

7/17

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE LA OXIDASA DEL ALFA TOCOFEROL
EN SOYA, FRIJOL Y ALFALFA

SIN AÑO
DE PUBLICACION

EZEQUIEL MURILLO GARCIA

Q.F.B. ORIENTACION BIOQUIMICO MICROBIOLOGO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS. Tesis
ADQ. 1975
FECHA 11-24
PROC. 3



QUIN

JURADO

PRESIDENTE	ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ
VOCAL	GUADALUPE VELEZ PRATT
SECRETARIO	ANGELA SOTILO
1er. SUPLENTE	CARLOS DEL RIO
2do. SUPLENTE	JAIIME MORA

Sitio donde se desarrolló el tema:

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNAM

Sustentante

EZEQUIEL MURILLO GARCIA _____

Asesor

Dra. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ _____

Agradezco al Dr. JOHN K. BAUME la
inapreciable dirección de este
trabajo.

INDICE

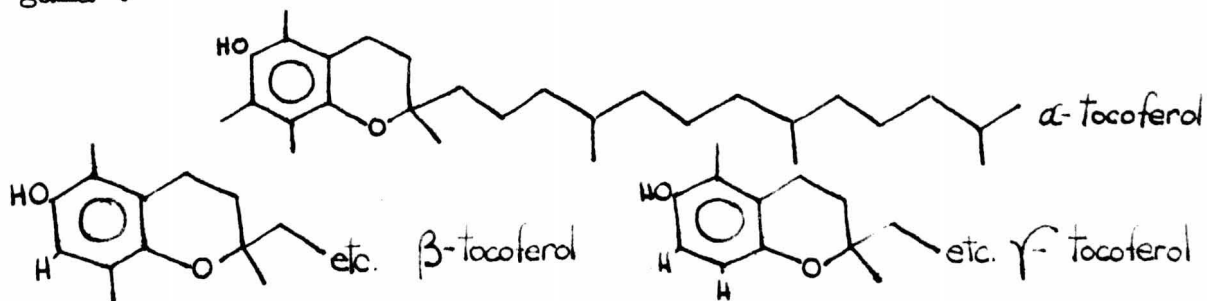
	página
CAPITULO I	
INTRODUCCION	1
CAPITULO II	
METODOS Y RESULTADOS	
1.- Ensayo enzimático	5
2.- Problema de actividad endógena.....	6
3.- Separación de la actividad de alfa tocoferol oxida- sa de la actividad endógena	8
4.- Influencia en la actividad enzimática de la extrac- ción y la manipulación	9
A) Tiempo de homogeneización	9
B) EDTA, mercaptoetanol y cisteína	10
C) Fuerza iónica	10
D) Temperatura de almacenaje	10
E) Columnas de Sephadex	10
F) Liofilización	10
5.- Actividad óptima de la enzima	
A) Concentración de alfa tocoferol	10
B) pH óptimo	11
C) Concentración de fosfolípidos	11
6.- Reproducibilidad del método	11
7.- Niveles de enzima	11
A) Durante la germinación	11
B) En harina de semillas	11
c) En otras partes de plántulas de diferentes especies	12
8.- Estabilidad de la enzima en semilla al cocimiento .	12
9.- Purificación parcial	12
CAPITULO III	
DISCUSION	14
BIBLIOGRAFIA	18

CAPITULO I

INTRODUCCION

En el año de 1922 Evans y Bishop descubrieron que para el desarrollo normal del embarazo y la obtención de crías sanas, la rata necesita un factor dietético que se presenta en el aceite de semillas y es, por lo tanto, soluble en aceite. En el año de 1924 Sure le dió a esta sustancia el nombre de vitamina E. La existencia de la vitamina E se reconoció de manera general cuando en 1926 Evans y Burr lograron elaborar un método biológico para la comprobación de este factor. En el año de -- 1936 Evans y colaboradores lograron el aislamiento de dos factores químicos con actividad de vitamina E, estos fueron el alfa y beta tocoferoles procedentes del aceite de germen de trigo. Posteriormente se ha reportado que el alfa tocoferol se encuentra en todas las plantas superiores. Se ha encontrado su necesidad absoluta en aves, roedores, así como en bovinos y otros animales. Los herbívoros son los animales mas sensibles a la deficiencia de esta vitamina. Los síntomas típicos, además de la infertilidad en ambos sexos, son la degeneración del tejido epitelial, la distrofia muscular seguida de necrosis, hemólisis de glóbulos rojos in vitro por peróxidos, y en general perturbaciones en el metabolismo de lípidos.

En la naturaleza se encuentran varias sustancias con actividad vitamínica E; estas son los tocoferoles alfa, beta y gama:



El más abundante es el alfa tocoferol, que en forma pura es un aceite amarillo pálido, soluble en alcohol, eter y grasa, pero insoluble en agua. Absorbe a un máximo de 298 nm; es resistente al calor, ácidos y álcalis; sin embargo es muy

sensible al oxígeno y otras sustancias oxidantes. En presencia de peróxidos se oxida fácilmente, por esta característica evita la rancidez de las grasas en que está disuelta. (Steep y Kuhnau)

La presencia de la cadena de fitilo hace altamente insoluble al alfa tocoferol, pero es soluble en solventes orgánicos y lípidos. El hecho de que los tocoferoles sean derivados cíclicos de la hidroquinona explica fácilmente la inactivación por oxígeno del aire, siendo los productos de la oxidación inactivos vitamínicamente. (Steep y Kuhnau 1966)

La pérdida de actividad vitamínica también se observó por la ingestión de algunas leguminosas. Dietas que contienen frijoles (Phaseolus vulgaris) incrementan la incidencia de distrofia muscular en pollos y corderos. Eso se acompaña por una marcada depresión de los niveles de alfa tocoferol en el plasma, los síntomas pueden eliminarse administrando vitamina E, o co-ciendo los frijoles por 60 minutos a 127°C. Por extracciones alcohólicas se demuestran dos factores con actividad antivitamínica ; uno soluble en agua inestable al calor y otra soluble en alcohol y resistente al calor . El factor soluble en alcohol se determinó como una grasa insaturada. Estudiando la encefalomalacia en pollos , Sugsen en 1955 notó una interferencia en la utilización de vitamina E por la ingestión de alfalfa (Medicago sativa), se demostró después que la alfalfa contenía una fracción soluble en alcohol que interfería con la absorción de vitamina E. Sunyal en 1953 había reportado que en chícharo (Pisum sativum) hay un factor que interfiere con la actividad de la vitamina E para prevenir la reabsorción fetal en ratas . (Leidler 1971)

Por otra parte se ha reportado que cuando se maceran tejidos de las hojas de chícharo, se produce una destrucción --oxidativa del alfa tocoferol. Esto puede suceder por dos procesos distintos , uno es la acción de lipooxigenasas en los lípidos insaturados . Los compuestos resultantes de esto pueden oxidar al alfa tocoferol de una manera no enzimática en presencia de proteínas con grupo hemo.

Otra alternativa es la presencia de un sistema enzi--mático que fuera responsable directo del metabolismo del alfa tocoferol . Esta posibilidad fué sugerida por Gaunt y Stowe (1967)

por estudios de rompimiento del alfa tocoferol en homogenados de brotes etiolados de chícharo.

Barlow y Gaunt reportaron en 1972 estudios sobre este sistema. Uno de los problemas que surgieron fué la introducción del alfa tocoferol en el medio de reacción. Encontraron entonces que la vitamina, disuelta en etanol sufría una ruptura rápida en presencia de un extracto libre de células, y si el etanol estaba en un 20% en volumen se alcanzaban los mejores niveles de actividad. Ningún otro solvente fué capaz de activar la oxidación del alfa tocoferol. Sin embargo la velocidad de ruptura de crecía hasta que a los 15 minutos de reacción se encontraba poca actividad, esto se atribuyó a otro efecto del etanol. Cuando se preincubó el extracto libre de células en etanol, se perdió casi totalmente la actividad de la enzima. Para inactivar a la enzima completamente y detener completamente la reacción para medir la concentración de alfa tocoferol sin oxidar, encontraron que el 2-propanol, ya sea hirviendo o a temperatura ambiente detiene casi completamente la reacción, mientras que el etanol hirviendo no tenía un efecto inmediato. Encontraron además que el extracto libre de células se inactivaba por un tratamiento a 100°C por cinco minutos.

Este extracto libre de células tuvo una actividad óptima a un pH de 5.5 no habiendo actividad por debajo de un pH de cuatro.

Cuando separaron varias fracciones por centrifugación descubrieron que solo se recuperaba la actividad con el sobrenadante de 100 000 gravedades mas el botón de centrifugación de esta misma fracción; así que para la actividad era necesaria la fracción membranal, y algún componente soluble. El componente membranal necesario para la actividad fué la fracción de fosfolípidos. Había además un aumento lineal en actividad al incrementar la concentración de fosfolípido hasta cinco mg/ml, después de esta concentración no hubo un aumento adicional en actividad enzimática.

Al dializar encontraron una pérdida del 40% que no se reestablecía al añadir el dializado.

El factor activo en el sobrenadante era el factor lábil al calor y al etanol; cuando se le trató con tripsina o una mezcla de alfa quimotripsina y carboxipeptidasa A , se produjo una pérdida casi total de actividad, el factor fué resistente a la precipitación con sulfato de amonio. Encontraron que a 4°C - durante cinco días no se perdía actividad , mientras que el extracto crudo de células perdía actividad en unas cuantas horas incluso a 4°C .

Para excluir la posibilidad de un rompimiento por hidroperóxidos añadieron linoleato con diferentes concentraciones de etanol y encontraron que el etanol inhibe casi completamente este tipo de oxidación. Para eliminar la posibilidad de la formación de hidroperóxidos en el extracto libre de células , añadieron fosfolípidos con diferentes niveles de hidroperóxidos, y no encontraron diferencia en la actividad. Incubando lipooxigenasa y hemoglobina con la fracción celular particulada seguida de la adición de alfa tocoferol , no produjo rompimiento de la vitamina. Así que el sobrenadante no podía reemplazarse por --- proteínas catalizadoras de la producción de hidroperóxidos de lípidos .

La concentración de alfa tocoferol para la máxima actividad fué de 1.3 mM y la Km fué de aproximadamente 0.25 mM.

Se encontró que los productos del metabolismo son tres, el más abundante tiene un espectro de UV con un máximo en 288 nm, se confirmó que no tiene ningún hidroxilo libre. Encontraron actividad además en trébol, pero no en trigo ni avena.

