

BIBLIOGRAFIA

- 1) BAIRD-PARKER, A. C. (1974).—The basis for the present classification of staphylococci and micrococci. En YOTIS, W. W. (ed.). *Recent advances in staphylococcal research*. Ann. N.Y. Acad. Sci., **236**:7-13.
- 2) BAIRD-PARKER, A. C. (1979).—Methods for the identification of staphylococci and micrococci. En SKINNER, F.A.S., and LOVELOCK, D.W. (ed.). *Identification methods for microbiologists*. 2.^a edición. Society for Applied Bacteriology Technical Series, Academic Press, London, **14**:201-210.
- 3) DYE, E. S., y KAPRAL, F. A. (1978).—Role of lipids in the destruction of *Staphylococcus aureus* in abscesses. *Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology*, **78**:30.
- 4) EVANS, J. B., y KLOOS, W. E. (1972).—Use of shake culture in a semisolid thioglycolate medium for differentiating staphylococci and micrococci. *Appl. Microbiol.*, **23**:326-331.
- 5) FLESJA, K. J., y ULVESAETER, H. O. (1979).—Pathological lesions in swine at slaughter. II. Culled sows. *Acta Vet. Scand.*, **20**:515-514.
- 6) GUTIÉRREZ, L. M.; MENES, I.; GARCÍA, M. L., y MORENO, B. (1981).—Sensitivity to lysostaphin as a criterion for the identification of staphylococci from animal origin. *J. Appl. Bacteriol.*, **50**:541-549.
- 7) JONES, J. E. T. (1980).—Observations on the bacterial flora of abscesses in pigs. *Br. vet. J.*, **136**:343-348.
- 8) KANOE, M.; IMAGAWA, H.; TODA, M.; SATO, A., y INOUE, M. (1976).—Bacteriology of bovine hepatic abscesses. *Jap. J. vet. Sci.*, **38**:263-268.
- 9) KESKINTEPE, H. (1977).—Staphylococci in animals. Characteristics, distribution and its public health significance. *Veteriner Facultesi Dergisi*, **24**:90-98.
- 10) MCCracken, A., y McCaughey, W. J. (1973).—A survey of abscesses in bacon weight pigs. *Br. vet. J.*, **129**:359-361.
- 11) MELROSE, D. R., y GRACEY, J. F. (1975).—The implication of disease in the meat industry. En COLE, D. R., y LAWRIE, R. A. (ed.). *Meat*. Butterworth, 109-129.
- 12) OTHMAN, Y. M., y MAY, E. (1981).—The occurrence and significance of enterotoxigenic staphylococci on raw beef. En JELJASZEWICZ, J. (ed.). *Staphylococci and staphylococcal infections*. *Zbl. Bakt. Suppl.* **10**: 1033-1038.
- 13) PARISI, E.; PERACCA, L., y JULIN, M. (1978).—Considerazioni ispettive sulla epatite apodematosi dei bovini. *Ann. Fac. Med. Vet. Torino*, **25**:565-575.
- 14) RIISING, H. J. (1978).—Characterization of *Micrococcaceae* isolated from post-mortem examined pigs. *Nord. Vet.-Med.*, **30**:267-273.
- 15) SCHLEIFER, K. H., y KLOOS, W. E. (1975).—A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci. *J. Clin. Microbiol.*, **1**:337-338.
- 16) SUBCOMMITTEE (1965).—Minutes of first meeting of the Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Tax.*, **15**:107-108.
- 17) TEXDÖRF, I. (1981).—Diseases that impair the quality of slaughter pigs. *Fleischwirtschaft*, **61**:999-1003.
- 18) TURNER, F. J., y SCHWARTZ, B. S. (1958).—The use of lyophilized human plasma standardized for blood coagulation factors in the coagulase and fibrinolytic tests. *J. Lab. Clin. Med.*, **52**:888-894.
- 19) VARALDO, P. E.; GRAZI, G.; CISANI, G., y SATTA, G. (1979).—Routine separation of staphylococci from micrococci based on bacteriolytic activity production. *J. Clin. Microbiol.*, **9**:147-148.

