

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

PROTEASAS EN VARIEDADES DE MAÍZ

Por JUAN ROCA y RAUL ONDARZA V.,
del Instituto de Biología.

Al empezar en 1948 el estudio de la actividad enzimática en el proceso de germinación, señalamos el hecho de que a medida que se efectúa ese proceso en los cereales aumenta dicha actividad hasta llegar a un máximo y luego disminuye más o menos rápidamente. A partir de esa fecha hemos estudiado sistemáticamente la actividad sacarogénica del maíz y del frijol, las amilasas alfa y beta en híbridos y variedades de maíz mexicano, alfa y beta amilasas y catalasas en trigo germinado experimentalmente, y por último estudiamos catalasa en variedades de frijol, para continuar en este trabajo con la actividad proteolítica en variedades de maíz.

En estudios anteriores hemos visto la importancia que tienen las enzimas proteolíticas; sólo señalaremos que hemos modificado tanto el procedimiento de preparación de extractos como el método de valoración de la actividad enzimática. El extracto de todo el grano, ya sea seco o germinado, contiene una cantidad muy grande de carbohidratos desprovistos de propiedades enzimáticas, lo que dificulta las experiencias, pues como la actividad es proporcionalmente menor precisamente por ese resto inerte, exige, como es natural, un tiempo de acción muy largo, esto es, de 24 horas, razón por la que se nos ocurrió separar los gérmenes de maíz desarrollados por varios días y estudiar la actividad enzimática únicamente en el extracto obtenido con esos gérmenes, separados del resto inerte de polisacáridos, lo que por otra parte es lógico porque según hemos demostrado anteriormente la actividad enzimática está concentrada precisamente en el embrión.

Al estudiar las proteasas del frijol intentamos hacer ese estudio previa desecación de los extractos correspondientes, y señalamos que no dió resultado, pues una vez desecados perdieron toda su actividad, lo que probable-

mente se debió a que no disponíamos de los medios adecuados. Al estudiar las proteasas del maíz insistimos en la idea primitiva, para lo cual separamos los embriones a baja temperatura y conservamos al vacío, encontrando que en esas condiciones perdura la actividad por más de un mes, de tal manera que en este trabajo hemos utilizado en todos los casos únicamente gérmenes de maíz aislados y desecados.

También hemos cambiado el método de valoración de la actividad proteolítica. En el frijol utilizamos el de Waldshmidt-Leitz, fundado en la titulación de los grupos carboxílicos en la gelatina, esto es, en una proteína extraña: actualmente se tiende a reemplazar esos métodos por procedimientos autolíticos, lo que quiere decir que las proteasas obrarán sobre prótidos propios de las semillas como substratos. En este caso se siguen dos caminos, uno en el que se usan exclusivamente los prótidos propios, ideado por Ayre y Anderson; pero se ha visto que algunas veces hay el inconveniente de que esos prótidos de las semillas están en proporción igual o menor que la actividad enzimática, por lo que hay peligro de que falte substrato, y debido a esto propuso Miller una modificación que consiste en agregar a los prótidos propios cierta cantidad de prótido extraño en proporción constante: este es el método que hemos seguido en este trabajo. Zoch y Olson lo confirmaron al estudiar la actividad proteolítica en la malta utilizando autolizados con y sin hemoglobina. En los resultados que se consignan en el curso de este trabajo, puede verse que en muchos casos la actividad enzimática agotaría los prótidos propios del maíz en caso de que no se añadiese hemoglobina, por lo que el procedimiento escogido nos ha parecido bueno en vista de los resultados obtenidos.

Materiales y métodos

Las muestras de maíz estudiado germinaron siempre a temperatura entre 25 y 30° y en las mismas condiciones de humedad y luz. Primero se utilizaron muestras germinadas por 4 días; se procedió a separar los gérmenes bien desarrollados, y con ellos, previa trituración, se hizo un extracto acuoso para determinar actividad proteolítica según el método que se describirá después; los resultados obtenidos en tres valoraciones no fueron uniformes a pesar de haber seguido con cuidado la misma técnica, por lo que se procedió a desmenuzar y desecar rápidamente a 40° y en el vacío los gérmenes de 4 días, luego se pulverizaron finamente y, tomando una parte para determinar actividad proteolítica, se conservó el resto al vacío para repetir la misma técnica 15 días después: como los resultados obtenidos

fueron análogos en ambos casos, esto es, luego de la desecación y después de conservarlos, se procedió a obtener gérmenes de tres muestras de maíz germinados en las mismas condiciones por 4, 5, 6 y 7 días, se separaron los gérmenes, se desecaron, pulverizaron y conservaron al vacío.

