

PURIFICACION DE UNA ACTIVIDAD BUTILENGLICOL DESHIDROGENASA NADP-DEPENDIENTE, A PARTIR DE TEJIDO MUSCULAR DE GALLINA.

*Por F. Robla,
J. Burgos y
R. Martín*

INTRODUCCION

La existencia de butilénglico deshidrogenasa (2,3-butilénglico: NAD óxido-reductasa, EC 1.1.1.4, o BGDH) se demostró ya hace tiempo en microorganismos de los géneros *Aerobacter* y *Staphylococcus* (Strecker y Harary, 1954), pero sus propiedades son aún poco conocidas. Recientemente se ha comprobado su presencia en tejidos de mamíferos —extractos de hígado de rata (GABRIEL y colaboradores, 1971)—, aunque la escasa pureza de las preparaciones utilizadas no permitió establecer la estequiometría de la reacción. La actividad estudiada por GABRIEL y sus colaboradores acepta como coenzima tanto el NAD(H) como el NADP(H), pero es dos veces superior con NAD(H).

En un estudio de la distribución de BGDH en extractos de órganos y tejidos de varias especies animales realizado en nuestro laboratorio, se observó la existencia de una ligera actividad en el sentido acetona-butilénglico en hígado de ternera y paloma y en riñón y músculo esquelético de gallina, en todos los casos muy superior al utilizar como donador de hidrógeno NADPH que NADH. La actividad específica más alta de las observadas se encontró en los extractos de músculo del muslo de gallina. En esta publicación se da cuenta de las experiencias previas realizadas sobre la purificación de la actividad butilénglico deshidrogenasa NADP-dependiente a partir de los citados extractos.

MATERIALES Y METODOS.

Las soluciones de los reactivos y los tampones se prepararon en agua bidestilada y desionizada. Los coenzimas se obtuvieron de Boehringer. La acetona (BDH) fue purificada por sucesivos lavados con éter etílico deshidratado y libre de peróxidos

(WESTERFIELD, 1945) en atmósfera de nitrógeno, hasta que el contenido en diacetilo —determinado por el método de OWADES y JAKOVAC modificado por MARTÍN y BURGOS (1972)— fue menor del 0,05 %. El gel de fosfato cálcico se preparó siguiendo la técnica de KEILIN y HARTREE (1938). La acetona, el etanol, el sulfato amónico y todos los demás productos químicos utilizados fueron de «calidad reactivo».

Homogeneizaciones tisulares.

Para las homogeneizaciones tisulares se utilizó un homogeneizador de cuchillas M. S. E. equipado con un vaso de vidrio «Vortex» de 100 mls. de capacidad. Durante la homogeneización, las muestras se refrigeraron con hielo triturado.

Determinaciones de proteína.

Se realizaron por el método del biuret, según la técnica descrita por CHANCE y REDFEARN (1961); en las preparaciones más purificadas o en las que interesaba conservar la muestra, por su extinción a 280 y 260 m μ (WARBURG y CHRISTIAN, 1941).

Determinaciones de actividad butilénglicol deshidrogenasa.

La actividad BGDH se determinó a 25° C, siguiendo los cambios en extinción a 340 m μ en un espectrofotómetro Beckman DBGT termostatado con un ultratermostato Colora «N». Los ensayos se realizaron en el siguiente sistema:

Muestra: Tampón fosfato pH 7, 0,3 mmoles; NADH, 0,6 μ moles; acetoína, 12 μ moles; preparación enzimática, no más de 50 unidades; volumen total, 3 mls.

Referencia: Como la anterior, omitiendo la acetoína.

Provisionalmente, hasta que los estudios cinéticos permitan determinar las condiciones óptimas de ensayo, se ha definido una unidad enzimática como la cantidad de enzima que transforma 1 nmol de substrato por minuto en el citado sistema de análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Procedimiento de extracción.

Se ha elegido como procedimiento de extracción la homogeneización en cinco volúmenes de agua destilada con tres tratamientos de 30 segundos de duración a 14.000 r.p.m. alternados con períodos de reposo de otros 30 segundos, eliminando las partículas insolubles por filtración a través de dos capas de gasa y centrifugación a 1.500 \times g durante 10 minutos. La prolongación del proceso de homogeneización hasta un total de nueve tratamientos no mejora la extracción de la actividad BGDH.