Lo más sobresaliente encontrado en esta enzima fué el hecho de tener actividad en presencia de etanol , aunque esto - se había reportado ya en algunas fenolasas . Como el metabolismo de alfa tocoferol utiliza oxígeno molecular , sugirieron nombrar a esta enzima oxidasa del alfa tocoferol. Otras oxidasas y particularmente oxidasas transferedoras de electrones , se sabe que requieren fosfolípidos como cofactor. Es lógico pensar que una molécula como el alfa tocoferol interactúe específicamente con el fosfolípido por el hecho de tener una cadena de fitilo - tan lipolífica, y un solo grupo hidroxilo polar en el otro extremo.

CAPITULO II

METODOS Y RESULTADOS

1) ENSAYO ENZIMATICO

Para el ensayo enzimático se usaron plantas crecidas en agrolita (material inerte de soporte), en cajas de material plástico de 30 x 60 cm ; los tiempos de crecimiento fueron variables, pero se prefirió tomar las plántulas cuando estaban completamente desarrolladas , en todos los casos se evitaron los cotiledones . Excepto para los experimentos especiales , no se usó tampoco la raíz.

El amortiguador usado fué Na_2HPO_4 -citrato a un pH de 5.5 en unos casos y de 6.8 en otros; la molaridad usada fué de 0.05 en un principio , y despues de 0.1 M .

El alfa tocoferol (Merck) se disolvió en etanol absoluto , a concentración de 15 mg/ml .

El fosfolípido (extraído, como lecitina Tech , o como lecitina Sigma) se usó en concentraciones de 10 mg/ml.

El extracto enzimático de ensayo, se obtuvo homogeneizando el material con la mitad de su peso con amortiguador en un mortero preenfriado en hielo , evitando producir espuma . El material se filtra a través de gasa , este filtrado se centrifuga a 20 000 RPM durante 10 minutos ; el sobrenadante entonces, se centrifuga a 100 000 XG durante una hora . El sobrenadante se usa como material para el ensayo enzimático. El ensayo enzimático se hace en un oxímetro (Heat Co. Benton Harbor Mass. USA) graficando el curso de la reacción un graficador acoplado. El oxímetro mide cambios en la concentración relativa de oxígeno disuelto .

En la cubeta de reacción se ponen 0.2 ml de la solución de alfa tocoferol (concentración final 0.75 mg/ml ; 2.23 mM) , 0.2 ml de solución de fosfolípido (concentración final 0.5 mg/ml) y 3.4 ml de amortiguador, cuando se llega al equilibrio en la concentración de oxígeno se añade 0.2 ml del extracto enzimático por medio de una jeringa. Esto da un volumen final de 4 ml . El orden de adición no afecta el resultado, hasta antes de agregar la

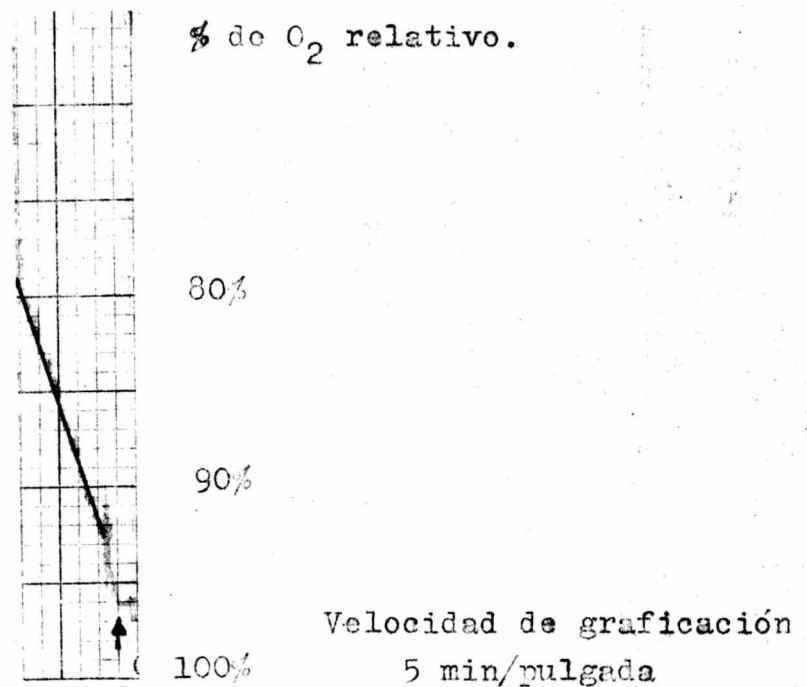


FIGURA A GRAFICA DE UN ENSAYO

Por medio del monitor se observa cuando la mezcla de reacción en agitación ha llegado al equilibrio (3.4 ml de amortiguador, 0.2ml de solución etanólica de alfa tocoferol, 0.2 ml de solución acuosa de fosfolípidos). Esto se puede comprobar poniendo en marcha el graficador.

Se ajusta el 100% y el 0% relativos de concentración de O₂ . Se añade entonces por medio de una jeringa , 0.2 ml del extracto enzimático, pasando un momento se estabiliza la tendencia - que se mantiene generalmente hasta el 20 a 30 % de concentración relativa de O₂ .

Se toma la pendiente de la gráfica de la parte estabilizada -- como tendencia uniforme.

enzima . Para el control, se usan las mismas cantidades, pero se añade 0.2 ml de etanol absoluto en lugar de la solución alcohólica de alfa tocoferol. El resultado de cada medición se toma como la pendiente de la gráfica que produce el graficador. La relación que existe entre la pendiente medida y la toma de oxígeno es de 0.1944×10^{-4} mM de O_2 /min cuando la pendiente es de uno , si la pendiente es de 10, la pendiente es de 1.944×10^{-4} mM de O_2 / min , si la pendiente es de 0.5 la toma es de 0.0972×10^{-4} mM de O_2 /min . Estos valores se obtienen tomando en cuenta la altura y la presión de la Cd. de México y a $23^\circ C$; pero suponiendo que no hay cambios sustanciales en la concentración de oxígeno por la presencia de las sales y del etanol; para los datos arriba mencionados se toma en cuenta también que la velocidad del papel en el graficador es de 5 minutos/pulgada. (Figura A)

2) PROBLEMA DE ACTIVIDAD ENDOGENA

En un principio , el ensayo no pudo tomarse como representativo de una actividad enzimática oxidativa del alfa tocoferol por la presencia de una actividad endógena, es decir , en el control en donde no hay sustrato, se encuentra actividad de toma de oxígeno. Se pensó que esta actividad se debía a la acción del extracto sobre unas posibles insaturaciones en los fosfolípidos. Por eso se pensó usar fosfolípidos de fuente conocida y por un método que diera esencialmente fosfolípidos sin una gran contaminación de grasas neutras . El método usado dió como promedio 2.3 gramos de fosfolípido crudo por cada 500 gramos de harina usada ; el aspecto del producto fué bueno, siendo de un amarillo pálido y lo suficientemente sólido como para pensar que era bajo en insaturaciones. Sin embargo, al probar este material se obtuvo una alta actividad endógena; esta actividad se redujo al hidrogenar el material en dioxano .(TABLA 1)

El material hidrogenable en dioxano es poco, por ello se pensó en hidrogenar en cloroformo en donde los fosfolípidos son mucho más solubles; la hidrogenación se hizo durante 24 horas.

TABLA 1 USO DE FOSFOLIPIDO EXTRAIDO DE AYOCOTE EN EL ENSAYO ENZIMATICO ,SIN HIDROGENAR E HIDROGENADO (EN DIOXANO).

Fosfolípido	Actividad de toma de O ₂ (pendiente)	
	sin alfa tocoferol (Endógeno)	con alfa tocoferol
Sin hidrogenar	6.5	10.0
Hidrogenado	3.2	8.5

El ensayo se llava a cabo con 0.2 ml de solución alcohólica de alfa tocoferol (15 mg/ml) o con 0.2 ml de etanol; el fosfolípido hidrogenado y no hidrogenado se emulsifica en concentración de 10 mg/ml y de esta solución se usan 0.2 ml para cada ensayo.

TABLA 2 HIDROGENACION EN CLOROFORMO DE FOSFOLIPIDOS EXTRAIDOS DE AYOCOTE.

Fosfolípido	Número de yodo	Actividad de toma de O ₂ (pendiente)	
		endógeno	con alfa-tocoferol
Sin hidrogenar	83.3%	6.0	9.8
Hidrogenando	41.5%	-	-

La hidrogenación se llevó a cabo durante 24 horas en cloroformo . El número de yodo se obtuvo por el método de Hanus.

Cuando se midió el número de yodo se encontró que la hidrogenación no había sido completa, y sus propiedades como cofactor las había perdido. (TABLA 2)

Se probó entonces un material crudo vendido como lecitina, para obtener el material para uso como fosfolípidos. Se usó una columna de 30 x 1 cm llena con gel de sílice hasta los 25 cm, lavándola con cloroformo y metanol. El material a purificar (5 gramos) se disolvió en 30 ml de cloroformo; ésta solución se pasó por la columna eluyendo con cloroformo, cloroformo-metanol 1:2, metanol-cloroformo 1:2, y metanol. El producto de cada fracción se evaporó a sequedad, y se pesó. Solo un 5.3 % del material se puede considerar como fosfolípido. (TABLA 3)

Se determinó entonces la utilidad de este material -- hidrogenado y sin hidrogenar; como se puede apreciar en la TABLA 4, el material no perdió sus insaturaciones ni la capacidad -- para producir actividad endógena. Por ello se pensó en usar otro método para separar las actividades.

Los métodos usados para esta parte del trabajo fueron: Extracción de fosfolípidos de harina de Ayocote. -- Se toma una cantidad de semillas de Ayocote, se refluja con 10 veces su peso en volumen de isopropanol por 5 minutos. Se filtra en un embudo Büchner; el residuo se refluja con 10 veces su volumen en peso de la muestra inicial con cloroformo. Se filtra y se combina con el filtrado anterior; se evapora a un volumen pequeño bajo presión en un rotavapor. Se añaden 100 ml de cloroformo y 100 ml de agua se agita suavemente para evitar la formación de una emulsión, se transfiere esto a un embudo de separación y se toma la parte orgánica. Se ponen 20 g de gel de sílice para cromatografía en un embudo Büchner, se lava con metanol y cloroformo. Se hace pasar entonces el extracto de cloroformo a través de la gel de sílice. Se lava con más cloroformo se eluyen los fosfolípidos de la gel de sílice con metanol, el extracto de metanol se evapora a sequedad, el producto es la fracción cruda de fosfolípidos.

