1,3 volúmenes de acetona y las muestras purificadas por cromatografía en DEAE-22 carecen de actividad NADH-deshidrogenasa inespecífica y butilénglico deshidrogenasa que pudieran interferir en los análisis y son, por tanto, adecuadas para la realización de estudios cinéticos.

4.—En la reacción catalizada por el sistema enzimático estudiado no hay consumo de oxígeno, producción de anhídrido carbónico, ni de ácidos y por cada molécula de diacetilo reducida a acetoina se oxida una de NADH. El enzima no requiere activadores metálicos ni cofactores adicionales, por lo que la estequiometría de la reacción queda establecida en la siguiente forma:



que coincide exactamente con la de la catalizada por la diacetilo reductasa (Ec. V. 2).

5.—La diacetilo reductasa de hígado de bóvido es un enzima claramente distinto de la butilénglico deshidrogenasa y del sistema piruvato oxidasa-diacetilo mutasa. Las preparaciones purificadas no catalizan la oxidación del NADH utilizando como substratos acetoina o piruvato ni muestran actividad acetato deshidrogenasa alguna que pudiera inducir a error en la interpretación de la estequiometría de la reacción.

6.—La reducción del diacetilo por la diacetilo reductasa de hígado de ternera es irreversible a todos los efectos prácticos aún a concentraciones de hasta 10 mM, respecto al NAD y 240 mM. respecto a la acetoina, muy superiores a las que son fisiológicas en los tejidos animales.

Esta conclusión coincide con las publicadas por STRECKER y HARARY (1954), SEITZ y col. (1963, a) y SPECKMAN y COLLINS (1968, b) para la reacción catalizada por el/los enzima/s de origen bacteriano a partir de resultados obtenidos en una gran variedad de condiciones experimentales y empleando diversas técnicas analíticas. Aun considerando que las características de los enzimas que catalizan una misma reacción pueden ser muy diferentes según su procedencia, parece conveniente descartar la posibilidad de que el diacetilo pueda producirse a partir de la acetona por oxidación de ésta bajo la acción de la diacetilo reductasa a menos que se aporten pruebas en sentido contrario.

7.—Las preparaciones purificadas por fraccionamiento con acetona no muestran una gran especificidad hacia el NADH, que puede ser sustituido por el NADPH. En cambio, el enzima es muy específico con respecto al diacetilo, que no es reemplazable por sustancias tan similares como la dietilacetona, acetilacetona, acetona, hexanodiona, piruvato, oxaloacetato o α -cetoglutarato.

La especificidad hacia el diacetilo parece ser tan considerable que tanto el enzima libre como el complejo enzima-NAD tienen muy poca o ninguna afinidad hacia la acetona, el producto relacionado con el diacetilo en la reacción. Este hecho constituye muy probablemente la causa de la irreversibilidad del sistema, aunque no se descarta la posibilidad de que radique en la etapa de conversión del complejo ternario enzima-NAD-acetona en enzima-NADH-diacetilo, cuya constante de velocidad no ha podido ser determinada precisamente por el carácter irreversible de la reacción.

8.—La diacetilo reductasa está localizada preferentemente en la fracción soluble de las células hepáticas de paloma y de ternera. En el hígado de paloma se recupera en esta fracción hasta el 90 por ciento de la actividad total; en el de bóvido alrededor del 50 por ciento se encuentra ligada a las partículas, principalmente mitocondrias y lisosomas, pero en la fracción soluble se recupera siempre un porcentaje más alto de la actividad total que en cualquier otra.

9.—Los resultados de las cromatografías en Sephadex G-100 sugieren que la diacetilo reductasa se encuentra al menos en dos estados de asociación en equilibrio regulado por la fuerza iónica del medio, probablemente un monómero y un trímero cuyos pesos moleculares han sido calculados en alrededor de 26.000 y 76.000.

10.—Aunque la diacetilo reductasa en las preparaciones purificadas no es muy estable a temperaturas elevadas, la actividad crece ininterrumpidamente entre 3,5 y 38,5° C. con un Q_{10} , entre 5 y 25° C, de 2,5. La ley de ARRHENIUS se cumple al menos en el intervalo de 3,5 a 28-30° C.; la energía de activación de la reacción se ha calculado en 14.400 cal./mol.

