

Medida de actividad ureásica en tejido intacto de cotiledones de *Citrullus vulgaris*

C. Vicente e Irene Olcina

Departamento de Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias
Salamanca

(Recibido el 24 de septiembre de 1973)

C. VICENTE and I. OLCINA. *Measurement of Ureasic Activity of the Intact Tissue of the Citrullus vulgaris Cotyledons*. Rev. esp. Fisiol., 30, 71-76. 1974.

The treatment of the intact tissue of the *Citrullus vulgaris* cotyledons with propilenglycol and propanol-2 at the 1 % and 3 % respectively provokes an increase in the output of ureasic activity measurement. This increase is due to higher facility to the urea penetration in the intercellular spaces.

Los datos que se poseen sobre actividades enzimáticas, obtenidos por técnicas que reproducen *in vitro* el ambiente celular, son sólo aproximados, ya que la destrucción de dicho ambiente hace variar de manera drástica condiciones tales como concentraciones relativas de proteínas, cofactores, activadores e inhibidores de un enzima dado en las células, condiciones que sólo pueden ser parcialmente reconstituidas en el laboratorio. Este problema ha recibido escasa atención, aunque en algunos casos se ha abordado con éxito. La estimación de actividades enzimáticas en tejidos o células intactas se ha llevado a cabo por «anestesia», mediante disolventes orgánicos, de las barreras de permeabilidad celular, como es el caso de la nitrato reductasa en plantas superiores (3) o de la ureasa bacteriana (4).

La ureasa en semillas de cucurbitáceas y leguminosas constituye una simplifica-

ción del problema, ya que es un enzima localizado en paredes celulares (9). El sustrato, suministrado de manera exógena, sólo tendría que vencer las barreras a su penetración que suponen los espacios intercelulares de un tejido intacto. Esta simplificación ha determinado su selección como enzima a experimentar, midiendo su actividad en tejido intacto de cotiledones de sandía y estudiando el aumento en el rendimiento de la medida cuando el tejido es tratado con algunos solventes orgánicos, dándose una posible explicación al fenómeno.

Material y métodos

Como material de experimentación se ha utilizado semillas de sandía, variedad comercial valenciana, con un poder germinativo del 95 %, según el test del tetrazolium (6). Para estimar la actividad ureá-

sica se incubaban, en un volumen final de 5 ml, cortes de semillas previamente pesados, con 100 μ moles de urea y 375 μ moles de fosfato, a pH 6,9, durante 30 minutos a 37° C. En los ensayos con disolventes orgánicos, las semillas fueron previamente mantenidas en contacto con propilenglicol y propanol-2, a las concentraciones que en su caso se indiquen, o en cloroformo o tolueno puros, a 37° C y durante los tiempos indicados, antes de poner el tejido en contacto con la urea. La reacción se detenía retirando el tejido y adicionando 1 ml de ácido tricloroacético al 3 %. La urea remanente se determinaba por el método del p-dimetil-amino benzaldehído (1), midiéndose el color desarrollado a 440 nm y calculándose por diferencia la urea consumida. La actividad enzimática del tejido se expresa como μ moles de urea consumida/g de peso fresco/minuto.

De la misma manera se medía la actividad para extractos libres de células, preparados por homogeneización de semillas en un homogeneizador Omni-mixer, de Sorvall, a 8.000 rpm durante un minuto con protección de hielo, en tampón fosfato 75 mM de pH 6,9 o en los diferentes solventes orgánicos. El sobrenadante obtenido por centrifugación a 26.500 \times g durante 20 minutos a 4° C en una centrífuga

Sorvall SS-1 se utilizaba como fuente de enzima.

Para investigar el efecto de los diferentes disolventes orgánicos sobre paredes celulares, se llevó a cabo su hidrólisis, en un volumen final de 3 ml, por pectinasa al 1 %, celulasa al 5 % o ambas (adquiridas en Sigma Chemical Co.), utilizando como estabilizador Cl_2Mg 0,5 M, siguiendo las indicaciones de RUESINK (7), valorándose los azúcares reductores por el método de SOMOGYI (8) y NELSON (5).

En digeridos enzimáticos de pectina comercial (BDH) llevados a cabo en las condiciones descritas en cada caso, se identificó el ácido galacturónico y sus derivados por cromatografía en capa fina sobre silicagel G, utilizando como disolvente piridina-acetato de etilo-ácido acético-agua (36:36:7:21 v/v) (2) o sobre celulosa MN 300, utilizando diisopropil éter-metanol (83:17 v/v) y revelando con naftorresorcinol (10).

