

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

IDENTIFICACION Y PROPIEDADES GENERALES DE LAS GLICOSIDASAS DE LA SEMILLA DE Yucca filifera

259

T E S I S

Que para obtener el título de

Q U I M I C O

p r e s e n t a

JOSE LUIS OCHOA OCHOA

México, D. F.

1975



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
PROC. M. F. 2477



QUÍMICA

PRESIDENTE

VOCAL

SECRETARIO

1er. SUPLENTE

2do. SUPLENTE

Sitio donde se desarrolló el tema: Itto. de Química de la U.N.A.M.

Nombre completo y firma del sustentante: José Luis Ochoa Ochoa

Nombre completo y firma del asesor del tema: Dr. Javier Padilla Olivares

Nombre completo y firma del supervisor técnico: Dr. Barbarin Arreguin

Lozano

T E M A R I O

Prologo

Identificación y Propiedades generales de las Glicosidasas de la semilla de Yucca filifera .

- Introducción
- Teoria
- Experimentación
- Resultados y Discusión
- Conclusiones
- Bibliografia

Apéndice : La Cromatografia de Afinidad .

- Introducción
- Generalidades
- Aplicación
- Bibliografia

PROLOGO :

Recientemente , el estudio de nuevas formas de explotación de las zonas áridas , trajo consigo el descubrimiento de un nuevo tipo de planta potencialmente capaz de convertirse en fuente muy importante de materiales Esteroidales : La Yucca filifera

Las yuccas en general son plantas semidesérticas que crecen en los estados de San Luis Potosí, Nuevo León, Zacatecas y Coahuila, principalmente. Hasta hace poco se utilizaban como plantas de ornato y tenían escasa aplicación Industrial. La semilla de la Yucca filifera ha resultado ser especialmente rica en aceites comestibles y productos esteroidales³.

Los esteroides aislados de dichas semillas van acompañados de varias moléculas de azúcares simples , por lo cual reciben el nombre de glicósidos. (Nota : ya se ha demostrado que la Célula puede realizar la expresión de compuestos orgánicos de naturaleza endógena y exógena , si éstos son convertidos a los respectivos derivados glucurónidos ; por

ejem-, los microsomas de Hígado de conejo catalizan la transferencia de glucosa, galactosa y N- acetil glucosamina de sus respectivos UDP - azúcares a Esteroides ^{7, 41}).

La semilla al germinar , echa mano de toda sustancia potencialmente capaz de ser convertida en energía . En esta fase se elaboran, ó activan, las enzimas necesarias para aprovechar hasta su última fuente de alimento. Dado que la cantidad de glicósido esteroidal es considerable (aproximadamente 15 %) , podemos suponer que dentro de las enzimas activas deben encontrarse las correspondientes glicosidasas .

Nuestro trabajo tiene por objeto la separación de las enzimas glicosídicas ya que pensamos que una vez purificadas pueden ser empleadas como herramientas auxiliares en la determinación de la estructura de un glicósido.

Podemos decir que hemos demostrado que tales enzimas se encuentran presentes; sin embargo, los resultados en cuanto a la purificación, no fueron del todo satisfactorios. Por esta razón, intentamos la separación enzimática por un método relativamente reciente, la Cromatografía de Afinidad . Incluimos por lo tanto, un apéndice sobre este tópico .

IDENTIFICACION Y PROPIEDADES GENERALES DE LAS
GLICOSIDASAS DE LA SEMILLA DE YUCCA filifera .

INTRODUCCION

Es bien sabido que los carbohidratos se asocian con moléculas de propiedades muy distintas para constituir materiales de reserva alimenticia a la Célula : Los Glicósidos .

Los glicósidos son derivados de las formas cíclicas de los azúcares, en los cuales el grupo -OH del C-1, es sustituido por condensación con un alcohol o un fenol para formar un hemiacetal (Fig No 1).

Los Glicósidos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y animal , así como mundo microscópico de los organismos unicelulares . En las plantas, en ocasiones resultan ser responsables del color de las flores y frutos sin embargo, la cantidad de glicósido presente varía de una especie a otra de acuerdo a la estación y condiciones climáticas .

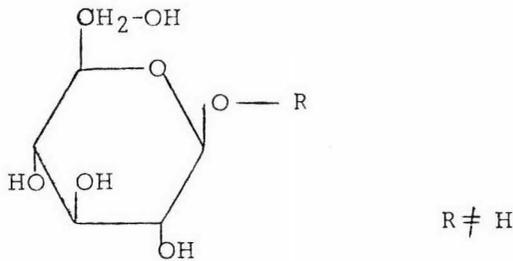


Fig. No. 1.- Representación de la fórmula general de un glicósido.

Bunge¹, asegura que los glicósidos poseen un papel de defensa contra la invasión de los tejidos por microorganismos. Este mismo investigador demostró que muchas agliconas son antisépticas y por ende de carácter bactericida. Por ejemplo, cuando la semilla de almendra es invadida, la amigdalina es hidrolizada y se libera ácido cianhídrico que previene la acción bacteriana (Fig. No. 2). Muchos otros glicósidos de origen vegetal son fisiológicamente activos y se utilizan en el tratamiento de enfermedades cardiacas.

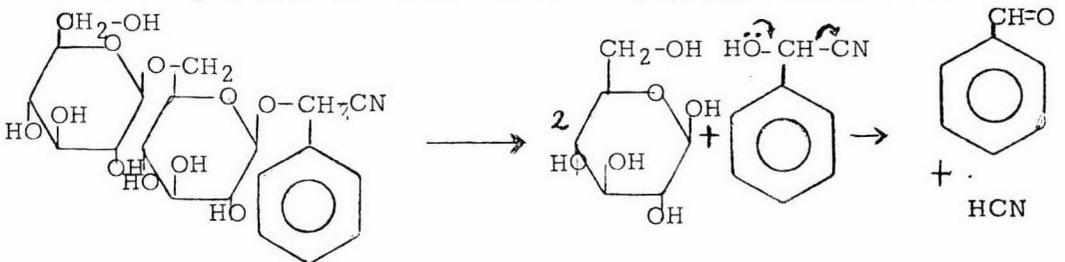


Fig. No. 2.- Hidrólisis enzimática del Glicósido amigdalina de la semilla de almendra.

Dentro de los diferentes glicósidos conocidos, algunos son de carácter esterooidal y han sido usados como venenos, la Filiferina es un ejemplo de ellos. Este tipo de glicósidos se caracterizan porque pueden formar espuma cuando son agitados en solución acuosa, de aquí que se les llame en forma general, saponinas.

La hidrólisis de las saponinas da lugar a los azúcares libres que bien pueden ser, entre otros, glucosa, galactosa, pentosa ó metil-pentosa² (fig. No. 3).

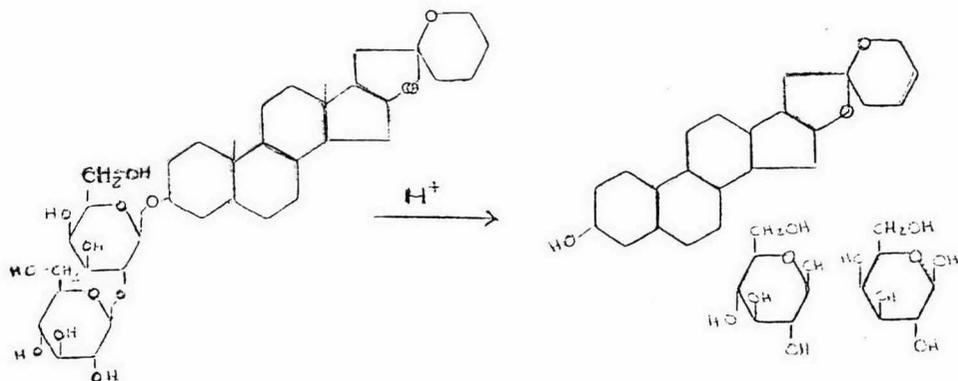


Fig. No. 3.- Hidrólisis del glicosido filiferina aislado de la semilla de *Yucca filifera*³.

Ha sido demostrado por Bate-Smith⁴, y por Nordstrom y Swaim⁵, que la mayoría de los compuestos fenólicos y alcoholes de bajo peso molecular, presentes en tejidos vegetales, se encuentran en forma de glicósidos (ver -

también refs. 6 y 7) .

Por otra parte, se ha establecido que ciertas enzimas son requeridas para la ruptura de los enlaces glicosídicos (8). De manera general, toda enzima capaz de hidrolizar un enlace glicosídico es llamada Glicosidasa ; aquellas enzimas encargadas de la hidrólisis de los enlaces glicosídicos se denominan Glucosidasas y las que rompen los enlaces galactosídicos son conocidas como Galactosidasas . Ambas enzimas se presentan a su vez, en dos tipos diferentes : a- y B- , de acuerdo a su acción frente al ; carbono anomérico a- ó B- de la molécula de sustrato (9-11).

La importancia del estudio de las glicosidasas no reside exclusivamente en interés científico puro, pueden ser utilizadas en forma práctica para dilucidar las propiedades y estructura de productos naturales de este tipo.¹²⁻¹³

TEORIA :

Todas las enzimas glicosídicas, de acuerdo a su modo de acción son consideradas Hidrolasas. Para la acción enzimática se postula un complejo constituido por las partes reaccionantes y representado por Enzima ---

Sustrato, el cual se descompone finalmente en la enzima y los productos hidrolíticos. Von Euler¹⁴, sugirió que para la formación del complejo E - S se requieren dos áreas en la enzima:

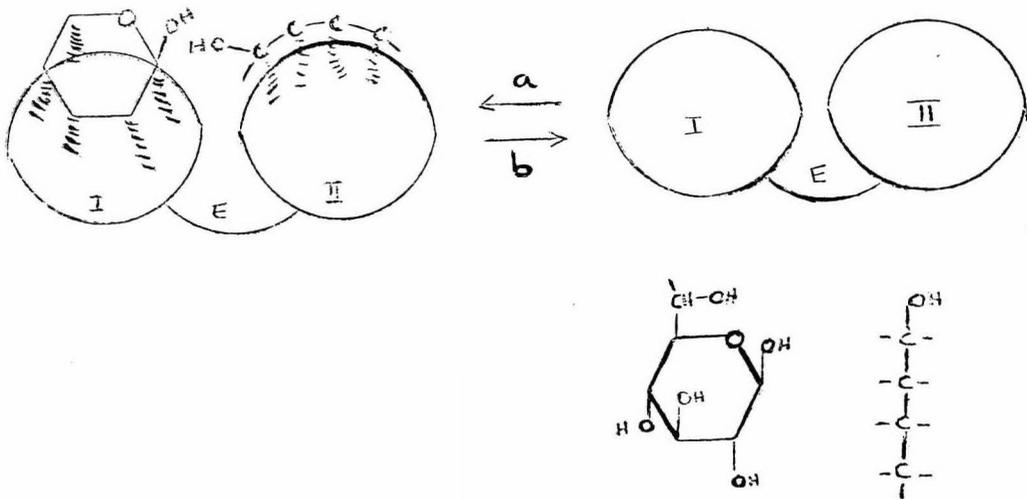


Fig. No. 4.- Representación de las áreas hipotéticas de adsorción de la enzima.

a.- Adsorción

b.- Des-adsorción

En la Fig. No. 4, las dos áreas ovaladas representan el "sitio activo" de la enzima, en el cual el glicósido es adsorbido: El grupo aglicona en un área y el radical carbohidrato en la otra. Se considera que el área No. 1 exhibe una extremada especificidad de adsorción, mientras que el área No. II presenta una adsorción muy general.

Por otra parte, se supone que la combinación de la enzima con el sustrato - tiene lugar a través de enlaces electrostáticos y de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y posiblemente otro tipo de enlaces covalentes débiles.

De acuerdo al mecanismo propuesto, el primer paso de la reacción toma lugar con la adsorción del sustrato en las dos áreas de la enzima. Al complejo E - S se adiciona entonces una molécula de agua ó un ión hidronio, sobre el enlace glicosídico y enseguida se efectúa la ruptura del enlace con la consecuente formación de un complejo Enzima-Azúcar y Aglicona. La etapa final comprende la desadsorción de los productos de hidrólisis, de la superficie de la enzima.

