

Separación cromatográfica de lacticodeshidrogenasa y xantindeshidrogenasa hepáticas de pollo

S. Gubert y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona

(Recibido el 10 de mayo de 1972)

S. GUBERT and J. BOZAL. *Chromatographic Separation of Lacticdehydrogenase and Xanthinedehydrogenase*. R. esp. Fisiol., 28, 213-224. 1972.

The purified preparations obtained on treating chicken liver homogenates by a process of thermic denaturation at 75° C and subsequent precipitation with ammonium sulphate (40-60 % saturation) contains jointly LDH and XDH at a degree of purification relative to the original homogenate of 15.5 and 24 times respectively.

The separation of both enzymes from the above purified preparations is achieved by a chromatographic adsorption with DEAE-cellulose. We obtain a XDH concentrated 65.5 times and an extract of LDH, the specific activity of which is 51 times greater than that of the supernatant proceeding from the original homogenate.

The chromatographic preparations of XDH and LDH show electrophoretically a number of bands much inferior to that of the original homogenates (7 proteic bands); in the XDH the number of bands is two while for the preparation of LDH there can be detected three proteic bands, the most intense corresponding to the LDH, according to observation on developing the pherograms with the specificic dehydrogenase developer.

The real K_m of the chicken liver XDH as determined in our preparation are: $K_m(\text{xanthine}) = 1.30 \times 10^{-5} \text{ M}$ (saturating concentration NAD) and $K_m(\text{NAD}) = 2.85 \times 10^{-5} \text{ M}$ (saturating concentration xanthine). The real constants for the pyruvate-LDH-NADH system are: $K_m(\text{pyruvate}) = 4.87 \times 10^{-5} \text{ M}$ (saturating concentration NADH) and $K_m(\text{NADH}) = 1.09 \times 10^{-5} \text{ M}$ (saturating concentration pyruvate). The stated values are in accordance with those determined for XDH and LDH on utilizing homogenates of chicken liver gland.

La relación existente entre el funcionamiento de la xantindeshidrogenasa y la lacticodeshidrogenasa hepáticas de pollo puede ponerse de manifiesto si se considera que la actuación de ambas deshidrogenasas puede acoplarse *in vitro* a través de sus transportadores electrónicos (6). El poder disponer de los enzimas de proceden-

cia hepática mencionados anteriormente, en gran estado de pureza, nos ha inducido al estudio de su separación.

La determinación del mecanismo de acción de ambos enzimas puros, libres de otros sistemas enzimáticos que pueden condicionar su actividad, presenta gran interés al objeto de comparar los resulta-

dos obtenidos por otros autores (6, 8) utilizando homogeneizados crudos y preparados enzimáticos parcialmente purificados que contienen ambas enzimas.

En la bibliografía se encuentran numerosos estudios de purificación de ambas enzimas, pero no se dispone de un método de separación y purificación de lacticodeshidrogenasa y xantindeshidrogenasa procedentes del mismo órgano. Únicamente LANDON y CARTER (11), al purificar la xantindeshidrogenasa de riñón de ave, describen un método adecuado para la eliminación de la lacticodeshidrogenasa pero no intentan su recuperación.

La purificación de lacticodeshidrogenasa de músculo de buey y de corazón de pollo ha sido lograda, entre otros por PESCE *et al.* (13) y BAILEY y WILSON (2), trabajando con músculo e hígado de trucha.

La obtención de purificados de xantindeshidrogenasa ha sido descrita por diversos autores: CORRAN (5), a partir de hígados de suido; RICHERT (16), operando con hígado de cerdo y de rata; KIELLEY (10), utilizando hígado de ternera y de rata; CARRASCO (4), con homogeneizados de glándula hepática humana y de cerdo, y AVIS *et al.* (1), en el caso de la xantina oxidasa de la leche.

REMY *et al.* (15), empleando técnicas que incluyen la desnaturalización térmica, el tratamiento con enzimas proteolíticas, la acción del pH y la precipitación selectiva con sulfato amónico, lograron purificar la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo cerca de 400 veces; sin embargo, nosotros hemos observado que dichos purificados contienen una gran proporción de lacticodeshidrogenasa acompañante.

En nuestro trabajo obtenemos, a partir de hígado de pollo, preparados que contienen ambas enzimas en alto grado de pureza, para lo cual hemos adoptado un método análogo al utilizado por REMY (*loc. cit.*), pero evitando los tratamientos desnaturalizantes prolongados. Ha

constituido objeto principal de nuestro trabajo la aportación de un método que permite obtener, por separado, las enzimas lacticodeshidrogenasa y xantindeshidrogenasa presentes en los purificados hepáticos de pollo. La técnica seguida se basa en la adsorción cromatográfica sobre resinas de DEAE-celulosa del producto parcialmente purificado y elución controlada de ambas enzimas mediante tampón fosfatos (pH = 7,4) de concentración creciente.

