

**PURIFICACION, PROPIEDADES Y MULTIPLES FORMAS
DE LA BUTILENGLICOL DESHIDROGENASA DE MUSLO DE
GALLINA Y SU CARACTERIZACION COMO UN NUEVO
ENZIMA**

Por Ana Bernardo Alvarez

Esta Tesis Doctoral forma parte de un amplio plan de trabajo cuya finalidad es resolver el confusiónismo existente en torno a la especificidad, nomenclatura, papel fisiológico y operatividad, como tales, «in vivo», de las diacetilo reductasas y butilénlicol deshidrogenasas, purificando los enzimas de diversas procedencias hasta homogeneidad electroforética y llevando a cabo un estudio lo más completo posible de su especificidad y de la cinética de las reacciones que catalizan, para deducir qué sustratos son utilizables en condiciones fisiológicas. El objetivo concreto del trabajo que aquí se describe ha sido aplicar este planteamiento general a la butilénlicol deshidrogenasa de tejido muscular de muslo de gallina. Para la purificación del citado enzima se partió de un método puesto a punto previamente en el Laboratorio de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de León que permitía obtener, mediante extracción acuosa, adsorción en gel de fosfato cálcico y cromatografía en Sephadex G-100, preparaciones con una actividad específica hacia 110 veces superior a la original y con un rendimiento próximo al 70%. Las preparaciones así obtenidas fueron sometidas a electroforesis en gel de almidón lo que puso de manifiesto la existencia de al menos 10 bandas de proteína, mostrando que el enzima se encontraba aún muy impurificado. Con objeto de mejorar el citado método de purificación se ensayó su fracciona-

Directores de la tesis: Prof. Dr. Justino Burgos González y Prof. Dr. Roberto Martín Sarmiento.

An. Fac. Vet. León, 1977, 23, 215-219.

miento por intercambio iónico en celulosa DEAE-23 y CM-23, cromatografía de afinidad en NAD⁺-Sephrosia, filtración molecular a través de Sephadex G-75 Superfino, intercambio iónico en Sephadex DEAE A-50, adsorción en gel de hidroxiapatita y por la técnica de electroenfoque de VESTERBERG y SVENSSON (1966). El procedimiento finalmente adoptado, fue el siguiente:

- a) Extracción acuosa homogenizando con 5 volúmenes de agua, filtración y centrifugación a 1.500 x g durante 10 minutos.
- b) Adsorción en gel de fosfato cálcico de la proteína no activa en la proporción suficiente para retirar por centrifugación alrededor del 10 % de la actividad total, obteniéndose un rendimiento del 90 % y un factor de enriquecimiento de 3-4 (ambos, como los que a continuación se dan para las demás etapas, relativos a la situación en los extractos acuosos).
- c) Liofilización del sobrenadante.
- d) Cromatografía en Sephadex G-100, obteniéndose un rendimiento del 65-70 % y un factor de enriquecimiento de 80-90.
- e) Liofilización de los tubos centrales de la banda así obtenida.
- f) Cromatografía en Sephadex G-75 Superfino lográndose un rendimiento del 50-55 % y un factor de enriquecimiento de 170-190.
- g) Cromatografía en gel de hidroxiapatita con un rendimiento global del 44-48 %, lográndose un factor de purificación de 500 a 570.
- h) Electroenfoque en el rango de pH de 4 a 8, con lo que se obtienen tres formas mayoritarias, una de pl 7,2 que supone del 26 al 28 % de la actividad originalmente presente, otra de pl 6,2 que supone hacia un 5,5 %, resultando ambas electroforéticamente puras; se obtiene también una tercera de pl 4,8 normalmente menos abundante, que supone hacia el 3,5-3,8 % obteniéndose factores de enriquecimiento de 4000, 3000 y 500, respectivamente.

La especie de pl 4,8 ofrece una banda de proteína ancha y difusa, lo que sugiere que se encuentra aún contaminada, pero también la banda de actividad lo es, de forma que cabe la posibilidad de que toda la proteína teñida corresponda al enzima.

