

Lactatodeshidrogenasa de hígado de pollo. Cristalización y constantes características

C. Lluís*, S. Gubert y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química
Barcelona

(Recibido el 18 de abril de 1975)

C. LLUIS, S. GUBERT and J. BOZAL. *Crystallized Chicken Liver Lactatedehydrogenase*. Rev. esp. Fisiol., 31, 223-234. 1975.

The purified preparations obtained from treating chicken liver homogenates by a process of thermic denaturations at 56° C, subsequent precipitation with ammonium sulphate (30-60 % saturation), acetone precipitation (25-50 % v/v) and chromatographic adsorption on DEAE-cellulose, contains stable LDH whose specific activity is 233 times greater than that of the original homogenate.

Crystalline LDH has been obtained by ammonium sulphate precipitation until nacreous turbidity.

The chromatographic preparations of LDH shows electrophoretically three bands; in the crystalline preparations of the enzyme the number of bands is two, the most intense one correspond to the LDH according to observation by developing the pherograms with the specific dehydrogenase developer. The isoelectric point of the chicken's liver LDH, obtained by electrophoresis on cellulose polyacetate is 5.3. The molecular weight of the enzyme found by thin layer chromatography, is $135,000 \pm 7,000$.

The true kinetic parameters variations with pH, for the two systems catalyzed by the LDH from chicken liver, suggested that the histidine, cysteine and lysine are present in the active center of the enzyme molecule.

Se describe en el presente trabajo la obtención de LDH de hígado de pollo cristalizada, cuyo elevado grado de pureza permite estudiar algunas particularidades del enzima de esta procedencia que está constituido predominantemente por el isoenzima H₄ y en ello difiere de la presente en el hígado de otros animales.

La LDH es una oxidorreductasa citosoluble; la cristalización del enzima de diversas procedencias ha sido descrita por otros autores (7, 11), si bien no se poseen antecedentes de la cristalización del enzima de hígado de pollo.

Los cristales de LDH de corazón de buey obtenidos por SCHWERT *et al.* (13), con un grado de purificación de 122 veces, aparecen acompañados de contaminantes amorfos, cuya eliminación por recristalización resulta difícil.

* Becario del Ministerio de Educación y Ciencia.

PESCE *et al.* (9) cristalizaron LDH muscular bovina; mediante fraccionamiento con sulfato amónico y cromatografía con carboximetilcelulosa obtuvieron preparados purificados unas 100 veces. El empleo de un gel de fosfato cálcico como adsorbente permitió, a los citados autores (*loc. cit.*), purificar 103 veces la LDH de músculo pectoral de pollo y lograron, también, purificar 200 veces la LDH de corazón de pollo por aplicación de un fraccionamiento salino, precipitación con acetona y posterior cromatografía con DEAE-celulosa.

Se describe a continuación la obtención de preparados cristalinos de LDH de hígado de pollo, exenta de xantindeshidrogenasa (XDH) y prácticamente libre de malicodeshidrogenasa (MDH) (proteínas habitualmente acompañantes de la LDH), lo que no resulta factible al aplicar al enzima de hígado de pollo los métodos propuestos por otros autores, entre ellos la absorción de la LDH por gel de fosfato cálcico preparado *in situ* (8), ya que en la elución del enzima se obtienen rendimientos muy bajos.

El peso molecular de la LDH de diversas procedencias oscila entre 131.000 y 153.000 ± 7.000 , el enzima no contiene metales y la proporción de histidina es mayor en el de mamíferos que en de las aves (7, 9). En el presente trabajo se describe la determinación del peso molecular de la LDH de hígado de pollo.

La presencia de histidina en el centro activo de la LDH ha sido sugerida por MILLAR y SCHWERT (6) y por ROBINSON *et al.* (12). Por su parte, DI SABATO y HOLBROOK (2, 10), mencionan la posible existencia de tirosina en el centro activo. La determinación de la variación de los valores de K_M y V_M con el pH, permite sugerir (14) que los grupos cuyos valores de pK son 7 y 9,3, respectivamente, intervienen en el desarrollo de la actividad LDH.

Con objeto de establecer las analogías o diferencias existentes entre la LDH de

hígado de pollo y el enzima de otras procedencias, se han estudiado las variaciones de las constantes cinéticas reales, K_M y V_M , con el pH para los sistemas directo e inverso catalizados por la LDH, datos que pueden contribuir, también, al mejor conocimiento del centro activo de la LDH en estudio.

Material y métodos

El enzima objeto de purificación procede de hígados de pollo separados del animal recién sacrificado; con ellos se obtuvieron los homogeneizados por empleo de un triturador de cuchillas.

Las separaciones cromatográficas se efectuaron mediante resina de DEAE-celulosa (Whatman DE 23).

Las electroforesis se realizaron sobre tiras de poliacetato de celulosa (Poliphor) sobre las que se depositaron de 5 a 7 μ l, que contenían 500 γ de proteína; se empleó tampón de fosfato sódico 50 mM de pH indicado en cada experiencia y se trabajó con una diferencia de potencial de 200 voltios durante 75 minutos a 4° C. Al final del intervalo se procedió al revelado de las tiras. La identificación de la LDH y de la MDH se efectuó por diseminación de 50 μ l del correspondiente revelador específico (15). El revelado de proteína se consiguió por inmersión de las tiras en un baño de tinción constituido por negro amido (108 20407) durante 5 minutos y posterior aplicación de las técnicas de decoloración y transparencia habituales.

