

Laboratorio de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de Murcia

Participación del ácido ascórbico en la respiración del limón

por

A. Soler, L. Murcia y F. Sabater

(Recibido para publicar el 20 de octubre de 1965)

La abundancia en algunos tejidos vegetales de enzimas capaces de catalizar la oxidación directa de substratos naturales por el oxígeno, tales como AA* oxidasa y fenolasa, ha sugerido desde hace varios años la posibilidad de actuación de sistemas respiratorios distintos del universalmente aceptado de transporte de electrones a través de flavoproteínas y citocromos.

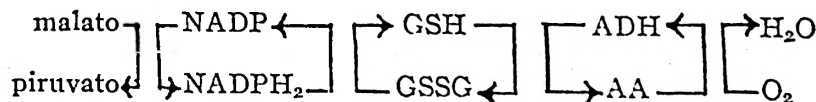
Dicha posibilidad ha sido motivo de discusiones, y quizás, hasta contar con más evidencia experimental, deba considerarse por ahora que el transporte de electrones por cadenas distintas de la de citocromos contribuye, en todo caso, en pequeña cantidad al total de la respiración, basados en la consideración de GODDARD y BONNER (1) de que la afinidad de dichas oxidasas por el oxígeno es relativamente baja.

Con todo, queda el problema de la

existencia de esta respiración menor que puede ser extramitocondrial, pues los enzimas que participan suelen ser bastante solubles, y que puede llegar a convertirse en respiración mayor en algunas circunstancias de la vida de la planta, como han señalado RUBIN y col. (6) para el caso de manzanas en que a baja temperatura el sistema de citocromos actúa demasiado lentamente, mientras que fenolasa, que tiene un coeficiente de temperatura bastante menor, actúa más a temperaturas bajas.

La observación por nuestra parte de una gran actividad AA oxidasa en etapas de gran actividad metabólica en limones induce a pensar en una participación activa de dicho enzima en los procesos metabólicos.

Una extensa revisión del metabolismo del AA en plantas y, especialmente, de su posible participación en la respiración



(*) Utilizaremos las siguientes abreviaturas:

AA : ácido ascórbico.

ADH : ácido dehidroascórbico.

GSH : glutatión reducido.

GSSG : glutatión oxidado.

fue hecha por MAPSON (3); de entre todas las posibilidades resalta la de un sistema que enlace AA oxidasa con ADH reductasa y ésta con glutatión reductasa según el anterior esquema.

tal sistema fue hallado que actúa *in vitro* en gérmenes de guisantes por MAPSON y MOUSTAFA (4) y sistemas similares fueron establecidos por MARRÉ y LAUDI (5) en las partes apicales de plantas de guisantes y JOUNG y CONN (8) en otros materiales vegetales.

Comprobar la existencia de tal sistema en el limón joven implica demostrar la presencia de los enzimas intermedios y la posibilidad de acoplarse entre sí para producir el transporte de electrones desde los substratos hasta oxígeno.

Material y métodos

Extracto activo. Trituramos en mortero una parte de limón, dos partes de arena y cuatro partes de tampón fosfato 0,1 M pH 7,0; centrifugamos 20 minutos a 3.000 × g y dializamos 3 días contra tampón fosfato 0,1 M pH 7,0, con cambios de tampón cada 24 horas.

Medida de actividad AA oxidasa. En un volumen total de 6 ml se ponen tampón citrato (100 μmoles)-fosfato (200 μmoles), AA (30 μmoles) y extracto (1 ml). Se deja actuar a 25° C mientras se agita con aparato magnético a tal velocidad (determinada experimentalmente) que el acceso de oxígeno no limita la velocidad de reacción y al cabo de 5 minutos se detiene por adición de 5 ml de disolución al 10 % de ácido fosfórico. La actividad se expresa en μmoles de AA desaparecidos en un minuto.

Medida de actividad ADH reductasa. Se pone en la rama lateral de un tubo Thunberg dehidroascorbato (10 μmoles) y en la rama principal GSH (20 μmoles), tampón Tris (150 μmoles)-ClH de pH 7,6 y extracto (1 ml), hasta un volumen total de 5,5 ml. Se evacua y llena 3 veces con nitrógeno y, finalmente, se evacua de nuevo. Se mezcla y deja actuar durante 10 minutos, se detiene por adición de 10 mls. de disolución al 10 % de ácido fosfórico, se enrasa con la misma disolución de fosfórico a 25 ml y se determina el AA formado por el método de

HUGHES (2). Se hacen testigos sin dehidroascorbato, con extracto hervido o sin extracto. La actividad se expresa en μmoles de ADH desaparecido en un minuto.

