

FORMACION DE PROTIDOS EN EL PROCESO DE GERMINACION DEL MAIZ. I

Por JUAN ROCA,
del Instituto de Biología.

Después de haber estudiado la acción enzimática de amilasas alfa y beta en el proceso de germinación del maíz, así como la de proteasas y catalasas, consideramos de sumo interés ver el papel que desempeñan los prótidos en ese proceso, esto es, las transformaciones que sufren a medida que se desarrolla el germen.

La nueva planta se forma al principio a expensas de los carbohidratos, lípidos y prótidos que contiene la semilla: parte de estos principios se metaboliza, desprendiendo la energía química necesaria para las funciones fisiológicas del nuevo ser, y otra parte ha de servir para la formación de nuevos compuestos específicos, esto es, propios de cada nuevo tejido.

Desde el siglo pasado se ha discutido, más o menos empíricamente, el origen y acumulación de cantidades relativamente grandes de glutamina y asparagina como producto del metabolismo de prótidos en semillas, análogo a la producción de urea en animales, con la diferencia de que en las plantas dichas sustancias pueden ser aprovechadas para la síntesis de nuevas proteínas, y de ahí que se les atribuyó papel preponderante en la formación de los prótidos de los vegetales.

En las semillas, la acumulación de glutamina precede generalmente a la de asparagina en la mayoría de los casos, y hasta la fecha no se ha demostrado que ambas aminas sean en realidad una forma de detoxicación del amoníaco producido en el metabolismo proteínico, porque es muy frecuente la acumulación de amoníaco en las plantas sin que experimenten fenómenos tóxicos.

En realidad no disponemos actualmente de una visión de conjunto, sino tan sólo de hechos aislados que no permiten la generali-

zación de los fenómenos observados. Hay que tener en cuenta que la semilla está formada por tejidos característicos de cada especie vegetal y, por lo tanto, contiene prótidos propios y no aminoácidos aislados, y claro está que al formarse dichos prótidos podrá predominar uno u otro aminoácido, según los casos, y todos ellos serán utilizados, previa hidrólisis, en la formación de nuevos tejidos que van apareciendo en el proceso de germinación. Tomar únicamente uno o dos aminoácidos como base para esa reestructuración es inadecuado e ilógico, y podría conducirnos a malinterpretar nuestras observaciones. Indudablemente ha de ser distinto en la planta adulta, cuando el vegetal está en aptitud de tomar de la tierra y del aire los elementos esenciales para su síntesis, no así cuando dependen únicamente de las reservas propias de la semilla.

Por otra parte, al plantear el problema de la formación de prótidos en el proceso de germinación, no debe pensarse únicamente en el nitrógeno como base: es necesario buscar también el origen y transformaciones del carbono, en el que se apoya el nitrógeno, con el objeto de establecer íntima relación entre ambos elementos esenciales para la formación adecuada de aminoácidos y por lo tanto de prótidos.

En efecto, está demostrado actualmente que la llamada dehidrasa ácido glutámico, aislada en semillas, sintetiza ese aminoácido por fijación del amoníaco sobre el ácido alfa cetoglutarico, activada por una coenzima, la codehidrasa 1, y que el hidrógeno es proporcionado por deshidrogenación de la triosa fosfato o sustancias análogas. Es evidente que en las semillas el nitrógeno ha de proceder del metabolismo de prótidos, previa hidrólisis y liberación por lo tanto de aminoácidos por acción de proteasas, acción que es muy intensa en los primeros días de germinación, como ha demostrado el autor en otro trabajo, y al oxidarse aparecerán aminas naturales que, al translocarse, formarán nuevos aminoácidos, y el resto, oxalacético o cetoglutarico, pueden entrar a formar parte del ciclo del ácido cítrico, proporcionando energía, o bien permitirán la formación de los ácidos aspártico o glutámico que a su vez podrán formar otros aminoácidos.

La composición de la semilla de maíz ha sido estudiada detenidamente en lo que se refiere a los aminoácidos de la zeína, y aunque no están de acuerdo los distintos autores, se le atribuye generalmente la siguiente: alamina 9.8, valina 1.9, leucina 25.0, fenilalanina 7.6, tirosina 5.9, ácido glutámico 31.3, ácido beta-hidroxiglutarico 2.5, ácido aspártico 1.8, prolina 9.0, serina 1.0, hidroxivalina 1.5, cistina 0.8, metionina 2.3, arginina 1.8, histidina 0.8, amoníaco 3.6.

Aunque los datos anteriores son importantes, nos hemos propuesto ampliarlos, tomando como punto de partida el maíz entero y utilizando para ello métodos adecuados para aplicarlos posteriormente al germen, en los sucesivos días de germinación, buscando a la vez relaciones enzimáticas que nos permitan penetrar en el proceso de transformación de prótidos.

MATERIALES Y METODOS

Como básico para nuestro estudio hemos empezado por el problema de la distribución del nitrógeno en la semilla total y en el germen, durante 12 días de germinación.

