

ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN EL PROCESO DE GERMINACIÓN. III

CATALASA EN VARIEDADES DE FRIJOL

Por JUAN ROCA y RAÚL ONDARZA,
del Instituto de Biología.

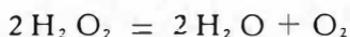
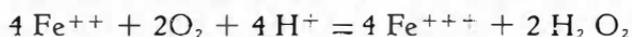
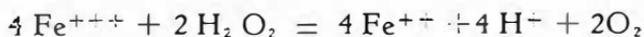
La catalasa se encuentra en casi todas las celdillas vegetales y animales en mayor o menor proporción, pues como quiera que está clasificada entre las oxidasas, esto es, está relacionada químicamente con los fenómenos de la respiración, se comprende que debe existir ampliamente distribuida, de una manera especial en donde ese proceso es más activo.

Desde antiguo se pudo considerar como enzima de laboratorio, ya que actúa sobre un substrato que se consideraba artificioso. Actualmente debe tenerse como verdadera enzima natural, ya que está demostrado que el peróxido de hidrógeno se forma en numerosas reacciones intraorgánicas, y si no aparece como tal es debido precisamente a la existencia de catalasa, que descompone ese veneno celular en el instante de su formación, protegiendo a los tejidos de su acción destructora.

Está demostrado que se trata de un compuesto férrico de porfirina, combinada en algunos casos en forma lábil con el grupo OH, indispensable para su actividad, y en caso de que ese grupo OH sea desplazado por diversos aniones, disminuye su acción. En realidad tiene grandes analogías con la metahemoglobina, pero difiere de ella en su color, en el espectro de algunos de sus derivados y en la estabilidad de su hierro trivalente. Ese grupo prostético está unido a una proteína específica, que es la que la diferencia, al parecer, de la peroxidasa y otras oxidasas.

Se trata en realidad de una de las enzimas más activas. A cero grados puede una molécula descomponer 2.6×10^6 mol. de H_2O_2 ; esa actividad aumenta con la temperatura hasta unos 50° y luego disminuye por destrucción de la misma.

Su acción se explica sencillamente por la reacción: $2H_2O_2 + \text{catalasa} = 2 H_2O + O_2$; actualmente se dan varias explicaciones, y una de las más aceptadas es la propuesta por Kellin y Hartree en la forma siguiente:



Se trata por lo tanto de una enzima que debe existir en los tejidos en que la actividad y la interacción de los agentes bioquímicos es grande, como es el caso de las semillas en el proceso de germinación.

Por lo mismo son numerosos los autores que han tratado de establecer relaciones entre la actividad catalásica y el proceso de germinación, llegando a conclusiones muy interesantes. Desde 1846 observó De Candolle (1) que al tratar de germinar semillas conservadas por 14 años, sólo se logró en la proporción de 4.6% de dichas semillas. Posteriormente se ha repetido varias veces la experiencia con resultados semejantes.

Al conocerse posteriormente las enzimas, se pensó que podría haber cierta relación entre las peroxidases y catalasas y se demostró que, en efecto, aparecía reacción positiva con el guayacán en aquellas semillas que no habían perdido la capacidad de germinar cuando se las ponía en condiciones adecuadas, y no solamente esto, sino que W. Crocker y T. Harrington (2) comprobaron que la actividad catalásica estaba en relación con la edad de las semillas.

Investigando la acción de distintas enzimas, como las amilasas, proteasas y catalasas, en relación con la vitalidad de las semillas, A. Nemeč y F. Duchon (3) dedujeron que las hidrolasas no se destruyen con la pérdida del poder germinativo, lo que sí sucede con la catalasa, y en consecuencia idearon un procedimiento que permitiese relacionar la actividad catalásica con la germinativa, y es el siguiente: se toman 2 gramos de semilla, se pulverizan finamente, se les añaden 20 c.c. de agua destilada en un erlenmeyer que se cierra con un tapón atravesado por dos tubos, uno de ellos cerrado con llave que regula la entrada al interior de agua oxigenada al 3%, previamente neutralizada, y el otro

que es un tubo de desprendimiento con el que se puede medir el O_2 desprendido por la catalasa de la semilla al actuar sobre el H_2O_2 .