Hidrogenación en dioxano. -- Se usó el método general -- para hidrogenar triglicéridos (Lichfield 1972). La muestra, -- 200 mg. se disuelven en 50 ml de dioxano recientemente destila

TABLA 3 ELUCION EN COLUMNA DE GEL DE SILICIO DE LECITINA "LA POLAR" .

Fracción	Rendimiento (%)	Actividad de toma de O ₂ endógeno	con α tocoferol
Cloroformo	84.9	6.5	6.8
Clor- Met 2:1	5.0	3.2	4.2
Met-Clo 2:1	4.8	2.1	6.5
Metanol	5.3	1.8	5.5

Se pusieron 5 g de fosfolípidos en 30 ml de cloroformo, este material se puso en una columna de gel de silicio que se eluyó - con suficiente volumen de cada una de las mezclas o solventes.

TABLA 4 USO DEL FOSFOLÍPIDO ELUIDO CON MET;CLOR 2:1 Y METANOL

Fosfolípido	Número de yodo	Actividad de toma de Oxígeno endógeno	con alfa tocoferol
Sin hidrogenar	62.8%	2.4	5.6
Hidrogenado	15.3%	1.2	5.0

La fracción eluida de la columna de gel de silicio con metanol-cloroformo 2:1 , y eluida con metanol, se probó con y sin hidrogenación (en dioxano).

do , se pone la solución en un frasco de 250 ml ; se agrega a esto 80 mg de Pd/C . La hidrogenación se hace a presión positiva de 1 p.s.i con agitación por medio de un agitador magnético , durante 30 minutos . Después de la reacción se añaden 30 ml de cloroformo y se pasa la solución a través de papel filtro , lavando con cloroformo . Se evaporan los solventes a sequedad en un rotavapor , para recuperar el material ; éste se pesa , para después suspenderlo en amortiguador a una concentración de 10 mg/ml .

Hidrogenación en cloroformo .- Se usó el mismo método anterior pero usando 6 g de material en 50 ml de cloroformo . Se usaron en este caso 100 mg de Pd/C al principio de la reacción y se añadieron durante el curso de la reacción 100 mg de Pd/C más, cada vez que disminuía la velocidad de toma de hidrógeno. Se agregan en total 400 mg de Pd/C en las 24 horas de hidrogenación.

Número de yodo.- Se usó el método de Hanus. Este consiste en tener : Solución de yodo en ácido acético glacial 6.2 g de I₂ en 0.5 l ; 25 g de Na₂S₂O₃.5H₂O en un litro (0.1 N) ; solución de KI , 16.5 g en 100 ml de agua ; solución de almidón. Se determina la concentración de yodo de la solución titulando con Na₂S₂O₃ 0.1 N (ésta a su vez se titula previamente) , con el resultado se calcula la cantidad de bromo que se debe agregar a la solución de I₂ para la formación del IBr . Para la determinación del número de yodo se añaden 25 ml de BrI al problema y a un blanco , el problema está disuelto en cloroformo a una concentración de 0.5 g en 20 ml . Agregando el BrI se deja reaccionar durante 30 min en oscuridad y con agitación ocasional . Al cabo de este tiempo se añaden 30 ml de KI y 100 ml de agua . El I₂ restante se valora con la solución de Na₂S₂O₃ ; cuando se llega a un color amarillo pálido , se agrega la solución de almidón soluble , hasta que se produce viraje a blanco ; el número de yodo se calcula por la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{volumen de Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times \text{factor (0.01269)}}{\text{peso de la muestra}} = \text{número de yodo (\%)}$$

3) SEPARACION DE LA ACTIVIDAD DE ALFA TOCOFEROL OXIDASA Y LA ACTIVIDAD ENDOGENA

Usando una columna de Sephadex G 150 se pudo lograr la separación de las dos actividades (FIGURA 1) . Se pudo demostrar además que estas actividades se suman ; la demostración se hizo por el hecho de que la lecitina comercial "La polar" da un nivel de actividad endógena en tallo y hoja mientras que usando lecitina Sigma , solo existe actividad endógena en hojas , y esta es menor que en el caso anterior. Tomando en cuenta las actividades de ambos casos, se encuentra que las diferencias entre la actividad endógena y la de alfa tocoferol oxidasa , es la misma (TABLA 5) , esto es , las dos actividades registradas se están sumando .

El método usado para ésta separación fué el uso de una columna de 30 x 1 cm , se llenó con Sephadex G 150 (Pharmacia); éste material se había hidratado en amortiguador durante 12 horas; cuando se guardó el material se hizo añadiendo azida de sodio al 0.02 %. A la columna se le hizo pasar amortiguador para eliminar la azida de sodio. Preparada la columna se pasaron 5 - ml del extracto enzimático y se tomaron fracciones de 4 ml . A cada fracción se le midieron actividad y concentración de proteínas .

Determinación de proteínas.- Método de Lowri y col. (1951) . Para éste método los materiales son: Solución A (Na_2CO_3 al 2 % en sosa 0.1 N) Solución B (Tartrato de sodio y potasio al 2% mas sulfato de cobre al 1% , estas dos soluciones mezcladas en proporción de 1:1) ; las soluciones A y B se mezclan en proporción de 40 a 1 . Reactivo de Folin-Cicalteau (Merck) , se prepara mezclándolo con agua en proporción de 1 a 1 . La solución patrón es una solución de albúmina bovina en concentración de 0.5 mg/ml . El método para la determinación es poner -- 0.5 ml de la solución problema , se agregan entonces 5 ml de la solución A y después de 10 minutos se agrega la solución B y se deja que el color desarrolle completamente durante 30 minutos , pasado este tiempo se lee a 750 nm . El patrón se hace tomando volúmenes de 0.1 a 0.5 ml de solución patrón y agregando agua

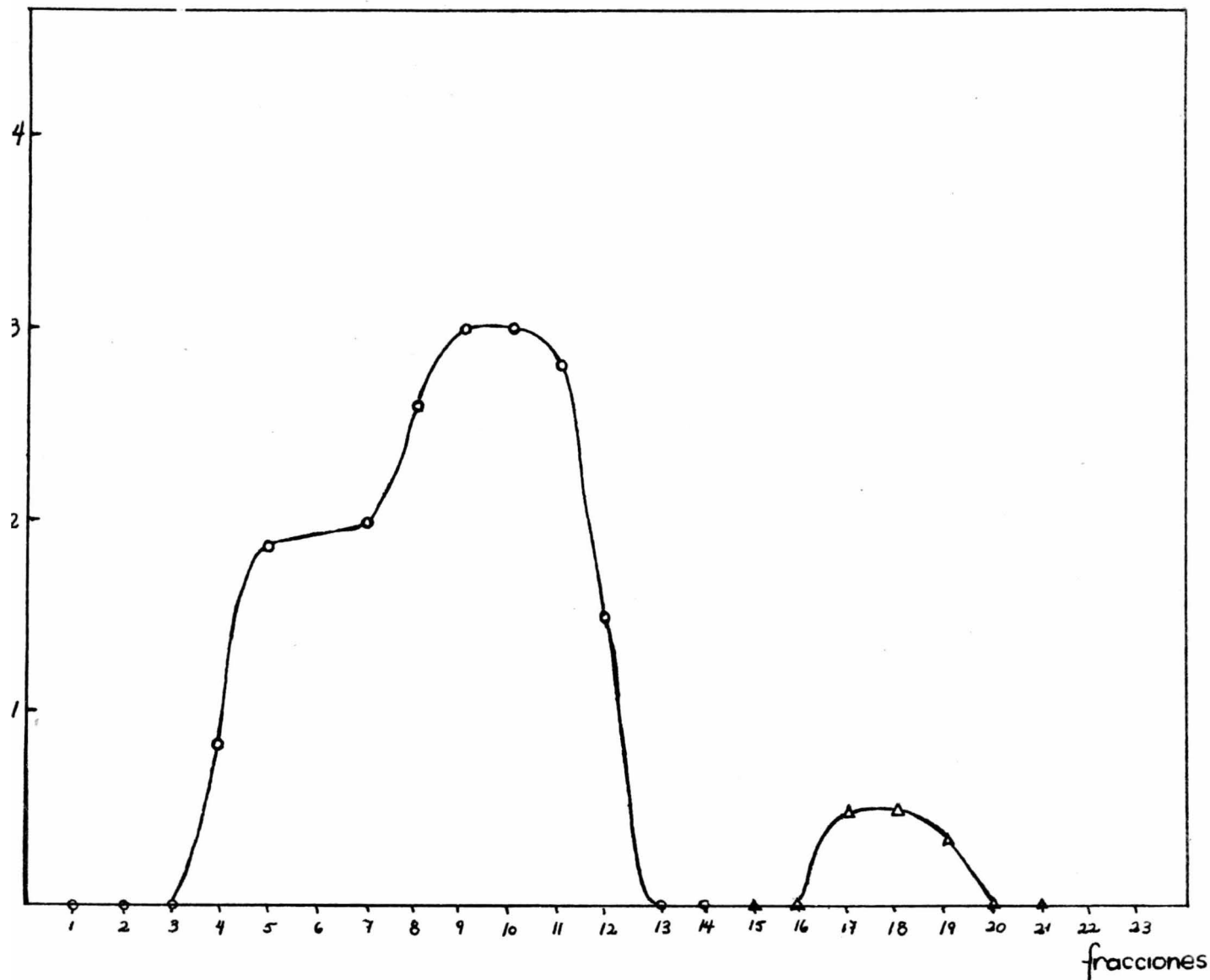


FIGURA 1 SEPARACION DE LA ACTIVIDAD ENDOGENA DE LA ACTIVIDAD DE ALFA TOCOFEROL OXIDASA EN SEPHADEX G-150 .

El material usado es planta completa de frijol negro; este material se homogeneizó en amortiguador 0.1M y pH de 5.5 . La actividad del sobrenadante de 100 000 xg fué de 14 para la actividad de la alfa tocoferol oxidasa y de 2.3 para el endógeno. La columna usada fué de 30 cm de largo , esta se llenó con Sephadex G-150 hasta 26 cm de la columna. Se pasaron 5 ml de material centrifugado a 100 000 xg ; la columna se eluyó con el mismo amortiguador , tomándose fracciones de 3 ml . El ensayo se hizo con Lecitina Sigma que da niveles bajos de endógeno, para cada fracción se midieron actividades endógenas y de alfa tocoferol oxidasa. La suma de actividad en las fracciones de alfa tocoferol oxidasa es de 19.4; este aparente aumento de actividad , se debe a la dilución. Esto se discute en el último capítulo.

TABLA 5 USO DE DOS FOSFOLÍPIDOS QUE DAN NIVELES DIFERENTES DE ACTIVIDAD ENDOGENA.

