

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

CATEDRA DE BIOQUIMICA

PROF. DR. FEDERICO MAYOR ZARAGOZA

AMINOACIDOS LIBRES, CON ESPECIAL ESTUDIO DEL 4-AMINO BUTIRATO, EN PLANTAS SUCULENTAS

por

Fermín Sánchez Medina *

Ars Pharm. VIII, 7-10 (1967)

El ácido 4-aminobutírico (4-AB), aminoácido no proteínogénico, se halla muy difundido tanto en animales (1,2) y vegetales (3,4) como en microorganismos (5,6,7). Su concentración es especialmente notable en cerebro (8,9,10), tubérculos, rizomas y semillas (11,12). La localización cerebral del ácido 4-aminobutírico ha originado numerosos trabajos que abogan por una acción directa en la transmisión del impulso nervioso (13,14). Esta sugestiva hipótesis no explica sin embargo su presencia habitual en una gran diversidad de organismos inferiores, por lo que en la actualidad, y sin descartar la posible acción neurohormonal de este compuesto, se tiende a considerar al 4-aminobutirato como un metabolito estrechamente vinculado a ciclos generales del metabolismo intermediario, concretamente al ciclo de Krebs.

Efectivamente, el ácido 4-aminobutírico puede actuar como dador de grupos amino en una reacción de transaminación relacionada con el ciclo cítrico. El 2-oxoglutarato es el cetoácido aceptor del resto aminado, formándose ácido glutámico y semialdehído succínico. No es necesario destacar el interés de esta reacción que origina ácido glutámico—del que a su vez se regenera 4-AB por descarboxilación— y que puede conducir a la formación de ácido succí-

nico mediante una reacción acoplada. Esta secuencia representa, por un lado, un ciclo acoplado al de Krebs y, por otro, constituye una vía metabólica para el ácido glutámico complementaria de la que lo relaciona con el 2-oxoglutarato por desaminación oxidativa. Aun en el caso de que este ciclo vicario fuera de actuación secundaria o eventual, es evidente el importante papel que podría jugar como sistema de recurso celular en situaciones de emergencia.

Por las razones que acabamos de enunciar, consideramos que el estudio de las reacciones que concurren en el glutamato en plantas suculentas, de metabolismo hipóxico debido a la superficie relativamente escasa que exponen al intercambio atmosférico, podría proporcionar datos de interés para contribuir a esclarecer el metabolismo de aminoácidos en las mismas y muy especialmente el relacionado directamente con el glutamato. Los resultados previos obtenidos en *Agave americana* aconsejaron ampliar este estudio y extenderlo a otras plantas de características similares.

Los resultados hallados indican que el ciclo alternativo del tricarbóxico que preside el 4-aminobutirato es altamente operante en la mayoría de las plantas suculentas investigadas, cuya peculiar

(*) Extracto de la Tesis Doctoral, dirigida por el Profesor Dr. Federico Mayor Zaragoza, Granada 1967.

Parte de este trabajo se ha realizado gracias a una Beca de la Comisaría de Protección Escolar.

fisiología incrementa el interés por el papel que puede jugar el sistema del 4-AB como derivación del ciclo tricarbóxico. A pesar de haber hallado indicios de 4-aminobutirato en Crasuláceas, su especial y característico metabolismo glucolítico y gluconeogénico justifica que no se requieran los servicios del sistema del 4-AB.

MATERIAL Y METODOS

1.º—*Determinación de aminoácidos libres.* Los tejidos vegetales se estabilizan previamente por ebullición con alcohol 95° (10 g de planta en 50 ml de alcohol) y se trituran en un homogeneizador mecánico. Se realizan sucesivas extracciones con alcohol absoluto, alcohol de 70°, y agua destilada hasta agotar el marco. Se reúnen los filtrados correspondientes y se concentran hasta eliminar el alcohol (50 ml). Una vez mezclados con un volumen igual de ácido acético al 2 %, se pasan por una columna de resina cambiadora de iones (Lewatit-S-100). Los aminoácidos así retenidos se eluyen con amoníaco 1 M y la solución obtenida se concentra hasta sequedad con ayuda de vacío (Rota-vapor), redisolviendo luego los aminoácidos por lavados sucesivos con 1 ml de ácido acético al 2% y 1 ml de agua destilada.

Los aminoácidos se han identificado por aplicación de técnicas mixtas de cromatografía y electroforesis sobre papel (15) verificando simultáneamente las oportunas pruebas de recuperación y control.

2.º—*Determinación de las actividades enzimáticas.* Los ensayos realizados en el estudio prospectivo de la *glutamato descarboxilasa* se han llevado a cabo por identificación electroforética (15) del 4-AB, producto de la reacción, utilizando homogenados directos obtenidos por disgregación del material vegetal en un aparato tipo "Turmix" (40 g de planta en 200 ml de tampón fosfato sódico-potásico 0.1 M, pH=5.7) refrigerado convenientemente. El homogenado se filtra por muselina. Para la determinación del pH óptimo de actividad descarboxilante, los extractos se obtuvieron en las mismas condiciones, pero sustituyendo el tampón fosfato del pH indicado por los tampones apropiados. Los tampones fueron preparados según Go-

mori (16) y el pH final comprobado en un medidor de pH Polymetron 45-B.