El peso molecular de la LDH se determinó utilizando la técnica de cromatografía en capa fina (aparato suministrado por la casa Boehringer) en placas de Sephadex G-200 superfino (Pharmacia). Como eluyente se utilizó tampón de fosfatos 50 mM de pH = 6,6 y como indicadores cromatográficos se utilizaron el citocromo c y la ferritina. Las proteínas de calibrado fueron el quimotripsinógeno, la ovoalbúmina de gallina, la albúmina de

suelo bovino y la aldolasa (Boehringer). Como reactivo revelador general de proteínas se utilizó el ácido sulfanílico diazoado y en los casos que fue necesario se utilizó el reactivo revelador específico para la LDH utilizado habitualmente en las técnicas electroforéticas (15).

La determinación de la actividad LDH se efectuó midiendo los decrementos de densidad óptica a 340 nm del NADH en un espectrofotómetro Beckman DBGT, provisto de inscriptor y a la temperatura de $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$, en cubetas de 1 cm de paso de luz que contenían los volúmenes de disolución de piruvato y de NADH necesarios para que sus concentraciones finales fuesen de $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ y $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, respectivamente. La reacción se inició por vertido del volumen adecuado de disolución de LDH, hasta completar el total de 3 ml.

El contenido en proteína de las disoluciones se determinó espectrofotométricamente midiendo la D.O. a 280 nm, introduciendo un factor de corrección $\lambda = 260 \text{ nm}$, según el método descrito por WARBURG y CHRISTIAN (16).

Resultados

Obtención de preparados purificados de LDH. Al obtener preparados purificados de LDH de hígado de pollo, se observó la presencia habitual de dos proteínas contaminantes; la que figura en mayor proporción es la MDH, apareciendo también, aunque en cantidad menor, la XDH.

El método de obtención de LDH cristalizada que se describe ha permitido la eliminación, prácticamente completa, de ambas enzimas. Se resumen a continuación las etapas del proceso de purificación adoptado.

El homogeneizado de partida se prepara a partir de 400 g de hígados frescos, que, convenientemente troceados, se suspenden en 200 ml de disolución de tampón de fosfato sódico 50 mM de $\text{pH} = 7,4$

a 4°C y se trituran en un homogeneizador de cuchillas.

Se vierte sobre el homogeneizado aproximadamente doble volumen del tampón a 78°C con agitación constante hasta alcanzar la temperatura de 56°C , a la que se mantiene el conjunto durante 30 minutos sin que cese la agitación. Al final del intervalo se transfiere el conjunto a un baño que contiene una mezcla frigorífica y se enfría rápidamente a 2°C . Por último se centrifuga a $4.500 \times g$ durante 30 minutos a 0°C , con objeto de eliminar las proteínas coaguladas y queda un sobrenadante transparente de color rojo.

Al sobrenadante obtenido, se le añade sulfato amónico sólido, lentamente y con agitación constante, hasta alcanzar un 70 % de saturación, a la temperatura de 4°C a la que se mantiene posteriormente durante 2 horas con agitación suave. Se recoge el precipitado obtenido por centrifugación a las condiciones descritas. El precipitado se disuelve en cinco volúmenes del tampón fosfatos habitual y se somete a diálisis, a 4°C , frente al mismo tampón hasta eliminación de sulfatos, para lo que bastan de 20 a 24 horas. El contenido del saco de diálisis se centrifuga como habitualmente y al sobrenadante que se recoge se le adiciona sulfato amónico sólido hasta alcanzar el 30 % de saturación en la sal; el precipitado que aparece se separa por centrifugación y se desecha.

Al sobrenadante obtenido se le añade sulfato amónico sólido hasta alcanzar el 60 % de saturación; se deja en reposo 2 horas a 4°C y el precipitado que aparece se separa por centrifugación a $18.000 \times g$ durante 30 minutos a 0°C . El precipitado se disuelve en 5 volúmenes de tampón, tris-ClH 5 mM, de $\text{pH} = 7,6$ y se dializa durante 20 horas a 4°C frente al mismo tampón. El contenido del saco de diálisis se centrifuga a $18.000 \times g$ durante 30 minutos a 0°C y se recoge el sobrenadante, procediéndose a efectuar un tratamiento con acetona.

Al sobrenadante obtenido, enfriado a 0° C se le adiciona, lentamente y con agitación constante, acetona enfriada a -15° C, hasta alcanzar una proporción del 25 % (v/v). Transcurridos 20 minutos después de la adición de la acetona se centrifuga el conjunto a 4.500 × g durante 30 minutos a 0° C.

Al sobrenadante obtenido se le añade de nuevo acetona hasta alcanzar el 50 % (v/v), en las mismas condiciones ya descritas y el precipitado que aparece se separa por centrifugación tal como se ha indicado. El precipitado obtenido se suspende en tampón de fosfatos 50 mM de pH = 7,4 y se mantiene en agitación durante 30 minutos a 4° C; el material insoluble se separa por centrifugación a 18.000 × g durante 30 minutos a 0° C y se desecha, recogiendo el sobrenadante.

