

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Delta-aminolevulinato sintetasa delta-aminolevulinato
dehidrasa y porfirinas en semillas de pinus pinea
germinantes**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Mercedes Méndez Marco

Madrid, 2015

Mercedes Mendez Marco

TP
1980
009



* 5 3 0 9 8 5 2 7 3 7 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-12 6492-X

DELTA-AMINOLEVULINATO SINTETASA DELTA-AMINOLEVULINATO
DEHIDRASA Y PORFIRINAS EN SEMILLAS DE PINUS PINEA GER
MINANTE.

Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
1979



BIBLIOTECA

FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, CENTRO COORDINADO DEL C.S.I. C.

Excmo. Sr. Manuel SANZ MUÑOZ
Sr. Angel SANTOS RUIZ
Sr. Luis RECALDE MARTINEZ
Sr. A. CABEZAS FERNANDEZ DE
CANTO
Sr. Juan BARCELÓ COLL
Sr. Manuel SANZ MUÑOZ

" DELTA - AMINOLEVULINATO SIMETASA, DELTA - AMINOLEVULINATO
DEHIDRASA Y PORFIRINAS EN SEMILLAS DE PINUS PINEA GERMINANTES" ..

MADRID, Marzo 1979.

MEMORIA presentada por la Licenciada
MARIA MERCEDES MENDEZ MARCO para as-
pirar al grado de Doctor en Farmacia.

A HIS PADRES.

Las investigaciones efectuadas en esta Tesis Doctoral han sido planeadas y dirigidas por el Dr. Don Manuel Sanz Muñoz, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y realizadas íntegramente en la Sección de Fitobioquímica del Departamento de Bioquímica, Centro Coordinado del C.S.I.C. (Facultad de Farmacia de Madrid), durante los cursos 1976-77, 1977-78 y 1978-79.

El agradecimiento al Profesor SANTOS RUIZ por su amable acogida en el Departamento y por haberme dado toda clase de facilidades para la realización de esta Tesis Doctoral.

Quiero expresar también mi sincero agradecimiento al Dr. Sanz Muñoz, bajo cuya dirección ha sido realizado este trabajo, por la orientación, ayuda y estímulo prestados en todo momento.

Igualmente hago extensiva mi gratitud a la Dra. Pilar González González por los consejos dados y a mis compañeros del Departamento por el ánimo y la amistad que me han ofrecido, así como a todo el personal del mismo.

Parte de los resultados que aquí se exponen han sido presentados al XXVII Congreso International Des Sciences Physiologiques (Paris, Julio, 1977); a la XVII Reunión de la Sociedad Española de Bioquímica (Madrid, Octubre, 1978) y al XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (Bilbao, Diciembre, 1978).

ABREVIATURAS.

- A = Acetilo.
ADP = Adenosin 5'-difosfato.
ATP = Adenosin 5'-trifosfato.
C.C.D. = Cromatografía en capa delgada.
Co A = Coenzima A.
d = Dias.
d-ALA = Acido delta aminolevulínico.
d-ALA dehidrasa = Acido delta aminolevulínico dehidrasa.
d-ALA sintetasa = Acido delta aminolevulínico sintetasa.
DEAE celulosa = Dietilaminoetil celulosa.
DVA = Acido 4-5 dioxivalérico.
EDTA = Acido etilen diamino tetracético.
d-KG = d-cetoglutarato.
M = Metilo.
P = Propilo.
PBG = Porfobilinógeno.
V = Vinilo.

I N D I C E

	<u>Pág.</u>
1.- INTRODUCCION.	1
2.- PARTE TEORICA (Biosíntesis de porfirinas).	2
2.1.- Primer paso intermediario.	2
2.2.- Segundo paso intermediario.	5
2.3.- Tercer paso intermediario.	6
2.4.- Cuarto paso intermediario.	8
2.5.- Quinto paso intermediario.	8
2.6.- Sexto paso intermediario.	9
2.7.- d-ALA sintetasa.	9
2.8.- d-ALA deshidrasa.	13
2.9.- Porphirinas.	14
3.- OBJETO DEL TRABAJO.	19
3.1.- Metodología en la literatura.	20
4.- PARTE EXPERIMENTAL.	25
4.1.- MATERIAL Y METODOS.	25
4.1.1.- d-ALA sintetasa.	25
4.1.1.1.-Purificación de la enzima.	25 bis
4.1.1.1.1.-Extracción.	25 "
4.1.1.1.1.1.-Primer paso.Extracto bruto.	26
4.1.1.1.1.2.-Segundo paso.Precipitación acetónica.	26
4.1.1.1.1.3.-Tercer paso. Precipitación con sulfato amónico.	27
4.1.1.2.-Determinación de proteínas.	28

	<u>Pág.</u>
4.1.1.3.- Incubación y determinación enzimática.	28
4.1.1.4.- Km. Su determinación.	35
4.1.1.5.- pH óptimo de la actividad enzimática.	37
4.1.1.6.- Temperatura óptima de la actividad enzimática.	37
4.1.1.7.- Relación lineal entre proteínas y formación de d-ALA.	37
4.1.1.8.- Influencia de activadores e inhibidores sobre la actividad enzimática.	38
4.1.2.- d-ALA dehidrasa y detección de la actividad enzimática.	41
4.1.2.1.- Purificación de la enzima.	41
4.1.2.1.1.- Extracción.	42
4.1.2.1.1.1.-Primer paso.Extracto bruto.	43
4.1.2.1.1.2.-Segundo paso.Precipitación acetónica.	43
4.1.2.1.1.3.-Tercer paso.Precipitación con sulfato amónico.	44
4.1.2.1.1.4.-Cuarto paso.Eluato de DEAE celulosa.	44
4.1.2.2.- Determinación de proteínas.	46
4.1.2.3.- Incubación y determinación enzimática.	46
4.1.2.4.- Km. Su determinación.	48
4.1.2.5.- pH óptimo de la actividad enzimática.	50
4.1.2.6.- Influencia de inhibidores sobre la actividad enzimática.	51
4.1.3.- Porfirinas.	60
4.1.3.1.- Porfirinas patrones.	60

	<u>Pág.</u>
4.1.3.1.1.--Separación cromatográfica en capa delgada.	60
4.1.3.1.2.--Límites de sensibilidad de fluo- rescencia y curvas de absorción.	63
4.1.3.2.--Reconocimiento previo de porfirinas en pi- ñones.	68
4.1.3.2.1.--Determinación espectral de las porfirinas.	72
4.1.3.3.--Tratamiento previo de los piñones.	72
4.1.3.4.--Porfirinas libres en piñones.	75
4.1.3.4.1.--Extracción.	75
4.1.3.4.2.--Identificación espectral.	76
4.1.3.4.3.--C.C.D.	76
4.1.3.5.--Determinación de porfirinas seminales al estado de esteres.	78
4.1.3.5.1.--Preparación de los esteres y y extracción.	79
4.1.3.5.2.--Identificación por espectrofo- tometría.	80
4.1.3.5.3.-- C.C.D.	81
4.2.- RESULTADOS.	83
4.2.1.- d-ALA sintetasa.	83
4.2.1.1.--Preparación y purificación.	83
4.2.1.2.--Determinaciones en piñones en diferentes estadios de germinación: actividad enzimá- tica, proteínas, actividad enzimática espe- cífica, constante de Michaelis, pH óptimo, temperatura óptima y activadores e inhi- bidores de la actividad enzimática.	85

	<u>Pág.</u>
4.2.2.-d-ALA dehidrasa.	115
4.2.2.1.-Preparación y purificación.	115
4.2.2.2.-Determinaciones en piñones en diferentes es- tadios de germinación: actividad enzimática, proteínas, actividad enzimática específica, constante de Michaelis, pH óptimo e inhibi- dores de la acción enzimática.	117
4.2.3.-Porfirinas.	150
4.2.3.1.-Determinaciones previas.	150
4.2.3.2.-Resultados cualitativos.	156
4.2.3.2.1.-Cromatograma con fluorescencia roja.	156
4.2.3.2.2.-Máximos de absorción(bandas de Soret)	168
4.2.3.3.-Resultados cuantitativos.	172
4.2.3.3.1.-Porfirinas en piñones cerrados.	172
4.2.3.3.2.-Porfirinas en piñones abiertos.	179
4.2.3.3.3.-Porfirinas en piñones germinados.	188
5.- DISCUSION.	193
6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES.	203
7.- BIBLIOGRAFIA.	206

1. INTRODUCTION.

1.- INTRODUCCION.

=====

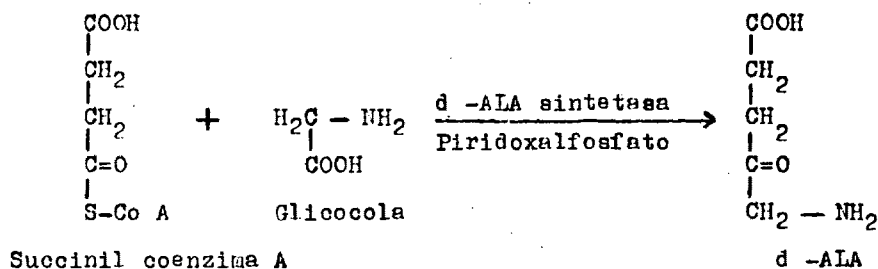
En la sección de Fitobioquímica del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense hubo la oportunidad de comprobar que en la semilla de *Pinus pinea* como en otras coníferas durante el proceso de la germinación se biosintetiza clorofila; esto fué el motivo de investigar qué clorofilas se podían sintetizar durante su curso y qué niveles cuantitativos podrían seguir durante el mismo.

Las conclusiones de estas investigaciones fueron demostrar que en semillas estratificadas sobre vermiculita humedecida con agua en capas alternantes y sometidas a 4 °C., durante ciertos periodos de tiempo no se forma clorofila; solamente con una estratificación de tres meses parecía iniciarse ténuamente. Pero cuando esta semilla, previamente estratificada, se ponía a germinar en cámara de Jacobsen a 29° C se iniciaba la biogénesis de clorofilas a y b en cantidades sumamente pequeñas pero significativas, expresadas en el orden de $\mu\text{g/g}$ referido a peso seco de plántula, para después y a medida que progresa la germinación aumentar los niveles de clorofilas a y b a mg/g de peso seco según los estadios de desarrollo de la plántula y tomando como referencia la longitud de la radícula. Estas investigaciones fueron objeto de una Tesina presentada en la Facultad de Farmacia (Madrid) durante el año de 1975, una comunicación con el título de "Chlorophyll in *Pinus pinea* Germinating Seeds" a las XII Journées Biochimiques Latines celebradas en Burdeos del 31 de Mayo al 3 de Junio de 1976 y otra en la Real Academia de Farmacia en la sesión científica del 2 de Noviembre de 1978.

2.- PARTE TEORICA.

ma A y la glicocola activada, tiene que estar presente el enzima de condensación d-ALA sintetasa. La reacción, por otra parte, se favorece con la presencia de Mg^{++} en forma de Cl_2Mg y de otras sustancias tales como el ATP y ADP, según Kikuchi y col. (1958), que hicieron experimentos con extractos de *Rhodospseudomonas spheroides* y *Rhodospirillum rubrum*.

La reacción transcurre así:



Esta condensación se verifica solo en bacterias fotosintéticas como *Rhodospseudomonas spheroides* y en planta inferiores como *Chlorella vulgaris*. El ácido α -amino β -ceto adípico que es el producto de condensación de succinil coenzima A y glicocola activada no se ha podido detectar durante la formación de d-ALA. Sin embargo Laver y col. (1958) indican que a pH 7 en solución acuosa se produce espontáneamente su descarboxilación muy rápidamente a d-ALA. Según dichos autores el ácido α -amino β -ceto adípico tiene una vida media de un minuto.

Como confirmación de la necesidad de piridoxalfosfato para la activación de la glicocola y por ende de la biosíntesis del d-ALA se han estudiado inhibidores de la misma. El aminomalonato o la l-cisteina o las cianidas y la penicilamina inhiben la reacción

porque son susceptibles de formar complejos con el grupo aldehídico del piridoxalfosfato é impedir, por consiguiente, la combinación de éste con la glicocola para su activación.

Otras rutas metabólicas para la biogénesis del d-ALA parecen haberse vislumbrado en plantas superiores; así es la que sugiere la incorporación de un esqueleto intacto de cinco átomos de carbono del ácido glutámico en d-ALA. Beal y col. (1975) mantienen este criterio y llegan a esta conclusión confirmándolo, porque por alimentación específica con glutámico C^{14} de brotes de cebada etiolada en-verdecidos a la luz en presencia de ácido levulínico (que es el inhibidor competitivo de la d-ALA dehidrasa ó porfobilinógeno sintetasa) se acumula d-ALA.

Ya anteriormente Beal y Castelfranco (1974) en experimentos efectuados con cotiledones de pepino (*Cucumis sativus* L. var. Alpha verde), hojas de cebada (*Hordeum sativum* var. Numar) y hojas de alubia (*Phaseolus vulgaris* L. var. Redliney) en presencia de precursores sellados con C^{14} (ácido levulínico) inhibidor de la d-ALA dehidrasa y midiendo la radioactividad del d-ALA llegaron a la conclusión de que compuestos dicarboxílicos de 5 átomos de carbono, como glutamato, glutamina y d-oxoglutarico eran los mas efectivos. En cambio, la glicocola con C^{14} y succinato fueron relativamente pobres en la incorporación.

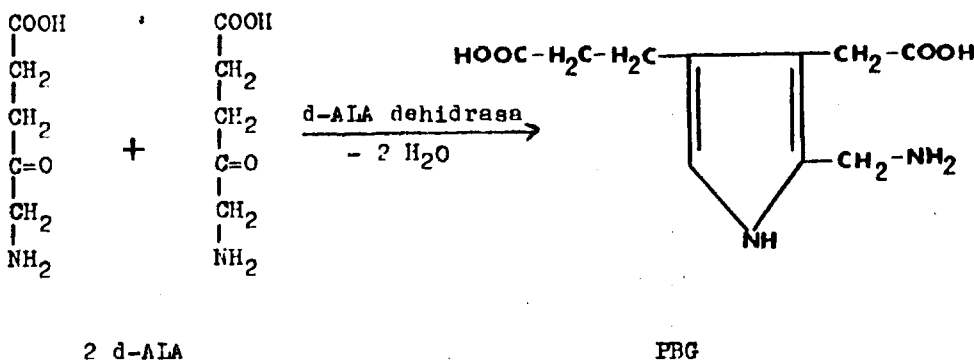
La integración de una molécula intacta de 5 átomos de carbono al d-ALA ha sido también evidenciada por Meller y col. (1975) en algunas plantas superiores, como en las hojas de pepino, haba, cebada, avena é incluso maiz.

Por último se ha sugerido otra vía metabólica de la biogénesis de d-ALA, según la cual un precursor de 5 átomos de carbono se convierte en d-ALA sin rotura de carbono - carbono. Tait (1968) postulaba que un aldehído análogo al d-ALA, el DVA participaba en la biosíntesis. Por ello es interesante que Lohr y Friedman (1976) presenten la primera demostración de una enzima parcialmente purificada obtenida a partir de extractos de hojas de Zea mays que reduce el α -KG a DVA utilizando NADH como reductante. En tal extracto hay presente una transaminasa que cataliza la conversión de DVA a d-AL.

2.2.- Segundo paso intermediario.

El segundo paso intermediario es el que conduce a la formación del PBG a partir de d-ALA. Después de que el PBG se obtuvo en forma cristalina en 1952 se demostró que las preparaciones de células de Chlorella desintegradas y de eritrocitos aviares según Bogorad y Granick (1953) podían sintetizar gran número de porfirinas, incluso protoporfirina cuando se suministraba PBG como sustrato. Por otra parte, una vez establecido el papel del d-ALA se aclaraba que el PBG se podría formar por condensación de dos moles de d-ALA. La enzima d-ALA dehidrasa ó d-ALA dehidratasa cataliza la condensación de dos moles de d-ALA para formar uno de PBG con desprendimiento de dos de agua. Granick (1954, 1959 y 1961) ha demostrado con extracto de Chlorella y de espinacas que el d-ALA se convierte en PBG. Igualmente Shemin y Russell señalan que el d-ALA puede reemplazar a los dos sustratos, succinato activo y glicocola, para la síntesis de clorofilas.

La reacción de condensación transcurre así:



2.3.- Tercer paso intermediario.

El tercer paso intermediario conduce a la formación de uroporfirinógeno I y uroporfirinógeno III a partir de PBG.

Por unión de dos moles de PBG con separación de un mol de NH_3 se forma una estructura dipirrólica. El dipirrol uniéndose con otro mol de PBG y separación de NH_3 forma otra estructura tripirrólica, la cual condensándose con otro mol de PBG y nueva separación de NH_3 da lugar a una estructura tetrapirrólica. Estas condensaciones se efectúan en presencia de urogen I sintetasa; si la acción de esta enzima se verifica exclusivamente, entonces la estructura tetrapirrólica se cicla y forma uroporfirinógeno I, pero si sobre la estructura tetrapirrólica actúa además de la urogen I sintetasa la urogen III cosintetasa, entonces se efectúa en el anillo pirrólico IV una transposición de los radicales acetilo y propilo y se forma el uroporfirinógeno III que es la forma natural.

2.4.- Cuarto paso intermediario.

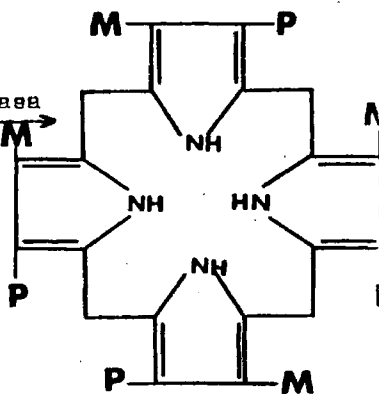
Por la acción de la urogen descarboxilasa los restos acéticos del uroporfirinógeno III se descarboxilan y pasan a grupo metilos formándose así el coproporfirinógeno III.

De la misma manera se origina el coproporfirinógeno I a partir del uroporfirinógeno I.

Uroporfirinógeno III

Urogen descarboxilasa

- CO₂
- CO₂
- CO₂
- CO₂



Coproporfirinógeno III

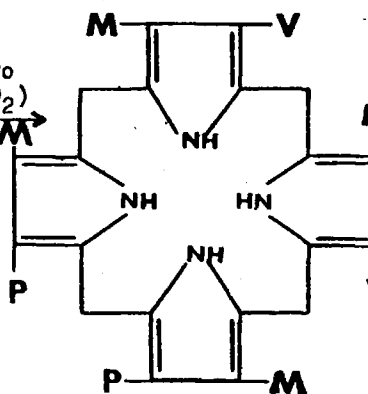
2.5.- Quinto paso intermediario.

El coproporfirinógeno III mediante la acción de la coprogenoxidativo descarboxilasa que simultáneamente ejerce un efecto descarboxilante y oxidante sobre los restos propiónicos para transformarlos en grupos vinilos -CH=CH₂ con desprendimiento de dos moles de carbónico y oxidación de 4 H, se origina el protoporfirinógeno IX.

Coproporfirinógeno III

Coprogen oxidativo
descarboxilasa (O₂)

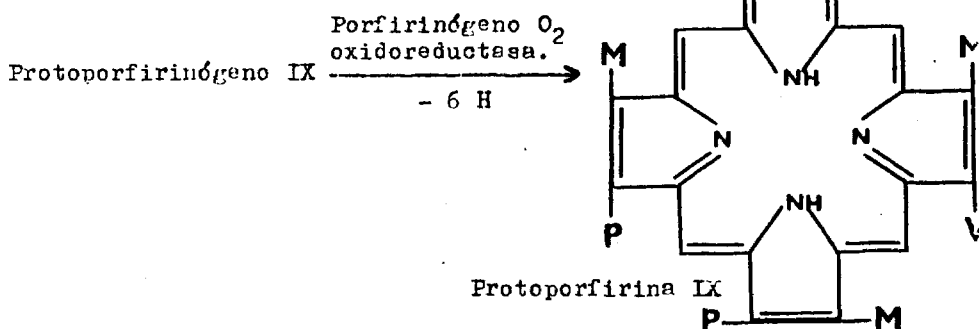
- 2 CO₂
- 4 H



PROTOPORFIRINOGENO IX

2.6.- Sexto paso intermediario,

El protoporfirinógeno IX en reacción aerobia catalizada por la porfirinógeno O₂ oxidoreductasa mitocondrial, pierde 6 H y se transforma en protoporfirina IX.



En esta parte teórica nos hemos limitado a realizar una descripción somera y concreta de los diferentes pasos intermediarios que existen desde la biogénesis de d-ALA hasta la formación de protoporfirina IX, sin hacer incapié en los distintos pasos entre porfirinas y clorofilas, porque en realidad solo las enzimas d-ALA sintetasa y d-ALA dehidrasa y el estudio de las porfirinas existentes en la semilla de Pinus pinea en diferentes estadios de germinación son los objetivos de esta Tesis Doctoral. Por ello vamos a tratar de ver las funciones, las características e investigaciones que se han efectuado sobre dichas enzimas y las porfirinas detectadas en la biosíntesis de la clorofila.

2.7.- d-ALA sintetasa.