La hidrólisis enzimática difiere de la hidrólisis ácida, solamente en la formación del complejo Enzima - Sustrato ya que el ataque al enlace glicosídico se lleva a cabo por los iones hidronio en ambos casos. El papel de la enzima es probablemente proporcionar la activación preliminar de la molécula de sustrato, lo cual está de acuerdo con las observaciones hechas de -

que las energías de activación de las reacciones catalizadas por enzimas son mucho más pequeñas que aquellas que corresponden a las reacciones catalizadas por ácidos exclusivamente.

Durante el período de combinación de la enzima y el sustrato, (el cual debe ser muy corto), los movimientos translacionales y vibracionales de la molécula de sustrato son restringidos, por lo que las correspondientes energías pueden proveer una fuente de activación. Así mismo, un decremento en la entropía toma lugar en el primer paso, y por lo tanto también es posible que para este tipo de activación, la energía provenga primariamente de la energía cinética de la molécula de sustrato. La activación también puede ser resultado de la distorsión de la molécula de sustrato por la enzima; es decir, en la formación del complejo E + S el enlace glicosídico puede ser deformado por el movimiento relativo de un área respecto a otra.

Efectos de los cambios estructurales en la velocidad
de hidrólisis Enzimática.-

A simple vista, parecen ser dos los factores que influyen en la velocidad de la hidrólisis enzimática: la fuerza del enlace glicosídico que va a ser hidrolizado y la magnitud y posición de los enlaces entre la enzima y el sustrato. El primero de estos factores va paralelo a la facilidad de la hidrólisis ácida y puede ser evaluado comparando la velocidad de reacción a iguales concen-

traciones de sustrato. El segundo factor no puede ser evaluado rápidamente, sin embargo, la constante de Michaelis puede proporcionar cierta información.

De acuerdo al mecanismo propuesto se puede decir, que los sustratos glicosídicos más fácilmente hidrolizables, son aquellos en los que el enlace glicosídico es más débil y la adsorción y des-adsorción de sustrato y producto, respectivamente, están balanceados. Cuando los enlaces entre la enzima y el sustrato son muy fuertes, lógicamente la disociación de los productos de la hidrólisis resulta ser un factor limitante.

Las características propias de la aglicona también influyen en la hidrólisis enzimática de los glicósidos. En las series n - alquil, la hidrólisis de los β -glucosidos, desde metil- , a nonil- en la cadena de aglicona, han sido estudiados por Pigman y Richtmyer¹³. Estos mismos investigadores encontraron que cuando la cadena de átomos de carbono es más larga de nueve, el glicósido es ya tan insoluble que no puede ser estudiado bajo las concentraciones usuales.

Se ha visto un incremento progresivo en la facilidad de hidrólisis a medida que el largo de la cadena aumenta. Otras series homólogas, tales como las series ciclohexil - y bencil - , exhiben un comportamiento similar. En las series de los alcoholes primarios, no obstante, hay una longitud óptima para

la aglicona de siete a ocho átomos de carbono ya que, a longitudes mayores, la facilidad de hidrólisis disminuye. La explicación a este hecho la podemos dar si pensamos en que el número de enlaces es mayor entre la enzima y el sustrato a medida que la cadena aumenta, por lo que el reconocimiento de la enzima por el sustrato correspondiente es mucho más rápido y el complejo más estable; pero, precisamente por esto, la disociación se hace cada vez más difícil, convirtiéndose hasta cierto punto, en inhibición del proceso hidrolítico en general. En otras palabras, el paso determinante en la velocidad de reacción es la disociación de los productos de la hidrólisis y no el ataque al enlace glicosídico, ni la adsorción.

Quizá no resulte muy obvio, pero es lógico que los compuestos con aglicona de cadena recta sean adsorbidos más fácilmente y que la asociación se incrementa a medida que la longitud de la cadena se hace mayor. Las cadenas rectas son más altamente adsorbidas que las ramificadas tal vez por su capacidad para acomodarse en las áreas activas de la enzima.

Aquellos glicósidos que tienen a los azúcares como agliconas (disacáridos, por ejemplo), son de singular importancia porque se ha visto que no son hidrolizados por las mismas enzimas que hidrolizan a los glicósidos ordinarios, o heterósidos (14). Sin embargo, se han encontrado notables excepciones a este caso (15, 16).

Respecto a los B-aril glicósidos, podemos resumir en breves incisos lo que ha sido obtenidos principalmente por Helferich¹⁴ y colaboradores:

- a) La introducción de los llamados grupos meta directores en cualquier posición, tienden a incrementar la velocidad de hidrólisis; particularmente los grupos aldehídicos.
- b) La introducción de un grupo amino siempre disminuye la velocidad de hidrólisis, debido a que su carácter polar origina un enlace muy estable que dificulta la disociación del producto. La acetilación de los grupos amino contraresta este efecto.
- c) Cuando cualquier otro grupo (meta - o para - director) excepto el grupo amino, es sustituido en la posición orto-, la velocidad de hidrólisis se incrementa considerablemente.
- d) Los grupos meta directores en las posiciones para, incrementan la facilidad de hidrólisis, pero mucho menos que en la posición orto-. Otros grupos disminuyen la facilidad de hidrólisis.
- e) Los grupos en meta- producen un efecto intermedio entre los observados en las posiciones de orto y para en general, incrementan la velocidad de reacción.
- f) Cuando dos grupos *idem* se sustituyen en el núcleo aromático, la influencia es más o menos aditiva.

Debemos aclarar que dichas conclusiones se aplican a la B-glucosidasa y probablemente a la B-galactosidasa aisladas de la semilla de almendra, porque enzimas similares de otras fuentes se llegan a comportar de manera bastante diferente. No obstante, constituye un ejemplo claro de la influencia de la aglicona sobre la facilidad de hidrólisis del glicósido .

Por otra parte, no debemos pensar que los efectos observados corresponden a la acción de los diversos grupos sobre el anillo; si estos grupos tuvieran efecto sobre el enlace glicosídico que va a ser hidrolizado, habría un paralelismo entre la variación de la hidrólisis enzimática y la, ácida, pero se ha demostrado que este no es el caso . Como ejemplo podemos decir que el fenil-B - glucósido es hidrolizado con ácido, mucho más rápidamente que el p - hidroxacetofenona - B - glucósido; pero éste último , es hidrolizado tres veces más rápido por enzimas que el fenil-B-glucósido simple .

Concluimos en que las diferencias se deben indudablemente a diversas - influencias, incluyendo efectos inductivos y resonantes sobre el enlace glicosídico; así como también, a la adsorción del grupo aglicona . Podemos suponer, no obstante, que quizá ocurra la formación de enlaces débiles entre los grupos en posiciones o-, m- y p-, con la enzima y que por lo tanto los grupos en posición orto- posean una mayor influencia sobre el enlace que va a ser hidrolizado .

A continuación daremos algunas características de cada una de las enzimas estudiadas por nosotros, con el objeto de conocerlas un poco más teóricamente.

a - D - glucosidasa	(17) E/C. (3.2.I.20)
Nombre sistemático:	a - D - glucósido glucohidrolasa
Nombre trivial:	a - Glucosidasa
Otros Nombres (no recomendados):	Maltasa
Reacción general:	un a - D- glucósido + H ₂ O = un alcohol + a - D - Glucosa.

Nota: La amplia gama de especificidad para los a-D- glucopiranósidos varía de acuerdo a la fuente. También actúa como glucotransferasa.

En 1878 se observó que de la acción de la amilasa sobre el almidón se obtenía glucosa y maltosa. Musculus y Von Mering habían denominado a ésta misma enzima glucasa; otros autores la han denominado maltasa y muy recientemente se le ha llamado a - glucosidasa (18).

La enzima ha sido aislada de diversos tejidos y se le ha otorgado un origen lisosómico * (19).

* En general se supone que todas las enzimas glicosídicas están localizadas en los lisosomas y que poseen características tales

como una actividad óptima a pH ácido. Se ha visto que en el hombre la ausencia, o en su caso escasa actividad, de las enzimas glicosídicas son causa de trastornos metabólicos importantes. Muy pocos estudios han conducido a determinar la capacidad normal de los Lisosomas para degradar glicolípidos y glicoproteínas, pero sabemos que todo tipo de material Biológico es degradado en los lisosomas aunque no se ha podido explicar suficientemente éste fenómeno. Los datos acumulados hasta ahora a través del uso de substratos artificiales, indican que los lisosomas contienen un vasto número de enzimas hidrolíticas capaces de romper cualquier tipo de enlace glicosídico (20, 21, 22)

En cuanto a la forma de acción, se dice que el ataque de una α -glucosidasa se lleva a cabo preferentemente sobre el extremo de la cadena glicosídica dando origen al siguiente oligosacárido homólogo menor (23).

Algunos autores consideran que la especificidad está determinada por el residuo glicosídico ya que la naturaleza de la aglucona es importante como se aclaró anteriormente (24).

Casi todas las α -glucosidasas requieren de la presencia de un radical α -D-piranosil para actuar. Los cambios en las configuraciones de los carbonos 1, 2, 3 ó 4, pueden originar la pérdida de la actividad enzimática, en la misma forma que el cambio de la estructura piranosa a - -

furanosa. En algunos casos, los carbonos 5 y 6 pueden ser sustituidos sin afectar la acción de la enzima, pero por ejemplo las enzimas aisladas de levaduras no poseen acción sobre α -glucósidos en los cuales el arreglo del C-6, difiere de aquél en la D-glucosa.

B - D - Glucosidasa	(17) E.C. 3.2.1.21.
Nombre sistemático :	B-D-glucósido glucohidrolasa
Nombre trivial :	B-glucosidasa
Otros Nombres (No recomendados) :	Gentobiasa, Cellobiasa
Reacción general :	un B-glucósido + H ₂ O → un alcohol + B- D- glucosa .
Nota :	Posee una amplia gama de especificidad posiblemente actúa como B-galactosidasa 25-27 . Cataliza reacciones como -- transferasa .

Generalmente los glicósidos presentes en tejidos vegetales poseen el azúcar unido mediante un enlace B-, por lo que la B- actividad, es de relativa importancia en muchos casos, para el desarrollo de la planta.

La B-glucosidasa es una de las enzimas más abundantes, o al menos presente en la mayoría de los tejidos animales y vegetales. Posee un rango muy amplio de actividad de acuerdo al sustrato sobre el cual actúa y a la especie de donde han sido obtenidas (34).

Diversos B-glucosidos han sido preparados con sustituciones en los hidroxilos 2, 3 y 4 del azúcar, por grupos metoxi-y p-toluén sulfonilos (tosilos) en todos los casos, los derivados resultaron ser inhidrolizables por la enzima correspondiente. Se ha visto que las sustituciones sobre el C-6 de los B-glucósidos afectan la acción enzimática distintamente a las que se hacen sobre los carbono 2, 3 y/o 4; parece que en éste caso se tiene cierta influencia cuantitativa en la velocidad de la hidrólisis por la voluminosidad de los sustituyentes.

a - Galactosidasa	E.C. (3.2.1.22)	(17)
Nombre sistemático:	a - D - galactósido galactohidrolasa	
Nombre Trivial:	a - Galactosidasa	
Otros nombres (No recomendados):	Melibiasa	
Reacción general:	un a-D-galactósido + H ₂ O = un alcohol + a - D - galactosa	

A diferencia de los otros tipos de enzimas ya mencionadas, la α -galactosidasa se encuentra en fuentes muy escasas : Café , Alfalfa, Levadura, algunas semillas y ciertos insectos .

Diversos estudios han demostrado que esta enzima es capaz de hidrolizar al igual que la B-galactosidasa , a los fucósidos (6 desoxi-galactósido) y arabinósidos configuracionalmente homólogos . Dos factores son similares en estos sustratos: el tipo de enlace glicosídico y las orientaciones de los H- y OH- en los carbonos 2,3 y 4 del anillo piranoide . Sin embargo, se ha llegado a separar la actividad B-galactosidasa de la B-fucosidasa , lo que significa que en algunos casos son enzimas diferentes (35) .

Finalmente, como en el caso de los otros glicósidos , la metilación de uno, o más de los oxihidrilos C-2, C-3, C-4 y C-6, conducen a la completa pérdida de la actividad enzimática .(18) .