Fosfolípido empleado	Actividad de toma de O ₂ (medido como pendiente)					
	Hoja Endógeno	con α toc.	difer.	Tallo endógeno	con toc	α dif.
"La Polar"	11.93	2.36	9.57	6.55	1.12	5.43
Sigma	10.96	1.84	9.12	5.6	0	5.6

Cada valor obtenido con fosfolípido La polar es el promedio de seis experimentos; y el obtenido con fosfolípido Sigma es el promedio de cinco experimentos. El material usado fué ayocote.

TABLA 6 TIEMPO DE HOMOGENEIZACION Y ACTIVIDAD .

Tiempo	ACTIVIDAD COMO TOMA DE O ₂ (medido como pendiente)	
	sin alfa tocoferol (endógeno)	con alfa tocoferol
1 min	0.8	2.5
2 min 30 seg	1.2	11
5 min	2	5
10 min	3.48	4.2
1 min	0.6	0
1 min 30 seg	0.6	0
2 min	1.2	0.8
2 min 30 seg	1.5	0.5
3 min	1.0	6
3 min 30 seg	1.2	3.2
4 min	2.0	4.3

En el primer experimento se usó extracto de ayocote, en el segundo frijol bayo. La homogeneización fue a 4°C, en mortero, con pH de 5.5, tomando la mitad del amortiguador por peso de la muestra.

a cada uno para completar 0.5 ml , se añaden las soluciones A y B de la misma manera como se indicó antes.

4) INFLUENCIA EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA EXTRACCIÓN Y LA MANIPULACIÓN

A) TIEMPO DE HOMOGENEIZACIÓN

El tiempo inicial de homogeneización es muy importante para obtener una buena actividad . Solamente entre 2.5 y 3.5 minutos existe una actividad óptima , después de este tiempo hay un decrecimiento (TABLA 6). Para obtener resultados reproducibles se usó un tiempo de homogeneización fijo (2.5 minutos) . Este decrecimiento se debe probablemente a la inevitable formación de espuma por la presencia de saponinas .

B) EDTA , MERCAPTOETANOL Y CISTEINA

Cuando la homogeneización se hizo en presencia de EDTA, mercaptoetanol o cisteína , se encontró que ninguna de éstas -- sustancias tiene una influencia en la actividad de oxidasa del alfa tocoferol pero sí en la actividad endógena (TABLA 7) .

C) FUERZA IÓNICA

Se encontró una influencia de la fuerza iónica en la actividad enzimática , lo mismo usando sulfato de amonio que fosfato dibásico de sodio (TABLAS 9 y 8) . La influencia es positiva al aumentar la fuerza iónica, pero a altas concentraciones se tienen problemas de precipitación de las sales. Al dializar hay siempre una pérdida de actividad, sin embargo esta pérdida está condicionada a la fuerza iónica contra la que se dializa (TABLA 10) , hay una menor pérdida si se dializa contra un amortiguador 0.1 M que si se dializa contra uno de concentración 0.5 M .

D) TEMPERATURA DE ALMACENAJE

La enzima es en general estable cuando se ha obtenido el sobrenadante de la centrifugación a 100 000 X g . Sin embargo, la estabilidad es más grande si se conserva congelada que si está solamente en refrigeración (4°C). A temperatura ambiente

TABLA 7 INFLUENCIA DE EDTA, CISTEÍNA, Y MERCAPTOETANOL EN LA ACTIVIDAD.

Concentración	Actividad como toma de O ₂ (pendiente)	
	Endógeno	con alfa tocoferol
Mercaptoetanol 0.01 M	2	10
Mercaptoetanol 0.05 M	3	8
Mercaptoetanol 0.1 M	3	10
Cisteína 0.01 M	4	7
Cisteína 0.05 M	4.5	9.2
Cisteína 0.1 M	9.5	9.5
EDTA 0.01 M	3.5	11
EDTA 0.05 M	3	9.5
EDTA 0.1 M	4	12.5

Cada una de las sustancias usadas se disolvió en el amortiguador en la concentración indicada. Con este amortiguador se homogeneizó el material (ayocote); este mismo amortiguador se usó para el ensayo enzimático.

TABLA 8 INFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA (SULFATO DE AMONIO).

Concentración de Sulfato de Amonio	Actividad medida como toma de Oxígeno	
	Endógeno	con alfa tocoferol
1%	1.2	2.14
2%	2.0	1.2
3%	2.5	1.0
4%	5.0	1.5
5%	4.5	1.2
10%	4.5	1.2
15%	1.0	0.0
20%	0.0	0.0

La homogeneización se llevó a cabo con el amortiguador usual, el ensayo enzimático se llevó a cabo con soluciones de sulfato de amonio señaladas.

TABLA 9 INFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA (Na_2HPO_4)

Molaridad de Na_2HPO_4	Actividad medida como toma de Oxígeno endógeno	con alfa tocoferol
0.01 M	1.5	3
0.05M	1.2	11
0.1 M	2.0	10
1.0 M	2.0	13

La homogeneización y el ensayo enzimático se hicieron con el mismo amortiguador y con la respectiva molaridad. La molaridad real es mas alta porque no se tomó en cuenta el citrato con el que se ajustó el pH.

TABLA 10 INFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA EN LA ESTABILIDAD DE LA ENZIMA A LA DIÁLISIS.

	Actividad medida como toma de O_2 (pendiente) endógeno	con alfa tocoferol
Actividad antes de diálisis	2.5	4
Diálisis contra 0.05 M	1.95	2.97
Diálisis contra 0.1 M	1.8	3.92

Los resultados son el promedio de cuatro diálisis diferentes con el mismo material y al mismo tiempo. El material se homogeneizó en amortiguador de molaridad 0.05. La diálisis fué durante 12 horas en cuarto frío y con agitación continua.

es menos estable que a refrigeración . (TABLA 11)

E) COLUMNAS DE SEPHADEX

El paso de cualquier material en que haya actividad - enzimática por columnas de Sephadex G 25 o G 150 no altera la actividad de la enzima . Esto se puede apreciar en la suma de - actividades de cada fracción obtenida en una columna de Sephadex G 25 (TABLA 12) o G 150 (TABLA 13) .

F) LIOFILIZACION

A las actividades de oxidasa de alfa tocoferol y de endógeno , no las afecta por igual la liofilización , ya que una muestra liofilizada por 4 horas hasta la eliminación completa de agua , perdió casi toda la actividad de oxidasa de alfa tocoferol , pero conservó parte de la actividad endógena. Esto sucedió al resuspender el material liofolizado en 5 ml de agua y luego pasado éste por una columna de Sephadex G 150 .

5) ACTIVIDAD OPTIMA DE LA ENZIMA

A) CONCENTRACIÓN DE ALFA TOCOFEROL

Para la actividad enzimática del extracto de ayocote la concentración óptima de alfa tocoferol es de 2.23 mM , esto fué igual que para frijol bayo; la Km probable es de 0.67 mM para el ayocote , y de 0.59 para el frijol bayo.(FIGURAS 2 y 3)

B) pH OPTIMO

En chícharo de acuerdo con Barlow y Gaunt (1972) el pH óptimo del sistema es de 5.5 ; éste fué también el pH óptimo encontrado para el sistema del ayocote y del frijol bayo . (FIGURA 4 , TABLA 14)

C) CONCENTRACION DE FOSFOLIPIDOS

Usando la lecitina Sigma , se encontró que hasta 5 mg/ml hay una relación mas o menos lineal entre la concentración de fosfolípidos y la actividad enzimática . De 5 mg/ml a 20 mg/ml no hay cambios significativos en la actividad , pero aumentando la concentración de fosfolípidos aún más , hay una pérdida total de la actividad del fosfolípido como cofactor , de

TABLA 11 EFECTO EN LA ENZIMA DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAJE.

Condición	Actividad como toma de Oxígeno (pendiente)	
	Endógeno	con alfa tocoferol
Antes de almacenamiento	2.2	10.0
Temperatura ambiente (24 horas)	2.5	6.0
Temperatura ambiente (una semana)	1.8	2.8
4°C (48 horas)	2.0	7.5
4°C (una semana)	2.0	7.6
Congelación (48 horas)	2.0	9.5
Congelación (una semana)	2.0	9.5

El material usado fué ayocote, en todos los casos, despues del almasenaje ,hay material que precipita (no tiene actividad ni endógena ni de oxidasa del alfa tocoferol) ; se eliminó este material por medio de un embudo Büchner (tratando de evitar la formación de espuma); antes y despues de esta filtración la actividad es prácticante la misma.

TABLA 12 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA AL PASO POR SEPHADEX G-25

Fracción	Actividad como toma de oxígeno (pendiente)
4	1.8
5	3.86
6	3.65
7	0.75
Suma de actividades	10.06
Actividad original	7.5

Las fracciones 4y 5 son la diferencia de actividad del endógeno y de el ensayo con alfa tocoferol. Cada fracción es de 4 ml .

TABLA 13 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA AL PASO POR SEPHADEX G-150

Fracción	Actividad como toma de O ₂ (pendiente)
4	0.8
5	1.75
6	2
7	2.6
8	3
9	3
10	2.8
11	1.5
Suma de actividades	17.45
Actividad original	12.5

Cada fracción tiene 3 ml . Esta columna como la anterior es de 30 cm de largo , el material se eluyó con el buffer de Na₂HPO₄-citratato, pH 5.5 y 0.1 M .

El hecho de que exista más actividad en la suma de actividades se verá en la discusión.