CATEDRA DE TECNOLOGIA Y BIOQUIMICA DE LOS ALIMENTOS

(Prof. Dr. JUSTINO BURGOS GONZALEZ)

ESTUDIO DEL EFECTO DE DISTINTOS FACTORES SOBRE LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LACTOSA SINTETASA EN LOS MICROSOMAS DE TEJIDO MAMARIO PROCEDENTES DE GANADO VACUNO

Por I. Burguete Toral*
A. López Pérez
J. Burgos González

INTRODUCCION

Las técnicas descritas en la bibliografía (KARIMOTO y REITHEL¹⁰, BABAD y HASSID², BRODBECK y EBNER^{4, 5}, BREW y col.³, PALMITER¹⁶, KUHN^{12, 13, 14}, FITZGERALD y cols.⁸, TRAYER y HILL¹⁸, KLEE y KLEE¹¹, PRIEELS y col.¹⁷, etc.) referentes a la determinación de lactosa sintetasa por métodos radioquímicos presentan con frecuencia problemas, no sólo los inherentes de la propia naturaleza de la interacción de los dos componentes A (galactosiltransferasa) y B (alfa-lactalbúmina) (COFFEY y REITHEL^{6, 7}, BREW, VANAMAN y HILL³, HILL y col.⁹, ANDREWS¹, KLEE y KLEE¹¹, FITZGERALD y col.⁸ y TRAYER y HILL¹⁸) del enzima, sino también los derivados de otros factores como son el contenido en proteína en la fracción subcelular a ensayar y el período de incubación (COFFEY y REITHEL^{6, 7}).

En este trabajo se estudia el efecto de estos factores sobre la determinación de la actividad lactosa sintetasa en la fracción microsómica procedente del tejido mamario del ganado vacuno.

MATERIAL Y METODOS

Reactivos químicos

El Uridín-5-diofosfato¹⁴-C-galactosa (UPD-D¹⁴-C-gal.) (ICN PHARMACEUTICALS, INC.) fue suministrado en una disolución acuosa de etanol (2/8) (v/v), con una actividad específica de 30 mCi/mmol. Los restantes productos utilizados procedían de Sigma Chem. Co., Merck, BDH, etc., y eran de calidad reactivo.

* Cátedra de Biología.
An. Fac. Vet. León., 1983, 29, 327-334.

Material biológico

Se emplearon ubres de vacas en fase de lactación, procedentes de animales de 8 años de edad de raza Frisona.

Obtención de la fracción microsómica

Se obtuvo siguiendo el método descrito por COFFEY y REITHEL^{6, 7}.

Determinación de proteína

Se llevó a cabo siguiendo el método de LOWRY y col.¹⁵.

Determinación de la actividad lactosa sintetasa

Se siguió el método radioquímico descrito por KLEE y KLEE¹¹ (modificación del descrito por BREW y col.³).

Contaje del material radiactivo

Para dicho contaje se empleó como líquido de centelleo Instagel (Packard).

RESULTADOS

Efecto de la concentración de alfa-lactalbúmina en el medio de incubación sobre la actividad lactosa sintetasa de los microsomas mamarios

Es un hecho bien sabido, desde los experimentos de COFFEY y REITHEL^{6, 7}, BREW, VANAMAN y HILL³, que la actividad lactosa sintetasa de las preparaciones microsómicas es más alta cuando se incorpora alfa-lactalbúmina al medio.

Con el propósito de conseguir una actividad catalítica máxima se exploró la concentración de alfa-lactalbúmina óptima para nuestras preparaciones. A tal fin se incubaron alícuotas conteniendo 2,5 mg de proteína de una preparación de microsomas, en el medio standard de análisis, con una marca en el UDP¹⁴-C-galactosa de 113.400 d.p.m. y cantidades de alfa-lactalbúmina comprendidas entre 0 y 30 μ g/100 μ l. Al término de la incubación (10 minutos a 37°C) se ensayó la ¹⁴C-lactosa formada por el método radioquímico citado en Material y Métodos.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla I. La actividad máxima se obtiene cuando la concentración de alfa-lactalbúmina en el medio de ensayo es de 0,13 mg/ml.

TABLA I
Efecto de la concentración de α -lactalbúmina sobre la actividad lactosa-sintetasa. Preparación microsómica ensayada: 2,5 mg

| α -lactalbúmina (μ g) | Radiactividad medida de la lactosa (d.p.m.) | % trans-formación UDP- ¹⁴ C-gal. en ¹⁴ C-lactosa | Unidades totales (m μ mol/min) | Actividad específica (m μ mol/min mg) | % de la actividad máxima |
|-----------------------------------|---|--|------------------------------------|---|--------------------------|
| 0 | 993* | 0,87 | 0,06* | 0,02* | 18,33 |
| 2 | 1.361* | 1,20 | 0,08* | 0,03* | 25,24 |
| 20 | 5.400* | 4,77 | 0,33* | 0,13* | 100,00 |
| 30 | 4.827* | 4,26 | 0,29* | 0,12* | 89,51 |

* Media de tres determinaciones.