Las determinaciones *cuantitativas* de la actividad enzimática se realizaron manométricamente en aparato de Warburg (Braun SL-65) utilizando los extractos obtenidos del modo descrito. La determinación de proteínas se ha llevado a cabo según el método de Lowry y colaboradores (17).

Para los ensayos de actividades *aminotransferásicas* se han utilizado homogenados directos obtenidos con tampón citrico-bórax-fosfato 0.5 M, pH=8.3 (18), así como extractos purificados por diálisis en presencia de tampón 0.0005 M —en microdializador diseñado al efecto—, extractos purificados por "salting out" (con sulfato amónico a pH=8.3 entre 20 y 50% de saturación), y mitocondrias aisladas según el método de Millero y colaboradores (19), previa disgregación de las mismas en un aparato ultrasónico MSE-60. Las actividades transaminantes han sido puestas de manifiesto por identificación electroforética de los aminoácidos resultantes. El semialdehído succínico empleado en la reacción con el glutamato fue preparado según la técnica de Witt y Holzer (20).

En todos los casos se realizaron incubaciones a 35° C (en baños termorregulados dotados de dispositivos con agitación mecánica) durante dos horas, operándose en concentraciones de sustrato del orden de 9×10^{-3} M.

3.º—*Determinaciones volumétricas.*

Preparación de extractos. Se ha aplicado en todos los casos de 20 g de material vegetal, los cuales, previamente troceados, se han mezclado con unos 130 ml de alcohol absoluto y agitados en un aparato disgregador tipo "Turmix" durante dos minutos. Después de filtrar por muselina, los extractos han sido llevados a un volumen final de 150 ml, realizándose las valoraciones en partes alícuotas de 50 ml.

Valoración. Los extractos alcohólicos han sido valorados con solución de KOH 0.01 N. La operación se realiza con el vaso completamente cerrado y agitando el extracto vegetal al máximo, mediante el sistema de agitación electromagnética del instrumento empleado con este fin.

4.—*Métodos isotópicos.* Se llena un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 10 ml de líquido de Knop-Heller (21), añadiendo 4-AB en proporción de 345 mg por litro. Se esteriliza al autoclave a 110° durante 15 minutos. Se añade el volumen de 4-AB marcado que contenga 10 microcurios. Se mide la radiactividad en 0.1 ml del medio resultante.

Una vez preparado así el matraz se adapta el tapón provisto de un tubo en U, manteniéndose en etanol hasta ese momento, llenándose con cantidad adecuada de sosa 5 N.

Antes de realizar las siembras debe esterilizarse superficialmente el material vegetal (lavando abundantemente con agua estéril). Luego se introduce el tejido entre hojas de papel de filtro previamente esterilizadas en el autoclave (una hora a 120°), cortándose en fragmentos de 1 × 1 cm mediante pinzas y cuchillo previamente flameados. Los fragmentos se introducen en el matraz mediante pinzas largas, siguiendo las reglas habituales de asepsia en este tipo de técnicas.

El matraz tapado se lleva al dispositivo ideado para la incubación. La agitación debe ser muy leve de tal modo que el material quede alternativamente cubierto y descubierto por el líquido nutritivo para permitir la respiración y la nutrición del material vegetal.

El matraz se mantiene en estas condiciones el tiempo de incubación requerido. Una vez transcurrido este tiempo

se hace pasar una corriente de nitrógeno por el sistema y se recoge la sosa del tubo en U. Se añade solución de cloruro bórico 1 N a la sosa y se recoge el precipitado en un filtro de vidrio poroso desmontable, previamente tarado, dejando secar bajo lámpara de infrarrojo. Una vez seco, el carbonato se suspende en agua y una porción de la suspensión se coloca sobre una plancheta de peso conocido y se deja secar. Por diferencia de peso podemos calcular la cantidad de carbonato colocado en la plancheta. Se mide la radiactividad del carbonato y la de 0.1 ml del medio después del ensayo.

5.—*Productos.* Los aminoácidos y coenzimas utilizados en las reacciones enzimáticas fueron suministrados por Sigma y Nutritional Biochemical. La ninhidrina procedía de la firma BDH; la piridina, de Riedel y Haën. El resto de productos y disolventes procedía de firmas nacionales.

RESULTADOS

1.—*Aminoácidos libres en las especies ensayadas.* Expresamos a continuación los resultados obtenidos en la investigación de aminoácidos libres existentes en *Opuntia vulgaris*, (tallo y fruto), *Cereus tortuosus*, *Crassula portulaca* y *Sedum pachiphyllum*. Las concentraciones respectivas vienen indicadas por cruces de una manera aproximada, atendiendo a la superficie e intensidad de las manchas obtenidas.

TABLA I

Aminoácidos libres en *Opuntia vulgaris* (tallo y fruto) y *Cereus tortuosus*.