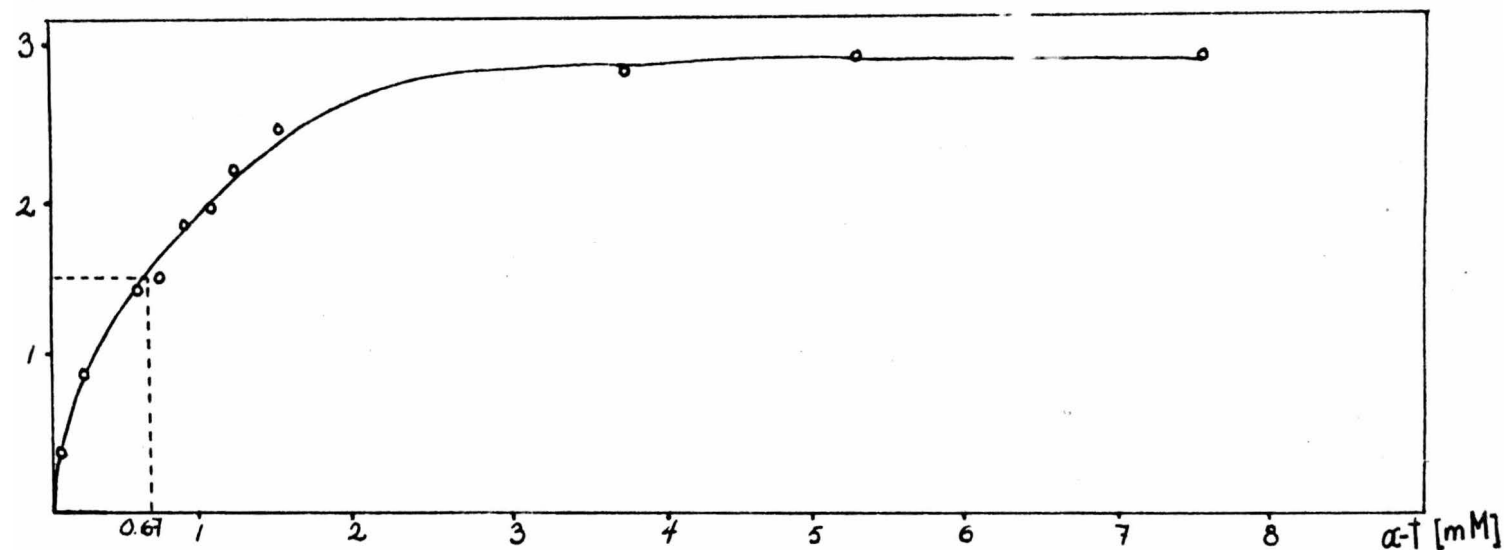


FIGURA N° 2 ACTIVIDAD DE ALFA TOCOFEROL OXIDASA, CONTRA CONCENTRACION DE ALFA TOCOFEROL

El material es ayocote, se usó la planta completa. Los ensayos se hicieron a pH de 6.8 y el amortiguador es 0.05 M. El alfa tocoferol se introdujo como solución alcohólica .

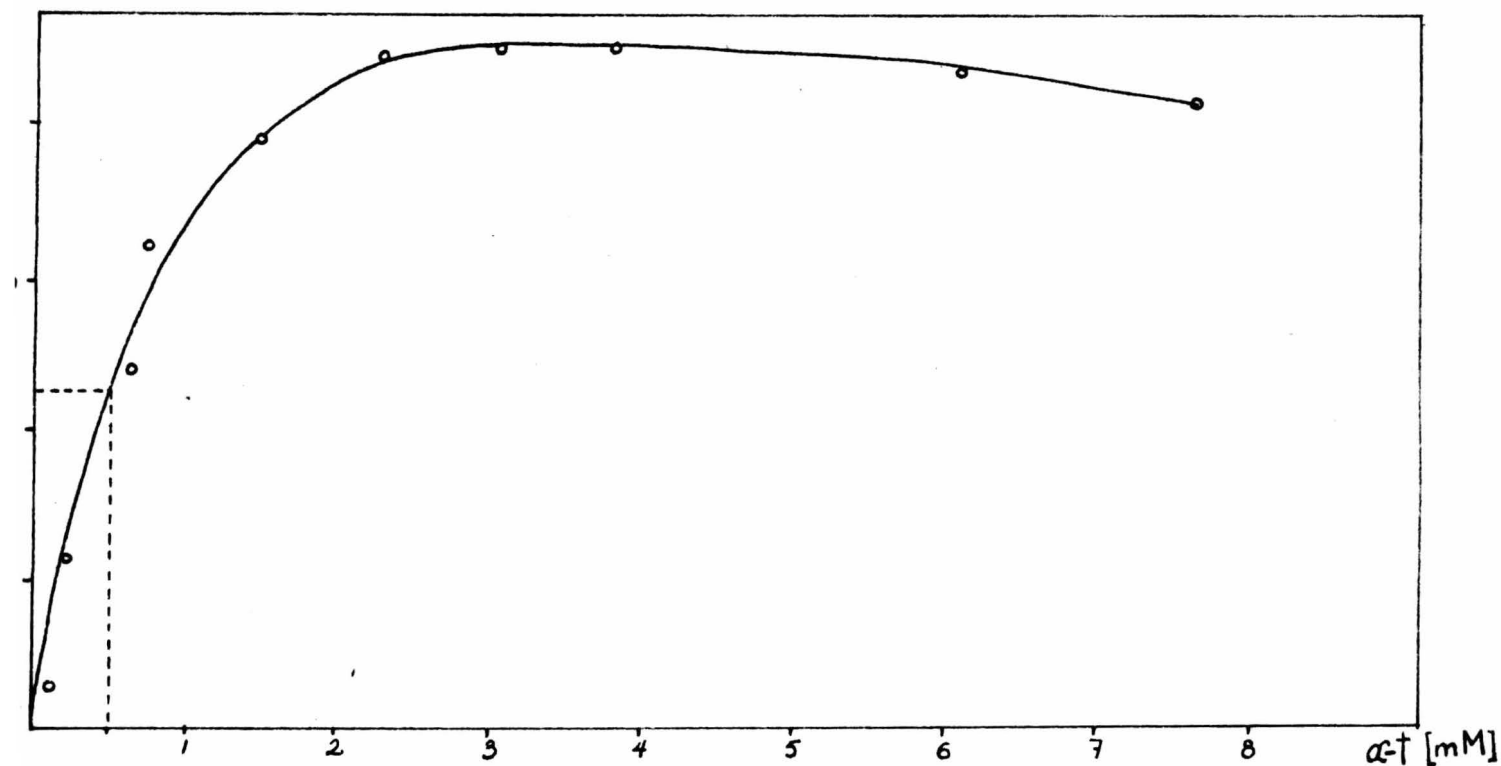


FIGURA N° 3 ACTIVIDAD DE ALFA TOCOFEROL OXIDASA , CONTRA CONCENTRACION DE ALFA TOCOFEROL.

El material usado fué raíz de frijol bayo. El amortiguador es de pH 5.5 y con una molaridad de 0.1 M. El alfa tocoferol se introdujo a la mezcla de reacción como solución alcohólica.

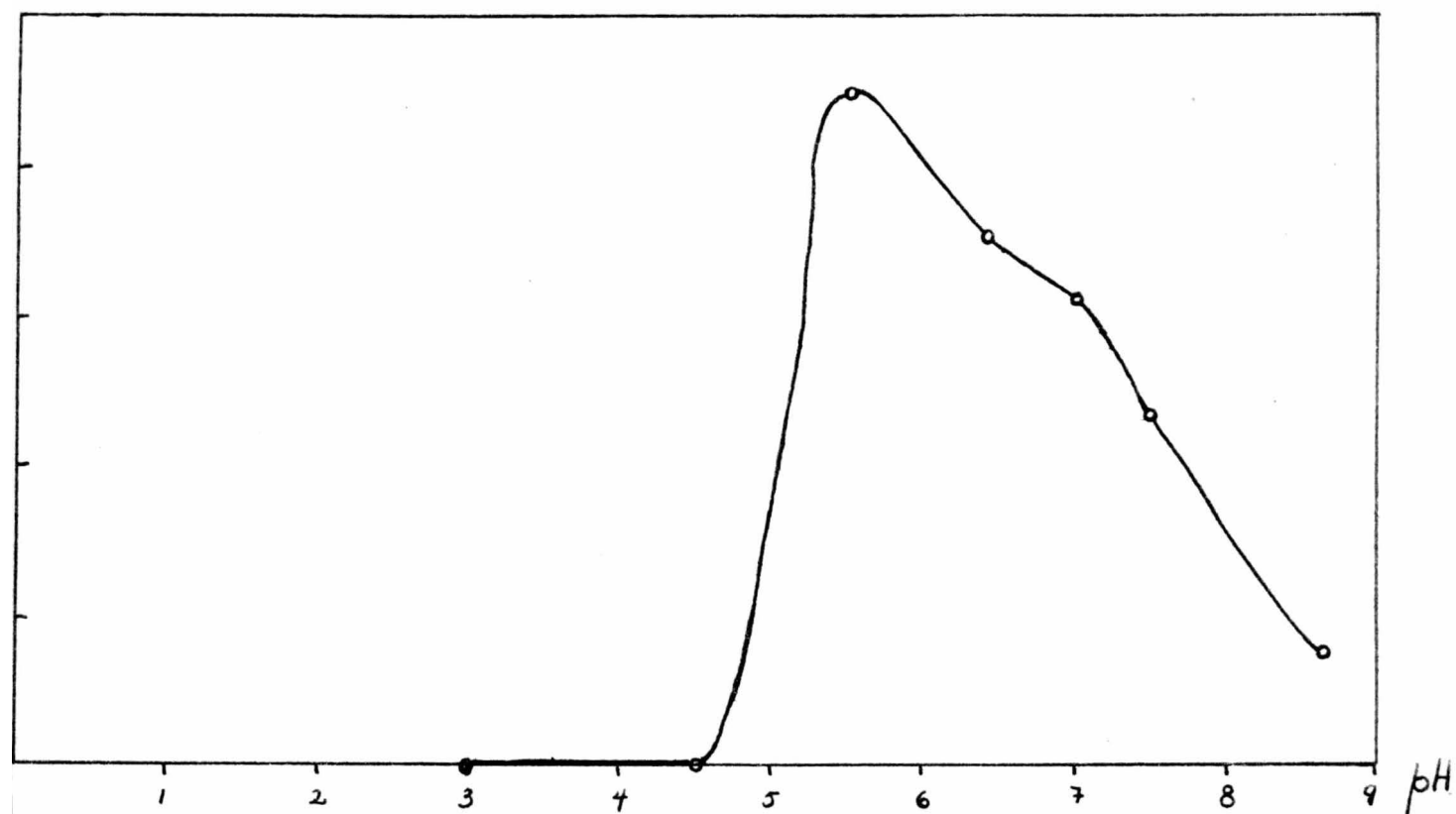


FIGURA N° 4 CURVA DE ACTIVIDAD DE ALFA TOCOFEROL OXIDASA
CONTRA DIFERENTES pH .

Los pH son los tomados despues de la reaccion.

Se usó para los ensayos la raiz del ayocote. El amortiguador usado es de 0.1 M .

La actividad esta dada por la pendiente de la gráfica obtenida.

La velocidad de graficacion es de 0.2 pulgadas/minuto.