Resultados similares se obtuvieron en análogos experimentos en los que se pretendió perfilar la concentración óptima (ver figura 1). En ningún caso se logró incrementar la actividad conseguida con dicha concentración. Concentraciones más altas daban actividades más bajas.

Relación entre la cantidad de proteína microsómica utilizada en el ensayo y la actividad lactosa sintetasa

Estudios sobre actividad lactosa sintetasa realizados con distintas cantidades de preparación enzimática revelaron que dicha actividad, al menos en las condiciones de ensayo utilizadas, no guardaba una relación lineal.

Al objeto de establecer definitivamente las condiciones de ensayo, en lo que a actividad enzimática se refiere, se determinó la actividad lactosa sintetasa en 0,25, 0,4, 1, 1,5, 2,5 y 5 mg de proteína microsómica utilizando tres alícuotas en cada una de las cantidades citadas, en las condiciones de ensayo ya descritas e introduciendo en forma de UDP¹⁴-C-galactosa en todos los casos con una marca radiactiva de 55.700 d.p.m.

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla II, donde puede apreciarse un descenso de la actividad específica enzimática al aumentar la concentración de proteína microsómica, revelando la probable existencia de algún inhibidor en la preparación.

Estudio comparativo del efecto del tiempo de incubación de la mezcla sobre la actividad lactosa sintetasa

Las técnicas descritas en la bibliografía relativas a la determinación de la actividad lactosa sintetasa por métodos radioquímicos revelan amplias discrepan-

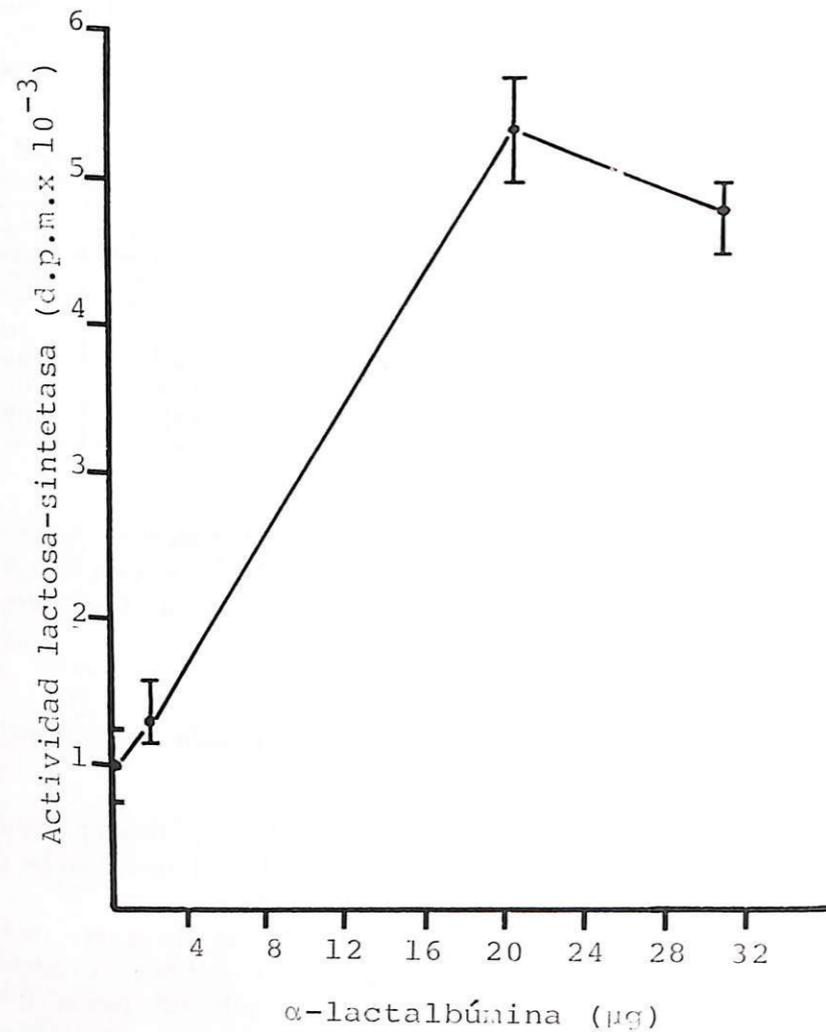


Figura 1.—Variaciones de la actividad enzimática lactosa-sintetasa de 2.5 mg de proteína microsómica, en presencia de cantidades variables de α -lactalbúmina. La actividad enzimática viene expresada por la radiactividad (d.p.m.) del producto formado.