La extracción con acetona (10 volúmenes) seguida de extracción del polvo acetónico con cinco volúmenes de agua da rendimientos similares a la acuosa en cuanto a actividad específica, pero inferiores en cerca de un 25 % respecto a actividad total. La actividad BGDH es poco estable en el polvo acetónico.

Fraccionamiento de los extractos acuosos.

Precipitación de la proteína no activa por acción del calor.—En la tabla 1 se resumen los resultados del fraccionamiento de un extracto acuoso de músculo del muslo de gallina por acción del calor. La actividad enzimática es relativamente poco estable frente al calor, pero es protegida eficazmente por la presencia de NADPH a la concentración de $0,4 \times 10^{-4}$ M., lo que permite conseguir un factor de enriquecimiento de 1,75 con recuperaciones de actividad próximas al 100 % por tratamiento a 65° C durante cinco minutos. Este sistema se empleó para la purificación de los extractos en algunas experiencias previas, pero, finalmente, fue abandonado porque la inclusión de NADPH en el medio encarece mucho el proceso sin que el alto coste

TABLA 1

Fraccionamiento de un extracto acuoso (1/5) de músculo del muslo de gallina, por acción del calor.

Tratamiento	Proteína ¹ (mgrs.)	Actividad ¹ (unidades)	Activ. ¹ por mgr. prot.	Factor
50° C, 5 min.	N. P.	95,4	93,9	0,98
	² Acet.	»	88,6	0,93
	NADPH	»	96,7	1,01
50° C, 10 min.	N. P.	80,1	79,5	0,99
	² Acet.	»	86,4	1,08
	NADPH	»	95	1,18
50° C, 20 min.	N. P.	71,1	51,8	0,73
	² Acet.	»	47,5	0,67
	NADPH	»	92,4	1,3
60° C, 5 min.	N. P.	57,6	54,4	0,94
	² Acet.	»	63,9	1,11
	NADPH	»	94,2	1,63
60° C, 10 min.	N. P.	53,1	31,5	0,59
	² Acet.	»	46,7	0,88
	NADPH	»	86,4	1,63
60° C, 20 min.	N. P.	48,6	0	0
	² Acet.	»	0	0
	NADPH	»	0	0
Muestra original		101,7	95	0,93

¹ En el sobrenadante tras centrifugación a 15.000 \times g durante 15 minutos.

² N. P.: Calentadas sin adición de ningún agente protector.
Acet.: Calentadas en presencia de acetoína (4 mM.).
NADPH: Calentadas en presencia de NADPH (0,04 mM.).

venga compensado por un incremento muy satisfactorio en el grado de purificación de las muestras.

Precipitación de la proteína inactiva por acidificación.—El enzima es poco estable a pHs ácidos, por lo que la precipitación de la proteína no activa por acidificación—en el rango de pH 6 a 4,8—con ácido acético o clorhídrico diluidos no consigue mejora alguna en la actividad específica.

Precipitación con sulfato de protamina.—La precipitación de ácidos nucleicos y nucleoproteínas con sulfato de protamina tampoco resulta en una purificación estiable, aunque la actividad en el sobrenadante es estable hasta concentraciones de 0,5 — 0,6 por mil.

Precipitación fraccionada con sulfato amónico.—La actividad BGDH comienza a precipitar a partir de concentraciones de sulfato amónico del 55 % de saturación a 0°C (tabla 2). En la fracción del 70 al 80 % podría lograrse una mejora en la actividad específica de aproximadamente 1,6, pero sólo se recoge alrededor del 65 % de la actividad total de los extractos por lo que se ha considerado preferible no utilizar este procedimiento. Además, la inclusión de esta etapa en el esquema general obligaría a dializar las muestras, con el inconveniente de que se pierde de nuevo del 30 al 40 % de la actividad sin que pueda recuperarse por la adición de líquido de diálisis concentrado; esta pérdida es menor si se emplean métodos continuos, pero en este caso se precisa tal cantidad de dializante que el sistema resulta inaplicable en la práctica.

