

Análisis de la acción enzimática de la pepsina sobre el suero antidiftérico

Por FERNANDO MODERN y GUILLERMO RUFF

Ya en trabajos anteriores, hicimos notar que en los sueros proteolizados sólo más o menos el 20 % del nitrógeno total era coagulado por el ácido tricloroacético. El resto había perdido esa propiedad y no sólo no era precipitado por ácido tricloroacético y calor sino que tampoco lo era por SO_4Na_2 al 22 % o $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ a media saturación.

La cantidad de nitrógeno coagulable fué determinada en sueros normales y antidiftéricos.

Sin embargo, hasta ahora no habíamos determinado cuantitativamente los constituyentes obtenidos por la acción enzimática de la pepsina. Ahora estudiamos esta acción, sobre sueros, plasmas y sueros concentrados (método salino) antidiftéricos.

Las proteínas antitóxicas provenientes de los materiales antes mencionados, fueron parcialmente digeridas por la acción enzimática de la pepsina en medio ácido. Las fracciones obtenidas de la molécula proteica primitiva (proteosas, peptonas y resto azoado) fueron analizadas siguiendo el método que describimos a continuación:

Como gran parte de la substancia proteolizada precipita con SO_4Na_2 al 22 %, analizamos los precipitados obtenidos por esta sal, en presencia de alcohol etílico al 10 %. Sabemos por trabajos ya publicados por nosotros, que el alcohol impide la precipitación de proteosas en gran proporción. Como estas substancias pueden perjudicar al suero final, es de gran valor el uso del alcohol principalmente en proteolisis pépsicas largas (método Parfentjev).

PARTE EXPERIMENTAL

Para analizar las proteínas que no están completamente proteolizadas, usamos el método descripto por Wasteneys y Borsook ⁽¹⁾ considerando sólo la fracción proteínica, las proteosas y el resto azoado.

De acuerdo al método antes citado, consideramos proteína a la fracción precipitable por ácido tricloroacético en las siguientes condiciones experimentales:

A 40 cm³. del suero proteolizado le agregamos 10 cm³. de ácido tricloroacético al 10 %. Se deja una hora a temperatura ambiente y se filtra. Se determina el N por Kjeldahl del filtrado (por duplicado).

Como se conoce la cantidad de N que contiene el suero proteolizado, la diferencia nos da el precipitado por ácido tricloroacético y que corresponde al N proteico.

La fracción considerada como de proteosas se determinó en la siguiente forma:

El filtrado anterior con ácido tricloroacético, aproximadamente 35 cm³., se coloca en un balón aforado y se hierve a baño-maría por espacio de 3 horas para eliminar el ácido tricloroacético que se descompone en anhídrido carbónico y cloroformo. Luego se enfría y lleva a volumen primitivo. A 30 cm³. de esta dilución se le agregan 20 gramos de SO₄Na₂ anhidro, se eleva la temperatura a 33° C. durante media hora y se filtra en la estufa a la misma temperatura. Cuando han filtrado 25 cm³. se recoge en matraz aforado y se lleva con agua destilada a 50 cm³.

Con esta dilución desaparece el peligro de la cristalización del SO₄Na₂ y se pueden tomar con pipeta las muestras para la determinación del N (2 muestras de 10 cm³. cada una). Hay que tomar en cuenta, en los cálculos el aumento de volumen que se produce al agregar a los 30 cm³., 20 gramos de SO₄Na₂ . 1 cm³. del filtrado de SO₄Na₂ corresponde a 0.467 cm³. del filtrado del ácido tricloroacético.

La diferencia entre el N del filtrado del ácido tricloroacético y este filtrado de SO₄Na₂ nos da el N correspondiente a las proteosas; el N correspondiente a la parte no precipitable ni por ácido tricloroacético, ni SO₄Na₂, lo llamamos nitrógeno residual o resto azoado. En este nitrógeno residual queda comprendido el correspondiente a las peptonas de acuerdo a Wasteneys y Borsook (loc. cit.).