El sobrenadante obtenido se lleva al 60 % de saturación en sulfato amónico por adición de la sal en estado sólido y el precipitado activo se separa por centrifugación a 18.000 × g durante 30 minutos a 0° C.

El precipitado proteico que contiene la LDH se disuelve en el menor volumen posible de tampón de fosfatos 5 mM de pH 7,4 y se dializa en las condiciones habituales.

El contenido del saco de diálisis se centrifuga y se cromatografía en columna (20 × 1,5 cm), a 4° C, utilizando como

soporte DEAE-celulosa, que había sido equilibrada previamente con el tampón de fosfatos 5 mM de pH = 7,4 utilizado en la elución; se recogieron volúmenes de 5 ml cada 10 minutos.

Los resultados de la cromatografía apa-

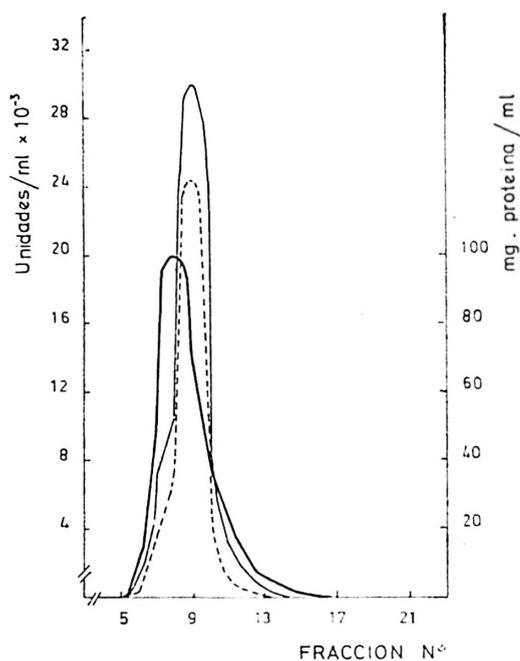


Fig. 1. Cromatografía con resina de DEAE-celulosa. (—) mg/ml de proteína; unidades/ml de: (---) MDH, (—) LDH.

Tabla I. Purificación de la LDH de hígado de pollo.

Fracción	Prot. total mg	Unidades totales de LDH	Act. Espe- cífica Unid/ mg Prot.
Homogeneizado	184.000	368.000	2,5
Sbdnte. trat. térmico	64.896	216.320	4,6
Ppdo. 70 % sat. (NH ₄) ₂ SO ₄	21.980	179.560	13,4
Sbdnte. 30 % sat. (NH ₄) ₂ SO ₄	8.172	175.960	20,7
Ppdo. 60 % sat. (NH ₄) ₂ SO ₄	6.838	151.200	33,7
Ppdo. al 50 % acetona rediseuelto y centrifugado	2.120	105.000	276
Eluidos cromat. DEAE-celulosa al 70 % sat. (NH ₄) ₂ SO ₄	195	77.000	555

recen en la figura 1, las fracciones comprendidas entre la 5 y la 13, corresponden a un máximo de proteína en el que se localiza la mayor parte de la actividad LDH, exenta de actividad XDH e impurificada con algo de actividad MDH (determinada espectrofotométricamente a 340 nm de manera análoga a la LDH).

Las fracciones que presentaban los valores máximos de actividad enzimática se reunieron y se precipitaron nuevamente con sulfato amónico sólido hasta un 70 % de saturación. Se obtuvieron así 5 g de un precipitado proteico húmedo que, mantenido a 4° C, conserva su actividad LDH por períodos de tiempo superiores a 10 meses.

En cada una de las etapas de purificación se determinó el contenido en proteína y la actividad LDH de los sobrenadantes y de los precipitados (tabla I).

La aplicación sucesiva de las etapas precedentes ha permitido la obtención de un preparado de LDH cuyo grado de pureza es 222 veces superior respecto de los

homogeneizados iniciales y el rendimiento de obtención de aproximadamente el 20 por ciento.

Cristalización de la LDH de hígado de pollo. La cristalización de la LDH se ha llevado a cabo disolviendo el preparado purificado, anteriormente descrito, en la mínima cantidad posible de agua bidestilada. A la disolución resultante se le añade sulfato amónico sólido hasta el 45 % de saturación en la sal a 0° C. El conjunto se mantuvo a dicha temperatura durante dos o tres días, al cabo de los cuales se observa la aparición de cristales perfectamente visibles al microscopio.