La actividad proteolítica se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Lawrence L. Zoch y W. J. Olson; se prepararon las soluciones siguientes:

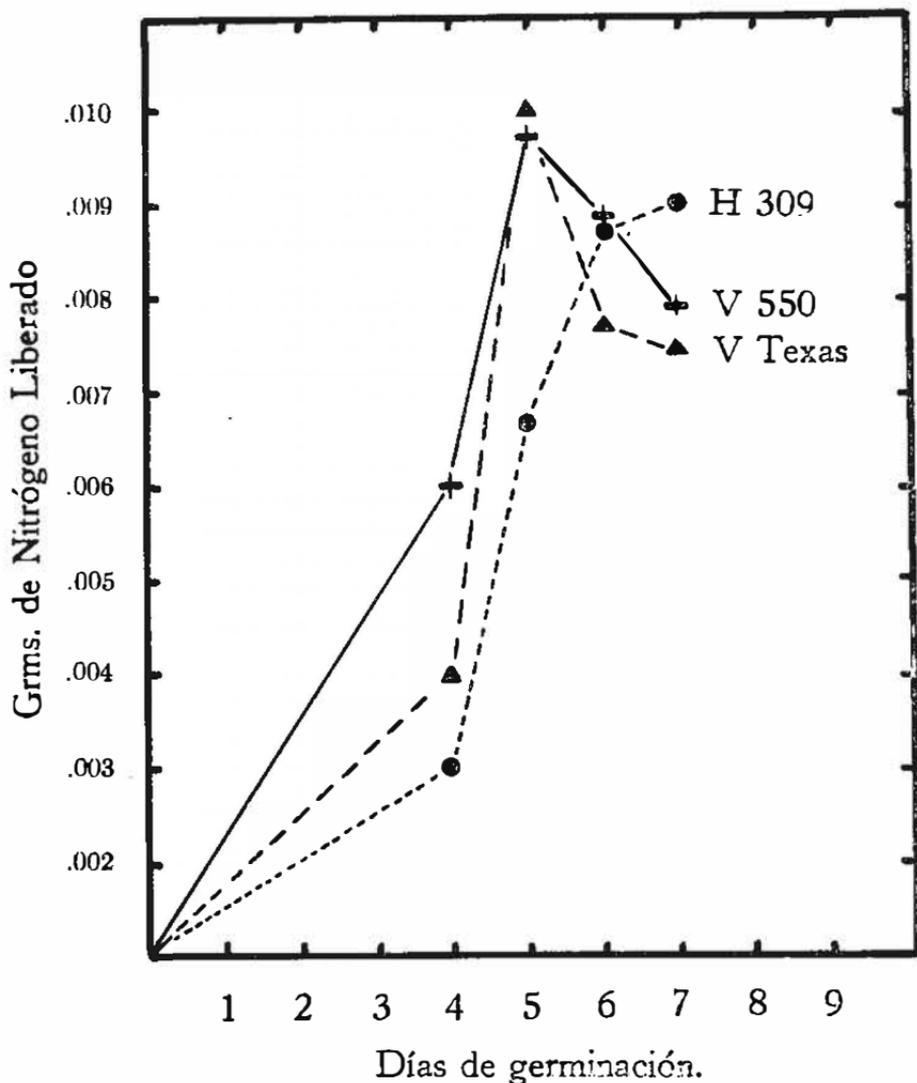
1. Buffer de acetatos-ácido acético, preparado con una solución que contiene 24.612 grs. de acetato de sodio y 16 ml. de ácido acético glacial en 900 ml. de agua, añadiendo más acético hasta pH 4.5 y luego agua a 1000 ml.
2. Acido tricloracético al 37.5%, disolviendo 37.5 grs. en 62.5 ml. de agua.
3. Bactohemoglobina Difco en polvo.

