

ASPARTASA Y GLUTAMINASA EN SEMILLAS DE MAÍZ

por

ROSALIA RAMIREZ, ANGELES ARIZA,
MERCEDES MARTIN & B. SABATER

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los cambios metabólicos que acompañan a la germinación es en general muy pobre. La mayoría de los trabajos se han orientado a estudios de los cambios de intensidad respiratoria, a la variación del contenido de algunos componentes esenciales y más raramente se han abordado estudios a nivel enzimático (1). Recientemente (2) se han realizado algunos estudios sobre cambios en los niveles de enzimas glicolíticos durante la germinación de algunas semillas.

Un componente importante (20 por 100 del peso seco) de las semillas de maíz son las proteínas (3); por esta razón creemos de interés un estudio del metabolismo de aminoácidos durante la germinación de esta planta, orientado sobre todo a un esclarecimiento del metabolismo del nitrógeno en relación con la síntesis y degradación de los dos componentes esenciales: proteínas y ácidos nucleicos.

Dentro de un estudio general del metabolismo de aminoácidos durante la germinación de las semillas de maíz, comunicamos aquí la identificación en embrión de estas semillas no germinadas, de las actividades aspartasa y glutaminasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ácido L-aspartico y la L-glutamina utilizados procedían de la casa Sigma; los fosfatos, el etilendiaminotetracetato disódico (EDTA)

y el mercaptoetanol, de la casa Merck. El resto de los productos utilizados procedían de casas comerciales y eran analíticamente puros.

Las semillas de maíz utilizadas (raza Basto) fueron una donación del doctor Monteagudo, del I. N. I. A. de Madrid.

Las centrifugaciones se hacían en una centrífuga Wifug modelo X 1.

Los tratamientos de ultrasonidos se hacían con un sonicador de la casa Branson, moleo MSE.

Las valoraciones enzimáticas se realizaron midiendo el NH_3 , liberado por acción de la aspartasa y glutaminasa, con el reactivo Nessler (4). Para ello, en un volumen final de dos ml se ponían (en μmoles): tampón fosfato potásico pH 6,8, 100; L-aspartato potásico o L-glutamina, 10; añadiéndose 0,2 ml de preparación enzimática. La mezcla se incubaba a 37° y la reacción se paraba a los veinte minutos por adición de 2 ml de ácido tricloroacético frío al 5 por 100, centrifugándose a 3.000 rpm durante cinco minutos. A 2 ml del sobrenadante se añadían 3 ml de agua destilada y 0,3 ml del reactivo Nessler, midiéndose a continuación la absorbancia a 440 m μ en un Spectronic. Se llevaban controles del tiempo 0, incubación sin sustrato e incubación sin preparación enzimática. Se llevaba un patrón de amoníaco con dos μmoles de CINH_4 en los 2 ml de incubación; previamente comprobamos que con éste la relación densidad óptica-amoniaco era lineal entre 0 y 5 μmoles de CINH_4 en la mezcla de incubación, que correspondía a densidades ópticas entre 0 y 1.1.

Las proteínas se medían por el método de Lowry *et al.* (5).

Se define la unidad de actividad enzimática como la que libera un milimicromol de NH_3 por minuto en las condiciones de ensayo. La actividad específica se refiere a mg de proteína.

RESULTADOS

Preparación de extractos

El embrión y el endospermo de semillas no germinadas se separaban físicamente con una cuchilla.

Para la preparación de extractos sonicados se machacaban finamente en un mortero porciones de embrión o endospermo y se suspendían en tres volúmenes de un medio de extracción que se compo-

nia de 0,05 M tampón fosfato potásico pH 7; 0,001 M EDTA, y 0,005 M mercaptoetanol; a continuación se sonicaba durante un minuto a intensidad 8 y se centrifugaba a 5.000 rpm durante treinta minutos; el sobrenadante constituía el extracto crudo.

Para la preparación de extractos con arena, como antes, se machacaban finamente en el mortero porciones de embrión o endospermo y se trituraban con dos veces su peso de arena, finalmente se suspendían en tres volúmenes del mismo medio de extracción y se centrifugaba como en los extractos sonicados.

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

En la tabla I se representan las actividades enzimáticas y las proteínas detectadas en los diferentes extractos. Como puede apreciarse, los extractos sonicados son más ricos en proteínas y los sonicados de embrión son los únicos con actividades aspartasa y glutaminasa por nuestro método de ensayo.