11.—La actividad enzimática sigue la ecuación general de velocidad para reacciones en las que participan dos substratos (Ec. VII. 22) al menos a concentraciones de diacetilo entre $0,05$ y $3,9 \times 10^{-3}$ M. y de NADH de $0,58$ a $2,33 \times 10^{-4}$ M. Las constantes de equilibrio de la reacción en el sentido diacetilo-acetona se han calculado, mediante técnicas de estado estacionario, en:

$$\begin{array}{ll} K_{NADH} = 3,12 \times 10^{-4} \text{ M.} & K_{\text{diacetilo}} = 1,22 \times 10^{-4} \text{ M.} \\ K'_{NADH} = 1 \times 10^{-4} \text{ M.} & K'_{\text{diacetilo}} = 3,98 \times 10^{-5} \text{ M.} \end{array}$$

12.—La reacción catalizada por la diacetilo reductasa de hígado de bóvido sigue un mecanismo de orden obligatorio de fijación de substratos en todo el intervalo de concentraciones de éstos estudiado. Las características de la inhibición por los productos (no inhibición por la acetona, inhibición por el NAD *competitiva* respecto al NADH y *no competitiva* respecto al diacetilo) son concordantes con un mecanismo ordenado clásico en el que el NADH actuase como substrato conductor, pero la irreversibilidad del sistema no permite obtener datos suficientes para excluir como posible la variante de THEORELL-CHANCE.

13.—El perfil de pH de la reacción muestra que la actividad diacetilo-reductasa es máxima a pH 6 — 6,2, con un pico secundario a pH 6,8. Estos y otros datos podrían sugerir la existencia de más de una especie enzimática con actividad diacetilo reductasa en el hígado de ternera, pero el análisis detallado de los datos aportados pone de manifiesto que es muy poco probable.

14.—Se sugieren dos posibles funciones para la diacetilo reductasa en los tejidos animales: la reoxidación de los piridín-nucleótidos reducidos, en orden a facilitar el funcionamiento de la glicolisis en condiciones de anaerobiosis parcial, y un mecanismo de detoxificación relacionado fundamentalmente con la producción de diacetilo por los microorganismos de la flora intestinal.

RESUMEN

Por primera vez se demuestra la existencia de diacetilo reductasa en tejidos animales. Se ha detectado, por técnicas colorimétricas y especrofotométricas, actividad diacetilo reductasa en diversos órganos y tejidos de varias especies de aves y mamíferos, aunque parece ser menos abundante en las células animales que en las bacterias. Intracelularmente se distribuye con preferencia en la fracción soluble, lo que señala hacia una posible participación en los mecanismos de reoxidación de los piridín-nucleótidos.

La diacetilo reductasa de hígado bovino ha sido purificada parcialmente por extracción acetónica, precipitación fraccionada con acetona y cromatografía en columna de DEAE-22-celulosa, con rendimientos del 4 % y un factor de multiplicación de la actividad específica de alrededor de 250 respecto a los extractos acuosos originales.

Con muestras purificadas por este procedimiento se ha estudiado el peso molecular del enzima por cromatografía en gel de Sephadex G-100, el mecanismo de la reacción y su reversibilidad, la participación de cofactores y la influencia del pH, la temperatura y la concentración de enzima, substratos y productos sobre la actividad enzimática.

RESUME

On démontre, pour la première fois, la présence de diacétyl-reductase dans une variété de tissus d'animaux. On étudie sa distribution intracellulaire en montrant sa concentration dans la fraction soluble quoiqu'il y a quelque activité dans la mitochondrie et dans d'autres fractions.

Le diacétyl-reductase de foie bovin a été purifié, en partie, par un procédé comprenant la précipitation d'acétone d'extraits aqueux de tourtes d'acétone et la chromatographie sur la cellulose DEAE-22. Par cette méthode on obtient un 4 por 100 de l'activité totale avec une augmentation de 250 fois dans l'activité spécifique sur les extraits aqueux de foie bovin.