Finalmente, hemos determinado para los sistemas xantina-xantindeshidrogenasa-NAD y piruvato-lacticodeshidrogenasa-NADH, las constantes cinéticas de Michaelis-Menten reales para cada sustrato operando a concentración saturante del sustrato que se mantiene constante. Los valores hallados nos han permitido establecer una relación con las constantes establecidas para dichas enzimas cuando actúan en homogeneizados o en preparados parcialmente purificados que contienen ambos sistemas enzimáticos.

Material y métodos

Los enzimas objeto de purificación proceden de hígados de pollo, con los cuales se obtuvieron los homogeneizados de la glándula.

En las determinaciones de actividad se han empleado como sustratos xantina (Merck) y piruvato sódico (Schuchardt) y como aceptores electrónicos NAD y NADH (Boehringer).

Las separaciones cromatográficas se efectuaron mediante DEAE-celulosa (Whatman DE 23). Las electroforesis se realizaron sobre tiras de poliacetato de celulosa «Celogel» (Chemetron).

Concentraciones proteicas. El establecimiento de las concentraciones de proteína de los eluidos cromatográficos, se determinó midiendo la extinción de las disoluciones a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU y multiplicando el valor

de la densidad óptica por un factor característico de cada proteína. En el caso de la xantindeshidrogenasa el factor de conversión es igual a 0,44 mg/ml D.O. (3) y para la lacticodeshidrogenasa 0,79 mg/ml D.O. (9).

Actividad xantindeshidrogenasa. Las determinaciones de la actividad xantindeshidrogenasa se llevaron a cabo por medición espectrofotométrica, a $pH = 7,4$ (tampón fosfatos 0,05 M) de las velocidades iniciales de reacción, calculando a 340 nm el incremento de densidad óptica debido a la reducción del NAD. En los ensayos rutinarios efectuados a $25^{\circ}C$ la concentración de xantina fue de $1 \times 10^{-4} M$ y la del aceptor electrónico NAD de $1 \times 10^{-3} M$, concentraciones escogidas por no provocar inhibición por sustrato.

La concentración de enzima que se ha utilizado permite obtener una variación rectilínea de densidad óptica durante tres minutos de la reacción como mínimo.

Actividad lacticodeshidrogenasa. Las velocidades iniciales de reacción para el sistema piruvato-lacticodeshidrogenasa-NADH se determinaron espectrofotométricamente (Beckman DU) midiendo a 340 nm el descenso de la densidad óptica debida a la transformación del NADH. Exceptuando los ensayos en que se estudió la variación de la actividad enzimática en función de la concentración de los sustratos, las concentraciones de piruvato y de NADH en la cubeta espectrofotométrica fueron de $1,8 \times 10^{-4} M$ y $4 \times 10^{-5} M$, respectivamente. Las experiencias se efectuaron a $25^{\circ}C$ en un medio tamponado de $pH = 7,4$ (fosfatos 0,05 M).

Revelado de los ferogramas. Las electroforesis se han practicado sobre tiras de celogel, depositando mediante una micropipeta de 5 a 10 μl que contienen unas 500 γ de proteína y se deja actuar la corriente durante cuatro horas a 140 voltios. Tanto para las electroforesis de lactico-

deshidrogenasa como de xantindeshidrogenasa se ha utilizado el revelador general de proteínas Ponceau-S, exponiendo las tiras al mismo durante cinco minutos. Seguidamente se decoloran en ácido acético al 5 %, se deshidratan durante treinta minutos en metanol puro y, finalmente, se transparentan en un baño formado por metanol-ácido acético-glicerina (87:12:1 en volumen) durante un minuto, seguido de calefacción entre $50-60^{\circ}C$ hasta lograr su total transparencia.

En el caso de la lacticodeshidrogenasa se ha utilizado el reactivo específico formado por 1 ml de lactato sódico 1 M, NAD (10 mg), 3 mg de sal de tetrazolio (MTT), 0,3 mg de metasulfato de fenazina y 4,3 ml de agua destilada.