Son realmente sorprendentes los resultados obtenidos por dichos autores. pues en semillas de avena del año de 1891, con poder nulo de germinación, sólo recogieron indicios de O_2 y al disminuir progresivamente la edad de las semillas aumentó progresivamente el volumen de oxígeno. hasta llegar a semillas de 1920 en las que el poder de germinación fué de 100% y el volumen de O_2 resultó ser de 75.8. Sin poner en duda estos resultados, señalamos sin embargo el hecho de que en las condiciones establecidas por los autores podrían existir otros agentes, aparte de la catalasa, que provocasen la descomposición del H_2O_2 . De todos modos, aunque otros autores no están de acuerdo en las conclusiones, es muy interesante esa experiencia para explicar la importancia de la catalasa en el proceso de germinación.

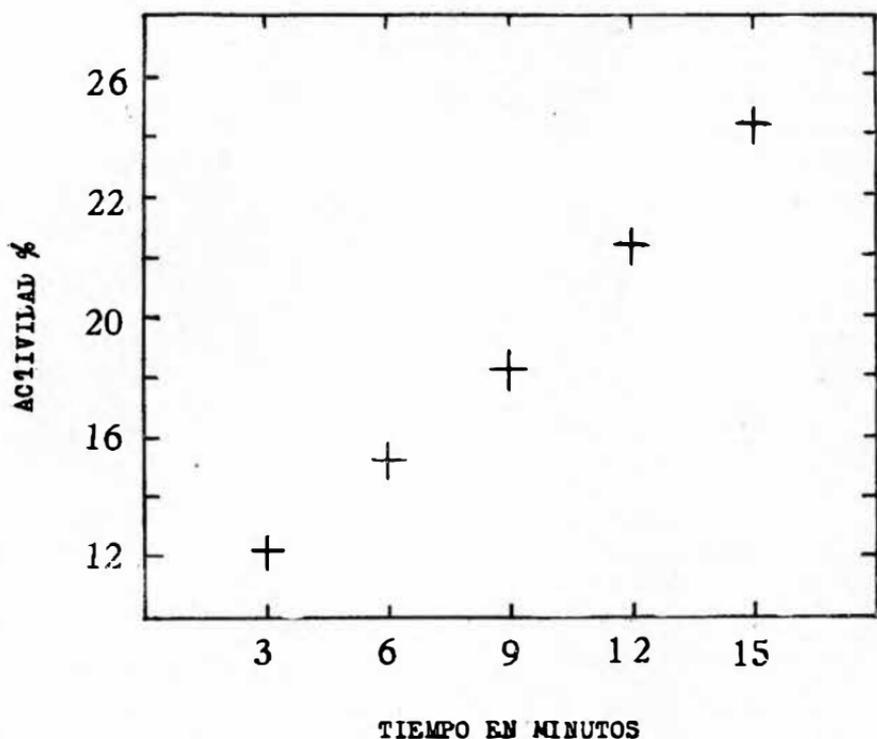
En esta clase de estudios se acostumbra actualmente valorar la concentración de la catalasa o su pureza, y en este caso se sigue el método de Von Euler y Josephson, (4) pero generalmente lo que se hace es valorar su actividad en extractos naturales más o menos purificados. Los métodos usados se reducen fundamentalmente a dos: uno, ideado por Appleman, es manométrico, esto es, se mide el volumen de oxígeno desprendido por la acción de la catalasa sobre el agua oxigenada; el segundo se funda en la titulación del oxígeno desprendido en la reacción, bien sea con permanganato o con tiosulfato. (5) Nosotros hemos usado el método iodométrico de titulación del H_2O_2 después de la acción de la catalasa y restándole el valor hallado en un ensaye en blanco.

El extracto lo preparamos partiendo de 5 gr. del vegetal pulverizado, añadiendo 100 ml. de agua destilada, y lo dejamos por 30' en B. de M. a 30°; se centrifuga y filtra. Se miden 20 ml. de una solución de H_2O_2 0.1 N.; se añaden 1 ml. del extracto anterior y 4 ml. de buffer de fosfatos de pH 6.8; se sumerge en baño de agua a 2° por 15' si no se especifica lo contrario, y después de ese tiempo se añaden 5 ml. de H_2SO_4 al 20% y un gramo de KI; después de 20' se titula con tiosulfato .1 N. utilizando como indicador engrudo de almidón, y del valor obtenido se restan los ml. gastados con un ensaye en blanco, esto es, preparado todo exactamente como en el caso anterior pero sin que se use extracto.

