

Proteasas de Plantas Superiores.

II. Ficina (EC 3.4.22.32)

Laura M.I. LÓPEZ ¹, C.L. NATALUCCI ², N.S. PRIOLO,

M.C. ARRIBÉRE ³ y N.O. CAFFINI ^{2*}

Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE),
Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata. Casilla de Correo 711, 1900 La Plata, Argentina

RESUMEN. Ficina, una cisteinilproteínasa aislada del látex de al menos dos especies y distintas variedades de *Ficus* (*Moraceae*), es una de las proteasas vegetales mejor conocidas. En el presente trabajo se ofrece una breve síntesis de sus principales propiedades bioquímicas.

SUMMARY. "Proteases of Higher Plants. II. Ficin (EC 3.4.22.3)". Ficin, a cysteinilprotease isolated from the latices of at least two species and different varieties of *Ficus* (*Moraceae*), is one of the well known plant proteases. In this paper a brief review of its biochemical properties is presented.

ANTECEDENTES ETNOFARMACOLOGICOS

Ficina constituye un buen ejemplo de productos naturales cuyo estudio fue promovido por el conocimiento previo de su empleo en medicina popular. En este caso la primera referencia etnofarmacológica existente es el uso que hacían algunos nativos de América Central y Sudamérica del látex que obtenían de la higuera (*Ficus spp.*, *Moraceae*) en el tratamiento de ciertas parasitosis intestinales ¹.

Robbins ² tiene el mérito de haber establecido la relación de causalidad entre el efecto antihelmíntico observado y la presencia de actividad proteolítica en el látex de *Ficus laurifolia* **. Este hallazgo le sugirió extender el estudio sobre los posibles efectos proteolíticos (hidrólisis de la gelatina) y antihelmínticos (digestión de *Ascaris* provenientes de intestino de cerdo) a otras quince especies de *Ficus* y a especies de otros géneros de *Moraceae* (*Artocarpus foret*, *Brostimum alicastrum*,

* Autor a quien dirigir la correspondencia

** Los nombres científicos se consignan tal como son citados por los autores

¹ Becaria del CONICET. ² Miembros de la Carrera del Investigador de la CIC. ³ Becaria de la CIC.

PALABRAS CLAVE: Fitoproteasas; Plantas Superiores; Ficina; *Ficus spp.*; *Moraceae*; Propiedades bioquímicas; Revisión

KEY WORDS: Plant Proteases; Higher Plants; Ficin; *Ficus spp.*, *Moraceae*; Biochemical properties; Review

Broussonetta papyrifera y *Morus nigra*), todas ellas cultivadas en el Jardín Botánico que la Universidad de Harvard poseía en Soledad (Cuba), aunque con resultados poco alentadores. No obstante, en el mismo trabajo se consignan altos valores de actividad proteolítica y notorio efecto antihelmíntico para *Ficus carica* y *F. glabrata*, las dos especies que desde entonces constituyen las principales fuentes de ficina ³.

Poco tiempo después, en una comunicación en la que omite citar la especie productora, Walti ⁴ informa haber obtenido la enzima en forma cristalina: el látex diluido, llevado a pH 5 y mantenido a 5 °C durante varias semanas genera cristales que exhiben actividad hidrolítica frente a gelatina y benzoilglicinamida. El autor también comprobó que la enzima cristalina retenía su capacidad antihelmíntica frente a *Ascaris*, aunque actualmente ya no se emplea con esos fines y en su remplazo pueden consignarse otros usos farmacológicos, así como su empleo en distintos procesos industriales ⁵.

MECANISMO DE ACCION Y CENTRO ACTIVO DE LA ENZIMA

Los primeros estudios bioquímicos sobre el mecanismo de acción hidrolítico comienzan con el trabajo de Winnick *et al.* ⁶, quienes establecen de manera concluyente que ficina es una proteasa sulfhidrilo-dependiente. Varios años después Cohen ⁷ inicia la caracterización de la enzima determinando que se trata de una proteína básica (pI = 9,0) y comprobando que la estabilidad de la enzima en relación con el pH depende fuertemente de la presencia de cisteína en el medio de reacción.