Para la valoración de la actividad proteolítica se pesan 0.5 grs. del polvo desecado de germen de maíz, se mezclan con 0.25 grs. de bactohemoglobina en matraz Erlenmeyer, y se añaden poco a poco y agitando 25 ml. de solución buffer de acetatos hasta obtener un líquido homogeneizado. En matraz análogo se pesa, mezcla y diluye exactamente lo mismo que antes: los dos matraces se ponen en B. de M. a 40°, a los 20 minutos se saca del B. M. uno de los matraces, que se tomará como testigo, y se le añaden, agitando, 5 ml. de la solución concentrada de tricloracético; el otro matraz continúa en B. M. por otros 60 minutos, y después de ese tiempo se le añaden 5 ml. de la solución de tricloracético; se agita y centrifuga el contenido de los dos matraces a 1800 r. p. m. por 5', y se filtran por papel Whatman no. 30. Del filtrado de cada matraz se toman 5 ml., y en cada uno se valora el N. por el método conocido de Kjeldhal. Del N liberado por el extracto después de actuar 80', se resta el obtenido en el testigo de 20', y esa diferencia en mgs. de N por 1 hora y 1 gramo de polvo de germen es lo que señalamos como actividad proteolítica, esto es, el nitrógeno soluble espontáneamente en 20' se resta del que liberan las proteasas después de actuar 60' en las mismas condiciones, y la **unidad de actividad corresponde a mgs. de N liberado en 1 hora y por gr. de germen.**

Las muestras estudiadas han sido el H 309, con altura de aclimatación de 1000 a 1900 mtrs., la V Texas, y la V 550 con altura de aclimatación de 0 a 1300 m. s. n., del mar; los gérmenes de 4, 5, 6 y 7 días tuvieron desarrollo exuberante.

GRAFICA N° 1

Actividad Proteolítica



La actividad proteolítica de todos esos gérmenes se expresa claramente en la gráfica n° 1.

De la gráfica anterior se deduce claramente que la actividad proteolítica es prácticamente nula al empezar la germinación; aumenta, pero no

igualmente en las tres muestras, ya que la máxima actividad, medida por el nitrógeno liberado, corresponde al 5º día para las muestras Texas y 550, mientras que para el maíz 309 aparece la máxima actividad en el 7º día.

Con objeto de profundizar en el conocimiento de esa actividad proteolítica se procedió a comparar el nitrógeno total, o sea las proteínas del maíz, con el nitrógeno soluble de las mismas muestras: el primero se obtuvo por un Kjeldhal directo del grano semilla de maíz, y el llamado soluble se valoró tomando el polvo del maíz respectivo, y después de añadir hemoglobina y buffer de acetatos, se dejó 60' en B. M. a 40°, añadiendo después tricloracético y valorando en 5 ml. del filtrado el nitrógeno, calculando después el de 1 gr. y restándole previamente el N propio de la hemoglobina soluble en las mismas condiciones; los resultados vienen expresados a continuación.