En lo que se refiere a los tiempos de incubación de la mezcla previos a la congelación de la reacción. En principio, parece lógico suponer que, cuanto más se prolongue la incubación, mayor será la actividad total media, siempre que exista sustrato suficiente, pero COFFEY y REITHEL^{6, 7} observaron que la actividad enzimática específica medida tras incubaciones de 20 minutos superaba a la observada en incubaciones de 60 y 120 minutos.

Al objeto de determinar el tiempo óptimo de incubación se tomaron alícuotas de una preparación microsómica que contenían 25, 50 y 250 μg de proteína y se

TABLA II
Relación entre actividad enzimática lactosa sintetasa y proteína microsómica utilizada en el ensayo. Marca de UDP-¹⁴C-galactosa 55.700 d.p.m.

| Proteína (mg) | Radiactividad media de la lactosa (d.p.m.) | % transformación de UDP- ¹⁴ C-gal. en ¹⁴ C-lactosa | Unidades totales (m μ mol/min) | Actividad específica (m μ mol/min mg) |
|---------------|--|--|------------------------------------|---|
| 0.25 | 6.480* | 12.2 | 0.85* | 3.40* |
| 0.40 | 10.154* | 18.2 | 1.27* | 3.17* |
| 1.00 | 21.148* | 37.9 | 2.65* | 2.65* |
| 1.50 | 27.133* | 48.7 | 3.41* | 2.27* |
| 2.50 | 11.896* | 21.3 | 1.49* | 0.60* |
| 5.00 | 10.749* | 19.3 | 1.35* | 0.27* |

* Media de tres determinaciones.

incubaron en el medio standard con una marca de UDP¹⁴-C-galactosa que representaba 113.400 d.p.m. durante 10, 20 y 60 minutos.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 2, donde puede observarse que la actividad enzimática disminuye entre 10 y 60 minutos con el tiempo de incubación, y que no se ve afectada por la concentración de proteína microsómica utilizada. El descenso es más significativo a medida que se incrementa la concentración de proteína microsómica.

DISCUSION

Es conocida la necesidad, a la hora de efectuar estudios de inhibición de un sistema enzimático, de trabajar en condiciones en las que se observe una linealidad de las representaciones de actividad en función de la concentración de proteína ensayada. Nosotros hemos tratado de encontrar estas condiciones «ideales» o aproximarnos a ellas para la determinación de actividad lactosa sintetasa en preparaciones de microsomas de glándulas mamarias.

Nuestras experiencias relativas a la influencia de la alfa-lactalbúmina exógena sobre la actividad lactosa sintetasa medida confirman, en líneas generales, las de BRODBECK y EBNER^{4, 5}, COFFEY y REITHEL^{6, 7}, HILL y col.⁹ y FITZGERALD y col.⁸, en cuanto que ponen de manifiesto que la actividad de las preparaciones aumenta con la alfa-lactalbúmina exógena añadida, en tanto ésta no pase de un cierto límite a partir del cual comienza a descender la actividad lactosa sintetásica medida. Con nuestras preparaciones y en las condiciones experimentales usadas, la cantidad de alfa-lactalbúmina añadida al medio de ensayo (0,13 mg/ml) para lograr una actividad máxima es notablemente inferior a la observada por HILL y col.⁹ y COFFEY y REITHEL^{6, 7}, hallándose próxima a la concentración obtenida por FITZGERALD y col.⁸ (0.2 mg/ml). Es probable que estas diferencias estén relacionadas con el nivel de alfa-lactalbúmina endógena.