B- Galactosidasa	(17) E.C. (3.2.1.23)
Nombre sistemático :	B-D- galactósido galactohidrolasa
Nombre trivial :	B-galactosidasa
Otros Nombres (no recomendados):	Lactasa
Reacción general :	un B-D-galactósido + H ₂ O \rightarrow in alcohol + B-D-galactosa .

La B-galactosidasa es probablemente la enzima mejor estudiada. No tanto por su distribución en el mundo de los seres vivos³⁶, sino porque ha sido la primera aislada en forma pura y cristalizada³⁷.

Diversas investigaciones han demostrado que la misma enzima actúa como transferasa con la formación preferencial de enlaces glicosídicos B-(1-6). Sin embargo, ya se han encontrado algunas excepciones en enzimas aisladas de intestino de ternera y en ciertos microorganismos, las cuales, en condiciones específicas que están determinadas por el medio y el tipo de aceptor, pueden dar origen a la formación de un enlace B-(1-3), ó B-(1-4).³⁷

El análisis de la estructura molecular de la enzima ha permitido detectar la presencia de un grupo imidazol y un grupo sulfhidrilo en el centro activo de la enzima que probablemente actúen como se ilustra a continuación:

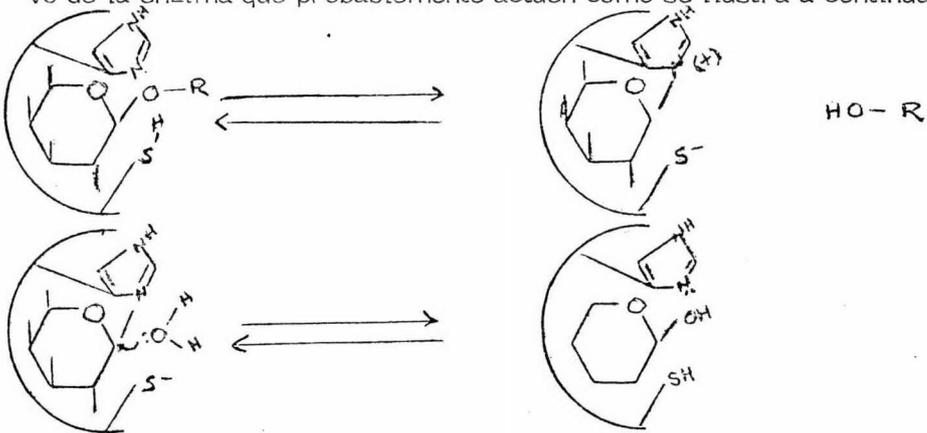


Fig. No. 5 Modelo de acción enzimática de la B-galactosidasa.

Es importante notar la reversibilidad de las reacciones; lo que nos explica en muchos casos, la función de la misma enzima como transferasa.

Por otra parte, sabemos que la actividad óptima de la enzima se desarrolla a un pH ácido, que explicación podemos dar a éste fenómeno? La respuesta es muy simple, ya hemos mencionado que la enzima posee un grupo imidazol en el centro activo y además se plantea la existencia de ciertos grupos cargados negativamente, como por ejemplo grupos carboxilos. Atendiendo a la naturaleza molecular de dichos grupos, es muy factible que estos sean los responsables de la actividad de la enzima a pH's ácidos. Se puede decir que el pk del grupo imidazol es muy cercano al extremo básico porque la presencia de los grupos carboxilo conducen a suprimir la disociación del grupo NH del imidazol y por ende, a elevar el valor de su pk. Sin embargo, la presencia de iones alcalinos que tenderían a rodear a los grupos negativos liberarían al grupo NH del imidazol de la influencia de aquellos.

En éstas condiciones, la disociación del grupo NH del imidazol se ve facilitada y su pk se desplaza a la escala ácida dando origen a un aumento de la actividad enzimática (ver fig, No. 6).

Como muchas otras enzimas glicosídicas, la B-galactosidasa parece ser naturalmente lisosómica (21 y 22) y estar asociada a trastornos del metabolismo de los glicósidos (38).

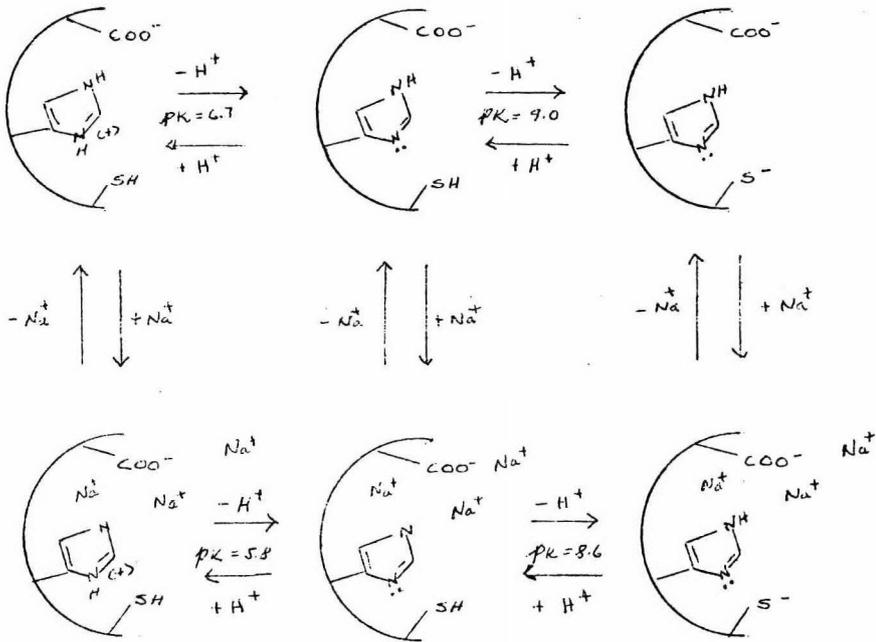


Fig.No.6.- Explicación esquemática de la actividad enzimática a diferentes pH's y la acción de los iones alcalinos en los grupos del sitio activo.

2. Experimentación

A.- Materiales y Métodos

Las semillas fueron recolectadas en el mes de febrero (1974) en los estados de San Luis Potosí y Coahuila.

Para las distintas cromatografías se emplearon:

- Sephadex: G - 10, G- 200, DEAE - A 50 y sulfopropil - ... de -
Pharmacía.

- Glicósidos: De Sigma

p-nitro-fenil-a-D-glucósido

p-nitro-fenil-B-D-glucósido

p-nitro-fenil-a-D-galactósido

o-nitro-fenil-B-D-galactósido

- Aparatos e Instrumentos

Ultracentrifuga Beckman L-2HV

Spectrophotometer Unicam SP 600 U.V.

pH meter Beckman Expandomatic

Determinación de proteínas

Se llevó a cabo espectrofotométricamente efectuando lecturas a una $\lambda = 280$ nm y comparando contra una curva de calibración preparada con albúmina de suero de bovino a diferentes concentraciones. También fueron determinadas por el método de Biuret (39).

Determinación de la actividad ³²

Con este fin se empleó : 0.4 ml de solución amortiguadora de fosfato disódico - ácido cítrico 0.2 M y 0.1 M respectivamente a un pH de 5.3; 0.4 ml de una solución de glicósido cromogénico a- ó B-, según el caso, cuya concentración era de 10 mMoles /ml; y 0.6 ml de una solución enzimática cuya concentración era determinada en cada ensayo. La mezcla de reacción era llevada a un volumen final de 3ml con agua destilada y se dejaba reposar durante una hora a la temperatura del laboratorio agitando ocasionalmente. Para desarrollar la coloración propia del p-nitrofenol liberado, se agrega 1ml de solución de carbonato de sodio 0.1 M y se compara contra una curva estándar preparada anteriormente leyendo a 410 nm la absorción. La actividad específica de la enzima está definida como los micro moles de p-nitrofenol liberados / min / mg de proteína; La unidad enzimática se define como la cantidad que libera 1 micro mol de p-nitro fenol/min.

Extracción

500 g de semilla fueron lavados durante 15 min, con agitación y percolando con agua destilada. Posteriormente se colocaron en un recipiente sobre algodón húmedo al abrigo de la luz durante ocho días para germinación, después de los cuales fueron trituradas utilizando 1.5 lt de una solu_

ción de cloruro de sodio al 0.9 %. La suspensión es filtrada mediante una gasa y centrifugada inmediatamente a 4°C a 9 000 x g durante 20 min. El sedimento se descarta y el sobrenadante se filtra nuevamente en un embudo Beckman con celíta para eliminar todo residuo graso.

Fraccionamiento con Sulfato de Amonio

Al extracto líquido se le adiciona sulfato de amonio sólido hasta una concentración del 40% de saturación, (40). La suspensión ahora se centrifuga durante 15 min a 15 000 x g y el sedimento se descarta; el sobrenadante se lleva hasta un 80% de saturación con la misma sal y se centrifuga a las mismas condiciones anteriores. En este último caso, la fracción que sedimenta constituye la fracción de interés y se le denomina: F₄₀⁸⁰

Purificación por Cromatografía de la Fracción F₄₀⁸⁰

La fracción se dializa empleando una columna de Sephadex G-10 (3 cm x 25 cm) estabilizada con solución Buffer de ácido acético - acetato de sodio 0.1M de pH 5. Posteriormente una porción de la fracción recolectada se pasa a través de una columna de Sephadex DEAE-A 50 (1cm x 50cm) estabilizada con el mismo Buffer. La elución se efectúa, en este caso, cambiando la fuerza iónica del medio desde 0.02 hasta 1.5 M con NaCl en 200 ml de solución amortiguadora.

Enseguida, se hace pasar a través de una columna de Sephadex G-200 (2cm x 50 cm) estabilizada con buffer de fosfatos de sodio 5mM de pH 6.5. Finalmente, se emplea una nueva columna preparada con Sulfopropil Sephadex (1 cm x 40 cm) estabilizada con buffer de ácido acético-acetato de sodio 0.01 M de pH 5 y la elución se lleva a cabo cambiando la fuerza iónica de 0.02 hasta 1.5 M como en el caso de la columna de Sephadex DEAE - A 50.

Electroforésis

Las diversas fracciones recolectadas fueron analizadas en electroforesis de disco de poliacrilamida a una concentración del 5%:

1 g de poliacrilamida; 0.0344 g de N-N-metilén-bisacrilamida; 0.02 ml de TEMED; 20 ml de solución amortiguadora de Glicina-tris 0.01M pH 8.4; 1 ml de sol. de persulfato de amonio fresco de concentración 10 mg/ml. Las electroforésis se corrieron durante 2:30 hrs con 5 mAmp/columna y 75 volts/cm. El tamaño de las columnas era de 6 cm x 0.8 cm. Se utilizó como electrolito una solución buffer de 0.02 M de glicina-tris de pH 8.4. La tinción se lleva a cabo con "amido negro" y las geles se decoloran con una solución de ácido acético al 4%.

B.- RESULTADOS Y DISCUSION:

De los 500 g de semilla se obtuvieron aproximadamente, 19 g de proteína, lo que corresponde a un 4% del peso.

Se efectuaron determinaciones de la actividad en distintos lotes, a diferentes días de germinación (5, 7, 8 y 11 días) y encontramos que la actividad era máxima al octavo día. Los resultados obtenidos en este lapso se muestran en la tabla No. 1.

T A B L A No. 1

ACTIVIDAD DE LAS DISTINTAS ENZIMAS EN EL EXTRACTO TOTAL (E.T.)
A LOS OCHO DIAS DE GERMINACION

ENZIMA:	ACTIVIDAD ESPECIFICA:	UNIDADES TOTAL :
-glucosidasa	6×10^{-3}	114
-glucosidasa	48×10^{-3}	912
-galactosidasa	93×10^{-3}	1,687
-galactosidasa	6.9×10^{-3}	130

La actividad obtenida en el extracto crudo resultó ser satisfactoria, como para continuar con la purificación. Decidimos entonces llevar a cabo el primer paso que consistía en el fraccionamiento con el sulfato de amonio. Para ello seguimos las recomendaciones dadas por Bourbouze, R.³² con una ligera modificación: Bourbouze recomendada añadir la sal de sulfato de amonio hasta obtener una concentración del 45 % de saturación, y separar en esta forma la fracción que correspondería a las proteínas que precipitan en el rango de 0 - 45 ; al analizar dicha fracción en nuestro caso, encontramos que gran parte de la actividad se perdía si respetábamos dichas reco-

mendaciones; decidimos entonces eliminar solamente las proteínas que precipitaran en un rango de 0-40 y en esta forma seleccionar, posteriormente, la fracción que precipita en el rango de 40-80, teniendo la seguridad de que rescatabamos la mayor parte de la actividad de naturaleza glicosídica presente en el extracto total. Así pues, la fracción F_{40}^{80} - excluye tanto a las proteínas que precipitan en el rango 0-40 %, como las que son solubles arriba del 80 % de saturación.

