

Laboratorio de Radiobiología, C. S. I. C., Facultad de Veterinaria de Madrid
Instituto de Investigaciones Veterinarias
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Madrid

Determinación de las diferentes formas químicas de encontrarse el azufre en la ovomucina

por

M. D. Astudillo, V. Fernández y F. Sanz

(Recibido para publicar el 25 de noviembre de 1956)

En nuestros estudios de sulfoconjugación en mucopolisacáridos nos hemos encontrado con diversos problemas de análisis de azufre que nos han sido preciso resolver. Unas veces por métodos químicos, otras por métodos radioquímicos, amperométricos, potenciométricos, colorimétricos, cromatográficos, etcétera.

Actualmente el análisis de estos compuestos está adquiriendo excepcional importancia, por servir en muchos casos para diagnóstico de ciertas enfermedades, tales como el reumatismo, hepáticas, etc., y es de esperar que no tardando mucho estos análisis, entren a formar parte de los análisis clínicos corrientes.

La química de los mucopolisacáridos toma una orientación nueva desde el 1946. Se ha comprobado que en la dinámica del tejido conectivo los mucopolisacáridos tienen una gran participación y que muchos de los antígenos naturales son polisacáridos de interés.

Revisiones sobre la química de los mucopolisacáridos se han dado por diversos autores. Son clásicas las de STACEY (18), WHISTLE, MEYER (12) y, más recientemente, las de DORFMAN (5) y JEAMLOZ. De la lectura de unas y otras se saca como consecuencia que no hay un concepto exacto y claro sobre aquellas sustancias que deben incluirse en el grupo de mucopolisacáridos.

Blix (3) limita este grupo a las sustancias que contienen esencialmente exosaminas, y ácidos urónicos y para otros este concepto no es exclusivo. RIEDER (14) indica que la glucosamina se encuentra en los dos principales mucopolisacáridos de huevo.

La utilización del radioisótopo S^{35} para el estudio de la formación de mucopolisacáridos fué empleada por DZIEWIATKOWSKI y colaboradores (6) en lo que se refiere a la formación del sulfato de condroitín y con la misma finalidad lo emplearon también BOSTRÖEM y AGVIST (4) para estudiar la formación de mucopolisacáridos de cerebro y piel.

Por estos autores y por SANZ y ASTUDILLO (1, 15) se ha venido demostrando que en la formación de mucopolisacáridos hay utilización de azufre cuando se administra al organismo en forma de sulfatos.

Una importante recopilación sobre el aislamiento y análisis de mucopolisacáridos se ha publicado recientemente por KENT y WHITEHOUSE (9).

MEYER, NEUBERGER y STACEY (13) han estudiado además del ovomucoide y de la ovomucina otros mucopolisacáridos de menor importancia contenidos en el huevo de gallina.

Los datos analíticos recogidos sobre la composición química de la ovomucina son los siguientes :

	Young	Meyer	Lanni	Sörersön
N	12,5	12,1-13	12,5	—
S	1,73	—	2,4	—
Cistina	4,57	—	—	—
Exosamina	11,0	7,8-9,3	—	—
Exosa (met. orcinol). . .	—	—	10,3	14,9
Total carbohidratos como azúcares reductores . .	—	17,1-19,1	—	—

Material y métodos

PARTE BIOLÓGICA

Se han utilizado gallinas de raza Leghorn, de unos ocho meses y peso aproximado de 1,3 Kg.

Se administró el S^{35} en forma de sulfato sódico, por inyección en los músculos pectorales, en una sola dosis de 1,3 microcuries por gramo de peso.

Se recogieron los huevos después de haber inyectado.

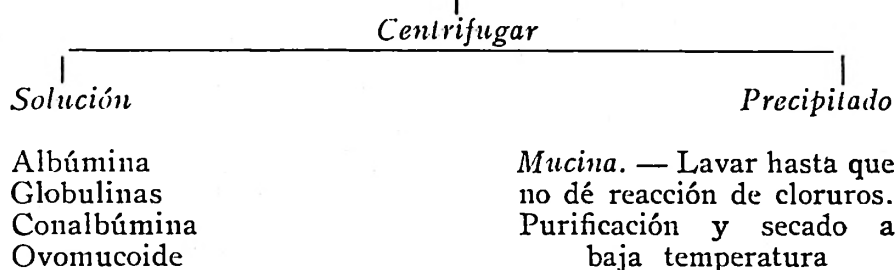
PARTE QUÍMICA

Para la separación de las proteínas de la clara de huevo,

así como para la purificación de la ovomucina y del ovomucoide, se ensayaron diversos procedimientos y se introdujeron las modificaciones que se consideraron oportunas.