Resultados

Semillas de sandía, previamente despojadas de sus cubiertas externas, pesadas y cortadas, eran incubadas a 37° C en propilenglicol o propanol-2 al 1, 3, 5, 7 y 10 % en tampón fosfato 75 mM de pH 6,9, a tiempos crecientes y medida posterior-

Tabla I. Efecto del propilenglicol y propanol-2 sobre la medida de actividad ureásica en cotiledones de sandía.

Concentraciones de alcohol ** %	Actividad ureásica						
	Control *	Cotiledones tratados con propilenglicol			Cotiledones tratados con propanol-2		
		30	45 (minutos)	60	30	45 (minutos)	60
5,6							
1		68,4	74,1	80,0	11,6	63,0	95,0
3		34,5	34,5	63,8	59,3	97,4	140,6
5		31,3	30,3	47,9	50,3	56,6	69,2
7		28,6	23,8	47,0	11,7	47,8	53,8
10		16,1	18,0	20,4	0,0	42,3	44,3

- * El tejido control se incubó durante 60 minutos en tampón fosfato 75 mM de pH 6,9 y a 37° C.
- ** El volumen se completa con tampón fosfato 75 mM de pH 6,9.

mente la actividad ureásica después de cada tratamiento. Se observa (tabla I), que, con ambos disolventes, se obtiene mayor rendimiento en la medida con respecto a controles incubando exclusivamente en tampón, siendo máximo para concentraciones de 1 % de propilenglicol y 3 % de propanol-2. El decrecimiento en la actividad de las semillas tratadas con concentraciones superiores debe estar en función de una desnaturalización del enzima. Resultados semejantes se obtuvieron utilizando cloroformo y tolueno puros (tabla II).

Cuando se utilizan extractos libres de células, preparados por homogeneización de las semillas con propilenglicol y propanol-2 a las concentraciones y tiempos estimados como óptimos, los resultados confirman los anteriormente descritos. El tratamiento con ambos alcoholes, en el momento de llevar a cabo la ruptura de las células, aumenta el rendimiento en la medida de actividad ureásica (tabla III).

Tabla II. Efecto de cloroformo y tolueno sobre la medida de actividad ureásica en cotiledones de sandía.

Compuesto	Actividad ureásica dependiendo del tiempo de incubación (minutos)		
	30	45	60
Cloroformo	37,5	136,9	150,3
Tolueno	69,8	81,5	129,6

Tabla III. Efecto de propilenglicol y propanol-2 sobre la medida de actividad ureásica en extractos libres de células de cotiledones de sandía.

Los extractos libres de células, en los diferentes tratamientos, se prepararon como se especifica en Métodos.

Tratamiento	Actividad ureásica
Tampón fosfato 75 mM (pH 6,9)	62,0
Propilenglicol al 1 %	84,3
Propanol-2 al 3 %	124,7

Tabla IV. Liberación de azúcares reductores a partir de paredes celulares en presencia y ausencia de alcoholes por tratamiento con pectinasa y celulasa

Los azúcares reductores se expresan como μ moles de glucosa/g de peso fresco/hora.

Tratamiento	Control	Propilenglicol	Propanol-2
Pectinasa	5,2	3,6	0,0
Celulasa	19,9	19,5	19,6
Celulasa + Pectinasa	20,8	20,8	19,5

En estos tratamientos se debe excluir la liberación del enzima al medio por acción de los alcoholes, ya que las disoluciones de éstos, una vez separado el tejido después del máximo tiempo de incubación, no contenían actividad ureásica detectable.

Al ser la ureasa un enzima de pared celular, se supuso que la acción de los alcoholes afectaría esta estructura. Al intentar la digestión de las paredes celulares por la acción combinada de celulasa y pectinasa se encontró que, si bien la hidrólisis de celulosa no era afectada por la presencia de propilenglicol y propanol-2 a las concentraciones óptimas, la hidrólisis del componente péctico por pectinasa era parcialmente impedida (tabla IV). Estos resultados son reproducibles cuando la fracción péctica nativa era sustituida por una pectina comercial y se la sometía a hidrólisis por pectinasa. La pectina, al 0,5 %, era preincubada con propilenglicol o propanol-2 en las concentraciones óptimas para valoración ureásica, a 4° C durante una y doce horas, respectivamente, sometiéndola después a hidrólisis por pectinasa al 1 % durante cinco horas a 25° C (tabla V).

En efecto, no es atribuible a una pérdida de actividad por parte de la pectinasa por efecto de los alcoholes, ya que incubando enzima y alcohol en las condiciones descritas antes de añadir pectina no se observa ninguna inactivación del enzima.

Tabla V. Hidrólisis de pectina por pectinasa en presencia y ausencia de alcoholes.