Les préparations enzymatiques purifiées par le fractionnement de l'acétone sont très spécifiques pour l'un des substrats, le diacétyl (butane-2-3-dione), lequel ne peut pas être remplacé par du pentane-3-one, pentane-2-4-dione, hexane-2-5-dione, pyruvate, oxaloacetate, α -ketoglutarate or acétoine (acétyl-methyl-carbinol), mais pas pour l'autre: le NADH

peut être remplacé par le NADPH. L'activité enzymatique a son maximum à pH 6,1 et n'a pas besoin d'ions métalliques. A pH 6,1 la réaction dans la direction diacétyl-acétone suit la loi d'Arrhenius, au moins de 3,5°C à 28-30°C; on a calculé que l'énergie d'activation est de 14.400 cal/mol. Il n'a pas été possible de détecter de l'activité dans la direction contraire (acétoine-diacétyle).

La filtration de Sephadex gel résolut les préparations enzymatiques en deux somets d'activité; les poids moléculaires des espèces enzymatiques furent calculés en 26.000 et 76.000. La proportion de la grandeur des sommets varia selon la molarité de l'éluant (phosphate buffer pH 6,3) et cela indique que le diacétyl-réductase peut se trouver en deux états d'association différents (comme monome et comme trinome), l'équilibre étant régulé par la force ionique du buffer.

On a effectué une ample étude à fin d'expliquer le mécanisme de la réaction. On a conclu qu'elle suit un mécanisme ordonné mais il n'a pas été possible de distinguer entre le variante classique et le variante de Theorell-Chance.

SUMMARY

It is shown for first time that diacetyl reductase is present in a variety of animal tissues. Its intracellular distribution is studied, showing its concentration in the soluble fraction, although there is some activity in mitochondria and other fractions.

Diacetyl reductase from beef liver has been partially purified by a procedure involving acetone precipitation of acetone cakes water extracts and chromatography on DEAE-22-cellulose. By this method a 4 % yield of total activity is obtained with a 250 fold increase in specific activity over beef liver water extracts.

Enzyme preparations purified by acetone fractionation are highly specific for one of the substrates, diacetyl (butane-2-3-dione), which can not be replaced by pentane-3-one, pentane-2-4-dione, hexane-2-5-dione, pyruvate, oxaloacetate, α -ketoglutarate or acetoin (acetyl-methyl-carbinol), but not for the other: NADPH can be substituted for NADH. Enzyme activity shows a maximum at pH 6.1 and does not require metallic ions. At pH 6.1 the reaction in the diacetyl-acetoin direction follows Arrhenius law at least from 3.5°C. to 28-30°C.; activation energy has been estimated

to be 14,400 cal./mol. It has not been possible to detect any activity in the backward direction (acetoin-diacetyl).

Sephadex gel filtration resolved the enzyme preparations in two peaks of activity; the molecular weights of the enzymatic species were estimated as 26.000 and 76.000. The ratio of the peaks size varied with the eluant (phosphate buffer pH 6.3) molarity and this is taken as indicative that diacetyl reductase can be in two different states of association (as a monomer and a trimer), the equilibrium being somehow regulated by the ionic strength of the buffer.

An extensive kinetic study was performed in order to elucidate the reaction mechanism. It has been concluded that it follows an ordered mechanism but it has not been possible to distinguish between classical and Theorell-Chance variants.

