

Cambios en el contenido de aminoácidos libres y otras fracciones nitrogenadas a lo largo del proceso germinativo en semillas de *Lupinus albus*

M. P. González, M. Cascales y A. Santos-Ruiz

Departamento de Bioquímica. Facultad de Farmacia. Madrid

(Recibido el 4 de agosto de 1969)

M. P. GONZALEZ, M. CASCALES and A. SANTOS-RUIZ, *Changes In the Aminoacid and Other Nitrogenous Fractions Along the Germination Process In Lupinus albus Seeds*, R. esp. Fisiol., 26, 37-42, 1970.

Aminoacid and protein content along the germination of *Lupinus albus* seeds have been studied. The aminoacid pool increased markedly showing the highest values about the 5th day of the germination. 4-aminobutyrate concentrations were parallel to the glutamate decarboxylase activity and inverse to the glutamic acid level. The high initial values and the progressive increase of asparagine and the low proportion of glutamine all during the process, strongly suggest that the mechanism of the ammonia incorporation almost exclusively occurs via aspartic acid, with the subsequent formation of asparagine. Protein biosynthesis appeared to be in such an intensity than in spite of the hydrolytic process affecting the storage proteins, there was a protein level six times higher on the 5th day compared to that in the dry seed.

Los cambios metabólicos que tienen lugar durante la germinación de semillas, en la mayor parte de los compuestos nitrogenados y en especial de los aminoácidos libres y proteínas, ha sido objeto de numerosos estudios. BEEVERS *et al.* (1) han estudiado este problema en semillas de guisante en germinación y han demostrado que durante el período de rápido crecimiento del axis, el contenido de nitrógeno desciende rápidamente en los cotiledones, mientras que se registra un aumento en los axis. Los aminoácidos sufren, como tales compuestos nitrogenados, cambios espectaculares que se originan en los procesos de hidrólisis proteica y transporte activo de unas partes a otras de la semilla. También en semillas de guisante, LAWRENCE *et al.* (3) han observado cómo el

4-aminobutirato se presenta en los cotiledones en cantidades considerables. En otras leguminosas, JONES *et al.* (2) trataron de estudiar el metabolismo de la arginina en semillas en germinación y han demostrado que este aminoácido disminuye en las primeras semanas de germinación. Posteriores estudios de estos mismos autores, con arginina marcada con 14-C, dieron por resultado la formación, a partir de ella, de ornitina, prolina, urea y CO₂ marcados. La presencia de arginasa, así como de ureasa en extractos de las semillas, ponen de manifiesto la existencia en ellas de las enzimas necesarias para el ciclo de la ornitina. El metabolismo de las amidas glutamina y asparagina es muy interesante durante la germinación. Recientes estudios hechos por WANG (8) so-

bre semillas durmientes de trigo, han demostrado que la asparragina es el aminoácido que se encuentra en mayor proporción; en cambio, durante la germinación, se registra una marcadísima disminución de esta amida, que va acompañada por un rápido incremento de la glutamina. Posteriormente, cuando la plantita está más desarrollada, vuelve la asparragina a situarse como predominante. Esto demuestra la estrecha relación existente entre los metabolismos intermediarios de ambas amidas, aunque se desconocen las causas que provocan el aumento de una u otra.

Los estudios realizados en nuestro Laboratorio sobre la descarboxilación enzimática del ácido glutámico en semillas en germinación (6) y los resultados obtenidos en las diferentes actividades enzimáticas a lo largo del proceso, hicieron que se llevara a cabo una investigación encaminada hacia el metabolismo nitrogenado, por una parte debido a que las variaciones enzimáticas tienen que estar forzosamente relacionadas con un cambio en la fracción protídica, y por otra teniendo en cuenta que tales variaciones han de influir sobre el *pool* de aminoácidos, ya que tanto el sustrato como el producto de esta reacción descarboxilante se encuentran entre la fracción de aminoácidos libres.

Material y métodos

Para la germinación, las semillas de *Lupinus albus* fueron colocadas y dispuestas de la forma indicada por SENDINO *et al.* (6), a temperatura constante.

