

Instituto «G. Marañón» del C.S.I.C. — Madrid (España)
Director: Prof. Dr. J. L. R.-Candela

Glutamato deshidrogenasa de levadura: Propiedades

por

C. López-Quijada

(Recibido para publicar el 19 de julio de 1963)

La presencia de la deshidrogenasa glutámica en levadura es conocida desde hace algún tiempo, así como el hecho de que el enzima procedente de estas fuentes, en contraste con el enzima de hígado (1), reacciona con NADP y, sólo en forma muy limitada o nula, con NAD (2). Sin embargo, no se conocen estudios de purificación de este enzima.

En este trabajo se presenta un método de purificación de la deshidrogenasa glutámica de levadura. El procedimiento es muy sencillo y proporciona excelentes porcentajes de recuperación. También se determinan algunas de sus propiedades y en especial la significación de la escasa proporción de grupos-SH y su acusada sensibilidad para el paracloromercuribenzoato (PCMB).

Material y métodos

Se ha usado levadura fresca y prensada de panaderos tipo Fleischmann y Danubio.

El NADPH₂, NADP, NADH₂, NAD y PCMB, son reactivos obtenidos de «Sigma Chem.» El resto del material lo componen productos comerciales.

Las proteínas fueron medidas por el método de Biuret y contrastadas con el de LOWRY *et al.* (3) y RODWELL *et al.* (4). Las

incubaciones se han efectuado a 37° C y los ensayos a 30° C en Espectrofotómetro Beckman con células de 3 cm³ y medidas a 340 m μ en la proporcionalidad de 3 min. Sus lecturas sirvieron para el cálculo de la actividad (5). Las centrifugaciones, de no hacerlo constar expresamente, se hicieron en centrífuga Internacional a 20.000 por g durante 12 minutos.

Ensayo. Para el ensayo rutinario de la actividad de la deshidrogenasa glutámica se mezclan los siguientes componentes en un volumen final de 3 cm³: 130 μ m de Buffer de fosfato potásico pH 7,6, 90 μ m de α -cetoglutarato, 300 μ m de ClNH₄, 0,3 μ m de NADPH₂ y el enzima. Cuando se mide la reducción del NADP o cuando se emplea NAD y NADH₂, las condiciones son especificadas.

Definición de unidad de enzima y actividad específica. La unidad es definida como cantidad de enzima que produce un cambio de absorción de 0,001 por min. en las condiciones standardizadas del ensayo. La actividad específica es el número de unidades por miligramo de proteína.

Resultados

Extracción. La ruptura de las células de levadura se llevó a cabo por plasmolisis y desintegración sónica. Con la ayuda del desintegrador MSE pueden obtenerse preparaciones muy activas por el siguiente procedimiento: Una pasta de levadura y agua (20 gr y 20 cc respectivamente) se rompe en frío en el MSE, parando la sonicación cada 2 min. durante uno, para evitar sobrecalentamientos. Se retiran muestras a determinados tiempos y se centrifugan. En el sobrenadante se determina la actividad. No hay actividad al tiempo cero, a los 10 min. se encuentran 3500 unidades por cc y 8 mg de proteínas y a los 20 minutos 12.000 unidades con 32 mg de proteínas. Poco aumento de actividad puede encontrarse pasado este tiempo. Considerando que la cantidad de enzima que puede ser preparada por sonicación es muy limitada, intentamos la solubilización por plasmolisis.

Las condiciones óptimas de la plasmolisis fueron determinadas como a continuación se expresa: 1 libra de levadura se mezcla con 60 cc de tolueno al mismo tiempo que se calienta la mezcla a 37° C en un baño de agua; antes de 40 min. la levadura licua. Se mantiene a 37° C y se toman a determinados tiempos alícuotas apropiadas para el estudio de la actividad.

Como puede verse en la tabla número 1 al aumentar el tiempo

de plasmolisis aumenta también la actividad hasta un límite de 24 horas, a partir del cual el procedimiento es nocivo para la integridad de la proteína enzimática. Muestras de 24 horas de incubación por este sistema son retiradas para la purificación del enzima.