La enzima d-ALA sintetasa denominada también succinil Co A glicocola - C - succinil transferasa (descarboxilante) (cuya función es provocar la condensación de succinato activado por el

coenzima A ó succinilcoenzima A con glicocola activada por piridoxalfofato) se ha obtenido en preparaciones bastante puras a partir de extractos de bacterias fotosintéticas como se desprende de los trabajos de Kikuchi, Kumar, Culmage y Shemin (1958) y Rhodospseudomonas spheroides, habiéndose logrado una purificación de 80 veces, y con ello demostrado la presencia de d-ALA en algas y bacterias fotosintéticas. Miller y Teng (1967) realizaron la purificación de la d-ALA sintetasa en plantas superiores (espinacas) y estudiaron su cinética encontrando que el Fe^{++} estimula su actividad un 150 % y que el piridoxalfofato y el Mg eran esenciales para su máxima actividad. También Twarnick, Russell y Bruce (1971) estudiaron la purificación y caracterización de la d-ALA sintetasa en relación con la regulación de la síntesis porfirínica. Ya Deal en 1971 en investigaciones sobre la regulación de la síntesis de la clorofila en algas Chlorella por medio de la formación y del metabolismo del d-ALA, no pudo detectar la presencia de d-ALA sintetasa en preparaciones con células rotas, aunque comprobó que suministrando d-ALA exógenamente en presencia de dimetilsulfóxido se formaba el correspondiente PBG.

No obstante la presencia de d-ALA sintetasa en plantas superiores ha sido objeto de referencias contradictorias, por ejemplo Miller y Teng (1967) hicieron referencia del enzima en hojas de espinacas pero no fué suficientemente detallada para admitir credibilidad de la evaluación de los métodos y resultados. Por otra parte Xifra, Battle y Tigier (1971) mencionan la reacción succiniltransferasa en extractos de tejidos de habas de soja no enverdecidas y de células cultivadas de soja; sin embargo esta enzima no se

especifica con respecto al sustrato y requerimientos de cofactores.

Ramaswamy y Madhusudanan Nair (1973) en un sugestivo trabajo sobre la d-ALA sintetasa contenida en la piel de patatas verdes almacenadas en frío, estudia su actividad enzimática, su preparación, purificación y su contenido a lo largo del almacenamiento entre otras investigaciones. No obstante la reacción enzimática se puede verificar con una enzima muy purificada en ausencia de cofactores tales como Co A, ATP, Mg y piridoxalfosfato, todos los cuales son necesarios para el sistema transferasa de otras fuentes. No se descarta la posibilidad de que la acción enzimática en la piel de la patata pudiese ser debida a microorganismos. Otra razón mas que aboga en pro de aceptar todavía con precauciones la existencia de d-ALAsintetasa en tejidos de plantas superiores.

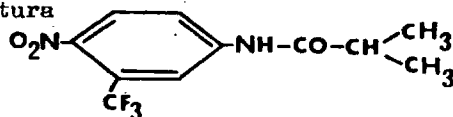
Schneider Hansjoerg (1973) estudia la acumulación de d-ALA por la actividad d-ALA sintetásica en cultivos de tejidos de tabaco.

En apoyo de la existencia de la d-ALA sintetasa se manifiesta Wellburn (1975) porque en ensayos verificados con Avena laminae, halla que el citrato marcado con C¹⁴ en los átomos de carbono 1 y 5 se incorpora a la clorofila pasando por d-ALA.

Por otra parte Sanders y col. (1975) han estudiado los cambios enzimáticos en mutantes de levaduras deficientes de citocromos que requieren d-ALA y hallan que mientras la actividad de la d-ALA sintetasa en homogenatos de células de oyo - 4 era al menos tan alta como en extractos de levadura normal. Así pues el gene cyd - 1 parece controlar la estructura ó biosíntesis de la d-ALA sintetasa, mientras que el gene oyo - 4 puede regular la expresión de la actividad sintetasa ó puede controlar una enzima subsiguiente en el paso de la biosíntesis porfirínica.

En la referida Tesina presentada por M^{re} Mercedes Méndez Marco "Identificación del d-aminolevulinato en semillas de Pinus pinea en germinación" se pone de manifiesto la formación de d-ALA en diferentes estadios de germinación, la biogénesis de éste se inicia en piñones estratificados y en piñones que después de estratificar se ponen a germinar (aunque sin germinar, es decir cerrados). Esto parece afirmar que el mecanismo de biogénesis del d-ALA no se inicia hasta que la semilla se encuentra en condiciones de temperatura, que permite comenzar la biosíntesis de clorofila. Después de una serie de tratamientos que se realizaron con las semillas, especialmente en el llevado a cabo con ácido levulínico (que posee una acción competitiva con la d-ALA dehidrasa y permite acumular d-ALA por no transformarse éste por la acción de aquella enzima en PBG) se demuestra la biogénesis de d-ALA. Esto hacía pensar en la posibilidad de la existencia de d-ALA sintetasa, aunque en ese trabajo no se abordase tal problema.

Por último vamos a pasar una breve revista a los principales trabajos en que se han realizado experimentos ó estudios con la d-ALA sintetasa: Kikuchi (1976) ha estudiado la translocación intracelular de la d-ALA sintetasa en el hígado; Edwards y Elliot (1975) la inducción por los esteroides de esta enzima en células de hígado de ratas aisladas; Gidari, Lans y Levere (1976) estudiando inductores de la d-ALA sintetasa encontraron que la flutamida compuesto no esteroídico de estructura



es un inductor de la enzima incrementando su actividad 24 veces a

concentración de 1 μM y 62 veces a concentración de 50 μM en pasos de biosíntesis del hemo en experimentos realizados en células cultivadas de hígado de embriones de pollo; de sus estudios se desprende por otro lado que la inducción in vitro de la d-ALA sintetasa en porfirias químicas como respuesta a ciertas hormonas sexuales y productos químicos ha sido investigada por Granick (1966).

2.8.- d-ALA dehidrasa.

Denominada también d-ALA deshidratasa ó porfobilinógeno sintetasa, porque ya se refirió anteriormente que es susceptible de dar por su presencia un mol de PBG a partir de 2 moles de d-ALA con desprendimiento de otras dos moléculas de agua.

Después que el PBG se obtuvo en forma cristalina en 1952 se demostró que las preparaciones de células de *Chlorella* desintegrada y de eritrocitos aviares según Bogorad y Granick (1953), podían sintetizar gran número de porfirinas, incluso protoporfirina cuando se suministraba como sustrato PBG. Por otra parte una vez establecido el papel del d-ALA que aclaraba que el PBG se podría formar por condensación de dos moles de d-ALA siendo la responsable de esta reacción la d-ALA dehidrasa. En esta época no se había purificado a partir de plantas pero se había demostrado su presencia en numerosas especies. El d-ALA se convierte en PBG por extractos de *Chlorella* y de espinacas según Granick (1954). En la ceca etiología como indica Granick (1959 y 1961) se acumula la protochlorofilida ó como señalan Sisler y Klein (1963) y Gibson y col. (1955) cuando se les administra d-ALA.

Por esta época sólo se había logrado preparar muy purificada la d-ALA dehidrasa a partir de hígado de buey, de eritrocitos avia-

res, de reticulocitos de conejo según trabajos de Gibson, Neuberger y Scott (1955) y de Schmidt y Shemin (1955) y en Rhodospseudomonas spheroides por Burnham y Loacellias (1963), pero no de plantas superiores.

La enzima, sin considerar su origen, se activa por compuestos sulfhidrúlicos, tales como el glutatión ó cisteína y cuando procede del R. spheroides requiere para su activación iones potasio.

En años ya más recientes se ha podido identificar su presencia en plantas superiores ó incluso purificar. Entre otras se ha encontrado en extractos de células cultivadas de soja por Xifra y col. (1971) y en cotiledones de pepino, de hojas de cebada y de alubia por Beal y Castelfranco (1974).

Shemin (1976) ha realizado un trabajo bastante completo sobre la estructura, función y mecanismo de esta enzima y en otro aspecto Cheh y Neillands (1976) hacen una revisión de sus propiedades catalíticas y su inhibición por el medio ambiental.

2.9.- Porfirinas.

La literatura sobre porfirinas es extensísima. Por eso no vamos a efectuar una relación exhaustiva de toda su bibliografía y solamente nos vamos a limitar a reseñar la existencia respecto a las posibles porfirinas que se encuentran en el reino vegetal ó en determinados casos por su posible aplicación de metodología ó aislamiento y reconocimiento de aquellas a las encontradas en el reino animal.

En primer lugar se pueden citar revisiones como a continuación se indican: Conceptos modernos de la biogénesis de porfirinas y el

núcleo de la corrina de la vitamina B₁₂ hecho por Bykhovskii, Zaitseva y Bukin (1969). Revista sobre la bioquímica, patología bioquímica, diagnóstico clínico y tratamiento de porfirias: realizada por Tsiu-Tiong Ho (1972). Revista sobre la composición, biosíntesis y bioquímica de uroporfirina, coproporfirina y protoporfirina y la terapéutica de porfirinurias eritropoyéticas y hepáticas humanas en Gajdos Torok (1969) y porfirias y porfirinurias Gratecos (1972). Revista de Elder, Gary y Nicholson (1973) sobre la bioquímica de porfirinas, clasificación y nomenclatura de las porfirinas, su investigación y preservación de muestras de orina, heces, eritrocitos y plasma. Revista sobre porfirinas como sistemas de modelos para el estudio de relaciones estructurales hecha por Adler (1973). Control de biosíntesis de porfirina, revisión efectuada por Kikuchi (1973). Biosíntesis de porfirinas, clorinas y corrinas Butterby y Donald (1975). Revisión de porfirinas y su biosíntesis efectuada por Kozuru Mitsuo y col. (1977). Por último una revista sobre porfirinas en lo que concierne a estructura, biosíntesis, reacciones y propiedades de porfirinas y compuestos relacionados, efectuada por Smith (1977).

En vegetales se han realizado estudios sobre porfirinas. Son clásicos los de Bogorad (1958) sobre la síntesis de porfirinas a partir de porfobilinógeno; interesantes los de Rebeiz y col. (1970). Mauxerall (1977) realiza una revisión sobre las porfirinas y la estructura de la clorofila en relación a su formación en el proceso fotosintético. Por otra parte Kang y Spikes (1976) estudian la fotooxidación porfirínica de la apoperoxidasa de Horse radish, y Xifra y Batlle (1978) realizan una serie de trabajos sobre la biosíntesis de porfirinas, enzimas inmovilizadas y ligandos y entre

ellos el estudio sobre succinil Co A sintetasa procedente de células cultivadas de haba de soja.

También se han investigado los inductores que pueden incrementar la biogénesis de porfirinas y los mecanismos de biosíntesis de porfirinas inducidas por drogas, realizado por Gerald y col. (1975). De todos estos inductores químicos destaca por su gran potencia la alilisopropilacetamida (Granick y Keppas, 1967). Granick y Urata (1963) encuentran un marcado incremento en la actividad enzimática mitocondrial hepática de la d-ALA sintetasa, cuando a los cobayos se les alimenta con 3,5-dicarbetoxy 1,4-dihidrocollidine. A las 24 horas hay una eliminación máxima de PBG por orina y de las 24 - 48 horas se acumulan los gránulos de porfirina en células de parénquima hepático. Granick (1966) realizó un estudio sobre la inducción in vitro de la síntesis de d-ALA sintetasa en porfiria química y la respuesta a ciertas drogas, hormonas sexuales y productos químicos, de todas estas sustancias las de máxima actividad son las siguientes: etilaminomalonato, glutetimida, griseofulvina, dietil 1-4 dihidro 2-4-6 trimetilpiridin 3-5 dicarboxilato (DDC) y el dietil 2-4-6 trimetilpiridin 3-5- dicarboxilato; le siguen en actividad el mesanto milontan, cloranfenicol, ácido dialil barbitúrico, fenobarbital sódico, y el β -metilglutarato dietilester.

Por la somera y esquemática descripción anterior de los pasos intermediarios tercero, cuarto, quinto y sexto se deduce que en la biosíntesis de la protoporfirina IX y por ende de la clorofila, los compuestos que con mas probabilidad se pueden encontrar en las semillas germinantes son la uro, la copro y la protoporfirina. Por eso y en este apartado nos vamos a referir a ellas. Bogorad (1958) o

tecta una uroporfirinógeno isomerasa en germen de trigo que cata - liza la síntesis de uroporfirinógeno III a partir de PBG.

Frydman, Valasinas y Frydman (1973) y Frydman y Frydman (1975) in - vestigan sobre el mecanismo y naturaleza del proceso de la biosínt - sis de uroporfirinógeno a partir del PBG.

En lo que respecta a la coproporfirina ha sido mas estudiada en el reino animal, como es natural. Por ejemplo ha sido estudiado su origen en una revisión sobre la excreción porfirínica en la orina y metabolismo anormal de las porfirinas en envenenamiento con plomo por Muira Hajine (1971). Pero no obstante se ha estudiado tambien en otros individuos. Gibson, Matthew, Neuberger y Tait (1961) y Tait y Gibson (1961) comprobaron en bacterias fotosintéticas como *Rhodospseudomonas spheroides*, las bajas concentraciones de etio - nina inhiben la síntesis de la bacterioclorofila y estimulan gran - demente la acumulación de la coproporfirina. Por otra parte Jensen (1963) empleando cromatografía en capa delgada demostró la presen - cia de los isómeros I y III de coproporfirina en el *Staphylococcus aureus* (JT/52).

La protoporfirina IX fué ya estudiada por Granick en 1948 de - mostrando que era un compuesto precursor de la clorofila y en este mismo año Grinstein y Maxwell proponían el empleo de un microméto - do para la determinación de protoporfirina libre de eritrocitos. Nishida y Labbe (1959) y Jones (1963) ha investigado la enzima que cataliza la acción de incorporación de los iones ferrosos en la protoporfirina.

Por otra parte ha sido estudiada la formación enzimica del de - rivado monometilester de la magnesio protoporfirina IX por Tait y

Gibson (1961), para ello la catálisis la efectúan incubando H-protoporfirina IX y S-adenosilmetionina.

Finalmente se han caracterizado por Brouillet, Arselin y Voiland (1975) los compuestos intermedios tetrapirrólicos de la biosíntesis de protoporfirina.

3.- OBJETO DEL TRABAJO.

3.- OBJETO DEL TRABAJO.

En nuestro Departamento se habia iniciado el estudio de la clorofila en la semilla de *Pinus pinea* detectando e identificando sus dos clorofilas existentes a y b y se habia seguido su evolución cuantitativa durante el curso de la progerminación y germinación propiamente dicha como ya se indicó en la Introducción. Por otra parte se habia logrado tambien identificar d-ALA en la semilla de *Pinus pinea* en diferentes estadios de germinación y su posible origen biosintético como se refiere en la Parte Teórica y demostrar de manera fehaciente y previa la actividad enzimática d-ALA dehidrásica; estos últimos objetivos ofrecian un amplio y progresivo campo de investigación que podian conducir al esclarecimiento de los primeros pasos intermediarios de la Biosíntesis de la clorofila, en lo concerniente a la primera fase de ella, es decir, hasta la biogénesis de la protoporfirina IX.

Hay que tener presente que en la semilla de *Pinus pinea* no se ha verificado ninguna investigación a este respecto; que en las plantas superiores hay todavia puntos que aclarar ó que son objeto de controversias como es por ejemplo la existencia de d-ALA sintetasa y que por ello seria interesante objeto de estudiar su presencia en la semilla de *Pinus pinea*; el confirmar, por otra parte, la actividad d-ALA dehidrásica para la formación de PBG a partir de d-ALA y, ya con estos sillares básicos, llegar a saber qué porfirinas son las que se originan en estos primeros pasos intermediarios.

Por esto y como base de investigaciones a llevar a cabo, se

planeó demostrar en primer término la actividad d-ALA sintetásica en piñones a diferentes estadios de germinación; despues obtener un extracto enzimático purificado en el cual se pudieran estudiar ó caracterizar las principales propiedades de la enzima. En segund término investigar igualmente las condiciones de la actividad enzimática d-ALA dehidrásica en semillas en condiciones análogas de germinación y pregerminación en las que se estudiara la d-ALA sintetasa; purificación de la enzima y estudio de sus principales características en el extracto de purificación. Por último y en tercer término se ha tratado de detectar e identificar la existencia y clase de porfirinas que pudieran haber durante el proceso de germinación y en semillas no germinadas; la respuesta de la semilla a determinados estimulantes de la biogénesis de porfirinas y la evolución cuantitativa de las mismas en diferentes estadios de pregerminación y germinación propiamente dicha.

3.1.- Metodología en la literatura.

Con dicho motivo se revisaron los métodos de determinación de actividad enzimática, de aislamiento y purificación de las enzimas d-ALA sintetasa y d-ALA dehidrasa y de las determinaciones de las constantes de Michaelis, pH óptimo, temperatura óptima, activadores e inhibidores y después de un acoplamiento a las semillas de Pinus pinea, se adoptaron los que vienen descritos en la Parte experimental en el apartado de Material y métodos 4.1., que comprende los subapartados 4.1.1. (4.1.1.1 - 4.1.1.8) y 4.1.2. (4.1.2.1 - 4.1.2.6), porque son métodos generales en la bibliografía sin diferencias ostensibles de unos a otros en cada determinación.

En lo que respecta a porfirinas se pueden destacar como método de detección e identificación los que están basados en la separación de las mismas después de aisladas por cromatografía sobre papel, en capa delgada, electroforesis y determinación espectrofotométrica. La separación de porfirinas se puede efectuar globalmente separándolas en estado libre ó bien en forma de esteres para después separarlas unas de otras.

Strain y Svec (1975) describen técnicas de separación para clorofilas y porfirinas por medio de columnas y cromatografía sobre papel. Igualmente Nicholas y Rigminton (1955) emplean cromatografía sobre capa delgada para la separación de porfirinas.

Los esteres de porfirinas también los separan por cromatografía sobre papel; así Falk y Benson (1953) describen un método que además de separar los esteres isoméricos de uroporfirina I y III permite en combinación con el método de Chu, Green y Chu (1951) la identificación de las porfirinas naturales, uroporfirina I y III, coproporfirina I y III y protoporfirina. El método de estos últimos autores es un micrométodo para la detección y separación de esteres metílicos de coproporfirinas I y III, protoporfirina IX, mesoporfirina IX y uroporfirina I, por cromatografía sobre papel.

La cromatografía sobre capa delgada también ha sido un método muy empleado para la separación de mezcla de porfirinas libres una vez aisladas y de sus correspondientes esteres, Demole (1958); también Jensen (1963) y Balek y Szutka (1965) realizan separaciones de porfirinas por cromatografía en capa delgada. Ellsworth (1969) después de extraer las protoporfirinas IX con clo

roformo de una solución neutra y evaporar el cloroformo, disuelven las porfirinas en 2-6 lutidina y las aplican a placas preparadas con una capa de gel de SiO₂. El desarrollo lo efectúan con 2-6 lutidina, como líquido de elución de las manchas etanol. Con este procedimiento de separación sabiendo los Rf obtenidos y combinándolo con la espectrofotometría de los valores cromatográficos de las bandas, llega a la conclusión de que la banda A es protoporfirina IX, la B protoporfirina IX metilester y la banda C la dimetilester. El mismo Ellsworth en colaboración con Perkins y Snow (1970) purifica por C.C.D. dihidroporfirinas y Doss (1970,a) estudia por C.C.D. la separación de los esteres metílicos.

Las porfirinas, una vez aisladas y separadas, se pueden caracterizar por su fluorescencia ó espectralmente por sus bandas de absorción ó por las bandas de Soret. Doss (1970,b) y Doss, Ulshoefery y Dormston (1971) han determinado porfirinas después de separadas por C.C.D. midiendo sus fluorescencias in situ. Jirsa y Kordac (1976) por medio de las bandas de Soret detectan no solamente uro, hepta, penta y coproporfirina, sino también cinco pigmentos fluorescentes rojizos (subporfirinas) con la misma banda máxima de Soret que la uroporfirina.

Por último hacemos referencia de la C.C.D. de porfirinas libre sobre talco (With, 1967), de la separación por cromatografía en capa delgada de celulosa (Gajdos - Torók, 1968) y de la separación por C.C.D. de los esteres metílicos de porfirinas, clorinas y compuestos relacionados con hojas o placas ya preparadas de Eastman "Chromagram" por la técnica que da magníficos resultados de Chu y Chu (1966).

Como colofón a la somera revista pasada a los trabajos de C. C. D. sobre porfirinas, citaremos dos revisiones interesantes sobre la determinación de porfirinas por C. C. D. y otras técnicas cromatográficas, las llevadas a cabo por Doss (1972) y el mismo Doss (1976) sobre métodos de diagnóstico clínico para la diferenciación de desórdenes metabólicos en porfirias por técnicas cromatográficas.

La electroforesis ha sido otro medio de separación de porfirinas, pero se ha empleado más que nada en el diagnóstico clínico y aplicado a porfirias por Fischl y col. (1970); Traverse y Coquelet (1970) y Clotten (1971).

Por espectrofotometría se han detectado e identificado muchas porfirinas, pero generalmente precedidas de una separación cromatográfica, sea del tipo que sea. Así Bogorad (1958), mediante estas técnicas de cromatografía sobre papel y espectral, estudia la síntesis enzimática de porfirinas a partir de porfobilinógeno. Scharf, Clotten y Schmidt (1969) estudian los límites de detección de la determinación espectrofotométrica de porfirinas.

Finalmente se han empleado resinas cambiadoras de iones para la separación de porfirinas y subsiguiente reconocimiento espectral y comparación con las separaciones efectuadas por C. C. D. Estos métodos se han utilizado más bien en orinas por Doss y Schmidt (1972) y Martínez y Hille (1971).