Liener ⁸ es el primero en llevar a cabo un cuidadoso análisis de la naturaleza del grupo activo de la enzima, confirmando que se trata de una proteinasa cisteínica con un único grupo -SH activo por molécula, aún cuando advierte que la misma contiene al menos otro grupo tiol y una unión disulfuro no esenciales para la actividad proteolítica.

En un estudio posterior en el que el centro activo es bloqueado con ¹⁴C-iodoacetato (el iodoacetato es un inhibidor específico de proteinasas cisteínicas), Wong y Liener ⁹ proponen la secuencia aminoacídica que debería corresponder a la vecindad del sitio activo, que refleja una notoria similitud con la que propuesta por Light *et al.* ¹⁰ para el centro activo de papaína (Figura 1) y que reforzaría la hipótesis de Lowe y Williams ¹¹ de que ambas proteasas deberían tener el mismo mecanismo de acción, donde el intermediario catalítico sería un compuesto acil-enzima en el que el grupo sulfhidrilo esencial se encontraría acilado.

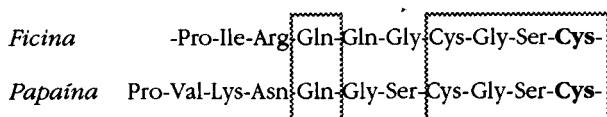


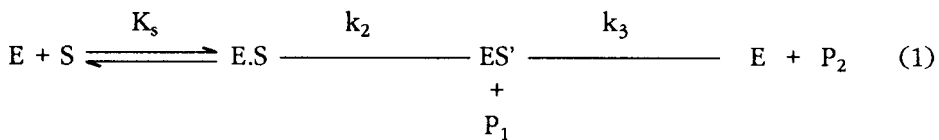
Figura. 1. Comparación de las secuencias aminoacídicas del centro activo de ficina ⁹ y papaína ¹⁰

Los estudios sobre la composición del centro activo recibieron un nuevo y controvertido aporte con el trabajo de Metrione *et al.* ¹², quienes a partir de una ficina cruda (látex desecado comercial) consiguen obtener una única fracción acti-

va, de peso molecular estimado en 23 kDa y con una composición aminoacídica similar a la de papaína, pero en la que la secuencia adjudicada al sitio activo (Tyr-Ser-Gly-Val-Cys) no coincide con la anteriormente propuesta por Wong y Liener ⁹. Sin embargo en un estudio posterior Husain y Lowe ¹³ confirman los resultados obtenidos por estos últimos autores.

Esta aparente antinomia condujo a Friedenson y Liener ¹⁴ a revisar las causas que podrían haber originado tan dispares resultados. Una explicación posible podría estar relacionada con la existencia de múltiples formas moleculares de la enzima, cada una de ellas con una diferente secuencia en el centro catalítico. La otra posibilidad es que Metrione *et al.* ¹² hubieran determinado la secuencia que contiene al grupo tiol inactivo. Ambas alternativas fueron consideradas por Friedenson y Liener ¹⁴ con resultados negativos, quienes atribuyeron los resultados obtenidos por aquellos autores a la posibilidad de que, en las condiciones en que fue realizada la experiencia, el grupo -SH activo hubiera reaccionado con uno de los puentes disulfuro que existen en la molécula formando un nuevo puente disulfuro y liberando un grupo tiol inactivo, cuya secuencia aminoacídica podría ser la que determinaron los autores cuestionados.

Al estudiar el efecto del pH sobre la hidrólisis de sustratos sintéticos tales como BAEE (α -N-benzoil-L-arginina etil éster) y BAA (α -N-benzoil-L-argininamida) en una fracción activa (Ficina D) obtenida de *Ficus carica* var. *Kadota*, Kramer y Whitaker ¹⁵ determinan que la hidrólisis es dependiente de grupos cuyos valores de pK sugieren que en el centro activo de la enzima se hallan involucrados un grupo sulfhidrilo y un grupo carboxilo. En base a esos resultados, Whitaker ¹⁶ confirma posteriormente que en la clásica ecuación que interpreta el mecanismo de acción de las cisteinil-proteasas (1) el paso de la acilación es el que controla la velocidad de la reacción y que la constante que determina la velocidad de ese paso (k_2) depende de la existencia de dos grupos con valores aparentes de pK igual a 4,74 (grupo carboxilo) y 8,44 (grupo sulfhidrilo).