TABLA I

EFEECTO DE LA PLASMOLISIS Y TIEMPO DE SOLUBILIZACION EN LA DESHIDROGENASA GLUTAMICA DE LEVADURA

	Plasmolisis y tiempo de incubación en horas							
	2	4	6	8	16	24	48	72
Unidades	85	145	180	300	252	250	25	4
Actividad específica	41	50	51	52	42	30	18	10
mgr. Prot./c.c.	207	290	354	574	600	800	139	40

Se retira en los tiempos indicados con una alícuota de 5 c.c. y se diluye en igual volumen de agua para ser centrifugada durante 10 minutos a 20.000 x g. En el fluido sobrenadante se determina la actividad y proteínas.

Purificación. La mezcla obtenida del plasmolizado de tolueno se disuelve en agua y cuando está bien homogeneizada, se centrifuga. El sobrenadante (extracto crudo) es tratado en la proporción de 10:1 con ácido acético 1 M, agregándolo muy lentamente en frío y con agitación continua. Se mantiene la mezcla durante 3 ó 4 horas a 0° C y se centrifuga de nuevo. El sobrenadante obtenido (*fracción I*) se neutraliza con apropiada cantidad de CO₂HK 1M. Esta fracción es muy estable.

Se agrega el 5 % de SO₄Na₂ a la fracción I calentando la mezcla a 70° C durante 5 min. y, después de enfriada, se centrifuga. El fluido sobrenadante representa la *fracción II*. A esta fracción se añade el 35 % de SO₄(NH₄)₂ sólido, se somete la mezcla a 37° C para facilitar la solubilidad de la sal y se centrifuga durante 25 min. a 27.000 x g.

El sobrenadante obtenido se desprecia y el precipitado se disuelve en el mínimo volumen posible de Buffer de acetato 0,05 M y pH 5,6. Se calienta la solución obtenida a 70° C durante 5 min. y después de dejarla enfriar se diluye la mezcla con agua en la proporción de 1:5 para ser centrifugada; descartado el precipitado, el sobrenadante es la *fracción III*. (Tabla número 2.) La precipitación con sulfato de amonio se repite una vez más en las mismas condiciones y proporciones para obtener la *fracción IV*. Esta última fracción se ajusta a una concentración de proteínas de 20 mg por cc. Por cada centímetro cúbico de esta solución se añaden 150 mg de SO₄(NH₄)₂ sólido, se ca-

lienta la mezcla a 37° C durante 5 min. y, después de enfriada, se centrifuga a 27.000 × g. El sobrenadante es la *fracción V*.

Para la obtención de una más completa purificación se ha usado la técnica de gradientes con soluciones de sacarosa a diversas molaridades : 1,75 M, 1,25 M, 0,75 y 0,25 M.

TABLA II
PURIFICACION DE LA DESHIDROGENASA GLUTAMICA DE LEVADURA *

Fracción	Volumen c.c.	Unidades totales	Proteínas totales mgr.	Actividad específica	Recuperación
E. crudo	570	13.680,000	17,100	800	100
I	660	11.880,000	11,880	1.000	86
II	530	9.540,000	7,950	1.200	70
III	46	7.800,000	478	15.000	52
IV	14	7.000,000	126	50.000	52
V	8	6.400,000	62	103.000	50
VI	1	4.000,000	12	333.000	29

* Para una libra de levadura.

Se coloca en tubos de ultracentrifuga, por orden de molaridad decreciente, 1 ml de cada una de estas soluciones de sucrosa, seguida de 1 ml de la fracción V previamente dializada. Las centrifugaciones se efectuaron durante 2 horas en el modelo Spinco SW 39 a 100.000 × g «Cabeza oscilante». Después de centrifugado el material, los niveles se retiran con sumo cuidado por medio de una jeringuilla y se añade el 35 % de SO₄(NH₄)₂ sólido al nivel en que se encuentra la fracción más abundante del enzima (0,75 M). La mezcla se centrifuga durante 30 min. y el precipitado obtenido se disuelve en 1 cc de agua (*Fracción VI*).

Esta fracción es muy estable, puede mantenerse a 2-4° C durante semanas y permite la congelación durante meses, pero no puede ser liofilizada. El procedimiento es perfectamente reproducible, y puede llevarse a efecto con cantidades de levadura de 200 a 1.000 gr, con variantes no superiores al 10 % en recuperación y actividades específicas. Sin embargo, los resultados obtenidos son muy pobres cuando las muestras de levadura fueron mantenidas en congelación antes de la plasmolisis.