Es de destacar, que la movilidad, al pH a que la electroforesis se efectuó (7,8) de las formas enzimáticas de pl 7,2 y 6,2 es sensiblemente idéntica y, dentro de la incertidumbre que crea la anchura de la banda, en la de pl 4,8 es probablemente también la misma. Se ha observado también la existencia de otras especies enzimáticas muy minoritarias que catalizan la reacción butilén-glicol deshidrogenasa y acompañan a las tres principales en todo el proceso de purificación hasta el electroenfoque.

El peso molecular, calculado para el enzima por cromatografía en Sephadex G-75 Superfino, es de 28.000 para las tres formas enzimáticas.

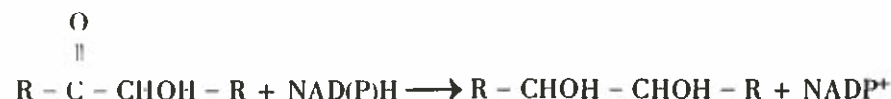
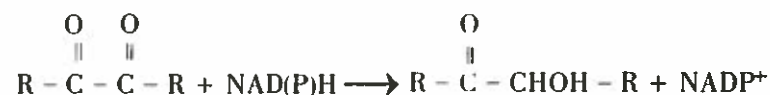
Se estudió la especificidad de sustrato y coenzima de las tres formas mayoritarias; la especie de pl 4,8 es la que mejor acepta el β -NADH y no utiliza el α -NADH, pero al igual que las otras dos, presenta mayor actividad con NADPH.

Respecto a los sustratos, acepta bien el glicoxal, los ésteres de los α -cetoácidos, las dicetonas vecinales y las α -hidroxicetonas; no reduce en cambio el acetaldehído, las monocetonas, las dicetonas no vecinales, ni los α -cetoácidos; de todos los sustratos ensayados el que mejor acepta es el gliceraldehído seguido de las dicetonas vecinales.

En cuanto a la especie de pl 6,2 acepta cualitativamente los mismos sustratos que la forma de pl 4,8 si bien manifiesta pequeñas diferencias cuantitativas, siendo más activa frente a la pentano-2,3-diona que frente al gliceraldehído y aceptando peor el β -NADH.

La especie de pl 7,2 es más activa frente al metilglicoxal y las dicetonas vecinales ensayadas que frente al gliceraldehído, sin embargo, las diferencias más importantes frente a las otras dos especies es que acepta mucho mejor el β -NADH, y que utiliza el oxalacetato; en algunos casos presenta una aparente actividad con α -NADH posiblemente debido a las impurezas de β -NADH que contiene. En resumen, se puede decir que estas formas enzimáticas reducen los α -dicarbonilos a α -(hidroxi)-carbonilos y éstos a los correspondientes carbinoles, acoplada a la oxidación de NADPH o NADH.

La estequiometría de la reacción catalizada se determinó incubando una mezcla de diacetilo, NADPH y preparación enzimática determinando en ella periódicamente diacetilo, acetoína y butilén-glicol; las tres especies enzimáticas se comportan de la misma forma estableciéndose la estequiometría de la reacción en los siguientes términos:



Se estudió la estereoespecificidad de las tres especies enzimáticas midiendo su actividad frente al gliceraldehído D, el L, la suma de ambos y el gliceraldehído racémico comercial; los resultados que se obtuvieron demuestran que las tres especies reducen ambos isómeros, si bien la forma L es peor aceptada, debido con toda probabilidad a la presencia en ella de algún inhibidor; este supuesto se comprobó posteriormente incubando una mezcla de acetoína racémica, NADPH y las preparaciones enzimáticas y determinando la acetoína presente a lo largo del tiempo de incubación; las tres especies consumen la casi totalidad de la acetoína presente inicialmente.

Se investigó la estereoisomería del producto de la reducción de uno de los dos carbonilos vecinales que sucesivamente transforma, para lo cual se siguió el contenido en acetoína y la rotación óptica de una mezcla de reacción que

contenía preparación enzimática, NADPH y un amplio exceso de diacetilo. Las tres formas enzimáticas producen acetoina dextrógira con una rotación óptica específica de $+ 226,4^\circ$ (s.d. $\pm 20,5$), lo que demuestra que el grupo carbonilo del diacetilo que resulta reducido se transforma en uno L- α -hidroxi-carbonilo.

