

**DOS METODOS RAPIDOS PARA LA PURIFICACION DE LA
L-GLICOL DESHIDROGENASA (NAD⁺)
DE *ENTEROBACTER AEROGENES*.**

**(TWO RAPID PROCEDURES TO PURIFY L-GLYCOL
DEHYDROGENASE (NAD⁺) FROM
ENTEROBACTER AEROGENES)*****

Por J. Carballo, *
J.C. Rodríguez Salido, **
J. González Prieto, *
R. Martín Sarmiento *
y A. Bernardo *

Palabras clave: L-glicol deshidrogenasa (NAD⁺), 2,3 Butanodiol.
Key words: L-glycol dehydrogenase (NAD⁺), 2, 3 Butanediol.

RESUMEN

Se proponen dos nuevos procedimientos para la purificación de la L-glicol deshidrogenasa (NAD⁺) de *Enterobacter aerogenes*. Ambos métodos dan preparaciones con un grado de pureza muy elevado (actividad específica en torno a 31,5-34 U.I./mg. de proteína), ofrecen un rendimiento muy alto (42-49% sobre la actividad inicial), no utilizan técnicas lesivas para la enzima y tienen también la ventaja de requerir tiempos de realización cortos (6-8 horas).

SUMMARY

Two new procedures to purify L-glycol dehydrogenase (NAD⁺) from *Enterobacter aerogenes* are proposed. Both of them give very pure preparations (s. a. = 31,5-34 I.U./

* Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos.

** Antibióticos, S.A. León.

*** Este trabajo ha sido financiado con una ayuda concedida por la Excm. Diputación Provincial de León.

An. Fac. Vet. León. 1989, 35, 31-41

mg protein), with a high yield (42-49% of initial activity), avoid the use of fractionation techniques harmful to the enzyme and are also advantageous in requiring only 6-8 hours.

INTRODUCCION

Bryn y colaboradores demostraron en 1971 la existencia de una enzima en *Enterobacter aerogenes* capaz de reducir el diacetilo a acetoina y ésta a butilenglicol, para la que propusieron el nombre de diacetilo (acetoina) reductasa⁴. La citada enzima, un tetramero de subunidades de peso molecular en torno a 25.000 dalton⁸, reduce también la 2,3 pentanodiona y el acetiltilcarbinol¹¹, presentando una alta afinidad por la acetoina¹² y ligeramente menor por sus demás sustratos^{9, 11}.

En los primeros años de la década actual se describió su existencia en *Saccharomyces uvarum*^{7, 13}. Más recientemente se han realizado nuevos estudios destinados a completar su caracterización, con la conclusión de que se trata de una óxido-reductasa no incluida aún en la lista de la I.U.B. que debe recibir el nombre de L-glicol deshidrogenasa (NAD⁺)². El procedimiento propuesto inicialmente por Bryn y sus colaboradores para la obtención de la deshidrogenasa de *Enterobacter aerogenes* rinde preparaciones electroforéticamente puras⁴. No obstante presenta el inconveniente de resultar caro, potencialmente lesivo para la enzima y muy laborioso: requiere cinco precipitaciones, dos diálisis, dos cromatografías de intercambio iónico, una de adsorción y otra de filtración molecular. En el presente artículo se ofrecen dos nuevos métodos, muy rápidos y sencillos, para su purificación. La calidad de las preparaciones obtenidas con ellos es algo inferior a la que se logra por el sistema de Bryn, pero más que suficiente para la mayor parte de las aplicaciones.

MATERIAL Y METODOS

Las cepas de *Enterobacter aerogenes* fueron proporcionadas por la American Type Culture Collection y por la Czechoslovak Collection of Microorganisms. Fueron cultivadas a temperatura óptima (37°C para las ATCC 29940, 29752, 29008 y CCM 2531; 30°C para las demás), en un agitador mecánico utilizando el medio de Davis y Mingioli⁵ suplementado según Kogut y Podoski¹⁰. Las células se recogieron por centrifugación a 1.000 x g. durante veinte minutos y, salvo indicación en contrario, se suspendieron en cinco volúmenes de tampón fosfato bisódico-monopotásico 50 mM de pH 7,0. Se sonicaron luego en un Labsonic 1510 mediante 9 golpes de 15 segundos a una potencia de 200 W. El sonicado se clarificó por centrifugación a 40.000 x g. durante treinta minutos.