O. vulgaris, tallo *O. vulgaris*, fruto *C. tortuosus*

	<i>O. vulgaris</i> , tallo	<i>O. vulgaris</i> , fruto	<i>C. tortuosus</i>
A. Aspártico	2 +	4 +	3 +
A. Glutámico	5 +	5 +	5 +
A. 4-Aminobutírico	3 +	7 +	1 +
Arginina	1 +	14 +	4 +
Lisina (Ornitina)	4 +	1 +	5 +
Leucina (Isoleucina)	5 +	10 +	2 +
Valina	4 +	9 +	2 +
Tirosina	1 +	6 +	Indicios
Prolina	14 +	15 +	Indicios
Alanina	8 +	8 +	5 +
Glicocola	6 +	5 +	4 +
Treonina	2 +	—	1 +
Glutamina	2 +	6 +	1 +
Serina	10 +	10 +	3 +
Asparagina	2 +	—	Indicios
Fenil alanina	1 +	5 +	—

La presencia de arginina y prolina ha sido comprobada por medio de sus reacciones específicas respectivas (22,23).

En el caso de las especies de crasuláceas se han realizado análisis paralelos en plantas recolectadas al atardecer y por la mañana, inmediatamente antes de recibir iluminación.

En todos los casos se ha partido de la misma cantidad de planta y realiza-

do el análisis en idénticas condiciones por lo que los resultados son comparables entre sí.

Hemos de anotar, no obstante, que el material de partida para el ensayo de *Opuntia vulgaris* procedía de plantas de gran tamaño, recolectadas en el campo, mientras en los demás casos se partió de plantas procedentes de jardines e invernaderos.

TABLA II

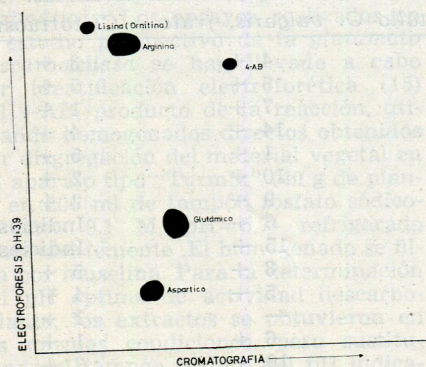
Aminoácidos libres en *Crassula portulacea* y *Sedum pachyphyllum*

	A	B	A	B
A. Aspártico	1 +	1 +	3 +	4 +
A. Glutámico	3 +	5 +	4 +	5 +
A. 4-Aminobutírico	1 +	2 +	1 +	2 +
Arginina	4 +	5 +	4 +	6 +
Lisina (Ornitina)	3 +	3 +	1 +	2 +
Leucina (Isoleucina)	2 +	3 +	3 +	4 +
Valina	3 +	4 +	2 +	4 +
Tirosina	1 +	2 +	2 +	2 +
Prolina	1 +	1 +	1 +	1 +
Alanina	3 +	4 +	3 +	4 +
Glicocola	2 +	3 +	2 +	3 +
Treonina	2 +	2 +	1 +	4 +
Glutamina	—	—	3 +	4 +
Serina	2 +	3 +	3 +	4 +
Asparagina	1 +	1 +	1 +	2 +
Fenil-alanina	2 +	3 +	—	1 +

Columnas A: Plantas recolectadas por la tarde.

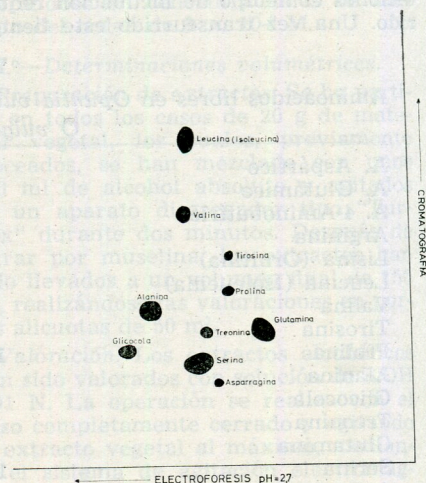
Columnas B: Plantas recolectadas por la mañana.

A continuación incluimos, a título de ejemplo, los cromatogramas correspondientes a la especie *Sedum pachyphyllum*, recolectada por la tarde (figuras 1 y 2).



(R-87-67)

Figura 1.—*Sedum pachyphyllum*. Planta recolectada por la tarde. Primer desarrollo



(R-86-67)

Figura 2.—*Sedum pachyphyllum*. Planta recolectada por la tarde. Segundo desarrollo

2.º—*Difusión de la glutamato descarboxilasa*. La actividad descarboxilante hallada en las especies ensayadas por el método semicuantitativo cromatográ-

fico se resume a continuación. Las cruces corresponden a las distintas superficies e intensidades de las manchas de 4-AB formado.