Respecto a los métodos adoptados para la detección de porfi-

nas, elegimos como más idóneos los que vienen descritos en la Parte Experimental en el apartado de Material y Métodos 4.1.3 y subapartados 4.1.3.1, 4.1.3.2, 4.1.3.3, 4.1.3.4 y 4.1.3.5, basados en el aislamiento de porfirinas según se indica, subsiguiente separación y detección e identificación por las manchas de fluorescencia roja en capa delgada ó por los espectros de absorción en las bandas de Soret.

4.- PARTE EXPERIMENTAL.

4.- PARTE EXPERIMENTAL.

4.1.- MATERIAL Y METODOS.

El material de partida que se ha empleado ha sido semillas de *Pinus pinea* procedentes de Coca (Segovia), con una capacidad germinativa de 95 %.

La estratificación se ha realizado poniendo capas alternantes de vermiculita humedecida con agua y piñones completos, es decir, con epispermo a una temperatura de 4 °C durante diferentes periodos de tiempo.

La germinación se verificó en cámaras de germinación Jacobsen a grado de humedad constante y a temperatura de 29-30° C. Los tratamientos a que fueron sometidos los piñones se describen posteriormente.

Para las medidas espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro Beckman modelo D.U. Para las centrifugaciones se usó una centrifuga refrigerada RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge. Para la sonicación se empleó el Omni-Mixer Sorvall y para las incubaciones el baño Gallenkamp regulable a varias temperaturas. La lámpara de luz ultravioleta Hanovia Lampe (Knicisa) fue la empleada para visualizar en las placas de cromatografía en capa delgada las manchas de porfirinas. Por último se utilizó también un potenciómetro Radiometer Copenhagen pH Meter 22.

4.1.1.- d-ALA Sintetasa.

En términos generales la biogénesis del d-ALA se verifica a partir de succinato activado (succinil Co. A) y glicocola en

presencia de d-ALA sintética. No obstante la reacción tiene otros requerimientos y necesita otros compuestos para su ejecución como después veremos detalladamente.

4.1.1.1.- Purificación de la enzima.

Según Burnham y Lacelles (1963). Está basada en la obtención de un extracto a partir de embriones endospermos, seguido de una precipitación acetónica y después de otra con sulfato amónico, y una serie de manipulaciones durante el curso de la purificación que permite obtener extractos en los cuales se pueden ejecutar una serie de determinaciones que después se describirán.

4.1.1.1.1.- Extracción.

Pésense exactamente alrededor de 50 gramos de piñones y sepárense embriones y endospermos y pésense cada una de las dos partes por separado, para seguir después con cada uno de ellos todo el procedimiento de purificación. Cada material tritúrese en mortero enfriado a 0° C., con arena de mar lavada también enfriada a la misma temperatura, con ayuda de tris buffer (0'04 M de pH 7'8) hasta perfecta homogenización. La operación se debe realizar a no más de 2° C. Se adiciona más tris enfriado hasta un volumen de 300 ml. Después se filtra por papel de filtrar jarabes, humedecido con agua y comprime el residuo recogido lo más posible. El filtrado grueso obtenido se somete a sonicación, efectuando ésta en varias partes alícuotas del mismo, como unos 20 ml. cada vez y durante 3 minutos cada una, con el fin de desnaturalizar los ácidos nucleicos liberados de las células rotas. Esta manipulación al igual que las demás hay que realizarla a no más de 2° C. Por último reúnanse los líquidos después de la sonicación.

4.1.1.1.1.-Primer paso. Extracto bruto.

La suspensión anterior se centrifuga a 28 C. durante 30 minutos a 6.000 r.p.m. Se descartan los residuos precipitados de las células y por cada 10 ml del sobrenadante se adicionan 2 ml. de o-fenantrolina 5 mM; 0'1 ml. de β -mercaptoetanol 0'1 M y 1 ml. de Cl_2Mg 0'1 M. Esto supondría para los 300 ml. la adición respectiva de 60 ml., 3 ml. y 30 ml. de dichas sustancias, pero, con objeto de no diluir el líquido de partida, se le puede agregar volúmenes mucho más reducidos pero a mayor concentración de manera tal que contengan iguales cantidades; así se puede agregar 2 ml. de o-fenantrolina 150 mM; 0'1 ml. de β -mercaptoetanol 3 M y 1 ml. de Cl_2Mg 3 M. Después de agitar se centrifuga a 6.000 r.p.m. Se decanta el sobrenadante y el residuo se lava con más tris buffer 0'04 M de pH 7'8 por agitación, se centrifuga de nuevo e incorpora el sobrenadante de loción con el anterior. Por último se lleva a 300 ml. En este extracto se separan 70 ml. para efectuar las determinaciones de proteínas, actividad enzimática y actividad enzimática específica, pH óptimo y temperatura óptima de la actividad enzimática, Km, relación entre proteínas y formación de d-ALA, y los activadores e inhibidores.

4.1.1.1.1.2.- Segundo paso. Precipitación acetónica.

El líquido restante del extracto anterior exactamente medido enfriado a 02 C., se adiciona lentamente sobre un litro de acetona previamente enfriada a -302 C y mantenida a esta temperatura durante la adición y deja en reposo por lo menos

10 minutos a dicha temperatura. Se centrifuga a 6.000 r.p.m. durante 15 minutos en centrífuga refrigerada. El precipitado se resuspende en 20 ml. de acetona a - 30° C., agita y centrifuga de nuevo para recoger el precipitado.

4.1.1.1.3.-Tercer paso. Precipitación con sulfato amónico

El precipitado del paso segundo se resuspende en tris buffer 0'1 M de pH 7'8 conteniendo β -mercaptoetanol (2 mM) y EDTA (2 mM). Después de mezclar la suspensión durante 15 minutos se centrifuga a 15.000 r.p.m., durante 15 minutos y descarta el precipitado. El sobrenadante se lleva a 125 ml. después de lavar el precipitado por agitación y recuperar el sobrenadante por decantación. A los 125 ml se le adicionan 2'5 ml de β -mercaptoetanol 0'1 M; 10 ml de o-fenantrolina 5 mM, 5 ml de Cl_2Mg 0'1 M y 2'5 ml de EDTA 0'1 M y mezcla el conjunto por agitación. A temperatura por debajo de 5° C., se agrega lentamente a este volumen (145 ml.) de líquido enfriado previamente, otro volumen igual de sulfato amónico a saturación también enfriado a menos de 5° c. Después de un equilibrio de 20 minutos se recoge el precipitado por centrifugación a 15.000 r.p.m., durante 15 minutos y descarta el sobrenadante. El precipitado se redisuelve en tris buffer 0'1 M de pH 7'8. El soluto se dializa toda la noche contra tris buffer 0'01 M de pH 7'8 y lleva finalmente a 100 ml para realizar las determinaciones de proteínas, actividad enzimática y actividad enzimática específica, pH óptimo y temperatura óptima de la actividad enzimática, K_m , relación entre proteínas y formación de d-ALA y los activadores e inhibidores.

En los extractos preparados a partir de los tres pasos de extracción se hicieron las técnicas que a continuación se reseñan en los apartados 4.1.1.2; 4.1.1.3.; 4.1.1.4.;4.1.1.5.; 4.1.1.6; 4.1.1.7. y 4.1.1.8. No todas ellas se aplicaron totalmente en cada uno de los extractos; en los apartados correspondientes de Resultados se puede confirmar.

4.1.1.2.- Determinación de proteínas.

Se sigue el método de Lowry (1951), tan conocido y empleado que no vamos a describirlo.

4.1.1.3.- Incubación y determinación enzimática.

Para realizar la incubación con los extractos y determinar su actividad enzimática es necesario emplear una mezcla de incubación con una serie de compuestos que puedan favorecer la formación de d-ALA en presencia de la d-ALA sintetasa. Burhan y Lascelles (1963) en experiencias que realizan, emplean por 1 ml. las siguientes sustancias:

Glicocola 100 $\mu\text{mol}/1\text{ml}$.

Succinato sódico 100 $\mu\text{mol}/1\text{ml}$.

ATP sal sódica 10 $\mu\text{mol}/1\text{ml}$.

Cl_2Mg 10 $\mu\text{mol}/1\text{ml}$.

Piridoxalfosfato 0'25 $\mu\text{mol}/1\text{ml}$.

Glutación reducido 10 $\mu\text{mol}/1\text{ml}$.

Tris - HCl buffer (pH = 7'2) 50 $\mu\text{mol}/1\text{ml}$.

En otros experimentos adicionan además:

EDTA 1 $\mu\text{mol}/1\text{ml}$.

Coenzima A 0'53 $\mu\text{mol}/1\text{ml}$.

β -mercaptoetanol 1 μ mol/1ml

Succinil coenzima A ticoquinasa 0'1 μ mol/1ml.

Nosotros hemos preparado mezclas de incubación 6 milimolares. Para el cálculo de las cantidades hemos tomado como referencia la glicocola y después el resto de las sustancias las hemos determinado proporcionalmente. El cálculo de la glicocola se ha verificado de manera tal que la cantidad que se ponga en los 2 ml de incubación, se pase después por la columna, se eluya ésta con 10 ml., se toma 1 ml. de éstos, es decir, 1/10 de la glicocola, que haya reaccionado en la mezcla de incubación y por último se lleva a 5 ml., en los cuales se practica la reacción para determinar el d-ALA formado; esta reacción está basada en la técnica de Mauzerall y Granick (1956) y acoplada a la valoración en piones. De esta manera tenemos cantidad suficiente de glicocola y por consiguiente de d-ALA para que se pueda medir espectralmente después de todas las manipulaciones.

En 2 ml. de glicocola 6 mM hay 900 μ g. Después de la elución habrá 900 μ g en 10 ml. Como de estos 10 ml. se toma 1 ml. que se lleva a 5 ml. finales en los cuales se practica la reacción colorada de d-ALA, contendrá $90 : 5 = 18$ μ g. En la siguiente TABLA I se puede ver las cantidades que se pueden medir de glicocola expresados en d-ALA.

T A B L A I

Molaridad de glicocola	6 mM	3 mM	2 mM	1'5 mM	0'9 mM	0'3 mM
µg en 2 ml.de mezcla de incubación.	900	450	300	225	135	45
µg contenido en el ml. final para la deter - minación de d-ALA.	18	9	6	4'5	2'7	0'9

Nosotros hemos empleado para preparar la mezcla de incubación (con la que determinamos la actividad enzimática, Km, pH óptimo, temperatura óptima, activadores e inhibidores y la relación lineal entre proteínas y formación de d-ALA) una solución madre 6 mM que contenía los siguientes compuestos:

Glicocola 900 µg.
Suocinato sódico 3'6 µg.
ATP sal sódica 666 µg.
Cl₂Mg 270 µg.
Piridoxalfosfato 12 µg.
Glutation (GSH) 369 µg.
Tris-HCl buffer pH 7'2,725'4 µg.
Agua c.s.p. 2 ml.

El pH de la solución total es de 7'75.

La falta de otros compuestos que lleva la mezcla de incubación preparada por Burham y Lascelles se subsana por lo que contenga los piñones.

Ejecución de la técnica de incubación y determinación enzimática: Pónganse 2 ml. de la mezcla de incubación 6 mM, agréguese 1 ml de problema; caliéntese una hora a 37° C. y párese la reacción exactamente al término de dicho tiempo por adición de 0'5 ml de ácido tricloroacético al 12'5 %. Si los líquidos después de la reacción no son transparentes se centrifuga a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos (si es necesario se filtra para eliminar la grasa).

El sobrenadante se pasa por una columna de Dowex-50 W (50 x 4-400) convenientemente preparada, para ello esta resina se agita fuertemente con HCl 2 N y se deja toda la noche a temperatura ambiente. Se decanta y lava repetidamente por agitación hasta que los líquidos de loción decantados no den reacción alcalina. La resina así lavada se acidifica por fuerte agitación con HCl 4N, se decanta el líquido ácido y se vuelven a repetir las operaciones de lavado y decantación con HCl 2N, HCl N y agua.

Las columnas empleadas son de vidrio de 1 cm. de diámetro y 11 cm. de longitud útil en las cuales se introduce un trozo de algodón humedecido con agua y exprimido ó prensado después con ayuda de una varilla de vidrio. En ellas se agrega tal cantidad de resina preparada que cuando se sedimente el lecho de las mismas sea de 3 cm. de longitud por cada 15-20 ml que se agreguen.

Una vez preparada la resina y montada la columna se hace pasar el sobrenadante y deja fluir a una velocidad de 3 ml. por 10 minutos. La operación se da por terminada cuando pasó todo el líquido; entonces se lava la columna con 5 ml de agua destilada y a continuación se eluye con 10 ml de acetato amónico 1 M y el eluato se lleva a 10 ml exactos. Por último se determina el d-ALA espectrofotométricamente según se describe a continuación.

El d-ALA por condensación con acetilacetona ó etilacetato de sodio forma un pirrol con una posición alfa libre que puede reaccionar con el reactivo de Ehrlich para formar un compuesto coloreado que es susceptible de medir a 553 nm.

Los reactivos que se emplean para esta reacción son los siguientes:

- Etilacetato sódico al 10 % en solución acuosa, se prepara calentando suavemente hasta total disolución. Es estable por lo menos dos días a la temperatura ambiente, por su poca duración conviene prepararlo extemporáneamente.

- Sosa 10 N, no es necesario expulsar el anhídrido carbónico

- Ácido clorhídrico 5N.

- Reactivo de Ehrlich, se prepara con p-dimetilaminobenzaldehído al 2 % con ácido clorhídrico 5N; estable por lo menos tres semanas a la temperatura ambiente; si es necesario se recristaliza en metanol acuoso.

El modo de realizar la reacción se consigna en la TABLA II.

T A B L A II

DETERMINACION DEL d -ALA			
Número de tubo.	1	2	Blanco
Etilacetoacetato sódico al 10 %	1 ml	1 ml	1 ml
Problema.	1 ml	1 ml	0
Agua.	0	0	1 ml
Sosa 10 N.	0'5 ml	0'5 ml	0'5 ml

Una vez agregados estos reactivos, se agitan bien los tubos, se calientan en baño de agua hirviendo durante dos minutos y se dejan enfriar. Después se adicionan a cada tubo 0'5 ml de agua, 1 ml de ClH 5N y 1 ml de reactivo de Ehrlich; se agitan y dejan en reposo 10 minutos. Por último se realiza la lectura espectrofotométrica a 550 nm.

4.1.1.4.- Km. Su determinación.

Se realiza con mezcla de incubación de molaridad mM, 6, 3, 2, 1'5, 0'9, 0'3, y 0 con arreglo a los datos de la TABLA III.

T A B L A III

DETERMINACION DE LA Km.								
Número de tubo	1	2	3	4	5	6	B	
Problema en ml.	1	1	1	1	1	1	1	
Mezcla de incubación	Molaridad en mM	6	3	2	1'5	0'9	0'3	0
	Número de ml.	2	2	2	2	2	2	2(agua)
Molaridad real en tubo(en mM)	3'43	1'71	1'14	0'86	0'51	0'17	0	

Ejecución de la técnica: Se realiza efectuando la incubación seguida de las determinaciones de d-ALA según lo descrito en el apartado 4.1.1.3. Después se traza la gráfica según Lineweaver - Burk (1934).

4.1.1.5.- pH óptimo en la actividad enzimática.

Se practica con mezcla de incubación madre de concentración 6 mM a diferentes pH: 6, 6'5, 7, 7'5, 7'8 y 8. Para ello se toman 2 ml de cada una de las concentraciones, se le añaden 2 ml de agua y se llevan a los referidos pH con $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$ pH=4'3 y $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH=8'9. Se incuban como siempre cada una con 1 ml. de problema durante una hora a 37° C. y después se determina el d-ALA formado. En un eje de coordenadas se representa el número de $\mu\text{g.}$ de d-ALA encontrados en función del pH.

4.1.1.6.- Temperatura óptima de la actividad enzimática.

Se determina a 15°, 20°, 25°, 30° y 37° C. La ejecución de la técnica se verifica con 2 ml. de la mezcla de incubación (solución madre 6 mM) y 1 ml. de problema. A cada temperatura se hacen dos experiencias. El resto de las manipulaciones se practica como en los apartados anteriores. En un eje de coordenadas se representa el número de $\mu\text{g.}$ de d-ALA hallados en función de la temperatura.

4.1.1.7.- Relación lineal entre proteínas y formación de d-ALA.

Es la relación que puede haber entre las proteínas cuando se encuentran a concentraciones inferiores a 0'8 mg/1ml y la cantidad de d-ALA que se forma.

Para su determinación una vez que se sabe el contenido de proteínas por mililitro de problema se efectúan las diluciones de manera tal que se preparen soluciones con 0'8, 0'6, 0'5, 0'4 y 0'2 mg de proteínas/1 ml y con 2 ml de estas soluciones y 2 ml de la mezcla de incubación 6 mM, se verifican las incubaciones y determinaciones finales.

4.1.1.3.- Influencia de activadores é inhibidores sobre la actividad enzimática.

- Como activadores se utilizan los siguientes compuestos:

Tiamina: $P_m=280'9$; 1 ml 0'1 mM contiene 28'09 μg .

Btioniua: P_m (anhidro)=153'2; 1 ml 0'1 mM contiene 15'32 μg .

Hemina: $P_m=652$; 1 ml 0'1 mM contiene 65'20 μg .

- Como inhibidores se emplean:

$(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$: $P_m=111'69$; 1 ml 0'1 mM contiene 11'17 μg .

SO_4Cu : P_m (anhidro)=159'69; 1 ml 0'1 mM contiene 15'969 $\mu\text{g} = 16 \mu\text{g}$.

En la ejecución de la técnica se emplea indistintamente cada una de las sustancias indicadas. Como ejemplo se pone la tiamina; si en lugar de tiamina se pone agua, se obtienen unos valores que pueden servir para trazar una curva comparativa con la

obtenida con tiamina, que llamaremos curva blanco y servirá de modelo ó patrón comparativo con todas las demas.

Ejecución de la técnica: Póngase en cada uno de 6 tubos de ensayo, bien limpios y secos, 3 ml. de tiamina 0'1 mM. Añádase como sustrato (mezcla de incubación) en cada tubo 2 ml. de molaridad decreciente 6, 3, 2, 1'5, 0'9 y 0'3 mM y 1 ml. de problema (véase la TABLA IV).

T A B L A IV

Número de tubos.	1	2	3	4	5	6
TIAMINA 0'1 mM.(ml.)	3	3	3	3	3	3
Contenido en μg .	34'27	34'27	32'27	34'27	34'27	34'27
Sustrato (mezcla de incubación), (ml.)	2	2	2	2	2	2
Molaridad del sustrato en mM.	6	3	2	1'5	0'9	0'3
Problema (enzima), (ml.)	1	1	1	1	1	1
Molaridad real del tubo (mM).	1'85	0'92	0'61	0'46	0'28	0'09

La incubación de los tubos y determinación del d-ALA se realiza como en los apartados anteriores. Con los valores obtenidos de d-ALA y los correspondientes a la molaridad de los sustratos, se hallan las cifras inversas y se llevan a un eje de coordenadas para trazar la curva.

Para la molaridad real del tubo hay que considerar que la molaridad del sustrato respectiva de cada tubo que es de 6, 3, 2, 1'5, 0'9 y 0'3 en dos ml. de sustrato, al pasar a un volumen de 3 + 2 + 1 ml. más 0'5 ml. de ácido tricloroacético, es decir, un total de 6'5 ml., las molaridades hay que multiplicarlas por $2/6'5$.

4.1.2.- D-ALA Dehidrasa y detección de la actividad enzimática.

Se basa en la actividad de la d-ALA dehidrasa en condiciones apropiadas de reacción sobre el d-ALA como sustrato. Por unión de dos moléculas de d-ALA y eliminación de dos de agua se forma PBG, el cual se puede identificar y determinar cuantitativamente por la reacción rojo-violácea que da con el reactivo de Ehrlich y su máxima absorción en 553 nm.

4.1.2.1.- Purificación de la enzima.

Basada en Burnham y Lascelles (1963).

Se funda en la obtención de un extracto a partir de embriones o endospermos, seguido de una precipitación ace-

tónica, luego de otra con sulfato amónico y por último se pasa por una columna de DEAE-celulosa. Estas manipulaciones nos permiten obtener extractos, en los cuales se pueden hacer una serie de determinaciones que después se describirán.

4.1.2.1.1.- Extracción.

Pésense exactamente alrededor de 50 g. de piñones y sepárense embriones y endospermos y pésense exactamente para después continuar con cada uno de ellos todo el procedimiento de purificación. Cada material tritúrese en mortero enfriado a 0° C., con arena de mar lavada, también enfriada a 0° C. y con la mínima cantidad de tris buffer (0'1 M de pH 7'8) hasta perfecta homogenización, para lo cual se tritura todo el tiempo que sea necesario. Después se fluidifica con más buffer enfriado y se pasa por un filtro de papel de filtrar jarabes humedecido con agua para así eliminar la gresu, y comprime el residuo. El líquido recogido se lleva a un volumen de 100 ml con más tris buffer (0'1 M pH 7'8) y se trata ultrasónicamente en porciones de 20 ml, durante 3 minutos cada una para desnaturalizar los ácidos nucleicos liberados de las células rotas. Como todas las operaciones hay que efectuarlas a no más de 2° C., la sonicación se realiza poniendo cada porción de 20 ml en un baño de hielo. Esta extracto total, tratado ultrasónicamente se diluye a 300 ml con tris buffer 0'1 M de pH 7'8 conteniendo EDTA (mM) y β -mercaptoetanol (mM).