Fraccionamiento de la clara

Se trata con igual vol. de sol. ClNa , 0,25 %, y se ajusta a pH 6 con ClH 1 N

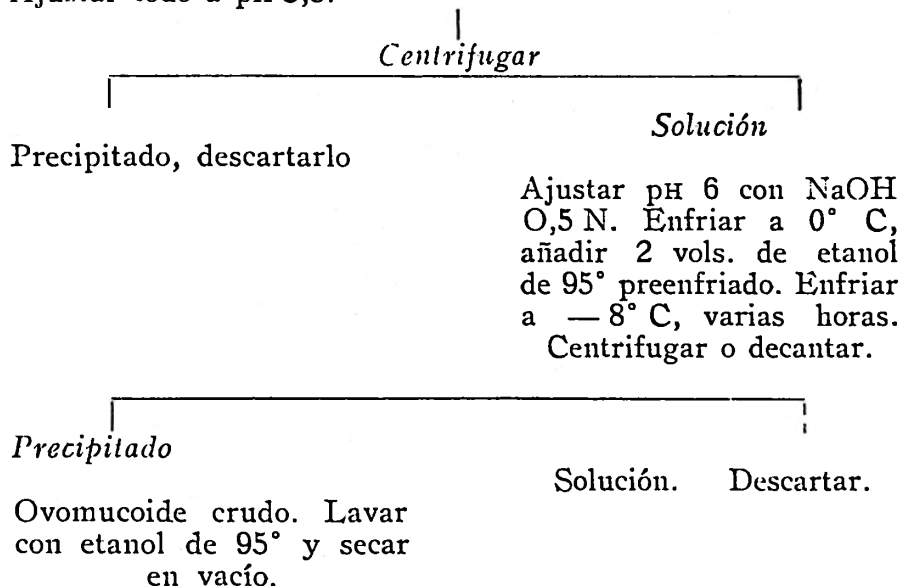


Preparación del ovomucoide

Ajustar pH 3,5 con SO_4H_2 , 1 N

Añadir tricloroacetato sódico del 10 % a pH 3.

Ajustar todo a pH 3,5.



DETERMINACIÓN DE AZUFRE

Secas las proteínas, se pesó de ellas la cantidad obtenida por huevo y de esta cantidad se tomaron dos partes : una para

análisis de azufre total y otra para el análisis del azufre sulfoconjugado.

Para el análisis de azufre total se siguió el método de oxidación con peróxido, en la bomba Parr, semimicro y se precipitó como sulfato bórico, recogiendo el precipitado en filtros portamuestras de plexiglás sobre papel Albet número 242, se secaron primero a 60° C para poder medir la actividad y después se calcinaron a 850° C. Se mantuvieron en desecador hasta peso constante.

Para determinar el azufre sulfoconjugado, se hidrolizó la mucina con ClH 6 N a reflujo, durante una hora. Se eliminó el ClH de los hidrolatos, y se decoloró la solución. Recogidos filtrados y aguas de lavado se concentraron y precipitaron como BaSO₄ a un pH 3,8. Se midió la actividad y se calcinó, como en el caso anterior.

Como la cantidad de azufre es pequeña en sulfoconjugados, se añadió, antes de precipitar con BaCl₂, una cantidad conocida de solución de Na₂SO₄ Merck.

La cistina se determinó como mercaptido de cobre primero y, después, se oxidó éste con peróxido, en la bomba, para referir todas las determinaciones a sulfato bórico con las correcciones de autoabsorción de las débiles energías con partículas β del S³⁵.

PARTE RADIOQUÍMICA

Empleamos sulfato sódico radioactivo procedente del centro radioquímico de Amersham (Inglaterra).