Precipitación fraccionada con disolventes orgánicos.—El tratamiento con acetona o etanol, incluso a bajas temperaturas (-15° C), inactiva en gran parte al enzima. Sólo se recoge actividad en la fracción que precipita en el rango de cero a 0,5 volúmenes de disolvente por volumen de extracto, no recuperándose en ella más del 20 % de la actividad original.

Fraccionamiento por intercambio iónico.—Se han utilizado CM-celulosa y DEAE-celulosa en el rango de pH 6 a 7,5 (limitado por la estabilidad del enzima) en tampón fosfato de molaridad variable entre 3 mM y 0,8 M.

TABLA 2

Fraccionamiento por precipitación con sulfato amónico de un extracto acuoso de músculo del muslo de gallina.

Depósito de la fracción	Proteína (mgrs.)	Actividad (unidades)	Actividad por mgr. prot.	Factor
0-55 % de saturac.	46,6	—	—	—
55-60 % » »	14,6	0,65	0,05	0,07
60-65 % » »	46,9	14,4	0,31	0,52
65-70 % » »	107,8	51,8	0,48	0,81
70-75 % » »	100,8	82,6	0,82	1,4
75-80 % » »	93,5	98,5	1,06	1,8
80-100 % » »	68,2	49,1	0,72	1,2
Muestra original	456,5	270	0,59	

Las experiencias realizadas con CM-celulosa indican que la actividad BGDH queda retenida antes que la mayor parte de la proteína inactiva. Sin embargo no se ha conseguido eluir satisfactoriamente la actividad, debido a que la butilénglico deshidrogenasa es poco estable en medios de fuerza iónica elevada y/o pH alcalino.

En DEAE-23 la proteína es retenida más fácilmente que la actividad y puede conseguirse alguna mejora en la actividad específica utilizando concentraciones adecuadas de DEAE para eliminar la mayor cantidad posible de proteína contaminante sin pérdidas significativas de actividad BGDH. Los mejores resultados se han obtenido a los pHs más altos (7-7,5) y molaridad más baja (3 mM.), con factores de enriquecimiento en torno a 2 y recuperación del 85 al 90 % de la actividad total.

Adsorción fraccionada en gel de fosfato cálcico.—En la tabla 3 figuran los resultados del fraccionamiento de un extracto acuoso por adsorción en gel de fosfato cálcico. El tratamiento con 0,5 volúmenes de gel (con un peso seco de 2,8 grs./100 mls.) por volumen de muestra da por resultado la adsorción de casi el 80 % de la proteína y sólo el 15 % de la actividad, lo que permite lograr un factor de enriquecimiento en el sobrenadante superior a cuatro.

La fracción adsorbida entre 0,5 y 5 volúmenes de gel por volumen de muestra, retiene alrededor de un 17 % de la proteína y un 70-75 % de la actividad. Se estudió, por tanto, la posibilidad de mejorar el grado de purificación por elución fraccionada del material adsorbido con tampones fosfato de pH 7 0,01 M., 0,05 M., 0,1 M. 0,5 M. y sulfato amónico al 30 % en tampón fosfato 0,5 M., pero la proteína y la actividad se eluyen casi simultáneamente y el enriquecimiento logrado es muy escaso.

En vista de estos resultados se decidió aplicar como primera etapa de purifica-

TABLA 3

Fraccionamiento de un extracto acuoso de músculo del muslo de gallina, por adsorción en gel de fosfato cálcico.

Fracción 1	Proteína (mgrs.)	Actividad (unidades)	Activ. por mgr. prot.	Factor
0,05	104,7	110,1	1,05	1,25
0,1	91,3	104,8	1,15	1,37
0,3	50,8	100,2	1,97	2,35
0,5	25	85,9	3,44	4,1
0,75	19,8	74,3	3,75	4,46
1	17,4	60,7	3,49	4,15
1,5	13,5	50	3,70	4,4
2	12,6	45,6	3,62	4,31
5	5	9,5	1,9	2,26
Muestra original	124,5	105	0,84	

¹ Sobrenadante de la fracción tratada con los volúmenes de gel que se expresan, por volumen de muestra (peso seco del gel: 2,8 grs./100 mls.). El gel. y la proteína retenida en él, se eliminaron por centrifugación a 1.500 X g durante 10 minutos.

ción la adsorción con cantidad suficiente de gel de fosfato cárlico para retener alrededor de un 10 % de la actividad total, eliminando el gel por centrifugación a $1.500 \times g$ durante 10 minutos y liofilizando el sobrenadante.