Medida del sistema ADH reductasa más AA oxidasa. Se realiza manométricamente, con la siguiente composición en el matraz de reacción: en la parte lateral AA (1 μmol) y GSH (9 μmoles) en un volumen de 0,5 ml; en la parte principal extracto (2 ml). Se hacen testigos con extracto hervido o sin GSH. La actividad se expresa gráficamente en μl de oxígeno consumidos a lo largo del tiempo.

Medida de actividad de enzima málico más glutación reductasa. Se realizó en Thunberg; en la rama lateral se pone el extracto (1 ml) y en la parte principal l-malato (10 μmoles, GSSG (10 μmoles), NADP (1 μmol)), Cl₂Mn (2,5 μmoles), tampón Tris (50 μmoles)-ClH de pH 7,6 en un volumen total de 2,75 mls. Se evacua y llena tres veces con nitrógeno y, finalmente, se evacua de nuevo. Al cabo de una hora se detiene la reacción con 5 ml de ácido fosfórico al 10 % y se valora el GSH con I₂ 0,01 N. Las actividades se expresan en μmoles de GSSG que se reducen en un minuto.

Medida del sistema enzimático total. Se siguió un procedimiento manométrico. En la rama lateral del matraz Warburg se pone NADP (0,25 μmoles), ascorbato o dehidroascorbato (1 μmol), glutación oxidado o reducido (1 μmol), l-malato (50 μmoles), Cl₂Mn (2,5 μmoles), en un volumen de 0,5 ml; en el departamento principal, extracto (2 ml). Se hacen diversos testigos según el ensayo; los resultados se expresan gráficamente en μl de oxígeno consumido a lo largo del tiempo.

Resultados y discusión

AA oxidasa. Los resultados se exponen en la tabla I. Se observa que la

TABLA I

AA oxidasa en las distintas etapas de desarrollo y zonas del limón. Las cifras de actividad significan μ moles de AA oxidados en 1 minuto.

Peso del fruto (g)	Flavado	Albedo	Carpelos	Total
1	—	—	—	4
12	1,4	1,6	2,2	—
20,5	0,7	0,8	0,12	—
29	0,4	0,42	0	—
49	0,15	0,15	0	—
65	0,15	0,2	0	—

actividad AA oxidasa es mucho mayor en frutos de menor tamaño, incluso en los carpelos.

Puesto que en frutos de menor tamaño la actividad metabólica es muy intensa, juzgada por la capacidad respiratoria, hallada por F. SABATER (7), queda establecido un paralelismo entre las actividades metabólica y AA oxidasa, al contrario de otros enzimas como peroxidasa, cuyo nivel no varía mucho a lo largo de la vida del fruto, al menos en el flavado.

ADH reductasa. Los resultados se exponen en la tabla II. Como se ve, la reducción no enzimática del ADH (ensayo n.º 4) es considerable, pero la reducción enzimática es bastante mayor.

TABLA II

Actividad ADH reductasa.

	Ensayo n.º			
	1	2	3	4
GSH (μ moles)	20	20	20	20
ADH (μ moles)	10	—	10	10
Tampón Tris 0,05 M—ClH, pH 7,6 (ml).	3	3	3	3
Extracto (ml)	1	1	—	—
Extracto hervido (ml)	—	—	1	—
Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0 (ml) . . .	—	—	—	1
Volumen final: 5,5 ml	—	—	—	—
AA formado (μ moles)	5,32	0,35	2,34	1,99

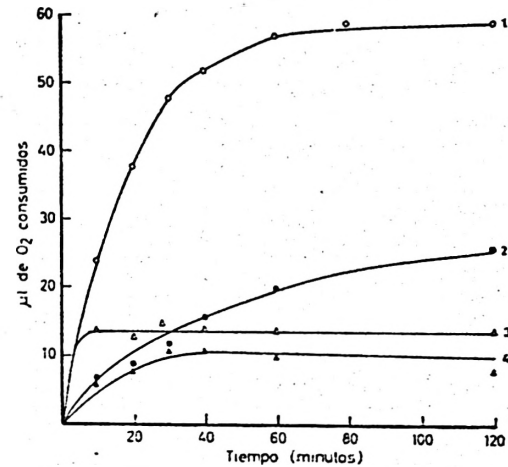


FIG. 1. Acoplamiento de AA oxidasa con ADH reductasa:

- Sistema completo: GSH (9 μ moles), AA (1 μ mol) y extracto (2 mols). Volumen total: 2,5 ml.
- Con extracto hervido.
- △—△ Sin GSH.
- ▲—▲ Con extracto hervido y sin GSH.