En trabajos publicados por nosotros (2, 3, 4) quedó determinado que después de una proteolisis, o de una proteolisis seguida de una termocoagulación, únicamente más o menos el 20 % del N total corresponde a proteínas íntegras, mientras que la mayor parte del N que primitivamente correspondía a proteínas, ya no coagulaba por el calor, ni precipitaba por ácido tricloroacético.

La mayor parte del N ha sufrido un cambio total en sus propiedades ya que no pertenece más a las proteínas sino a fracciones que resultan de la desintegración péptica de las proteínas.

Hasta ahora habíamos determinado únicamente la cantidad de N no coagulable, sin buscar una separación en esta fracción no coagulable. Ahora nos interesamos especialmente en esto último, estudiando además la influencia del alcohol etílico (5) en la precipitación por SO_4Na_2 y valorando las proteosas y el nitrógeno residual, en esta técnica modificada por nosotros. Además estudiamos comparativamente el fraccionamiento nitrogenado, en las condiciones antes descritas: 1º del suero antidiftérico primitivo, 2º del suero proteolizado, 3º del proteolizado y termocoagulado, variando los tiempos y temperaturas de estas operaciones; además la influencia del ácido fénico, 4º del precipitado por SO_4Na_2 al 22 % del suero proteolizado y termocoagulado, para conocer la cantidad de proteosas y resto azoado arrastrado en estas operaciones, 5º los mismos ensayos anteriores pero con plasma antidiftérico en presencia de alcohol etílico, 6º Con sueros concentrados (eu + seudoglobulinas). Finalmente se estudia la influencia de diferentes concentraciones de SO_4Na_2 en la precipitación de las antitoxinas considerando especialmente la purificación final obtenida.

Comenzamos describiendo el ensayo hecho con sueros antidiftéricos *sin proteolizar*, resumiendo en cuadros los resultados obtenidos en las diferentes experiencias.

Trabajamos con un suero antidiftérico de bajo valor antitóxico y que, diluído al doble con agua destilada, daba un contenido nitrogenado de 6,16 mg. por cm^3 . y un valor antitóxico de 200 unidades por cm^3 .

A 20 cm^3 . de este suero diluído al doble le agregamos 60 cm^3 . de solución fisiológica y 20 cm^3 . de una solución de ácido tricloroacético al 10 % (la concentración final del ácido tricloroacético correspondía a 2 %). Se mezcla bien, se deja reposar una hora y se filtra. Valorado el N (por Kjeldahl) en 20 cm^3 . del filtrado nos da un contenido de 0,84 mgs.; y como 20 cm^3 . de la dilución provienen de 4 cm^3 . de suero diluído al doble, corresponde a 0,21 mgs. de N por cada 1 cm^3 . de suero. Esta cantidad de N corresponde sólo a 3,4 % del N total y es la suma del nitrógeno residual y el de proteosas. 35 cm^3 . del filtrado que contiene el ácido tricloroacético se calientan en un balón especial 3 horas hasta eliminación total del cloroformo formado por la descomposición del ácido tricloroacético. Después de este tiempo, se completa nuevamente a 35 cm^3 . y se agregan a 30 cm^3 . 20 grs. de SO_4Na_2 seco y anhidro. Se calienta a 33° durante 1 hora, se filtra y 25 cm^3 . del filtrado (siempre a 33° C.) se llevan a 50 cm^3 . con agua destilada. Sobre 20 cm^3 . se valora el nitrógeno que corresponde a 0,392 mgrs. y como de acuerdo al cálculo del aumento de volumen (1 cm^3 . = 0,467) por el agregado

del SO_4Na_2 : $20.0467 = 9.34 \text{ cm}^3$, corresponde al suero diluido 1:5, y por lo tanto a $1,868 \text{ cm}^3$. del suero primitivo diluido al doble y contiene $0.21 \text{ mgr. por cm}^3$. de N. Como se encuentra la misma cantidad en el suero antes de precipitar por SO_4Na_2 , deducimos que todo el nitrógeno no precipitable por ácido tricloroacético corresponde a la fracción denominada nitrógeno residual y no contiene proteosas.