Un importante avance en el conocimiento de la composición del centro activo de la enzima se logra cuando Gleisner y Liener ¹⁷ confirman la participación de un residuo histidina en el mecanismo proteolítico de ficina (obtenida a partir de látex de *Ficus glabrata*). Utilizando 1,3-dibromoacetona consiguen alquilar únicamente el residuo His, previo bloqueo del grupo -SH reactivo con tetrationato de sodio y de un residuo metionina (vulnerable a la acción de la dibromoacetona) con metaperiodato de sodio; al reactivar el grupo sulfhidrilo por agregado de ditiotreitól la actividad proteolítica no se recupera, lo que confirma que el residuo His es esencial para la actividad enzimática. La comparación de los "mapas peptídicos" (obtenidos por cromatografía bidimensional de un digerido de la enzima por la acción de pepsina) de ficina con y sin tratamiento con dibromoacetona revela que como consecuencia de este último desaparece un tetrapéptido (P₃) que

contiene histidina y cuya secuencia coincide con la propuesta por otros autores¹⁸, que es idéntica a la de papaína¹⁹ y casi igual a la de bromelina de tallo¹³ (Figura 2).

<i>Papaína</i> ¹⁹	Asp- His -Ala-Val-Ala-Leu
<i>Bromelina de tallo</i> ¹³	His -Ala-Val-Thr-Ala
<i>Ficina</i> ¹⁸	Asp- His -Ala-Val-Ala-Ala
<i>Tetrapéptido P₃</i> ¹⁷	His -Ala-Val-Ala

Figura 2. Comparación de las secuencias aminoácidas en las que interviene histidina en el centro activo de papaína, bromelina y ficina

Como ya ha sido mencionado, la molécula de ficina contiene dos grupos tiol cisteínicos libres (no involucrados en uniones disulfuro), pero sólo uno de ellos interviene en el proceso hidrolítico, mientras que el otro está profundamente enterrado en la proteína nativa y su reactividad frente a reactivos electrofílicos sólo pudo ser puesta de manifiesto en medios desnaturalizantes tales como dodecilsulfato de sodio 8 o cloruro de guanidina²⁰.

El grupo tiol activo se encuentra efectivamente expuesto y es parte del sitio catalítico de la enzima, pero en los trabajos iniciales en los que se determinó el contenido de grupos tiol^{9,13} las preparaciones no superaban la relación de 0,6-0,7 moles de tiol por mol de proteína, debido a que los métodos de purificación utilizados no lograban separar la ficina activa de una porción de proteína no tiolada. Por aplicación previa de cromatografía covalente "en batch" con un gel de Sepharosa-glutación-2-piridildisulfuro, Malthouse y Brocklehurst²¹ consiguen obtener una ficina parcialmente purificada en la que la relación es de 1 mol de grupos tiol/mol de proteína activa.

Mediante el uso de un reactivo altamente específico para grupos tiol, el 2,2'-dipiridildisulfuro, los autores mencionados confirman que -al igual que lo que ocurre en papaína- el grupo tiol esencial de ficina interactúa con otro grupo ionizante (seguramente el grupo imidazol de histidina) y que, a diferencia de papaína, ficina no parece poseer un grupo carboxilo funcional equivalente al aspártico 158 de papaína.

COMPONENTES PROTEOLITICOS DE LA FICINA

Aplicando una técnica electroforética poco corriente ("*curtain electrophoresis*") Messing y van Ness²² separan al cabo de 28 días seis fracciones proteicas, tres de ellas activas; el pH óptimo frente a azoçoll (8,0 a 9,5) es compatible con los valores obtenidos previamente por Cohen⁷ sobre caseína (pH 6,5-9,5).