TABLA 14 pH OPTIMO PARA LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA

Ayocote

pH	pendiente
3	0
3.8	0
4.5	0
5.5	4.5
6.4	3.6
7	3.2
7.5	2.8
8.6	0.8

Frijol negro

pH	pendiente
3.2	0
5.6	4.0
6.5	3.8
7.5	2.5

Soya

pH	pendiente
3.2	0
5.5	7.5
6.3	7.0
7.8	5.5

Frijol beyo

pH	pendiente
3.1	0.0
5.5	9.2
6.7	7.5
7.5	7.0

Alfalfa

pH	pendiente
3.5	0.0
5.7	2.4
6.7	2.0
7.5	1.6

Los pH expresados , son los tomados despues de llevada a cabo la reaccion. Para el ayocote se tomo la raiz, igual que - para todos los demás casos , excepto en la alfalfa, en donde se usó toda la planta como extracto. La molaridad del amortiguador usado fue de 0.1 M en todos los casos.

tal manera que no se registra actividad enzimática . (FIGURA 5)

6) REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

Los niveles de actividad y la concentración de proteínas fué bastante reproducible de ensayo a ensayo usando las manipulaciones y las concentraciones que parecen ser las óptimas. (TABLA 15)

7) NIVELES DE ENZIMA

A) DURANTE LA GERMINACION

El ayocote sembrado en Agrolita se dejó germinar tomándose las partes en crecimiento de la planta (esto es sin tomar en cuenta los cotiledones), la medición no se empezó sino hasta el cuarto día , cuando hubo suficiente material para realizar la extracción ; la máxima actividad se alcanzó en el día noveno , después de éste día no hubo un aumento sensible . (FIGURA 6)

B) EN HARINA DE SEMILLAS

De las semillas se obtuvo un polvo pasando las semillas por un molino ; al material obtenido se le agregó amortiguador en dos veces el volumen de su peso. Se homogeneizó en un homogeneizador eléctrico (Virtis), durante 5 minutos ; este material se centrifugó a 20 000 RPM durante 20 minutos, el sobrenadante obtenido se centrifugó a 100 000 X g por una hora en un rotor (SW 30.3) . El sobrenadante se utilizó como material de ensayo y para purificación . Cuando se midieron los niveles de enzima en este material , se encontró endógeno en todos ; los niveles de oxidasa del alfa tocoferol y de endógeno difieren de semilla a semilla , los más altos fueron para el ayocote con respecto a la oxidasa del alfa tocoferol , mientras la soya tuvo los más altos niveles de endógeno ; aquí hubo siempre problemas de extracción por los altos niveles de lípidos que contiene . (TABLA 16)

m

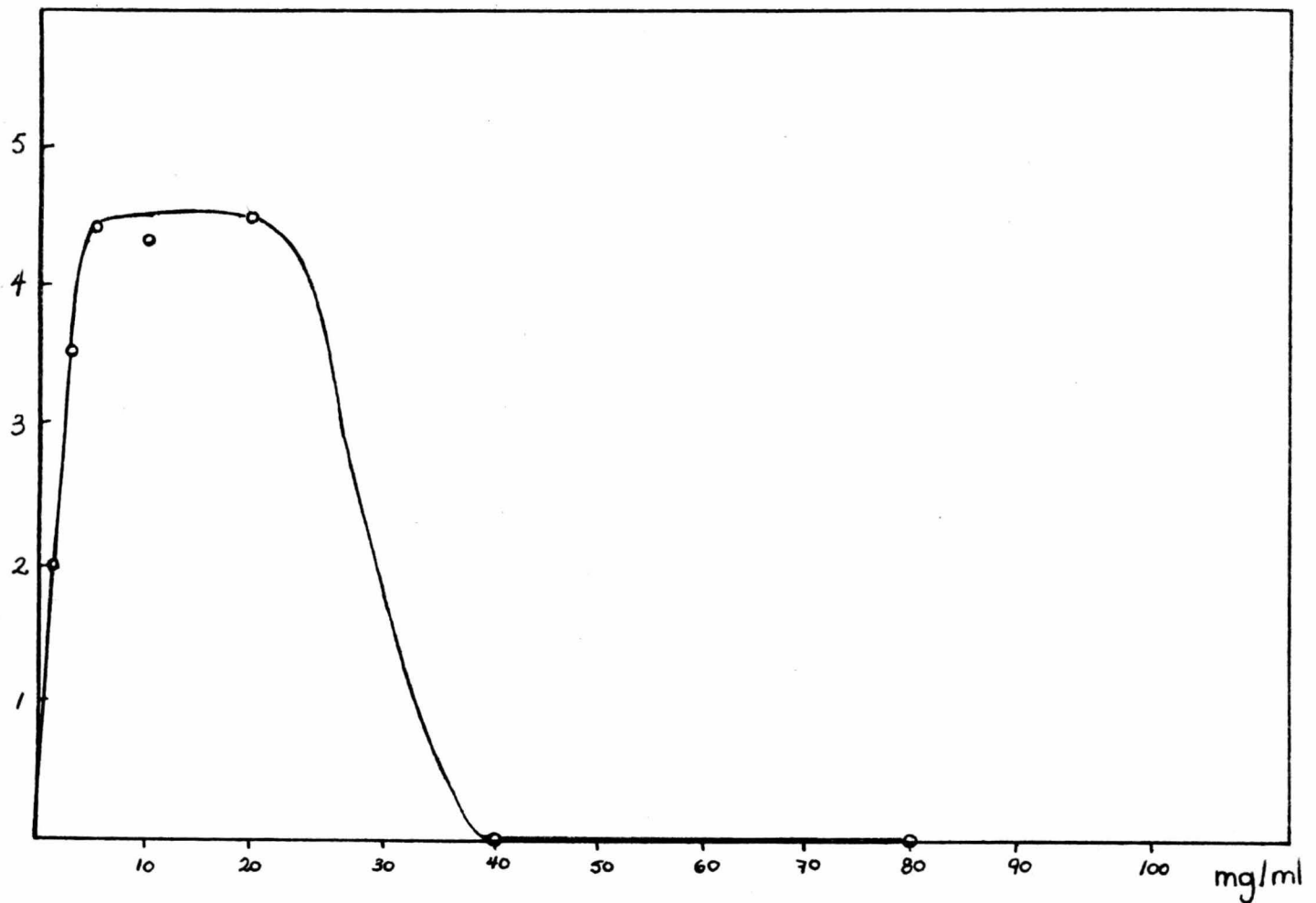


FIGURA N° 5 ACTIVIDAD DE LA OXIDASA DEL ALFA TOCOFEROL CONTRA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFOLÍPIDO.

Se usó el extracto de raíz de frijol bayo; el fosfolípido se emulsificó en el amortiguador usado para la extracción. El fosfolípido se introdujo en la mezcla del ensayo enzimático en un volumen de 0.2 ml, conteniendo las diferentes concentraciones de fosfolípido (el fosfolípido usado fue Lecitina Sigma) La reacción se llevó a cabo en amortiguador de pH 5.5 y 0.1M. La concentración de alfa tocoferol fué de 3 mg/ml. La actividad se mide como pendiente de graficación; la velocidad de graficación es de 0.2 pulg/ min.

TABLA 16 NIVELES ENZIMATICOS EN SEMILLAS

Semilla	Actividad medida como toma de O ₂ (pendiente) endógeno	con alfa tocoferol
Ayocote	0.33	3.5
Soya	0.8	2.0
Frijol negro	0.49	1.5
Frijol bayo	0.65	1.4
Frijol canario	0.5	1.75
Frijol cacahuete	0.4	1.9
Alfalfa	0.0	0.66

Se usó como material inicial polvo de cada semilla; se usó el doble de amortiguador del peso de la muestra (4 veces mas amortiguador que en los ensayos de las otras partes da la planta)

TABLA 15 NIVELES DE ACTIVIDAD Y DE PROTEINAS

Material usado	Actividad medida como toma de O ₂ (pendiente) oxidasa del alfa tocoferol	Proteinas
Planta total	12.0	4 mg/ml
Planta total	12.0	3.9 mg/ml
Hoja	14.0	8.13 mg/ml
Hoja	14.0	7.88 mg/ml
Raiz	4.5	5.44 mg/ml
Raiz	4.5	5.63 mg/ml
Raiz	4.5	5.22 mg/ml
Tallo	10.0	1.8 mg/ml
Tallo	10.0	2.36 mg/ml
Tallo	10.0	1.75 mg/ml

Se usó frijol bayo; se tomaron muestras que tenían la misma actividad para determinar las proteínas. La determinación proteica se hizo por el método de Lowri.

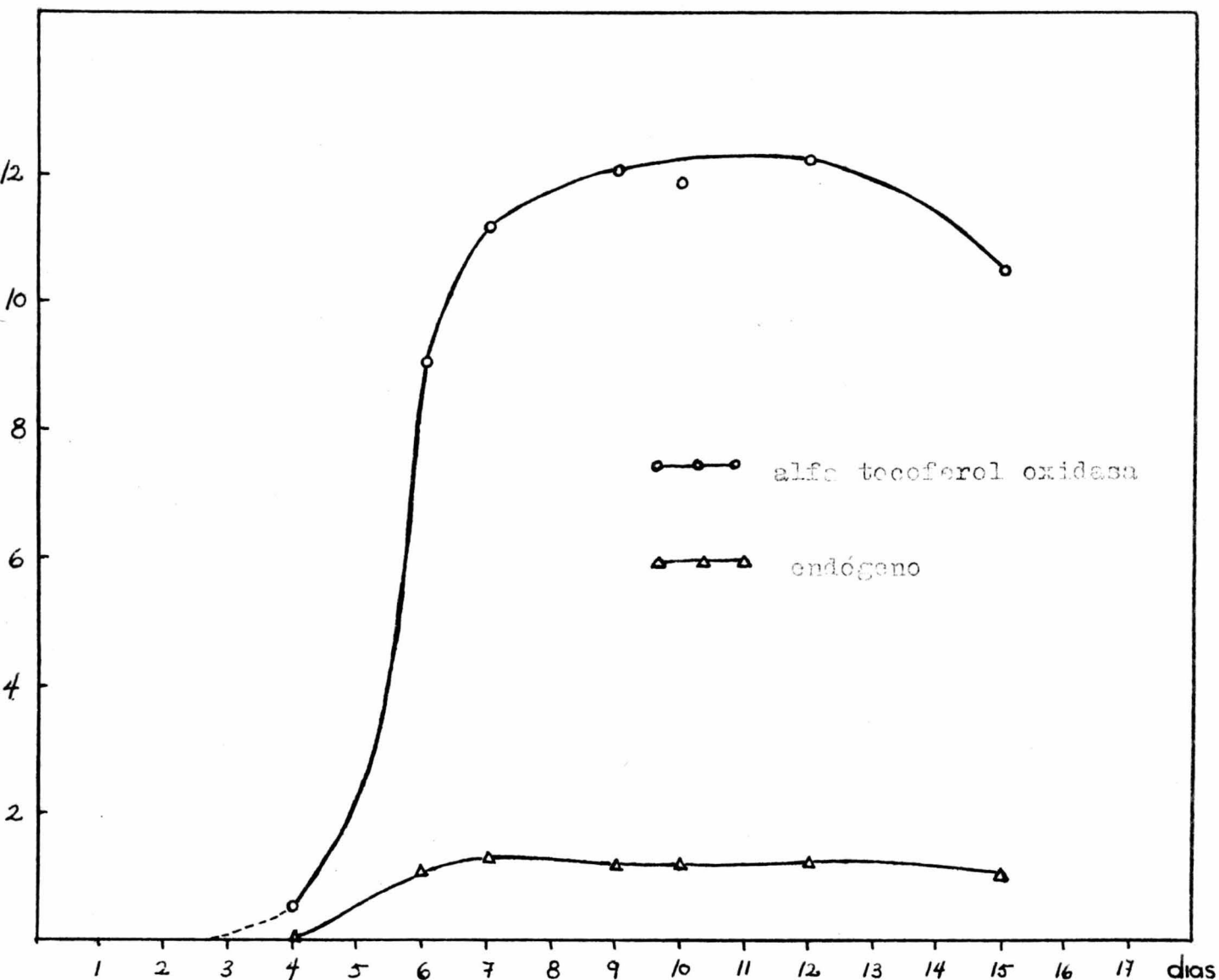


FIGURA N^o 6 NIVELES DE ENZIMA EN LAS PARTES GERMINANTES DE AYOCOTE CONTRA TIEMPO DE GERMINACION.