La proteína se determinó por el método de Lowry¹⁴, excepto en los eluatos de los cromatogramas y electroenfoques en los que el contenido en proteína se estimó por la extinción a 280 nm., tomando como referencia la seroalbúmina bovina y considerando que una disolución de 1 mg./ml absorbe 0,66³.

Los ensayos de actividad enzimática se llevaron a cabo por el método descrito por Bryn *et al*⁴, utilizando como sustratos NAD⁺ (Sigma) y 2,3 butanodiol (BDH). Como unidad de actividad se tomó la cantidad de enzima que transforma un μ mol de sustrato por minuto.

Las cromatografías de filtración molecular en Sephadex G-100 y G-200 y en Sephacryl S-200 Superfino se realizaron en columnas de 2,5 x 45 cm. equilibradas y eluidas

con tampón fosfato Na₂-K 50 mM de pH 7,0. Las de intercambio iónico en DE-52, en columnas de 1,5 x 16 cm., empleando como eluyente tampón fosfato 10mM de pH 7,0 a un flujo de 70 ml./hora, o de 2,5 x 41 cm., eluidas a 190 ml./hora. Los electroenfoques se llevaron a cabo por la técnica de Ayers y Erickson¹, en el rango de pH 3-10. Para los cromatogramas, en el rango 4-8 sobre gel PBE-94 equilibrado en tampón Imidazol-ClH 25 mM de pH 8,0, se utilizaron columnas de 2,5 x 23 cm., que se eluyeron, a un flujo de 140 ml./hora, con polibuffer 74 (Farmacia). Las cromatografías de adsorción en hidroxapatita se efectuaron en columnas de 1 x 10 cm. de Biogel HTP (Bio-Rad), empleando como eluyente, a una velocidad de flujo de 35 ml./hora, un gradiente lineal entre 50 y 300 mM de tampón fosfato Na₂-K de pH 7,0 formado por 75 ml. de cada componente.

Para la realización de las electroforesis se siguió la técnica descrita por Provecho *et al*¹⁵. Las tinciones para actividad L-glicol deshidrogenasa de los geles se realizaron según Hetland *et al*⁸ y las de proteína por el procedimiento de Fenner *et al*⁶.

Todos los experimentos se realizaron a 0-4°C.

RESULTADOS

Elección de cepa

Se comprobó la actividad enzimática de diez cepas de *Enterobacter aerogenes*, previa adaptación de las mismas mediante dos pases en el medio B.H.I. y tres más en el utilizado para el cultivo y recogida de las células. Los resultados obtenidos (Tabla I) ponen de manifiesto que la cepa que proporciona una mayor actividad es la ATCC 15038, que fue la elegida para realizar el resto de los experimentos descritos en este trabajo.

TABLA I
Actividad L-glicol deshidrogenasa (NAD⁺) de diversas cepas de *Enterobacter aerogenes*

Cepa	Actividad enzimática (Unidades/100 ml. de medio)			
	6 horas	8 horas	12 horas	14 horas
ATCC 13048	4,9	56,7	80,3	61,0
ATCC 15038	27,8	130,5	139,8	82,1
ATCC 15337	0,3	27,6	51,5	49,9
ATCC 29007	—	55,9	12,0	14,4
ATCC 29008	0,05	18,4	55,1	46,4
ATCC 29009	2,7	21,1	53,9	63,8
ATCC 29010	8,0	30,4	22,7	16,9
ATCC 29751	20,1	116,7	9,2	15,6
ATCC 29940	35,0	49,1	47,6	77,2
CCM 2531	23,7	84,3	58,0	68,0

Elección del momento óptimo de recogida

Se sembraron veinticuatro matraces que contenían cada uno de ellos 160 ml. del medio de Davis y Mingioli, con un 1% de un cultivo la de cepa ATCC 15038 previa-