A.—CACTACEAS

<i>Opuntia vulgaris</i>	+++++
<i>Opuntia ficus indica</i>	+++++
<i>Opuntia microdasys albispina</i>	+++
<i>Cereus tortuosus</i>	+++++
<i>Cereus geometisans</i>	+++++
<i>Cereus peruvianus</i>	+++++
<i>Echinopsis multiplex</i>	++
<i>Ferocactus albispinus</i>	+
<i>Mammillaria elegans</i>	+++
<i>Pilocereus euphorbioides</i>	+
<i>Trichocereus santiaguensis</i>	++

B.—LILIACEAS

<i>Aloe brevifolia</i>	+
<i>Lapiedra martinezi</i>	+++
<i>Gasteria linguata</i>	++
<i>Hawortia attenuata</i>	+

C.—EUFORBIACEAS

<i>Euforbia mogador</i>	+++
-------------------------	-----

D.—AZIOACEAS

<i>Faucaria tigrina</i>	—
-------------------------	---

E.—CRASULACEAS

<i>Crassula portulacea</i>	—
<i>Sedum altissimum</i>	—
<i>Sedum pachiphyllum</i>	—
<i>Echeveria calva</i>	—
<i>Cotyledon ausana</i>	—

F.—AMARILIDACEAS

<i>Agave americana</i>	+++++
------------------------	-------

Curvas de actividad descarboxilante con relación al pH. La determinación del pH óptimo se ha realizado en las especies más activas, obteniéndose en todos los casos valores que oscilan entre 5.7 y 6.0. La figura 3 muestra el electroforograma correspondiente a la especie *Opuntia vulgaris* (fruto).

Diálisis. Se dializó —siguiendo la técnica oportunamente descrita— un extracto directo obtenido a partir de *Cereus tortuosus* y el dializado obtenido se ensayó en las siguientes condiciones:

A.—Sin adición de piridoxal-5-fosfato (PLP).

B.—Con adición de PLP.

C.—Con adición de extracto crudo hervido.

D.—Con adición de extracto crudo hervido y PLP.

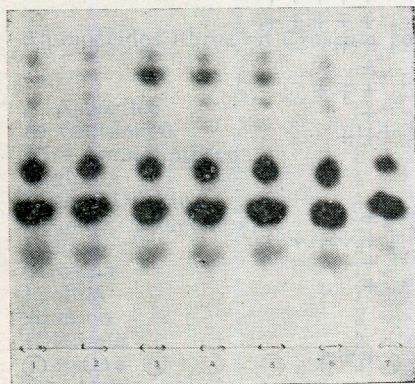
Otra prueba fue realizada con extracto crudo conservado en iguales condiciones que el dializado.

Las actividades, determinadas por el procedimiento electroforético habitual, resultaron como se expresa en la tabla III.

TABLA III

Glutamato descarboxilasa

A.—Dializado	++
B.—Dializado + PLP	+++
C.—Dializado + extracto hervido	++++
D.—Dializado + PLP + extracto hervido	+++++
E.—Extracto conservado igual al dializado	+++++



(R-88-67)

Figura 3.—Influencia del pH en la actividad de la glutamato descarboxilasa de *Opuntia vulgaris* (fruto). Los tubos contenían 1.5 ml del tampón correspondiente, 0.2 ml de PLP (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 0.3 ml de glutamato sódico al 1 % y 1 ml de preparación enzimática. Los pH finales resultaron de 5.3, 5.7, 6.0, 6.4, 6.8, 7.2 y 7.4 respectivamente

Obtención del enzima parcialmente purificado por fraccionamiento salino. Hemos obtenido una preparación enzimática parcialmente purificada a partir de *Opuntia vulgaris* (tallo) por precipitación fraccionada con sulfato amónico entre el 22 y 45%. La preparación obtenida se ensayó frente a glutamato sódico en las condiciones anteriormente indicadas, encontrándose una actividad específica veinte veces mayor a la del extracto crudo.

Estudio de algunas condiciones de la reacción.

A.—La adición de PLP a los extractos crudos mejora solo muy levemente la actividad descarboxilante.

B.—Influencia del etilendiaminotetra-

cetato (EDTA). La posible necesidad de iones metálicos, sugerida por el incremento de actividad observado al añadir extracto hervido y, por tanto, no activo enzimáticamente, al dializado de *Cereus tortuosus*, ha sido estudiada por el procedimiento habitual mediante la adición de EDTA en concentraciones del orden de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} M/l.

La actividad observada en todos los casos era sensiblemente igual a la obtenida sin adición de EDTA.

3.º.—*Determinación cuantitativa de la glutamato descarboxilasa.* Se han determinado manométricamente las concentraciones óptimas de sustrato y la constante de Michaelis-Menten (K_m) para las especies de *Cereus tortuosus* y *Opuntia vulgaris*. En todos los casos se han calculado las actividades específicas de los extractos, previa determinación de proteínas totales.

Se ha observado una coincidencia notable (Tabla IV) entre los valores de K_m hallados según la representación gráfica de Lineweaver y Burk (24) operando con velocidades "normales" (v, 10 min.) y los encontrados siguiendo el sistema propuesto por Schales y Schales (25,26) para el cálculo de velocidades iniciales en sistemas de rápido tránsito de orden cero a primer orden.

TABLA IV

Cálculo de la K_m en *Cereus tortuosus* y *Opuntia vulgaris*.