Dado que en diferentes trabajos previos la procedencia botánica del material era dudosa o inexistente, Sgarbieri *et al.*²³ plantearon la necesidad de una precisa determinación taxonómica del material del cual había sido obtenido el látex, ya que existen más de 1880 especies de *Ficus* y que solamente de *Ficus carica* se conocen al menos 700 variedades de cultivo. Al ensayar la actividad del látex de 16 variedades de *Ficus carica* por cromatografía de intercambio iónico comprueban que en las distintas variedades se modifican tanto el número de fracciones activas

(de 4 a 10) como la actividad. Asimismo determinan que la actividad específica del látex de *Ficus glabrata* es aproximadamente la mitad de la obtenida a partir de los de *F. carica* y que las fracciones activas no son coincidentes con las de esta última especie.

Un estudio posterior ²⁴ llevado a cabo sobre una de las variedades más promisorias, *Ficus carica* var. *Kadota*, permite cristalizar dos de los componentes más importantes (Ficinas C y D), comprobándose que todas las fracciones activas son muy básicas (pI > 9,6) y que frente a caseína el pH de máxima actividad se sitúa en la zona neutra (pH 6,7-7,5).

El estudio es extendido luego a 46 especies de *Ficus* ²⁵, encontrándose que sólo 13 de ellas poseen actividad proteolítica apreciable. El látex de *F. stenocarpa* resulta ser el de mayor actividad específica, seguido por los de *F. carica* y *F. glabrata*. Todos ellos evidencian estar constituidos por múltiples componentes proteolíticamente activos.

La aparición de un gran número de fracciones durante la purificación de una proteasa conlleva la posibilidad de una autodigestión de la enzima ("autólisis"), tanto más probable cuanto más purificada se halla la misma (ya que se reduce proporcionalmente el número de proteínas no proteásicas que podrían servirle de sustrato). Esta presunción lleva a Englund *et al.* ²⁰ a revisar los criterios de purificación utilizados hasta entonces, decidiendo inactivar reversiblemente a la enzima como paso previo a ser purificada, para lo cual tratan el látex de *Ficus glabrata* con tetratiónato de sodio, que convierte el grupo sulfhidrilo activo en sulfeniltiosulfato (SSSO₃). La proteasa cruda inactivada es luego purificada por precipitación salina, diálisis y cromatografía de intercambio catiónico (CM-Cellex a pH 7,0), con lo que se obtienen sólo cuatro fracciones activas, de las cuales una de ellas resulta ser homogénea y en la que se determina la composición aminoacídica (que no difiere significativamente de los resultados previamente obtenidos por Metrione *et al.* ¹² y Marini-Bettolo *et al.* ²⁶), el aminoácido N-terminal (Leu) y que no se trata de una glicoproteína. El valor de 26 kDa es también cercano a los pesos moleculares consignados por otros autores: 23 kDa (Metrione *et al.*) ¹², 26 kDa (Bernhard y Gutfreund) ²⁷ y 26,5 kDa (Marini-Bettolo *et al.*) ²⁶. Desde el punto de vista mecánico confirman que existe un único sulfhidrilo reactivo y otro inactivo y que hay tres puentes disulfuro. En cuanto a la especificidad de sustrato (cadena B de insulina oxidada), demuestran que ficina exhibe una mayor afinidad hacia uniones peptídicas en las que el residuo más próximo al extremo N-terminal es un aminoácido aromático.

La necesidad de comprobar si la existencia de múltiples formas moleculares en las proteasas purificadas se correspondía con la composición original del látex o si, por el contrario, eran simplemente artefactos generados durante el proceso de purificación, llevó a Kramer y Whitaker ²⁸ a revisar los resultados obtenidos con las variedades *Kadota* y *Black Mission* de *Ficus carica*. Los autores comprobaron que existen variaciones estacionales en cuanto a la cantidad de proteína contenida en el látex y a la actividad específica del mismo, pero que no existen diferencias en el número de formas moleculares que aparecen por cromatografía de intercambio. Para descartar la autólisis como explicación del elevado número de fracciones activas recogieron látex con y sin *p*-cloromercuribenzoato (un inhibidor

de proteasas cisteínicas) y en este último caso incubaron el látex durante 6 horas a 35 °C: salvo un componente de la variedad *Kadota*, que es transformado en otro en el curso de la purificación ²⁹, el resto de las isoformas moleculares se encontraban como tales en el látex crudo.