Para la extracción de los aminoácidos libres se tomaron muestras de las semillas a diferentes intervalos de tiempo, para investigar la variación de estos aminoácidos a lo largo del proceso germinativo. Las muestras, una vez pesadas y previa determinación de su peso seco, fueron trituradas en etanol absoluto y mantenidas a ebullición durante 5 minutos. Después de una

posterior extracción con etanol del 70 % y otra con agua, se reunieron todos los extractos y en la mezcla, una vez eliminado el etanol por destilación a vacío, se determinó la composición cualitativa de aminoácidos totales por cromatografía sobre papel y la cuantitativa de aminoácidos básicos por cromatografía en columna de resina Amberlita CG-120, siguiendo la técnica de MOORE y STEIN (5), modificada por ZACHMANN (9).

Para la determinación de proteínas en las semillas en los distintos tiempos de germinación, se tomaron las muestras que una vez pesadas fueron trituradas y extraídas con agua. El homogenado así formado se centrifugó a 6000 g durante 10 minutos y a 0°. Se tomó el sobrenadante y el precipitado se volvió a extraer por dos veces con agua, y posterior centrifugación. En la mezcla de sobrenadantes así obtenidos, llevada a volumen fijo, se determinó la fracción proteica por medida de las proteínas solubles, siguiendo la técnica de Folin-Ciocalteu según el método de LOWRY *et al.* (4).

Resultados

Las variaciones en el contenido de aminoácidos, determinadas según los métodos ya descritos, se expresan en las gráficas de la figura 1, donde aparecen los valores cuantitativos obtenidos por cromatografía en columna de los aminoácidos básicos, que se encuentran presentes en las semillas ensayadas: arginina, lisina, histidina y 4-aminobutirato. El total de aminoácidos ácidos, por este método, se separa en un pico único al iniciarse la elución de la columna. Estos resultados muestran los cambios (μ moles/g de peso seco) de algunos aminoácidos en el proceso germinativo, que resultan muy espectaculares en todos los casos ensayados. Es de notar que las variaciones encontradas en el 4-aminobutirato difieren de las de los otros aminoácidos, pues al no entrar a formar parte de las proteínas, su metabolismo no puede

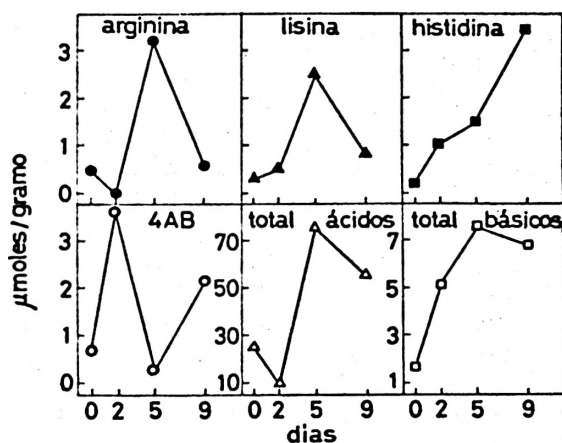


Fig. 1. Determinación cuantitativa de aminoácidos libres en semillas de *Lupinus albus* durante el proceso germinativo. Las condiciones de experimentación son las que se citan en el texto, siguiendo la técnica de Moore y Stein (5), modificada por Zachmann (9)

relacionarse en este aspecto con ellas. Por determinación en cromatografía sobre papel se han investigado, no sólo los aminoácidos ninhidrín positivos, sino también específicamente los guanídicos mediante la técnica de tinción de Sakaguchi, y la prolina e hidroxiprolina por el revelado selectivo de isatina al 0,1 % en butanol.