Cereus tortuosus:

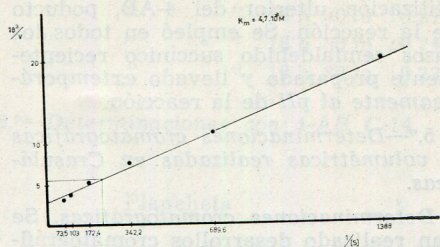
Constante de Michaelis: $K_m = 1.6 \times 10^{-3}$ M.

Actividad específica: $\text{QCO}_2 = 59.83$

Opuntia vulgaris:

Constante de Michaelis: $K_m = 4.7 \times 10^{-3}$ M.

Actividad específica: $\text{QCO}_2 = 25.20$.



(R-89-67)

Figura 4.—Glutamato descarboxilasa de *Opuntia vulgaris*. Determinación de la constante de Michealis-Menten según Schales y Schales. Los vasos contenían concentraciones de sustrato de 13.6, 9.71, 5.83, 2.91 y 1.45 $\times 10^{-3}$ y 7.2×10^{-4} M

La acción de efectores sobre la velocidad de la reacción descarboxilante se ha investigado manométricamente. La glutamato descarboxilasa de *Cereus tortuosus* es activada débilmente por el glutation (8%). El ácido ascórbico inhibe en un 12% y el 2.3 dimercaptopropanol alcanza valores de inhibición del 40%. La enzima de *Opuntia vulgaris* es claramente activada por glutation, EDTA y ácido salicílico, en proporciones próximas al 45% en todos los casos.

Influencia de la atmósfera inerte y de la presencia de 4-AB en la velocidad de la reacción descarboxilante. El estudio manométrico de la reacción descarboxilante en *Cereus tortuosus* revela que hay una actividad más intensa cuando se opera en atmósfera inerte (conseguida con gas nitrógeno). No se ha observado efecto alguno sobre la

- A. Aspártico + 2-oxoglutarato —>
 A. Glutámico + Oxalacetato —>
 Alanina + 2-oxoglutarato —>
 A. Glutámico + Piruvato —>

Las intensidades de estas reacciones han sido notablemente mayores que las encontradas para las que utilizan 4-AB como donador, cuando se ha partido de homogenados directos.

La transaminación entre la alanina y el 2-oxoglutarato ha sido la más intensa, siendo en cambio el paso inverso

velocidad de la reacción cuando se añade 4-AB.

4.º.—Investigación de actividades aminotransferásicas.

A.—Con 4-AB como aminoácido donador.

a.—Las actividades transaminantes han sido estudiadas en *Opuntia vulgaris* (tallo y fruto) *Cereus tortuosus* (tallo) y *Agave americana* (flores, hojas y escapo) (fig. 5).

b.—En todos estos materiales se ha encontrado actividad aminotransferásica entre 4-AB y 2-oxoglutarato, no hallándose una actividad apreciable para el piruvato en las condiciones de experimentación.

c.—La actividad observada utilizando homogenados directos ha sido precaria, debido a la aparente localización mitocondrial de la enzima y a la reactividad de los productos de la reacción (glutamato y alanina). En el primer caso, además se halla influida por la concurrencia de la transaminación con el aspartato presente en el extracto.

d.—La actividad transaminante entre el 4-AB y el 2-oxoglutarato se puso de manifiesto con más claridad utilizando extractos purificados por diálisis y por precipitación con sulfato amónico entre el 20 y 50% de saturación.

e.—Se han obtenido resultados completamente satisfactorios con preparaciones de mitocondrias rotas al ultrasonido: la producción de glutamato resultó así evidente y sin interferencias.

B.—Otros aminoácidos donadores. Se han identificado las actividades aminotransferásicas siguientes:

- A. Glutámico + Oxalacetato
 A. Aspártico + 2-oxoglutarato
 A. Glutámico + Piruvato
 Alanina + 2-oxoglutarato

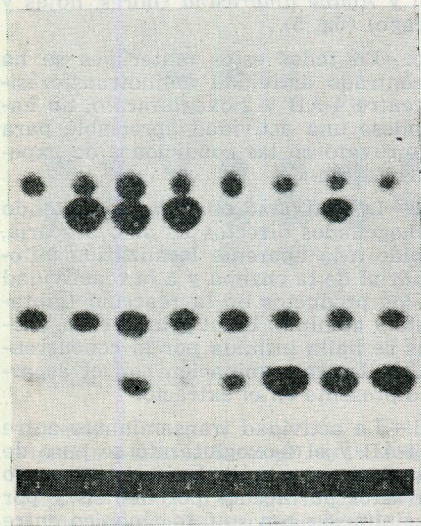
(transaminación entre ácido glutámico y piruvato) el de menor intensidad.

Las interconversiones entre los ácidos glutámico y aspártico han funcionado siempre bien, dependiendo el sentido de la reacción de las cantidades respectivas presentes.

C.—Reacción inversa (glutamato: se-

mialdehído succínico aminotransferasa). La reacción entre el glutamato y semialdehído succínico para originar 4-AB y 2-oxoglutarato ha sido puesta de manifiesto en los materiales anteriormente citados, utilizando los mismos tipos de preparaciones enzimáticas. (fig. 5).