4.1.2.1.1.1.- Primer paso. Extracto bruto.

La suspensión anterior (300 ml.) se centrifuga a 2° C., en centrífuga refrigerada durante 90 minutos a 8.000 r.p.m. Se decanta el sobrenadante y el residuo se lava con un poco de tris buffer por agitación, se centrifuga de nuevo e incorpora el sobrenadante de loción con el anterior. Por último se lleva a 300 ml. En este extracto se separan 100 ml. para la determinación de proteínas, actividad enzimática y actividad enzimática específica y el pH óptimo.

4.1.2.1.1.2.- Segundo paso. Precipitación acetónica.

Al líquido restante del extracto anterior (200 ml.) enfriado a 0° C., se le añade 10 ml. de Cl_2Mg 0'1 M mas 1 ml. de β -mercaptoetanol 0'01 M. Después de estar mezclados, el extracto se agrega lentamente sobre un litro de acetona previamente enfriada a -30° C. y mantenida a esta temperatura durante la adición, y deja en reposo por lo menos 10 minutos a dicha temperatura. El precipitado se recoge por centrifugación a -10° C. y lavó una vez con 200 ml. de acetona fría.

El precipitado lavado con acetona se redissuelve en 60 ml. de tris buffer (0'1 M de pH=7'8) conteniendo EDTA (mM) y β -mercaptoetanol (mM). La mezcla se dializa contra tris buffer (0'01 M de pH=7'8) conteniendo EDTA (mM) y β -mercaptoetanol (mM) durante toda la noche a temperatura de 2° C. Después de la diálisis el residuo insoluble se elimina por centrifugación y recoge el sobrenadante.

4.1.2.1.1.3.- Tercer paso. Precipitación con sulfato amónico.

Al sobrenadante del paso anterior se agrega sulfato amónico sólido hasta alcanzar el 40 % de saturación (aproximadamente 29 g.). Después de la adición la solución se equilibra durante 30 minutos antes de centrifugar. El precipitado se recoge por centrifugación a 15.000 r.p.m durante 30 minutos y a temperatura no superior a 22° C., a continuación se redissuelve en 10 ml. de tris buffer (0.1 M de pH=7.8) y se dializa toda la noche según el paso cuarto.

4.1.2.1.1.4.- Cuarto paso. Eluato de DEAE celulosa.

La fracción activa del paso tercero se dializa posteriormente contra tris buffer (2 mM de pH=7.8) con - teniendo EDTA (mM) y β -mercaptoetanol (mM) y al igual que las demás manipulaciones se realiza a temperatura de 22° C.

Después de la diálisis, este extracto enzimático parcialmente purificado, se lleva a un volumen conocido de 25 ml. en matraz aforado. Estos 25 ml. se dividen en dos partes, una de 10 ml. y otra de 15 ml. La fracción de 15 ml. para pasarla por una columna de DEAE-celulosa y la de 10 ml. para determinar la actividad enzimática, actividad enzimática específica, proteínas y Km, para ello a estos 10 ml. se le añaden 5 ml. de agua con el fin de tener un volumen suficiente para realizar las anteriores determinaciones.

Se prepara y equilibra una columna de 1-2 cm.x 20 cm. de DEAE-celulosa (volumen calculado de la columna 22'6 cm³), para ello se lava la DEAE-celulosa 3-4 veces con agua y por último se agita una vez con tris buffer (1 mM de pH=7'8). Una vez preparada la columna se adicionan lentamente los 15 ml. del extracto enzimático, esto se realiza en una habitación refrigerada para que la temperatura sea baja. A continuación se eluyen las proteínas de la columna por incremento de la fuerza iónica del buffer eluyente con ClK M, para lo cual se agrega tal cantidad que no den las reacciones de proteínas. Se efectúa el reconocimiento de proteínas por absorción a 280 nm (realizando las lecturas entre 230 y 300 nm) del principio y el final de la elución. Se va eluyendo con ClK M hasta que no existen proteínas; esto lo comprobamos con la reacción del Biuret, tomando fracciones del eluato y añadiendo 2-3 gotas de NaOH y SO₄Cu, hasta que dé coloración azul y no violácea comprándolo con un blanco ó patrón.

Después de pasar unos 50 ml. de ClK M la reacción de proteínas da negativa, entonces se añaden a la columna unos 3 ó 4 ml. de ClK H y recogen para hacer la lectura en el espectrofotómetro de las proteínas entre 230 y 300 nm. y confirmar así su ausencia.

Por último se adiciona y eluye lentamente con 40 ml. de ClK O'18 M para separar de la columna la d-ALA dehidrasa. En este líquido final se determina proteínas, actividad enzimática, y actividad enzimática específica, Km, pH óptimo de la actividad

enzimática y la influencia de los inhibidores sobre la actividad enzimática.

En los extractos preparados a partir de los cuatro pasos anteriores se hicieron las técnicas que se reseñan a continuación en los apartados 4.1.2.2.; 4.1.2.3; 4.1.2.4; 4.1.2.5 y 4.1.2.6. No todas ellas se aplicaron totalmente en cada uno de los extractos; en los apartados correspondientes a Resultados se puede comprobar.

4.1.2.2.- Determinación de proteínas.

Hemos empleado el conocido método de Lowry (1951) que no nos parece necesario describirlo.

4.1.2.3.- Incubación y determinación enzimática.

Para realizar la incubación se emplean en el primer paso 5 y 14 ml. procedentes de los 300 ml. del extracto bruto y en los demás casos 4 y 4 ml. para incubar en ausencia y presencia de d-ALA.

Póngase en dos tubos de ensayo las cantidades de problema según los casos y manténganse 10 minutos a 37°C. para atemperar, al cabo de este tiempo agregar al primer tubo (conteniendo 5 ó 4 ml. del extracto) 1 ml. del líquido de extracción tris buffer (0'1 M de pH=7'8) y al segundo tubo (que contiene 14 ó 4 ml. del extracto problema) 1 ml. del mismo líquido de extracción que lleva 2'5 mM de d-ALA; para ello se disuelven 3'5 mg. de d-ALA, el pH resultante debe ser de 7'8 pero si fuera menor

se adiciona aosa muy diluida hasta alcanzar dicho pH, Incubar en baño de agua a 37° C. durante 30 minutos, a su término se para la reacción añadiendo a cada tubo 1 ml: de ácido tricloroacético al 1 %. Si los líquidos despues de la reacción no son transparentes se centrifugan a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos y si es necesario se filtran por papel húmedo para eliminar la grasa, por último se llevan a un volumen de 25 ml. en matraz aforado. A continuación se pasan estos líquidos por sendas columnas de Dowex 2,2X8 (200-400 mallas) convenientemente lavadas y preparadas; para ello se trata la resina con acetato sódico 3N y agita fuertemente para pasarla a acetato. La operación de agitación y sedimentación se realiza tantas veces como sea necesario hasta privarlas de cloruros. La resina sedimentada se lava repetidamente con agua hasta que los líquidos decantados queden libres de acetato. Las columnas empleadas y la forma de montarlas son las mismas y se realiza de forma iguala lo descrito en el apartado 4.1.1.3. Despues de esta operación de montar, lavar las columnas y hacer pasar el líquido problema, cada una de ellas se lava con 10 ml. de agua y por último se eluyen con 2 ml. de ácido acético 1M y dos veces sucesivas con otros 2 ml. de ácido acético 0'2 M y los líquidos de elución se llevan a 10 ml. exactos. Por último se determina el porfobilinógeno espectrofotométricamente, para ello en cuatro tubos de ensayo se pone en cada uno 2'5 ml. de cada uno de los 10 ml. procedentes de los respectivos eluatos de las columnas y en otro que sirve de blanco 2'5 ml. de agua.

Añádase a cada tubo 2'5 ml. de reactivo de Ehrlich y agiténse fuertemente. Hágase la lectura del color rojo clavel que se produce a los 10 minutos de reposo, a 553 nm, determinando la densidad óptica.

4.1.2.4.- Km. Su determinación.

Se realiza con una solución de d-AIA de molaridad 0'6, 0'3, 0'2, 0'15, 0'09 y 0'03.10⁻² M, según los datos de la TABLA V.

T A B L A V

- 49 -

DETERMINACION DE LA Km.							
Número de tubo	1	2	3	4	5	6	B
Problema en ml.	0'5	0'5	0'5	0'5	0'5	0'5	0'5
Sustrato	Soluciones. 10^{-2} M.	0'6	0'3	0'2	0'15	0'09	0'03
	Número de ml.	4'5	4'5	4'5	4'5	4'5	4'5 (agua)
	Contenido en mg.	3'54	1'77	1'18	0'88	0'53	0

Ejecución de la técnica: Se realiza incubando los tubos con el sustrato durante 10 minutos a 37° C., al cabo de este tiempo se añade 0'5ml. del problema a cada tubo y se efectúa la incubación a 37° C., 30 minutos; después párese la reacción por adición de 0'2 ml. de ácido tricloroacético al 5 %. El resto de las manipulaciones y la determinación del PBG se realizan como en el apartado 4.1.2.3. Después se traza la gráfica según Lineweaver - Burk (1934).

4.1.2.5.- pH óptimo de la actividad enzimática.

Se realiza con el extracto problema procedente de los diferentes pasos de extracción, llevado a los pH de 6'5, 7, 7'5, 7'7, 7'8, 7'9 y 8.

En el caso del extracto bruto del primer paso se toman 7 lotes de 10 ml. cada uno y se llevan con fosfato sódico buffer 0'6 M ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$) a los referidos pH. Se introducen los tubos a 37° C., 10 minutos y a continuación se añade a cada uno 1 ml. de solución que contenga 1 mg. d-ALA/1 ml. y esté a pH=7'8. Se incuban a 37° C., durante 60 minutos y se para la reacción con 1 ml. de ácido tricloroacético al 1 %. El proceso se continúa como en el apartado 4.1.2.3. y determina el PBG espectrofotométricamente a 553 nm.

En el eluato resultante del paso por columna de DEAE-celulosa (paso cuarto) se determina el pH ópti-

mo poniendo en una serie de 7 tubos de ensayo 1 ml. del eluato y 4 ml. de agua en cada tubo. Se llevan con $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ y PO_4HNa_2 a los diferentes pH de 6'5, 7, 7'5, 7'7, 7'8, 7'9 y 8, seguidamente se introducen en un baño de agua regulado a 37° C. durante 10 minutos, pasado este tiempo añadimos a cada tubo 1 ml. de una solución que contiene 1 mg. de d-ALA/1 ml. y que está a pH=7'8. Se incuban a 37° C. durante una hora y para la reacción añadiendo 1 ml. de ácido tricloroacético al 1 %. El resto de las manipulaciones se efectúan como en el caso anterior.

4.1.2.6.-Influencia de inhibidores sobre la actividad enzimática.

La inhibición se ha realizado con una serie de compuestos llevados todos a una molaridad de $0'6 \cdot 10^{-2}$ M. y son los siguientes:

- Acido levulínico $0'6 \cdot 10^{-2}$ M que lleva 0'691 mg/1 ml
- Cianuro sódico $0'6 \cdot 10^{-2}$ M que lleva 0'290 mg/1 ml.
- Melonato sódico $0'6 \cdot 10^{-2}$ M que lleva 0'427 mg/1 ml.
- Arsenito sódico $0'6 \cdot 10^{-2}$ M que lleva 1'013 mg/1 ml.
- Azida sódica $0'6 \cdot 10^{-2}$ M que lleva 0'390 mg/1 ml.

Cada una de estas soluciones se han llevado a pH=7'8 con KOH $0'6 \cdot 10^{-2}$ M y a partir de ellas se preparan las diferentes soluciones de molaridad 0'3, 0'2, 0'15, 0'09, y $0'03 \cdot 10^{-2}$ M.

Ejecución de la técnica: Con cada uno de los inhibidores se manipula de la misma manera, como ejemplo pondremos el del ácido levulínico.

En 7 tubos de ensayo se pone en cada uno 2 ml. de una solución de d-ALA $0.6 \cdot 10^{-2} M$ y otros 2 ml. de ácido levulínico de molaridad decreciente, en el 7º tubo ó blanco en lugar de i inhibidor se ponen 2 ml. de agua. Se calientan 10 minutos a 37º C. y a continuación se añade a cada tubo 0.5 ml. del líquido problema. (Véase la TABLA VI)

T A B L A VI

Número de tubo.	1	2	3	4	5	6	B
d-ALA $0.6 \cdot 10^{-2} M$, en ml.	2	2	2	2	2	2	2
Contenido en $\mu g.$ d-ALA	1'56	1'56	1'56	1'56	1'56	1'56	1'56
Acido levulínico. $10^{-2} M$.	0'6	0'3	0'2	0'15	0'09	0'03	0
Número de ml.	2	2	2	2	2	2	2 (acu)
Contenido en $\mu g.$	1'38	0'69	0'46	0'34	0'21	0'07	0
Problema en ml.	0'5	0'5	0'5	0'5	0'5	0'5	0'5

El contenido en μg de los demás inhibidores queda expresado en la T A B L A VII.

T A B L A VII

Número de tubo.	1	2	3	4	5	6	B
Cianuro sódico. $10^{-2}M.$	0'6	0'3	0'2	0'15	0'09	0'03	0
Contenido en $\mu g.$	0'58	0'29	0'19	0'14	0'09	0'03	0
Malonato sódico. $10^{-2}M.$	0'6	0'3	0'2	0'15	0'09	0'03	0
Contenido en $\mu g.$	0'85	0'43	0'28	0'21	0'13	0'04	0
Arsenito sódico. $10^{-2}M.$	0'6	0'3	0'2	0'15	0'09	0'03	0
Contenido en $\mu g.$	2'03	1'01	0'67	0'51	0'30	0'10	0
Azida sódica. $10^{-2}M.$	0'6	0'3	0'2	0'15	0'09	0'03	0
Contenido en $\mu g.$	0'78	0'39	0'29	0'19	0'12	0'04	0

Las incubaciones de los tubos y determinación del porfo-
bilinógeno se realizan como en los apartados anteriores.

Con el fin de comprobar si esta inhibición era competi-
tiva ó no, se hizo una nueva extracción, pero partiendo de una
cantidad menor de piñones (aproximadamente unos 10 gramos) es-
tratificados y puestos a germinar para después separar embrio-
nes y endospermos pesados exactamente cada uno para continuar
después todo el procedimiento de purificación con cada uno de
ellos.

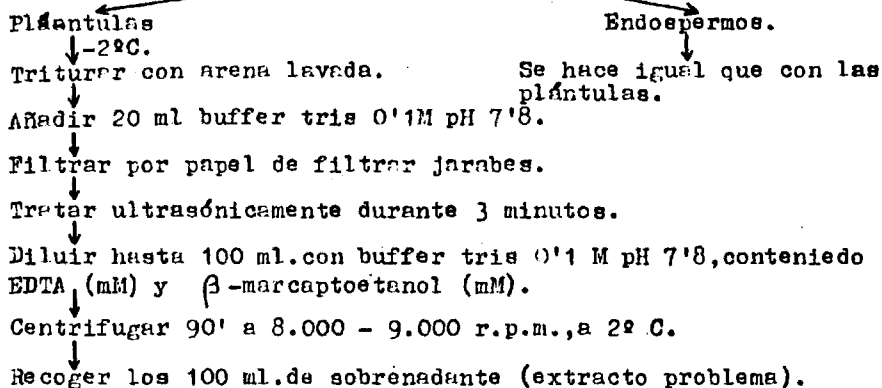
La técnica de extracción fué la misma que la utiliza-
da en el apartado 4.1.2.1.1., según se consigna en el

ESQUEMA I.

E S Q U E M A I.

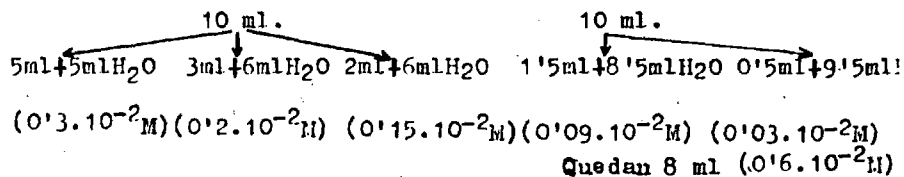
d-ALA Dehidrasa. Inhibidores y prueba control.

Piñones estratificados 55 días, puestas a germinar y apuntando la radícula.



Inhibición con ácido levulínico.

- Preparar ácido levulínico $0'6 \cdot 10^{-2}M$ (0'691 mg/1 ml.), para ello pesar 13'820 mg. de ácido levulínico, adicionar agua hasta disolución, alcalinizar con KOH $0'6 \cdot 10^{-2}M$ hasta pH=7'8 y aforar a 20 ml. Dividir estos 20 ml. de ácido levulínico $0'6 \cdot 10^{-2}M$ en dos partes de 10 y 10 ml.



- Preparar d-ALA $0'6 \cdot 10^{-2}M$ (0'786 mg), para ello pesar 15'72 mg de d-ALA, adicionar agua hasta disolución, alcalinizar con KOH $0'6 \cdot 10^{-2}M$ hasta pH = 7'8 y aforar a 20 ml.

- Hacer una reacción con el inhibidor (ácido levulínico) 0'03, 0'09, 0'15, 0'2, 0'3 y $0'6 \cdot 10^{-2}M$ y otra con d-ALA $0'6 \cdot 10^{-2}M$ en cantidades crecientes (0'3, 0'6, 0'9, 1'2, 1'5 y 1'8 ml) y sin el inhibidor, según las TABLAS VIII y IX.

T A B L A VIII

Número de tubo	1	2	3	4	5	6
Extracto problema, ml.	0'5	0'5	0'5	0'5	0'5	0'5
d-ALA 0'6.10 ⁻² M., ml.	2	2	2	2	2	2
Contenido en µg d-ALA.	1'56	1'56	1'56	1'56	1'56	1'56
Acido levulínico.10 ⁻² M,	0'03	0'09	0'15	0'2	0'3	0'6
Número de ml.	2	2	2	2	2	2
Molaridad real.	0'01	0'04	0'07	0'09	0'13	0'27

T A B L A IX

Número de tubo.	1	2	3	4	5	6
Extracto problema, ml.	0'5	0'5	0'5	0'5	0'5	0'5
d-ALA 0'6.10 ⁻² M., ml.	0'3	0'6	0'9	1'2	1'5	1'8
Contenido en µg d-ALA.	0'23	0'47	0'70	0'94	1'17	1'40
Agua, ml.	3'7	3'4	3'1	2'8	2'5	2'2
MOLARIDAD REAL.	0'04	0'08	0'12	0'16	0'20	0'24

Poner todos los tubos en baño de agua a 37° C., durante 10'.

↓

Añadir los sustratos y el problema.

↓

Incubar a 37° C. durante 30'.

↓

Parar la reacción añadiendo a cada tubo 1 ml. de ácido tricloro -
acético al 1 %.

↓

Filtrar y llevar a matraz aforado de 25 ml.

↓

Pasar por columna de Dowex 2 convenientemente preparada.

↓

Eluir con 2 ml de ácido acético 1M y dos veces sucesivas con 2
ml de ácido acético 0'2M. Aforar los eluatos a 10 ml.

↓

Tomar 2'5 ml. de cada uno de los eluatos de 10 ml y añadir 2'5 ml
de reactivo de Ehrlich. Hacer un blanco poniendo 2'5 ml. de
agua y 2'5 ml. de reactivo de Ehrlich.

↓

Dejar reposar. 10 minutos.

↓

Leer en espectrofotómetro a 553 nm, las densidades óptimas.

Se realizan experimentos iguales con otros inhibidores, como el cianuro sódico (0'29 mg/1 ml.) y el malonato sódico (0'427 mg/1 ml.)

Teniendo en cuenta la molaridad de cada tubo de las TABLAS VIII y IX y las densidades óptimas halladas tanto cuando se trabaja con ácido levulínico como inhibidor, como con cianuro sódico y malonato sódico, se efectúan los cálculos y después se trazan las correspondientes gráficas llevando a un eje de coordenadas, representando en el eje de ordenadas $1/v$ la inversa de la velocidad expresada en μg de PBG y en el de Abscisas $1/s$ la inversa del sustrato. Aparte de estas gráficas se trazan los controles correspondiente sin inhibidor.

4.1.3.- Porfirinas.

4.1.3.1.- Porfirinas patrones.

Las porfirinas que se han podido encontrar en vegetales, algas ó bacterias fotosintéticas han solido ser la protoporfirina ó coproporfirina; por esto es por lo que hemos tratado primeramente (antes de entrar en el estudio ó investigación de las porfirinas en piñones) de separar cromatográficamente protoporfirina y coproporfirina utilizadas como patrones, realizar sus curvas de absorción y valoración, y hallar los límites de sensibilidad en que las porfirinas no se detectan por su fluorescencia roja, pero sin embargo todavía son identificables por sus bandas de Soret.

4.1.3.1.1.- Separación cromatográfica en capa delgada.

Como patrones se utilizaron protoporfirina sal disódica y coproporfirina 1 (ambas de la casa Sigma).

Protoporfirina sal disódica, contiene la solución acuosa madre $1 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$; de ésta se preparan la diluida al $1/10$ y al $1/100$ que contienen respectivamente $0.1 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ y $0.01 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$.