Acoplamiento ADH reductasa más AA oxidasa. Los resultados se exponen en la figura 1. Las curvas 3 y 4 corresponden a la oxidación enzimática y no enzimática, respectivamente, del ascorbato. La figura 2 representa la oxidación no enzimática de GSH más AA.

Enzima málico más glutatiión reductasa. Los resultados se exponen en la tabla III.

TABLA III

Actividad enzima málico más glutatión reductasa.

	Ensayo n.º				
	1	2	3 (*)	4	5
1-malato (μ moles)	10	10	10	10	—
GSSG (μ moles)	10	10	10	—	10
NADP (μ moles)	1	—	1	1	1
Cl ₂ Mn (μ moles)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Tampón Tris 0,05 M—ClH, pH 7,6 (ml).	1	1	1	1	1
Extracto (ml)	1	1	1	1	1
Volumen final: 3,75 ml					
GSH producido (μ moles)	10	1,5	1	1	1,5

Detenida la reacción antes de mezclar los constituyentes (tiempo 0).

Sistema enzimático total. Se han hecho varios ensayos a lo largo del año con distintos resultados: durante los meses de agosto-diciembre la presencia de AA y GSH estimulan la respiración e incluso llegan a hacerse imprescindibles; en los meses de enero-julio ambas sustancias, sobre todo el GSH, son más bien inhibidores de la respiración. De

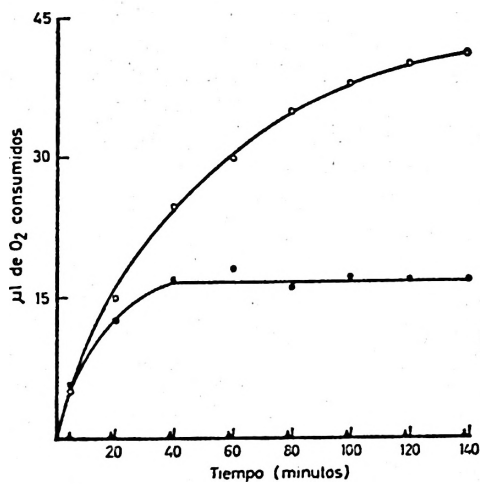


FIG. 2. Sistema enzimático total:

- Sistema completo: 1-malato (50 μ moles), Cl₂Mn (2,5 μ moles, NADP (0,25 μ moles), AA (1 μ mol), GSH (1 μ mol) y extracto (2 mols). Volumen total: 2,5 ml.
- Sin 1-malato.
- ▲—▲ Sin GSH ni AA.

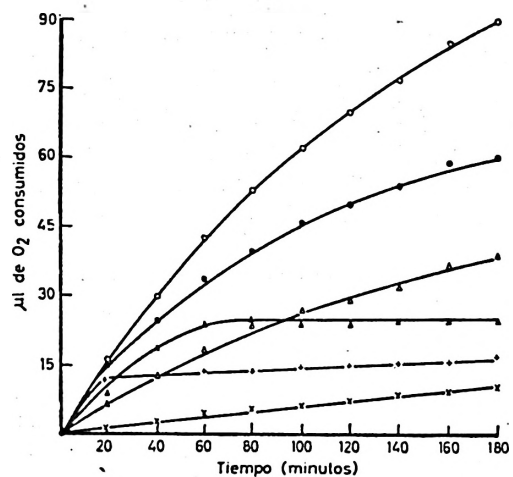


FIG. 3. Sistema enzimático total:

- Sistema completo: 1-malato (50 μ moles), Cl₂Mn (2,5 μ moles, NADP (0,25 μ moles), AA (1 μ mol), GSH (1 μ mol) y extracto (2 mols). Volumen total: 2,5 ml.
- Sin GSH.
- △—△ Sin AA.
- ▲—▲ Sin 1-malato.
- +—+ Sin NAD ni Cl₂Mn.
- x—x Con extracto hervido.

uno a otro caso se observa una transición gradual, de forma que durante algún tiempo no se observa estímulo o inhibición claros de la respiración por GSH y AA.