Se usaron las partes en germinación de una planta de Ayocote, los crecimientos no fueron homogéneos, así que en los días en que se hicieron los ensayos, se tomaron solamente las plantas que estaban en el estadio típico de ese día.

Al cuarto día había ya raíz, al sexto los cotiledones están ya abriéndose para dejar salir las hojas; al día noveno la planta está ya completamente desarrollada; el día decimoquinto ya se aprecian brotes de hojas secundarias.

C) EN OTRAS PARTES DE PLANTAS DE DIFERENTES ESPECIES

Para obtener los niveles de cada parte de las plántulas se tomó el material correspondiente para obtener el extracto . De un mismo lote de plantas se obtuvieron varios extractos por separado ; siendo la diferencia de cada uno a partir de la homogeneización . Los resultados de cada una de las especies se da en la TABLA 17 , lo más sobresaliente de estos resultados , es que se encontró endógeno exclusivamente en las hojas.

8) ESTABILIDAD DE LA ENZIMA AL COCER LA SEMILLA

El polvo de las semillas se puso en amortiguador hirviendo , se tomaron los materiales a diferentes tiempos . Cuando se llegó al tiempo deseado de cocimiento se agregó amortiguador hasta tener un volumen de dos veces el peso de la muestra, de aquí se obtuvo el extracto enzimático . Las semillas se pusieron en agua hirviendo directamente , hasta completar el tiempo deseado. Se molieron en licuadora con amortiguador (dos veces su peso en volumen) y se obtuvieron extractos enzimáticos .

Con este tratamiento , a los 10 minutos hay ya una pérdida apreciable en la actividad de la enzima en semillas , pero no es sino hasta los 20 minutos cuando se ha perdido casi toda la actividad . En el caso del polvo de las semillas , la pérdida de la actividad comienza desde el primer minuto , y a los 10 minutos ya no existe actividad medible . (TABLA 18)

9) PURIFICACION PARCIAL

El extracto enzimático crudo , se precipitó con sulfato de amonio al 40 % , 60% , 80% y saturación ; solamente se encontró actividad en la fracción precipitada con el sulfato de amonio al 40% , este precipitado se recuperó por centrifugación y se resuspendió en el menor volumen de amortiguador (pH 5.5 , y 0.1 M) . Esta fracción se calentó a 60°C por 15 minutos , se enfrió inmediatamente después en hielo ; habiendo una abundante precipitación . Se recuperó el sobrenadante centrifugando a --- 20 000 RPM por 10 minutos , y se midió la actividad y la concen

TABLA 17

NIVELES DE OXIDASA DEL ALFA TOCOFEROL EN DIFERENTES ESPECIES.

Material	Media aritmética.	Varianza (s^2)	Número de muestras.
FRIJOL CANARIO			
raiz	4.39	0.0189	10
tallo	10.18	0.0257	10
hoja	12.19	0.0409	10
FRIJOL NEGRO			
raiz	3.2	0.074	10
tallo	5.1	0.082	10
hoja	7.58	0.31	8
FRIJOL BAYO			
raiz	8.72	0.103	10
tallo	4.37	0.082	10
hoja	10.56	1.005	8
AYOCOTE			
raiz	4.3	0.081	10
tallo	5.6	0.073	10
raiz	9.12	0.621	10
SOYA			
raiz	7.1	0.107	10
tallo	11.5	1.785	7
hoja	11.86	0.408	4
ALFALFA			
Planta completa	2.066	0.002	4

En cada caso el material usado es del mismo grupo de plantas, se varió para cada caso desde la homogeneización del material. En todos los casos se hizo la extracción y el ensayo con amortiguador 0.1 M y pH de 5.5; las plantas tenían entre 12 y 15 días de germinación. Cuando se encontró endógeno, se restó este valor del valor obtenido del ensayo con alfa tocoferol.

TABLA 18 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA AL COCER INTENSO

Tiempo (minutos)	Actividad de toma de Oxígeno (pendiente)	
	Harina	Semilla
<u>EN FRIJOL BAYO</u>		
0	1.5	1.8
1	0.8	1.8
5	0.4	1.5
10	0.0	0.8
20	0.0	0.8
30	0.0	0.0
60	0.0	0.0
<u>EN AYOCOTE</u>		
0	3.5	2.8
1	2.5	2.5
5	0.5	2.0
10	0.0	1.2
20	0.0	0.6
30	0.0	0.0
60	0.0	0.0

Los tiempos indican tiempo de ebullición del material. No se tomó en cuenta la actividad endógena, esto es, los valores obtenidos se restaron de la actividad endógena; aunque esta última también desapareció, más o menos a la misma velocidad.

tración de proteínas . La actividad se perdió , pero se restituyó al agregarse 0.2 ml de una solución de sulfato de cobre -- 5×10^{-4} M en la mezcla de ensayo enzimático . El sobrenadante de la precipitación con calor se pasó por una columna de Sephadex G 150 (Pharmacia) de 30 x 1 cm ; se tomaron fracciones de 4 ml cada una ; la actividad se encontró solamente en las fracciones 5 y 6 . (TABLA 19)

La enzima no se comporta linealmente al diluirla , esto se hizo más patente al medir la actividad enzimática después de cada paso de purificación ; por ello se trataron varias diluciones para cada ensayo , se tomó aquella que daba los más altos índices de actividad al multiplicarla por la actividad . (FIGURA 7)

TABLA 19

PURIFICACION PARCIAL DE LA OXIDASA DEL ALFA TOCOPEROYL

Tratamiento	Actividad (U arbitrarias)	Volumen ensayado	Dilución (volumen fi- nal)	Rendimiento (U arbitrarias)	Proteínas (mg/ml)	Actividad específica. (U/mg de prote- inas.
Inicial	1.38 (x5)	0.2	30 ml	1 035	96.2	0.0143
Precipitación con $(NH_4)_2SO_4$	0.84(x100)	0.2	7 ml	2 940	5.94	0.141
Calentamiento por 15 min a 60°C.	0.49(100)	0.2	7 ml	1 715	0.77	0.635
Columna de Sephadex G-150						
Fracción 5	0.3(x50)	0.2	4 ml	300	0.111	0.272
Fracción 6	0.3(x50)	0.2	4 ml	300	0.112	0.270
Total				600		

El ensayo se hizo con polvo de semillas de ayocote, agregando dos veces en volumen el peso del material. Para cada ensayo se probaron varias diluciones y se tomó aquella que daba rendimientos mas altos. Con la dilución hecha se midieron las proteínas (método de Lowry et al.), a las fracciones de la columna se les midieron proteínas por D.O. a 280 nm. Siempre se dializó el material antes de medir proteínas. Las unidades de actividad son arbitrarias, y estan dadas por la pendiente de la gráfica resultante de la toma de oxígeno.