Los resultados recogidos en la tabla II revelan un descenso de la actividad específica medida, con el incremento de la concentración de enzima. Dado que

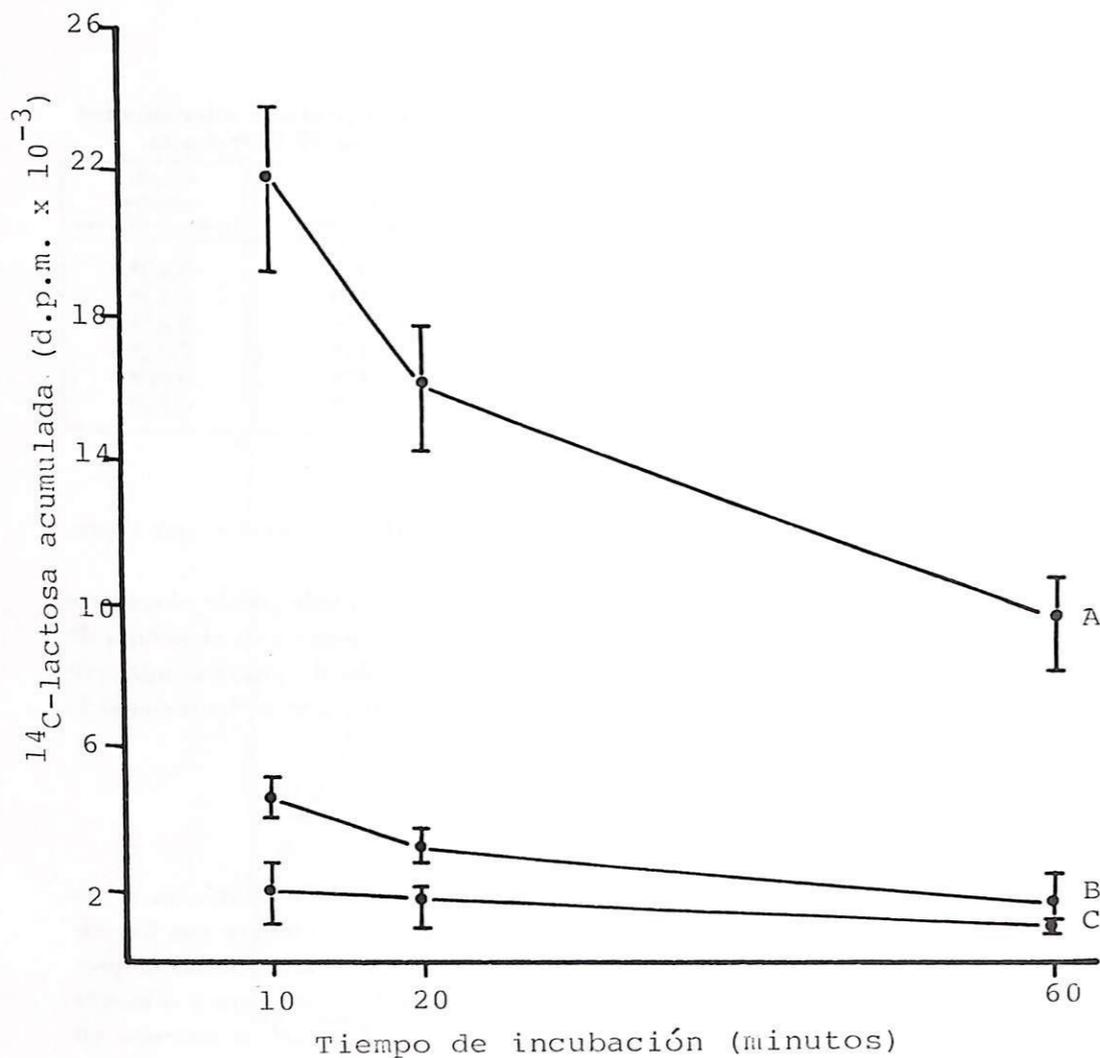


Figura 2.—Representación gráfica de la lactosa acumulada tras tiempos de incubación variables. La actividad enzimática viene expresada en términos de radioactividad (d.p.m.) del producto formado.
 A: ensayo con 250 µg de proteína microsómica.
 B: ensayo con 50 µg de proteína microsómica.
 C: ensayo con 25 µg de proteína microsómica.

el ensayo se realiza a tiempo fijo, podría atribuirse este fenómeno al agotamiento de sustrato o a la acción inhibitoria de los productos de la reacción. Alternativamente podría explicarse en términos de la presencia de un inhibidor interno en la preparación.

Los resultados que se representan en la figura 2, obtenidos utilizando preparaciones del mismo tipo que las de COFFEY y REITHEL^{6, 7}, revelan que el incremento del tiempo de incubación no sólo disminuye la actividad específica aparente, sino que también se da un progresivo declive de la cantidad de lactosa acumulada.