Es necesario dializar la fracción F_{40}^{80} para eliminar la sal contaminante y permitir en esta forma la expresión de la actividad catalítica; la fracción fue entonces alimentada en su totalidad a la columna de Sephadex - G-10 con los siguientes resultados en cuanto a actividad enzimática, expresados en la tabla No. 2.

T A B L A No. 2

ACTIVIDAD DE LAS DISTINTAS ENZIMAS EN LA FRACCION F_{40}^{80}

enzima:	actividad especifica:	actividad total :	rendimiento referido a Ext. tot. :	grado de purif.:
-gluc.	9	108	94 %	1.5
-gluc.	58	696	76 %	1.2
-gala.	120	1,440	77 %	1.3
-gala.	10	120	120 %	1.5

32

Bourbouze ,R. aplicó su fracción a una columna de Sephadex DEAE-A 50 y encontró que la porción de proteína que no era retenida, poseía la actividad glicosídica. Nosotros efectuamos la misma operación y obtuvimos un resultado muy similar. En la Gráfica No 1 presentamos solamente las dos primeras fracciones recuperadas antes de llevar a cabo la elución con el cambio de gradiente :

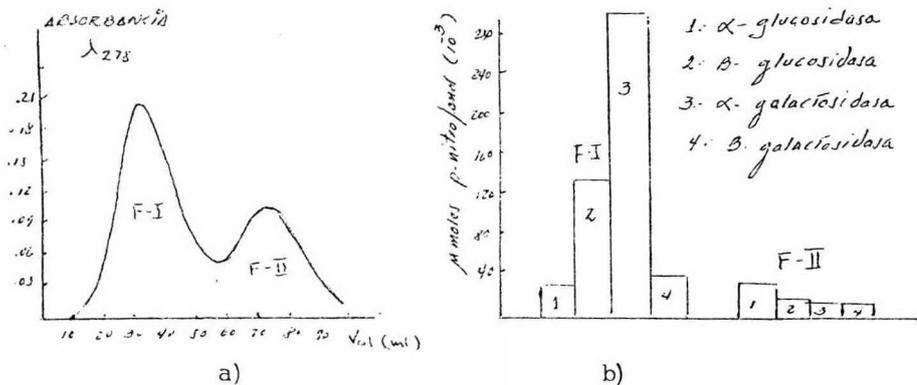


FIG. No 1

- a) Muestra la recolección de las fracciones .
(Vol de cada tubo 5 ml .)
- b) La FRACCION F₄₀⁸⁰ se ha subdividido en dos bandas F-I y F-II cuyas actividades se representan en este histograma comparativo .

Con el histograma de la Fig. I (b) es posible deducir que la fracción , más importante es la F-I . En la Tabla No 3 se especifican los calculos de ren-

dimiento y purificación para esta fracción:

T A B L A No. 3

ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA FRACCION F - I

<u>enzima:</u>	<u>actividad especifica:</u> $\times 10^{-3}$	<u>Cant. recup:</u>	<u>unidades tot :</u>	<u>rend:</u>	<u>purif:</u>
a -gluc.	22.5	4.5 g	94	82 %	3.8
B -gluc.	135.0	"	605	66 %	2.8
a -gala.	280.0	"	1260	68 %	3.0
B -gala.	20	"	90	69 %	2.8

Con estos datos podemos concluir en que es posible que la cantidad de enzima de naturaleza glicosídica sea muy pequeña y que aún persisten, en esta fracción grandes cantidades de otras proteínas contaminantes.

Es importante aclarar que el rendimiento que aquí se expresa se refiere a la actividad respecto a el extracto total; por ejemplo, la a -glucosidasa originalmente presentó 114 unidades totales, la fracción F-I contiene solo 94 de esas unidades, o sea un 82 %. Así pues, el rendimiento en ninguna de las tablas se refiere a la cantidad de proteína obtenida ya que en este aspecto y frente a los 19 g de proteína en el extracto total, el 4, 5 g de la F-I significa el 25 % aproximadamente.

Every, D ³³ y sus colaboradores, lograron separar la actividad glicosídica a-, de la B-, en una razón aceptable, pasando la fracción que estaban trabajando a través de una columna de Sephadex G - 200; así que

decidimos que el paso a seguir era emplear una columna de características semejantes. Alimentamos entonces la fracción F-I a la columna y obtuvimos los siguientes resultados :

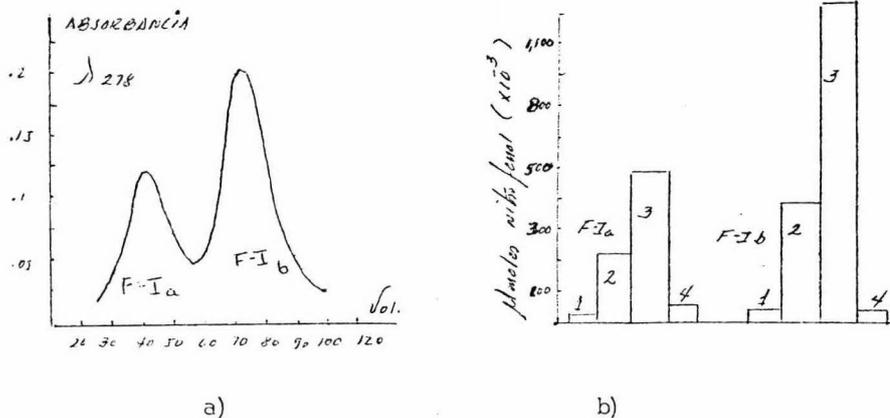


FIG No 2

- a) Representa la separación de F-I en la columna de Sephadex G-200.
- b) Actividades de las dos bandas obtenidas (denominadas F-Ia y F-Ib respectivamente)

Desafortunadamente, la separación no fué tan efectiva como esperabamos . La actividad glucosídica se repartió en dos fracciones (F-Ia y F-Ib) .

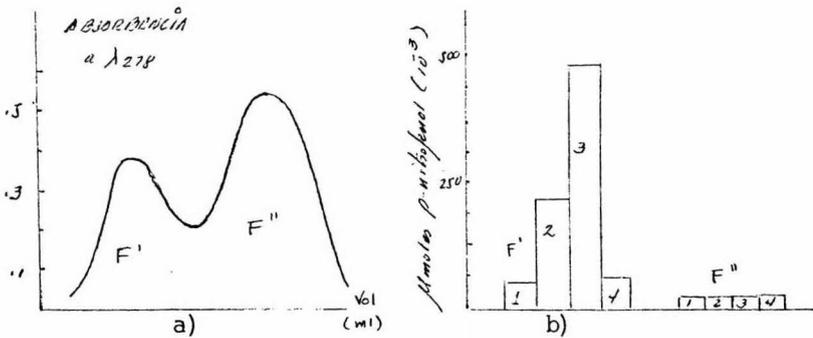
En vista de que la fracción F-Ib era la menos contaminada con actividad glucosídica a- , proseguimos la operación de purificación con esta fracción exclusivamente. En la Tabla No 4 se especifican los datos para F-I b .

TABLA No. 4

ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA FRACCION F - I b

enzima:	act. esp.: $\times 10^{-3}$	cant. recup.:	unidades totales :	rend.:	purif.:
a- gluc	35.7	0.9 g	32.13	28 %	6
B- gluc	437	"	390	42 %	9-1
a- gala	1147	"	1032	55 %	12.4
β - gala	85	"	765	59 %	12.2

Pensamos que el paso lógico a seguir sería emplear una columna de intercambio catiónico, para intentar la separación definitiva y por lo tanto resolvimos utilizar el Sephadex Sulfopropilico que en otros casos ha dado una mejor resolución que el Sephadex Cm-. A continuación se señalan los resultados obtenidos :



FIG, No 3

- a) La gráfica nos indica la nueva separación de la fracción F-I b en dos bandas llamadas F' y F'' .
- b) Actividad comparada entre las dos fracciones recuperadas F' y F'' .

ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA FRACCION F'

<u>enzima:</u>	<u>act. esp.:</u> x 10 ⁻³	<u>cant. recup.:</u>	<u>unidades totales .:</u>	<u>rendimiento</u>
a - gluc.	23.3	0.225 g	5.2	4.6
B - gluc.	168	"	37.8	4.1
a - gala.	456	"	102	5.5
B - gala.	34	"	7.65	5.9

Hasta este punto podemos decir que la separación de las diversas actividades glicosídicas, no ha sido posible. Debemos hacer notar la disminución de la actividad específica de cada enzima, atribuída seguramente, a cuestiones de manejo y operación. La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que las descongelaciones y congelaciones de las soluciones enzimáticas acarrearán la pérdida parcial o total, de la actividad. Por otra parte, la tabla nos indica el rendimiento de la fracción F' respecto al E.T., en este aspecto podemos decir que el rendimiento es ya tan bajo que no es posible trabajar con esta fracción nuevamente.

Separadamente, hemos llevado a cabo el análisis electroforético de las diversas fracciones obtenidas. Tal y como se puede ver en la Fig. No. 4 las variaciones en cuanto al número y posición de las bandas, es cero. Las condiciones en que se realizaron, nos permiten asegurar que proteínas de gran tamaño como es la B - galactosidas* (formada de 4 subunidades

y con un peso molecular total de 500 000 daltons) pueden penetrar a través del gel, pero que aquellas cuyo peso molecular es de menos de 100 000 daltons se "salen" del gel fácilmente. Según los datos reportados por Every³³ D y colaboradores. La α -glucosidasa posee un peso molecular de 150 000 y la β -glucosidasa de 225 000 daltons por lo que posiblemente las bandas si correspondan a las enzimas que tratamos de separar y que aparecen en todas las fracciones.

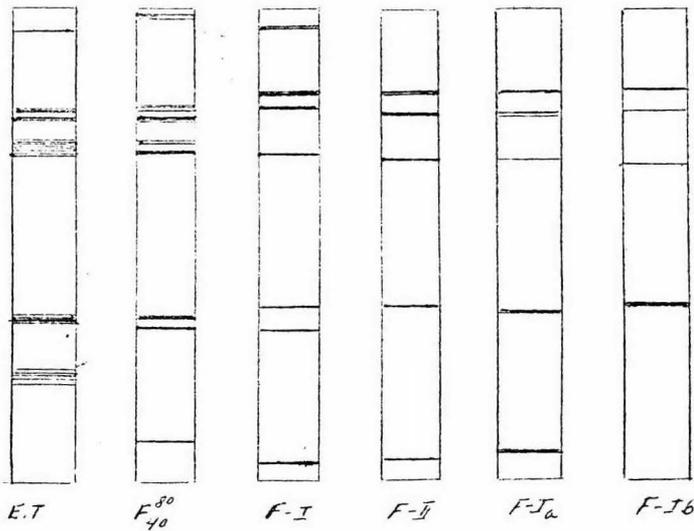


FIG. NO. 4

ELECTROFORESIS EN GEL .