Podría haberse incluido antes de la liofilización un tratamiento con DEAE-cellulosa a pH neutro o ligeramente alcalino que, probablemente, permitiría retirar parte de la proteína contaminante con recuperaciones del 90 al 100 % de la actividad. Sin embargo, se ha considerado preferible no incluir esta etapa por el momento para evitar en lo posible el problema que representa la centrifugación de los grandes volúmenes de extracto que obliga a manejar la escasa actividad de las muestras originales.

Fraccionamiento de los liofilizados.

Extracción.—Se ha intentado conseguir un procedimiento que permita recuperar toda la actividad de los liofilizados con el mínimo de volumen de disolvente para evitar una dilución excesiva de la actividad que haría difícil su determinación. De los distintos disolventes probados (agua, tampones fosfato de pH entre 6 y 7,5 y molaridades entre 3 mM y 0,2 M., suero fisiológico y urea 8 M.), los más eficaces han sido el agua y los tampones fosfato de pH 7 y baja molaridad. Se ha encontrado conveniente, aunque no totalmente satisfactoria, la extracción con tres mililitros de estos disolventes por gramo de liofilizado.

Fraccionamiento por intercambio iónico con DEAE-23.—Las experiencias realizadas muestran que a pH 7 en tampón fosfato 3 mM puede conseguirse un incremento de la actividad específica del orden de 1,4, con recuperación de alrededor del 90 % de la total, retirando la proteína retenida en DEAE-23 (2 mgrs./mgr. de proteína) antes que la actividad BGDH. Sin embargo, los resultados han sido poco reproducibles en las diferentes partidas de liofilizado, probablemente debido a que la concentración de las sales de los extractos originales durante la liofilización afecta mucho a la capacidad de intercambio del DEAE.

Cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-100.—En la figura 1 se representa el perfil de elución de la cromatografía en Sephadex G-100 de un extracto de liofilizado con tampón fosfato 3 mM. de pH 7 (3 mls. de disolvente/gr. de liofilizado). La actividad butilénglico deshidrogenasa se eluye en un solo pico, detrás de la banda principal de proteína, lo que permite obtener una actividad específica de 75-80 unidades por miligramo de proteína con recuperación del 75 % de la actividad de la muestra original.

Esquema general de purificación.

Las experiencias realizadas hasta ahora aconsejan incluir en el sistema de purificación las siguientes etapas:

