

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto español de Fisiología y Bioquímica
Sección de Fisiología General de Valencia

Sobre la desaminación peroxidásica de los aminoácidos

por M. Solsona y M. Mora

(Recibido para publicar el día 6 de octubre de 1949)

Conocida es la gran importancia biológica que tiene la desaminación de los aminoácidos, por lo fundamental que resulta este proceso en los fenómenos vitales. En química se dispone de diversos procedimientos, mediante los cuales, se consigue la separación de amoníaco de los antedichos ácidos aminados, y así: Dakin (1), consigue la desaminación mediante la acción del agua oxigenada en presencia de sales de hierro como agente catalítico. Aubel y Asselineau (2) lo logran por la acción del hipoclorito de sodio, reacción que en algunos casos la aprovechan para la determinación cuantitativa de algunos de ellos. Como productos finales obtienen estos últimos, anhídrido carbónico, cloruro sódico, amoníaco y un aldehído de un átomo de carbono menos.

En Química Biológica, sería interesante conseguir la desaminación mediante la peroxidasa hemoglobínica. Por ello, se ha creído conveniente estudiar la acción de disoluciones de hemoglobina, sobre otras de diferentes aminoácidos en agua oxigenada de concentración variable; operación que dadas las condiciones experimentales, se tiene que efectuar en medio, por lo menos, ligeramente ácido, en vez de a un pH 7'4, que sería el más indicado. Se estudia también si el agua oxigenada, a elevada temperatura y fuerte concentración, es capaz por sí sola de separar amoníaco.

Son objeto de estudio; la glicocola, alanina, leucina, asparagina, tirosina y los ácidos aspártico y glutámico.

Métodos

Tratamiento sólo con H_2O_2 .

Se preparan disoluciones 0,01 M de los diferentes aminoácidos (en el caso de la asparagina 0,005 M), en 10 c.c. de sulfúrico N y agua oxigenada de 50 volúmenes hasta 100 c.c. Se toman porciones de 25 c.c. y se calientan al baño maría hirviendo durante 0, 5, 15, 30 y 45 minutos, se enfrían y se procede a la destilación alcalinizando las disoluciones. Para ello se dispone de un aparato semejante al que usa Kjeldahl para la destilación en la determinación del nitrógeno, y se sigue la misma técnica. En el recipiente receptor se colocan 25 c.c. de sulfúrico 0,01 N. Para valoración de este sulfúrico, se emplea NaOH 0,01 N.

Tratamiento con H_2O_2 y hemoglobina.

Con concentración de H_2O_2 de 3 por 100. Se preparan disoluciones 0,01 M de los diferentes aminoácidos (en el caso de asparagina 0,005 M), en 1 c.c. de sulfúrico N, 10 c.c. de acetato sódico 0,1 N, 10 c.c. de ácido acético 0,1 N. 50 c.c. de H_2O_2 de 40 volúmenes, y agua destilada hasta 100 c.c. A estos 100 c.c. se le añaden otros 100 de una disolución de hemoglobina, preparada, disolviendo un c.c. de sangre en 1000 centímetros cúbicos de agua. Esta mezcla se mantiene en la estufa a 35° durante 24 horas. Se desproteíniza con 10 c.c. de tricloroacético al 10 por 100. Se toman 52'5 c.c. del líquido desproteínizado, y se procede como en el caso anterior.

Con concentración de H_2O_2 de 1'5 por 100. Se procede como en el caso anterior, salvo en la preparación de la disolución del aminoácido, en que, en vez de colocar 50 c.c. de H_2O_2 , se ponen 25.

En todos los casos, se efectúan los correspondientes ensayos en blanco, operando en las mismas condiciones y análogas soluciones, pero omitiendo en éstas, el aminoácido.

Resultados

Se recogen en los dos cuadros que se acompañan. El primero corresponde sólo al tratamiento con el H_2O_2 ; el segundo, a los tratamientos con el agua oxigenada y hemoglobina. En ellos se indican el número de c.c. de NaOH 0,01 N gastados en la valoración del sulfúrico 0,01 N que no queda neutrali-

zado en la destilación que se hace para la dosificación del amoníaco.

El amoníaco liberado se podrá deducir fácilmente, restando de los 25 c.c. de sulfúrico 0,01 N el número de c.c. de NaOH 0,01 N gastados; de la diferencia habrá de deducirse el valor correspondiente al ensayo en blanco.