Las condiciones en que se efectuaron las "incubaciones" fueron revisadas con el fin de determinar si verdaderamente eran apropiadas para permitir la expresión de la actividad catalítica óptimamente. La Fig. No. 5 nos muestra el efecto en la variación del p H del buffer; así mismo, se señala el efecto del tiempo de incubación utilizando la enzima α -galactosidasa:

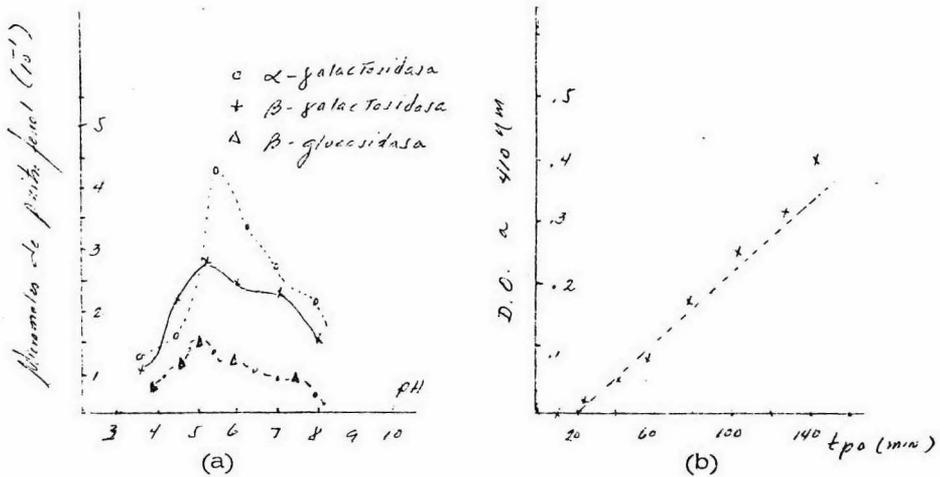


FIG. No. 5

- (a) La actividad enzimática en función del pH
- (b) El efecto del tiempo de incubación con la enzima α -galactosidasa

Se comparó también el efecto del buffer en condiciones similares, empleando una solución de ácido acético-acetato de sodio en un caso, y el buffer de fosfato de sodio-ácido cítrico en otro, resultando ser más efectivo éste último. Y en cuanto a la concentración de sustrato declaramos que siempre se trabajó con un exceso para que no constituyera una variable más del experimento. En resumen, podemos concluir diciendo que las condiciones en que se lleva a cabo la determinación de la actividad enzimática, son apropiadas y ningún factor constituye un elemento limitante o de inhibición.

Con estos resultados, intentamos la separación ya no por el método tradicional sino por la técnica relativamente nueva de la cromatografía de afinidad. Consideramos necesario aclarar, que se trata solo de un ensayo preliminar ya que al momento no contabamos con los elementos adecuados para efectuar su aplicación correctamente.

El apéndice que aparece en la última parte de este trabajo, señala objetivamente los requerimientos mínimos que deben ser satisfechos al aplicar la Cromatografía de afinidad. Desde este punto de vista ya habíamos establecido la hipótesis de que el resultado no podría ser satisfactorio, sin embargo nuestro planteamiento pareció suficientemente interesante como para llevarlo a cabo.

El DEAE - Sephadex posee ciertos grupos iónicos que le dan la propiedad de

poder atraer electrostáticamente a grupos afines, es decir, a grupos aniónicos o negativos. La salicina es un glucósido (o-hidroxibencil glucosa) que posee un grupo fácilmente ionizable, el grupo-OH del anillo aromático, y que al disociarse adquiere una carga negativa. Teóricamente, ambos compuestos se atraen por sus cargas, en solución; en esta forma el DEAE-sephadex se convierte en una matriz potencialmente capaz de ser atacada específicamente por la enzima β -glucosidasa.

Si a este "Bioadsorbente" específico para β -glucosidasa (montado previamente en una columna) añadimos la mezcla enzimática que constituye nuestro problema, podemos anticipar que la enzima correspondiente será "entretenida" con su sustrato y por ende tardará más tiempo en salir que el resto. En esta forma tendremos al menos, una de las enzimas purificadas.

La Fig. No. 6, representa por una parte la molécula de salicina y por otra su incorporación a la matriz del Sephadex DEAE - A50.

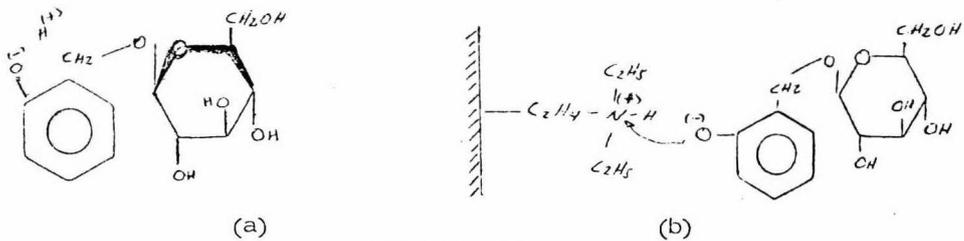


FIG. No. 6

- (a).- La salicina
- (b).- Incorporación de la salicina a la matriz de Sephadex DEAE - A50.

El resultado de la recolección de la muestra F-Ib, se ha graficado en la Fig. 7. Observese el pico último, cuya forma permite sugerir que corresponde a una fracción enzimática pura y que en nuestro caso se debe tratar de la fracción que contiene la actividad β - glucosídica.

Desafortunadamente, la muestra recolectada no presenta actividad enzimática. Seguramente las condiciones empleadas en la cromatografía dieron lugar a la desactivación de la enzima.

Como último dato, en ninguna de las fracciones obtenidas en esta recolección se detectó glucosa libre, lo que nos hace suponer que la enzima se asoció fuertemente con el sustrato de tal forma que su sitio activo ha quedado obstruido, y por lo tanto incapaz de manifestarse activamente.

Dado que los métodos tradicionales descritos no nos permitieron obtener una separación adecuada, la cromatografía de afinidad parece prometer resolver el problema. El procedimiento seguido por nosotros parece ser lógico, al menos en teoría, para aislar específicamente una de las enzimas. Es cuestión de superar el problema de la desactivación, de meditar profundamente en las condiciones de cromatografía para no ir a provocar el desalojamiento del sustrato por otros grupos aniónicos y de la temperatura, que en procesos muy largos suele ser un factor desnaturalizante.

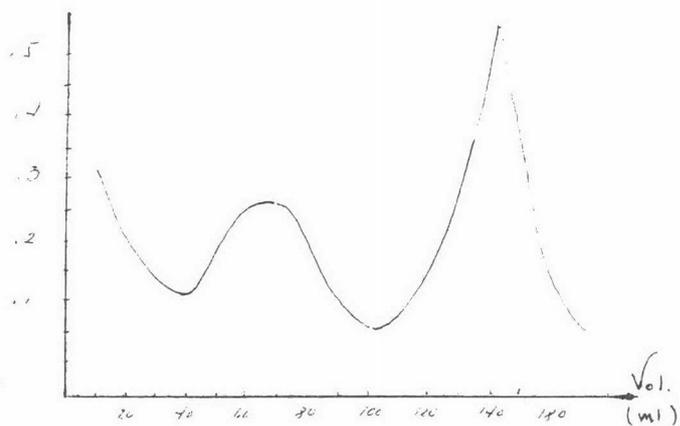


FIG. No. 7

Recolección de las diversas fracciones
obtenidas en la cromatografía en DEAE-
Sephadex -A 50 - Salicina .

C. Conclusiones

- 1.- El extracto crudo de la semilla de la Yucca filífera presentó actividad glicosídica de la siguiente naturaleza:
 - a - glucosidasa
 - B - glucosidasa
 - a - galactosidasa
 - B - galactosidasa
- 2.- La actividad glicosídica más intensa corresponde a la -galactosidasa, lo que viene a otorgar otra característica importante a la semilla de Yucca f. Dicha actividad enzimática es muy extraña porque existe en muy pocas fuentes naturales.
- 3.- Bajo métodos tradicionales no fue posible su separación, lo cual está de acuerdo con otros trabajos publicados con el mismo objetivo.
- 4.- Aplicando la técnica de Cromatografía de Afinidad fue posible la separación de la ^B-glucosidasa; lamentablemente sin actividad enzimática.

B I B L I O G R A F I A

1. Mc Ilroy, R. J.
The Plant Glycosides
1st. Ed.
Edward Arnold, Co
London (1950)
2. Tschesche, R., Und Wulff, G., Fortschritte d Chem Org
Naturst XXX págs 461 - 606.
3. Castillo, Flores M. Javier. Tesis Profesional. Universidad
Autónoma de Pueble. (1973) Esc. de Ciencias Químicas -
"Composición química de la semilla de Yucca filífera"
4. Bate - Smith, E. C. Symp. Biochem. Soc. 3 , 62, (1949).
5. Nordstrom, C. G. and Swain, T. J. of Chem. Soc., 2764, (1953)
6. Bernfeld, Peter
Biogenesis of natural compounds
The Mc-Millan, Co.
London, L.T.D. (1963)
7. Vessey, D. A. and Zakim, D., B. B. acta 315, 43-48, (1973)
8. Wolfram, M. L.
Advances in Carbohidrate Chemistry
Vol. 16 Pág. 239
Academic Press
N. Y. USA (1961)
9. Loomis, W. F. J., Bactriol. 97, 1149-1154, (1969).
10. Krishna Murti and Stone, B. A., Biochem J. 78, 715-23, (1961)
11. Meyer, D. et Bournillon, R., Biochimie 55, 5-10, (1973)

12. Sukeno, T et al Biochemistry, II , 1493-1501, (1972)
13. Li, Y. T. and Lee, Y. C. J. of Biol. Chem 247 , 3677-83, (1972)
14. Nord, F. F. and Werkman, C. H. Advances in Enzimology Vol. 4 Interscience Publishers, Inc. N. Y. (1944)
15. Cohn, M. et Monod, J. Biochim, Biophys acta 74 , 153, (1964).
16. Got, R. Marnay, A., Farrige, P. et Font, J. Nature 204, 686, (1964)
17. Florkim, M. and Stote, E. H.
Comprehensive Biochemistry
Vol. 13 Nomenclature of Enzimes
Elseviers Publishing, Co.
Amsterdam, (1964)
18. Sumner, J. B. and Somers, G. F.
Chemistry and Methods of Enzimes
3d. Ed.
Academic Press, Inc. Publishers
N. Y. USA (1953).
19. Bruni, C. B. et al J. of Biol. Chem. 244, 17 , 4735-42, (1969)
20. Aaronson, Jr. N. N.
Glycoproteins
2nd. Ed Part B Págs 1211-27
Gottschalk, Ed (1972)
21. Steigerwald, J. C. et al B. B. acta 321 , 256-61, (1973)
22. Bartholomew, B. A. and Perry, A. L. B. B. acta 315 , 123-27
(1973)
23. Kerr, R. W. et al J of Am. Chem. Soc. 73, 3916-21, (1951).
24. Hestein, S. and Lindegren, C. C. Nature 165, 158, (1950).

25. Dahlquist, A. B. *B. B. acta*, 50, 55, (1.61)
26. Got, R. et Marnay, A. *European, J. Biochem.* 4, 240-46, (1968).
27. Wallenfels, K., et Malhotra, O. P. *Advanc. Carbohydrate Chem.* 16, 238, (1961).
28. Baruah, P and Swain, T. *Biochemistry (1957)* 66, 321-23.
29. Crook, E. M. and Stone, B. A. *Biochem J.* 65, 1 - 12, (1957).
30. Heyworth, R. and Walker, P. G. *Biochem. J.* 83, 331-35, (1962).
31. Cohen, R. B. et al *J. Biol. Chem.* 195, 607-14 (1952).
32. Bourbouze, R. et al. *Biochimie* 55, 353-55, (1973)
33. Every, D. and Ashoworth, J. M. *Biochem. J.* 133, 37-47, (1973)
34. Veibel, S.
The Enzymes
Vol. I part 1
Ed. by Sumner, J. B. and Myrbach, K. N. Y.
Academic Press, Inc.
35. Dey, P. M. *B. B. acta* 302, 393-98, (1973)
36. Conchie, J. and Hay, A. J. *Biochem J.* 73, 327-34 (1959)
37. Blakely, J. A. and Mackenzie, S. L. *Canadian J. Biochem.* 47, 1021-25, (1969).
38. Labadie, J. And Aaronson N. N. *B. B. acta* 321, 603-14, (1973).
39. Gornall, A. G. *J. Biol. Chem.* 177, 751, (1949).
40. Dixon, M. *Bioch. J.* 54, 458, (1953).
41. Collins, D. C., *J. of Biol. Chem.* 243, 2928-2933, (1968)

A P E N D I C E

LA CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

INTRODUCCION

El término de afinidad cromatográfica se ha referido al uso de adsorbentes bioespecíficos en las purificaciones biológicas ¹ y ².

Los métodos tradicionales de purificación de proteínas (ó enzimas), comprenden generalmente una serie de pasos complicados y laboriosos que a veces nos conducen a la desnaturalización de la enzima, con la consecuente pérdida de la actividad catalítica, ó en el mejor de los casos, a una mala purificación.