BIBLIOGRAFIA

- ADKINS H. y COX E. W. (1938). *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 1151.
- ALAIS CH. (1965). «Science du Lait». Editions Gep, París, 2. ed. Págs. 45, 305 y 476.
- BARRITT M. M. (1936). *J. Path. and Bact.* **42**, 441.
- BAVISOTTO V. S., SHOVERS J., SANDINE W. E. y ELLIKER P. R. (1964). *Proc. Amer. Soc. Brew. Chemist.*, 211.
- BENNET G., LISKA B. J. y HEMPENIUS W. L. (1965). *J. Food Sci.* **30**, 35.
- BIESEL C. G., DEAN R. W., KITCHEL R. S., ROWELL K. M., NAGEL C. W. y VAUGHN R. H. (1954). *Food Res.* **19**, 633.
- BRAGG P. D. (1965). *Biochim. Biophys. Acta* **96**, 263.
- BROWN S. S., NEAL G. E. y WILLIAMS D. C. (1965). *Biochem. J.* **97**, 346.
- BRYN K., HETLAND O. y STORMER F. (1971). *Eur. J. Biochem.* **18**, 116.
- BURGER M., GLENISTER P. R. y BECKER K. (1957). *Proc. Amer. Soc. Brew. Chem.*, 110.
- BUSSE M. y KANDLER O. (1961). *Nature* **189**, 774.
- CLARKE P. H. y MEADOWS P. M. (1959). *J. Gen. Microbiol.* **20**, 144.
- CLAUSSEN N. H. (1903). *C. R. Trav. Lab. Carlsberg* **6**, 64.
- COX G. A. (1945). *J. Dairy Res.* **14**, 28.
- CRANE F. L., LESTER R. L., WIDMER C. y HAFETI Y. (1959). *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 73.
- CROTEAU R. J y FAGERSON I. S. (1968). *J. Food Sci.* **33**, 386.
- CHANCE B. y REDFEARN E. R. (1961). *Biochem. J.* **80**, 632.
- CHUANG L. F. y COLLINS E. B. (1968). *J. Bact.* **95**, 2083.
- DAGLEY S. y DAWES E. A. (1953, a). *J. Bact.* **66**, 259.
- DAGLEY S. y DAWES E. A. (1953, b). *Nature* **172**, 345.
- DALZIEL K. (1957). *Acta Chem. Scand.* **11**, 1706.
- DALZIEL K. (1962). *Biochem. J.* **84**, 244.
- DALZIEL K. (1963). *J. Biol. Chem.* **238**, 2850.
- DE LEY J. (1959). *J. Gen. Microbiol.* **21**, 352.
- DE MAN J. C. (1959). *Rec. Trav. Chim.* **78**, 480.
- DIXON M. y WEBB E. C. (1964). «Enzymes». Longmans, London, 2 ed. Págs. 203-230, 627 y 670-699.
- ERNSTER L. (1967). En «Methods in Enzymology» (Hirs C. H. W., ed.) Academic Press, New York, vol. X. Pág. 309.
- ERNSTROM C. A. (1965). En «Fundamentals of Dairy Chemistry» (Webb. B. H. y Johnson E. H., eds.). The Avi Publishing Company Inc., Westport, Conn, Págs. 590-663.
- FEARON W. R. (1939). *Biochem. J.* **33**, 902.
- FERREN W. P., SHANE N. y SCHWEIGERATH R. (1967). *Food Tech.* **21**, 1265.
- FLORINI J. R. y VESTLING C. S. (1957). *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 575.
- FORNACHON J. C. M. y LLOYD B. (1965). *J. Sci. Food Agr.* **16**, 710.