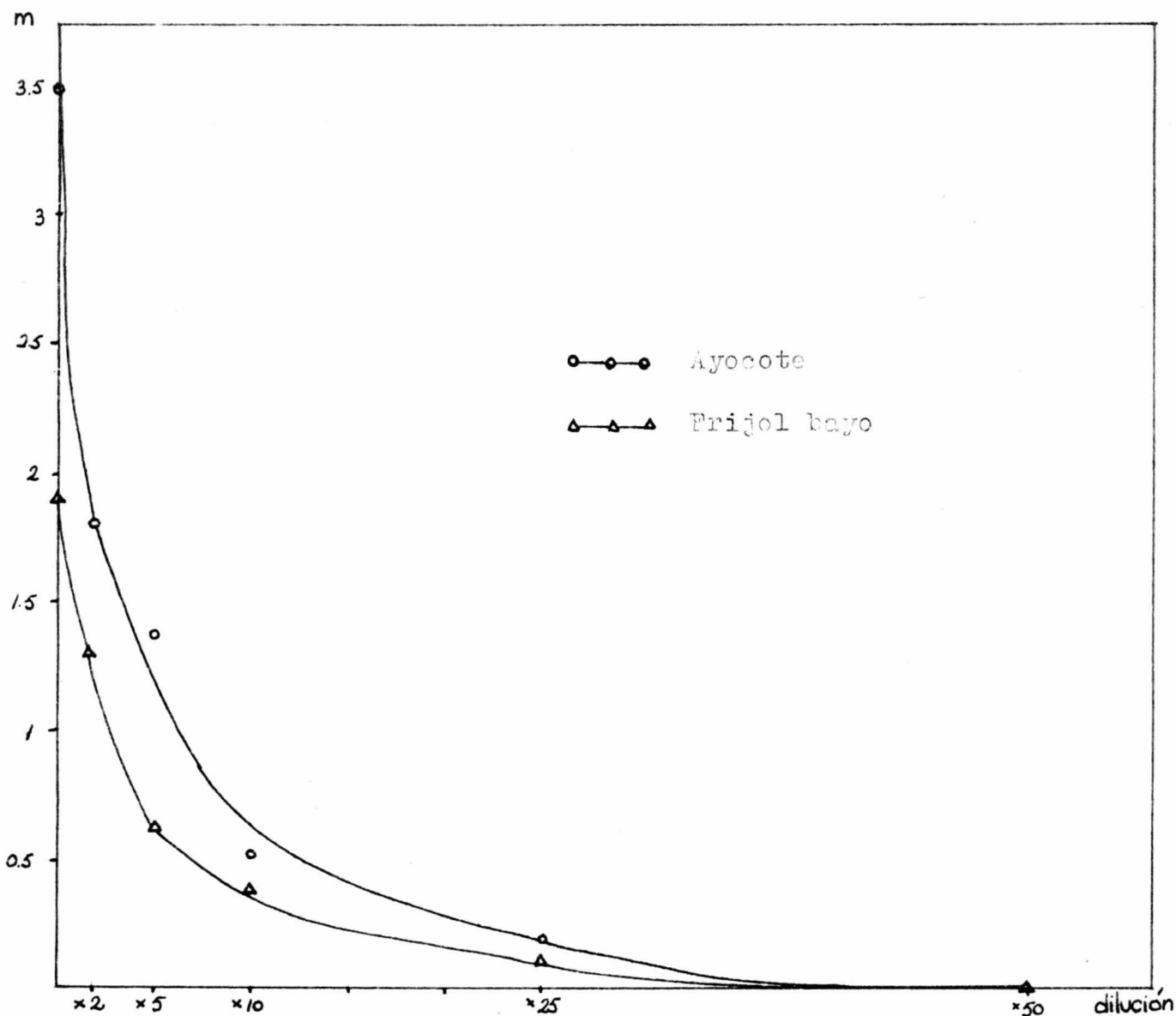


FIGURA N° 7 ESPACIO DE DILUCION

Usando extracto enzimático de harina de ayocote (○—○—○) se midieron las actividades a las diferentes diluciones ; usando para diluir amortiguador de fosfatos-citrato pH 5.5 y molaridad de 0.1 . Se añadió además a cada ensayo 0.2 ml de una solución de CuSO_4 $5 \times 10^{-4} \text{M}$. Usando las mismas condiciones se probó el extracto enzimático de harina de frijol bayo (▲—▲—▲).

CAPITULO III

DISCUSION

En el trabajo de Barlow y Gaunt (1972) no se reporta la existencia de una actividad endógena. Sin embargo en este trabajo fué uno de los problemas mas importantes, el hecho de hidrogenar muestras de fosfolípidos extraídos de ayocote (Phascolus coccineus) no evitó el endógeno, sin embargo lo redujo (TABLA 1); esto mismo sucedió con las fracciones eluidas con metanol cloroformo 2:1, y metanol (TABLA 4) de una muestra de lecitina comercial La Polar esto es una evidencia de que el problema de la actividad endógena esta relacionada con el nivel de insaturaciones de los fosfolípidos. Esta evidencia proviene del hecho de que los niveles de endógeno son mas o menos proporcionales a los valores obtenidos para el número de yodo (TABLA 1 y 4). Sin embargo contra lo que se hubiera pensado, la lipooxigenasa no esta involucrada, ya que añadiendo esto a un ensayo, no aumentó la actividad endógena (Gaunt, comunicación personal).

Al realizarse la separación de las diferentes fracciones de lecitina La Polar solo se encontró que tenía un 5.3% de material eluible con metanol, sin embargo las demás fracciones tuvieron además de actividad endógena, actividad de alfa tocoferol oxidasa (obtenida por sustracción de ensayo con y sin alfa tocoferol), esta última actividad va en aumento a medida que la elución va de cloroformo a metanol; este aumento se debe quizá a que el fosfolípido se encuentra desde la primera fracción (TABLA 3) (ya que usando sustancias puras nunca hay actividad en ausencia de fosfolípidos Barlow & Gaunt 1972). La causa de no haber obtenido la hidrogenación total se debió quizá a que la técnica usada no se ajustó en todos sus detalles (se usó Pd/C en lugar de Platino, y la presión usada fué de 1 p.s.i. en lugar de 4). Las actividades (endógena y de alfa tocoferol oxidasa) fueron perfectamente separables de una columna de Sephadex G-150 por lo que se puede deducir que no hay una dependencia entre las dos actividades, y están simplemente superpuestas. (FIGURA 1)

Esto se viene a confirmar por el hecho de que con dos tipos diferentes de fosfolípidos que dan niveles diferentes de endógeno se encuentra una diferencia prácticamente igual de oxidasa de alfa tocoferol. (TABLA 5)

Durante la extracción hay una pérdida de actividad después de haber llegado a un máximo (2.5 a 3.5 min) sin embargo el endógeno tiene un aumento mas o menos lineal(TABLA 6),esto se debe quizá a que los materiales empleados tienen una gran cantidad de saponinas que producen una gran cantidad de espuma que no puede evitarse. Esta espuma produce la pérdida de actividad de la oxidasa del alfa tocoferol debido probablemente a que esta enzima es muy sensible a la desnaturalización por espuma; por otro lado el aumento del endógeno se debe probablemente a que cada vez hay mejor homogeneización con la subsecuente liberación del sistema responsable del endógeno, este por sus características no sería tan sensible a la desnaturalización por la espuma.

El hecho de que la enzima no esté afectada por reactivos protectores de grupos sulfhidrilo indican que estos no están presentes en sitios activos de la enzima(TABLA 7),o que no afectan la conformación para que la enzima sea activa. El EDTA no tuvo ningún efecto, esto habría hecho pensar que no estaban involucrados iones divalentes. (TABLA 7)

La fuerza iónica, al contrario del sistema en chícharo (Barlow & Gaunt),tiene una gran influencia en la actividad de los sistemas probados (TABLAS 8 y 9).Esto se pudo advertir sobre todo al dializar un extracto contra diferentes fuerzas iónicas, en el caso de una concentración del amortiguador de 0.05 M, hay una pérdida de actividad cuando se dializa contra una concentración igual, la pérdida es mucho menor si se dializa contra una solución 0.1 M; (TABLA 10) esto puede deberse a que,ya que el Cu (II) es un cofactor de la enzima,la retención de este factor esta ayudado por la fuerza iónica del medio; o sea que, a concentraciones mas altas de iones, la enzima es mas capaz de retener el ion Cu (II) o a perderlo con mayor dificultad. El ion estaría tan unido a la enzima que el EDTA no sería capaz de quitarlo; esto expli

caría el hecho de que en presencia de EDTA no hay disminución de actividad.

Otra alternativa es que la enzima tiene mayor estabilidad de la conformación molecular de la enzima a altas concentraciones de iones.

La enzima no conserva totalmente su actividad a ninguna temperatura, sin embargo en congelación conserva su actividad (TABLA 11), esto es lógico si se piensa que el extracto de 100.000 gravedades tiene una gran cantidad de sustancias oxidantes y enzimas proteolíticas, estos factores serían más activos a temperatura ambiente que a congelación.

Por las concentraciones óptimas de alfa tocoferol y el pH óptimo (FIGURAS 2,3 y 4) (TABLA 14), las enzimas probadas deben ser muy similares; esto es lógico si se piensa que todas pertenecen a las leguminosas y por ello filogenéticamente relacionadas. Pero comparándolas con el sistema de Barlow y Gaunt (1972) se encuentra que la concentración óptima de alfa tocoferol y la K_m en chícharo (1.3 y 0.25 respectivamente) son más bajas que en los sistemas probados en este trabajo.

El papel del fosfolípido no se ha podido dilucidar, sin embargo se puede pensar que se forman vesículas de fosfolípido endonde puede llevarse a cabo la reacción de una molécula hidrofílica (la enzima) y una lipofílica (alfa tocoferol). Aumentando la concentración de fosfolípidos se forman micelas que englobarían al alfa tocoferol y no permitiría esto la interacción entre la enzima y su sustrato. (FIGURA 5)

La enzima resultó ser sensible a la cocción a 100°C en el polvo de las semillas y en las semillas enteras, esto hace pensar que cuando las semillas han tenido una pequeña cocción la enzima pierde su actividad y no puede producir ningún efecto nocivo. (TABLA 18)

El hecho de que la enzima requiera Cu(II) como cofactor unido al hecho de que el fosfolípido sea también un cofactor, y que el etanol aumente su actividad (Barlow y Gaunt 1972) hacen de la enzima muy seguramente una enzima de la clase de las fonolasas ya que algunas de ellas tienen estas mismas ca-

racterísticas.(Mahaler y Cordes 1972)

Se encontró que cuando la enzima se diluye, no hay un decrecimiento lineal de actividad como se esperaría(FIGURA 7).Esto se pudo apreciar mejor durante la purificación, ya que fué posible diluir la enzima incluso hasta 100 veces en algunos casos para obtener un valor de actividad que parece más cercano al real.

Se ha encontrado que muchas proteínas pueden inhibir la enzima a bajas concentraciones. Probablemente este efecto no es específico, sino que se debe a una competencia por fosfolípidos (Gaunt comunicación personal).Por esto quizá a la enzima se le pueda medir su actividad real solamente cuando no existan estas proteínas inespecíficas.

Por los resultados del estudio de esta enzima puede pensarse que no representa ninguna posibilidad de toxicidad para la población que consume los productos estudiados, por su labilidad a la cocción; sin embargo los animales pueden consumir estas leguminosas como ensilage fresco o como materia seca, en este caso pueden relacionarse los trastornos descritos en algunos animales como hipovitaminosis E (Leidler 1971). Por ello sería de interés práctico investigar la actividad enzimática directamente en los productos alimenticios para animales (especialmente herbívoros).

La enzima pura puede tener una gran utilidad en la investigación de membranas, ya que no se han encontrado métodos que eliminen específicamente la actividad del alfa tocoferol; y esta vitamina está ampliamente distribuida en las membranas biológicas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- S.M. Barlow and J.K. Gaunt
Phytochemistry 11: 2161-2170 (1972)
- 2.- J.K. Gaunt and B.B. Stowe
Plant Physiology 42: 859 (1967)
- 3.- Horowitz Williams Editor, Official Methods of Analysis
of the AOAC . Publicado por The Association of Official Ana
lytical Chemists.
Washington D.C. USA 11th edition .
- 4.- J.S. Leidler Publisher .
Toxic Foodstuffs and its constituents .
Academic Press New York USA 1971
- 5.- Carter Lichfield
Analysis of tryglicerides
Academic Press New York USA 1972
- 6.- M.G. Lowri y colaboradores .
J. Biol Chem 193 : 265-275
- 7.- Henry R. Mahler and Eugene H Cordes
Biological Chemistry
Harper and Row , New York USA 2nd Edition 1973
- 8.- W. Stepp , J. Kühnau y H. Schroeder
Las vitaminas
El Ateneo Buenos Aires Rep. Argentina 4^a Ed. 1967