Para proceder a la recrystalización se separó por centrifugación el precipitado cristalino, el cual se disolvió en el mínimo volumen posible de agua bidestilada y se adicionó de nuevo sulfato amónico sólido hasta la aparición de una ligera turbidez nacarada (fig. 2). El análisis de la actividad LDH de los cristales muestra un grado de purificación 233 veces superior

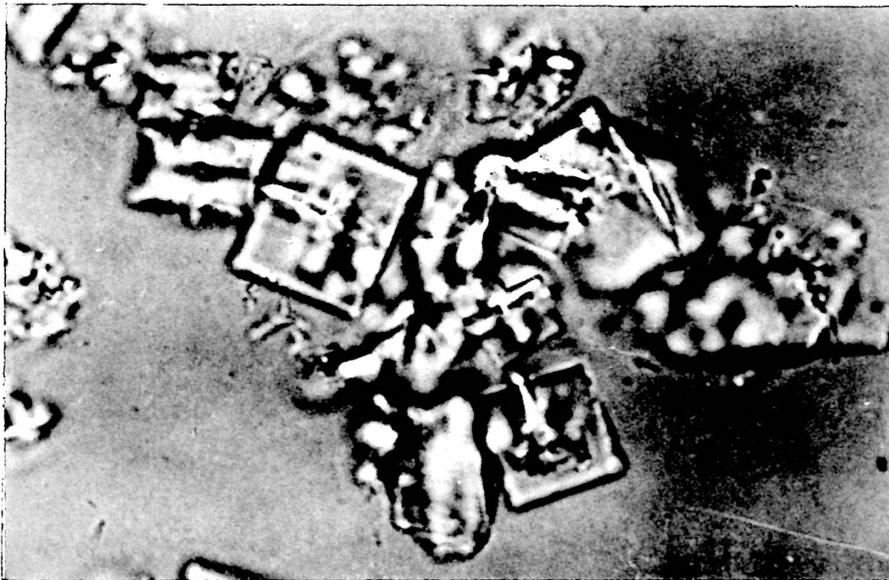


Fig. 2. LDH de hígado de pollo cristalizada, en microscopio de luz, sin contraste de fases a 1.000 aumentos.

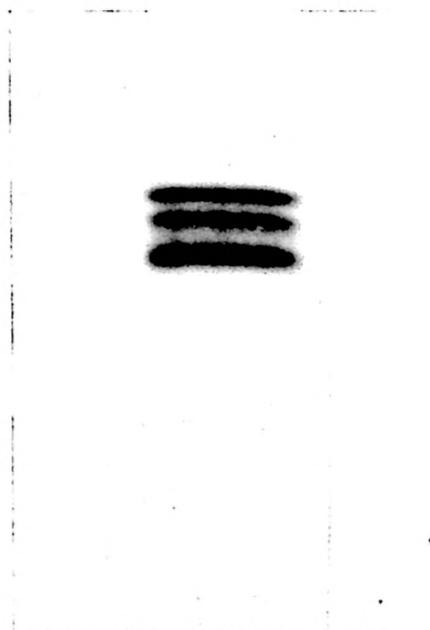


Fig. 3. *Electroforesis del preparado de LDH procedente de la separación cromatográfica en columna de DEAE-celulosa.*

Revelado general de proteínas.

a) de los homogeneizados de partida con un rendimiento aproximado de obtención del 2%. Los cristales aparecen prácticamente libres de MDH y presentan un único máximo de absorción a 280 nm.

Electroforesis de los purificados y de los cristales de LDH. La electroforesis en tiras de poliacetato de celulosa del preparado cromatográfico con DEAE-celulosa muestra tres bandas proteicas de distinta movilidad (fig. 3) utilizando como revelador negro amido. En las mismas condiciones el ferograma de los cristales de LDH muestra dos bandas electroforéticas (fig. 4); la mayoritaria corresponde a la LDH, la de menor movilidad corresponde a la MDH tal como se demuestra con sus reveladores específicos.

Determinación del pH óptimo de actuación de la LDH. El establecimiento del pH óptimo de actuación de la LDH de hígado de pollo se ha efectuado en un medio tamponado de fosfatos (sal sódica) 50 mM de pH comprendidos entre 6,0 y 8,0.

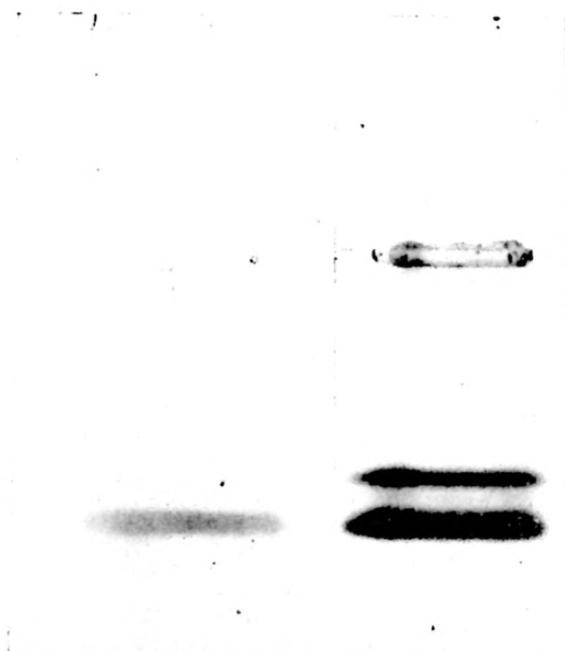


Fig. 4. *Electroforesis del preparado cristalino de LDH sobre acetato de celulosa.*

(a) Revelado general de proteínas; (b) Revelado específico de LDH.