Hasta hace unos años la comunicación de la existencia de diferentes formas moleculares en el curso de la purificación de una enzima era inevitablemente considerada como consecuencia de la impericia experimental del autor, pero el criterio se modificó sensiblemente luego del aporte de Kaplan ³⁰, quien puntualizó una serie de razones genéticas y no genéticas que podrían explicar la presencia de aquéllas. Dentro de las primeras pueden mencionarse la existencia de enzimas duplicadas producidas por genes separados o de enzimas producidas por alelos del mismo gen; entre las razones no genéticas, además de la posible producción de artefactos debido al método de purificación elegido, debería tenerse en cuenta la presencia de conformeros (isómeros conformacionales) de la misma enzima pero con diferentes propiedades de carga en solución.

Al estudiar la naturaleza de los seis principales componentes proteolíticos del látex de *Ficus glabrata*, Williams y Whitaker ³¹ comprueban que la composición aminoacídica de los mismos es esencialmente similar y que también lo son los mapas peptídicos que resultan luego de la hidrólisis trípica, por lo que los autores proponen que las diferencias cromatográficas observables podrían ser el resultado de una misma cadena polipeptídica plegada de distintas maneras (diferentes conformeros) y en consecuencia con diferentes grupos expuestos en la superficie ³², o bien deberse a diferencias mínimas en la composición o en la secuencia aminoacídica.

Trabajando de manera simultánea sin conocer los resultados anteriores, Jones y Glazer ³³ arriban a conclusiones similares al estudiar el látex de *Ficus glabrata*. Purifican cinco sulfhidrilproteasas (Ficinas B, E, F₁, F₂ y H) de pesos moleculares de 25-26 kDa, que poseen el mismo aminoácido N-terminal (leucina) y muestran similar especificidad e idénticas propiedades cinéticas frente a la cadena B de la insulina oxidada, caseína y sustratos sintéticos. Las diferentes formas moleculares reflejan sus diferencias en cuanto al tiempo de retención por los intercambiadores catiónicos, a su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida y a la variación en el contenido de algunos aminoácidos, esencialmente arginina y tirosina. En base a estos resultados los autores plantean que las sutiles diferencias moleculares observadas podrían ser importantes para la planta, lo que explicaría la sobrevivencia de todas ellas, a pesar de la presión evolutiva que tiende a eliminar a todas, a excepción de la que más eficientemente satisface los requerimientos de la planta. También consideran como explicación plausible la posibilidad de estar observando un fenómeno evolutivo en una etapa en la que un gen se ha duplicado varias veces pero que no ha sufrido aún mayores modificaciones.

Utilizando un procedimiento que implica fraccionamiento salino, cromatografía de intercambio y cromatografía de exclusión molecular, Kort *et al.* ³⁴ separan del látex de *Ficus glabrata* seis fracciones proteolíticamente activas (Ficinas I a VI). Dos de ellas (Ficinas II y III) resultaron homogéneas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y ultracentrifugación y pudieron ser cristalizadas. El peso molecular de la Ficina III (medida de concentra-

ción de grupos tiol) es de 26.000, pero su contenido en histidina (un residuo por mol) es mucho menor que el de la Ficina II (tres residuos por mol). Las Ficinas II, V y VI son probablemente iguales a las Ficinas F₁, F₂ y H de Jones y Glazer ³³, en tanto que la Ficina III es casi seguramente la misma proteína que purificaran Englund *et al.* ²⁰ y corresponde a la Ficina E de Jones y Glazer ³³.

En un estudio posterior Kort *et al.* ³⁵ investigaron la especificidad de ficina (Ficinas II y III) y de bromelina sobre el tipo de unión peptídica en dipéptidos, tripéptidos y polipéptidos, comprobando que ambas enzimas muestran un comportamiento comparable, ya que hidrolizan preferentemente uniones en las que participan los aminoácidos glicina, alanina y leucina y, en menor proporción, aquellas uniones en las que intervienen valina, fenilalanina y tirosina.