Se prepararon muestras del orden de 25 mg. de BaS³⁵O₄ para hacer las medidas radioactivas y se aplicaron las correcciones de autoabsorción por el método de Yankwich (17), trabajando a espesor infinito siempre que fué posible.

Para las medidas de actividad se utilizó contador G-M de ventana de mica, TGC 2 de 1,6 mg/cm², de la casa Tracerlab (Boston), con los correspondientes circuitos de suministro de alto voltaje estabilizado, amplificador, registro y castillo de plomo de la casa inglesa E. K. Cole.

Se mantuvo constante la geometría de las medidas haciéndose por duplicado. Se contaron impulsos suficientes para mantener en cada caso el error estadístico entre 1 y 2 %. Se tuvo en cuenta la fase de desintegración del isótopo en el día de la medida.

Resultados

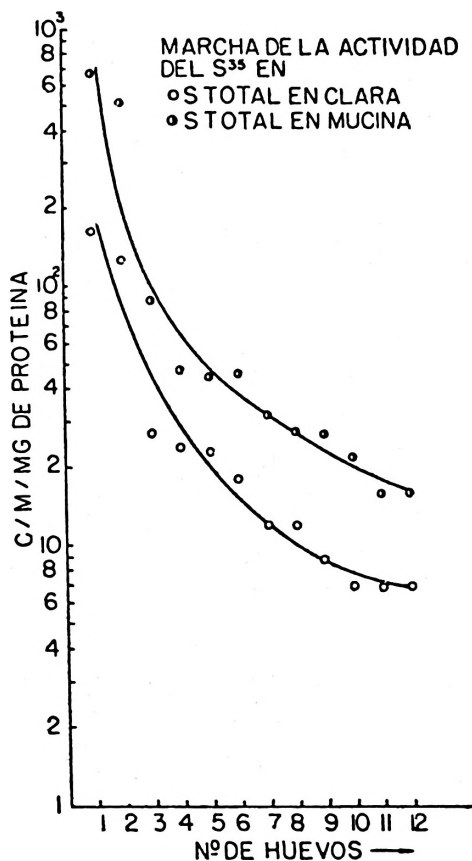
En la tabla I se encuentran los resultados del análisis elemental de ovomucina.

TABLA I

*Análisis elemental de
Ovomucina*

N = 11,75	%
C = 44,27	>
S = 2,68	>
H = 6,84	>
O = 34,73	>

La tabla II contiene los análisis químicos de azufre total de mucina. Las variaciones encontradas están en relación, por una parte, con el peso de la mucina por huevo y, por otra, con el contenido de azufre total, que difiere de un huevo a otro, porque es posible que existan variaciones individuales.



Gráf. 1

TABLA II

Determinaciones de azufre total en Ovomucina (gravimetrías)

N.º de muestra	Peso de ovom. por huevo	mg. de BaSO ₄	Azufre por ciento
1	98,9	16,6	2,3
2	114,2	17,2	2,1
3	105,0	20,7	2,7
4	111,6	20,8	2,5
5	92,6	21,3	3,1
6	81,3	18,4	3,1
7	95,3	20,0	2,9
8	97,8	18,4	2,6
9	96,0	21,2	3,0
10	94,0	17,5	2,5
Media . . .			2,68

El porcentaje de azufre oscila del 2,1 al 3,1 en las diez muestras analizadas.

En la tabla III (gráf. 1) se recogen los datos del análisis radioquímico del azufre total de la clara y mucina de doce huevos. Se establecen las siguientes relaciones entre clara y mucina :

TABLA III

Análisis radioquímico de azufre total de Clara y de Ovomucina

N.º de huevo	Clara mg.	Mucina mg.	Relación clar./muc. mg.	S. total de clara c/m/mg.	S. total de mucina c/m/mg.	Relación clara/mucina total c/m/S
1	3.700	124,8	30,0	163	668	7,2
2	3.794	117,1	32,3	126	517	7,9
3	3.654	135,2	27,0	27	89	8,9
4	4.359	141,7	30,7	24	48	15,4
5	4.230	169,7	24,9	23	45	11,3
6	3.942	151,6	26,0	18	47	14,1
7	3.514	167,8	20,9	12	32	—
8	3.795	147,9	25,6	12	28	10,9
9	3.532	142,5	24,7	9	27	—
10	4.731	116,4	40,6	7	22	12,8
11	3.966	126,3	31,4	7	16	13,7
12	4.365	121,6	35,8	7	16	15,6