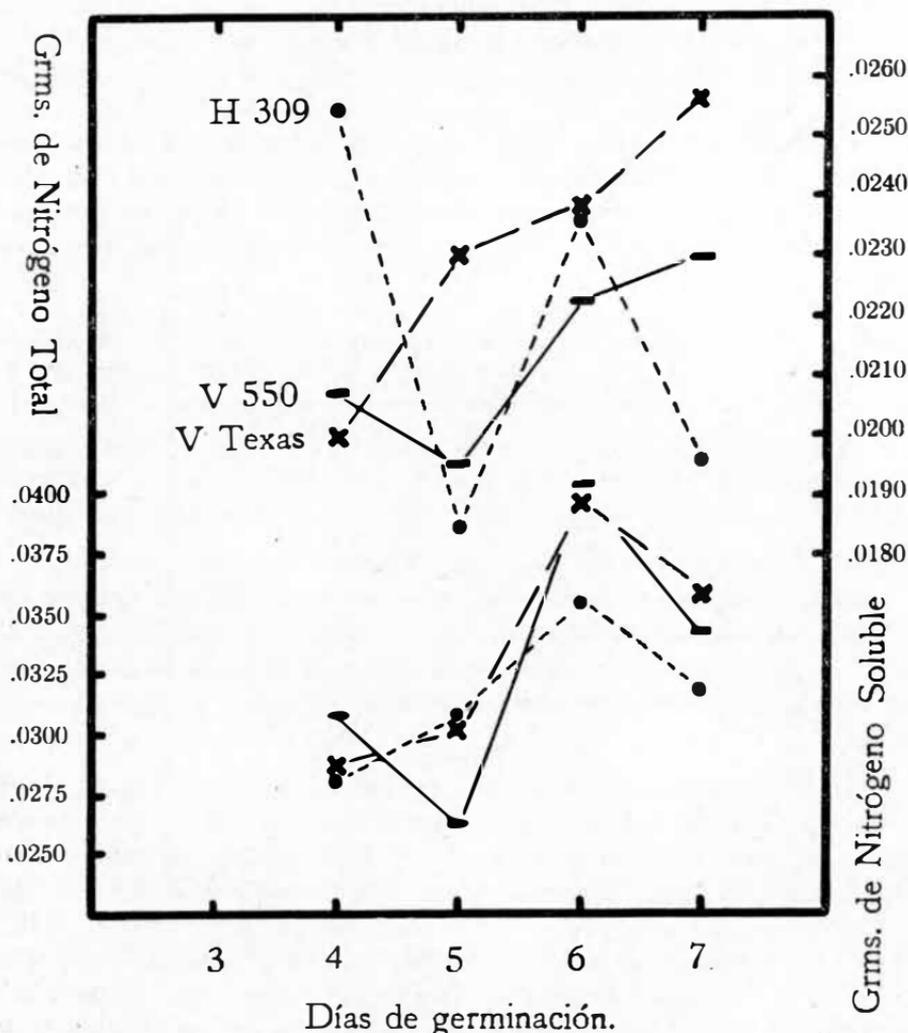
N total por 1 gr.	Muestras	N soluble por 1 gr. 1 h.
0.01526 grs.	Maíz H 309, sin germinar	0.002904 grs.
0.01568 grs.	Maíz V Tex. sin germinar	0.001056 grs.
0.01638 grs.	Maíz V 550, sin germinar	0.001512 grs.

Estudio comparativo análogo se hizo con el N total del embrión de maíz desecado correspondiente a 4, 5, 6 y 7 días de germinación, y el N soluble de las mismas muestras obtenido conforme se acaba de explicar en el párrafo anterior: los resultados, para mayor claridad, se expresan en la gráfica nº 2.

En lo que se refiere al N total, puede verse claramente en dicha gráfica que aumenta su proporción a medida que germina la semilla hasta el sexto día, para descender al día siguiente. Esto puede interpretarse como si se verificase la síntesis proteínica en el embrión a partir de los compuestos solubles, hidrolizados por las proteasas y transportados desde el endospermo o sea de los prótidos de reserva simplificados por las enzimas liberadas en el embrión: de lo que se deduce que comparando la actividad proteolítica de las tres muestras de maíz, en lo que se refiere a su poder de síntesis, encontramos un claro paralelismo entre mayor actividad proteolítica y mayor síntesis de proteínas, o sea que la variedad 550, que posee mayor actividad proteolítica, es la que al sexto día tiene también mayor cantidad de N total y por lo tanto mayor cantidad de prótidos.

GRAFICA N° 2

Metabolismo Proteínico



Esto se confirma con la parte de la gráfica que se refiere al llamado N soluble, o sea al que no se precipita por el ác. tricloracético al 37.5%, y que corresponde fundamentalmente al N. de aminoácidos liberados por la acción de las proteasas.

Discusión

Hartig, en 1858, fué el primero en sugerir que durante la germinación se fraccionan las proteínas de reserva de las semillas originando sustancias solubles, aprovechables por el embrión, a las que denominó "Gleiss"; esto fué aceptado por Pfeffer relacionando la gleiss con asparagina. Von Gorup Besanez descubrió en 1874 las enzimas proteolíticas en la semilla, y se aceptó como hecho cierto que la hidrólisis de los prótidos en el proceso de germinación era debida precisamente a las enzimas proteolíticas.

Posteriormente fué confirmado lo anterior, entre otros autores por Prianischnikow, que al estudiar la regeneración de prótidos en el germen asegura que los prótidos deben proceder de las reservas propias de las semillas, ya que en las condiciones experimentales de germinación de esas semillas en el laboratorio, se excluye la posibilidad de asimilación de otras fuentes extrínsecas de nitrógeno, de lo que deduce que la síntesis de los prótidos propios del germen, esto es, elaborados por el vegetal, ha de partir de los productos proteínicos hidrolizados en los primeros 10 o 15 días, los que una vez liberados podrán condensarse en forma de nuevos polipéptidos, no excluyendo la posibilidad de la transformación o síntesis de nuevos aminoácidos necesarios para formar los prótidos propios.