La técnica de Cromatografía de afinidad, a diferencia de los métodos convencionales, ofrece la posibilidad de realizar la separación de una manera práctica, aprovechando tan solo, ciertos parámetros fisicoquímicos de la enzima ó proteína.

Generalidades

Ciertas macromoléculas biológicas poseen regiones "localizadas" (sitios - activos) altamente especializados en realizar una única función. Se cree en el caso de las enzimas, que la estructura terciaria de estas moléculas es - específica para ayudar a mantener la integridad de estas regiones.

Los sitios activos enzimáticos, efectúan fundamentalmente dos procesos - fisicoquímicos muy distintos: uno primero de reconocimiento y otro de catálisis



Las constantes k_a y k_{-a} reflejan la magnitud de la propiedad de reconocimiento; propiedad que constituye la base de los principios fundamentales de la cromatografía de afinidad. Las constantes k_a y k_{-a} , son entonces una medida de la afinidad de E por S.

En la aplicación práctica de esta técnica es muy importante que el complejo E-S, no proceda hacia la derecha, es decir, que las especies interactuantes no sean alteradas químicamente como resultado de la interacción misma. - Por esta razón, en la purificación de un sistema enzimático es conveniente utilizar inhibidores más que los propios sustratos. En la misma forma, es preferible que el tipo de acoplamiento sea de cierta manera "no-enzimático" utilizando compuestos para los cuales no se obtienen alteraciones químicas, como por ejemplo: antígeno-anticuerpo³.

Los requerimientos de un sistema adecuado para afinidad cromatográfica - están determinados por:

- La porción que va a ser purificada
- El acoplamiento del ligando a la matriz
- Las condiciones experimentales

La cromatografía de afinidad, con enzimas enlazadas a soportes sólidos, ofrece un sistema más realista para poder explicar el modo de acción de proteínas (ó enzimas) unidas a membranas celulares. Algunos trabajos de insolubilización de sistemas enzimáticos (con dos o más enzimas enlazadas a un mismo soporte) permite suponer que las potencialidades de esta técnica son infinitas en aplicaciones industriales⁴.

Técnicas de purificación

Se han utilizado diversos métodos para purificar enzimas por cromatografía de afinidad. En general, la proteína que va a ser purificada se pasa a través de una columna que contiene un gel o polímero "activado"; es decir, al cual ha sido enlazado un inhibidor competitivo ó "ligando". La proteína que no exhiba una apreciable afinidad por el ligando, pasará sin retardarse a través de la columna; mientras que aquellas que reconozcan al inhibidor, serán retardadas de acuerdo a la constante de afinidad en las condiciones de experimentación.

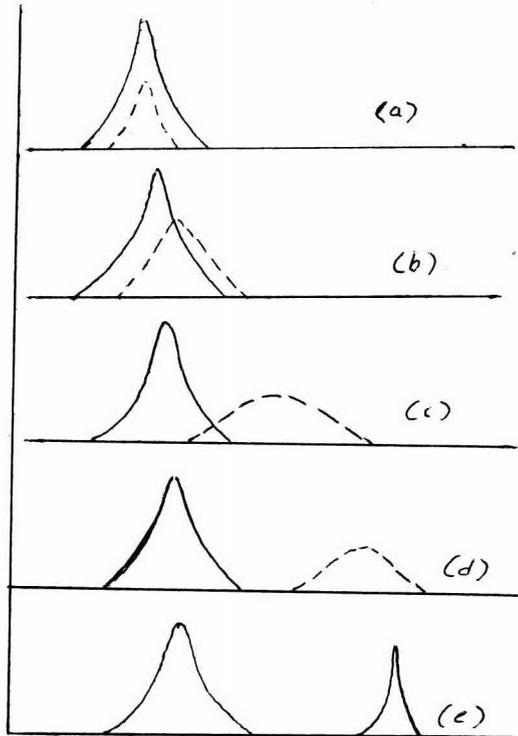


Fig. No. 1 .- Diversos patrones de separación por cromatografía, para un sistema de 2 componentes .

Caso (a).- Si el soporte sólido no presenta afinidad por la enzima específica, se considera un adsorbente totalmente inefectivo y la enzima emerge junto con la proteína contaminante .

Casos (b)

(c) y

(d).- Representan diversos grados de separación de acuerdo al retardo relativo de la mezcla protéica en la columna.

Caso (e).- Es un ejemplo clásico de separación por afinidad cromatográfica. En este caso, la enzima ha sido adsorbida específicamente y eluída bajo condiciones adecuadas.

La desventaja con este procedimiento es que el tiempo de operación puede resultar gravemente extenso.

Podría pensarse que el caso (e) es una exageración del caso (d), sin embargo, hay una diferencia importante: En presencia del adsorbente específico es posible obtener la enzima con un alto grado de purificación y en forma muy concentrada, apareciendo como un pico muy angosto en la elución.

Para poder aplicar el método de la cromatografía de afinidad es necesario - considerar cuidadosamente la naturaleza del acarreador sólido o adsorbente; las alteraciones estereoquímicas del ligando, como resultado de su enlace - miento covalente a la matriz; la separación del ligando de la matriz (distancia a la superficie sólida). Las condiciones de experimentación, el lavado y finalmente la elución.

Selección de la Matriz:

Para llevar a cabo el enlace de una enzima a un acarreador insoluble, se imponen ciertos requisitos a la naturaleza del acarreador mismo. Un soporte ó acarreador insoluble, ideal para cromatografía de afinidad enzimática, deberá poseer las siguientes propiedades⁴ :

- Debe interaccionar muy débilmente con las proteínas para minimizar la adsorción no específica.
- Debe hallarse libre de residuos iónicos que podrían causar interacciones no específicas con las proteínas.
- Debe poseer grupos químicos que puedan ser "activados" ó modificados, bajo condiciones inocuas a la estructura propia de la matriz para permitir el enlazamiento a una amplia variedad de ligandos.
- Debe ser mecánica y químicamente estable a las condiciones de acoplamiento y a diferentes condiciones de pH, fuerza iónica, temperatura, agentes desnaturalizantes y detergentes que en un momento dado pueden ser necesarios para la adsorción y/o la elución.
- Debe poseer una porosidad adecuada para permitir la entrada o salida de grandes moléculas. Por esta razón, las partículas

del gel deben ser preferentemente uniformes y esféricas.

- Debe mostrar óptimas propiedades de flujo después del acoplamiento.
- Y por último ser, lo suficientemente hidrofílica como para permitir la interacción entre las dos fases.

Algunos ejemplos:

Las camas de agarosa³⁻⁷, poliacríamida⁸⁻¹¹, y de vidrio satisfacen casi todos estos requisitos, por lo cual son las más empleadas. Por otra parte, resisten la acción de ciertos solventes no-acuosos y se hallan disponibles comercialmente (12).

Otros soportes, como por ejemplo la celulosa¹³⁻¹⁵, ofrecen pocas ventajas porque además de que sus fibras son heterogeneas y poseen una baja porosidad, tienen una velocidad de flujo muy pobre. El poliestireno y polímeros semejantes, no solo no son adecuados por su alto poder lipofílico, sino porque también adsorben inespecíficamente muchas otras proteínas. En la misma forma, el Sephadex^{4, 5, 16-18} se ha empleado ocasionalmente en las purificaciones de diversas proteínas; sin embargo, son insuficientemente porosos para tener una amplia aplicación en cromatografía de afinidad. La actividad biológica de enzimas, hormonas, anticuerpos, etc., decrece mucho cuando son enlazadas a matrices como la celulosa y el Sephadex, -

debido a que las interacciones entre las proteínas y el sustrato, se ven impedidas estéricamente cuando son de alto peso molecular. El efecto es mucho mayor cuando tales interacciones son importantes, como por ejemplo - antígeno-anticuerpo. En estos casos, la insolubilización de la enzima debe hacerse sobre matrices de estructura muy abierta.

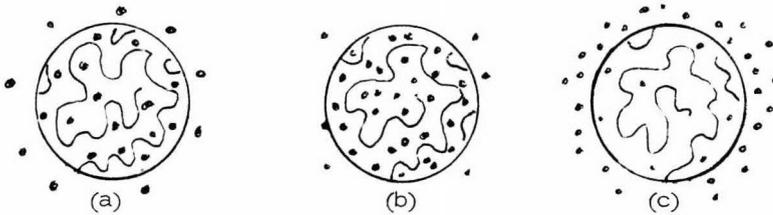
Las camas de Agarosa (Sepharosa) a diferencia de las dextranas, no pueden ser calentadas o congeladas ya que pueden ser afectadas estructuralmente de manera irreversible. Del mismo modo, no son capaces de tolerar compuestos orgánicos; La dimetilformamida y el etilén glicol (50% V/V), no afectan adversamente a las resinas, por lo tanto, estos solventes son muy útiles en situaciones en las que el compuesto que va a ser acoplado es relativamente insoluble en agua.

La Sepharosa puede ser almacenada a 4° C en suspensión acuosa, con preservativos bacterianos, por períodos de tiempo limitados solamente por la estabilidad del enlace del ligando. Es estable a la acción de soluciones de 0.1 M de NaOH y hasta 1 M de HCl por lo menos de dos a tres horas, sin sufrir - alteraciones en sus propiedades físicas, o bien, sin romper el enlace - - MATRIZ - LIGANDO. Estas camas pueden ser usadas repetidamente, aún después de haber sido expuestas a condiciones extremas; sólo se observan ciertas modificaciones cuando se ponen en contacto por períodos prolonga -

dos con una solución de guanidin- HCl 6 M ó de Urea 7 M, por lo que este tipo de desnaturalizantes protéicos pueden ser utilizados para ayudar a la elución de proteínas enlazadas específicamente, para lavar las columnas - ó bien para eliminar toda traza de proteínas adsorbidas durante el proceso de acoplamiento.

Un factor importante que debe tomarse en cuenta a la hora de seleccionar la matriz apropiada, es la disminución de la porosidad durante el tratamiento químico. Las camas antes de la activación pueden poseer poros que permitan la penetración de proteínas con pesos moleculares hasta de medio millón. Sin embargo, dicha porosidad disminuye durante las modificaciones químicas requeridas para la incorporación del ligando.

La importancia de la porosidad de la cama se ilustra con el siguiente esquema:



Part. porosa Insustituída

$$E_{\text{fuera}} = E_{\text{dentro}}$$

Part. porosa sustituida

$$E_f < E_d$$

Part. baja porosidad sust.

$$E_f > E_d$$

Fig. No. 2.- Adsorción de proteína en función de la porosidad y la sustitución con Ligando.

Los estudios de la purificación de la B-galactosidasa aislada de E.coli, nos sirve como ejemplo para demostrar la ventaja de una acrilamida polimerizada frente a una matriz de agarosa¹⁹. En estudios comparativos, se prepararon las dos matrices (agarosa y poliacrilamida) bajo las mismas condiciones y se observó que pese a que la poliacrilamida tenía un grado diez veces mayor de sustitución, no fue tan efectiva como la agarosa para la adsorción de la enzima. Se argumenta que muchos de los ligandos deben estar localizados en el interior de la propia matriz, inaccesibles a la enzima ya que el tamaño de la misma es relativamente alto y dificulta la penetración a través de los poros.

No obstante, es importante reconocer que en ciertos casos la porosidad de la matriz no es tan fundamental. Nos referimos a los casos en los que la capacidad de la matriz no es un factor limitante o aquellos en los que se pretende separar complejos de gran tamaño: Polisomas, Células intactas, fracciones membranares, etc. Como ejemplo podemos dar el uso de los derivados de Naptenpoliacrilamida que han dado tan buenos resultados en la separación de linfocitos capaces de reconocer específicamente al Hapteno²⁰. Y similarmente, derivados de Insulina-agarosa, que pueden ser empleados en la retención de células fantasmas que contienen receptores de superficie para la insulina¹. En todos estos casos la porosidad no resulta ser importante;

sin embargo, es necesario que la matriz no actúe como malla filtrante para el atrapamiento físico de las grandes moléculas en solución. Las camas de grandes partículas esféricas que permiten grandes espacios entre ellas, son ideales en situaciones análogas.