El hecho más de destacar en estas determinaciones es el incremento de la mayor parte de los aminoácidos en los primeros cinco días de germinación, tanto en las semillas germinadas en presencia de luz como en las germinadas en la oscuridad. El ácido glutámico se incrementa a partir del segundo día, ascendiendo hasta el día noveno. De la misma forma se incrementan marcadamente la glicocola, ácido aspártico, asparragina, 4-aminobutirato, valina, leucina y alanina. El incremento de la alanina se mantiene hasta el día 15. La asparragina aumenta bruscamente en los primeros días. La tirosina permanece prácticamente constante y tanto la prolina e hidroxiprolina aumentan débilmente a partir del segundo día. La diferencia más marcada que ha podido apreciarse entre

las semillas germinadas en la oscuridad es que en éstas no aparece hidroxiprolina y sí, en cambio, fenilalanina.

En la tabla I se muestran los valores de la concentración de aminoácidos totales en semillas germinadas en presencia de luz y en total oscuridad. En ellos es posible observar cómo los máximos no son coincidentes en las dos series, pareciendo como si los procesos hidrolíticos, que dan origen a los aminoácidos libres, fueran más rápidos en las semillas germinadas en la oscuridad.

Los valores obtenidos en ambas series, iluminadas y no, respecto a la cantidad de proteínas solubles, expresadas en gramos por 100 de peso seco y calculadas por el método de LOWRY *et al.* (4) se recogen en la tabla I. La síntesis proteica se inicia en los primeros estadios y con gran intensidad, a la vez que las proteínas de reserva van hidrolizándose para aportar los aminoácido y energías para que el proceso de síntesis *de novo* no se interrumpa. Los resultados obtenidos demuestran cómo la máxima concentración proteica se encuentra al quinto día de germinación, resultado

Tabla I. Variaciones en la fracción de aminoácidos libres y de proteínas solubles durante la germinación de semillas de *Lupinus albus*.

Los valores de aminoácidos libres están expresados en mg por 100 de peso seco y calculados según el método de valoración de aminoácidos que se sigue con la técnica de MOORE y STEIN (5).

Los valores de proteínas solubles están expresados en gramos por 100 de peso seco y se han calculado según el método de LOWRY y colaboradores (4).

Las semillas germinadas con iluminación se expusieron a la luz durante 10 horas diarias.

Tiempo Días	Aminoácidos totales		Proteínas solubles	
	Iluminación	Oscuridad	Iluminación	Oscuridad
0	1,7	1,7	5,1	5,1
2	2,4	2,5	13,6	10,7
5	5,2	6,0	25,5	30,0
9	6,7	3,9	16,5	12,6
12	5,2	2,2	11,0	11,6
15	3,9	2,5	15,2	7,8

de un incremento paulatino a partir de tiempo cero. Aunque los resultados experimentales sólo muestran los valores a los 0, 2, 5, 9, 12 y 15 días, puede fácilmente deducirse que el período de máxima actividad, en cuanto a síntesis proteica se refiere, ha de estar comprendido entre el segundo y quinto días. En días posteriores la continuada hidrólisis de las proteínas viejas del cotiledón hará que el valor absoluto de proteínas totales disminuya ostensiblemente hacia el noveno día, manteniéndose en días posteriores.

Discusión

En la cuantitativa de aminoácidos que aparece en la figura I, la proporción de 4-aminobutirato está de acuerdo con la actividad de la enzima que lo produce a partir del glutamato (6). El ácido glutámico, revelado por cromatografía sobre papel, disminuye y aumenta en proporción inversa. Es de notar que, exceptuando la histidina, todos los demás aminoácidos ensayados: arginina, lisina y el total de aminoácidos ácidos, se incrementan muy marcadamente hacia el quinto día y decrecen a partir de aquí. Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta la activación de enzimas hidrolíticas que tiene lugar en la semilla tan pronto como se produce la imbibición. Estas enzimas proteinasas y peptidasas actúan sobre la reserva proteica de estas semillas desdoblándola en aminoácidos libres.