Este suero, lo sometemos a una proteolisis péptica durante una hora a 46° C. y a pH 4.0. Con este objeto a 250 cm^3 . de suero se le agregan 250 cm^3 . de agua, 1 gr. de pepsina (1/10.000) y 17 cm^3 . de ácido cítrico al 20 % para llevarlo a pH 4.0. Luego de esta operación, se le agrega 25 gr. de Cl Na (5 %) y se procede al estudio del fraccionamiento del nitrógeno en la forma ya descripta. La parte restante la sometemos a una termocoagulación durante 10 minutos a 60° C. y filtramos. En el filtrado también estudiamos el fraccionamiento nitrogenado. Repetimos estas operaciones en presencia de ácido fénico al 2 ‰. En el cuadro I que figura a continuación damos los valores correspondientes:

CUADRO I

	Suero proteolizado	Proteolizado y termocoagulado	Proteolizado y 2 ‰ ác. fénico	Proteolizado y termocoagulado 2 ‰ ác. fénico
N inicial	6.16 (100 %)	4.34 70.45 %	6.16 (100 %)	3.78 61.3 %
N precipitable (1) (proteínas) ..	3.16 (51.4 %)	0.84 19.35 %	3.43 55.7 %	0.56 14.8 %
N no precipita- ble (2)	2.99 (48.57 %)	3.50 80.64 %	2.73 44.3 %	3.22 85.2 %
Proteosas	1.83 (29.7 %)	2.11 48.7 %	1.72 27.9 %	2.06 54.5 %
N residual	1.16 (18.84 %)	1.38 31.9 %	1.01 16.4 %	1.16 30.7 %
N eliminado por termocoagula- ción	—	29.55 %	—	38.6 %

Con el suero antidiftérico, sólo el 3,5 % del nitrógeno total es el que corresponde al N residual, no contiene proteosas y precipita más del 95 % con ácido tricloroacético, correspondiendo esta cantidad a las proteínas.

Este suero proteolizado por pepsina en las condiciones antes indicadas, da el 48.57 % de nitrógeno no precipitable por ácido triclo-

(1) Corresponde al precipitable por ácido tricloroacético al 2 %.

(2) Corresponde a la suma de proteosas y nitrógeno residual.

roacético como se puede ver en la primera columna del cuadro I. De esta cantidad, el 29.7 % corresponde a las proteosas y el 18.84 % al nitrógeno residual. Aproximadamente la mitad del nitrógeno (51.4 % corresponde a las proteínas íntegras. Vemos pues, que por la acción de la proteólisis péptica la cantidad precipitable disminuye del 95 % al 50 % más o menos.

Este suero sometido a la termocoagulación, en presencia de ClNa al 5 % en las condiciones ya descritas, sufre otro cambio como se puede ver en la segunda columna del cuadro I. Se elimina por termocoagulación el 29.55 % del nitrógeno, quedando solamente el 70.45 % del nitrógeno inicial. Del filtrado (de Pope) sólo el 19.35 % es precipitado por ácido tricloroacético (proteínas). De la cantidad no precipitable (80.64 %), a las proteosas corresponde el 48.7 % y al nitrógeno residual el 31.9 %. El aumento de estas fracciones es debido a que el 29.55 % de proteínas precipita en la termocoagulación pasando íntegramente el nitrógeno no precipitable por ácido tricloroacético en el filtrado de Pope (ver 2ª columna del cuadro I).

Estas dos columnas nos demuestran que la termocoagulación es eficaz, pues si se precipita directamente con SO_4Na_2 al 22 % el proteolizado, a lo sumo se conseguiría una purificación de 2 veces, en el valor antitóxico relacionado a las proteínas, pasando a 4 ó 5 veces después de la termocoagulación. Esta suposición la hacemos, siempre que precipite con sulfato de sodio al 22 %, sólo el nitrógeno precipitable por ácido tricloroacético. (Más adelante se estudia este punto).