Recientemente han aparecido técnicas de inmovilización de sustancias orgánicas en superficies de vidrio²¹. La tripsina y la pepsina, han sido enlazadas covalentemente a camas de vidrio poroso con un agente acoplante: El silano. Los acarreadores inorgánicos como el vidrio, tienen la ventaja de ser resistentes al ataque microbiano, a la disolución por solventes orgánicos y a las alteraciones configuracionales como resultado de cambios en el pH o en la composición del Buffer. Desafortunadamente, la adsorción no-específica de proteínas en la superficie del soporte constituyen un serio problema y la porosidad de las partículas de vidrio no facilita el tránsito de macromoléculas. Este tipo de soportes son particularmente útiles en los casos en los que el ligando que va a ser inmovilizado es altamente insoluble en agua. Como un ejemplo diremos que el estradiol ha sido acoplado a derivados sustituidos de 2-aminoalquil de vidrio, por procedimientos muy semejantes a los empleados para la activación de agarosa³. El flujo de las columnas montadas con este tipo de soportes es prohibitivamente lento y el empaquetado tan cerrado, que origina atrapamientos mecánicos de materiales de

gran tamaño.

Selección de Ligandos:

En la preparación de adsorbentes enzimáticos selectivos, las moléculas pequeñas que van a ser ligadas covalentemente al soporte sólido deben mostrar una especial afinidad por la macromolécula que se desea purificar. Con este objeto, se puede emplear un efector, un cofactor, un inhibidor, una vitamina y en casos muy especiales, el propio sustrato. Cuando una enzima requiere de dos sustratos para efectuar la reacción, uno de ellos puede ser seleccionado para inmovilizarla. En general, podemos decir que el sustrato correspondiente solo podrá ser usado para atrapar a la enzima si en las condiciones de inmovilización no se favorece la función catalítica de la misma.

Las pequeñas moléculas utilizadas como ligandos, deben poseer grupos químicos que puedan ser modificados para enlazarla al soporte sólido sin abolir o sin afectar seriamente, la parte que empleará para unirse a la enzima; es decir, la porción complementaria a la enzima.

Se ha observado que en la inmovilización del ligando, se presenta una disminución en la afinidad entre éste y la enzima. Se ha visto, por ejemplo, que si la fuerza de interacción del complejo E-S es muy fuerte en solución, del orden de una $K_i = 10^{-9}$ M un decremento de tres órdenes de magnitud se pre

senta en el caso del ligando insolubilizado. No obstante, en estas condiciones sigue siendo considerado como un adsorbente selectivo y efectivo.

Para la purificación efectiva por cromatografía de afinidad, la parte crítica del ligando que va a interactuar con la macromolécula debe estar lo suficientemente distante de la matriz, como para minimizar las interferencias estéricas en el acoplamiento. Este tipo de consideraciones parece ser muy importante con proteínas de alto peso molecular, muy voluminosas. Se han podido evitar en gran parte estas dificultades empleando ligandos unidos a uno de los extremos de un hidrocarburo largo ó "brazo", que por el otro lado está enlazado a la matriz.

Acoplamiento del Ligando a la Matriz:

Ciertos factores son de tomarse en cuenta a la hora de llevar a cabo el enlazamiento de un ligando determinado a una matriz cualquiera. Los procedimientos empleados consideran las propiedades fisicoquímicas de ambos elementos así como el tipo de grupos que van a intervenir en el enlace. Por esta razón vamos a discutir un poco sobre la naturaleza del enlace, su estabilidad y los diferentes procedimientos empleados para el acoplamiento.

a).- Naturaleza del enlace: En casi todos los casos, los sistemas de cromatografía de afinidad involucran la unión covalente entre el ligando

y la matriz. El enlace iónico ó la adsorción física, son propensos al desplazamiento ó eliminación del ligando de la matriz.

- b).- Estabilidad del enlace: Al menos se debe tener la seguridad de que el complejo ligando-matriz es estable a las condiciones experimentales; de otra manera, la elución del ligando ocurrirá durante la cromatografía. Si esto último sucede a escala importante, todo el material de interés (ligante), podría ser eluido acompañado con el ligando.
- c).- Cantidad de ligando incorporada al acarreador: Algunos estiman que la eficiencia de la reacción de acoplamiento, está dada por la cantidad de ligando no "atrapada". La cantidad de ligando unido al acarreador representa, teóricamente, la capacidad máxima de enlazamiento del bioadsorbente. En la práctica, sólo una fracción de las moléculas puede tener acceso a los sitios de enlace ya que la matriz no posee la porosidad ideal y por otra parte, una vez que una macromolécula ha sido adsorbida puede enmascarar ligandos adyacentes. No obstante es importante tener una determinación más o menos precisa, del rendimiento del acoplamiento; con este fin el ligando puede ser removido químicamente intacto de una porción del soporte, por hidrólisis ó bien por una reacción de reducción cuando está involucrado un enlace diazo (2). El empleo reciente de ligandos marcados" permite el cálculo ex:

to del rendimiento de acoplamiento.

d).- Procedimientos de acoplamiento¹²: Diversos procedimientos se han aplicado para la preparación de bioadsorbentes. Como se mencionó anteriormente, los acarreadores de agarosa, poliacrilamida y vidrio son los más empleados en cromatografía de afinidad. En general, la preparación de un bioadsorbente admite tres variantes:

- La del enlace directo del ligando a la matriz
- La del alargamiento del ligando por un brazo que subsecuentemente es enlazado a la matriz
- La derivación del acarreador con un espaciador a cuyos extremos se unen ligando y matriz opuestamente.

Se ha insistido ya en que las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la formación del enlace entre el ligando y matriz deben respetar la integridad de cada uno de éstos. En el caso en que el ligando es una macromolécula biológicamente activa, el enlace debe efectuarse con los grupos funcionales no responsable de dicha actividad. Por ejemplo, en el caso de enzimas, el enlace debe llevarse a cabo por medio de los grupos $-NH_2$ y/o $-COOH$, libres.

De acuerdo a las características de la matriz y considerando la naturaleza del ligando, se han establecido una serie de técnicas que po

demos clasificar de la siguiente manera:

- Activación de polisacáridos
- Activación de poliacrilamida
- Activación de camas de vidrio

Activación de polisacáridos:

Recientemente se ha propuesto un método de activación de polisacáridos, - que considerando las experiencias previas, se ha resumido en dos etapas:

- I. La formación de un intermediario reactivo, al tratar el polisacárido por unos minutos con una solución de haluro de cianógeno en condiciones alcalinas ^{7, 8} . . .
- II. . . . y la fase de acoplamiento propiamente dicha, que consiste en ligar el intermediario con el ligando correspondiente.

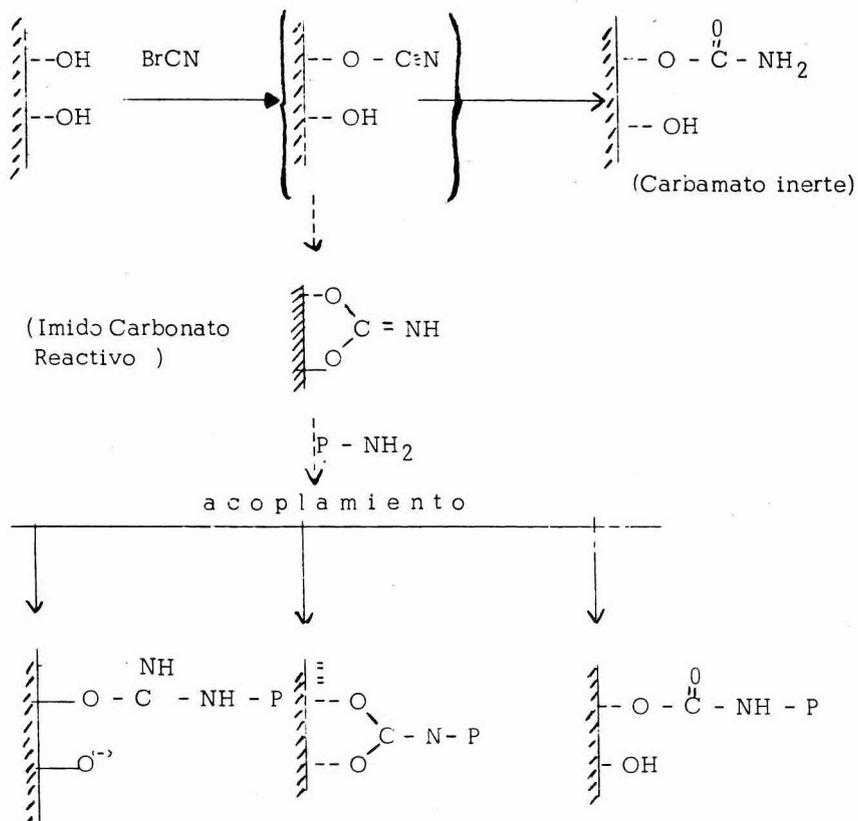


Fig. No. 3.- Esquematzación de la activación química de polisacáridos, por medio de haluros de cianógeno y acoplamiento químico de proteínas al complejo activado: polisacárido - haluro de cianógeno.

La reacción entre el polisacárido y el haluro de cianógeno parece ser muy complicada. El ataque directo sobre carbohidratos como la Celulosa y la Dextrana, se lleva a cabo sobre los grupos oxihidrilo. La reacción se efectúa a un pH relativamente alto ($\text{pH} = 11$) con la formación de la cianamida correspondiente.

El Sephadex "activado" ha sido analizado después de romperlo y secarlo, y se ha determinado que contiene nitrógeno pero no bromuro. Cuando a dicho soporte se le acopla la metil éster alanina, como ligando, en condiciones débilmente alcalinas, da un producto con el mismo contenido de nitrógeno que en el Sephadex "activado". Por lo tanto, durante el acoplamiento se libera amoniaco. Las pruebas hechas sugieren que los intermediarios, así como los productos finales, son principalmente ésteres de ácido carbónico-imino; pero tampoco puede excluirse la posibilidad de la formación de un éster cianato altamente reactivo.^{22, 23}

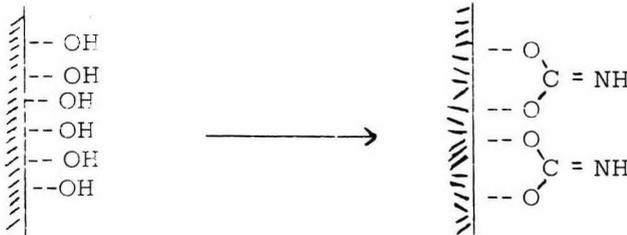
Se ha encontrado también, que las reacciones entre el bromuro de cianógeno y el Sephadex G-200 se acompaña de un progresivo decremento en la capacidad de "hinchamiento" del Sephadex, a medida que la sustitución aumenta.

T A B L A No. 1

Efecto de la sustitución en las propiedades de "Hinchamiento" de Sephadex (50 mg) a varios valores de pH y a 23° C con bromuro de cianógeno (50 mg en 2 ml de agua).

<u>pH de act.</u>	Decremento en el Vol. de la cama comparado con el Sephadex sin act.		
	G-25	G-100	G-200
9.5	10	10	10
10.0	25	60	70
11.0	50	60	70

Se ha propuesto como una explicación a este fenómeno de "encogimiento", la formación de enlaces entrecruzados (cross-linking), lo cual está de acuerdo con la formación Imino-ésteres:



El rendimiento de la reacción de acoplamiento depende de las condiciones experimentales, tal y como se puede ver en la siguiente tabla:

T A B L A No. 2

Activación de Sephadex G-25 utilizando bromuro de cianógeno, a diferentes pHs y cantidad de reactivo.-

pH	Polimero (tipo)	Sol. reactivo (mg BrCN/ml H ₂ O)	I *	II**
10	Seph. G-25	25	10	295
11	"	25	10	560
11	"	25	20	860
11	"	75	20	930
11.5	"	25	20	1 025
11.5	"	75	20	1 000
12.0	"	25	20	800

* I.- Cant de Gli-Leu añadidos (mg dipeptido/50 mg de poli)

**II. Cantidad de dipeptido acoplado (mmoles /g de poli)

T A B L A No. 3

Activación de Sephadex G-25 (50 mg) a pH 11 y 23 ° C con bromuro de cianógeno (50 mg en 2 ml de agua) variando el tiempo de activación:

Tiempo de reacción	Cant. de dipeptido (Gli-Leu) acoplado moles/g
3 min.	430
6 min.	560
12 min.	690
24 min.	640

T A B L A No. 4

Activación de Sephadex G-200 (50 mg) con Ioduro de cianógeno (60 mg/2 ml agua) y Cloruro de cianógeno (100 mg/2 ml agua) a pH 11 y 23 ° C a diferentes tiempos.

tpo (horas)	Cant. dipep. acoplado (moles/g)		Rend. del acopl. (%) basado en dipep. añadido	
	ICN	CICN	ICN	CICN
0.5	310	500	31	52
1	855	480	96	50
2	880		99	

Se han utilizado otros agentes activantes además del bromuro de cianógeno, tales como los cianatos orgánicos en un pH óptimo de 10-11, para polisacáridos. La ventaja con este tipo de agentes es que la activación es mucho más rápida que con los correspondientes cianógenos. En este caso, los intermedios activos son los imido-ésteres y los imido-carbonatos, muy similares a los obtenidos en la activación con el BrCN.