La técnica a seguir para el revelado consiste en el vertido, mediante un diseminador volumétrico, de 50 μl del revelador en 3 ó 4 veces. Se introducen las tiras en una cámara húmeda a $37^{\circ}C$ y se deja incubar durante 20-30 minutos. Seguidamente, se fija la tira en un baño de formaldehído al 5 % (2-3 min), se transparentan en un baño de ácido acético-agua-glicerina (30:69:1) y se calientan a $70^{\circ}C$ durante 5 minutos hasta su total transparencia.

Resultados

Obtención de purificados de xantindeshidrogenasa y lacticodeshidrogenasa por tratamiento térmico y precipitación fraccionada con sulfato amónico. El homogeneizado de partida se prepara a partir de 500 gramos de hígados frescos, que se trituran en un homogeneizador adecuado con ayuda de 1/2 volumen de tampón fosfato 0,05 M de $pH 7,4$ a $4^{\circ}C$, a cuya temperatura se practicaron todas las operaciones subsiguientes, salvo indicación en contra. Se vierten sobre el homogeneizado a continuación, y con agitación constante, dos volúmenes del mismo tampón, que se ha calentado previamente a $75^{\circ}C$.

Una vez se ha alcanzado la temperatu-

ra de 56° C se mantiene el conjunto en un termostato, regulado a dicha temperatura, durante media hora, mientras se continúa la agitación mecánica vigorosa. Se transfiere el conjunto a continuación a un baño que contiene una mezcla frigorífica y se enfría rápidamente a 2° C. Por último se centrifuga a 5.000 r.p.m. durante 15 minutos a 0° C en una centrifuga refrigerada Beckman, MSE.

Se obtiene un sobrenadante transparente de color rojo que por adición lenta, y con agitación constante, de sulfato amónico sólido se lleva a un 60 % de saturación (39 g sal/100 ml extracto). Se mantiene el conjunto con suave agitación durante una hora a 0° C y se recoge el precipitado obtenido por centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 30 minutos. Se disuelve el precipitado en cinco volúmenes de agua y adicionándose sulfato amónico hasta alcanzar el 35 % de saturación (20,9 g sal/100 ml de extracto), el precipitado formado se separa por centrifugación y se desecha. Por nueva adición de sulfato amónico (16,4 g/100 ml) al sobrenadante se alcanza la saturación final del 60 %; se deja en reposo durante una hora a 0° C y se recoge el precipitado por centrifugación en las condiciones descritas.

Los datos correspondientes a las distintas fases del procedimiento de purificación de la lacticodeshidrogenasa y de la xantindeshidrogenasa se resumen en la tabla I.

De la observación de los datos experimentales se pone de manifiesto que el proceso de purificación adoptado conduce a un preparado final enriquecido en ambos enzimas; el grado de pureza obtenido ha sido de 24 veces para la xantindeshidrogenasa y de 15,5 veces en el caso de la lacticodeshidrogenasa.

Debe observarse que el rendimiento de la operación (37 % para la xantindeshidrogenasa y 24 % para la lacticodeshidrogenasa) puede considerarse bajo, posiblemente debido a la introducción del tratamiento térmico a 75° C. Con objeto de determinar la estabilidad de ambos enzi-

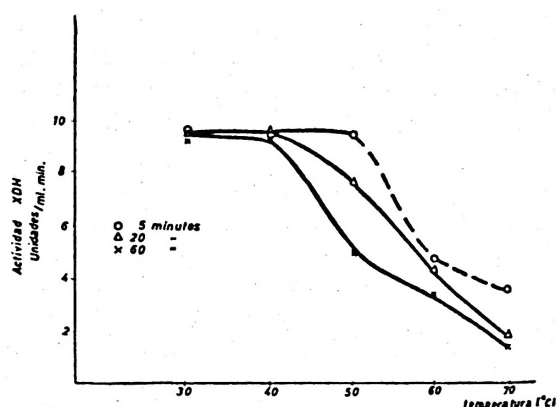


Fig. 1. Estabilidad térmica de la xantindeshidrogenasa hepática de pollo.

mas frente a la temperatura, se realizaron experiencias en las que se mantuvo el homogeneizado durante intervalos diversos a distintas temperaturas, determinándose seguidamente las actividades LDH y XDH (figura 1). La máxima estabilidad corresponde al intervalo de temperaturas entre los 30 y 40° C, independientemente del tiempo que el enzima haya estado sometido a dichas temperaturas. Asimismo, es importante subrayar que a partir de los 50° C se hace patente una disminución considerable de la actividad de la XDH. Estos hechos están de acuerdo con los descritos por PLUMMER y WILKINSON para la lacticodeshidrogenasa procedente de hígado y corazón humano (14).