Presencia del enzima en otras preparaciones de levadura. Se ha ensayado levadura desecada Anheuser-Busch, variedad CBS. Hay mucha menos cantidad de enzima por gramo que en la levadura fresca de Fleischman. Por otra parte las propiedades del enzima son similares.

Propiedades del enzima

Estabilidad a pH y temperatura. Una muestra parcialmente purificada (Fracción III) del enzima mantenida durante 10 minutos a 0° C y a valores de pH 1,8, 2,5, 3,0, 3,5 y 4,0 retiene 5, 40, 70, 80, 100 % respectivamente de la actividad original. El efecto de la temperatura en la estabilidad del enzima queda ilustrado en la figura n.º 1.

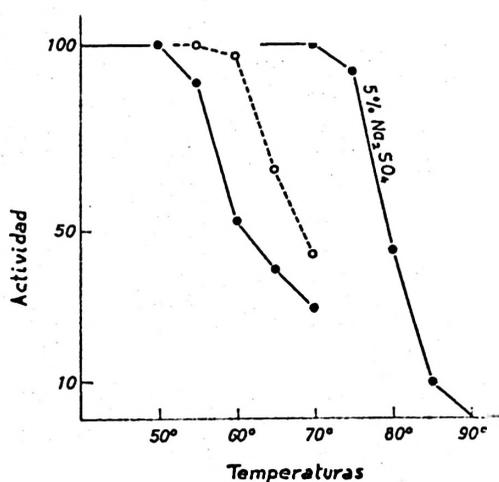


FIG 1 Efecto del Sulfato de Sodio en la estabilidad térmica del Enzima. Muestras de 29 mg de proteína en 1 cc. (fracción I.) se mantienen a las temperaturas indicadas durante 5 min, se enfrían, y se determina la actividad. Los resultados son indicados por ○ -- Enzima procedente de levadura de cerveza ; ● — Enzima de levadura de panadero sola y con la asociación del 5 % de SO₄Na₂.

Efecto del pH. Una muestra de enzima purificado muestra un pH óptimo de 7,6 cuando se mide la oxidación de NADPH₂ y de 8 en la reducción de NADP. (Figura n.º 2.)

Especificidad de coenzimas y velocidades relativas. Cuando el NADPH₂ se reemplazó por NADH₂ en el sistema standard de ensayo la reacción de actividad fue de 140 para NADPH₂/NADH₂. La oxidación de NADPH₂ es 14 veces más rápida que la reducción para NADP. La actividad con NAD es despreciable.

Especificidad de substrato. Habiendo sido recientemente demostrado que la deshidrogenasa glutámica de hígado cataliza también reacciones de otros aminoácidos (6, 7), hemos estudiado la aminación reductiva del piruvato y deaminación de alanina:

No existe actividad enzimática apreciable con NADH_2 o NAD para las dos reacciones a pH 7,6. Con NADPH_2 a pH 7,6, 8,0 y 8,6 se midieron 70, 800, y 4.000 unidades con piruvato y amoníaco. En las mismas condiciones del ensayo con α -cetoglutarato, son 50.000 unidades a pH 7,6.

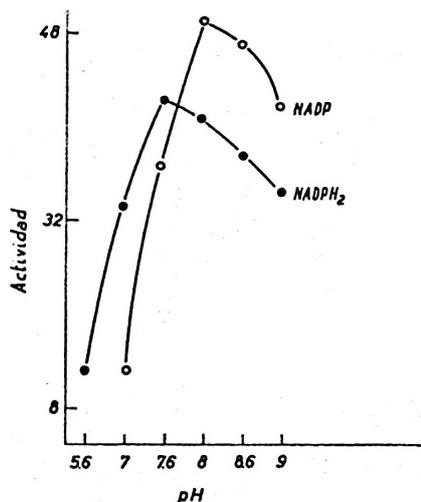


FIG. 2. EFECTO DEL pH . Para el ensayo de la oxidación del NADPH_2 se han usado las condiciones standard, para la reducción del NADP los componentes del ensayo fueron sustituidos por $50 \mu\text{m}$ de L -glutamato y $2 \mu\text{m}$ NADP . Los buffers usados son: Acetato potásico para pH 5,6; fosfato potásico para pH 7, 7,6 y 8; y Tris-Cl^- para pH 8,4, 8,6 y 9. Hay una ligera inhibición (25%) en la velocidad enzimática con Tris-Cl^- . Los valores arriba referidos han sido corregidos en relación a la aludida inhibición. La actividad se expresa en unidades totales existentes en 1 cc. $\times 1000$.