Se ha determinado la actividad del sistema NADH-LDH-piruvato en presencia de NADH 1×10^{-4} M y piruvato 3×10^{-4} M. Los resultados obtenidos se indican en la figura 5, en la que se observa que el pH óptimo está comprendido entre 7 y 7.4. Cuando el medio tamponado utilizado es de tris-fosfatos-(sal sódica)-KCl 0.142 M entre pH = 5.0 y 9.0, el pH óptimo está comprendido entre 6 y 6.5.

Determinación del punto isoeléctrico de la LDH. La determinación del punto isoeléctrico de la LDH de hígado de pollo se ha llevado a cabo midiendo su movilidad electroforética a distintos valores de pH, sobre soportes de poliacetato de celulosa.

El tampón utilizado en todas las determinaciones ha sido el de fosfato sódico 50 mM de valores de pH comprendidos entre 5 y 7.5. Las experiencias se han efectuado a 4° C con una diferencia de potencial de 200 voltios, durante 75 minutos. Se aplicaron $55.4 \mu\text{g}$ de proteína procedente del preparado de LDH después de la separación cromatográfica con DEAE-celulosa, cuyo ferograma presenta tres bandas electroforéticas de distinta movilidad.

La representación gráfica del promedio de los recorridos electroforéticos, medidos a los distintos valores de pH (fig. 6) permitió determinar que el valor del punto isoeléctrico es alrededor de 6.5 para la banda proteica de menor movilidad y de 5.3 para la banda proteica de mayor movilidad (fig. 6a), mientras que la banda de movilidad intermedia tiene un punto isoeléctrico de 5.6 (fig. 6b), en los ferogramas en los que se aplicó el revelador general de proteínas.

Cuando se practicó el revelado de las tiras con los reveladores específicos de LDH y MDH, se estableció que el primero de ellos posee un punto isoeléctrico comprendido entre 5.3 y 5.4, mientras que el de la MDH se halla comprendido entre 5.6 y 5.7 (fig. 6c y d).

Peso molecular de la LDH de hígado de pollo. La determinación del peso molecular de la LDH ha sido realizada por la técnica de cromatografía en capa fina por aplicación de $2 \mu\text{g}$ de citocromo c junto con $3 \mu\text{g}$ de cada una de las proteínas estándar siguiendo la técnica indicada en Material y métodos.

La concentración de purificado cristalino de LDH que se muestra óptima es de $1 \mu\text{g}$ de preparado en $0.4 \mu\text{l}$ del tampón de elución, de lo cual se aplican $3 \mu\text{l}$.

La representación de los valores de r_{cit} , recorrido proteína / recorrido citocromo, frente al logaritmo de los pesos moleculares (fig. 7), permite interpolar el valor de r_{cit} para la LDH calculando un peso molecular de 135.000 ± 7.000 .

En los cromatogramas en los que la porción correspondiente a la deposición de LDH se reveló con el reactivo específico para este enzima (15) el valor del peso molecular calculado es el mismo, en concordancia con los valores que aparecen en la bibliografía para el enzima de otras procedencias.

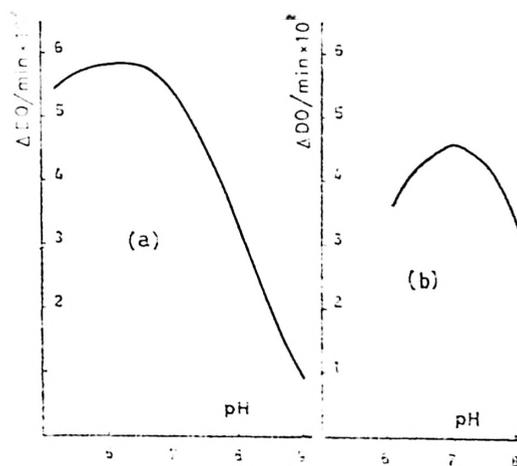


Fig. 5. pH óptimo de la LDH de hígado de pollo.
(a) Tampón tris-fosfato-KCl 0,142 M; (b) tampón fosfatos 50 mM.

Variación de K_m y V_{max} reales* con el pH. Se ha determinado la variación que experimentan con el pH los valores de K_m y V_{max} reales para los sistemas NADH-LDH-piruvato y NAD-LDH-L-lactato en el intervalo de valores de pH

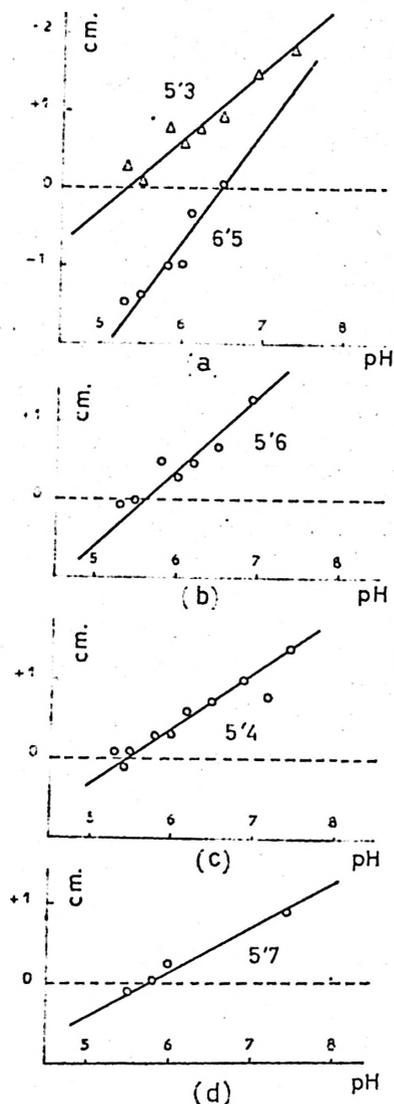


Fig. 6. Punto isoeléctrico de la LDH hepática de pollo. (a) y (b) Revelador general de proteínas; revelador específico de: (c) LDH, (d) MDH.