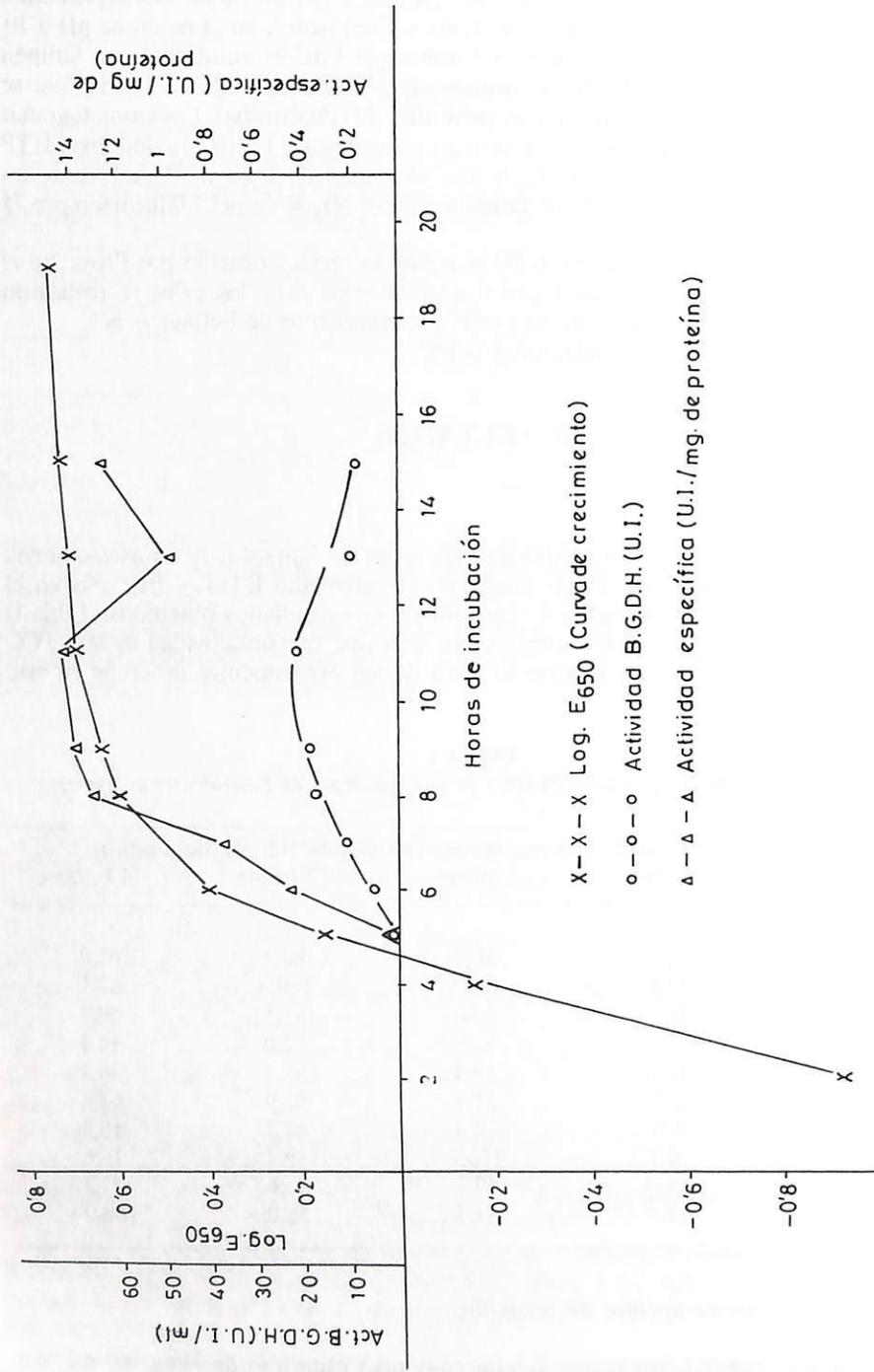


Fig. 1.- Curva de crecimiento de *Enterobacter aerogenes* (cepa ATCC 15038) y evolución de la actividad butilglicol deshidrogenasa por ml., y específica.

mente adaptada al citado medio mediante tres pases. Se tomaron muestras periódicamente siguiendo en ellas el crecimiento por el cambio de extinción a 650 nm. y determinando en los extractos celulares actividad enzimática y proteína. Se obtuvieron los resultados de la Fig. 1, que prueban que la mayor actividad total y específica se obtiene al cabo de once horas de incubación.