Tratamiento	Azúcares liberados en función de tiempo de preincubación	
	1 h	12 h
Agua	2,57	2,57
Propilenglicol	2,16	0,12
Propanol-2	2,20	0,17

Hirviendo durante una hora una disolución de pectina al 0,5 % en EDTA 0,01 M se logra la liberación de ácido galacturónico. Una preparación de este tipo daba una mancha por cromatografía en capa fina sobre silicagel G de Rf 0,25, utilizando como disolvente piridina-etilacetato-ácido acético-agua. Esta mancha correspondía al ácido galacturónico libre. Si la disolución de pectina había sido previamente tratada con propilenglicol o propanol-2 a las concentraciones mencionadas (durante doce horas a 4° C), la cromatografía del hervido con EDTA sobre celulosa MN 300, utilizando como disolvente diisopropil éter-metanol, daba dos manchas, ninguna de las cuales correspondía a ácido galacturónico, cuyos Rf eran 0,12 y 0,15. Para un Rf de 0,15 corresponde un derivado metilado del ácido galacturónico, no habiendo sido identificado el otro componente.

Discusión

Los resultados expuestos en las tablas I, II y III demuestran claramente que ciertos disolventes orgánicos estimulan el rendimiento en la medida de actividad ureásica en tejidos vegetales intactos o en sus extractos. Referencias sobre este problema existían para la actividad ureásica de células de *Proteus rettgeri* tratadas con tolueno, aunque no se daba una explicación satisfactoria del fenómeno. En el presente trabajo, se ha comprobado que, como una explicación para los hechos observados en las experiencias realizadas como cotiledones de sandía, debe excluirse la libe-

ración del enzima a partir de la estructura celular sobre la que está localizado. Tampoco se observan cambios morfológicos en las estructuras celulares. El problema debe ser, pues, enfocado en el sentido de una mayor accesibilidad del sustrato a los centros de localización del enzima.

La tabla IV da una primera explicación del fenómeno al demostrar que la fracción péctica de las paredes celulares se vuelve resistente a la hidrólisis por pectinasa cuando el tejido es tratado con propilenglicol o propanol-2. Este efecto aumenta con el tiempo de tratamiento y no es atribuible a una desnaturalización del enzima hidrolítico. Se podría suponer entonces que los ácidos galacturónicos de la pectina han sido sustituidos, quizás en el grupo ácido, por los alcoholes mediante un proceso de esterificación o transesterificación.

Esta hipótesis viene confirmada por el hecho de que un hidrolizado de pectina tratado previamente con los alcoholes y sometido a cromatografía en capa fina presenta un tercer componente, de Rf distinto al del ácido galacturónico y el ácido galacturónico metilado en posición 6, que sería —según la bibliografía consultada (10)— un producto de la esterificación del grupo carboxilo del ácido galacturónico por los alcoholes.

Una esterificación de este tipo significaría que la población de agua en los espacios intercelulares del tejido aumenta, sumándose el agua liberada en la esterificación a la de la preparación que penetra naturalmente. Este grado de hidratación máxima favorecería la penetración de la urea en el tejido, siendo entonces fácilmente hidrolizada por la ureasa superficial localizada en las paredes celulares.

Resumen

El tratamiento de cotiledones de *Citrullus vulgaris* con propilenglicol al 1 % y propanol-2 al 3 % provoca un aumento considerable en el rendimiento de medida de actividad ureásica,

tanto en tejido intacto como en extractos libres de células. Se postula que este hecho es debido al aumento del agua intercelular por esterificación del ácido galacturónico de la fracción péctica de la pared celular, lo que permite una mayor accesibilidad de la urea a los centros de localización del enzima.

Bibliografía

1. BAILLY, M., FONTY, P. y LEGER, N.: *Ann. Biol. clin.*, 25, 10, 1967.
2. BANCHER, E., SCHERZ, H. y KAINDL, K.: *Mikrochem. Acta*, 1962, 1043.
3. JAWORSKI, E. G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43, 1274, 1971.
4. MAGAÑA-PLAZA, I. y RUIZ-HERRERA, J.: *J. Bacteriol.*, 93, 1294, 1967.
5. NELSON, N. J.: *J. Biol. Chem.*, 153, 375, 1944.
6. PORTER, R. H., DURRELL, M. y ROMM, H. J.: *Plant Physiol.*, 22, 149, 1947.
7. RUESINK, A. W.: En «Methods in Enzymology», 23 (San Pietro, A., ed.). Academic Press, Nueva York, 1971, p. 197.
8. SOMOGYI, M. J.: *J. Biol. Chem.*, 117, 771, 1937.
9. VICENTE, C.: *Rev. Real Acad. Ciencias*, Madrid 64, 641, 1970.
10. WOLFROM, M. L., PATIN, D. L. y LEDEKREMER, R. M.: *J. Chromatog.*, 17, 488, 1965.