Teniendo en cuenta estos resultados se intentaron diversas modificaciones en el método de purificación anteriormente descrito, con objeto de, sin disminuir de modo apreciable el grado de purificación, mejorar sensiblemente el rendimiento global del proceso.

En vista del efecto desfavorable que sobre la actividad XDH ejerce el tratamiento térmico a 75° C, procedimos a sustituirlo introduciendo el tratamiento de los homogeneizados con ácido acético 0,1 M, llevándolos hasta pH 5, que se ha revelado como muy eficaz para conseguir la eliminación de una buena proporción de proteína inactiva. El que con sólo este tra-

Tabla I. Purificación de xantindeshidrogenasa y de lacticodehidrogenasa de hígado de pollo.

Proceso	Peso o volumen	Xantindeshidrogenasa					Lacticodehidrogenasa				
		U/ml	Unidades totales	Conc. proteína mg/ml	Actividad específica U/mg prot.	rendimiento %	U/ml	Unidades totales	Conc. proteína mg/ml	Actividad específica U/mg prot.	rendimiento %
Homogeneizado de partida • Sobrenadante, tratamiento 56° C Primer fraccionamiento, 0,6 g (NH ₄) ₂ SO ₄ /ml Segundo fraccionamiento, 0,6 g (NH ₄) ₂ SO ₄ /ml	172 ml	1,45	249,4	248,16	0,0058	—	397,8	68.420	447,06	0,89	—
	200 ml	0,68	136,0	48,84	0,014	54,5	188,5	37.700	88,1	2,14	55,1
	20 g	6,05	121,0	110,0	0,055	48,5	1.320	26.400	198,0	6,67	38,5
	9,3 g	9,97	92,7	71,72	0,139	37,0	1.780	16.554	129,3	13,8	24,3

• Las actividades (U/ml) y la concentración proteica (mg/ml) están referidas a una parte alcuota del homogenado después de centrifugar a 5.000 r.p.m. durante 20 min.

tamiento no se consiguiese una mejora relevante en el grado de purificación, nos ha sugerido el complementarlo con un tratamiento térmico pero a temperatura inferior a la de 75° C previamente utilizada.

Los mejores resultados se han conseguido por aplicación de la técnica que a continuación se describe: A homogenados hepáticos obtenidos según se ha descrito previamente, se les adicionó ácido acético 0,1 M, con agitación constante hasta alcanzar el pH de 5. El precipitado proteico separado se elimina por centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 30 minutos. El sobrenadante se mezcla con dos volúmenes de tampón, previamente calentado a 56° C, y se mantiene el conjunto a esta temperatura durante 10 minutos, enfriándose a continuación rápidamente hasta alcanzar la temperatura de 4° C. Se centrifuga nuevamente a 5.000 r.p.m. durante 20 minutos y se desecha el precipitado. Finalmente, el sobrenadante se fracciona con sulfato amónico entre el 40 y 60 % de saturación (tabla II).

Los resultados obtenidos indican que la supresión del tratamiento térmico a 75° C conduce a una mejora sustancial del rendimiento de la operación, independientemente del método preparativo empleado, pero al mismo tiempo el grado de purificación alcanzado es, en todos los casos, sustancialmente inferior.

Tabla II. *Purificación de xantindeshidrogenasa hepática de pollo.*

Proceso	Grado de purificación	Rendimiento %
Tratamiento a pH 5 y fraccionamiento con (NH ₄) ₂ SO ₄ (40-60 %)	8,8	48
Tratamiento a 56° C y fraccionamiento con (NH ₄) ₂ SO ₄ (40-60 %)	6,1	50
Tratamiento a 56° C y pH 5. Fraccionamiento con (NH ₄) ₂ SO ₄ (40-60 %)	15	80

Separación cromatográfica de xantindeshidrogenasa y lacticodeshidrogenasa presentes en los preparados hepáticos de pollo, parcialmente purificados. La separación de ambas enzimas se ha logrado empleando la resina catiónica DEAE-celulosa, de acuerdo con la técnica que se describe a continuación:

Seis gramos del purificado de xantindeshidrogenasa hepática obtenido por tratamiento térmico a 75° C y subsiguiente fraccionamiento con sulfato amónico se disuelven en tampón fosfato 0,001 M de pH 7,4 y se dializa frente al citado tampón durante 24 horas. El dializado se centrifuga a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4° C y el sobrenadante se adsorbió en una columna de 50 × 2,5 centímetros que contenía la resina DEAE-celulosa previamente equilibrada con tampón de fosfatos 0,001 M de pH 7,4. Se comenzó la elución con 400 ml del mismo tampón, recogiendo fracciones de 5 ml mediante un colector Fractomat Y-3. La velocidad de elución fue de 0.5 ml/minuto. Las fracciones obtenidas contienen toda la actividad lacticodeshidrogenásica. Cuando se observó la ausencia de proteína en los eluidos, se prosiguió la elución con un gradiente de concentraciones salinas conseguido al mezclar gradualmente 400 ml del tampón fosfato 0,001 M de pH 7,4 con 200 ml de tampón fosfato 0,1 M del mismo pH, con lo cual se consigue recoger las fracciones que contenían la xantindeshidrogenasa.