Se comprobó también que la reacción es reversible, aunque el equilibrio de la misma está muy desplazado en el sentido directo, lográndose cuantificar una actividad deshidrogenasa razonablemente alta con pentano-2,3- diol y también, aunque inferior, con los demás sustratos reducidos probados. Por primera vez ha resultado asimismo posible detectar una actividad diacetilo reductasa reversible.

No existe en la Clasificación de la I.U.P.A.C.-I.U.B. ningún enzima que corresponda a las características citadas; se trata pues de uno nuevo, para el que, de acuerdo con las normas de nomenclatura y clasificación vigentes, se propone el nombre científico de L(+)-glicol: NAD(P) óxido-reductasa y el nombre recomendado de L(+)-glicol deshidrogenasa y su inclusión en la clase 1, subclase 1, sub-subclase 1. Se recomienda también incluir en el apartado «Comentarios» la nota «reduce los dicarbonilos vecinales a L(+)- α -hidroxicarbonilos y éstos y los D(-)- α -hidroxicarbonilos a L o meso glicoles.

Se calcularon las correspondientes constantes de Michaelis aparentes, a concentraciones de sustrato fijo que se suponen saturantes; los sustratos para los que mayor afinidad presenta el enzima son, entre los estudiados, el gliceraldehído, la pentano-2,3-diona y el diacetilo, manifestando las tres formas algunas pequeñas diferencias; parece razonable pues que utilicen «in vivo» con un alto nivel de eficacia estos compuestos y tal vez también el glioxal y el metilglioxal, pero seguramente no la acetoina (el sustrato utilizado para su purificación), pues la K_m obtenida para ella, en torno a 3 mM, se halla muy lejos de su concentración fisiológica esperable, entrando además en competencia con los otros sustratos cuya afinidad por el enzima es mucho mayor. La K_m obtenida para el NADPH es cerca de 50 veces más baja que la correspondiente al NADH, lo que pone de manifiesto que «in vivo» los enzimas estudiados operan fundamentalmente acoplados al NADPH.

Este enzima, que ofrece formas de pesos moleculares y movilidad electroforética semejantes sólo diferenciables por su pI, presenta pues, microheterogeneidad. Los mecanismos que se consideran más probables para la aparición de las formas enzimáticas citadas, son la desamidación de residuos de asparagina o glutamina a partir de la forma de pI 7,2 y la aparición, por evolución divergente, de moléculas que difieran en su contenido en histidina. Aunque no puede excluirse por completo que las múltiples formas se originen por proteólisis durante las primeras etapas de purificación, cabe argumentar que no se observan pérdidas de actividad durante la purificación y que todos los enzimas del catabolismo por reducción del diacetilo hasta ahora aislados presentan múltiples formas.

PURIFICATION, PROPERTIES AND MICROHETEROGENEITY OF HENS MUSCLE BUTYLENEGLYCOL DEHYDROGENASE AND ITS CHARACTERIZATION AS A NEW ENZYME

By adsorption in calcium phosphate gel, filtration through Sephadex G-100 and G-75 Superfine and chromatography on hydroxiapatite, an enzyme originally named butyleneglycol dehydrogenase, has been purified 500-570 fold, with a 44-48 % yield, from aqueous extracts of hens thigh muscles.

Electrofocusing this preparation, two electrophoretically pure species of pI 7,2 and 6,2 and another one of pI 4,8 have been isolated.

The three forms of the enzyme show a molecular weight of 28000 daltons and catalyze the reversible reduction of vicinal dicarboniles and hydroxy carboniles coupled to NADH or NADPH oxidation. Stechiometric and substrate specificity studies allow to propose for which is considered a new enzyme the following nomenclature: scientific name L(+)-glycol: NAD(P) oxidoreductase; and recommended name L(+)-glycol dehydrogenase.

From the kinetic studies performed it is deduced that the substrates used under normal physiological conditions are 2,3-pentanedione, glyceraldehyde, diacetyl and perhaps glyoxal and methylglyoxal and the coenzyme NADPH.

The three molecular species of the enzyme show equal electrophoretic migration at pH 7,8.

The most likely origins of the microheterogeneity of the enzyme are considered to be either deamidation of asparagine and glutamine residues of the form of pI 7,2 or divergent evolution leading to forms differing in its histidine contents.