En el mismo cuadro I, columna 3ª y 4ª, damos los resultados del fraccionamiento nitrogenado en las mismas condiciones anteriores, pero en presencia del ácido fénico al 2 ‰. En el proteolizado hay una mayor cantidad (55.7 %) del nitrógeno precipitable, disminuyendo correlativamente la fracción no precipitable. También el nitrógeno eliminado por termocoagulación, es más alto llegando a 38,6 %. Sólo precipitan en el filtrado de Pope (con ácido fénico al 2 ‰) el 14,8 % del nitrógeno presente.

A continuación estudiamos la influencia del tiempo de la proteólisis a 46°C. Hacemos proteólisis de 2 horas y de 1 hora, seguidas de una termocoagulación a 60°C. durante 10 minutos. En el cuadro II damos los fraccionamientos nitrogenados de los proteolizados y de los termocoagulados separadamente.

CUADRO II

	Proteolizado 2 h. 46° C)	Proteolizado y termocoagulado	Proteolizado (1 h. 46° C)	Proteolizado y termocoagulado				
N inicial	6.16 mg/cm ³	4.44	72.1 %	6.16 mg/cm ³	3.46	56 %		
N precipitable (proteínas)	2.76	44.39 %	0.66	14.96 %	4.2	69 %	0.70	20 %
N no precipitable	3.39	51.1 %	3.78	85 %	1.91	30.9 %	2.76	79.3 %
Proteosas	2.12	34.45 %	2.28	51.3 %	0.91	14.7 %	1.56	45 %
N residual	1.27	20.65 %	1.50	33.7 %	1.0	16.2 %	1.19	34.6 %
N eliminado por termocoagulación	—		27.84 %		—		43.75 %	

Como era de suponer (comparar columna 1ª y 3ª) cuanto más larga es la proteolisis menor es la cantidad precipitable por ácido tricloroacético (60 % a 45 %) y de acuerdo con los cálculos, aumenta proporcionalmente la cantidad de nitrógeno no precipitable por ácido tricloroacético. La fracción de proteosas es la que más aumenta con 2 horas a 46° C., pues de 14,7 % (a la hora) pasa a 34,45 %. La fracción correspondiente al nitrógeno residual aumenta muy poco (de 16 % a 20 %).

En el filtrado de Pope, la cantidad precipitable de nitrógeno es tanto menor, cuanto mayor es el tiempo de duración de la proteolisis. Poca variación sufren las cantidades de proteosas y nitrógeno residual.

Precipitación del filtrado termocoagulado (Pope) por SO₄Na₂ al 22 %. — 200 cm³ del filtrado termocoagulado (Pope) se lleva a pH 7.6 y se agregan 44 gr. de SO₄Na₂ seco y anhidro. Se disuelven al bañomaría a 40° C, se deja en la estufa durante la noche y luego se filtra. El filtrado contiene 2 mg. de nitrógeno por cm³. El filtrado de la precipitación con SO₄Na₂ al 22 % se precipita con ácido tricloroacético al 4 %, y contiene por cm³ 1.92 mg. de N. Se elimina el ácido tricloroacético en la forma usual y luego con SO₄Na₂ a saturación se precipita a 33° C, se filtra y se valora el N del filtrado (1 cm³. = 0.974 mg. de N).

CUADRO III

	N mg/cm ³	N % del inicial	N % del N del filtrado Pope
N inicial	6.16	—	—
N filtrado de Pope	3.46	56.25 %	—
N pp por SO ₄ Na ₂ 22 %	1.45	23.64 %	42 %
N no pp por SO ₄ Na ₂ 22 %	2.0	32.6 %	58 %

En la segunda columna se especifican los valores del nitrógeno, con respecto al suero proteolizado inicial y como de 6.16 mgs. por cm^3 pasan en el filtrado, sólo 3.46 mg., corresponde a 56,25 % el nitrógeno del filtrado de Pope.