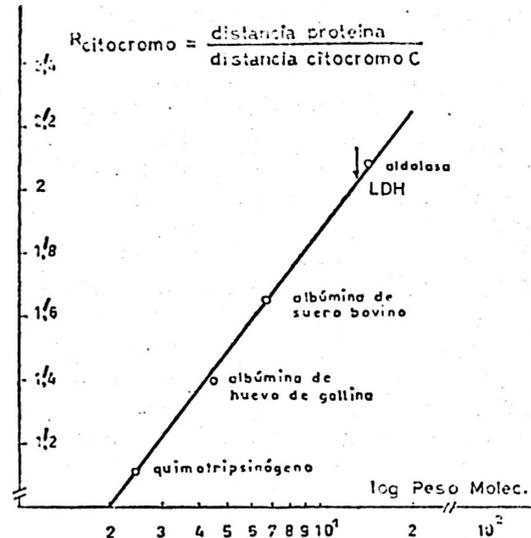


Fig. 7. Determinación del peso molecular de la LDH de hígado de pollo. Detección de la LDH con el reactivo específico.

comprendidos entre 5 y 9 para el sistema directo y desde 6 a 9,5 para el sistema inverso, en un medio tamponado de tris-fosfatos-KCl 0,142 M.

Para el cálculo de los valores reales de K_m y V_{max} a cada uno de los pH se utilizó el método gráfico de VESTLING-FIORINI (5).

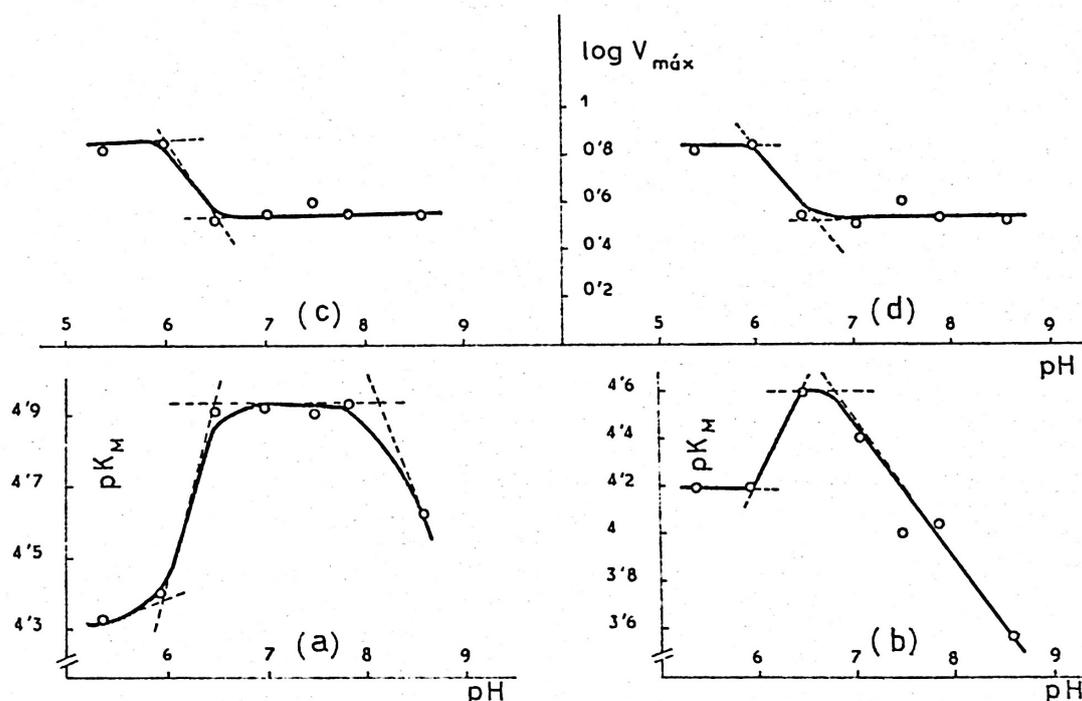
Los resultados obtenidos se recogen en la tabla II.

En la representación gráfica, según el método de DIXON (3, 4), del $\log V_{max}$ y pK_M frente al pH, para el sistema NADH-LDH-piruvato (fig. 8), aparecen dos puntos de inflexión cuyos valores de pK oscilan entre 6 y 6,1 y entre 6,4 y 6,5, comunes para el NADH y para el piruvato, que corresponderían a grupos ionizables del enzima que intervienen en la formación del complejo Enzima-Substrato. Se observa, en la representación gráfica de pK_M ,

* Se ha utilizado el término «real» para designar los parámetros cinéticos K_m y V_{max} obtenidos en la representación secundaria de $1/v$ frente $1/s$, según el método de VESTLING-FIORINI (5); corresponde al vocablo inglés *true*.