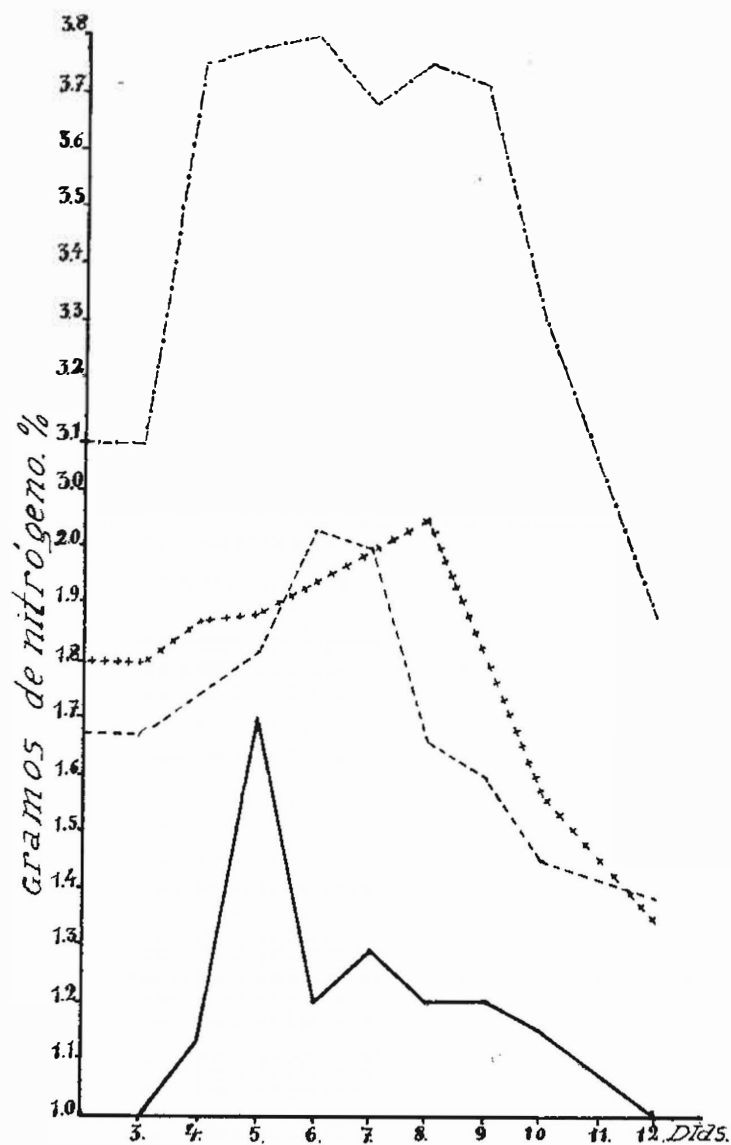
En todas estas experiencias se ha utilizado maíz híbrido Ramillan (celita) desarrollado en estufa a temperatura y humedad sensiblemente constantes, desecando luego en debidas condiciones el producto por separado, esto es, gérmenes solos y aparte, en lote semejante, la plantita completa con todo y semilla, y pesando al final el producto desecado y pulverizado.

En cada caso se ha valorado el nitrógeno total, nitrógeno amínico, el húmico, el amoniacal, el nitrógeno húmico soluble en ácidos y el de aminoácidos totales y fraccionados, esto es, el del precipitado con ácido fosfotúngstico, previa su redisolución, y el de la fracción no precipitada, todo ello según los métodos clásicos.

Para la hidrólisis de los prótidos totales y los de gérmenes, se tomaron cantidades adecuadas y se hizo actuar el ácido clorhídrico a la concentración de 30%: después de 9 horas de acción ya no aumentó la cantidad de aminoácidos, pero utilizamos además otro procedimiento que nos pareció más práctico, obteniendo los mismos resultados: se tomó medio gramo del polvo desecado de cada una de las muestras, y se añadieron 10 ml. de HCl al 10% en ampulas de 12 ml. que se cerraron cuidadosamente a la llama y se tuvieron en autoclave por 6 horas a presión de 12 lb. En todos los casos se valoró nitrógeno amínico con el aparato de Van Slyke.

Ponemos a continuación los resultados obtenidos con el nitrógeno amínico total del maíz entero y de los gérmenes respectivos, previa desintegración del material, desecación, pulverización e hidrólisis por el método descrito anteriormente, ya que esto es lo que más interesa en el presente trabajo.

En la gráfica pueden observarse varios hechos interesantes. La cantidad de nitrógeno amínico casi se duplica a los tres días de germi-



--- Nitrógeno total de maíz entero germinado.

.... Nitrógeno de embriones.

— Nitrógeno amínico de maíz entero germinado.

+++ Nitrógeno amínico de embriones.

nación y aumenta sensiblemente hasta el séptimo día, lo que está de acuerdo con la acción de proteasas en el proceso de germinación, para decrecer luego paulatinamente hasta el término de nuestras experiencias, pero se acentúa más en los gérmenes correspondientes. En cambio los prótidos totales de los gérmenes no varían sensiblemente hasta el noveno día, en que empiezan a decrecer francamente.