La cantidad precipitada por el SO_4Na_2 al 22 %, es de 23.6 % con respecto al N inicial, pero de 42 % con respecto al nitrógeno que contiene el filtrado de Pope. Estos resultados están de acuerdo con los valores anteriores, pues precipitando todas las antitoxinas con 22 % de SO_4Na_2 , corresponde a una purificación final de 4 a 5 veces.

El nitrógeno no precipitable por SO_4Na_2 al 22 % se reparte en la siguiente forma:

El 96 % del nitrógeno (del filtrado de SO_4Na_2 al 22 %) no precipita por ácido tricloroacético y corresponde de esta cantidad el 50 % más o menos a las proteosas y el resto al nitrógeno residual.

Ensayos con plasma antidiiftérico. — Usamos plasma antidiiftérico diluído 1:1 con agua destilada y que contenía en esta dilución 7.56 mg. de nitrógeno por cm^3 . y 250 unidades antitóxicas. A 500 cm^3 . de plasma, le agregamos 500 cm^3 . de H_2O que contenía 2 gr. de pepsina y 2 cm^3 de ácido fénico, y por el agregado de 41 cm^3 de ácido cítrico al 20 % se llevó a pH 4.

La proteolisis se hizo a 46° C. durante 1 hora, y el fraccionamiento nitrogenado en la forma corriente; los valores encontrados figuran en el cuadro IV. En el mismo cuadro figura el fraccionamiento nitrogenado después de la termocoagulación en presencia de 5 % de ClNa (10 minutos a 60° C).

CUADRO IV

	Proteolizado N mg/ cm^3		Proteolizado y termocoagu- lado N mg/ cm^3	
N inicial (1:1)	7.56		4.16	55.1 %
N precipitable (proteínas)	5.46	72.2 %	1.01	24.4 %
N no precipitable	2.10	27.8 %	3.15	75.6 %
Proteosas	1.05	13.9 %	1.8	43.2 %
N residual	1.05	13.9 %	1.35	32.4 %
N eliminado por termocoagulación.	—	—		44.9 %

Comparando este cuadro con el cuadro II se observa que hay muy poca variación en el fraccionamiento nitrogenado, entre el suero antidiiftérico y el plasma antidiiftérico. La cantidad precipitable por ácido tricloroacético es aproximadamente igual.

Precipitación del filtrado Pope con SO_4Na_2 al 22 %. — 200 cm³. del filtrado de la termocoagulación se llevan a pH 7.6 y se agregan 44 gr. de SO_4Na_2 anhidro. Se disuelven al bañomaría a 40° C. se deja en la estufa a 37° (durante la noche) y luego se filtra.

En el cuadro a continuación, damos los valores obtenidos. En la primera columna figuran los valores de nitrógeno en miligramos por centímetro cúbico. En la segunda columna el porcentaje de nitrógeno, comparado con el del suero inicial proteolizado y en la tercera columna referido al nitrógeno del filtrado de Pope. Cuando decimos en la segunda columna que contiene el 55.1 % del nitrógeno en el filtrado de Pope, se refiere a que de 7.65 mg. sólo encontramos 4.16.

CUADRO V

	N mg por cm ³	N % del inicial	N % referido al filtrado
N inicial	7.56	—	—
N del filtrado de Pope	4.16	55.1 %	—
N precipitable por SO_4Na_2 al 22 %	1.78	23.6 %	42.8 %
N no precipitable por SO_4Na_2 al 22 % ..	2.38	31.5 %	57.1 %

Con SO_4Na_2 al 22 % precipitan el 23.6 % del nitrógeno total del proteolizado y el 42,8 % referido al nitrógeno total del filtrado de Pope. La cantidad precipitada por SO_4Na_2 al 22 % es algo mayor que la que precipita por ácido tricloroacético, lo que nos indica que hay cierto arrastre de sustancias nitrogenadas, que por supuesto no son proteínas íntegras (comparar este cuadro con los anteriores).