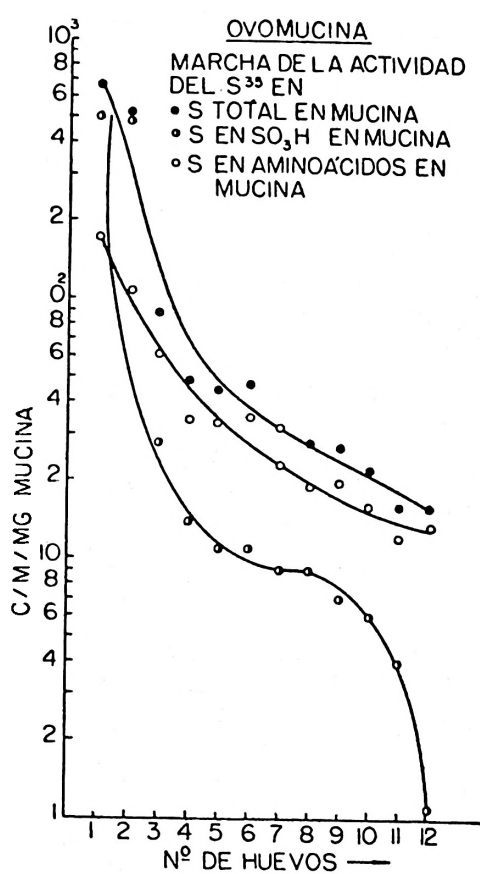
TABLA IV

Análisis radioquímico de azufre total, azufre sulfoconjugado y azufre amínico de Ovomucina. Actividad específica, c/m/mg. (S³²)

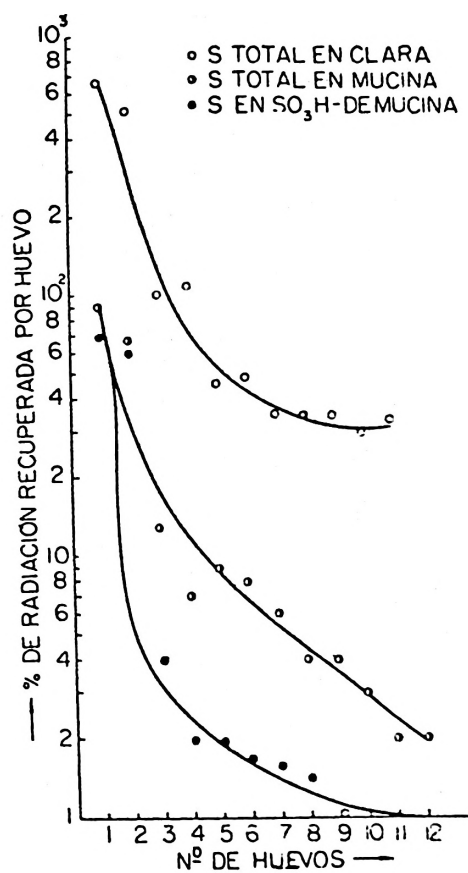
N.º de huevo	S. total en mucina c/m/mg.	S. sulfoconjugado de mu. c/m/mg.	S. amínico de mucina c/m/mg.	S. % total en mucina	S. % en sulfoconjugados
1	668	497	171	2,25	0,77
2	517	487	—	—	0,69
3	89	28	61	3,90	0,73
4	48	14	34	4,17	0,55
5	45	11	34	3,71	0,60
6	47	11	36	—	0,47
7	32	9	19	2,41	0,79
8	28	9	19	—	0,78
9	27	7	20	2,42	1,05
10	22	6	16	2,50	1,19
11	16	4	12	2,36	0,66
12	16	1	—	2,15	0,89
Media				2,70	0,760

Peso total de clara, mg *Radiación de azufre total en clara*
 ----- ; -----
Peso total de mucina, mg. *Radiación de azufre total en mucina*

por huevo. Las pequeñas variaciones en la relación de pesos están justificadas, por las mismas razones expuestas para la tabla II, que difieren de un huevo a otro.