Coproporfirina 1: Se prepara de un vial que contiene $5 \mu\text{g}$. Para ello se adicionan 0.5 ml de $\text{ClH } 0.1 \text{ N}$; se calienta suavemente durante 5 minutos en baño de agua agitando periódicamente y espera a que se enfríe. Después se adiciona amoníaco hasta $\text{pH} = 8$. Concentración a que queda, $5 \mu\text{g}$ en $0.5 \text{ ml} = 500 \mu\text{l}$; $5 \mu\text{l}$ contendrán $0.05 \mu\text{g}$.

Placas de 10 x 6'6 cm. revestidas con adsorbente de celulosa Kodak.

Aplicación de protoporfirina sal disódica 5 μ l. de la solución
diluida al 1/10 = 0'5 μ g.

Aplicación de coproporfirina 1, 5 μ l = 0'05 μ g.

Líquido de desarrollo: Lutidina-agua (10 : 3).

Tiempo de desarrollo: una hora y 30 minutos.

Secado de la placa con aire caliente.

Rf de protoporfirina = 0'83.

Rf de coproporfirina = 0. No emigra.

En la mezcla de ambas sólo emigra la protoporfirina con el mismo Rf = 0'83.

En ambas a la luz ultravioleta dan intensa fluorescencia roja.

(Véase FIGURA 1.)

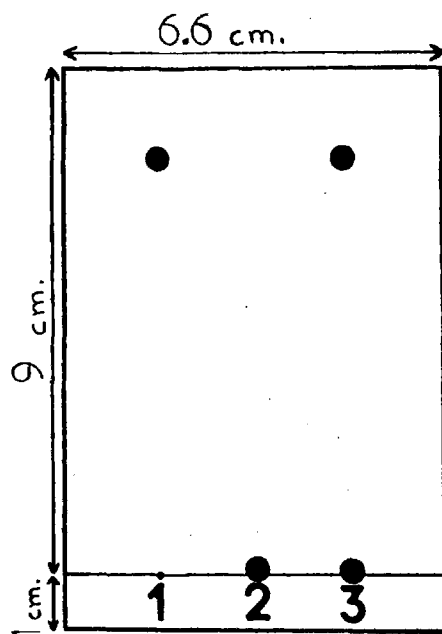


Fig.1 PATRONES:

1. Protoporfirina sal disódica.

2. Coproporfirina 1.

3. Mezcla proto y coproporfirina.

Se verificó otro cromatograma con objeto de dilucidar si la no emigración de la coproporfirina fuera consecuencia de prepararla en solución amoniacal y durante el transcurso de la aplicación ó goteo y del desarrollo se volatilizase el amoniaco y quedase fuertemente adsorbida por el ClH. Por ello se calentó suavemente la solución amoniacal de coproporfirina para eliminar el amoniaco y alcalinizó con sosa 0'2 N hasta pH 8. Con protoporfirina sal disódica y coproporfirina 1 alcalinizada se repitió el cromatograma con el mismo resultado que el anterior, es decir, que la coproporfirina queda adsorbida en el punto de partida, sin emigrar.

4.1.3.1.2.- Límites de sensibilidad de fluorescencia y curvas de absorción.

Límites de sensibilidad de fluorescencia de protoporfirina sal disódica. Se obtuvo un cromatograma análogo a los anteriores en las mismas condiciones de ejecución aplicando 5 μ l. de unas soluciones de protoporfirina sal disódica que contenía 1 μ g/1 μ l; 0'1 μ g/1 μ l; 0'01 μ g/1 μ l y 0'001 μ g/1 μ l es decir, la segunda diluida al 1/10, la tercera al 1/100 y la cuarta al 1/1000 con respecto a la primera ó patrón. Las manchas de las soluciones patrón y diluida al 1/10 se ven directamente y su fluorescencia al U.V.; la diluida al 1/100 solo se visualiza su fluorescencia al U.V. y la diluida al 1/1000 no se detecta de ninguna forma. Es decir, que la fluorescencia roja se percibe todavía a los 0'05 μ g = 5/100, pero no a los 0'005 μ g = 5/1000.

Se obtuvieron dos curvas de absorción con los eluatos de las manchas obtenidas en el cromatograma con la solución madre de protoporfirina y la diluida al 1/10. Para ello las manchas correspondiente del cromatograma se sacaron rascando con una espátula; llevando a sendos tubos de centrifuga, se agitaron despues cada uno con 2 ml. de ClH 0'5 N y adicionó a cada uno 3 ml. de agua y despues de homogenización se centrifugaron y en los sobrenadantes se determinaron las densidades óptimas desde 380 a 430 nm. Las curvas resultantes en forma de campana dieron el máximo de absorción en 409 nm.

Límites de sensibilidad de fluorescencia de protoporfirina IX dimetil ester. Se emplearon protoporfirina IX dimetil ester de hemina de buey de la firma Sigma y otra esterificada por nosotros a partir de la protoporfirina sal disódica.

Preparación de protoporfirina metilada: Se partió de unos 100 mg de protoporfirina sal disódica Sigma, la cual se puso en contacto durante 24 horas con 20 ml. de metanol que llevaba incorporado 1 ml. de SO_4H_2 concentrado. Despues de diluir con 20 ml. de agua se extrajo con 50 ml. de éter sulfúrico y 20 ml. de cloroformo; a continuación se adicionó en varias veces sucesivas mas cloroformo para agotar totalmente. Los extractos clorofórmicos-etéreos se lavaron con 100 ml. de agua amoniacal al 2 % y despues con otros 100 ml del mismo disolvente; se volvió a lavar con mas agua, se separaron las capas, se desecó con SO_4Na_2 an.

hidro y filtró por filtro de SO_4Na_2 y evaporó al vacío, calentando suavemente al baño maria para eliminar el cloroformo. El líquido final (unos 20 ml.) más el líquido cloroformico de loción se vertió en una cristalizadora y dejó evaporar hasta sequedad. Resultó un polvo oscuro. Con ambas porfirinas metiladas se trazaron las curvas de absorción disueltas en Cl_3CH y ClH 2N, dando curvas en forma de campana con un pico en 409 nm. Con estos dos productos se prepararon unas soluciones madres cloroformicas tales que contuviesen 1 $\mu\text{g}/1$ ml. y en 9 tubos de hemolisis para cada solución se tomaron partes alícuotas respectivas de 0'9, 0'8, 0'7, 0'6, 0'5, 0'4, 0'3, 0'2 y 0'1 y se les adicionó a cada tubo 0'1, 0'2, 0'3, 0'4, 0'5, 0'6, 0'7, 0'8 y 0'9 de cloroformo.

Véase la T A B L A X.

T A B L A X

Número de tubos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Solución patrón, en ml.	0'9	0'8	0'7	0'6	0'5	0'4	0'3	0'2	0'1
Cloroformo, en ml.	0'1	0'2	0'3	0'4	0'5	0'6	0'7	0'8	0'9
Contenido en $\mu\text{g}/\text{ml}$.	0'9	0'8	0'7	0'6	0'5	0'4	0'3	0'2	0'1

1
2
3

Las diluciones anteriores se deben de efectuar inmediatamente antes de realizar las cromatografías en capa delgada y en tubos bien cerrados para evitar evaporaciones.

Se preparan varios cromatogramas en capa delgada utilizando protoporfirina IX dimetil ester procedente de hemina de buey y otros varios usando la protoporfirina dimetilada obtenida por síntesis.

Las dimensiones de las placas fueron de 10 x 6'6 cm.; adsorbente de revestimiento gel de silica. La procedencia de las placas es de la casa Eastman Kodak. Las aplicaciones realizadas fueron de 20 μ l de cada una de las soluciones con contenido de 0'9, 0'8, 0'7, etc.. hasta 0'1 μ g/1 ml. Los Rf de cada una de las manchas fueron muy semejantes y solo dejó de percibirse fluorescencia roja en aquellas soluciones de aplicaciones menores de 0'4 μ g/ml. Por consiguiente el límite de sensibilidad para ambas patrones fué de 0'8 μ g/100 μ l.

Sabiendo que las soluciones límites que dan fluorescencia roja son las que contienen 0'4 μ g/ml., 20 μ l contendrán:

$$\frac{0'4 \times 20}{1.000 \mu\text{l}} = \frac{8 \mu\text{g.}}{1.000 \mu\text{l.}} = 0'8 \mu\text{g}/100 \mu\text{l.}$$

Se obtuvieron las curvas de absorción de los eluatos clorofórmicos (5 ml.) de las manchas correspondientes, obtenidas de la forma ya reseñada, a las soluciones con límite de sensibilidad 0'8 μ g/100 μ l de fluorescencia roja y dieron aquellas también en forma de campana con un máximo de absorción correc-

to (pico en 409 nm.). Los líquidos clorofórmicos se evaporaron al vacío y los residuos disueltos cada uno en 5 ml. de ClH 2N dieron análogas curvas en campana con el mismo máximo de absorción; igualmente las soluciones de menor contenido de protoporfirina, por debajo de 0'4 µg/ml. (límite de sensibilidad) dieron curvas similares sin presentar fluorescencia roja las soluciones en ClH 2N.

De los resultados obtenidos descritos en los apartados 4.1.3.1.1. y 4.1.3.1.2. se deduce que existe una mas alta sensibilidad para la detección de fluorescencia roja en los esteres de protoporfirina que en las porfirinas libres (protoporfirina) y que por niveles mas bajos de detección de fluorescencia roja aunque ésta no se detecte, sin embargo se puede todavia captar por espectrofotometría los máximos de absorción.

4.1.3.2.- Reconocimiento previo de porfirinas de piñones.

Estas determinaciones se realizaron como tanteos para despues proseguir la detección y caracterización de las mismas.

Para su reconocimiento hemos tratado de identificarlas como es natural en embriones, realizando unas extracciones en las cuales se pueden determinar por sus espectros de absorción. Las porfirinas poseen 4 bandas de absorción en

el visible a 500, 540, 580 y 620 nm. Pero todas ellas, incluso las metaloporfirinas y hematoporfirinas tienen una banda de absorción en el U.V. próximo llamada de Soret que permite determinarlas con mayor sensibilidad afinando de 10 a 20 veces mas que por las correspondientes en el visible y en cubetas de un cm. de espesor llegar a caracterizarlas a concentraciones del orden de 10^{-6} mg/ml. En soluciones clorhídricas 2N, las bandas de Soret para las correspondientes porfirinas son las siguientes.

Máximo de absorción.

Uroporfirina	405 nm.
Coproporfirina	402 nm.
Protoporfirina	409 nm.
Deutoporfirina	404 nm.
Mesoporfirina.	401 nm.

- Principio: Se basa en efectuar una extracción de los pigmentos, en la cual se realiza una incubación con sustancias que favorecen la formación de d-ALA y por ende la de porfirinas, para después detectarlas y determinarlas por espectrofotometría.

- Técnica: Basada en la extracción en la realizada por Kikuchi, Kumar y col., (1958), para los ensayos I y II de la d-ALA sintética.

Póngase un gramo de embriones exactamente pesado en un

mortero enfriado con hielo a 0° C. Adiciónese arena lavada enfriada igualmente y tritúrese con 3 ml. de fosfato buffer 0'1 M de pH 6'9 hasta estar muy bien homogeneizado. El líquido se pasa por tejido de muselina ó papel de filtrar jarabes a un matraz aforado de 5 ml. Se reextrae por trituración del residuo que queda en el mortero con otros 2 ml. de buffer y procúrese pasar al matraz aforado todo el líquido y después de escurrido todo el residuo del mortero, exprímase bien y por último llévase a 5 ml. Estos 5 ml. se dividen en 3 fracciones, la 1ª de 2 ml., la 2ª de otros 2 ml. y la 3ª de 1 ml. Las dos primeras son para realizar las incubaciones según las técnicas I y II de la d-ALA sintetasa referidas anteriormente; y la 3ª de 1 ml. para determinar las proteínas según Lowry (1951).

- Técnica I de la d-ALA sintetasa.

A la 1ª fracción de 2 ml. se le adicionan:

0'1 ml. de glicocola 50 μ mol.

0'1 ml. de piridoxalfofato 0'25 μ mol.

0'1 ml. de Cl_2Mg 2 μ mol.

0'1 ml. de succinato 2 μ mol, y

0'1 ml. de ATP 2 μ mol.

A la 2ª fracción de 2 ml. se le adicionan las mismas sustancias con idénticas cantidades que en la 1ª fracción pero sin succinato.

- Para la técnica II de la d-ALA sintetasa, hay que tomar de las fracciones 1 ó 2 una cantidad tal que contenga 8 mg. de proteínas.

A este volumen de cada una de las fracciones se le adicionan las mismas sustancias que en la técnica I, es decir, que en el primer caso se hace la incubación con glicocola 50 $\mu\text{mol.}$, piridoxalfosfato 0'25 $\mu\text{mol.}$, Cl_2Mg 2 $\mu\text{mol.}$, succinato 2 $\mu\text{mol.}$ y ATP 2 $\mu\text{mol.}$ y a la 2ª fracción no se le adiciona el succinato. El volumen total final en ambas incubaciones debe ser de 2 ml.

En cada uno de estos 4 experimentos se realizan las operaciones siguientes: Incúbense durante 80 minutos exactos a 34° C. y paréñse las reacciones a dicho término de tiempo añadiendo a cada uno 1/5 del volumen de ácido tricloroacético al 20 % (es decir, de 0'4 a 0'5 ml.). Despues se centrifuga cada líquido a 12.000 r.p.m., durante 15 minutos y se recoge por separado el sobrenadante y el residuo. Liévase cada uno de los sobrenadantes a un matraz aforado de 5 ml. y el líquido de loción (fosfato buffer) del residuo incorpórese a los respectivos matraces y por último enrásese a 5 ml. De cada uno de estos matraces se hacen pasar 4 ml. por una columna de Dowex 50 W (200-400 mallas) convenientemente preparada y se eluye con 10 ml. de acetato amónico 1M. En una parte alícuota de cada uno de estos 10 ml. se determina el d-ALA por el método de Mauzerall-Granick, haciendo la lectura a 550 nm. despues de 10 minutos de reposo en un espectrofotómetro Beckman. (La determinación del d-ALA fué objeto de parte de la Tesina que presentamos en Octubre de 1976).

El ml. restante de cada uno de los matraces de 5 ml. de los experimentos 1 y 2 de las técnicas I y II, llévase con agua destilada a 5 ml. y adiciónense 5 ml. de ClH 4N; así el conjunto de ambos quedan diluidos a 10 ml. de ClH 2N. En cada uno de ellos se determinan espectralmente las porfirinas a la longitud de onda de las bandas de Soret.

Los residuos de las respectivas centrifugaciones anteriores se agitan intensamente con 5 ml. de ClH 2N, centrifugan de nuevo a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos y en los sobrenadantes se determinan las porfirinas igualmente.

4.1.3.2.1.-Determinación espectral de las porfirinas.

Para ello las densidades ópticas halladas se expresan en protoporfirina. Como densidad óptica de máxima absorción de la protoporfirina (pico en 409 nm.) se ha tomado 0'532 en una concentración diluida al 1/100 de una solución madre que lleve 1,000 µg/1.000 µl., es decir, que contenga 10 µg/1 ml. Por lo tanto el número de µg/1 ml. de protoporfirina se deducen de la relación $\frac{0'532}{10 \mu\text{g}} = \frac{\text{D.O. problema}}{x}$, luego se hacen los cálculos adecuados con arreglo a las diluciones hechas.

4.1.3.3.- Tratamiento previo de los piñones.

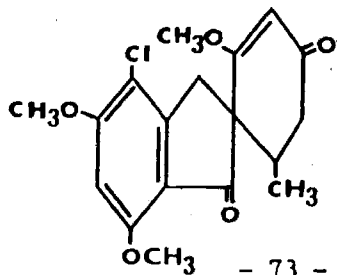
Los piñones se han tratado de diversas formas con objeto de comprobar si estos tratamientos podían favorecer

la biogénesis de porfirinas y por ende al haber mayor cantidad de ellas, detectarlas mejor.

Uños tratamientos se han verificado por medios naturales como la estratificación ó la puesta a germinar de los piñones dentro de determinadas condiciones de humedad y temperatura (generalmente 29-30 ° C.) ó de estratificación seguido de germinación.

Otros tratamientos se han efectuado incorporando ó introduciendo en los piñones pequeñas cantidades de determinadas sustancias químicas que pueden ser inductores de la biogénesis porfirínica.

Entre los múltiples inductores de la d-ALA sintetasa y por tanto de las porfirinas que menciona Granick (1966), destacan la alilisopropilacetamida, glutetimida, dietil 1-4 dihidroxi 2-4-6- trimetil piridin 3-5 dicarboxilato (DDC), dietil 2-4-6- trimetil piridin 3-5 dicarboxilato y la griseofulvina. De todos ellos el de mas fácil adquisición para nosotros fué la griseofulvina que aunque es poco hidrosoluble se puede utilizar, porque las soluciones empleadas en los tratamientos son de concentraciones muy bajas.



GRISEOFULVINA.

Por otra parte hemos utilizado tiamina que es un gran estimulante de la germinación (Sanz Muñoz y Palacios Alaiz, 1972; y Sanz Muñoz y Santos Ruiz, 1974); d-ALA que como es un sillar básico de la biogénesis porfirínica, al haber un exceso ha de favorecer también la formación de porfirinas; también hemos empleado treonina y etionina. Por último se utilizó EDTA como materia que formando un complejo con el magnesio puede actuar frenando la biosíntesis porfirínica ya que los iones magnésicos son activadores de la d-ALA sintetasa para la formación de d-ALA, primer paso intermediario en la biogénesis de protoporfirina.

Los tratamientos de estratificación y germinación se han verificado con arreglo a las normas dadas al comienzo del apartado 4.1. Los demás se han realizado sumergiendo los pifones completos (es decir, con cubierta) en soluciones que contuviesen el número de mg del inductor, según los casos, por 100 ml de agua, durante 3 días. En caso de haber dos compuestos en el líquido de inmersión se ponen 40 mg de uno, cuando es tiamina y del otro según se especifica en las tablas y resultados. Para aclarar mejor esto, lo concretaremos diciendo que en los tratamientos con tiamina, treonina, d-ALA y etionina se pusieron 40, 12, 20 y 2 mg de cada uno de ellos en la solución respectiva. En las que llevaba EDTA y tiamina, 4'94 g. y 40 mg. de cada una en la solución en que el EDTA va sin diluir; en

otra se diluye el EDTA al 1/2 ó al 1/10. En las soluciones que llevan griseofulvina, en una de ellas se pone tiamina en solución acuosa y griseofulvina a saturación, en otra la griseofulvina al 1/2 de saturación y en la tercera al 1/10 de saturación.

4.1.3.4.- Porfirinas libres en piñones.

La detección de porfirinas libres la hemos verificado, después de la extracción de las mismas, por un procedimiento de extracción basado en la técnica de Tait y Gibson (1961).

4.1.3.4.1.- Extracción.

Para ello se pesan exactamente alrededor de 6 g. de piñones y trituran con arena de mar lavada y desengrasa fraccionadamente con acetona en varias porciones hasta desaparición total de la grasa. El residuo se lleva cuantitativamente a un tubo de centrifuga y adiciona acetato de etilo-ácido acético (9:3) (v/v) se agita intensamente y se centrifuga. El sobrenadante se separa y el residuo se vuelve a agitar con más acetato de etilo-ácido acético (3:1) (v/v), se centrifuga de nuevo y el sobrenadante se reúne con el anterior, en una ampolla de decantación. A la ampolla se agrega 10 ml. de ClH 3N, se agita y separa la capa clorhídrica a un vaso de precipitado. A este vaso de precipitados se adicionan 3'8 g. de CO₂Na, hasta neutralización. Pásese el contenido del vaso

a una ampolla de decantación, lavando aquél con 2 ml. de agua y extráigase primero con 10 ml. de acetato de etilo y despues con otros 2 ml. Reúnanse los extractos de acetato de etilo, se dejan escurrir para eliminar el agua y finalmente se deseca con SO_4Na_2 anhidro. El extracto desecado se lleva a un matraz aforado de 10 ml. y enrusa con mas disolvente. Se toman 5 ml. y evaporan al vacío en un matraz de fondo redondo de color topacio hasta quedar una cantidad de líquido muy pequeña para posteriormente realizar cromatografías en capa delgada.

4.1.3.4.2.- Identificación espectral.

Los 5 ml. restantes del matraz aforado se evaporan totalmente al vacío y el residuo se disuelve en 5 ml. de ClH N y verifican ó determinan sus espectros de absorción en longitudes de onda comprendidas entre 380 a 430 nm. para determinar sus máximos.

4.1.3.4.3.- Cromatografía de capa delgada.

El líquido que quedó de la evaporación al vacío se evapora totalmente y el residuo se disuelve en 1 ml. de amoniaco muy diluido, ésta es la muestra que se emplea para preparar el cromatograma.

Técnica de la cromatografía (Gajdos-Török, 1968) :
Para ello se emplean placas u hojas (ya preparadas) revestidas de una capa de celulosa (sin indicadores de fluorescencia, N° 6064), 160 μ de espesor, sobre una resina poliéster de 190 μ .

Este soporte es transparente a la luz V. en todo el espectro visible y muy próximo al infrarrojo y muy resistente a los disolventes orgánicos. Las hojas se presentan en dimensiones de 20 x 20 cm., pero nosotros las cortamos en dos mitades de 10 x 20 y después cada una en tres de 10 x 6'6 cm.

Para la aplicación de la muestra se emplea una microjeringa Precisión Sampling Corporation de 5 μ l.