TABLE I

Actividades aspartasa y glutaminasa en semillas de maíz

Extracto	Proteínas	Aspartasa		Glutaminasa	
	mg/ml	U/ml	Actividad específica	U/ml	Actividad específica
Embrión sonicado	12	100	8,3	130	11
Embrión con arena	4	<5	<0,8	<5	<0,8
Endospermo sonicado	5	<5	<1	<5	<1
Endospermo con arena	2	<5	<2,5	<5	<2,5

Detalles en el texto.

Las actividades sobre aspártico y glutamina eran aditivas; así, la actividad medida por el amoníaco liberado cuando se incubaba el extracto sonicado de embrión con los dos substratos, era la suma de las actividades sobre cada uno de ellos, lo que indica que se trata de dos

enzimas distintos, uno específico para ácido aspártico y otro específico para glutamina. Además las dos actividades se inactivan de forma diferente con el tiempo; después de diez días mantenido el extracto a -15° , éste conserva el 80 por 100 de la actividad aspartasa y el 50 por 100 de la actividad glutaminasa.

Las dos actividades son termosensibles y así se pierden después de mantener el extracto cinco minutos en baño de María a 100° .

Si los extractos sonicados de embrión se hacían omitiendo el mercaptoetanol del medio de extracción y las actividades se medían inmediatamente, se obtenían prácticamente las mismas actividades que se indican en la tabla I, pero éstas desaparecían casi totalmente después de mantenidos los extractos tres días a -15° ; si a continuación se añadían 0,005 M mercaptoetanol, las actividades se recuperaban casi totalmente al cabo de un día mantenidos a -15° .

DISCUSIÓN

Las actividades aspartasa y glutaminasa han sido identificadas en diversos microorganismos (6, 7), habiendo sido identificada también glutaminasa en mamíferos (8); ambas enzimas muestran poseer propiedades reguladoras. En cambio en plantas superiores, o no han sido detectadas o se han encontrado en muy pequeña cantidad (9).

Nosotros hemos detectado la presencia de ambas enzimas en embrión de maíz no germinado y hemos puesto a punto un método adecuado para la preparación de extractos.

El que sólo se detecten las actividades en extractos sonicados, apunta a que en semillas no germinadas pueden estar ligadas a material celular particulado.

El que pueda perderse la actividad de una forma recuperable por reactivos de grupos -SH, como el mercaptoetanol, demuestra la presencia en ambas enzimas de estos grupos -SH.

En la actualidad estudiamos estas dos actividades enzimáticas.

RESUMEN

Se han identificado las actividades aspartasa (C. E. 4.3.1.1) y glutaminasa (C. E. 3.5.1.4) en embrión de semillas de maíz. Estas actividades, que muestran tener grupos -SH sensibles a la oxidación, se han identificado en extractos sonicados de embrión, pero no en extractos de embrión obtenidos por trituración con arena ni en extractos de endospermo.

Agradecimiento

Deseamos agradecer al profesor F. Bustiza la ayuda y consejo recibidos durante la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Wareing, P. F. — 1969 — *Physiology of plant Growth & Development* — Ed. Wilkins, M. B. McGraw-Hill, pág. 687, Londres.
- (2) Khaikin, E. E. & Zeleneva, I. V. — 1972 — *FEBS letter*, 21, 269.
- (3) Stafford, G. A. — 1965 — *Essential of Plant Physiology* — Heinemann Educational Books, pág. 197, Londres.
- (4) Koch, F. C. & McMeekin, T. L. — 1924 — *J. Amer. Chem. Soc.*, 46, 2066.
- (5) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. — 1951 — *J. Biol. Chem.*, 193, 256.
- (6) Wade, H. E., Robinson, H. K. & Phillips, B. W. — 1971 — *J. Gen. Microb.*, 69, 299.
- (7) Williams, V. R. & Lartigue, D. J. — 1967 — *J. Biol. Chem.*, 242, 2973.
- (8) Sayre, F. W. & Roberts, E. — 1953 — *J. Biol. Chem.*, 233, 1128.
- (9) Sanwal, B. D. & Lata, M. — 1964 — *Modern Methods of Plant Analysis* — Ed. Linskens, H. F., Sanwal, B. D. y Tracey, M., V., vol. VII, pág. 309. Springer-Verlag. Berlín.

(Recibido el 20 de septiembre de 1972)

Cátedra de Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias, Universidad Complutense
Madrid