Gráf. 2



Gráf. 3

Las relaciones que se establecen entre la radiación en clara y mucina, prueban que en la primera fase predomina la actividad en mucina, probablemente por el proceso de sulfoconjugación y, hacia el cuarto día, dicha relación aumenta y tiende a ser constante.

La tabla IV (gráf. 2) contiene los resultados de los análisis de mucina en azufre total, azufre sulfoconjugado y azufre amínico, y la tabla V (gráf. 3.) los porcentajes de radiación

TABLA V

Porcentaje de radiación recuperada en las siguientes fracciones de dosis administrada (dosis 1,3 rc/g. S³⁵O, sulfato):

N.º de huevo	En S. total de clara	En S. total de mucina	En S. sulfoconjugado de mucina
1	0,661	0,091	0,068
2	0,513	0,067	0,059
3	0,114	0,013	0,004
4	0,106	0,007	0,002
5	0,106	0,009	0,002
6	0,110	0,008	0,002
7	0,046	0,006	0,001
8	0,049	0,004	0,001
9	0,049	0,004	0,001
10	0,035	0,003	0,001
11	0,030	0,002	0,000
12	0,034	0,002	0,000
Suma	1,839	0,216	0,142

recuperada en clara, en azufre total de mucina y en azufre sulfoconjugado.

Se observa una desproporción entre la actividad recuperada en el azufre sulfoconjugado y en el azufre amínico, teniendo en cuenta la mayor cantidad que existe de este último en mucina.

En resumen, los resultados de estos análisis han sido los siguientes :

$$\text{Ovomucina} \left\{ \begin{array}{l} \text{Azufre total} \quad 2,68 \% \\ \text{S sulfoconjugado} \quad 0,80 \% \\ \text{Cistina} \quad 4,65 - 1,32 \% \text{ S} \end{array} \right\} \left\{ \begin{array}{l} 1,88 \% \text{ S amínico} \\ 0,80 \% \text{ S} \\ \text{sulfoconjugado} \end{array} \right.$$

Discusión

Los datos de la tabla III demuestran la existencia de azufre sulfoconjugado en ovomucina. Algunos autores parecen indicar la existencia de este hecho, pero datos experimentales no han aparecido en la bibliografía.

La relación entre la actividad específica c/m/mg del S total y del S sulfoconjugado (después de haber administrado el S en forma de sulfato) nos demuestran que en la mucina hay metabolismo de azufre a grupos SO₃H — en una proporción bastante considerable, si se tiene en cuenta que ponderalmente estos grupos significan menos que el azufre contenido en la parte proteica. La relación que existe entre estas dos formas de azufre no está claramente establecida, ni en la bibliografía

se encuentran datos. Tampoco aparecen, de si la sulfoconjugación es un fenómeno previo o independiente del paso de sulfatos a proteínas.

De los hechos aportados en este estudio, se demuestra claramente que el azufre inorgánico, en este caso el sulfato, parte del mismo se metaboliza a sulfoconjugados y parte a proteínas.

La eficacia de esta transformación en las aves parece intensa, y se puede decir de los datos obtenidos que se realiza en una proporción mayor en huevo que en otros órganos y parece ser más intensa que la señalada en la bibliografía para cartílagos y mucosas de mamíferos.

Conclusiones

Los análisis de azufre realizados en ovomucina nos permiten sacar las conclusiones siguientes :

- 1.^a Existe una fracción de azufre sulfoconjugado en ovomucina del orden de 1,0 % y que puede incluirse esta proteína entre las *sulfomucinas*. Que existen variaciones individuales en la cantidad de este azufre sulfoconjugado.
- 2.^a La actividad radioactiva se concentra principalmente en esta fracción de azufre sulfoconjugado durante los cuatro primeros días de administración de la radiación, mientras que la actividad en azufre amínico es pequeña ; después de los cuatro primeros días, disminuye la actividad del S sulfoconjugado rápidamente, aumenta la del azufre amínico, se mantiene constante durante unos días y decae lentamente.

Summary

Determination of various chemical forms of finding the sulphur of ovomucin

A study has been made of various chemical forms of finding the sulphur in ovomucin by means of the radioisotope S^{35} .