Elección del tiempo de sonicación

Alícuotas de una suspensión de células suspendidas en cinco volúmenes de tampón fosfato bisódico-monopotásico 50 mM de pH 7 se sometieron a un número variable de tratamientos de sonicación de quince segundos de duración a 200 W. de potencia. De acuerdo con los resultados obtenidos, que se presentan en la Fig. 2 se decidió aplicar un tratamiento de nueve golpes.

Estabilidad de la enzima

La Fig. 3 a y b recoge la influencia del pH y de la molaridad del tampón sobre la estabilidad de la enzima. Puede comprobarse que es más estable a pH 7 o superiores y a molaridades altas. Bryn y colaboradores utilizaron NAD^+ y mercaptoetanol para protegerla durante el proceso de purificación. Sin embargo la adición a nuestros extractos de NAD^+ hasta 0,1 mM y mercaptoetanol hasta 25 mM no produjo mejora sensible en el mantenimiento de la actividad a lo largo del tiempo.

Purificación de los extractos

Se ensayaron las siguientes técnicas de fraccionamiento: precipitaciones con sulfato de estreptomycin, sulfato de protamina, sulfato amónico y acetona; cromatografías de filtración molecular en Sephadex G-100, G-200 y Sephacryl S-200 Superfino; cromatografía de adsorción en gel de hidroxapatita; electroenfoque, cromatoenfoque y cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. Las que ofrecieron mejor resultado fueron las de intercambio iónico, cromatoenfoque y adsorción en hidroxapatita, con factores de purificación en torno a 20 en las dos primeras y hacia siete en la última. Las cromatografías de filtración molecular dieron resultados relativamente satisfactorios, con factores de purificación de 3,5, pero sólo en las mejores fracciones, que suponen hacia el 15% de la actividad recogida (tomando el 50% de la actividad, el factor de purificación descende a 2,6-3). El electroenfoque determinó una mejora sensible en la actividad específica de las muestras (factor de purificación de 3), pero mucho menor que la alcanzada por cromatoenfoque, técnica que es además mucho más rápida. Las técnicas de precipitación dieron resultados muy pobres, con factores de purificación entre 1,3 y 1,6, excepto la de fraccionamiento con sulfato amónico, que permitió alcanzar actividades específicas 2-2,5 veces más altas que la de los extractos, si bien recogiendo sólo el 50% de la actividad.

A partir de estos resultados, se proponen dos procedimientos rápidos para la purificación de la L-glicol deshidrogenasa (NAD^+) de *Enterobacter aerogenes*:

Método A

Suspéndanse dieciséis gramos de células de cepa ATCC 15038 en 80 ml. de tampón Imidazol-ClH 25 mM de pH 8 y sométase la suspensión a sonicación y aclaramiento