- FRATEUR J. (1950). *Céllule* **53**, 287.
- FRUTON J. S. y SIMMONDS S. (1961). «Bioquímica General». Ediciones Omega, Barcelona, 3. ed. Págs. 271-285.
- GALE E. F. (1948). Citado en Harvey R. J. y Collins E. B. (1963). *J. Bacteriol.* **86**, 1301.
- GREEN D. E., STUMPF P. K. y ZARUDNAYA K (1947). *J. Biol. Chem.* **167**, 811.
- GUTFREUND, H. (1968). «Introducción al estudio de los enzimas» Ediciones Omega, Barcelona. Pág. 74.
- HALPERN Y. S. y UMBARGER H. E. (1959). *J. Biol. Chem.* **234**, 3067.
- HANES C. S. (1932). *Biochem. J.* **26**, 1406.
- HARVEY R. J. y COLLINS E. B. (1961). *J. Bact.* **82**, 954.
- HARVEY R. J. y COLLINS E. B. (1962). *J. Bact.* **83**, 1005.
- HARVEY R. J. y COLLINS E. B. (1963). *J. Bact.* **86**, 1301.
- HENRI V. (1902). *C. R. Acad. Sci. París* **135**, 916.
- HOFFMAN P. C., KUNZ H. W., SCHMID W. y SIESS M. (1964). *Biochem. Zeitschrift* **339**, 548.
- HOLZER H. y BEAUCAMP K. (1961). *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 225.
- JENNINGS W. G. y NURSTEN H. E. (1967). *Anal. Chem.* **39**, 521.
- JHONSON 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. (1955). *J. Bact.* **71**, 425.
- JUNI E. y HEYM G. (1956). *J. Biol. Chem.* **218**, 365.
- KATO S. y NISHIKAWA N. (1960). *Bull. Brew. Sci.* **6**, 12.
- KEILIN D. HARTREE, E. F. (1938). *Proc. Roy. Soc. B* **124**, 397.
- KRAMPTZ L. O., SUZUKI I. y GREULL G. (1961). *Fed. Proc.* **20**, 971.
- KREBS H. A. y PERKINS J. R. (1970). *Biochem. J.* **118**, 635.
- LEES G. J. y JAGO G. R. (1970). *J. Dairy Res.* **37**, 129.
- LEMOIGNE M. (1920). *Comp. Rend.* **170**, 131.
- LEVITAS y col. (1947). Citados en «Documenta Geigy» J. R. Geigy S. A., Basilea VI ed. (1965). Pág. 572.
- LEWIS M. J. (1968). *Brew. Dig.* **43**, 75.
- LEWIS K. F. y WEINHOUSE S. (1958). *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4913.
- LINEWEAVER H. y BURK D. (1934). *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658.
- MAHLER H. R., BAKER R. H. y SHINER V. J. (1962). *Biochemistry* **1**, 47.
- MAHLER H. R. y CORDES E. H. (1968). «Biological Chemistry». Harper y Row, London, Págs. 240 y 393-404.
- MICHAELIAN M. B., FARMER R. S. y HAMMER B. W. (1933). *Iowa Agr. Expt. Sta. Bull.* **155**, 326.
- MICHAELIAN M. B. y HAMMER B. W. (1936). *Iowa Agr. Expt. Sta. Bull.* **167**, 205.
- MICHAELIS L. y MENTEN M. L. (1913). *Biochem. Zeitschrift* **49**, 333.
- MORGAN M. E. y DAY E. A. (1965). *J. Dairy Sci.* **48**, 1382.