In a first publication on these problems, we reported the path made by the radioactive activity of S^{35} in white and in yolk of egg, when this radioisotope is administered in the form of sulphate.

In a second, we also published the path of this activity in six fractions obtained, two of eggwhite, two of yolk and two of shell. In this work we found that one of the eggwhite proteins had a specific activity very superior to all the others.

In this third work we investigate the cause of such activity. An eggwhite fractionation is made, testing various methods, principally those of LONGSWORTH, FREDERICQ, DENTSCH, FORSTHE and FOSTER and various others, with some modifications introduced by us.

The ovomucin, having been isolated in sufficient quantity and purified, is hydrolysed under different forms, sometimes in a closed tube at 120° C for 20 hours, sometimes in an autoclave at 2.5 atmospheres and at other times heated at reflux for 8 hours, always in acid hydrolysis. Its elemental composition is determined and twenty determinations of total sulphur and proteic sulphur are made. The quantity of total sulphur does not correspond exactly to that of proteic sulphur and it is found that it possesses $\text{—O—SO}_3\text{H}$.

Radioactive sodium sulphate is administered to a hen and twelve eggs are collected; the total eggwhite and the ovomucin is analysed, the total sulphur and the sulphoconjugated sulphur being also determined in the latter.

Determinations are made in the form of barium sulphate and after all the necessary corrections for radioactive steps, it is found that the sulphoconjugated sulphur fraction in ovomucin has great specific activity, greater than all other fractions in the first days of laying, which decreases rapidly at the same time as the activity of proteic sulphur increases.

Relations between eggwhite and ovomucin are established for weight and radioactive activity.

Some physical and chemical properties of this protein are studied among them its denaturalisation by diverse agents, its buffer property; electrophoretic tests are made for its identification in eggwhite; and its aminoacid and glucosamine composition is determined.

This work contributes the fact that ovomucin is a sulphomucin; its aminoacid composition is studied; and it is considered probable that the sulphoconjugated groups $\text{—O—SO}_3\text{H}$, are the step from sulphates to proteins this being deduced from the path of the specific activity, shown by S^{35} radiation in this protein.

Bibliografía

- (1) ASTUDILLO, M. D., y SANZ, F. : *An. R. Soc. Esp. F. Q.*, **50B**, 901, 1954.
- (2) BENESCH, R., y BENESCH, R. : *Arch. Biochem.*, **19**, 33, 1948.
- (3) BLIX, G., y FLASCHENTRAGER, Z. B. : *Physiol. Chem.*, **751**, Springer-Verlag, 1951.
- (4) BOSTRÖM, H., y AQUIST, E. G. : *Ac. Chem. Scand.*, **6**, 1557, 1952.
- (5) DORFMAN, A. : *Pharmacol. Rev.*, **1**, 1, 1955.

- (6) DZIEWIATKOWSKI, D. D., y BENESCH, R. E. : *J. Biol. Chem.*, **178**, 991, 1945.
- (7) FREDERICQ, E., y DENTSCH, H. F. : *J. Biol. Chem.*, **181**, 499, 1949.
- (8) GOLDZIEHER, J. W. y colabs. : *J. Clin. End. and Metab.*, **13**, 662, 1953.
- (9) KENT, P. V., y WHITEHOUSE, M. W. : «Biochemistry of the amino-sugar», Londres, 1955.
- (10) KOLTHOFF, I. M. : «Polarography», vol. II, pág. 942, Nueva York, 1952.
- (11) KOLTHOFF, I. M., SRICKS, W. y colabs. : *J. Anal. Chem.*, **26**, 358, 1941.
- (12) MEYER, K. : *Advances in Proteins Chem.*, **2**, 249, 1945.
- (13) NEUBERGER, A. : *Biochem. J.*, **32**, 1435, 1938.
- (14) RIEDER, S. V. : *Fed. Proc.*, **12**, 258, 1953.
- (15) SANZ, F., y ASTUDILLO, M. D. : *An. R. Soc. Esp. F. Q.*, **49B**, 609, 1953.
- (16) STANCEY, M. : *Advances in Carbohydrates Chem.*, **2**, 161, 1942.
- (17) YANKWICH, P. E. y colabs. : *Anal. Chem.*, **19**, 439, 1947.