Como líquido de desarrollo se utiliza lutidina 2-6: agua (10:3) y vapores de amoníaco. La cubeta que utilizamos para el desarrollo de los cromatogramas fue cilíndrica de 11 cm. de alto por 9 cm. de diámetro interior con un reborde superior esmerilado al cual después de lubricado sirve para sostener una tapa de vidrio de 1 cm. de espesor y quedar así un cierre hermético.

En el fondo de la cubeta se superpone una cápsula de fondo plano de diámetro de 7-8 cm., sobre la cápsula se pone un peso sustancia de tipo alto de 2 cm. de radio lleno de amoníaco concentrado y sobre la cápsula se agrega 25 ml. de una mezcla de lutidina 2-6:agua (10:3) y tapa la cubeta procurando que quede herméticamente cerrado durante 30-40 minutos, con objeto de alcanzar una buena saturación de vapores amoniacales y lutidina.

Después de hecha sobre una placa la aplicación con la microjeringa de cada una de las muestras y de los patrones, a una distancia de 0'5 cm. como punto de partida, del

borde de la misma de menor longitud y cada una de la aplicación de las muestras por lo menos a una distancia de 1 cm., se pasa la placa a la cubeta sumergiendo el extremo de aplicación de la hoja en el líquido de desarrollo puesto en la cápsula, de forma que aquella se apoye en la pared de la cámara. Se tapa la cubeta y espera alrededor de una hora y 30 minutos (el tiempo depende de la concentración de porfirinas y de la temperatura ambiente, la temperatura óptima es de 23-24° C.)

Después de secada con aire caliente, las manchas fluorescentes se localizan a la luz U.V. Los valores de R_f aproximados son para uroporfirina 0'10; coproporfirina 0'44 y Protoporfirina 0'83.

4.1.3.5.- Determinación de porfirinas semi - nales al estado esteres.

De los resultados obtenidos en los apartados 4.1.3.1.1. y 4.1.3.1.2., se infería que existe una mayor sensibilidad para la detección de fluorescencia roja en los esteres de protoporfirina que en los de protoporfirina libre, y es aún mayor la sensibilidad si se detecta por espectrofotometría que por fluorescencia. Estas son las causas que aconsejan el determinarlas en forma de esteres. Los esteres más utilizados son los metanólicos y para su esterificación requieren la presencia de ácido sulfúrico concentrado.

4.1.3.5.1.-Preparación de los esteres y extracción.

Pésense exactamente una cantidad conocida entre 1 y 10 gramos de piñones privados de la cubierta (embriones más endospermos) en un mortero enfriado con hielo. Agréguese arena de mar lavada, enfriada también a 0° C. y tritúrese lo más finalmente posible, añadiendo, si es necesario, la mínima cantidad de metanol-sulfúrico (metanol Merok con un 5 % de ácido sulfúrico concentrado) para que se forme una pulpa y la trituración resulte homogénea. Después de homogenización perfecta cúbrase con metanol-sulfúrico (aproximadamente 50 ml) y consérvese en la oscuridad 24 horas. Centrifúguese a 6.000 r. p.m. durante 15 minutos y el líquido sobrenadante llévase a una ampolla de decantación, añádese cloroformo, agítese y si no se separan bien las capas adiciónese agua suficiente hasta que por agitación se separen. El cloroformo que lleva ya disueltos los esteres porfirínicos, por su mayor densidad, se separa por la parte inferior del embudo de decantación. Se repite la extracción con más cloroformo y reúne este extracto con el anterior y el todo se lava con una solución amoniacal al 2 % tantas veces como sea necesario para eliminar la acidez (comprobación con papel de pH). Después de bien escurrida la ampolla para eliminar el agua, se le adiciona SO_4Na_2 anhidro y filtra la solución clorofórmica, a un matraz bien seco de fondo

redondo y color topacio, por un embudo que contenga también SO_4 H_2O anhidro. El sulfato de la ampolla se lava con más cloroformo y pasa por el embudo al matraz. Por último el disolvente se evapora al vacío hasta sequedad.

Todas las manipulaciones de la extracción se deben realizar con luz difusa.

4.1.3.5.2.-Identificación por espectrofotometría.

El residuo seco se disuelve en 1-2 ml de cloroformo y pasa a un matraz aforado de 5 ml. El matraz de fondo redondo se lava con otros 2 ml. de disolvente y una segunda vez con 1 ml. y los líquidos de loción se incorporan al matraz aforado y se enrasa. Este líquido además de utilizarse para la obtención de las curvas de absorción se emplea para la preparación de los cromatogramas. Como para los cromatogramas se gasta una cantidad sumamente pequeña (del orden como máximo de 20-50 μl .) y se suelen realizar antes que las espectrofotometrías, prácticamente el líquido clorofórmico existente después de efectuar éstas es aproximadamente de 5 ml. En este volumen se determina la curva de absorción entre longitudes de onda de 380 a 430 nm. y halla sus máximos de absorción. Después se evapora al vacío la solución clorofórmica, el residuo se disuelve en 5 ml. de ClH_2N , e igualmente se determina su curva y máximos de absorción.

4.1.3.5.3.- Cromatografía en capa delgada.

La solución clorofórmica referida anteriormente (apartado 4.1.3.5.2.) es la que se emplea para la preparación de los cromatogramas.

La técnica operatoria y el material empleado, como microjeringa para aplicación de las muestras, la cubeta ó cámara para la cromatografía y demás accesorios son idénticos a los que se utilizan en las cromatografías efectuadas para las porfirinas libres (apartado 4.1.3.4.3.).

Diferencias: Aquí las placas u hojas son de polietilen-tereftalato, revestidas con sílica gel, de espesor 100 μ . El sistema de disolvente para el desarrollo de los cromatogramas es cloroformo:keroseno:etanol (30:10:2) ó n-decano:cloroformo (1:9). Como disolvente de saturación se emplea el cloroformo que va en el peso de las sustancias introducido en la cubeta. Tiempo de saturación de la cubeta una hora y el de desarrollo del cromatograma aproximadamente 30 minutos. A este tiempo, el frente del disolvente de desarrollo con respecto al punto de partida ha recorrido aproximadamente 9 cm.

Cuando se quieren determinar las curvas de absorción en los eluatos de las manchas obtenidas en los cromatogramas, se rascan las manchas con una espátula, se eluyen con cloroformo hasta total agotamiento y llevan a 5 ml. en matraz aforado. Con esta solución se determina la curva y máxi-

mos de absorción entre 380 y 430 nm.

Despues este mismo líquido evaporado al vacío, su residuo disuelto en 5 ml. de ClH 2N puede servir para determinar también su curva y máximos de absorción.

4.2.- RESULTADOS.

4.2.- RESULTADOS.

4.2.1.- d-ALA sintetasa.

4.2.1.1.- Preparación y purificación.

Para la preparación y purificación de la d-ALA sintetasa se siguió la metodología descrita en el apartado 4.1.1. y subapartados 4.1.1.1., 4.1.1.1.1., 4.1.1.1.1.1., 4.1.1.1.1.2 y 4.1.1.1.1.3, de Material y Métodos y los resultados que se consignan fueron obtenidos siguiendo el ESQUEMA II ; en este mismo esquema se indican las determinaciones efectuadas.

ESQUEMA II.

Piñones.

Embriones.

Endospermos.

Extracto bruto, 300 ml.

Igual que para los embriones.

Añadir 2 ml o-fenantrolina 150 mM, 1 ml. Cl_2Mg y 0.1 ml. de β -mercaptoetanol 3 M.

Extracto bruto total 303.1 ml. (Primer paso).

Determinar: Proteínas; pH óptimo; temperatura óptima; relación de proteínas y d-ALA; Inhibidores (SO_4Cu y $(SO_4)_3Fe_2$); Activadores (Tiamina, Etionina, y Hemina) y queda el resto del extracto bruto.

Precipitación del resto del extracto bruto con acetona a $-30^\circ C$.
(Segundo paso)

Centrifugación.

Suspensión del precipitado en acetona a $-30^\circ C$, agitación y centrifugación.

Recogida del precipitado.

Suspensión del precipitado en buffer.

Centrifugación.

Recuperación del sobrenadante.

Adición de β -mercaptoetanol, o-fenantrolina, Cl_2Mg , EDTA y agitación.

Adición de sulfato amónico a saturación (Tercer paso).

Centrifugación y recogida del precipitado.

Disolución del precipitado en buffer tris.

Dializar contra tris de menor molaridad.

Llevar a volumen conocido.

Determinar: Proteínas; Actividad enzimática; Actividad enzimática específica; Im ; pH óptimo; Temperatura óptima; Linealidad de proteínas y d-ALA; Inhibidores y Activadores.

4.2.1.2.- Determinaciones en piñones en diferentes estadios de germinación: actividad enzimática, proteínas, actividad enzimática específica, constante de Michaelis, pH óptimo, temperatura óptima, y activadores e inhibidores de la actividad enzimática.

Se realizaron determinaciones seriadas de proteínas, actividades enzimáticas y actividades enzimáticas específicas en partes alícuotas de las fracciones correspondientes a los pasos primero, segundo y tercero en embriones, plántulas y endospermos de:

- Piñones estratificados 90 días, puestos a germinar y cerrados.
- Piñones estratificados 90 días, puestos a germinar 28 días y abiertos.
- Piñones estratificados 90 días, puestos a germinar 30 días y germinados apuntando la radícula.
- Piñones estratificados 90 días, puestos a germinar y germinados con radícula de 1'5 - 2 cm:
- Piñones estratificados 90 días, puestos a germinar y germinados con radícula de 3 - 4 cm.

A continuación en la TABLA XI se incluyen los valores de proteínas y actividades enzimáticas. En la TABLA XII las actividades enzimáticas específicas y en la TABLA XIII las relaciones de las proteínas del primer paso al tercero y las de las actividades específicas del tercero al primer paso.

T A B L A X I

EMBRIONES (referidos a 20 ml.)						ENDOSPERMIOS (referidos a 20 ml.)					
PROTEINAS (mg.)			ACTIVIDAD ENZIMATICA (µg/h)			PROTEINAS (mg.)			ACTIVIDAD ENZIMATICA (µg/h)		
Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 1	Paso 2	Paso 3
						<u>CERRADOS</u>					
30'34	11'19	2'90	0	3'66	8'01	45'19	9'83	2'41	0	0	5'72
						<u>ABIERTOS</u>					
26'08	10'80	4'83	6'59	8'24	17'18	30'28	14'97	4'59	9'89	8'24	22'90
						<u>APUNTANDO LA RADICULA</u>					
25'22	4'56	4'03	16'49	11'91	17'18	37'20	14'68	7'66	11'54	9'16	27'49
						<u>RADICULA DE 1'5 - 2 cm.</u>					
34'83	14'99	6'14	21'44	17'41	28'63	46'48	21'09	7'02	16'49	14'66	22'90
						<u>RADICULA DE 3 - 4 cm.</u>					
52'77	10'49	5'73	8'24	13'74	19'47	48'44	18'98	4'19	11'54	8'24	16'03

T A B L A XII

ACTIVIDAD ENZIMATICA ESPECIFICA ($\mu\text{g}/1 \text{ h}/1 \text{ mg. proteínas}$).					
EMBRIONES (referidos a 20 ml.)			ENDOSP-ERIOS (referidos a 20 ml.)		
Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 1	Paso 2	Paso 3
		<u>CERRADOS.</u>			
0	0'33	2'76	0	0	2'42
		<u>ABIERTOS</u>			
0'25	0'76	3'55	0'33	0'55	4'98
		<u>AFUNTANDO LA RADICULA</u>			
0'65	2'61	4'26	0'31	0'62	3'58
		<u>RADICULA DE 1'5 - 2 cm.</u>			
0'62	1'16	4'66	0'35	0'69	3'26
		<u>RADICULA DE 3 - 4 cm.</u>			
0'16	1'31	3'40	0'24	0'43	3'83

T A B L A XIII

EMBRIONES (referidos a 20 ml.)		ENDOSPERMIOS (referidos a 20 ml.)	
Relación de proteínas del 1º al 3º paso. (mg)	Relación de actividades específicas del 3º al 1º paso. (veces de aumento).	Relación de proteínas del 1º al 3º paso. (mg)	Relación de actividades específicas del 3º al 1º paso. (veces de aumento)
	<u>CERRADOS.</u>		
10'46	2'76	18'70	2'37
	<u>ABIERTOS.</u>		
5'40	14'03	6'59	15'24
	<u>APUNTANDO LA RADICULA</u>		
6'25	6'51	4'85	11'56
	<u>RADICULA DE 1'5 - 2 cm.</u>		
5'67	7'57	6'62	9'19
	<u>RADICULA DE 3 - 4 cm.</u>		
9'20	21'77	11'56	16'08

En las TABLAS XIV y XV se representan los valores
hallados y descritos en las TABLAS XI, XII y XIII.

T A B L A XIV

EMBRIONES.									
PIÑONES	FRACCION	VOLUMEN ml.	PROTEI- NAS. mg/ml.	ACTIVI- DAD EN- ZIMATI- CA. µg/1h.	ACTIVI- DAD EN- ZIMATI- CA ESPE- CIFICA. µg/h/mg prot.	ACTIVI- DAD UNI- DADES. µg/h/ml.	ACTIVI- DAD TO- TAL. (µg/ h/ml) x Vol.	RENDI- MIENTO %	PURIFICA- CION. Rela- ción de activida- des, enzi- máticas + especifi- cas del 2 ó 3º peso al 1º.
CERRADOS	Paso 1º	20	1'52	0	0	0	0	100	-
	Paso 2º	10	0'56	3'66	0'33	0'37	3'66	366'5	0'33
	Paso 3º	10	0'14	8'02	2'76	0'80	8'02	801'8	2'76
ABIERTOS	Paso 1º	20	1'30	6'60	0'25	0'33	6'60	100	-
	Paso 2º	10	0'54	8'25	0'76	0'82	8'25	124'99	3'02
	Paso 3º	10	0'24	17'18	3'55	1'72	17'18	260'40	14'03
APUNTAN- DO LA RA- DICULA.	Paso 1º	20	1'26	16'49	0'65	0'82	16'49	100	-
	Paso 2º	10	0'23	11'91	2'61	1'19	11'91	72'22	3'99
	Paso 3º	10	0'20	17'18	4'26	1'72	17'18	104'16	6'51
RADICULA DE 1'5 a 2 cm.	Paso 1º	20	1'74	21'44	0'62	1'07	21'44	100	-
	Paso 2º	10	0'75	17'41	1'16	1'74	17'41	81'20	1'88
	Paso 3º	10	0'31	28'63	4'66	2'86	28'63	133'55	7'57
RADICULA DE 3 a 4 cm.	Paso 1º	20	2'64	8'25	0'16	0'41	8'25	100	-
	Paso 2º	10	0'52	13'74	1'31	1'37	13'74	166'67	8'40
	Paso 3º	10	0'29	19'47	3'40	1'95	19'47	236'11	21'77

T A B L A X V

ENDOSPERMOS.									
PIÑONES	FRACCION	VOLUMEN ml.	PROTEINAS. mg/ml.	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. µE/1 h.	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ESPECÍFICA. µg/h/mg prot.	ACTIVIDAD UNIDADES. µg/h/ml.	ACTIVIDAD TOTAL. (µg/h/ml) x Vol.	RENDIMIENTO. %	PRURIFICACION. Relación de actividades enzimáticas específicas del 2º paso al 1º.
CERRADOS	Paso 1º	20	2'26	0	0	0	0	100	-
	Paso 2º	10	0'49	0	0	0	0	100	0
	Paso 3º	10	0'12	5'73	2'37	0'57	5'73	572'70	2'37
ABIERTOS	Paso 1º	20	1'51	9'90	0'33	0'49	9'90	100	-
	Paso 2º	10	0'75	8'25	0'55	0'82	8'25	83'34	1'68
	Paso 3º	10	0'23	22'91	4'98	2'29	22'91	231'49	15'24
APUNTANDO LA RADICULA.	Paso 1º	20	1'86	11'55	0'31	0'58	11'55	100	-
	Paso 2º	10	0'73	9'16	0'62	0'92	9'16	79'36	2'01
	Paso 3º	10	0'38	27'49	3'58	2'75	27'49	239'09	11'56
RADICULA DE 1'5 a 2 cm.	Paso 1º	20	2'32	16'49	0'35	0'82	16'49	100	-
	Paso 2º	10	1'05	14'66	0'69	1'47	14'66	88'89	1'96
	Paso 3º	10	0'35	22'91	3'26	2'29	22'91	138'89	9'19
RADICULA DE 3 a 4 cm.	Paso 1º	20	2'42	11'55	0'24	0'58	11'55	100	-
	Paso 2º	10	0'95	8'25	0'43	0'82	8'25	71'43	1'82
	Paso 3º	10	0'21	16'03	3'83	1'60	16'03	138'89	16'08

Respecto de la constante de Michaelis (K_m) se obtuvieron valores para cada uno de los pasos primero (extracto bruto) y tercero, de los embriones ó plántulas y endospermos de cada uno de los estadios de germinación de semillas (cerradas, abiertas, apuntando la radícula, con radícula de 1'5 a 2 cm y radícula de 3 a 4 cm.) descritos anteriormente.

Los valores medios de K_m de los embriones y endospermos de los pasos primero y tercero fueron respectivamente los siguientes:

Embriones, paso 1º $1'01 \cdot 10^{-2} M$ y paso 3º $1'01 \cdot 10^{-2} M$.

Endospermos, paso 1º $0'99 \cdot 10^{-2} M$ y paso 3º $0'99 \cdot 10^{-2} M$.

(Véase la TABLA XVI).

T A B L A XVI

SFERIONES.				ENDOSFERIENS.			
Valores me- dios.	Paso 1º	Paso 3º	Valor me- dio total.	Valores me - dios.	Paso 1º	Paso 3º	Valor medio total.
Km ($\cdot 10^{-2}M$).	1'01	1'01	1'01	Km ($\cdot 10^{-2}Li$).	0'99	0'99	0'99
\bar{v}_m ($\mu g/30'$)	24'22	23'63	23'92	\bar{v}_m ($\mu g/30'$)	18'95	22'80	22'87

A continuación se insertan la TABLA XVII y la curva en la Fig.2 (en la que se representa el valor medio de la Km según Lineweaver Burk) correspondientes a la Km y Vm medias de la suma de las de embriones y endospermos.

T A B L A XVII

	EMBRIONES.	ENDOSP-ERMOS.	VALOR MEDIO. (embriones más endospermos)
Km	$1'01 \cdot 10^{-2}$ M	$0'99 \cdot 10^{-2}$ M	$1'00 \cdot 10^{-2}$ M
Vm	23'92 $\mu\text{g}/30'$	20'87 $\mu\text{g}/30'$	22'40 $\mu\text{g}/30'$

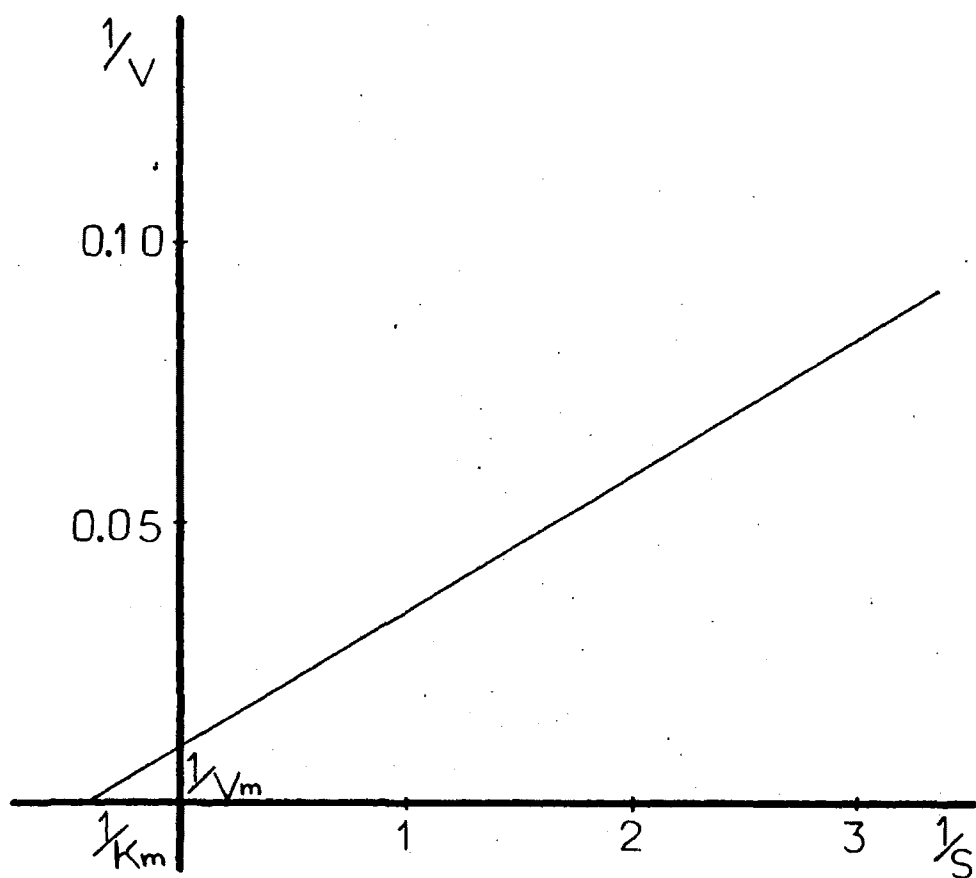


Fig. 2. δ -ALA sintética. K_m y V_m

medias de embriones y endospermos.

$$K_m = 1,00 \cdot 10^{-2} M, V_m = 22,40 \mu g/30'$$

Para las determinaciones de pH óptimo, temperatura óptima, relación lineal entre proteínas y formación de d-ALA, activadores ó inhibidores se partió de una mayor cantidad de piñones y siguieron igualmente las manipulaciones referidas en el Esquema II efectuándose sus técnicas de determinación en los pasos primero ó tercero según se indican en las gráficas; también se determinó en ambos la constante de Michaelis. Los piñones utilizados para ello fueron estratificados 92 días, puestos a germinar y germinados con plántulas de radícula de 1'5 a 2 cm. En la TABLA XVIII se representan los valores de las fracciones pasos primero y tercero.