A nuestro juicio, este hecho no admite otra interpretación que la de la existencia, en las preparaciones utilizadas, de sistemas capaces de transformar la lac-

tosa en algún producto retenido por la columna-piruvato o lactato, por ejemplo, dada la naturaleza de la resina utilizada para separar la lactosa del UDP-galactosa, o que, por su naturaleza volátil, acabara pasando del medio de análisis a la atmósfera. Esto explicaría que el descenso, con el tiempo de incubación, de la lactosa determinada se inicie tanto más temprano y sea tanto más acusado cuanto más proteína microsómica se halle presente. Tal vez no se deba tanto al incremento de los enzimas presentes en las citadas transformaciones metabólicas de la lactosa como a la dependencia de su actividad con respecto a la concentración de sustrato (lactosa previamente acumulada en el sistema). Evidentemente, esta hipótesis bastaría por sí sola para explicar la falta de linealidad de las representaciones de actividad (lactosa acumulada/tiempo) en función de la concentración de enzima.

En cualquier caso, los resultados obtenidos en nuestros experimentos revelan que, utilizando períodos de incubación no superiores a 10 minutos y restringiendo la cantidad de preparación a límites no superiores a 1 mg de proteína microsómica, las condiciones de análisis resultan, en este sentido, satisfactorias, siendo alta la probabilidad de que las determinaciones efectuadas reflejen bastante bien la cantidad de lactosa formada. De hecho, las actividades específicas medidas no sólo igualan, sino que superan claramente, las observadas por BRODBECK y EBNER¹, BABAD y HASSID² y COFFEY y REITHEL^{6, 7}.

RESUMEN

Se ha realizado un estudio del efecto que sobre la actividad lactosa sintética de los microsomas de tejido mamario bovino ejercen los siguientes factores: concentración de alfa-lactalbúmina exógena, cantidad de proteína microsómica y tiempo de incubación. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la actividad óptima se alcanza cuando la alfa-lactalbúmina añadida es 0,13 mg/ml, la proteína microsómica 1 mg y el tiempo de incubación no supera los 10 minutos.

EFFECT OF DIFFERENT FACTORS ON THE DETERMINATION OF THE LACTOSE SYNTHETASE ACTIVITY IN MICROSOMES FROM BOVINE MAMMARY GLAND

SUMMARY

It has been studied the effects of the following factors on Lactose Synthetase activity in microsomes from bovine mammary gland: alpha-lactalbumin exogen concentration, microsomal protein concentration and incubation time. The results show that the better activity is obtained a concentration of alpha-lactalbumin of