Ante todo procedimos a estudiar la actividad catalásica en función del tiempo. Se partió de un extracto de frijol germinado por 3 días y a una concentración de .01 gr., 20 ml. de substrato .15 M. y 9 ml. de

fosfatos de pH 6.8: la enzima del extracto actuó por 3, 6, 9, 12 y 15' alrededor de 2° C. Los resultados se expresan en la gráfica siguiente:

C A T A L A S A



Puede verse, al observar la gráfica anterior, que se trata de una reacción lineal, y por lo tanto nos demuestra que la concentración de enzima y substrato está dentro de las debidas proporciones y que los resultados serán correctos siempre que se trabaje dentro del tiempo señalado por la gráfica anterior. Hemos escogido el tiempo de 15' para cuantificar la actividad catalásica, ya que en ese tiempo es casi nula la autodestrucción del substrato.

Previamente hicimos experiencias semejantes, a distintas concentraciones, siempre con relación al tiempo de 3, 6, 9, 12 y 15', y así por ejemplo, con una concentración de .05 gr. a los 3' sobrepasaba la actividad a la que marca la gráfica a los 15', y por consiguiente al poco tiempo era casi total la reducción del substrato. En consecuencia se esco-

gió la concentración de .01 y 15' de acción para estimar la actividad catalásica en frijol germinado.

Procedimos después al estudio comparativo de actividad catalásica en distintas variedades de frijol. Se escogieron semillas que nos proporcionó la Oficina de Estudios Especiales de la Secretaría de Agricultura y Ganadería y procedentes del campo experimental de Chapingo. El experimento se hizo en semillas sin germinar, todas ellas en las mismas condiciones, esto es, partiendo de 5 gr. de cada una de esas variedades, con las que se hicieron extractos al 10%. Se valoró la actividad enzimática para poder comparar la potencialidad en catalasa. Debemos advertir que en este caso tuvimos que utilizar extractos de concentración superior al .01, ya que al determinar su actividad en 15' resultó muy pequeña. Después de varias experiencias decidimos partir de .05 y tomamos 10 ml. de H_2O_2 , esto es, la mitad de la concentración que se usó al estudiar el frijol germinado. Es evidente que en la semilla sin germinar ha de haber una actividad catalásica mucho menor que en el frijol germinado, y por lo tanto se necesita partir de un extracto más concentrado y menor cantidad de substrato, para que en 15' aparezca una acción suficientemente intensa para ser valorada con la solución de tiosulfato.

En estas condiciones se obtuvo la máxima actividad catalásica para semillas de frijol negro; a éste le sigue el amarillo, y por último el canario, blanco y mex, como puede verse en la tabla siguiente:

Variedad de frijol	Buffer pH 6.8	H_2O_2 .15M	Extracto enzimático	Agua	% de actividad catalásica
1. Negro. (Rocamex 2).	10 ml.	10 ml.	1 ml.	4 ml.	92
2. Mex. 44-2	10 ml.	10 ml.	1 ml.	4 ml.	27
3. Canario.	10 ml.	10 ml.	1 ml.	4 ml.	26
4. Blanco. (Zac. 1-A-3).	10 ml.	10 ml.	1 ml.	4 ml.	26
5. Amarillo.	10 ml.	10 ml.	1 ml.	4 ml.	42
6. Hgo. 12-A.	10 ml.	10 ml.	1 ml.	4 ml.	42

Se estudió por último la acción de agentes reductores a la concentración de .01 M y por 15', obteniendo los resultados siguientes: el

ferricianuro fué el que inhibió más activamente la acción de la catalasa; le sigue en orden de inhibición el sulfato de cobre, después la cisteína, muy ligeramente el sulfhídrico y vitamina C, y prácticamente no tuvo acción el cianuro. Se repitió la experiencia a la misma concentración pero haciendo actuar el extracto por 30', y en este caso se obtuvo inhibición total con el cianuro y muy marcada con el sulfato de cobre.