T A B L A XVIII

PIÑONES.	FRACCION.	VOLUMEN ml.	PROTEI- NAS. mg/ml.	ACTIVI- DAD EN- ZIMATI- CA. µg/1 h.	ACTIVIDAD ENZIMATI- CA ESPECI- FICA. µg/h/mg prot.	ACTIVI- DAD UNI- DADES. µg/h/ml.	ACTIVI- DAD TO- TAL. (µg/h/ml) x Vol.	RENDI- MIENTO. %	PURIFI- CACION Relact ón de so- tivida- des enz. especif. 2º ó 3º paso al 1º.
<u>PLANTULAS.</u>									
RADICULA de 1'5 a 2 cm.	Paso 1º	303'1	0'90	450	1'66	1'48	450	100	-
	Paso 3º	100	0'07	574'92	26'91	5'75	574'92	127'76	16'25
<u>ENDOSPERMIOS</u>									
RADICULA DE 1'5 a 2 cm.	Paso 1º	303'1	1'09	340	1'03	1'12	340	100	-
	Paso 3º	100	0'08	449'93	18'45	4'50	449'93	132'33	17'98

Los valores medios de las K_m y V_m en las plántulas y endospermos se incluyen en la TABLA XIX.

Los valores medios de las K_m y V_m de la suma de plántulas y endospermos se insertan en la TABLA XX y vemos que son prácticamente iguales a los de la TABLA XVII, que provienen de los distintos estadios de germinación anteriormente reseñados.

La representación gráfica de Lineweaver Burk de la K_m no se efectúa porque sus valores son realmente idénticos a los de la Figura 2.

T A B L A XIX

PLANTULAS.				ENDOSPERMIOS.			
Valores medios	Paso 1º	Paso 3º	Valor medio total.	Valores medios	Paso 1º	Paso 3º	Valor medio total.
Km ($\cdot 10^{-2}$ M).	0'97	1'14	1'05	Km ($\cdot 10^{-2}$ M).	1'21	0'75	0'98
Vm ($\mu\text{g}/30'$).	26'60	25'00	25'80	Vm ($\mu\text{g}/30'$).	20'00	20'00	20'00

T A B L A XX

	PLANTULAS	ENDOSPERMIOS.	VALOR MEDIO (plántulas mas endospermos)
Km	$1'05 \cdot 10^{-2}$ M	$0'98 \cdot 10^{-2}$ M	$1'01 \cdot 10^{-2}$ M
Vm	25'80 $\mu\text{g}/30'$	20'00 $\mu\text{g}/30'$	22'90 $\mu\text{g}/30'$

En la Figura 3 está representado el pH óptimo 7'8 de la d-ALA sintetasa en el primer paso.

En la Figura 4 la temperatura óptima que es de 37° C.

En la Figura 5 se representa la relación lineal entre la concentración de proteínas (eje de abscisas) y la formación de d-ALA expresado en μg (eje de ordenadas); por ella vemos que tanto en plántulas como en endospermos a mayor cantidad de proteínas hay una correspondencia y mayor cifra de d-ALA formado por la actividad enzimática d-ALA sintetásica.

Los valores obtenidos en el paso tercero para las medidas del pH óptimo, temperatura óptima, relación lineal entre la concentración de proteínas y formación de d-ALA, activadores é inhibidores, fueron muy semejantes a las del paso primero, por eso no insertamos las gráficas correspondientes.

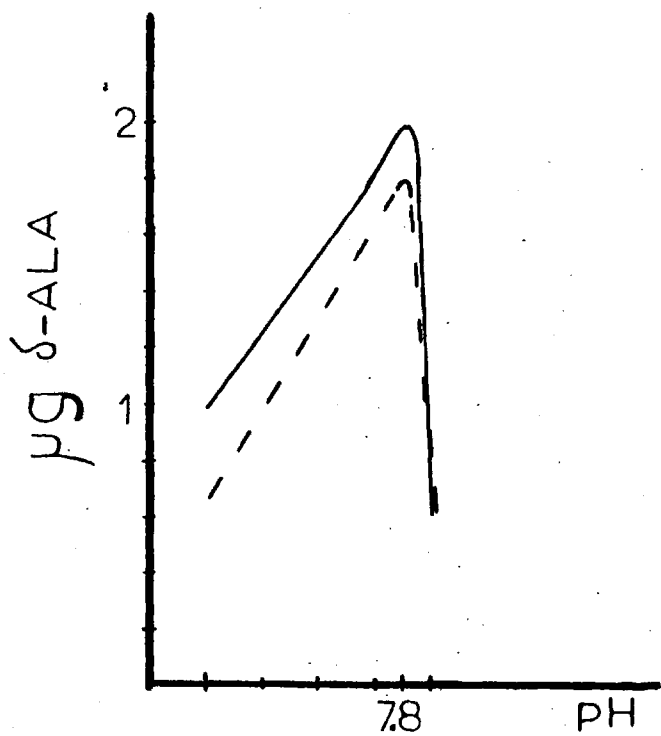


Fig.3 δ -ALA sintetasa. pH óptimo = 7,8. Plántulas(—); Endospermos(-----)

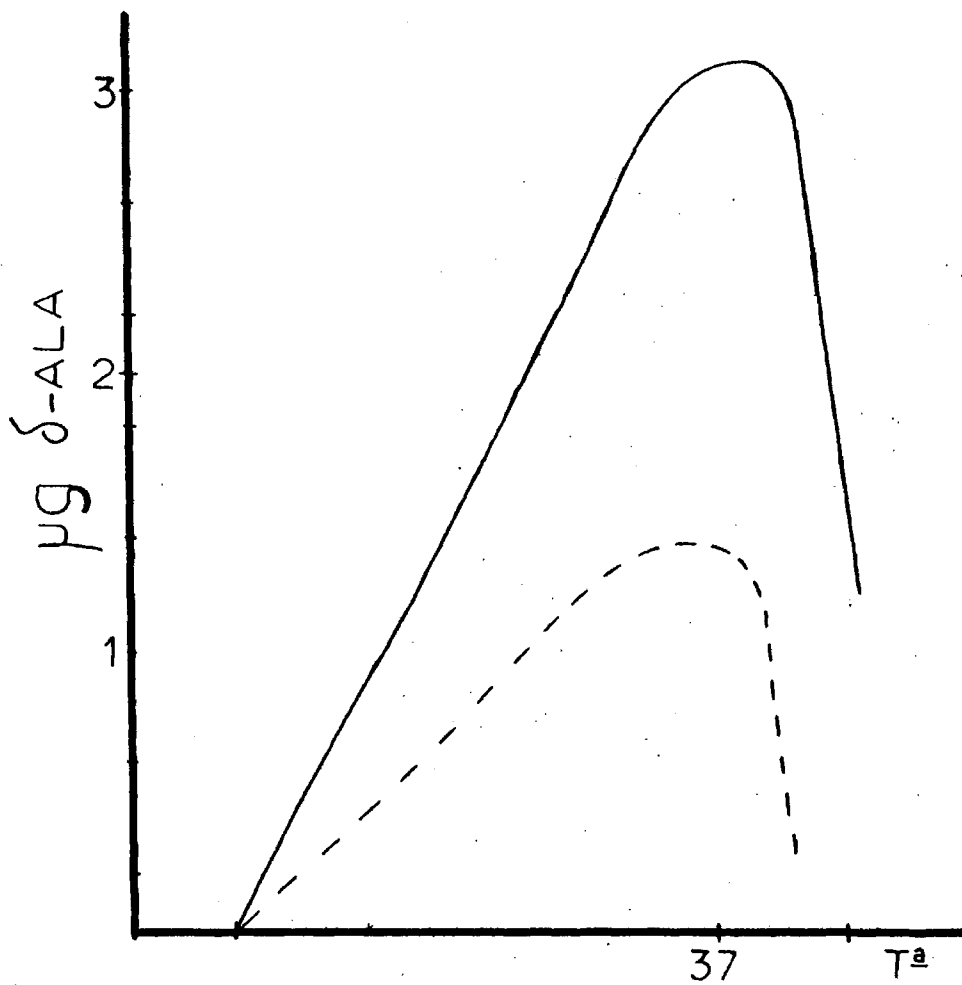


Fig.4 δ -ALA sintetasa. Temperatura óptima 37°C. Plántulas(—); Ecospermos(-----)

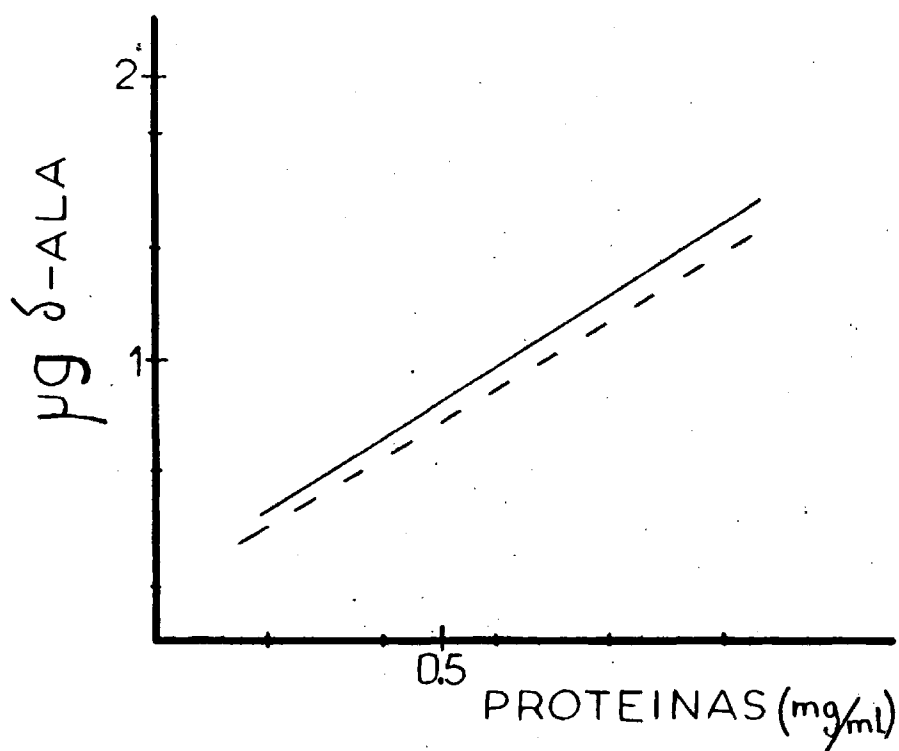


Fig.5 δ -ALA sintetasa. Relación entre proteínas y formación de δ -ALA
 Plántulas(—); Endospermos(-----)

En las Figuras 6, 7, y 8 se representan las gráficas correspondientes a la acción de activadores como etionina, tiamina y hemina sobre la actividad enzimática d-ALA sintetásica.

En las Figuras 9, y 10 las de inhibidores como sulfato cúprico y sulfato férrico y en la Figura 11 la de un blanco comparativo sin ningún efecto influyente ó inhibitorio. En cada una de las gráficas se pone en el eje de ordenadas la velocidad respectiva expresada en μg de d-ALA y en el eje de abscisas la concentración del sustrato en el caso del blanco y en los demás la concentración del activador ó del inhibidor.

En ellas se puede observar una cierta linealidad proporcional entre el sustrato, el sustrato con adición de activador ó inhibidor y la actividad enzimática (expresada por v en μg de d-ALA.)

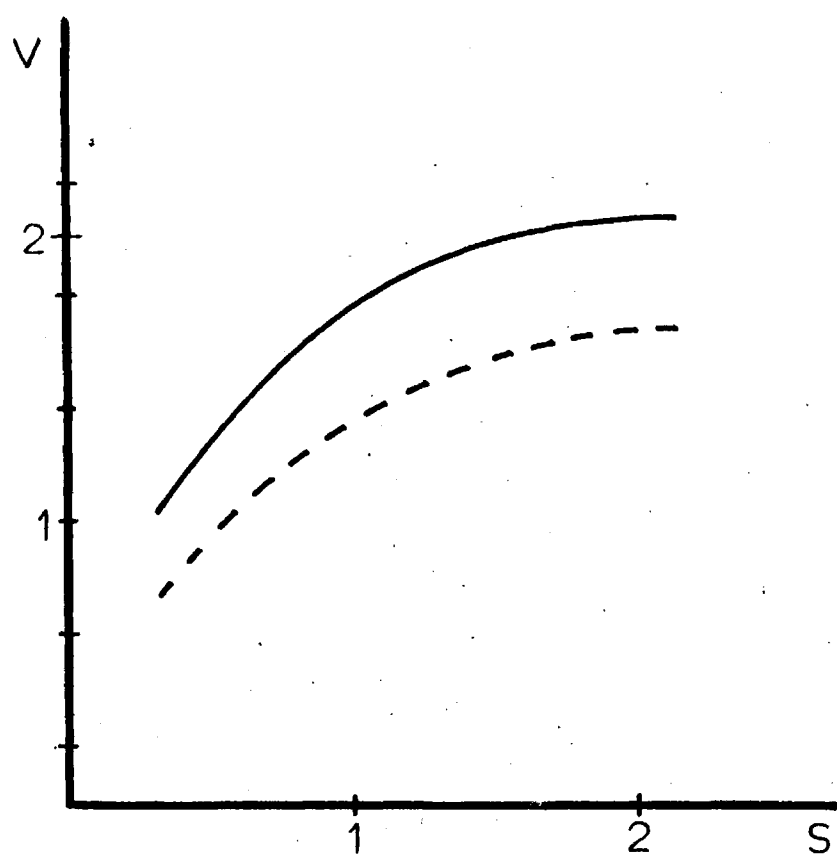


Fig.6 δ -ALA sintetas. Activación con etionina. Plántulas(—); Endospermos(-----).

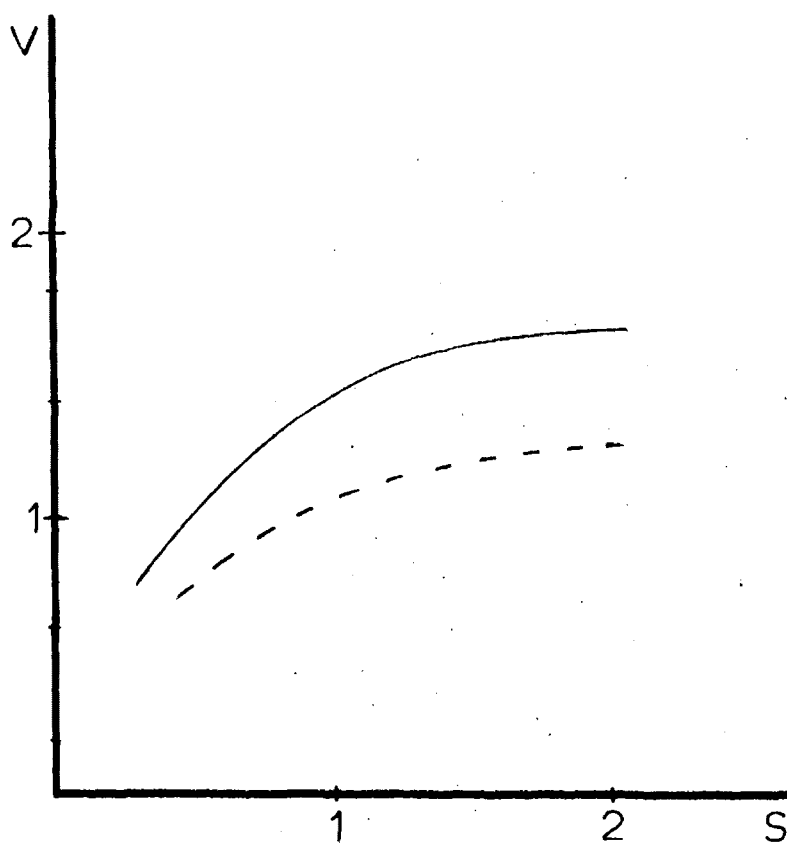


Fig.7 δ -ALA sintetasa. Activación con tiamina. Plántulas(—); Endospermos(-----)

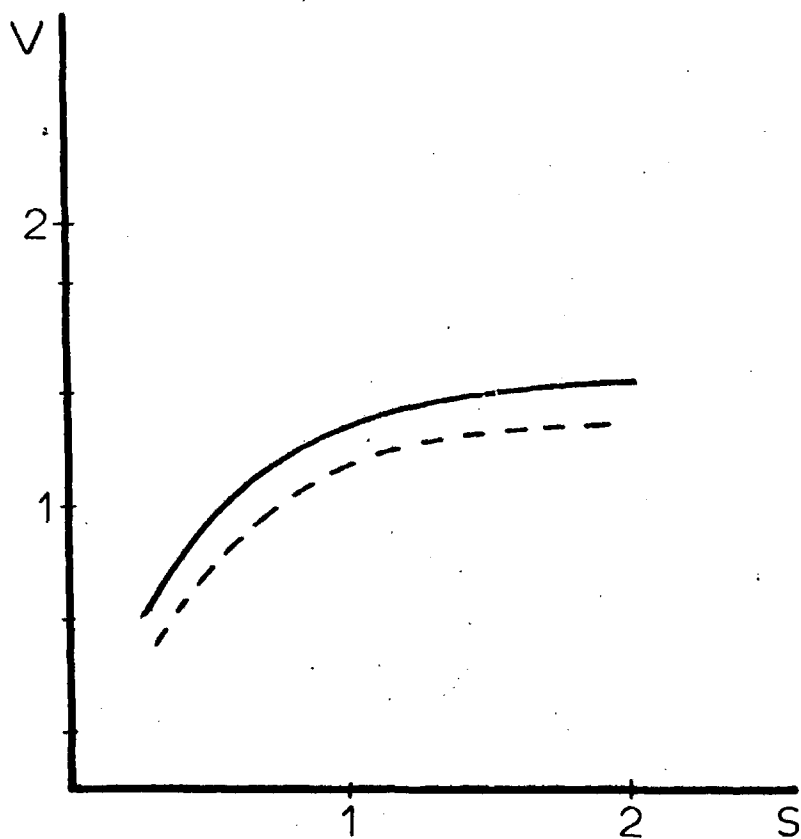


Fig.8 δ -ALA sintetasa. Activación con hemina. Plántulas(—); Endospermos(-----)

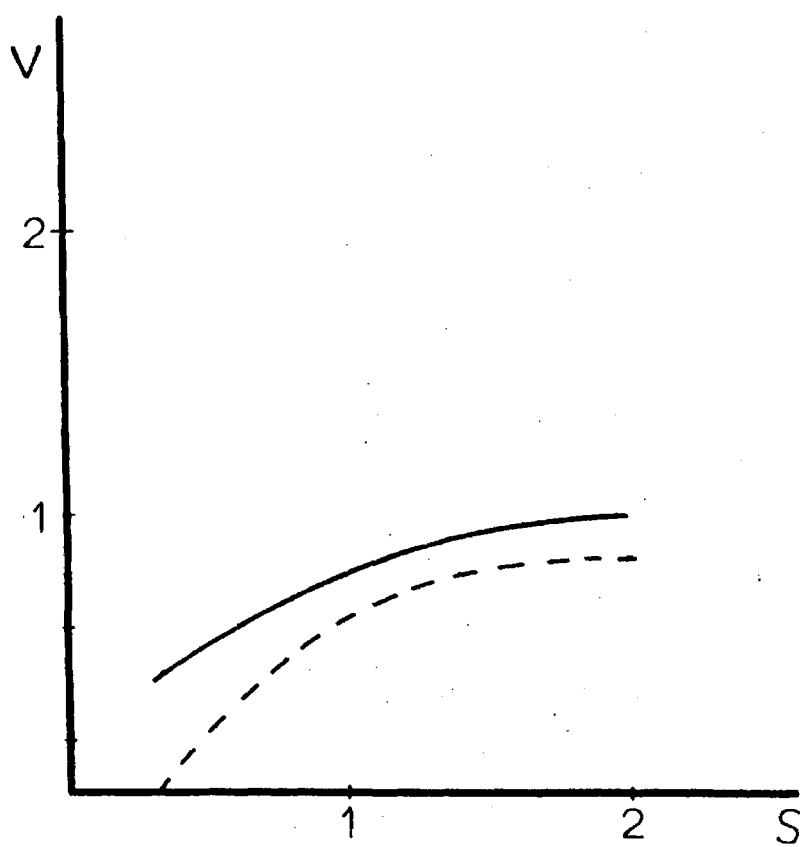


Fig.9 δ -ALA sintetasa. Inhibición con sulfato cúprico. Plántulas(—); Endospermos(-----)