Influencia de la concentración del substrato en la actividad del enzima. Se ha estudiado el efecto de la concentración de todos los substratos en la reacción de la deshidrogenasa glutámica de levadura. El método de LINEWEAVER y BURK (8) muestra las constantes de Michaelis-Menten (K_m) de 4×10^{-5} M, $8,5 \times 10^{-5}$ M, 0,12 M, 1×10^{-2} M y 7×10^{-4} M para α -cetoglutarico, NADPH_2 , amoníaco, glutamato y NADP , respectivamente.

Estabilidad del enzima en presencia de cofactores. Conocido el hecho de la menor estabilidad de la deshidrogenasa glutámica de hígado en presencia de NADPH_2 (9), hemos estudiado el efecto de cofactores en este enzima de levadura. Como puede

verse en la tabla n.º 3, el enzima de levadura es también menos estable en presencia de NADPH_2 . La estabilidad es proporcional a la concentración de proteína enzimática y es necesario aumentar la temperatura de incubación hasta 68° para conseguir inactivaciones apreciables.

TABLA III

EFEECTO DEL NADPH_2 EN LA ESTABILIDAD DE LA DESHIDROGENASA GLUTAMICA DE LEVADURA A DIFERENTES CONCENTRACIONES

Reactivos presentes durante la incubación	% de actividad permanente a	
	0 min.	15 min.
Enzima 0,04 mgr prot.	100	100
" + 3×10^{-4} NADPH_2	100	54
Enzima 0,25 mgr prot.	100	100
" + 3×10^{-4} NADPH_2	100	64
Enzima 0,5 mgr prot.	100	100
" + 3×10^{-4} NADPH_2	100	100

Cada tubo contiene en 1 c.c. 150 μm de un Buffer de fosfato sódico, pH 7,4 y las adiciones indicadas. Incubación 68°C .

Titulación de grupos SH. Para la determinación de grupos SH por métodos argentométricos se han estudiado muestras (fracción VI) de grupos controles e inactivados con NADPH_2 (10). En contraste con los resultados obtenidos con la misma técnica para la deshidrogenasa glutámica de hígado (11), no ha sido posible la determinación de grupos tioles en este enzima de levadura.

Estabilidad del enzima en presencia de PCMB. Como puede verse en la tabla n.º 4 la deshidrogenasa glutámica de levadura muestra una marcada sensibilidad para el PCMB obteniéndose el 50 % de inactivación con una concentración de 1×10^{-7} M. Para producir el mismo grado de inhibición en el enzima de hígado son suficientes concentraciones de 1×10^{-4} M. de PCMB (12). No fue posible la reactivación de estas muestras con Cisteína.

Contenido del enzima en aminoácidos. El estudio (métodos cromatográficos) de una muestra de la máxima pureza del enzima (Fracción VI) confirmó el contenido de los siguientes aminoácidos, con un peso molecular mínimo de 33.000: Lisina, Histidina, Arginina, A. Aspártico, Treonina, Serina, A. Glu-

TABLA IV

EFECTO DEL PCMB EN LA ESTABILIDAD DE LA DESHIDROGENASA GLUTAMICA DE LEVADURA.

Reactivos presentes durante la incubación	% de actividad permanente a los 10 minutos	
		+Cisteína 3 $\mu\text{m}/\text{c.c.}$
Enzima PCMB	100	80
+ 1×10^{-7} M.	57	40
+ 1×10^{-6} M.	20	14
+ 1×10^{-5} M.	0	0

Cada tubo contiene en 1 c.c. 150 μm de un Buffer de fosfato sódico, pH 7,4 y las adiciones indicadas. Incubación a 30° C.

Ensayo: 130 μm . Buffer de fosfato potásico. pH 7,6.

50 μm . L-glutamato y 0,002 mg. de proteína (enzima) en un volumen final de 3 c.c.

Se inicia la reacción añadiendo 2 μm . de NADP.

támico, Prolina, Glicina, Alanina, Valina, Isoleucina, Tirosina, Leucina con la característica ausencia de aminoácidos del grupo Cisteína.

Estos resultados confirman la escasa o nula presencia de grupos-SH en el enzima deshidrogenasa glutámica de levadura.