Los resultados de la cromatografía aparecen en la figura 2; de su observación puede deducirse que con dicha técnica se logra la separación casi cuantitativa de la xantindeshidrogenasa y la lacticodeshidrogenasa. En efecto, las fracciones 9-16 corresponden a un máximo de proteína en donde se localiza la mayor parte de la actividad lacticodeshidrogenasa, libre de actividad xantindeshidrogenasa. Por otra parte, la mayor proporción de xantindeshidrogenasa se encuentra concentrada entre las fracciones 40-65, siendo práctica-

mente despreciable la actividad laticodeshidrogenasa acompañante.

Las fracciones que presentaban los valores máximos de actividad enzimática se reunieron y se precipitaron nuevamente con sulfato amónico hasta un 60 % de saturación (47,2 g sal/100 ml disolución). Se obtuvieron así, 2,45 g de laticodeshidrogenasa y 0,95 g de xantindeshidrogenasa.

En la tabla III se comparan las actividades específicas halladas para los purificados cromatográficos con respecto a los del homogeneizado inicial y del purificado parcial a un 60 % de saturación con sulfato amónico.

Electroforesis de los preparados purificados. En el proceso de purificación de ambas enzimas se ha seguido sometiendo las distintas fracciones del proceso a electroforesis analítica sobre celogel en tam-

pón fosfato 0,05 M, pH 7,4, durante cuatro horas; los electrogramas del homogeneizado inicial revelados con Ponceau-S muestran una gran complejidad, apreciándose la existencia de siete bandas bien definidas, mientras que en el producto parcialmente purificado, se observa la desaparición total de las bandas más próximas al origen y una intensificación de dos de las bandas centrales. Finalmente, en los electrogramas (fig. 3) de los precipitados obtenidos al llevar al 60 % de saturación en sulfato amónico las fracciones cromatográficas correspondientes a la laticodeshidrogenasa y la xantindeshidrogenasa, sólo aparecen tres bandas definidas en el precipitado de laticodeshidrogenasa y dos bandas en el purificado de xantindeshidrogenasa, al utilizar el revelador general de proteínas Ponceau-S. Cuando se utiliza el reactivo específico de laticodeshidrogenasa (véase Material y Métodos) aparece una única banda que coincide con la de mayor intensidad y mayor velocidad de emigración detectada con el revelador general de proteínas.

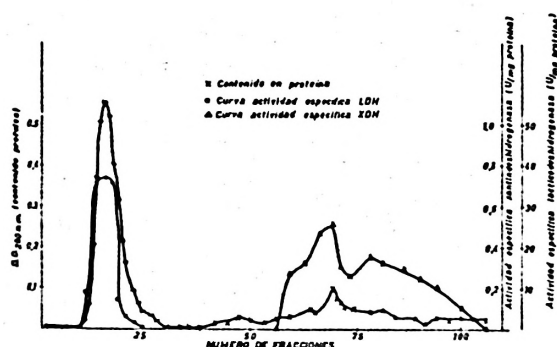


Fig. 2. Separación cromatográfica de xantindeshidrogenasa y laticodeshidrogenasa de hígado de pollo a 4° C.

Determinación de las constantes de Michaelis-Menten del sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD. La xantindeshidrogenasa es inhibida por exceso de su sustrato xantina cuando sus concentraciones son superiores a 1×10^{-4} M (7), trabajando con una concentración saturante del aceptor electrónico NAD de $1,2 \times 10^{-3}$ M.

Puesto que la reacción catalizada por la xantindeshidrogenasa hepática de pollo

Tabla III. Actividades específicas y grado de purificación de la LDX y XDH en las distintas fases de separación cromatográfica.