El *pool* de aminoácidos que se incrementa considerablemente por causa de estos procesos hidrolíticos, puede en parte ser transportado al embrión y usado en la síntesis de proteínas protoplasmáticas. Según los valores encontrados en la determinación de las proteínas (tabla I), la síntesis proteica se inicia en la semilla desde los primeros momentos, y alcanza su concentración máxima hacia el quinto día, en el momento preciso en que la germinación comienza a hacerse visible. Otra parte de

estos aminoácidos puede ser utilizada como sustrato respiratorio. Es bien conocido que los aminoácidos pueden sufrir una desaminación oxidativa y originar los correspondientes cetoácidos y amoníaco. Alternativamente, los aminoácidos pueden primeramente transaminarse y dar lugar así a un incremento de los ácidos aspártico y glutámico, los cuales, por otra parte, son, respectivamente, desaminados a oxalacetato y 2-oxoglutarato, intermediarios usuales del ciclo tricarboxílico. De esta forma, el esqueleto carbonado de los aminoácidos derivados de la rotura de las proteínas de reserva puede utilizarse como suministrador de energía. Las cantidades relativamente altas de amoníaco que resultan de la desaminación de los aminoácidos podrían resultar tóxicas si se fueran acumulando, pero estudios sobre ciertas semillas han mostrado que pueden ser incorporadas a ciertos aminoácidos, tales como los ácidos aspártico y glutámico, y originar asparagina y glutamina, respectivamente.

En nuestros experimentos hemos observado cómo la asparagina, revelada en cromatografía sobre papel, se incrementa de manera notable y continuada a lo largo de los 15 primeros días, lo cual está de acuerdo con los resultados de LAWRENCE *et al.* (3), obtenidos en semillas de guisante. Este acúmulo se produce por amidación del ácido aspártico, al tratar de consumir la célula, el amoníaco resultante de las desaminaciones oxidativas de los aminoácidos, necesarias para los requerimientos energéticos de la nueva planta. En el caso de la glutamina — amida del ácido glutámico, y que, según varios autores, aparece también acumulada en semillas de cucurbitáceas y ricino — no hemos encontrado más que pequeñas cantidades, que no experimentan a lo largo del proceso estudiado aumento alguno. Quizás la presencia de la glutamato descarboxilasa en la semilla seca y su incremento de la actividad en los primeros días actúa consumiendo grandes cantidades de glutamato,

no dejando exceso suficiente para la captación del amoníaco que se vaya acumulando.

afectan a las proteínas de reserva, al quinto día la cantidad es de seis veces superior a la de la semilla seca.

Resumen

El contenido en aminoácidos y proteínas experimenta notables cambios a lo largo de los primeros 15 días de germinación, en semillas de *Lupinus albus*. La fracción de aminoácidos libres sufre un marcado incremento con un máximo hacia el quinto día del proceso germinativo. El 4-aminobutirato experimenta variaciones en proporción directa a la actividad de la enzima que lo produce y su incremento coincide con una disminución del ácido glutámico, de quien procede por descarboxilación. La gran cantidad de asparragina que se aumenta progresivamente a lo largo de todo el proceso, y la escasa proporción de glutamina, hace pensar que el mecanismo de captación del amoníaco en exceso se verifica casi exclusivamente vía ácido aspártico. La biosíntesis de proteínas se inicia desde la imbibición a una intensidad tal, que a pesar de los procesos hidrolíticos, que

Bibliografía

1. BEEVERS, L. y GUESNEY, F. S.: *Plant. Physiol.*, **41**, 1455, 1966.
2. JONES, V. M. y BOULTER, D.: *New Phytol.*, **67**, 925, 1968.
3. LAWRENCE, J. M. y GRANT, D. R.: *Plant. Physiol.*, **38**, 561, 1963.
4. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
5. MOORE, S. y STEIN, W. H.: *Anal. Chem.*, **30**, 1190, 1958.
6. SENDINO, M. J.: Tesis Doctoral. Julio 1969. Madrid.
7. SENDINO, M. J., CASCALES, M. y SANTOS-RUIZ, A.: *R. esp. Fisiol.*, **26**, 31, 1970.
8. WANG, D.: *Contr. Boyce Thompson Inst.*, **24**, 109, 1968.
9. ZACHMANN, M., TOCCI, P. y HYHAN, W. L.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 1355, 1966.