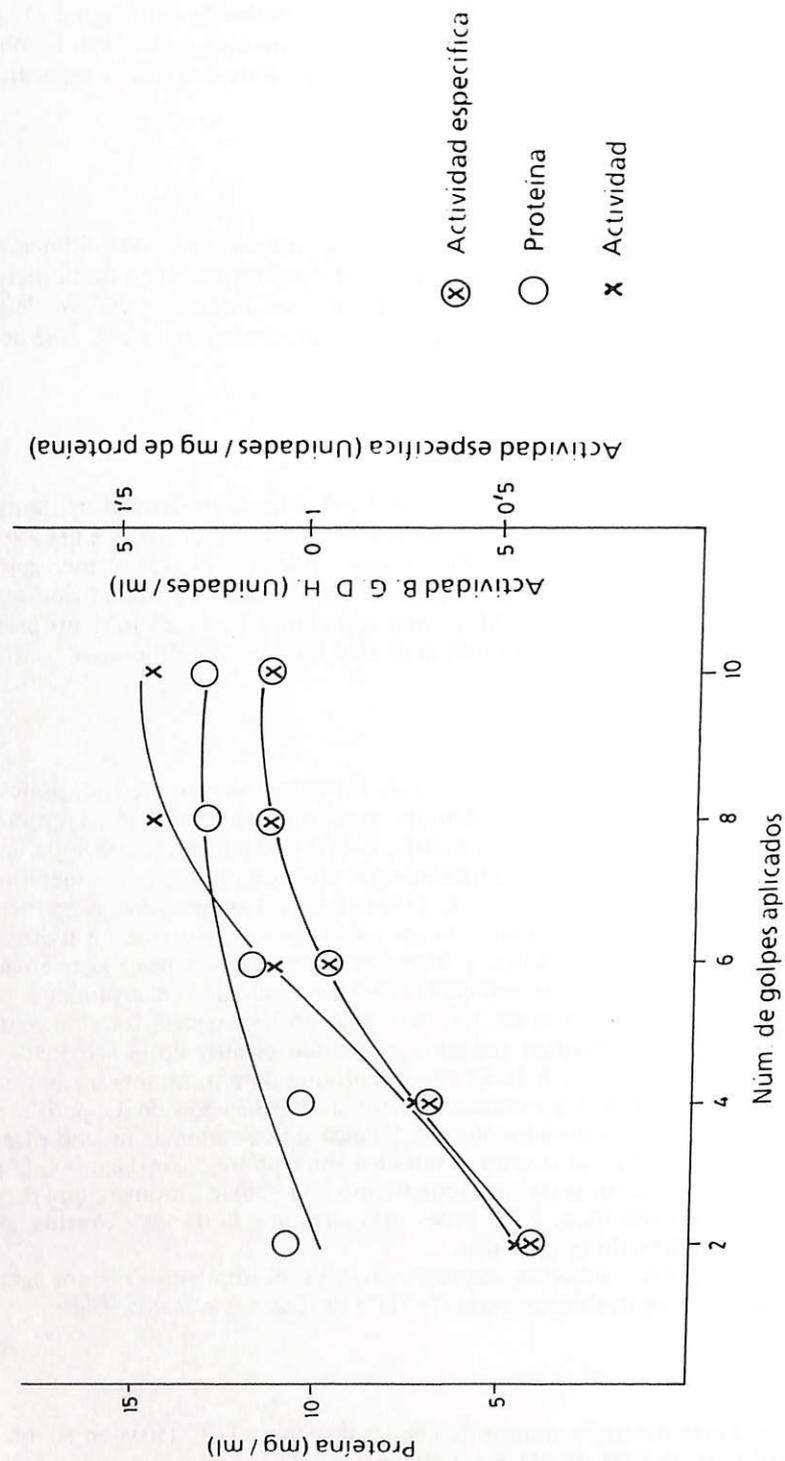


Fig. 2.- Influencia del tiempo de sonicación de las suspensiones celulares sobre la actividad enzimática de los extractos.

por centrifugación como se describe en el apartado de Material y Métodos. Cromatografiase el extracto a través de una columna de 2,5 x 23 cm. empacada con gel PBE 94 para cromatoenfoco. Elúyase con polibuffer 74 diluido 1/8 en agua destilada ajustado a pH 4,0 con ClH 25 mM, a un flujo de 140 ml./hora, recogiendo fracciones de 10 ml. La actividad se eluye en torno a pH 6,8. Tómanse las cuatro mejores fracciones (tubos 65-68, tiempo de retención 4,6-4,8 horas) y cromatografiense en una columna de DE-52 de 1,5 x 16 cm. equilibrada con tampón fosfato 10 mM de pH 7,0 y eluida con el mismo tampón a un flujo de 70 ml./hora, tomando fracciones de 6 ml. Recójense las seis mejores fracciones (tubos 4-9, tiempo de retención 0,3-0,8 horas). Los resultados obtenidos por la aplicación de este método se resumen en la Tabla II.a.

TABLA II.a

Purificación de la L-glicol deshidrogenasa (NAD⁺) de *Enterobacter aerogenes* por el método A.
Material de partida: 16 g. de células de la cepa ATCC 15038

Etapas	Proteína total (mg)	Act. total (Unidades)	Act. específica (Unidades/mg de proteína)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
(1)	696	768	1,1	—	—
(2)	19,9*	414,4	20,8	18,9	53,9
(3)	10,3	324,7	31,5	28,6	42,3

- (1) Extracción
(2) Cromatoenfoco
(3) Cromatografía de intercambio iónico en DE-52
* Leída por extinción a 280 nm.

