

TRABAJOS DIVERSOS

Nota preliminar sobre el aislamiento y purificación parcial de una lisozima de la leche de burra*

Dr. M. CASTAÑEDA-AGULLO,

Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina.

Universidad Nacional.

México, D. F.

En el año de 1922, Fleming publica sus primeras observaciones sobre la acción bactericida de la clara de huevo, hechos que tenían por base los trabajos anteriores de Laschtschenko y de Rettger y Sperry. En colaboración de Allison (1923), Fleming encuentra en la clara de huevo una sustancia de característica enzimática a la que denominó lisozima y que posee acción inhibidora y lítica sobre ciertas bacterias, tanto saprofitas como patógenas. Fleming y Allison demostraron que la lisozima se halla en casi todos los tejidos animales y vegetales, pero en concentraciones menores que en la de la clara de huevo. Pudieron comprobar su presencia en el moco nasal, lágrimas, saliva, líquido pleural, semen, suero sanguíneo, pus, orina albuminúrica, etc., así como en gran variedad de huevos de aves y peces.

Más tarde, Prickett, Miller y McDonald (1933), estudian el poder lisozímico en las leches de mujer, mona, llama, perra, rata, obteniendo como resultado, el que las concentraciones en las diversas leches son aproximadamente iguales.

Bordet (1928), Rosenthal y Lieberman (1921), y los investigadores chilenos Vaccaro, Cabezas y Copaja (1944) negaron la presencia de lisozima en la leche de vaca, contrariamente a Prickett y colaboradores.

Los pediatras se fijaron desde luego en estos resultados, considerando que podrían ser de importancia para la alimentación infantil. El trabajo de Vaccaro y colaboradores señala que las deyecciones de los lactantes alimentados con leche humana inhiben totalmente el desarrollo de los cultivos de *Escherichia Coli*, *Eberthela Typhosa*, *Salmonella parathphi A.* y *Proteus Morganii*. En cambio, las deyecciones de lactantes alimentados artificialmente, carecen de poder lisozímico.

El valor terapéutico de la lisozima de la clara de huevo ya ha sido utilizado con éxito por Buyanovskaya y Jermol'eva (1938), en el tratamiento de úlceras de los ojos, infecciones postoperatorias, quemaduras, sinusitis, etc.

* Presentado en la sesión del 20 de marzo de 1946 por el señor Presidente de la Academia. Se publica en la "Gaceta" en vista del dictamen de los miembros de la Sección de Fisiología.

En aquellos países donde se emplea el asno como animal de carga, es corriente el uso de la leche de burra para el tratamiento de infecciones diversas, como las conjuntivitis, las otitis, las infecciones intestinales, etc. En México (1) algunos pediatras recomiendan para alimentación artificial de los lactantes, el empleo de la leche de burra como el mejor sustituto de la leche humana, y dicen haber observado que con su uso disminuyen en ellos los trastornos digestivos. Sin embargo, en la bibliografía no se encuentra dato alguno relacionado con la existencia de una lisozima en la leche de burra. Asimismo, los investigadores que han trabajado con diferentes leches de mamíferos se refieren a la acción directa de la leche o a las deyecciones de los alimentados con ellas, sin la obtención de ningún preparado más o menos purificado.

La presente nota preliminar tiene por objeto dar cuenta del aislamiento y purificación parcial de una lisozima de la leche de burra.

MÉTODOS

En sus lineamientos generales, el método empleado ha sido semejante al utilizado por Meyer y colaboradores (1936), para la purificación de las hormonas hipofisarias, y de la lisozima de la clara de huevo.

A un volumen de leche fresca de burra, se le agregan cuatro de acetona, y se deja la mezcla en el refrigerador, a 5° C., durante veinticuatro horas. Se forma un precipitado, que se lava sucesivamente con acetona y éter, sin que cambie la temperatura, y se le deseca en vacío, sobre anhídrido fosfórico. Se obtiene así un precipitado seco, de color blanco, que contiene como impurezas, caseína, lactatos y diversas sales, de débil actividad litica, en la proporción de seis gramos por cada 100 c.c. de leche. Del material crudo se extrae la lisozima con alcohol a 60%, acidificado con ácido acético. Se concentra el volumen a baja temperatura y se precipita con alcohol, recogiendo el precipitado en solución ligeramente alcalina y se añade lentamente SO_4H_2 diluido hasta completa precipitación. Al líquido que sobrenada se le agrega ácido flaviánico, el necesario para producir franca precipitación, y se lava el precipitado con alcohol frío. Nuevamente se disuelve el precipitado en solución débilmente alcalina, y se repite el tratamiento con SC_4H_2 , esta vez en presencia de ácido flaviánico. El precipitado se lava abundantemente con alcohol que contenga unas gotas de amoníaco, terminando de lavar con alcohol y éter fríos. Se deseca en vacío sobre anhídrido fosfórico y a -10°C . De treinta gramos, del precipitado crudo, se obtienen doscientos doce miligramos de preparación de lisozima parcialmente purificada. El producto es muy

(1) Agradecemos a los doctores Alfonso G. Alarcón y Dagoberto Molina Polo, la información relativa, que nos condujo a investigar la actividad lisozimica de la leche de burra.

soluble en solución salina, da débil la reacción del biuret y la cantidad de nitrógeno que contiene, determinado por micro-kjeldahl, es de 8.4%.