0,13 mg/ml, 1 mg of microsomal protein and not more than 10 minutes of incubation period.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ANDREWS, P. (1970).—Purification of Lactose Synthetase A protein from human milk and demonstration of its interaction with α -Lactalbumin. *FEBS Letters*, **9** (5): 297-300.
- 2) BABAD, H., y HASSID, W. Z. (1966).—Soluble Uridine Diphosphate D-galactose: D-glucose β -4-D-galactosyltransferase from Bovine Milk. *J. Biol. Chem.*, **241** (11): 2672-2678.
- 3) BREW, K.; VANAMAN, T. C., y HILL, R. L. (1968).—The role of α -lactalbumin and the A protein in lactose synthetase: a unique mechanism for the control of a biological reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **59**: 491-497.
- 4) BRODBECK, U., y EBNER, K. (1966).—Resolution of a Soluble Lactose Synthetase into two protein components and solubilization of microsomal Lactose Synthetase. *J. Biol. Chem.*, **241** (3): 762-764.
- 5) BRODBECK, U., y EBNER, K. E. (1966).—The subcellular distribution of the A and B proteins of Lactose Synthetase in Bovine and Rat Mammary Tissue. *J. Biol. Chem.*, **241** (23): 5526-5532.
- 6) COFFEY, R. G., y REITHEL, F. J. (1968).—The Lactose Synthetase Particles of Lactating Bovine Mammary gland. Preparation of Particles with intact Lactose Synthetase. *Biochem. J.*, **109** (169): 169-176.
- 7) COFFEY, R. G., y REITHEL, F. J. (1968).—The Lactose Synthetase Particles of Lactating Bovine Mammary Gland. Characteristics of the Particles. *Biochem. J.*, **109** (169): 177-183.
- 8) FITZGERALD, D. K.; BRODBECK, U.; KIYOSAWA, I.; MAWAL, R.; COLVIN, B., y EBNER, K. E. (1970).— α -lactalbumin and the lactose synthetase Reaction. *J. Biol. Chem.*, **245** (8): 2103-2108.
- 9) HILL, R. L.; BREW, K.; VANAMAN, T. C.; TRAYER, I. P., y MATTOCK, P. (1968).—The structure, function and evolution of α -lactalbumin. *Brookhaven Sympos. Biol.*, **21**: 139-154.
- 10) KARIMOTO, R. S., y REITHEL, F. J. (1965).—The synthesis of lactose by a soluble protein derived from bovine mammary tissue. *Life Sci. Pergamon Press Ltd. Printed in Great Britain*, **4**: 919-922.
- 11) KLEE, W. A., y KLEE, C. B. (1972).—The interaction of α -lactalbumin and the A protein of lactose synthetase. *J. Biol. Chem.*, **247** (8): 2336-2344.
- 12) KUHN, N. J. (1968).—Lactogenesis in the rat. Metabolism of uridine diphosphate galactose by mammary gland. *Biochem. J.*, **106**: 743-748.
- 13) KUHN, N. J. (1969).—Progesterone withdrawal as the lactogenic trigger in the rat. *J. Endocr.*, **44**: 39-54.
- 14) KUHN, N. J. (1969).—Specificity of Progesterone inhibition of Lactogenesis. *J. Endocr.*, **45**: 615-616.
- 15) LOWRY, H. O.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A., y RANDALL, R. J. (1951).—Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265.
- 16) PALMITER, R. D. (1969).—Properties of Lactose Synthetase from Mouse Mammary Gland: role of a proposed third component. *Biochim. Biophys. Acta*, **178**: 35-46.
- 17) PRIEELS, J. P.; DOLMANS, M.; LEONIS, J., y BREW, K. (1975).—Nitration of Tyrosine Residues in Human α -Lactalbumin. Effect on Lactose Synthase Specifier Activity. *Eur. J. Biochem.*, **60**: 533.
- 18) TRAYER, I. P., y HILL, R. L. (1971).—The Purification and Properties of the A protein of Lactose Synthetase. *J. Biol. Chem.*, **246** (21): 6666-6675.

ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS METODOS DE DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LACTOSA SINTETASA EN LOS MICROSOMAS DE TEJIDO MAMARIO DEL GANADO BOVINO. EFECTOS QUE SOBRE ESTA ACTIVIDAD ENZIMATICA EJERCEN LA CONGELACION Y REFRIGERACION

Por I. Burguete Toral*
A. López Pérez
J. Burgos González

INTRODUCCION

La elección del método de determinación de la actividad lactosa sintetasa (LS) ha sido con frecuencia motivo de controversia. Los métodos espectrofotométricos hasta ahora empleados se basan en la determinación del UDP formado mediante una serie de reacciones acopladas, una de las cuales (generalmente la lactosa deshidrogenasa) oxida el NADH a NAD, lo que permite conocer la cantidad de lactosa sintetizada vía los cambios de extinción a 340 m μ . El método desarrollado por DAVIDSON⁷ ha sido objeto de modificaciones por otros investigadores (BRODBECK y EBNER⁴, ANDREWS¹, FITZGERALD y col.⁸ y ANDREWS¹ y KITCHEN² entre otros). Estos métodos son sumamente ventajosos por su rapidez y sencillez, pero ofrecen, por el contrario, inconvenientes tales como la interferencia de otros enzimas o sistemas enzimáticos que oxidan también el NADH.

Los métodos radioquímicos (BRODBECK y EBNER⁵, KLEE y KLEE⁹ y BREW y col.³) cuantifican la actividad LS mediante el recuento radiactivo de la lactosa formada a partir de UDP-galactosa marcada con ¹⁴C. Estos ensayos de incorporación, aunque resultan engorrosos y requieren el uso de un instrumental más complejo, son más sensibles.

En el presente trabajo se estudia la eficacia de ambos métodos (espectrofotométrico y radioquímico) para cuantificar la actividad LS en microsomas obtenidos a partir de tejido de glándula mamaria de bóvidos, así como el efecto que ejercen sobre dicha actividad la refrigeración de microsomas y la congelación de la glándula mamaria.

* Cátedra de Biología.
An. Fac. Vet. León., 1983, 29, 335-342.