Al tratar de explicar el proceso íntimo de las transformaciones del nitrógeno en el proceso de la germinación del maíz, hemos hecho numerosos cromatogramas con los hidrolizados de los 12 días de germinación y a la vez hemos dosificado algunos aminoácidos con distintos métodos, especialmente ácidos aspártico y glutámico. Actualmente lo estamos ampliando a otros aminoácidos y a ciertas enzimas que consideramos interesantes, para tener más elementos de juicio.

DISCUSION

Es natural que tratásemos de aplicar la reacción de Braunstein y Kritzmann a varios aminoácidos. Es bien conocido el hecho que los mencionados autores descubrieron, esto es, la reacción por transaminación, lo que dió origen a la suposición de que dicho proceso era de suma importancia en el metabolismo de prótidos. Virtamen y Laine, al año siguiente, afirmaron que el primer aminoácido sintetizado por las leguminosas era el ácido aspártico y éste participa después en la síntesis de los demás aminoácidos por transaminación con los alfa cetoácidos correspondientes. Algunos investigadores sostienen que son necesarios dos sistemas para verificar la transaminación, uno con el ácido aspártico y otro con el glutámico.

Nos parece más lógico, como afirma Harry G. Albaum, la suposición de un solo sistema:

1 (1) ácido glutámico + ácido oxalacético $\rightleftharpoons$ alfa cetoglutárico + (1) ácido aspártico, pues como se ha observado en embriones de ciertos vegetales, a las 24 horas de germinación hay cierto paralelismo de unidades de transaminación, nitrógeno soluble y protéinico: entre las 24 y 48 horas el nitrógeno soluble aumenta bruscamente, mientras que el protéinico lo hace a la velocidad inicial hasta las 72 horas, en que ambas actividades son paralelas.

De lo anterior se deduce que para la síntesis protéinica se necesita previamente la simplificación de los prótidos propios mediante la proteasa y acción subsiguiente de la transaminasa que podrá actuar con los cetoácidos procedentes del metabolismo de los glúcidos, que

está enormemente aumentado en el endospermo durante el proceso de germinación. Es, por lo tanto, de gran interés el estudio de las relaciones que pueden existir entre la síntesis proteínica, metabolismo de carbohidratos y acción de transaminasa.

CONCLUSIONES

1. El nitrógeno amínico casi se duplica a los tres días de germinación, especialmente en los embriones.
2. El nitrógeno amínico aumenta hasta el octavo día.
3. Esa acción está relacionada con la acción de proteasas.

BIBLIOGRAFIA

- ALBAUM, H. G. and COHEN PH., P., 1943: Transamination and protein synthesis in germinating oat seedlings. *Jour. of Biol. Chem.*, 149:19.
- BEESMAN, S. P., MAGNERS, J., SCHIVERIN, P. and WAELSCH, H., 1948: The absorption of glutamic acid and glutamine. *Jour. of Biol. Chem.*, 175:817.
- BRAUNSTEIN, A. E., 1947: Transamination and the integrative functions of the dicarboxylic acids in nitrogen metabolism. *Advances in protein Chemistry*, Vol. III, 2. Academic Press., New York.
- COHEN PH., P., 1951: Transaminases. *The enzymes*, Vol. I, Part 2, 1040. Academic Press., New York.
- CRAVIOTO, B. R. O., 1941: Estudio de los compuestos nitrogenados del maíz.
- GREEN, D. E., LELOIR, L. F. and NOCITO, V., 1945: Transaminases. *Jour. of Biol. Chem.*, 161:559.
- HERBST, R. M. and SHEMIN, D., 1943: The synthesis of peptides by transamination. *Jour. of Biol. Chem.*, 147:541.
- LEONARD MARY, J. K. and BURRIS, R. H., 1947: A survey of transaminases in plants. *Jour. of Biol. Chem.*, 170:701.
- LUGG, J. W. H., 1949: Plant proteins. *Adv. in prot. Chem.* Vol. V, 230. Academic Press, New York.
- MORROW, C. A., 1927: *Bioch. Labor. Meth.* New York.
- O'KANE, D. E. and GUNSALUS, I. C., 1947: The resolution and purification of glutamic-aspartic transaminase. *Jour. of Biol. Chem.*, 170:425.
- , 1947: Aspartic-alanine transaminase, an artifact. *Jour. of Biol. Chem.*, 170:433.
- OLCOTT, H. S., 1944: A method for the determination of glutamic acid in proteins. *Jour. of Biol. Chem.*, 153:171.
- RAUTANEN, N., 1946: Transamination in green plants. *Jour. of Biol. Chem.*, 163: 687.
- ROCA y ONDARZA, 1953: Proteasas en variedades de maíz. *An. Inst. Biol.* XXIII, 1.
- SCHMIDT, C. L. A., 1938: *The Chemistry of amino acids and proteins*. New York.

- SPPECK, J. F., 1947: The enzymic synthesis of glutamine. Jour. of Biol. Chem., 168:403.
- WAELSCH, H., 1952: Amide metabolism in plants. Adv. in Enzym. Vol. 13, 263. Interscience Publishers, New York.