Del filtrado de SO_4Na_2 al 22 %, el 8,82 % pertenece a sustancias nitrogenadas precipitadas por ácido tricloroacético. El resto, aproximadamente el 91 % está formado por nitrógeno no precipitable por ácido tricloroacético. De éstos, el 50 % corresponde a la fracción proteosas y el otro 50 % al nitrógeno residual.

Precipitación con SO_4Na_2 en presencia de alcohol etílico. — A 182 cm³. del filtrado Pope obtenido del plasma antidiftérico, se le agregan 18 cm³. de alcohol y 44 gr. de SO_4Na_2 . Los demás detalles de la técnica ya han sido descriptos.

CUADRO VI

	N mg/cm ³	N % del inicial	N Referido al filtrado
N inicial	7.56	—	—
N del filtrado de Pope	4.16	55.1 %	—
N precipitable por SO_4Na_2 al 22 %	1.33	17.7 %	31.11 %
N no precipitable por SO_4Na_2 al 22 % ..	2.83	37.4 %	67.9 %

La cantidad de nitrógeno precipitable por SO_4Na_2 al 22 % es menor en presencia de alcohol, pasando de 23,6 % a 17,7 %. Referido al filtrado pasa de 42,8 % a 32,1 %.

Este ensayo está de acuerdo con nuestras experiencias anteriores, en donde demostramos que la presencia de alcohol al 10 % impide la precipitación de gran parte de las sustancias nitrogenadas que no contienen antitoxinas.

El filtrado de SO_4Na_2 al 22 %, contiene 17 % de N precipitable por ácido tricloroacético. Esta cantidad es mucho más elevada que la obtenida en la precipitación sin alcohol. En el resto no precipitable (83 %), la mitad corresponde a proteosas y la otra mitad al nitrógeno residual.

Si estudiamos la repartición del nitrógeno del precipitado del SO_4Na_2 al 22 %, nos encontramos que está formando parte de proteosas que coagulan en su mayor parte por ácido tricloroacético (más del 70 %) en cambio si operamos sin alcohol, el precipitado de SO_4Na_2 al 22 %, contiene mucha mayor cantidad de sustancias no proteicas (que no precipitan con ácido tricloroacético).

Ensayos con sueros concentrados. — Trabajamos con un suero concentrado (Nº 1365) formado por una mezcla de euglobulinas y seudoglobulinas que contenía 29.75 miligramos de N/cm³. correspondientes a 18,6 % de proteínas y con un valor antitóxico de 1200 unidades por cm³.

Para eliminar todo el sulfato de sodio que contenía lo sometemos a una diálisis en tubos de celofán. Al final de esta operación 300 cm³. de suero se llevaron a 1.300 cm³. con agua. A 1.000 cm³. de esta dilución se le agregaron 2 gr. de pepsina y 20 cm³. de ácido cítrico al 20 % para llevarlo a pH 4.0. Se somete a una proteólisis de una hora a 46° C. Luego en las condiciones anteriores se termocoagula en presencia de ClNa al 5 % y en el cuadro a continuación damos el fraccionamiento proteico de estos dos líquidos.

CUADRO VII

	Proteolizado	Proteolizado y termocoag.
N inicial (suero diluido)	6.09	2.8 45.9 %
N precipitable (proteínas)	5.0 82.2 %	1.05 37.5 %
N no precipitable	1.08 17.8 %	1.75 62.5 %
Proteosas	0.56 9.2 %	0.89 31.7 %
N residual	0.52 8.6 %	0.86 30.8 %
N eliminado por termocoagulación ..	—	54 %

Como era lógico suponer, en los sueros concentrados, hay una mayor cantidad de N precipitable por ácido tricloroacético y lo mismo pasa en el filtrado de Pope. Por lo tanto, partiendo de un suero concentrado nunca podemos purificar los sueros más de 3 veces. En el suero concentrado primitivo no se encuentran ni proteosas ni resto nitrogenado y todo el nitrógeno presente corresponde al precipitable por ácido tricloroacético (100 %).