Es conocido desde hace tiempo que el vegetal, desde los primeros días de su vida, dispone de dos sustancias, asparagina y glutamina, formadas por aminación de los carboxilos de los ácidos aspártico y glutámico; esas sustancias son capaces de proporcionar grupos amínicos por transaminación, y por lo tanto pueden formar nuevos aminoácidos necesarios para formar los prótidos propios. Las enzimas proteolíticas, que apenas si demuestran actividad en la semilla natural, empiezan a movilizarse al empezar la germinación, aumenta su actividad hasta los 5 o 7 días según se vió antes en este trabajo, y como consecuencia de esa actividad aumenta el N soluble que corresponde a los aminoácidos, siendo éstos, así transformados, la base para la síntesis proteínica.

Como consecuencia de lo anterior se comprende que gran número de aminoácidos fueron hallados por primera vez en los retoños o gérmenes de vegetales: la síntesis de los aminoácidos puede explicarse fácilmente cuando el vegetal puede absorber por sus raíces el nitrógeno necesario para la formación de los grupos amínicos, pero antes de esa absorción o bien cuando se cultivan en medio carente de nitratos, la aparición de aminoácidos sería inexplicable si no dispusiese de prótidos de reserva que contienen

dichos elementos o por lo menos de grupos aminicos que puedan liberarlos y fijarlos a ácidos orgánicos elaborados previamente. Gollewski germinó semillas de *Lupinus* en agua hasta que las raicillas tuvieron 1 cm. de largo para trasplantarlas luego, una parte a soluciones nutritivas carentes de nitrógeno y el resto a soluciones semejantes pero agregándoles glucosa, y así las tuvo para su desarrollo en la obscuridad por 14 días; el resultado fué que las plantas que dispusieron de glucosa, esto es, que pudieron obtener fácilmente de las soluciones nutritivas los materiales de carbono que necesitan para su desarrollo, utilizaron en menor proporción las reservas de los carbohidratos de los cotiledones y la hidrólisis proteínica fué mucho menor que la de las plantas que se desarrollaron en solución nutritiva sin glucosa. La explicación está en que la transformación o simplificación de los prótidos de semillas de *Lupinus* es muy grande en los primeros días de su germinación, debido a que la reserva de carbohidratos es muy baja y por lo tanto muy pequeña la proporción de monosas liberadas por las amilasas de ésta, tanto que apenas satisfacen las necesidades del vegetal en formación, y como son aprovechadas rápidamente no dispone de materia suficiente para elaborar ácidos orgánicos necesarios para la síntesis de los aminoácidos. Es lógico por lo tanto deducir que en los cereales, como el maíz, en donde la reserva de carbohidratos es grande así como la actividad amilásica, le queda a la planta, después de satisfacer sus propias necesidades, suficiente cantidad de materiales para elaborar ácidos y por lo tanto la actividad proteolítica será menor en ese tipo de semillas.

Hemos visto además que a mayor cantidad de nitrógeno total del maíz corresponde mayor actividad proteolítica: así la muestra 550 que tiene 0.01638 grs. de N por gr. es la que tiene también la máxima actividad a los 5 días, de 0.01008 por gr. en 1 hora, y el que tiene menor cantidad de N proteínico, o sea el 309 con 0.01526 gr. de N, tiene también menor actividad proteolítica, de 0.008904 gr. de N en 1 hora, y esa actividad la desarrolla en más tiempo, esto es, hasta los 7 días. Tal parece, pues, que la actividad proteolítica es mayor cuando las amilasas del maíz tienen todavía acción reducida y por lo tanto dispone de muy pequeña cantidad de monosas, mientras que al aumentar éstas, la actividad proteolítica del maíz disminuye.

Es que la simplificación de las reservas proteínicas y por lo tanto la actividad proteolítica está como controlada por la corriente que va de los cotiledones o endospermo al embrión, transportando monosas y aminoácidos, dependiendo el predominio respectivo, en último término, de cuál

de dichos componentes esté en mayor o menor proporción. Por otra parte, los productos primarios de la hidrólisis de las reservas proteínicas del maíz son transportados a las partes crecientes, en donde como tales o previa transformación son aprovechados para la formación de nuevos prótidos, necesarios para el desarrollo de la planta.