- MURDOCK D. I. (1964). *J. Food Sci.* **27**, 354.
- MURDOCK D. I. (1967). *Food Tech.* **21**, 643.
- MURDOCK D. I. (1968). *J. Milk Food Tech.* **31**, 245.
- O'MEARA R. A. Q. (1981). *J. Path. and Bact.* **34**, 401.
- OWADES J. L. y JAKOVAC J. A. (1963). *Am. Soc. Brew. Chem. Proc.* **22**.
- PACK M. Y., SANDINE W. E., ELLIKER P. R. y DAY E. A. (1964a). *J. Dairy Sci.* **47**, 674.
- PACK M. Y., SANDINE W. E., ELLIKER P. R. DAY E. A. y LINDSAY R. C. (1964b). *J. Dairy Sci.* **47**, 981.
- PETTE J. W. (1949). *XII Inter. Dairy Cong.* **2**, 572.
- PIEN J., BAISSE J. y MARTÍN R. (1936). *Lait* **16**, 243.
- PIEN J., BAISSE J. y MARTÍN R. (1937). *Lait* **17**, 675.
- PILONE G. J., KUNKEE R. E. y WEBB A. D. (1966). *Appl. Microbiol.* **14**, 608.
- PORTNO E. D. (1966). *J. Inst. Brew.* **72**, 193.
- PRILL E. A. y HAMNER B. W. (1938). *Iowa State Coll. J. Sci.* **12**, 385.
- RAVAL D. N. y WOLFE R. G. (1962). *Biochemistry* **1**, 1112.
- RAVAL C. N. y WOLFE R. G. (1963). *Biochemistry* **2**, 220.
- RICKEMBERG H. V., COHEN G. N., BUTTIN G. y MONOD J. (1956). *Ann. Inst. Pasteur* **91**, 829.
- SCANLAN R. A. y LINDSAY R. C. (1968). *J. Food Sci.* **33**, 440.
- SCHWEET R. S., FULD M., CHESLOCK K. Y. y PAUL M. H. (1951). En «*Phosphorus metabolism*» (Mc Elroy W. D. y Glass B., eds.). Johns Hopkins Press, Baltimore, vol. I, pág. 246.
- SCHWERT G. W. y HAKALA M. T. (1952). *Arch. Biochem. Biophys.* **38**, 55.
- SEBECK O. K. y RANDLES C. I. (1952). *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 373.
- SEITZ E. W., SANDINE W. E., ELLIKER P. R. y DAY E. A. (1962). *Bacteriol. Proc.* **23**.
- 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.
- SEMERANO G. y POLACZEK B. (1940). *Gazz. Chim. Ital.* **70**, 448.
- SHIKATA M. y TACHI I. (1930). *Chem. Abstracts* **24**, 5720.
- SCHIMMEL J. L. y KIRKPATRICK W. F. (1939). *J. Inst. Brew.* **45**, 137.
- SINGER T. P. y PENSKY J. (1952). *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 316.
- SIZER I. W. (1943). *Adv. in Enzym.* **3**, 35.
- SOCQUET I. M. y LAIDLER K. J. (1950). *Arch. Biochem.* **25**, 171.
- SOKATCH J. T. y GUNSLAS C. I. (1957). *J. Bacteriol.* **73**, 452.
- SOLOMON J. B. (1959). *Dev. Biol.* **1**, 182.
- SPECKMAN R. A. y COLLINS E. B. (1968, a). *Anal. Biochem.* **22**, 154.
- SPECKMAN R. A. y COLLINS E. B. (1968, b). *J. Bacteriol.* **95**, 174.
- STOTZ E. y RABORG J. (1943). *J. Biol. Chem.* **150**, 25.
- STRECKER H. J. y HARARY I (1954). *J. Biol. Chem.* **211**, 263.
- STRECKER H. J. y KORKES S. (1952). *J. Biol. Chem.* **196**, 769.
- SUOMALAINEN H. y LINNAHALME T. (1966). *Arch. Biochem. Biophys.* **114**, 502.
- SUOMALAINEN H. y RONKAINEN P. (1968). *Nature* **220**, 792.
- THOMPSON J. W., SHOVERS J., SANDINE W. E. y ELLIKER P. R. (1970). *Appl. Microbiol.* **19**, 883.
- TOLLS T. N., SHOVERS J., SANDINE W. E. y ELLIKER P. R. (1970). *Appl. Microbiol.* **19**, 649.
- VAN BEYNUM J. y PETTE J. W. (1939). *J. Dairy. Res.* **10**, 250.
- VAN NIEL C. B. (1927). *Biochem. Zeitschrift* **187**, 472.
- WANG K. M. (1969). *Biochem. J.* **115**, 191.
- WARGURG O. y CHRISTIAN W. (1941). *Biochem. Zeitschrift* **310**, 384.
- WATT D. y KRAMPITZ L. O. (1947). *Fed. Proc.* **6** 301.
- WEST D. B., LAUTENBACH A. L. y BECKER K. (1952). *Proc. Amer. Soc. Brew. Chemist*, **81**.
- WESTERFELD W. W. (1945). *J. Biol. Chem.* **161**, 495.
- WHEAT R. W. y AJI S. J. (1955, a). *J. Biol. Chem.* **217**, 897.
- WHEAT R. W. y AJI S. J. (1955, b). *J. Biol. Chem.* **217**, 909.
- WHITE A. G. C., KRAMPITZ L. O. y WERKMAN C. H. (1946). *Arch. Biochem.* **9**, 229.
- WOOLF B. (1932). En «*Algemeine Chemie der Enzyme*» (Haldane J. B. S. y Stern K. G., eds.). Dresden y Leipzig, Steinkopff Verlag.
- WRATTEN C. C. y CLELAND W. W. (1963). *Biochemistry* **2**, 935.
- ZEWE V. y FROMM H. J. (1962). *J. Biol. Chem.* **237**, 1668.