TABLA II.b

Purificación de la L-glicol deshidrogenasa (NAD⁺) de *Enterobacter aerogenes* por el método B.
Material de partida: 10 g. de células de la cepa ATCC 15038

Etapas	Proteína total (mg)	Act. total (Unidades)	Act. específica (Unidades/mg de proteína)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
(1)	468	432	0,9	—	—
(2)	21,6	378,2	17,5	19,4	87,5
(3)	6,3	213	33,9	37,7	49,3

- (1) Extracción
(2) Cromatografía de intercambio iónico en DE-52
(3) Cromatografía de adsorción en hidroxiapatita.

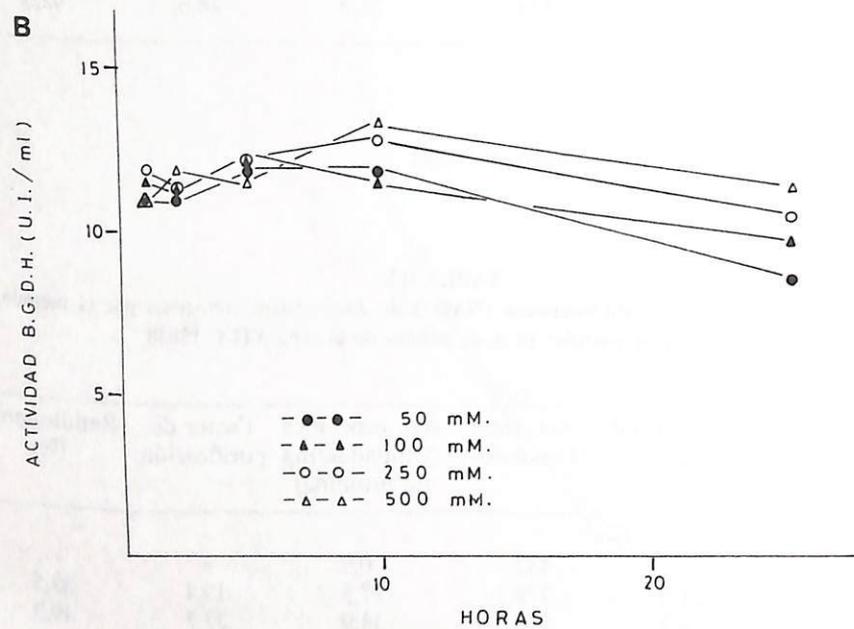
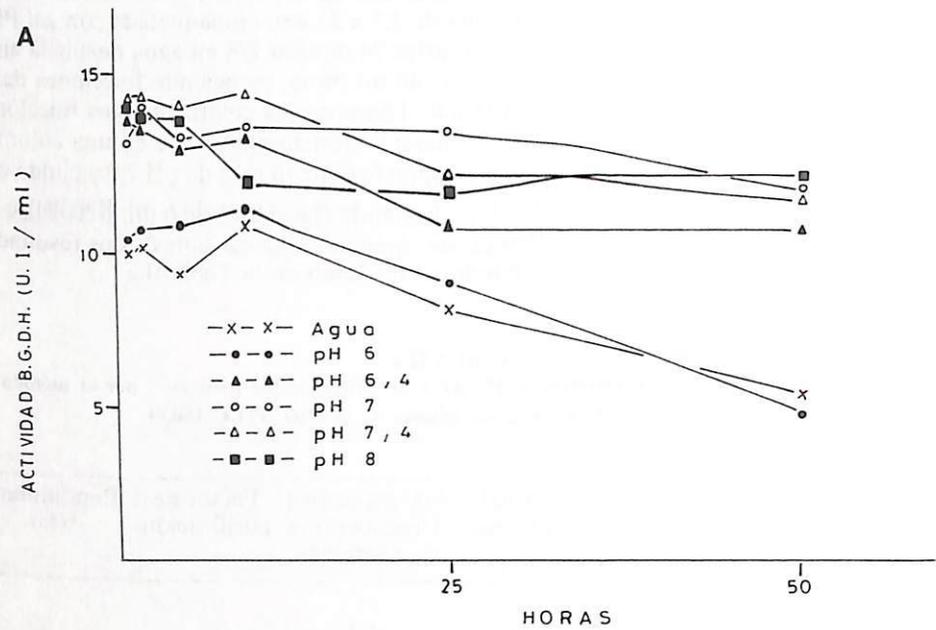


Fig. 3.- Estabilidad de la L-glicol deshidrogenasa (NAD⁺) de *Enterobacter aerogenes*. a) influencia del pH: medio de dilución, tampón fosfato bisódico-monopotásico 50 mM de los pHs expresados en la gráfica. b) efecto de la molaridad del tampón: medio de dilución, tampón fosfato bisódico-monopotásico de pH 7 a las molaridades que se indican.