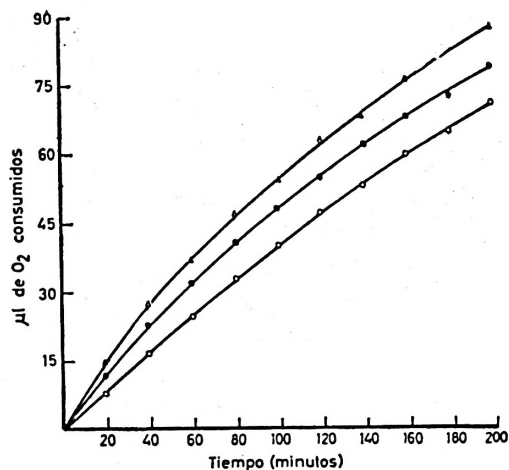


FIG. 4. Sistema enzimático total :

- Sistema completo : l-malato (50 μ moles), Cl_2Mn (2,5 μ moles), NADP (0,25 μ moles), AA (1 μ mol), GSH (1 μ mol) y extracto (2 mols). Volumen total : 2,5 ml.
- Sin AA.
- △—△ Sin GSH.

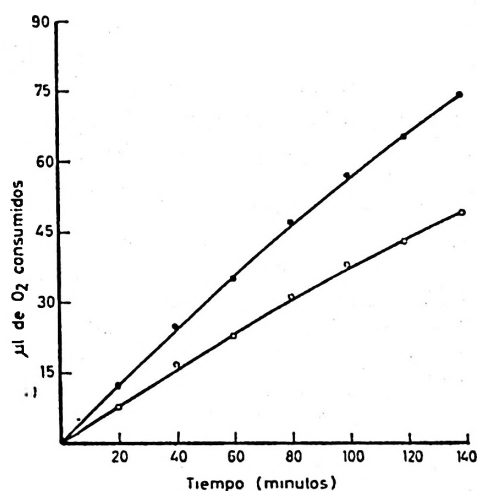


FIG. 5. Sistema enzimático total :

- Sistema completo : l-malato (50 μ moles), Cl_2Mn (2,5 μ moles), NADP (0,25 μ moles), AA (1 μ mol), GSH (1 μ mol) y extracto (2 μ moles). Volumen total : 2,5 ml.
- Sin GSH o sin AA.

Las figuras 2, 3, 4 y 5 expresan los distintos casos observados.

Es, pues, evidente que en algunas épocas del ciclo vegetativo anual el sistema en estudio puede actuar. Decidir si actúa realmente, o no, implicaría una comprobación *in vivo*, para lo cual no se dispone por ahora de técnicas adecuadas, pero cabe argüir que, siendo los enzimas glutatión reductasa, ADH reductasa y AA oxidasa solubles es probable que se hallen localizados en el fluido citoplasmático, en cuyo caso el sistema tiene bastantes probabilidades de actuar *in vivo*.

Resumen

En limones jóvenes se han encontrado los enzimas necesarios para un transporte de electrones desde sustratos hasta oxígeno a través de NADP, glutatión y ácido ascórbico. Tal sistema enzimático puede funcionar acoplado aunque en grado diferente, según la época del año, en extractos dializados de frutos.

Summary

The participation of ascorbic acid in the respiration of the lemon

The enzyme ascorbic acid : O_2 oxydo-reductase is present in large amounts in young lemons. The existence of an electron transport system from malic acid to oxygen, mediated by NADP, glutatión and ascorbic acid is studied. Essays in Thumberg tubes show that malic acid is oxydized by glutatión and catalytic amounts of NADP. Manometric methods show that glutatión can be enzymically oxydized by oxygen and catalytic amounts of ascorbic acid. Seasonal variations are found for the operation of the total system.

Bibliografía

- (1) GODDARD, D. R. y BONNER, W. D. : Plant Physiology, Vol. 1 A, pág. 209. Editado por F. C. Steward. New York. Academic Press, New York and London. 1960.

- (2) HUGHES, R. E. : *Biochem. J.*, **64**, 203-8, 1956.
- (3) MAPSON, L. W. : *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **9**, 119-50, 1958.
- (4) MAPSON, L. W. and MOUSTAFA, E. M. : *Biochem. J.*, **62**, 218-59, 1956.
- (5) MARRÉ, E. y LAUDI, G. : *Atti Accad. Nazl. Lincei, Rend.*, Classe sci. fis., mat. e nat., **16**, 649, 1954.
- (6) RUBIN, B. A., ARTSIKHOVSKAYA, E. V., SOKOLOVA, V. E. e IVANOVA, T. M. : *Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.*, **85**, 1123-6, 1952.
- (7) SABATER, F. ; Tesis Doctoral, pág. 52. Publicaciones de la Universidad de Murcia, 1962.
- (8) YOUNG, L. C. T. y CONN, E. E. : *Plant Physiol.*, **31**, 275-11, 1956.