Proceso	Laticodeshidrogenasa		Xantindeshidrogenasa	
	Actividad específica	Grado de purificación	Actividad específica	Grado de purificación
Homogeneizado inicial	0,89	—	0,0058	—
Purificado parcial	13,80	15,5	0,139	24,0
Purificado cromatográfico	45,57	51,2	0,38	65,5

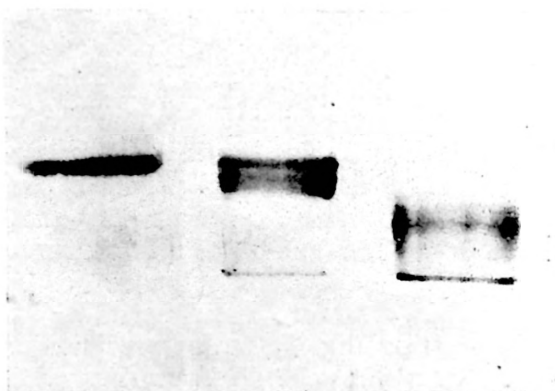


Fig. 3. Electrogramas de LDH y XDH purificados sobre DEAE-celulosa.

De izquierda a derecha: LDH con revelador específico, LDH con revelador rojo Ponceau y XDH con revelador rojo Ponceau.

precisa el empleo de dos sustratos, la xantina y el NAD, la determinación de las constantes de Michaelis-Menten reales para cada uno de los sustratos, debe efectuarse en presencia de una concentración saturante y constante del otro sustrato.

a) Determinación de $K_m(\text{xantina})$.

El preparado enzimático procede de la precipitación al 60 % de saturación en sulfato amónico de los purificados cromatográficos. La concentración del enzima fue de 2.4×10^{-1} U/ml; las concentraciones variables de xantina estuvieron

comprendidas entre 4×10^{-5} M y 1×10^{-4} M, y las determinaciones se efectuaron con dos concentraciones distintas de NAD (1×10^{-3} M y 1.33×10^{-3} M).

La representación de los resultados según la ecuación de Lineweaver-Burk (12) aparece en la figura 4a. El valor de $K_m(\text{xantina})$ es igual a 1.30×10^{-5} M. Puede observarse que la concentración de NAD empleada es, efectivamente, la concentración saturante puesto que la K_m no varía al aumentar la de NAD.

b) Determinación de $K_m(\text{NAD})$.

De modo análogo, para hallar la $K_m(\text{NAD})$, se han determinado las velocidades iniciales de formación de NADH para diferentes concentraciones del aceptor electrónico NAD (comprendidas entre 0.67×10^{-4} M y 4×10^{-4} M) y dos concentraciones distintas de xantina saturante (1×10^{-4} M y 3×10^{-4} M).

Los resultados obtenidos operando con un purificado de xantindeshidrogenasa de concentración 2.5×10^{-1} U/ml, se expresan mediante gráficas $1/v$ frente a $1/(S)$, que aparecen en la figura 4b. El valor de $K_m(\text{NAD}) = 2.85 \times 10^{-5}$ M para ambas concentraciones de xantina.

Determinación de las constantes de Michaelis-Menten del sistema piruvato-lacti-

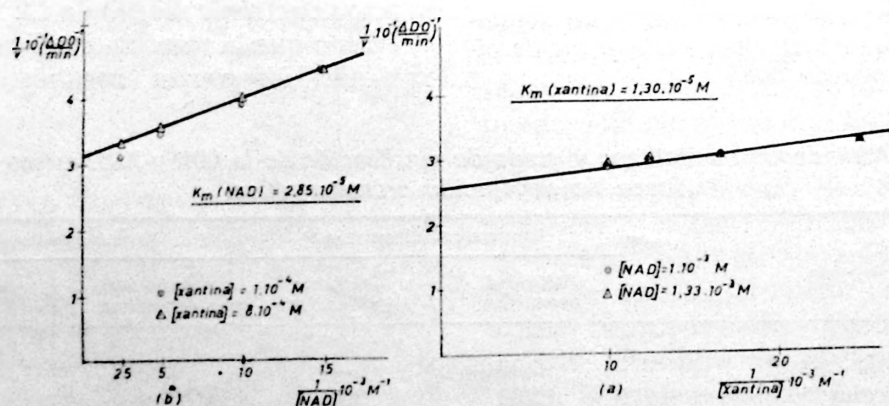


Fig. 4. Determinación de la K_m para el sistema xantina-XDH-NAD.