Únicamente, en el caso de la asparagina, se consigue liberación de amoníaco; que debe corresponder al grupo amido, por la labilidad de esta función, ya que no se obtiene resultado positivo con el ácido aspártico.

En la experiencia II, se pone de manifiesto que la separación de NH_3 en la asparagina, se produce sin necesidad de la presencia de la peroxidasa hemoglobínica, preparando disoluciones de este aminoácido en H_2O_2 de idéntica manera, y añadiendo 100 c.c. de agua en vez de los 100 de la disolución de hemoglobina. Procediendo análogamente a la destilación, se obtiene la misma liberación de NH_3 . Se observa, que la concentración en H_2O_2 es proporcional al amoníaco desprendido. La alcalinidad reinante en el proceso de destilación, ella por sí sola, solamente produce un desprendimiento de NH_3 equivalente 1'5 centímetro cúbico de sulfúrico 0,01 N, como se demuestra, preparando una disolución de asparagina en 2 c.c. de sulfúrico N y agua destilada hasta 100 c.c., tomando 25 c.c. de esta disolución y destilando con la misma técnica.

En el tratamiento sólo con H_2O_2 , parte del proceso de separación de NH_3 , se produce durante la calefacción a 100° en medio ácido y fuertemente oxidante, el resto durante el proceso de destilación en medio alcalino.

Los valores que se dan, son medias aritméticas de cuatro resultados próximos.

I

Aminoácidos	c.c. de NaOH 0,01 N				
	0m.	5m.	15m.	30m.	45m.
Glicocola	21'3	21'2	21	21'1	20'6
Alanina	20'4	20'	20'6	20'4	20'1
Leucina	21'4	21	21'1	21'5	20'2
A. glutámico	20'4	21'1	20'7	20'2	20
A. aspártico	21'3	20'9	21	20'7	20'2
Tirosina	21'6	20'9	20'7	20'8	21
Asparagina	14	12'1	12	10'9	10'8
Ensayo en blanco		20'8			

II

Aminoácidos	c.c. de NaOH 0,01 N	
	Conc. H_2O_2 3%	Conc. H_2O_2 1'5%
Glicocola	24	24'6
Alanina	24'1	24'8
Leucina	24'5	25
Ácido glutámico	24'3	24'2
Ácido aspártico	24'6	24'8
Tirosina	24'4	25
Asparagina	20'3	22
Ensayo en blanco	24'3	24'6

Resumen

Se estudia la posible acción catalizadora de la peroxidasa hemoglobínica, en la desaminación de aminoácidos por la acción del agua oxigenada. Para ello, se mezclan disoluciones de diferentes aminoácidos en H_2O_2 , medio ligeramente ácido, con otras de hemoglobina; manteniéndolas en contacto durante 24 horas y a 35° . Procediéndose a la determinación del amoníaco, no se obtienen resultados positivos en los aminoácidos estudiados, glicocola, alanina, leucina, tirosina, ácidos glutamínico y aspártico, y asparagina. En esta última, se separa NH_3 , que debe corresponder al grupo amido, sin concurso de catalizador.

Previamente se comprueba, que el H_2O_2 de fuerte concentración y a 100° , no produce desaminación en los aminoácidos citados. También, como en el caso anterior; la asparagina cede amoníaco, que debe corresponder al grupo amido.

Summary

The authors make a study of the possible catalyzing action of haemoglobinic peroxydase in the deamination of aminoacids through the action of hydrogen peroxide. For this purpose solutions of different aminoacids in H_2O_2 a slightly acid medium, are mixed with others of haemoglobine and kept in contact for 24 hours at 35° . On proceeding to the determination of ammonium no positive results were obtained in the aminoacids under observation: glyocol, alanin, leucin, thyrosin, glutaminic and aspartic acids and asparagin. In the last named NH_3 is separated, which must correspond to the amide group without any catalyzer assistance.

Previously it is ascertained that the H_2O_2 in a strong concentration and at 100° does not produce deamination in the aminoacids mentioned. As in the former instance, asparagin liberates ammonium, which must correspond to the amide group.

Bibliografía

- (1) DAKIN. — *J. Biol. Chem.*, 1, 171 (1905/06); 4, 63 (1908).
- (2) AUBEL y ASSELINEAU.—*Biochem. Biophys. Acta*, 2, 198 (1948).