El porciento de prótidos es mayor en la muestra de maíz 550, le sigue la V Texas y ocupa el último lugar la muestra H 309, y, según se vió antes, la actividad proteolítica es mayor en la muestra 550, y el 2º y 3er. lugar lo ocupan la V Texas y la 309 respectivamente, a lo que corresponde en los diferentes embriones una síntesis más intensa de prótidos en el mismo orden, esto es, mayor en los de la 550, siguen los de la muestra Texas, y por último los de la 309, con la particularidad de que la altura de aclimatación está en relación con la actividad proteolítica. Por último, observamos que la muestra 309 de gérmenes de maíz a los 4 días de germinación tiene mayor cantidad de N soluble: este hecho, que parece anómalo, lo atribuimos nosotros a la acumulación de dicho nitrógeno por una deficiencia pasajera en la actividad sintética, o sea que la temperatura experimental de germinación no era la más adecuada en relación con la temperatura de aclimatación.

La actividad proteolítica en el proceso de germinación del maíz, objeto de este trabajo, nos permite confirmar los puntos de vista expuestos por Chibnall y otros investigadores, o sea que las proteasas del maíz en dicho proceso de germinación hidrolizan los prótidos propios, aparecen por lo tanto aminoácidos, el vegetal los oxida, y como consecuencia aparece amoníaco y a la vez asparagina y glutamina, independientemente de los carbohidratos no hidrolizados todavía por acción de las amilasas; a medida que éstas aumentan su actividad, la hidrólisis proteínica disminuye y aumenta la acción sintética, estableciéndose desde este momento una interdependencia entre ambas acciones, regulada por el crecimiento y necesidades fisiológicas del vegetal. Esto se verifica rápidamente en el maíz debido a que la cantidad de prótidos es muy pequeña comparativamente con la enorme cantidad de que dispone de glúcidos, de tal modo que el N soluble, o sea el de aminoácidos, es aprovechado inmediatamente para la síntesis de los prótidos propios, como lo ha demostrado Bishop en la cebada y se ha confirmado indirectamente en este trabajo al encontrar en el embrión de maíz de 6 días la máxima acumulación de N proteínico.

Conclusiones

1ª La máxima actividad proteolítica en el proceso de germinación de las muestras de maíz estudiadas es a los 5 y 7 días.

2ª La actividad proteolítica en las muestras estudiadas está en relación con la cantidad de N total de las mismas.

3ª La actividad proteolítica de las muestras de maíz estudiadas está en relación con la altura de aclimatación.

B I B L I O G R A F I A

- BALLS, A. K. and HALE, W. S., 1938.—The preparation and properties of wheat proteinase. *Cereal Chem.* XV:622.
- CHIBNALL, A. CH., 1939.—Protein metabolism in the plant.
- LABARRE, J. et PFEFFER, S., 1946.—Etudes sur les enzymes de la féve gourgane (*Vicia faba* L.) pendant la germination. *Revue Canadienne de Biologie.* V, N° 2:233.
- LUERS, H., 1936.—Changes in enzymes during malting. *Cereal Chem.* 13:153-171.
- MILLER, B. S., 1947.—*J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 30, 659.
- ONDARZA, R.—Alfa, beta amilasa y catalasa en trigo germinado experimentalmente. Tesis Fac. de Ciencias U. N. A. M., 1951.
- ROCA, J. y ONDARZA, R., 1948.—Estudios sobre la actividad enzimática en el proceso de germinación. I. Actividad sacarogénica y proteolítica del frijol. *An. Inst. Biol.* XIX, N° 2, 283-298.
- , 1949.—Amilasas alfa y beta en híbridos y variedades de maíz mexicano. *An. Inst. Biol.* XX, Nos. 1 y 2:17-26.
- , 1951.—Catalasa en variedades de frijol. *An. Inst. Biol.* XXII, N° 1:3-9.
- , 1950.—Papel de las enzimas en el proceso de germinación. *Rev. de la Soc. Mex. Hist. Nat.* XI, Nos. 1-4:43-58.
- ZOCK, L. L. and OLSON, W. S., 1949.—The influence of barley variety and location grown on the proteolytic activity of malt. *Amer. Sec. of Brew. Chem. Proc. Ann. meeting.* 1-5.