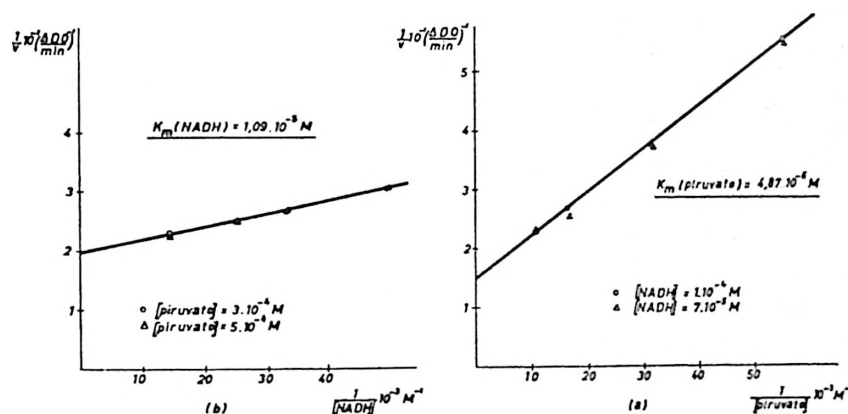


Fig. 5. Determinación de la K_m para el sistema piruvato-LDH-NADH.

codeshidrogenasa-NADH. La lacticodeshidrogenasa hepática de pollo precisa del concurso de dos sustratos, el piruvato y el NADH para su actividad enzimática. En consecuencia, la determinación de las constantes cinéticas reales del sistema para ambos sustratos debe practicarse en presencia de una concentración saturante y constante del otro sustrato; dichas concentraciones saturantes de piruvato y NADH para el sistema piruvato-lacticodeshidrogenasa-NADH son $3 \times 10^{-4} M$ y $1 \times 10^{-4} M$, respectivamente, cuando se trabaja con homogenados hepáticos de pollo (6).

a) Determinación de K_m (piruvato).

Las experiencias se han realizado empleando un preparado cromatográfico de lacticodeshidrogenasa que contiene $1.35 \times 10^{-1} U/ml$. Las velocidades iniciales se han determinado para concentraciones variables de piruvato comprendidas entre $1.8 \times 10^{-5} M$ y $9 \times 10^{-5} M$ y con dos concentraciones distintas de NADH ($7 \times 10^{-5} M$ y $1 \times 10^{-4} M$).

La representación de los valores de $1/v$ frente a $1/(S)$, indicada en la figura 5a, nos pone de manifiesto que el valor de $4.87 \times 10^{-5} M$ hallado para la K_m (piruvato) permanece constante al aumentar la concentración del aceptor electrónico

NADH. Asimismo, cuando se emplean purificados de lacticodeshidrogenasa en lugar de homogeneizados, la concentración saturante de NADH puede situarse por debajo de la hallada para los homogeneizados.

b) Determinación de K_m (NADH).

El estudio se ha realizado para dos concentraciones distintas y saturantes de piruvato ($3 \times 10^{-4} M$ y $5 \times 10^{-4} M$), determinando en cada caso las velocidades iniciales de transformación del NADH, para distintas concentraciones de NADH comprendidas entre $2 \times 10^{-5} M$ y $7 \times 10^{-5} M$. La disolución enzimática contenía $1.35 \times 10^{-1} U/ml$.

Expresados los resultados según la ecuación de Lineweaver-Burk se obtiene la figura 5b. El valor de la constante cinética para concentraciones saturantes de piruvato es igual a $K_m(NADH) = 1.09 \times 10^{-5} M$.

Discusión

En los purificados de xantindeshidrogenasa hepática de pollo, obtenidos por nosotros siguiendo las técnicas de purificación descritas por REMY (*loc. cit.*) y adoptadas por CARRASCO (*loc. cit.*), se pone de manifiesto la elevada actividad lacticodeshidrogenasa presente en los mismos.

El intento de lograr la separación de

ambos enzimas nos ha conducido a diversas modificaciones de dicho método con objeto de lograr preparados de ambas enzimas con un rendimiento elevado. Las variantes introducidas: tales como la supresión del tratamiento térmico a 75° C, la precipitación de las nucleoproteínas por tratamiento con ácido acético a pH 5 y la eliminación de proteínas termolábiles a temperaturas inferiores a la consignada, aunque nos han permitido lograr una mejora sustancial de los rendimientos, no han permitido en ningún caso obtener los enzimas por separado y el grado de purificación es sustancialmente inferior.

Este hecho pone de manifiesto que la obtención de preparados enzimáticos altamente purificados obliga a tratamientos térmicos a temperaturas elevadas a pesar de que estas acciones desnaturizantes ocasionan considerables pérdidas de rendimiento en las proteínas enzimáticas.

La separación de la xantindeshidrogenasa y la lacticodeshidrogenasa a partir de purificados de ambas enzimas se ha logrado cuantitativamente mediante adsorción cromatográfica selectiva con DEAE-celulosa. Mediante el empleo de esta técnica se ha logrado purificar la xantindeshidrogenasa unas 65,5 veces y la lacticodeshidrogenasa unas 51 veces.