Método B

Obtégase un extracto de 10 gr. de células en cinco volúmenes de tampón fosfato 10 mM de pH 7.0. Cromatografiase en una columna de DE-52 de 2,5 x 41 cm., equilibrada con el tampón de extracción. Elúyase con el mismo buffer a una velocidad de flujo de 190 ml./hora, tomando fracciones de 6,5 ml. Recójense los siete tubos centrales del pico de actividad (18-24, tiempo de retención 0,6-0,8 horas) y sométanse a cromatografía de adsorción en una columna de hidroxiapatita de 1 x 10 cm. equilibrada con el tampón fosfato 10 mM de pH 7.0. Elúyase con 40 ml. del tampón fosfato Na₂ - k 50 mM, pH 7 y a continuación con un gradiente lineal de tampón fosfato bisódico-monopotásico formado por 75 ml. de buffer 50 mM y 75 ml. de 300 mM. Velocidad de flujo 35 ml./hora; volumen de las fracciones, 3,3 ml. En los mejores tubos (43-47, tiempo de retención 5,5-6 horas) se recoge hacia el 50% de la actividad de los extractos originales con un factor de purificación de 37-38.

Electroforesis de las preparaciones purificadas

Las electroforesis en gel de acrilamida de las preparaciones obtenidas por los métodos A y B muestran la existencia de una banda principal de proteína y dos más, muy tenues, con menor movilidad electroforética (Fig. 4 a y b). El R_f para la banda principal se calculó en 0,211.

Al teñir los gels para actividad L-glicol deshidrogenasa se obtuvo una sola banda cuyo R_f coincide con el de la banda principal de proteína.

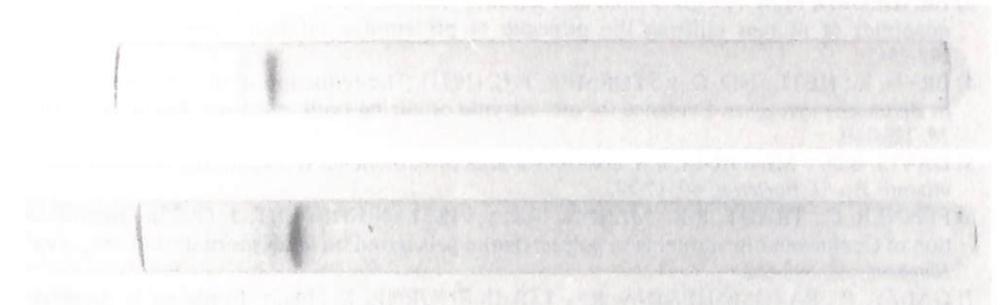


Fig. 4.- Electroforesis en gel de acrilamida. a) Preparaciones purificadas por el método A. b) Preparaciones purificadas por el método B.

DISCUSION

Los dos procedimientos de purificación de la L-glicol deshidrogenasa (NAD⁺) de *Enterobacter aerogenes* ATCC 15038 que se proponen en este trabajo dan rendimientos muy similares. Con el método B se obtienen resultados algo más satisfactorios en cuanto a rendimiento y factor de purificación, pero, como contrapartida, resulta ligeramente más largo.

Sus ventajas respecto al sistema propuesto por Bryn y colaboradores⁴ son claras:

a) Son métodos mucho más rápidos, que pueden desarrollarse en una sola jornada de trabajo frente a unas dos semanas que requiere la aplicación del procedimiento de Bryn.

b) Mejoran sensiblemente el rendimiento, de 2,1 a 2,5 veces más alto que el obtenido por el método anterior.

c) Prescinden del uso de técnicas de precipitación y de diálisis, que suelen ser muy lesivas para este tipo de enzimas.

d) Parten de una cepa bien tipificada y fácilmente asequible.

Aunque las preparaciones obtenidas no son electroforéticamente homogéneas, como las que rinde el método de los referidos autores, su grado de pureza es muy elevado y no contienen otras enzimas susceptibles de interferir en los ensayos de actividad L-glicol deshidrogenasa, por lo que son perfectamente válidas para la mayor parte de los fines.