Para orientarnos en cuanto a la actividad de la lisozima obtenida preparamos y purificamos de modo análogo, lisozima de clara de huevo, en forma de flavianato, y nos servimos de la unidad propuesta por Meyer y colaboradores que proponen como tal, la cantidad mínima de lisozima necesaria para lisar 0.5 c. c. de suspensión tipo de bacterias en veinte horas, y a treinta y siete grados. Esta unidad, en la práctica, presenta ciertos inconvenientes que dependen de las condiciones biológicas de los cultivos, pero se logran valores más constantes, tanto con la lisozima de la clara de huevo, como en la de la leche de burra, usando tiempos de lisis más cortos.

De 10 gramos de clara de huevo se obtuvieron 110 miligramos, con una actividad aproximada de dos mil unidades por miligramo, rendimiento y actividad que están dentro de los límites observados por Meyer y colaboradores con sus preparados que han sido considerados como los de mayor actividad, mientras no fué posible lograr la cristalización de la lisozima.

La actividad lítica se determinó sobre suspensión de *Micrococcus lysodeikticus*, en NaCl al 0.9%, diluyendo la suspensión bacteriana hasta igualar su densidad nefelométrica con la densidad del tipo número ocho de BaSO₄, que corresponde a una concentración de cuatro mil millones de bacterias por c. c., que ha sido considerado como tipo. La edad de los cultivos en todos los experimentos fué de dieciocho horas.

RESULTADOS

TABLA I

Actividad lítica de la lisozima de leche de burra sobre *Micrococcus lysodeikticus*, a 37°

| Suspensión bacteriana tipo | Lisozima Mg. | Tiempo de producción | Lisis | Grado |
|----------------------------|--------------|----------------------|-------|------------------|
| 1 c. c. | 0.5 | Instantáneo | | Total |
| 1 c. c. | 0.1 | 20) | | Total |
| 1 c. c. | 0.05 | 30) | | Total |
| 1 c. c. | — | — | | Nulo en 24 horas |

TABLA II

Actividad lítica de la lisozima de clara de huevo sobre *Micrococcus lysodeikticus*, a 37°

| Suspensión bacteriana tipo | Lisozima Mg. | Tiempo de producción | Lisis | Grado |
|----------------------------|--------------|----------------------|-------|------------------|
| 1 c. c. | 0.5 | Instantáneo | | Total |
| 1 c. c. | 0.1 | 1.5) | | Total |
| 1 c. c. | 0.05 | 2.5) | | Total |
| 1 c. c. | — | — | | Nulo en 24 horas |

DISCUSION

Por procedimientos análogos a los empleados para purificar la lisozima de la clara de huevo, se logró aislar de la leche de burra un preparado lisozimico capaz de lisar el *Micrococcus lysodeikticus* en condiciones tipo.

La obtención de una preparación lisozimica, de origen distinto a la de la clara de huevo, sugiere que se investigue si se trata de una sola lisozima, o de dos, con diferencias especificas en cuanto a selectividad y poder lítico con relación a diversos sustratos bacterianos de interés patógeno.

RESUMEN

I.—La leche de burra contiene una lisozima, capaz de lisar el *Micrococcus lysodeikticus*.

II.—Ha sido aislada en forma de flavianato, y se le ha podido purificar parcialmente, con un contenido en N. de 8.4%.

III.—Se ha comparado su actividad (tablas I y II) con la lisozima de la clara de huevo, purificada.

Damos las gracias al Profesor Izquierdo por la revisión de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- Bordet, J., (1928).—Compt. Rend. Soc. Biol., 4,1252.
 Buyanovskaya, I., y Jermoleva, Z. W. (1938).—Acta med. U. R. S. S., 1,248.

- Fleming, A., (1922).—Proc. Roy. Soc. (B), 93,306.
- Fleming A., Allison, V. D. (1923).—Brit. J. Exptl. Path. 3,252.
- Meyer, K. Thompson, R., Palmer, J W., y Khorazo, D., (1936).—J. Biol. Chem., 113,303.
- Prickett, P. S., Miller, N. H. y McDonald, F. J., (1933).—J. of Bac. 25.61.
- Rosenthal, L. y Lieberman, H., (1921).—J. of Infect. Dis. 48,226.
- Vaccaro, H., Cabezas, J. y Copaja D., (1944).—Rev. Chilena de Pediatría, 8,599.