Discusión

El procedimiento descrito permite, con poco esfuerzo, la preparación de una deshidrogenasa glutámica de levadura de gran actividad específica, siendo mucho más sencillo y económico que los usados para la preparación del enzima procedente de hígado. Además su gran estabilidad, el rápido «turnover» y su alta especificidad para el NADPH₂, y NADP debe proporcionar un magnífico elemento de trabajo en estudios de regeneración de NADP o NADPH₂ en reacciones de su acoplamiento.

La deshidrogenasa glutámica de hígado ha sido y es ampliamente estudiada. La fácil y económica obtención del enzima de levadura debe permitir estudios comparativos del mayor interés. La especificidad en relación a coenzimas y el hecho de que el enzima parece no ser asociado o disociado (13) en relación a sus cambios de concentración en contraste con el enzima de hígado (14), al mismo tiempo que las constantes cinéticas son similares, indican que el conocimiento adicional de propiedades

cinéticas y moleculares del enzima de levadura puede ser de gran interés.

La ausencia de aminoácidos del grupo «Cisteína» en la composición del enzima, unido a la gran sensibilidad para el PCMB y a la imposibilidad de determinación de grupos tioles, confirman la posibilidad de la escasa o nula presencia de grupos-SH en la molécula de esta deshidrogenasa glutámica de levadura.

Resumen

Se presenta un método de purificación de una deshidrogenasa glutámica de levadura. El método es muy reproducible y se logra con excelente porcentaje de recuperación y gran actividad específica.

El enzima cataliza a pH 7,6 la oxidación de NADPH₂ 14 veces más rápidamente que la reducción de NADP. La actividad con NAD y NADH₂ es prácticamente despreciable. El enzima es muy estable particularmente en presencia de la sal, y es mucho más estable en presencia de NADPH₂ que la deshidrogenasa glutámica de hígado.

Se presenta también la consideración de la posibilidad de la ausencia de grupos-SH en la estructura molecular del enzima.

Summary

Properties of yeast glutamate dehydrogenase

A method for the purification of glutamic deshydrogenase from yeast is presented. The method is very reproducible and results in excellent yields of preparations of high specific activity which are homogeneous in the ultracentrifuge.

The enzyme catalyzes at pH 7.6 the oxidation of NADPH₂, 14 times faster than the reduction of NADP. It has negligible activity with NADH₂ and NAD.

The enzyme is very stable particularly in the presence of salt. However, it is more stable in the presence of NADPH₂ as with the glutamic deshydrogenase from liver.

Bibliografía

- (1) ADLER, E. GÜNTHER, G. y LIVERET, J. E.: *Z. Physiol. Chem.*, 255, 27, 1938.
- (2) ADLER, E., HELLSTRON, H., GÜNTHER, G. y EULER, H. V.: *Z. Physiol. Chem.*, 255, 14, 1938.
- (3) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.

- (4) RODWEL, V. W., TOWNE, J. C. y GRISOLIA, S. : *J. Biol. Chem.*, 228, 875, 1957.
- (5) CAUGHEY, W. S., SMILEY, J. D. y HELLERMAN, L. : *J. Biol. Chem.*, 224, 591, 1957.
- (6) STRUCK, J. JR. y SIZER, I. W. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 86 : 260, 1960.
- (7) FISSHER, H. F. y MCGREGOR, L. L. : *J. Biol. Chem.*, 236, 791, 1961.
- (8) LINEWEAVER, H. y BURK, J. : *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 568, 1934.
- (9) GRISOLIA, S., GRADY, H., FERNÁNDEZ, M. y TUCKER, D. : *Med. Exper.* 4, 329, 1961.
- (10) BENESCH, R. E., LARDY, H. A. y BENESCH, R. : *J. Biol. Chem.*, 216, 663, 1955.
- (11) GRISOLIA, S., FERNÁNDEZ, M., AMELUNXEN, R. y QUIJADA, C. L. : *Biochem. J.*, vol. n.º 3, december, 1962.
- (12) STRECKER, H. J. : *In Methods in Enzymology.*, vol. 2, p. 220. Ed. by Colowick S. P. y KAPLAN N. O. New York. Academic Press Inc. 1955.
- (13) Trabajos no publicados.
- (14) JIELDING, K. L. y TOMKINS, G. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 47, 1983, 1960.