Galzy y sus colaboradores ^{7, 13} han descrito también un procedimiento para la purificación de la enzima que reduce el diacetilo y la acetoína en *Saccharomyces uvarum*, al parecer la misma que se estudia aquí. La actividad específica de las preparaciones obtenidas por los autores citados es unas diez veces más baja que las que resultan de la aplicación de nuestros métodos, si bien el significado de este dato es dudoso por tratarse de óxido-reductasas de procedencia muy distinta.

BIBLIOGRAFIA

- 1) AYERS, A.R. y ERIKSSON, K.E. (1982). En *Methods in Enzymology* (Ed. por Colowick, S.P. y Kaplan, N.O.) Vol. 89, pgs. 129-135. Academic Press, London.
- 2) BERNARDO, A.; MARTIN SARMIENTO, R.; CARBALLO, J. y GONZALEZ PRIETO, J. (1988). Caracterización de la Diacetilo (acetoína) reductasa de *Aerobacter aerogenes* como una L-glicol deshidrogenasa (NAD⁺). *III Congreso Luso-Español de Bioquímica*. Comunicación 5.74. Santiago de Compostela.
- 3) BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bindign. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- 4) BRYN, K.; HETLAND, O. y STORMER, F.C. (1971). The reduction of diacetyl and acetoin in *Aerobacter aerogenes*. Evidence for one enzyme catalizing both reactions. *Eur. J. Biochem.*, **18**, 116-119.
- 5) DAVIS, B.D. y MINGIOLI, E.S. (1950). Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B₁₂. *J. Bacteriol.*, **60**, 17-28.
- 6) FENNER, C.; TRAUT, R.R.; MASON, D.T. y VIKMAN-COFFELT, J. (1975). Quantification of Coomassie Blue proteins in polyacrylamid gels based on analyses of eluted dye. *Anal. Biochem.*, **63**, 595-602.
- 7) GALZY, P.; RATOMAHENINA, R. y LOUIS-EUGENE, S. (1983). Etude de la diacétyle réductase et de l'acétoine réductase chez une souche de *Saccharomyces uvarum*. *EBC Congress*, pgs. 505-510.
- 8) HETLAND, O.; OLSEN, B.R.; CHRISTENSEN, T.B. y STORMER, F.C. (1971). Diacetyl (acetoin) reductase from *Aerobacter aerogenes*. Structural properties. *Eur. J. Biochem.*, **20**, 200-205.
- 9) JOHANSEN, L.; LARSEN, S.H. y STORMER, F.C. (1973). Diacetyl (acetoin) reductase from *Aerobacter aerogenes*. Kinetic studies of the reduction of diacetyl to acetoin. *Eur. J. Biochem.*, **34**, 97-99.
- 10) KOGUT, M. y PODOSKI, E.P. (1953). Oxidative pathways in a fluorescent *Pseudomonas*. *Biochem. J.*, **55**, 800-811.
- 11) LARSEN, S.H.; JOHANSEN, L.; STORMER, F.C. y STORESUND, H.J. (1973). Formation of 2,3 pentanediol from 2,3 pentanedione and acetyethylcarbinol by diacetyl (acetoin) reductase from *Aerobacter aerogenes*. A possible new pathway. *FEBS LETTERS*, **31**, 39-41.
- 12) LARSEN, S.H. y STORMER, F.C. (1973). Diacetyl (acetoin) reductase from *Aerobacter aerogenes*. Kinetic mechanism and regulation by acetate of the reversible reduction of acetoin to 2,3 butanediol. *Eur. J. Biochem.*, **34**, 100-106.

- 13) LOUIS-EUGENE, S.; RATOMAHENINA, R. y GALZY, P. (1984). Reduction enzymatique du diacétyle et de l'acétoine par une souche de *Saccharomyces uvarum*. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* Bd., **24**, 151-159.
- 14) LOWRY, O.H.; ROSEMBROUGH, N.J.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 15) PROVECHO, F.; BURGOS, J. y MARTIN SARMIENTO, R. (1984). Further purification and characterization of diacetyl reducing enzymes from beef liver. *Int. J. Biochem.*, **16**, 423-427.