En todas las ocasiones la actividad ha sido más clara que la correspondiente



(R-90-67)

Figura 5.—4-AB: 2-oxoglutarato transaminasa. Reacciones directa e inversa en *Agave americana*. Los tubos contenían: n.º 1: 1 ml de tampón cítrico-borax-fosfato pH 8.4 y 1 ml de preparación enzimática; n.º 2: 0.5 ml de tampón, 0.1 ml de PLP (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 0.5 ml de 4-AB al 1 %, 0.15 ml de 2-oxoglutarato al 1 % y 1 ml de preparación enzimática; n.º 3: igual contenido; n.º 4: sin 2-oxoglutarato; n.º 5: sin 4 AB (en ambos tubos se añadió el volumen de tampón necesario para hacer un total de 2 ml); n.º 6: 1.5 ml de tampón, 0.1 ml de PLP y 0.4 ml de glutamato al 1 %; n.º 7: 1 ml de tampón, 0.1 ml de PLP, 0.4 ml de glutamato y 0.5 ml de semialdehído succínico (al 10 % aproximadamente); n.º 8: 1.5 ml de tampón, 0.1 ml de PLP y 0.4 ml de glutamato. En los tubos 6, 7 y 8 se agregó 1 ml de preparación enzimática. Los tubos 1, 2 y 6 fueron deteñidos a tiempo cero por adición de alcohol etílico antes de la incubación

a la reacción directa, debido a la menor utilización ulterior del 4-AB, producto de la reacción. Se empleó en todos los casos semialdehído succínico recientemente preparado y llevado *extemporáneamente* al pH de la reacción.

5.º—Determinaciones cromatográficas y volumétricas realizadas en *Crasuláceas*.

Determinaciones cromatográficas. Se han realizado desarrollos cromatográficos con los eluatos exentos de aminoácidos obtenidos de la columna de Lewatit S-100 a partir de los extractos de *Crasula portulácea* y *Sedum pachyphyllum* recolectados por la mañana y al atardecer. Se ha seguido la técnica cromatográfica de Jules, Schneider y Lacoste (27), utilizando la modalidad ascendente.

Coincidiendo con lo indicado por Ransón (28), se ha encontrado un considerable aumento de ácido málico en las plantas recogidas por la mañana, si bien en menor proporción que la citada por este autor. El ácido cítrico también se halla en mayor cantidad en la planta recolectada al amanecer. El isocítrico, en cambio, se halla en cantidades mínimas en la planta recolectada por la tarde y no se ha detectado en las muestras tomadas por la mañana.

Determinaciones volumétricas. Estas pruebas se han realizado con el fin exclusivo de confirmar los resultados obtenidos por cromatografía. Efectivamente, la acidez es mucho mayor en las plantas recolectadas por la mañana, como corresponde a su mayor contenido en ácido málico.

A continuación, y a título de ejemplo, exponemos los resultados obtenidos con *Crasula portulácea*. La planta fue mantenida en la oscuridad hasta las diez y media de la mañana, y las muestras para realizar las valoraciones fueron tomadas cada tres horas hasta el atardecer.

La acidez la referimos a ácido málico, expresando los resultados en mg de ácido málico por gramo de planta.

Muestra recogida a las 10 h 30 m	:1,190 mg Mal./g planta
" " " 13 h 30 m	:0.274 " "
" " " 16 h 30 m	:0.248 " "
" " " 19 h 30 m	:0.231 " "

6.º—Determinaciones con 4-AB C-14.

Plancheta	t	Cuentas	c/m	c/m correg. fondo.	c/m corregido autoabs.
0.1 ml. de medio antes de incubar	2	24,569	12,284.5	12,281.7	—
0.1 ml. de medio después de incubar	2	15,868	7,939	7,936.2	—
CO ₂ Ba 8.6 mg.	10	60	6	3.2	6.4
Co ₃ Ba30.7 mg.	10	75	7.5	4.7	5.2

Actividad media del C*O₃Ba a espesor infinito:

$$\frac{6.4 + 5.2}{2} = 5.8 \text{ c/m.}$$

Peso total de CO₃Ba-C¹⁴ obtenido = 585 mg.

45 mg (peso para espesor infinito) ... 5.8 c/m.
585 mg 75.4 c/m.

Actividad total en el CO₃Ba-C¹⁴ procedente del CO₂-C¹⁴ desprendido en las 5 horas de incubación : 75.4 c/m.

DISCUSION

En este estudio se ha comprobado la extraordinaria difusión de la glutamato descarboxilasa en vegetales. Existen interesantes variaciones en la actividad específica, pero su presencia es constante en las diversas especies de cada familia botánica. Las Crasuláceas y Aizoáceas constituyen una excepción, que puede explicarse en virtud de su peculiar metabolismo glucídico. Debe destacarse que el sistema del 4-AB se halla precisamente en las plantas estudiadas que presentan una menor superficie de intercambio, planteándose de nuevo su estrecha relación con el metabolismo precariamente oxigenado.