Si precipitamos el suero concentrado dializado con SO_4Na_2 al 22 % precipita el 97 % del nitrógeno total. En el filtrado obtenido de la precipitación con SO_4Na_2 al 22 %, se obtiene un 3 % de precipitable con ácido tricloroacético.

Precipitación del filtrado de Pope con diferentes cantidades de SO_4Na_2 . — Como el filtrado de Pope, ya contiene 5 % de ClNa , se podía esperar, que para la precipitación completa de las globulinas antitóxicas no fuera necesario el 22 % de SO_4Na_2 . Con este objeto precipitamos el filtrado de Pope con 18 %, 20 %, 22 %, y 24 % de SO_4Na_2 .

En el cuadro siguiente damos los resultados obtenidos.

CUADRO VIII

SO_4Na_2 %	N precipitable por ác. triclor. proteínas %	N residual proteosas %	U A.	Pérdida de unidades %	U A/proteína
18	92	8	160	10	30.000
20	93.5	6.5	180	0	26.500
22	77	23	180	0	23.500
24	78	21.6	180	0	22.500

Este ensayo nos indica, que ya al 20 % de SO_4Na_2 , se consiguen precipitar íntegramente las antitoxinas obteniéndose una relación de purificación mejor que al 22 %. A 18 % la relación de purificación es mayor, pero con una pérdida del 10 %, en las unidades antitóxicas.

Si estudiamos la repartición del nitrógeno en los filtrados, a las distintas concentraciones de sulfato de sodio, nos encontramos con que sólo no precipitan con ácido tricloroacético, los filtrados correspondientes al 24 %.

A continuación damos un cuadro con la repartición del nitrógeno en los filtrados de sulfato de sodio.

CUADRO IX

SO ₄ Na ₂ %	% del N inicial	% del N del filtrado de Pope	N precipitable por ác. tricloro- acético (proteínas)	Proteosas + N residual
18	26.4	57.5	4.3	95.6
20	23	50.5	1.0	99
22	21	46	2.2	98
24	19	41.5	0	100

A 24 % de SO₄Na₂, el filtrado como se puede ver en el cuadro IX, sólo contiene nitrógeno correspondiente a proteosas y ázoe residual. La cantidad de proteínas filtrantes al 20 y 22 % de SO₄Na₂, oscila entre 1 y 2 %.

En resumen, estos ensayos indican que con una concentración de 20 % de SO₄Na₂ se consigue una precipitación que corresponde prácticamente a proteínas y comparando los valores con el cuadro VIII, el 93,5 % precipita por ácido tricloroacético.

CONCLUSIONES

En este trabajo se analizan cuantitativamente las proteínas anti-diftéricas proteolizadas partiendo de diferente material antitóxico (suero, plasma y suero antidiftérico concentrado por sales).

Se valoran las proteínas, proteosas y peptonas más el resto azoado, aplicando la técnica descripta por Wasteneys y Borsook (loc. cit.).

Este fraccionamiento también se estudia en el precipitado obtenido por SO₄Na₂ del suero proteolizado y termocoagulado. Se determina el fraccionamiento nitrogenado del precipitado de SO₄Na₂ en presencia de alcohol etílico, demostrando que impide la precipitación de gran parte de sustancias nitrogenadas que no contienen antitoxinas.

Por último se estudia la cantidad óptima de SO₄Na₂ necesaria para la precipitación de las antitoxinas y que da la mejor relación de purificación.

BIBLIOGRAFIA

1. WASTENEYS y BORSOOK: *J. of Biol. Chem.* T. 62, pág. 1, año 1924.
2. MODERN y RUFF: *Rev. Inst. Bact.* T. 9, pág. 513, año 1940.
3. MODERN y RUFF: *Rev. Inst. Bact.* T. 9, pág. 530, año 1940.
4. MODERN y RUFF: *Bioch. Zeitschrf.* T. 305, pág. 405, año 1940.
5. MODERN y RUFF: *Rev. Soc. Arg. Biol.* T. 15, pág. 333, año 1939.