Tabla II. Variación de K_M y V_M reales con el pH.

pH	NADH		Piruvato		pH	L-lactato		NAD ⁺	
	$K_M \times 10^5$	$V_M \times 10^2$	$K_M \times 10^5$	$V_M \times 10^2$		$K_M \times 10^4$	$V_M \times 10^2$	$K_M \times 10^3$	$V_M \times 10^2$
5,4	4,5	6,8	6,4	6,6	5,9	6,8	2,8	3,1	3,0
5,9	3,8	7,1	6,0	7,6	6,4	4,2	2,5	4,0	6,6
6,5	1,2	3,3	2,3	3,1	7,0	2,1	22,0	1,0	10,7
7,0	1,2	3,5	3,5	3,1	7,4	2,5	14,1	0,9	12,9
7,5	1,1	4,1	9,5	4,0	7,9	1,8	18,3	1,2	17,6
7,8	1,1	3,7	7,6	3,5	8,6	4,0	21,5	3,3	22,2
8,6	2,4	3,4	33,0	3,3	9,2	6,1	30,1	2,8	25,8
					9,3	2,0	24,6	2,5	25,3

Fig. 8. Variación de pK_M y $\log V_M$ con el pH para el sistema NADH-LDH-piruvato. pK_M respecto a: (a) NADH, (b) piruvato; $\log V_M$ respecto a: (c) NADH, (d) piruvato.

la existencia de un punto de inflexión a $\text{pH} = 8,0$ cuando se trata del NADH y otro alrededor de $\text{pH} = 7,0$ para el piruvato, que no tienen correspondencia en la representación de $\log V_{\text{máx}}$, que podrían atribuirse a grupos ionizables próximos al centro activo pero que no intervienen en

la formación del complejo Enzima-Substrato.

En el estudio de la variación de las constantes cinéticas reales para el sistema inverso aparece un punto de inflexión a $\text{pH} = 7,0$ común para las cuatro representaciones (fig. 9) y aparecen en la re-

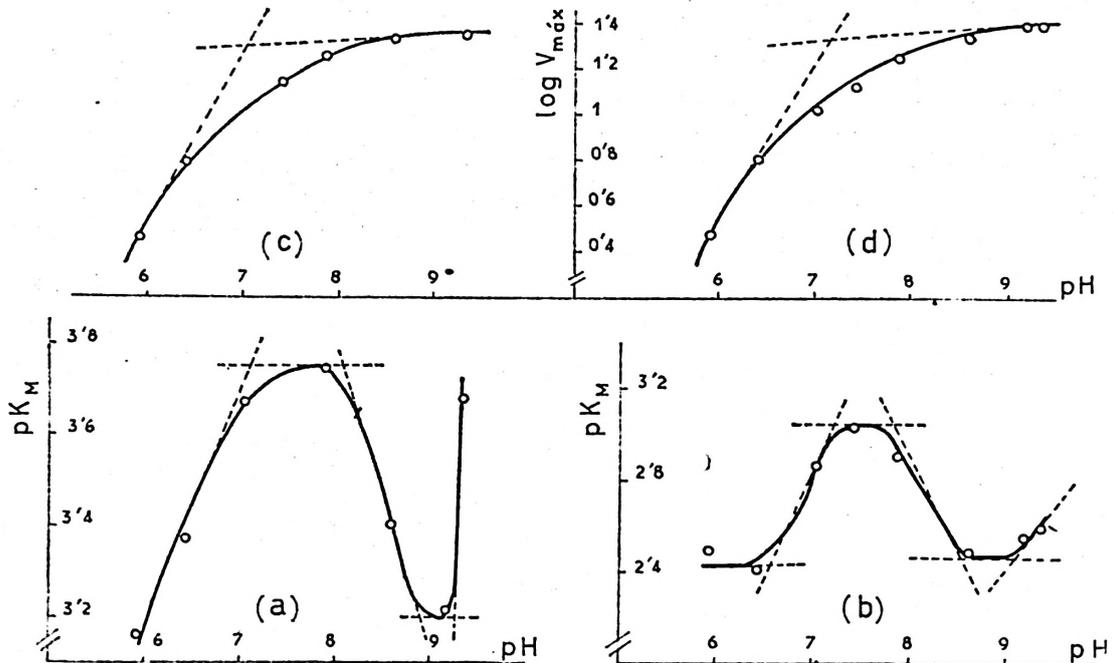


Fig. 9. Variación de pK_M y $\log V_M$ con el pH para el sistema NAD-LDH-L-lactato. pK_M respecto a: (a) NAD, (b) L-lactato; $\log V_M$ respecto a: (c) NAD, (d) L-lactato.

presentación de pK_M puntos de inflexión con valores de pK de 8,2, 9 y 9,3. Con las limitaciones propias del método, se sugiere la posible presencia de histidina, cisteína y lisina en el centro activo de la LDH.