a) Homogeneización del tejido muscular del muslo de gallina con cinco vo-

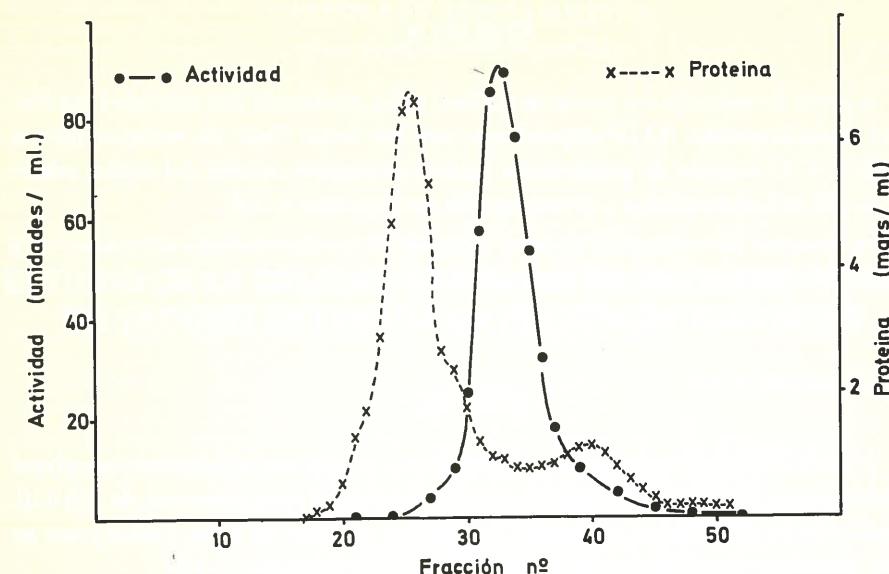


Fig. 1.—Cromatografía en Sephadex G-100 de un extracto de liofilizado con tres volúmenes (p/v) de tampón fosfato 3 mM., pH 7.

La cromatografía se efectuó en una columna de $2,5 \times 36,5$ cms., con flujo invertido. Volumen de la muestra: 4 mls. Eluyente: tampón fosfato 3 mM., pH 7. Presión hidrostática: 18 cms.

Se recogieron fracciones de 3,6 mls.

lúmenes de agua destilada fría en un homogeneizador de cuchillas (tres tratamientos de treinta segundos a 14.000 r. p. m., alternados con períodos de reposo de otros treinta segundos) y clarificación del homogeneizado por filtración a través de dos capas de gasa y centrifugación a $1.500 \times g$ durante 10 minutos; se obtiene así una actividad específica entre 0,47 y 0,95 unidades/mgr. de proteína, con un valor medio de 0,7.

b) Adición de gel de fosfato cárlico en cantidad suficiente para adsorber alrededor del 10 % de la actividad total. El gel y la proteína retenida en él se descartan por centrifugación (actividad específica del sobrenadante 2-3,5 unidades/mgr. de proteína, siendo el valor medio 2,7 y el factor de enriquecimiento 3,5-4).

c) Liofilización del sobrenadante.

d) Extracción del liofilizado con tres volúmenes (p/v) de tampón fosfato 3 mM. de pH 7. Centrifugación del extracto a $105.000 \times g$ durante 10 minutos para eliminar la turbidez y cromatografía en Sephadex G-100 equilibrado con el mismo tampón utilizado para la extracción (actividad específica 75-80 unidades por mgr. de proteína recogiendo el 75 % de la actividad total; factor de enriquecimiento, 105-115).

RESUMEN

A partir de músculo del muslo de gallina, se ha purificado una actividad butilén-glicol deshidrogenasa NADP-dependiente con un factor final de enriquecimiento de 105-110. El método de purificación incluye extracción acuosa del tejido, adsorción en gel de fosfato cálcico y cromatografía en Sephadex G-100.

Se resumen los resultados de otros métodos de fraccionamiento ensayados cuya utilización no se ha considerado conveniente.

RESUME

A partir d'un muscle de la cuisse de poule on a purifié une activité butyleneglycol dehydrogenase NADP-dépendante avec un facteur final d'enrichissement de 105-110. La méthode de purification comprend l'extraction aqueuse du tissu, l'adsorption en gel de phosphate de calcium et la chromatographie en Séphadex G-100.

On a résumé les résultats d'autres méthodes de fractionnement essayées dont l'emploi n'a pas été considéré convenable.

SUMMARY

From a muscle of the thigh of a hen we have purified a butyleneglycol dehydrogenase NADP-depending activity having a final enrichment factor of 105-110. The method of purification includes the aqueous extraction of the tissue, the adsorption on gel of calcium phosphate and the chromatography on Sephadex G-100.

We have summarized the results of other fractioning methods tried whose use has not been considered convenient.

BIBLIOGRAFIA

- CHANCE B. y REDFEARN E. R. (1961). *Biochem. J.* **80**, 632.
- GABRIEL A., JABARA H. y AL-KHALIDI U. A. S. (1971). *Biochem. J.* **124**, 793.
- KEILIN D. y HARTREE E. F. (1938). *Proc. Roy. Soc. B.* **124**, 397.
- MARTÍN R. y BURGOS J. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* **289**, 13.
- WARBURG O. y CHRISTIAN W. (1941). *Biochem. Z.* **310**, 384.
- WESTERFELD W. W. (1945). *J. Biol. Chem.* **161**, 495.