EVIDENCIA DE LA COMPOSICION GLICOPROTEICA DE FICINA

Algunas fitoproteasas han resultado ser glicoproteínas. Sin embargo, los primeros estudios de Englund *et al.* ²⁰ parecieron demostrar que ficina no poseía una fracción glucídica, propuesta no compartida por Jones y Glazer ³³, quienes denunciaron la existencia de al menos un 1% de carbohidratos. El trabajo de Friedenson y Liener ³⁶ puso fin a la controversia, al aislar un glicopéptido proveniente de la digestión péptica de ficina integrado por 9 aminoácidos asociados a una fracción polisacarídica compuesta por glucosamina, manosa, galactosa, fucosa y xilosa en relación molar 5:2:1:1:1, respectivamente, cuya composición recuerda a la del glicopéptido aislado de bromelina, que carece de galactosa 37,38 y posee menor contenido de glucosamina.

Sugiura y Sasaki ³⁹ estudiaron la composición de proteasas del látex de una variedad japonesa de higo (*Ficus carica* var. *Horatschi*), encontrando cuatro fracciones de similar composición, a las que llaman Ficinas A, B, C y D (peso molecular 24 a 26 kDa, pH óptimo 7-8, pI 8,3-10,2, similar estabilidad a la temperatura y al pH) y una fracción que contiene un 4,8% de carbohidratos (Ficina S), aunque en el resto de sus propiedades es semejante a las otras.

OTROS ESTUDIOS

Más recientemente Lynn y Clevette-Radford ⁴⁰ determinaron las propiedades de una proteasa presente en el "gomero" (*Ficus elastica* Roxb. et Homem, var. *decora*), a la que denominaron "Ficina E", que sorprendentemente no es una tiol-proteinasa, sino que pertenece al grupo de las proteinasas serínicas. La enzima tiene un peso molecular de 50 kDa, un pH óptimo de 6,0 y -a diferencia de los de ficina, bromelina y papaína- su pI es decididamente ácido (3,7). El mapa peptídico obtenido al hacer actuar Ficina E sobre la cadena B de la insulina es totalmente diferente al que se obtiene con ficina y la composición aminoacídica de esta nueva proteasa es también muy distinta a la de aquélla.

Una novedad en cuanto al material de partida para la obtención de ficina es el cultivo de tejidos vegetales. Cormier *et al.* ⁴¹ han conseguido obtener una preparación con actividad proteolítica equivalente a la ficina comercial a partir del cultivo de fragmentos de tallos provenientes de plantas jóvenes de higuera (*Ficus carica*). Los callos obtenidos luego de 28 días de cultivo son tratados con una solución conteniendo sustancias protectoras (esencialmente polivinilpirrolidona para

evitar la interacción con los fenoles, producidos en gran cantidad en el cultivo), lo que permite la extracción y ulterior purificación de una proteasa con elevada capacidad proteolítica y buena resistencia a la desnaturalización por calor.

ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO DE FICINA

Si bien el Comité de Nomenclatura Enzimática de la Unión Internacional de Bioquímica ha asignado a la ficina un código numérico que la identifica (EC 3.4.22.32), bajo esta denominación se incluye a un grupo de proteasas obtenidas mayoritariamente del látex de *Ficus glabrata* (de hecho, la "ficina" comercial es simplemente el látex desecado obtenido de frutos de esta especie).