Los electrogramas de las fracciones purificadas de xantindeshidrogenasa y lacticodeshidrogenasa, que nos permiten seguir el proceso de purificación, ponen de manifiesto la eliminación de la mayor parte de las proteínas extrañas, aunque en ningún caso se ha podido lograr un producto electroforéticamente homogéneo.

La similitud de valores hallados de las constantes de Michaelis-Menten para ambos sistemas enzimáticos puros con respecto a los obtenidos con homogeneizados de la glándula hepática, permiten la caracterización de ambas enzimas e indican que su comportamiento es independiente de si actúan aislados o en presencia de otros sistemas enzimáticos presentes en la glándula hepática original.

Resumen

Los purificados obtenidos al tratar los homogeneizados hepáticos de pollo por un proceso de desnaturalización térmica a 75° C y posterior precipitación fraccionada con sulfato amónico (40-60 % de saturación), contienen conjuntamente LDH y XDH con un grado de purificación relativo al homogeneizado de partida de 15,5 y 24 veces, respectivamente.

La separación de ambas enzimas de los purificados anteriores se consigue por cromatografía con DEAE-celulosa; obteniéndose un preparado de XDH concentrado 65,5 veces y un extracto de LDH cuya actividad específica es 51 veces superior respecto al sobrenadante procedente del homogeneizado de partida.

Los preparados cromatográficos de XDH y LDH muestran electroforéticamente un número de bandas muy inferior al de los homogeneizados iniciales (7 bandas proteicas); en la XDH el número de bandas es de 2, mientras que para el preparado de LDH se detectan tres bandas proteicas de la que la más intensa corresponde al LDH según se observa al revelar los ferogramas con el revelador específico de la deshidrogenasa.

Las constantes de Michaelis-Menten reales de la XDH hepática de pollo determinadas en nuestro preparado son: $K_m(\text{xantina}) = 1,30 \times 10^{-5} \text{ M}$ (concentración saturante de NAD) y $K_m(\text{NAD}) = 2,85 \times 10^{-5} \text{ M}$ (concentración saturante de xantina). Las constantes de Michaelis-Menten reales para el sistema piruvato-LDH-NADH son: $K_m(\text{piruvato}) = 4,87 \times 10^{-5} \text{ M}$ (concentración saturante de NADH) y $K_m(\text{NADH}) = 1,09 \times 10^{-5} \text{ M}$ (concentración saturante de piruvato). Los citados valores concuerdan con los determinados para XDH y LDH al utilizar homogeneizados de la glándula hepática de pollo.

Bibliografía

1. AVIS, P. G., BERGEL, F. y BRAY, R. C.: *J. Chem. Soc.*, **1100**, 1955.
2. BAILEY, G. S. y WILSON, A. C.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 5843, 1968.
3. CARRASCO, E.: Tesis Doctoral, 1967.
4. CARRASCO, E., MARTÍN-ESTEVE, J. y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, **24**, 193, 1968.
5. CORRAN, H. S., DEWAN, J. G., GORDON,

- A. H. y GREEN, D. E.: *Biochem. J.*, 23, 1694, 1939.
6. CORTÉS, A.: Tesis Doctoral. Marzo 1972.
7. DOMINGO, E., BOZAL, J. y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, 23, 145, 1967.
8. DOMINGO, E., BOZAL, J. y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, 25, 275, 1969.
9. HSIEH, W. T. y VESTLING, C. S.: *Biochemical Preparations*, V-11, 69.
10. KIELLEY, R. K.: *J. Biol. Chem.*, 216, 405, 1955.
11. LANDON, E. J. y CARTER, C. E.: *J. Biol. Chem.*, 235, 819, 1960.
12. LINEWEAVER, H. y BURK, D.: *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658, 1934.
13. PESCE, A., MCKAY, R. H., STOLZENBACH, F., CAHN, R. D. y KAPLAN, N. O.: *J. Biol. Chem.*, 239, P1753, 1964.
14. PLUMMER, D. T. y WILKINSON, J. H.: *Biochem. J.*, 87, 423, 1963.
15. REMY, G., RICHERT, D. A., DOISY, R. J., WELLS, I. C. y WESTERFELD, W. W.: *J. Biol. Chem.*, 217, 293, 1955.
16. RICHERT, D. A., VANDERLINDE, R. y WESTERFELD, W. W.: *J. Biol. Chem.*, 186, 261, 1950.