Tanto los valores de pH óptimo hallados como la constante cinética de Michaelis-Menten guardan una satisfactoria concordancia con los datos publicados anteriormente para la glutamato descarboxilasa de origen vegetal (3,4). El rápido decrecimiento de la actividad en relación al tiempo corrobora

los datos aportados por Beevers (29), como una rápida transición a una reacción de primer orden. Los compuestos tiólicos de bajo peso molecular no parecen proteger a la proteína apoenzimática en las condiciones experimentales. Únicamente el tripéptido glutation parece ejercer un ligero efecto protector de la actividad enzimática.

La determinación cuantitativa manométrica de la actividad descarboxilante ha permitido poner de manifiesto la alta actividad específica de las especies *Cereus tortuosus* y *Opuntia vulgaris*, confirmando plenamente los resultados obtenidos en la semicuantitativa cromatográfica.

Contrariamente a lo que sucede en la enzima procedente de *Lupinus albus* (4), el apozima retiene fuertemente al piridoxal-5-fosfato, de tal modo que su adición a la mezcla reaccionante estimula muy débilmente la actividad.

No hemos hallado influencia alguna por la adición de EDTA en las condi-

ciones experimentales. La incompatibilidad existente entre los pH óptimos de quelación y los de estabilidad apoenzimática hace que quede sin resolver el interesante problema del requerimiento de oligoelementos (30). La actividad 4-aminobutirato: 2-oxoglutarato aminotransferásica ha sido puesta claramente de manifiesto en los vegetales estudiados. Hasta este momento, únicamente Dixon y Fowden (31) habían podido demostrar claramente esta actividad en mitocondrias aisladas de guisantes. Existen, ciertamente, muchas dificultades experimentales para la demostración de esta actividad, ya que no pueden emplearse los procedimientos propios para el reconocimiento de grupos oxo (presentes igualmente en el producto, cetoácido homólogo del aminoácido dador) ni de los grupos amino (por razones similares). Este problema se plantea en todas las reacciones de transferencia ya que no se producen cambios notables de estructura ni se originan nuevos grupos que permitan la aplicación de una valoración analítica diferencial. Por otra parte, el glutamato, producto de la reacción transaminante (como compuesto derivado del 2-oxoglutarato, cetoácido aceptor) se halla normalmente en cantidades elevadas en los extractos y es muy difícil comparar los incrementos semicuantitativos obtenidos con los correspondientes ensayos testigo.

La demostración de actividad transaminante del 4-AB en los fraccionados con sulfato amónico, permite establecer sin lugar a dudas el papel fisiológico del sistema del 4-aminobutirato en los vegetales estudiados, como ciclo acoplado al de los ácidos tricarbóxilicos.

No se ha podido comprobar la indicación de Dixon y Fowden de que el piruvato actúa como aminoceptor. De todos los cetoácidos ensayados, únicamente el 2-oxoglutarato presentó actividad.

El reconocimiento de la reacción glutamato: semialdehído succínico aminotransferasa ha presentado menores obstáculos que la de la transaminasa directa debido, por una parte, a la menor concentración de producto (4-AB) en los blancos y, por otra, al menor metabolismo del mismo en las condiciones

experimentales. El hallazgo de esta actividad constituye, por vez primera, una clara demostración de las posibilidades de transformación del 4-AB en vegetales, de acuerdo con la disponibilidad de los sustratos requeridos.

Los resultados obtenidos sugieren una distinta localización de la enzima descarboxilante y transaminante (extra e intramitocondrial respectivamente). Esta distinta ubicación es de interés en la interpretación de su papel fisiológico. En condiciones normales, la eficacia de un sistema distanciado parece pequeña, cuando se sabe que la gran mayoría de las células vegetales tienen un ciclo tricarbóxilico activo y glutamato deshidrogenasa. Pero en condiciones que detengan la conexión entre el 2-oxoglutarato y el succinato, o que disminuyan el rendimiento del ciclo tricarbóxilico, este ciclo alternativo puede inducirse hasta alcanzar una notable significación biológica.

RESUMEN

Se ha realizado el estudio cromatográfico de los aminoácidos libres existentes en *Opuntia vulgaris* (tallo y fruto), *Cereus tortuosus*, *Crassula portulacae* y *Sedum pachyphyllum*.

Se presentan los resultados obtenidos en la labor prospectiva de la enzima descarboxilante del glutamato en 23 especies vegetales pertenecientes a 6 familias botánicas de plantas suculentas. La glutamato descarboxilasa se encuentra en todas las especies de Cactáceas, Euforbiáceas, Liliáceas y Amarilidáceas ensayadas, no habiéndose encontrado, en cambio, en las especies de Crasuláceas y Aizoáceas que se han estudiado. El pH óptimo (5.7-6.0) y la constante cinética de Michaelis-Menten ($1.6 \text{ y } 4.7 \times 10^{-3} \text{ M}$ para *Cereus tortuosus* y *Opuntia vulgaris* respectivamente) coinciden satisfactoriamente con los datos publicados para esta enzima en orígenes vegetales. La proteína apoenzimática retiene fuertemente unida, en las condiciones experimentales, a la molécula coenzimática (piridoxal-5-fosfato). Por fraccionamiento salino, se ha conseguido purificar unas veinte veces la glutamato descarboxilasa procedente de *Opuntia vulgaris* (tallo).