Hoy existe acuerdo en que se trata de una tiolproteínasa con un solo residuo cisteína activo por molécula y que en el centro activo participa también una molécula de histidina, no habiéndose comprobado la presencia de un residuo de ácido aspártico. La molécula de ficina, de naturaleza básica y de alrededor de 26 kDa, contiene una parte glucídica y su composición aminoacídica recuerda a la de papaína y de bromelina, al menos en la estructura correspondiente a su centro activo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Caldwell, F.C. y F.L. Caldwell (1929) *Am. J. Trop. Med.* **9**: 471 (citado por Robbins ³)
2. Robbins, B.H. (1930) *J. Biol. Chem.* **87**: 251-7
3. Robbins, B.H. y P.D. Lamson (1934) *J. Biol. Chem.* **106**: 725-8
4. Walti, A. (1938) *J. Amer. Chem. Soc.* **60**: 493
5. Caffini, N.O., L.M.I. López, C.L. Natalucci y N.S. Priolo (1988) *Acta Farm. Bonaerense* **7**: 195-213
6. Winnick, T., W.H. Cone y D.M. Greenberg (1944) *J. Biol. Chem.* **153**: 465-70
7. Cohen, W. (1958) *Nature* **182**: 659-60
8. Liener, I.E. (1961) *Biochem. Biophys. Acta* **53**: 332-42
9. Wong, R.C. y I.E. Liener (1964) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17**: 470-4
10. Light, A., R. Frater, J.R. Kimmel y E.L. Smith (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **52**: 1276-83
11. Lowe, G. y A. Williams (1965) *Biochem. J.* **96**: 189-93
12. Metrione, R.M., R.B. Johnston y R. Seng (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* **122**: 137-43
13. Husain, S.S. y G. Lowe (1970) *Biochem. J.* **117**: 333-340
14. Friedenson, B. y I.K. Liener (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* **149**: 169-74
15. Kramer, D.E. y J.R. Whitaker (1969) *Plant Physiol.* **44**: 609-14
16. Whitaker, J.R. (1969) *Biochemistry* **8**: 1896-901
17. Gleisner, J.M. y I.E. Liener (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **317**: 482-91
18. Husain, S.S. y G. Lowe (1970) *Biochem. J.* **117**: 341-6
19. Husain, S.S. y G. Lowe (1968) *Biochem. J.* **110**: 53-7
20. Englund, P.T., T.P. King, L.C. Craig y A. Walti (1968) *Biochemistry* **7**: 163-75
21. Malthouse, J.P.G. y K. Brocklehurst (1976) *Biochem. J.* **159**: 221-34
22. Messing, R.A. y W.P. van Ness (1961) *Enzymologia* **23**: 373-9
23. Sgarbieri, V.C., S.M. Gupte, D.E. Kramer y J.R. Whitaker (1964) *J. Biol. Chem.* **239**: 2170-7
24. Kramer, D.E. & J.R. Whitaker (1964) *J. Biol. Chem.* **239**: 2178-83

25. Williams, D.C., V.C. Sgarbieri y J.R. Whitaker (1968) *Plant Physiol.* **43**: 1083-8
26. Marini-Bettolo, G.B., P.U. Angeletti, M.L. Salvi, L. Tentori y G. Vivaldi (1963) *Gazz. Chim. Ital.* **93**: 1239-51
27. Bernhard, S.A. y H. Gutfreund (1956) *Biochem. J.* **63**: 61-4
28. Kramer, D.A. y J.R. Whitaker (1969) *Plant Physiol.* **44**: 1560-5
29. Kramer, D.A. y J.R. Whitaker (1969) *Plant Physiol.* **44**: 1566-73
30. Kaplan, N.O. (1968) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **151**: 382-99
31. Williams, D.C. y J.R. Whitaker (1969) *Plant Physiol.* **44**: 1574-83
32. Epstein, C.J. y A.N. Schechter (1968) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **151**: 85-101
33. Jones, I.K. y A.N. Glazer (1970) *J. Biol. Chem.* **245**: 2765-72
34. Kortt, A.A., S. Hamilton, E.C. Webb y B. Zerner (1974) *Biochemistry* **13**: 2023-8
35. Kort, A.A., J.A. Hinds y B. Zerner (1974) *Biochemistry* **13**: 2029-37
36. Friedenson, B. e I.E. Liener (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **342**: 209-12
37. Kito, K. y T. Murachi (1969) *J. Chromatogr.* **44**: 205-7
38. Scocca, J. y Y.C. Lee (1969) *J. Biol. Chem.* **244**: 4852-63
39. Sugiura, M. y M. Sasaki (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **350**: 38-47
40. Lynn, K.R. y N.A. Clevette-Radford (1985) *Phytochemistry* **25**: 1559-61
41. Cormier, F., C. Charest y C. Dufresne (1989) *Biotechnol. Lett.* **11**: 797-802