Finalmente, es importante recalcar, que el acoplamiento de proteínas a este tipo de soportes "activados" se lleva a cabo a través de los grupos amino primarios no-protonados, eficientemente. El medio de la reacción de acoplamiento debe ser elegido a un pH arriba del pK del ligando; es decir, entre 7 y 8 para aminas aromáticas, ($pK_a = 5$); 9.5 y 10 para aminoácidos ($pK_a=8$); y 10 para aminas alifáticas. Los derivados formados son la Isourea N-sustituídos Imido-carbonatos ó el carbonato correspondiente (ver fig. No. 3).

Activación y acoplamiento a Gel de poliacrilamida

Este tipo de matriz es un copolimero de acrilamida y N - N'-metilen bis - acrilamida que resiste a la hidrólisis en un rango de pH de 1 a 10.

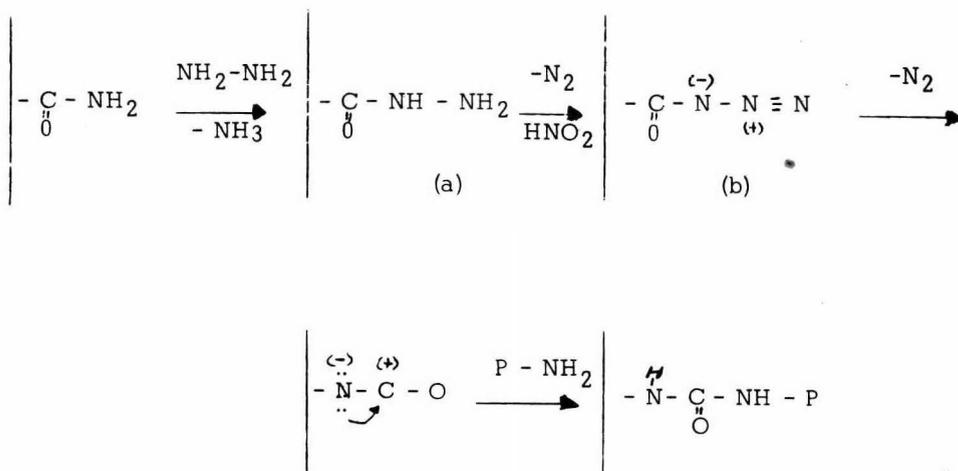


Fig. No. 4.- Activación y acoplamiento a Gel de poliacrilamida.

El tratamiento de la poliacrilamida con una solución acuosa de hidrazina, produce el gel de acil-hidrazida (a), quien a su vez es convertido por el ácido nitroso a un intermediario clave: acil-ávida (b). Este último puede ser acoplado ya sea a ligandos aminados, ó a espaciadores.

Activación y acoplamiento a camas de vidrio:

El vidrio poróso ha sido introducido como matriz para insolubilizar enzimas, gracias al desarrollo de la búsqueda de acarreadores adecuados para procesos de producción a gran escala. El vidrio es muy resistente a los cambios en la acidez y en el solvente, al daño mecánico y al ataque microbiano, como se dijo anteriormente. La activación de las camas de vidrio se ha logrado empleando derivados del 3-aminopropiltrietoxisilano, como se muestra en la fig. No. 5. En general, hay muy pocos datos, a la fecha, del uso del vidrio en cromatografía de afinidad. El Glutaraldehido puede hacerse reaccionar con la matriz derivada de vidrio, dejando el grupo carbonilo en disposición de ser enlazado a la glicil-D-fenilalanina, que es el inhibidor de la carboxipeptidasa A²⁴.

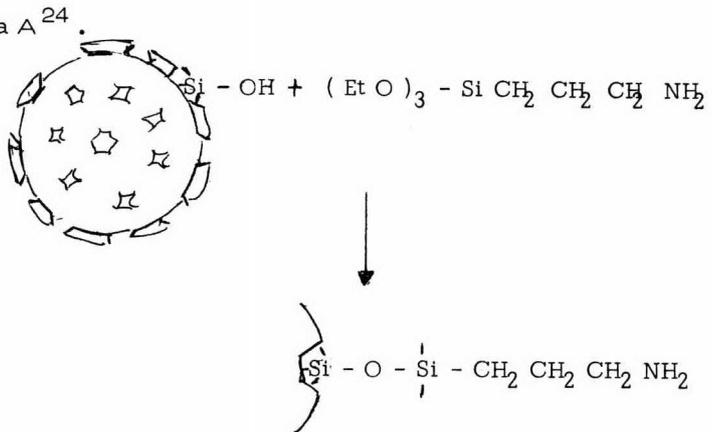


Fig. No. 5.- Derivación de la cama

Aplicaciones

Ya hemos señalado que la técnica de afinidad cromatográfica ha sido empleada para la purificación de una gran variedad de sustratos, por ejemplo: - Enzimas; transportadores, enlazantes represores de proteínas; sustratos - peptídicos, antígenos y fragmentos de la degradación proteolítica de proteínas; glicoproteínas y polisomas; virus; hormonas; etc. etc.

Para dar por terminado el presente trabajo, hablaremos un poco de los procedimientos empleados para separar la - galactosidasa, ya que se trata - de un caso con objetivos similares a los nuestros.

Purificación de la - galactosidasa de E. coli.-

Diversos adsorbentes han sido preparados empleando un inhibidor competitivo para la - galactosidasa aislada de E. coli: El p-amino fenil - - D - tio galacto - piranosido. (Fig. No. 6)

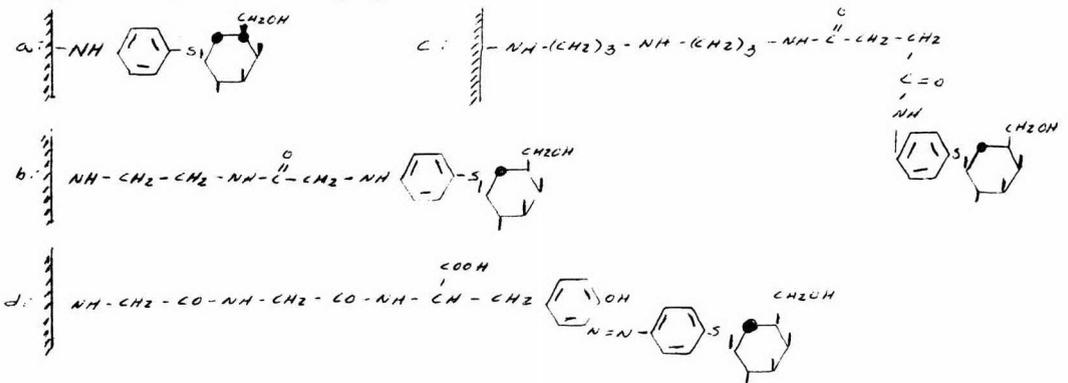


Fig No. 6. Adsorbentes preparados empleando como matriz la agarosa

El derivado (a), el cual posee el inhibidor ligado directamente a la matriz de agarosa, fue totalmente inefectivo para la adsorción de la enzima. En cambio, el derivado (b), provoca un ligero retardamiento en la migración de la enzima que podría ser comparado con la ilustración (b) de la Fig. No. 1. Los derivados (c) y (d) a su vez, originaron una fuerte adsorción resultando por lo tanto sumamente efectivos¹⁹. Con este caso se demuestra perfectamente el efecto de las interacciones estéricas entre matriz y "ligante", - así como la utilidad de emplear "brazos" en la preparación de bioadsorbentes para los procesos de purificación.

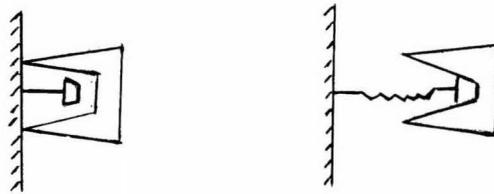


Fig. No. 7.- El "brazo" permite una mejor interacción ligando - ligante.

La enzima es adsorbida fuertemente a un pH neutro en columnas que contienen la resina (c) y la elución puede llevarse a cabo con Buffer de pH 10. La enzima obtenida por este procedimiento se manifiesta pura en - electroforésis de disco de gel. Y resulta muy interesante el hecho de que

el monómero de la enzima se ligue al tiogalactósido-agarosa en la misma proporción que la forma tetrámera y que bajo las condiciones estudiadas - son eludidas juntas a un pH de 10.

El monómero carece de actividad hidrolítica muy probablemente debido a la pérdida de la habilidad para asociarse en la forma tetrámera activa.

Los adsorbentes de poliacrilamida preparados de manera similar a los derivados de agarosa de la Fig. No. 6, resultaron ser inútiles en la adsorción ó en el retardamiento de la migración, tanto de muestras puras como "crudas" de β -galactosidasa de E. coli. Seguramente la falta de porosidad adecuada, el hecho de que muchos de los ligandos insolubilizados puedan quedar dentro de la matriz inaccesibles a la proteína en solución y las modificaciones estructurales que se suceden en el paso de la acilazida de la activación, son factores que se conjugan para dar origen a un adsorbente inefectivo²⁵.

B I B L I O G R A F I A

1. Coatrecasas, Pedro. *Advances in Enzimology* Vol. 36 (1974).
2. Guilford, H. *Chem Soc. Rev.* 249 - 270 (1973).
3. Cuatrecasas, P. *J. of Biol. Chem.* 245, 12 3059-64, (1970)
4. Porath, J. *Nature* 218, 834-38, (1968)
5. Hjertén, S *Arch. Biochem. Biophys.* 99, 446, (1962)
6. Cuatrecasas, P. and Parikh, Indu *Biochemistry* 11, 12 , 2291, (1972)
7. Porath, J. et al *Nature* 215, 1 491, (1967)
8. Hicks, G. P. and Updike, S. J. *Anal. Chem.* 38, 726, (1966)
9. Mosbach, K and Mosbach, R, *Acta Chem Scand.* 2 807 (1966)
10. Cuatrecasas, P. and Anfinsen *Methods in Enzimology* W. Jacob Ed. Vol. 23. Academic Press, N. Y. Pág. 345 (1971).
11. Inman, J. K. and Dintzins, H. M. *Biochem*, 8, 4074, (1969)
12. Sundberg, and Porath, H. J. *of Chromatography* 90, 87-98, (1974)
13. Weliky, N. et al *Inmuochem*, 1, 219, (1964)
14. Weethall, H. H. and Weliky, N., *Nature*, 204, (1964)
15. Weliky, N, and Weethall, H. H. *Inmuochem*, 2, 293 (1965)
17. Axén, R. Porath, J., and Erneback, S. *Nature* 214, 1302, (1967)

18. Axén, R. and Porath, J. *Nature*, 210, 367, (1966)
19. Steers, E., Cuatrecasas, P., and Pollard, H., *J. of Biol. Chem.* 246, 196, (1971)
20. Trujja-Baxchi, P, and Wofsy, L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 66, 685, (1970)
21. Weethall, H. H. and Hersh, L. S., *B. B. acta* 185, 465, (1969)
22. Hoyer, H. *Chem Ber.* 94, 1042, (1961)
23. Hough, L. et al *J. Chem Soc.*, 1934, (1962).
24. Robinson, P. J. et al *Biochim, Biophys, Acta* 242, 659, (1971)
25. Cuatrecasas, P. *J. of Biol. Chem.*, 245, 3059, (1970).