Discusión

La obtención de LDH de hígado de pollo en estado cristalino, con un grado de purificación de 233 veces respecto al homogeneizado inicial, ha permitido disponer del enzima en un grado de purificación idóneo para el estudio de algunas constantes características de la LDH.

En la obtención de preparados purificados de LDH de hígado de pollo se han aplicado algunas de las técnicas empleadas para la obtención de LDH de otros orígenes adaptadas adecuadamente al enzima de hígado de pollo y que han permi-

tido lograr, por primera vez, la cristalización del enzima de esta procedencia.

Los purificados así obtenidos se hallan exentos de nucleoproteínas, carecen de actividad XDH y exhiben una ligera actividad MDH.

El punto isoelectrico, el peso molecular y el pH óptimo de actuación de la LDH hepática de pollo, calculados en el presente trabajo, concuerdan con los que se les asignan al enzima de otras procedencias.

La variación de los parámetros cinéticos reales con el pH para ambos sistemas catalizados por la LDH, pone de manifiesto la existencia de varios puntos de inflexión que sugieren la intervención de los grupos $-SH$ y probablemente de la histidina y la lisina en el ciclo catalítico. Se pone también de manifiesto la extraordinaria complejidad del centro activo de la LDH de hígado de pollo en acuerdo

con lo postulado por ADAMS *et al.* (1), que sugiere la interacción entre numerosos restos aminoácidos de la molécula proteica y ciertos grupos de las moléculas de los coenzimas y de los substratos que inducen numerosos cambios de conformación, que son los que hacen posible la actividad de oxidorreductasa.

Resumen

Se describe un método de obtención de lacticodeshidrogenasa (LDH) de hígado de pollo cristalizada por tratamiento térmico a 56° C de los homogeneizados, precipitación con sulfato amónico (30-60 % de saturación), posterior precipitación con acetona (25-50 % v/v), y absorción cromatográfica con DEAE-celulosa. De la disolución del purificado, por adición de sulfato amónico sólido hasta la aparición de turbidez nacarada, se separan cristales de LDH cuyo grado de purificación es 233 veces con respecto al homogeneizado inicial.

El ferograma de los eluidos cromatográficos muestra tres bandas proteicas de diferente movilidad, mientras que en el obtenido de los cristales enzimáticos solamente aparecen dos, siendo la más intensa la que posee actividad LDH.

El punto isoeléctrico de la LDH de hígado de pollo, establecido por electroforesis sobre tiras de poliacetato de celulosa, se halla comprendido entre pH = 5,3 y 5,4 y su peso molecular, determinado por cromatografía en capa fina, es de 135.000 ± 7.000 .

La variación de los valores de K_M y V_M reales, respecto al pH, para los sistemas directo e inverso catalizados por la LDH, sugieren la presencia, en el centro activo del enzima, de los grupos imidazol de la histidina, sulfhidrilo de la cisteína y ϵ -amino de la lisina.

Bibliografía

1. ADAMS, M. J., MCPHERSON, A., ROSSMANN, M. G., SCHEVITZ, R. W., SMILEY, I. E. y WONACOTT, A. J.: En «Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases» (H. Sund, ed.). Springer-Verlag, Berlín, 1970, pág. 157.
2. DI SABATO, G.: *Biochemistry*, 4, 2288, 1960.
3. DIXON, M.: *Biochem. J.*, 55, 161, 1953.
4. DIXON, M. y WEBB, C. E.: En «Enzymes» (2.ª ed.). Longman's Green, Londres, 1967.
5. FLORINI, J. R. y VESTLING, C. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 25, 575, 1957.
6. MILLAR, D. B. y SCHWERT, G. W.: *J. Biol. Chem.*, 238, 3249, 1963.
7. NISSELBAUM, J. S. y BODANSKY, O.: *J. Biol. Chem.*, 236, 323, 1961.
8. OCHOA, S.: En «Methods in Enzymology», Vol. I (Colowich, P., Kaplan, N. O., ed.), Academic Press, New York, 1955, p. 739.
9. PESCE, A., MCKAY, R. M., STOLZEMBACH, F., CAHN, R. D. y KAPLAN, N. O.: *J. Biol. Chem.*, 239, 1753, 1964.
10. PFLEIDERER, G., HOLBROOK, J. J., ZAKI, L. y JECKEL, D.: *FEBS Lett.*, 1, 129, 1968.
11. REEVES, W. J. y FIMOGNARI, G. M.: *J. Biol. Chem.*, 238, 3853, 1963.
12. ROBINSON, D. R., STOLLAR, W., WHITE, S. y KAPLAN, N. O.: *Biochemistry*, 2, 486, 1963.
13. SCHWERT, G. W., MILLAR, D. B. S. y TAKENAICA, Y.: *J. Biol. Chem.*, 237, 2131, 1962.
14. SCHWERT, G. W.: En «Pyridine Nucleotide Dependent dehydrogenase» (H. Sund, ed.). Springer-Verlag, Berlín, 1970, p. 135.
15. THORNE, L. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 73, 193, 1963.
16. WARBURG, C.: En «Methods in Enzymology», Vol. III (S. P. Colowich, N. O. Kaplan, eds.), Academic Press, New York, 1963, pág. 451.