DISCUSIÓN

Como la naturaleza química de la peroxidasa y catalasa son muy semejantes, cabe preguntar si al titular la actividad catalásica no actúa también la peroxidasa: en nuestro procedimiento esto no es posible, ya que, si bien puede actuar la peroxidasa sobre el mismo substrato que la catalasa, esto es el H_2O_2 , esto no tiene lugar cuando la acción se verifica alrededor de 0° pues en este caso sólo actúa la catalasa, lo que confirmamos con varios experimentos.

Hemos de mencionar además que al preparar los extractos a 30° , actúa la catalasa sobre los substratos naturales, como se ve por el desprendimiento de O_2 , pero esto no es inconveniente si se toma en cuenta que en todos los casos se preparan los extractos en las mismas condiciones, de tal manera que la cantidad de O_2 desprendido es análoga en todas las circunstancias y, por lo tanto, si bien es cierto que la actividad medida por nosotros en los extractos vegetales no corresponde a la actividad total de la catalasa que contenía primitivamente la semilla o el vegetal, es también cierto que medimos una actividad análoga, de lo que se deduce que el procedimiento que hemos seguido es suficientemente preciso para que los resultados obtenidos sean comparables y correctos.

En cuanto a la naturaleza de la acción de la catalasa, se dice que su papel es destruir el H_2O_2 que obra como un veneno celular. Se forma, como consecuencia de esa acción, oxígeno molecular; ahora bien, es lógico investigar qué papel desempeña ese O_2 liberado por la catalasa. Mucho se ha discutido al respecto sin que pueda darse actualmente una explicación concreta. Sin embargo, hacemos notar el hecho bien conocido de que la catalasa abunda en los tejidos en donde los fenómenos de oxidación son más intensos. Hemos hecho una experiencia que consiste en determinar actividad catalásica en frijoles desarrollados por 21 días, haciendo por separado los respectivos extractos de hojas por un lado y raíces con sus tallos por otro; el resultado fué que

lo. extractos de hojas tuvieron una actividad cuatro veces mayor que los de raíces y tallos. El oxígeno desprendido por la catalasa debe por lo tanto ayudar a los fenómenos de respiración, formando previamente óxidos o peróxidos o bien interviniendo directamente en el metabolismo respiratorio, esto es, suministrando oxígeno en los lugares en que los fenómenos de oxidación son más intensos.

En cuanto a las diferencias encontradas en la actividad catalásica de distintas variedades de frijol, haremos notar que varios autores han encontrado diferencias semejantes al estudiar otras enzimas. Así L. Zoch y W. J. Olson (6) demuestran que la actividad proteolítica es distinta en diversas variedades de malta debido a la cebada que se usó al prepararla. Hills C. H. obtuvo resultados semejantes al estudiar amilasas en distintas variedades de cebada, y nosotros (7) encontramos diferencias análogas en semillas de maíz. Indudablemente los caracteres genéticos, propios de la variedad, han de regular la producción de catalasa en las semillas, sin excluir otras posibles causas, como son la influencia de los factores exteriores que sufrió la planta durante su desarrollo, y también las condiciones de madurez, manipulación y conservación de las semillas de frijol.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—DE CANDOLLE, 1846.—Citado por F. Bustinza Lachiondo. Bol. de la Real Soc. Española, 1925.
- 2.—CROOKER, W. y HARRINGTON, T., 1918.—J. of Agr. Res. 15. Washington.
- 3.—NEMEC A., DUCHON, F., 1921.—C. R. Ac. Sc. de Paris.
- 4.—VON EULER, H. and JOSEPHSON, K., 1927.—Ann. 452, 158.
- 5.—APPLEMAN, C. O., 1916.—Am. J. Bot. 3, 223-224.
- 6.—SUMMER, J. B., 1941.—Adv. in Enzymology. 1-166.
- 7.—ZOCH, L. L. and OLSON, W. J., 1949—Amer Soc. of Bew. Chem. 155.
- 8.—HILLS, C. H., 1938.—Cereal Chem. 15, 351.
- 9.—ROCA, J. y ONDARZA, R., 1949.—An. del Inst. de Biol. Méx. XX-17-26.