Se han investigado actividades aminotransferásicas en *Opuntia vulgaris*

(tallo y fruto), *Cereus tortuosus* (tallo) y *Agave americana* (flores, hojas y escapo). En todos estos materiales se ha encontrado actividad transaminante entre el 4-aminobutirato y el 2-oxoglutarato, no hallándose actividad apreciable cuando se utilizan piruvato y oxacetato como alfa-cetoácidos aceptores. Los mejores resultados se han obtenido —dada su situación intramitocondrial aparente— con preparaciones de mitocondrias rotas al ultrasonido. También se ha puesto de manifiesto la reacción transa-

minante inversa —glutamato: semialdehído succínico aminotransferasa.

Empleando 4-aminobutirato radiactivo, se ha puesto de manifiesto su incorporación y metabolismo en fragmentos tisulares de *Opuntia vulgaris*.

Estos resultados parecen confirmar la hipótesis de que el ciclo alternativo del 4-aminobutirato existe en la mayoría de las plantas suculentas investigadas, cuyo reconocido metabolismo hipóxico presta singular interés al conocimiento de su papel fisiológico.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—MASLOVA, M. N. y colaboradores. *Chemical Abstr.* 60, 8474h (1964).
- 2.—MONTEOLIVA, M. y colab. *Nature*, 205, 4976, 111 (1965).
- 3.—SCHALES, O. y SCHALES, S. S. *Arch. Biochem. Biophys.* 69, 378 (1957).
- 4.—MAYOR, F. *Ann. Real Acad. Farm.*, 25, 219 (1959).
- 5.—GALE, E. F. *Biochem. J.*, 34, 392 (1940).
- 6.—OLIVARES, J., MONTOYA, E. y MAYOR, F. 1.º Intern. Meeting Fed. Europ. Biochem. Soc. Abs. pág. 75.
- 7.—WARBURG, O. y colab. *Naturwissen*, 44, 235, (1957).
- 8.—BAXTER, C. F. y colab. *Federation. Proc.* 18, 187, (1959).
- 9.—ALBERS, R. W. y BRADY, R. O. *J. Biol. Chem.* 234, 926, (1959).
- 10.—SALVADOR, R. A. y ALBERS, E. W., *J. Biol. Chem.* 234, 922, (1959).
- 11.—OKONUKI, K. *Chemical Abstr.*, 47, 621b (1953).
- 12.—DONALD, D. y colab. *Anal. Chemist.*, 32, 874 (1960).
- 13.—BAXTER, C. F. y ROBERTS, E. "Neurochemistry of Nucleotides and Amino acidis". pág. 127. Jhon Wiley Sous, R. D. Brady y Tower, D. D; Ed. (1960).
- 14.—ELLIOT, K. A. C. *Brit. Med. Bull.*, 21/1,70 (1965).
- 15.—LOPEZ GORGE, J. y colab. *Real Soc. Esp. Fis. Quim.* Tomo LXIII (B), 465, n.º 4 (1967).
- 16.—GOMORI, G. *Methods in Enzymology*. Vol. I. pág. 138. Academic Press Inc. Publishers N. York. (1955).
- 17.—LOWERY, S. y colab. *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- 18.—THEORELL y STENHAGEN. *Biochem.* 2. 299, 417, (1939).
- 19.—MILLERO, A., BONNER, J. AXELROD, B. y BANDURSKY, R. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 37, 855, (1951).
- 20.—WITT, I. y HOLZER, H., *Acta Biol. Med. Germ.* 11, 712, 9 (1963).
- 21.—CASCALES, M. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Madrid. (1961).
- 22.—SMITH, I., *Chromatographic techniques*, p. 73. William Heinemam. Medical Books. Ltd. Londón (1958).
- 23.—ROKLAND, L. B. y UNDERWOOD, J. C., *Anal. Chem.* 28, 1679, (1956).
- 24.—LINEWEAVER, H. y BURK, D., *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658 (1934).
- 25.—SCHALES, O. y SCHALES, S. *Arch. Biochem.* 11, 155 (1960).
- 26.—SCHALES, O. y SCHALES, S. *Methods in Enzymology*. Colowick y Kaplan, Ed. Vol. II. pág. 190 (1956).
- 27.—JULIES, C., SCHNEIDER, A. y LACOSTE, A. M. *Bull. Soc chim. Biol.* 40, 1-121 (1958).

- 28.—RANSON, S. L. y THOMAS, M., *An. Rev. of Plant Physiology*, 11, 81, (1961).
29.—BEEVERS, A., *Biochem. J.*, 48, 132 (1951).
30.—STEENHOLT, G. y colab., *Congr. Intern. Biochem. Bruselas*, pág. 38 (1955).
31.—DIXON, R. O. D. y FOWDEN, L., *Ann. Botany*, 25, 513 (1961).

Granada, Octubre, 1967.