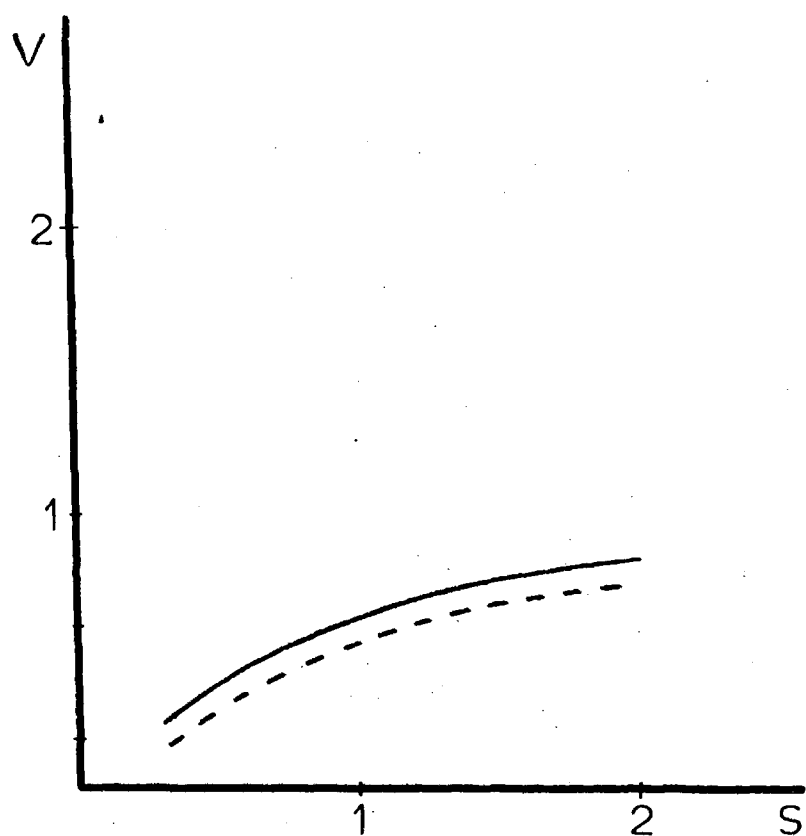


Fig.10 δ -ALA sintetasa. Inbibición con sulfato férrico. Plátulas(—); Endospermos(-----)

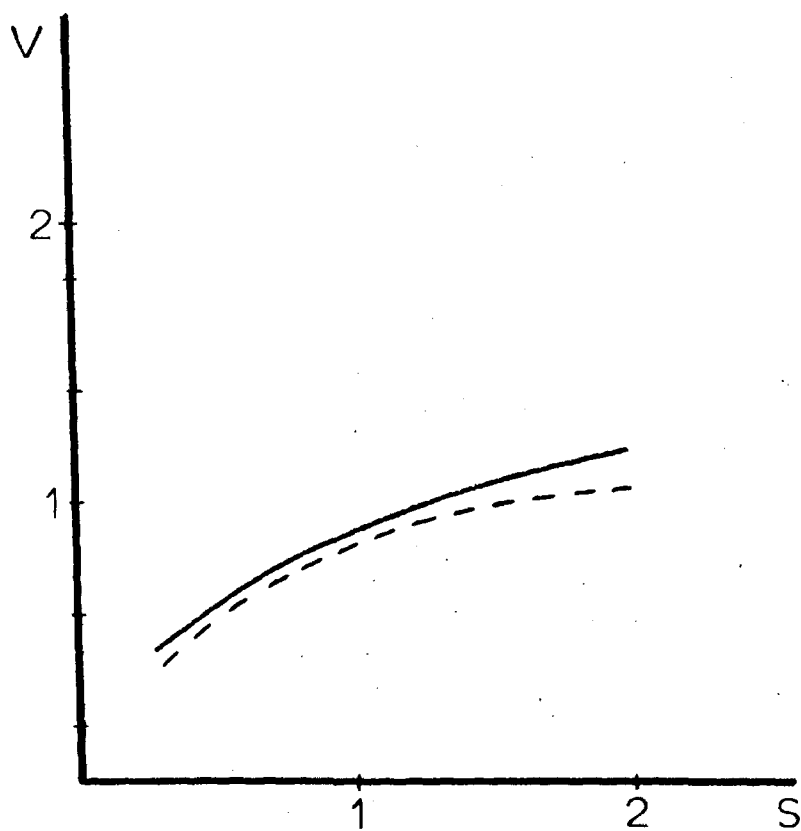


Fig.11 δ -ALA sintetasa, Blanco.

Plántulas(—); Endospermos(-----)



Con objeto de establecer la comparación entre los valores obtenidos en las gráficas correspondientes a las Figuras 6, 7, 8, 9, 10 y 11 se consignan sus resultados en la TABLA XXI, por orden de mayor a menor en sus diversas determinaciones y sus valores medios. Por ello se puede comprobar que la etio - nina, tiamina y hemina son activadores con respecto al blan - co y el sulfato cúprico y el sulfato férrico inhibidores de la actividad d-ALA sintetásica.

Por último se incluye una gráfica con las barras para esta - blecer el orden de activación (véase Figura 12), representando en el eje de ordenadas los valores medios de cada una de las sustancias ensayadas en comparación con el blanco, tanto en plántulas como en endospermos.

T A B L A I

MOLARIDAD (s)	STIONINA (v) µg d-ALA	TIAMINA (v) µg d-ALA	HEMINA (v) µg d-ALA	BLANCO (v) µg d-ALA	SULFATO CUPRICO (v) µg d-ALA	SULFATO FERRICO (v) µg d-ALA
PLANTULAS.						
2	2'06	1'65	1'48	1'15	0'99	0'82
1	1'89	1'48	1'31	0'90	0'82	0'66
0'66	1'65	1'23	1'23	0'74	0'66	0'49
0'50	1'40	0'99	0'99	0'57	0'57	0'41
0'30	0'99	0'74	0'66	0'41	0'41	0'24
0'89	1'59 >	1'21 >	1'13 >	0'75 >	0'69 >	0'52 VALOR MEDIO
ENDOSPERMIOS.						
2	1'65	1'23	1'31	1'06	0'82	0'74
1	1'40	1'07	1'23	0'82	0'74	0'57
0'66	1'23	0'99	0'99	0'74	0'49	0'41
0'50	0'99	0'82	0'74	0'64	0'24	0'33
0'30	0'74	0'66	0'49	0'49	-	0'16
0'89	1'20 >	0'95 =	0'95 >	0'75 >	0'57 >	0'44 VALOR MEDIO

- 113 -

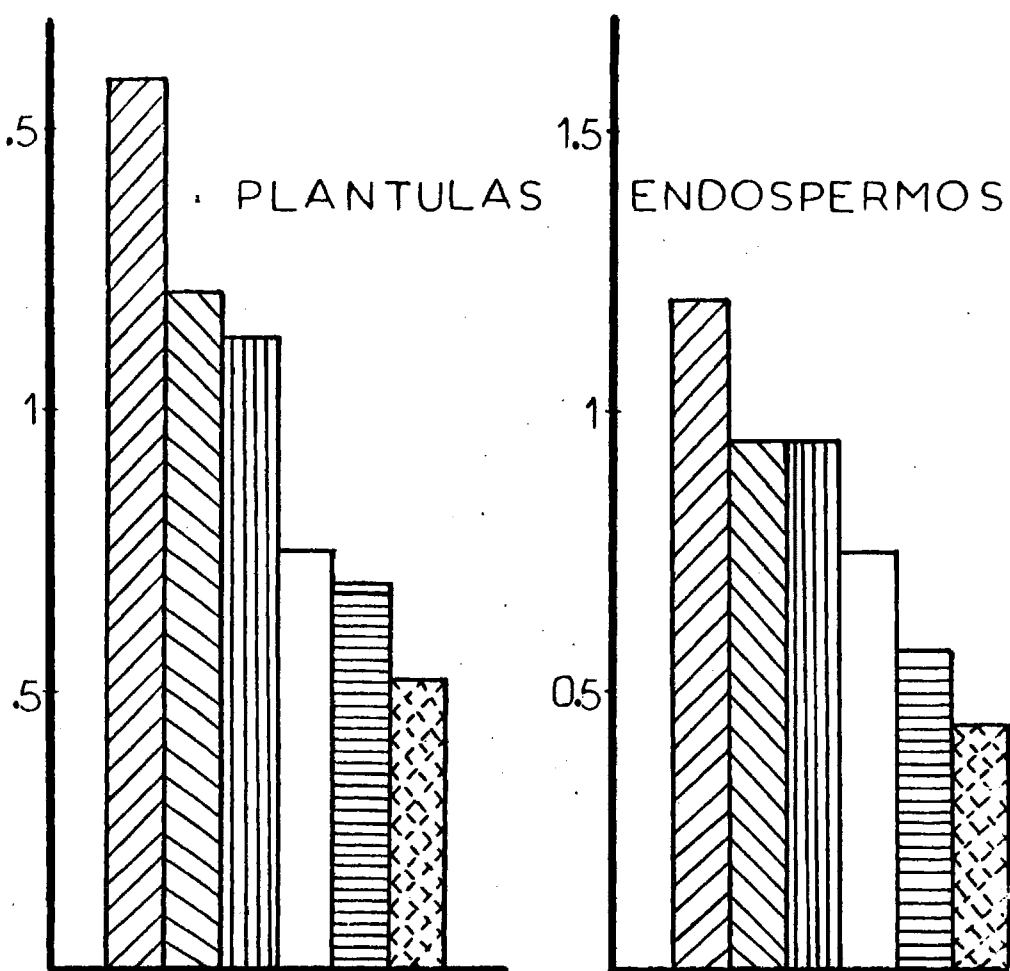


Fig.12 δ -ALA sintetasa. Activadores e inhibidores

Etionina

Tiamina

Hemina

Blanco

Sulfato cúprico

Sulfato férrico

4.2.2.- d-ALA dehidrasa.

4.2.2.1.- Preparación y purificación.

Para la preparación y purificación de la d-ALA dehidrasa se siguió la metodología descrita en el apartado 4.1.2 y subapartados 4.1.2.1, 4.1.2.2, 4.1.2.3, 4.1.2.4, 4.1.2.5 y 4.1.2.6 de Material y métodos y los resultados fueron obtenidos con arreglo al siguiente ESQUEMA III.

En este mismo esquema se indican las determinaciones efectuadas.

E S Q U E M A III

Finones.

Embriones.

Endospermos.

Extracto bruto, 300 ml (paso 1º)

Igual que para los embriones.

Determinar: Proteínas; Actividad enzimática; Actividad enzimática específica; pH óptimo; y queda el resto del extracto bruto.

Precipitación del resto del extracto bruto con acetona a -30° C.

Centrifugación y recogida del precipitado.

Suspensión del precipitado en buffer.

Diálisis contra buffer de menor molaridad.

Centrifugación y recolección del sobrenadante.

Precipitación del sobrenadante con sulfato amónico.

Centrifugación y recogida del precipitado.

Diálisis del precipitado más buffer con buffer de distinta composición (paso 4º).

Determinar: Proteínas; Actividad enzimática; Actividad enzimática específica y K_m , queda el resto del paso 4º.

Pasar por columna de DEAE celulosa el resto del paso 4º y lavar hasta la ausencia de proteínas.

Elución con $ClK\ 0.18\ M$ (Eluato).

Determinar: Proteínas, Actividad enzimática; Actividad enzimática específica; pH óptimo; K_m e inhibidores (ácido levulínico, cianuro sódico, malonato sódico, arsenito sódico y azida sódica).

4.2.2.2.- Determinaciones en piñones en diferentes es-
tadios de germinación: actividad enzimática,
proteínas, actividad enzimática específica,
constante de Michaelis, pH óptimo e inhibi-
dores de la acción enzimática.

Se realizaron determinaciones seriadas de proteínas, actividades enzimáticas, actividades enzimáticas específicas, agregando y sin agregar d-ALA y de Km en las fracciones primer paso, cuarto paso y eluato en embriones, plántulas y endospermos de:

- Piñones estratificados 55 días, puestos a germinar 5 d. y cerrados.
- Piñones estratificados 90 días, puestos a germinar y abiertos.
- Piñones estratificados 130 días, germinados apuntando la radícula.
- Piñones estratificados 130 días, germinados con radícula 0'5 a 1 cm.
- Piñones estratificados 130 días, germinados con radícula de 3'5 cm. ó mayor.

Para realizar estas determinaciones se partió siempre de una cantidad de semillas exactamente pesadas pero alrededor de 50 gr.

A continuación se incluyen en la TABLA XXII los datos correspondientes a los valores de proteínas y actividades enzimáticas.

En la TABLA XXIII los relativos a las actividades enzimáticas específicas y en la TABLA XXIV las relaciones de las proteínas del paso primero al eluato y actividades enzimáticas específicas del eluato al primer paso.

T A B L A XXII

EMBRIONES (referidos a 300 ml)			ENDOSPERMIOS (referidos a 300 ml)								
PROTEINAS (mg)			ACTIVIDAD ENZIMATI- CA (µg/h)			PROTEINAS (mg)			ACTIVIDAD ENZIMATI- CA (µg/h)		
Paso 1º	Paso 4º	Eluato	Paso 1º	Paso 4º	Eluato	Paso 1º	Paso 4º	Eluato	Paso 1º	Paso 4º	Elu.
<u>CERRADOS.</u>											
196'8	4'82	5'36	0'94	0'17	0'18	437	13'21	10'21	1'89	0'29	0'30
<u>ABIERTOS.</u>											
<u>APUNTANDO LA RADICULA</u>											
176'9	22'17	11'78	1'41	0'31	0'31	184'80	32'70	14'67	6'04	1'01	0'98
<u>RADICULA DE 0'5 a 1 cm.</u>											
197'1	57	4'26	1'70	0'71	0'84	292'70	72'02	6'36	0'94	0'24	0'36
<u>RADICULA DE 3'5 cm. ó más.</u>											
142'50	23'45	2'07	2'83	0'44	0'41	272'02	43'38	5'71	2'74	0'74	0'34
203'50	23'98	7'31	4'53	0'51	0'48	147'70	18'02	4'75	2'64	0'46	0'47

T A B L A XXIII

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ESPECÍFICA ($\mu\text{g}/1 \text{ h}/1 \text{ mg. proteínas}$)											
EMBRIONES.						ENDOSPERMIOS.					
Paso 12		Paso 42		Eluato		Paso 12		Paso 42		Eluato	
Con d-ALA	Sin d-ALA	Con d-ALA	Sin d-ALA	Con d-ALA	Sin d-ALA	Con d-ALA	Sin d-ALA	Con d-ALA	Sin d-ALA	Con d-ALA	Sin d-ALA
4'80	3'84	36'46	27'97	34'14	25'0	4'32	3'24	22'56	18'39	29'77	23'80
<u>CERRADOS.</u>											
8'01	6'41	14'03	9'16	26'82	18'59	32'73	24'54	31'04	22'75	67'21	49'33
<u>ABIERTOS.</u>											
<u>APUNTANDO LA RADÍCULA</u>											
8'63	0	12'58	4'51	197'18	80'05	3'23	0	3'37	5'07	57'39	70'91
<u>RADÍCULA DE 0'5 a 1 cm.</u>											
19'89	15'25	19'04	9'23	200'02	135'31	10'07	8'34	17'15	14'04	59'72	42'73
<u>RADÍCULA DE 3'5 cm. ó más.</u>											
22'29	6'96	21'44	11'28	66'64	41'65	17'91	14'71	25'53	20'27	99'99	76'91

T A B L A XXIV

EMBRIONES (µg FBG referidos a 300 ml)		ENDOSPERMIOS (µg FBG referidos a 300ml)			
Relación de proteínas del paso 1º al eluato (mg)	Relación de actividades específicas del eluato al paso 1º. (µg/1 h/1 mg prot.)		Relación de proteínas del paso 1º al eluato. (mg)	Relación de actividades específicas del eluato al paso 1º. (µg/1 h/1 mg prot.)	
	Con d-ALA	Sin d-ALA		Con d-ALA	Sin d-ALA
36'72	7'11	<u>OSERADOS.</u>		42'80	6'88
		6'51			
15'02	3'35	<u>ABIERTOS.</u>		12'60	2'05
		2'90			
46'27	22'85	<u>APUNTANDO LA RADICULA.</u>		46'02	17'78
		80'05			
68'84	10'05	<u>RADICULA DE 0'5 a 1 cm.</u>		47'64	5'93
		8'87			
27'84	2'99	<u>RADICULA DE 3'5 cm. ó más.</u>		31'09	5'58
		5'98			

En las TABLAS XXV y XXVI se representan los valores
de las TABLAS XXII, XXIII y XXIV.

T A B L A XXV

EMBRIONES (CON d-ALA)									
PIÑONES.	FRACCION.	VOLUMEN. ml.	PROTEINAS. mg/ml.	ACTIVI- DAD EN- CIMATI- CA. mg/h.	ACTIVI- DAD EN- CIMATI- CA ES- PECIFI- CA. µg/ h/mg. prot.	ACTIVI- DAD U- NIDA - NES. µg/h/ ml.	ACTIVI- DAD TO- TAL. µg/h/ ml) x Vol.	RENDA- MIEN - TO. %	PURIFICACION Relación de actividades enzimáticas específicas del eluato 6 4º paso al 1º.
CERRADOS	Paso 1º	300	0'656	0'94	4'80	3'15	945	100	-
	Paso 4º	15	0'036	0'18	36'46	11'73	176	18'62	7'59
	Eluato	25	0'018	0'18	34'14	7'32	183	19'36	7'11
ABIERTOS	Paso 1º	300	0'590	1'42	3'01	4'72	1417	100	-
	Paso 4º	15	0'074	0'31	14'03	20'73	311	21'95	1'75
	Eluato	25	0'039	0'32	26'82	12'64	316	22'30	3'35
AFUNTAN- DO LA RA- DICULA.	Paso 1º	300	0'657	1'70	8'63	5'67	1701	100	-
	Paso 4º	15	0'190	0'72	12'58	47'80	717	42'15	1'46
	Eluato	25	0'014	0'84	197'18	33'60	840	49'38	22'85
RADICULA 0'5 a 1 cm.	Paso 1º	300	0'475	2'83	19'89	9'45	2835	100	-
	Paso 4º	15	0'078	0'45	19'04	29'73	446	15'73	0'96
	Eluato	25	0'007	0'41	200'02	16'56	414	14'60	10'05
RADICULA 3'5 cm. 6 más.	Paso 1º	300	0'678	4'54	22'29	15'12	4536	100	-
	Paso 4º	15	0'080	0'51	21'44	34'27	514	11'33	0'96
	Eluato	25	0'024	0'49	65'64	19'48	487	10'74	2'99

T A B L A XXVI

ENDOSPERMIOS (con dmALA).									
PIÑONES.	FRACCION.	VOLUMEN. ml.	PROTEINAS mg/ml.	ACTIVI- DAD EN- CIMIATI- CA. mg/h.	ACTIVI- DAD EN- CIMIATI- CA ES - PECIFI- CA. µg/ h/1 mg. prot.	ACTIVI- dad U - NIDA - DES. µg/h/ ml.	ACTIVI- DAD TO- TAL. (µg/h/ ml) x Vol.	RENDI- MIEN - TO. %	PURIFICACIO- Relación de actividades enzimáticas específicas al eluato ó 4º paso al 1º.
CERRADOS	Paso 1º	300	1'457	1'89	4'32	6'30	1890	100	-
	Paso 4º	15	0'044	0'30	22'56	19'87	298	15'77	5'22
	Eluato	25	0'034	0'30	29'77	12'16	304	16'08	6'88
ABIERTOS	Paso 1º	300	0'616	6'05	32'73	20'16	6048	100	-
	Paso 4º	15	0'109	1'01	31'04	67'67	1015	16'78	0'95
	Eluato	25	0'049	0'99	67'21	39'44	986	16'30	2'05
ADUNTAN- TANDO LA RADICULA	Paso 1º	300	0'976	0'94	3'23	3'15	945	100	-
	Paso 4º	15	0'240	0'24	3'37	16'20	243	25'71	1'04
	Eluato	25	0'021	0'36	57'39	14'60	365	38'62	17'78
RADICULA 0'5 a 1 cm.	Paso 1º	300	0'907	2'74	10'07	9'13	2740	100	-
	Paso 4º	15	0'145	0'74	17'15	49'60	744	27'15	1'70
	Eluato	25	0'019	0'34	59'72	13'64	341	12'44	5'93
RADICULA 3'5 cm. ó más.	Paso 1º	300	0'492	2'65	17'91	8'82	2646	100	-
	Paso 4º	15	0'060	0'46	25'53	30'67	460	17'38	1'42
	Eluato	25	0'016	0'47	99'99	19'00	475	17'95	5'58

Respecto de la K_m se obtuvieron valores para cada uno de los pasos cuarto y quinto de los embriones, plántulas y endospermos de cada uno de los estadios de germinación de semillas (cerradas, abiertas, apuntando la radícula, con radícula de 0.5 a 1 cm, y radícula de 3.5 cm. ó más), cuyos valores medios fueron de $1.55 \cdot 10^{-2}$ M para embriones y $1.42 \cdot 10^{-2}$ M para endospermos y V_m respectivos de 48.61 $\mu\text{g}/30'$ y 44.77 $\mu\text{g}/30'$.

Repetidas estas determinaciones de K_m y V_m , se obtuvieron los siguientes valores definitivos de la TABLA XXVII, y en la Figura 13 se inserta la curva correspondiente a la K_m y V_m medias de la suma de las de embriones y endospermos.

T A B L A XXVII

	EMBRIONES.	ENDOSPERMOS.	VALOR MEDIO (embriones mas endospermos)
K _m	1'49.10 ⁻² M	1'13.10 ⁻² M	1'32.10 ⁻² M
V _m	47'50 µg/30'	43'11 µg/30'	45'30 µg/30'

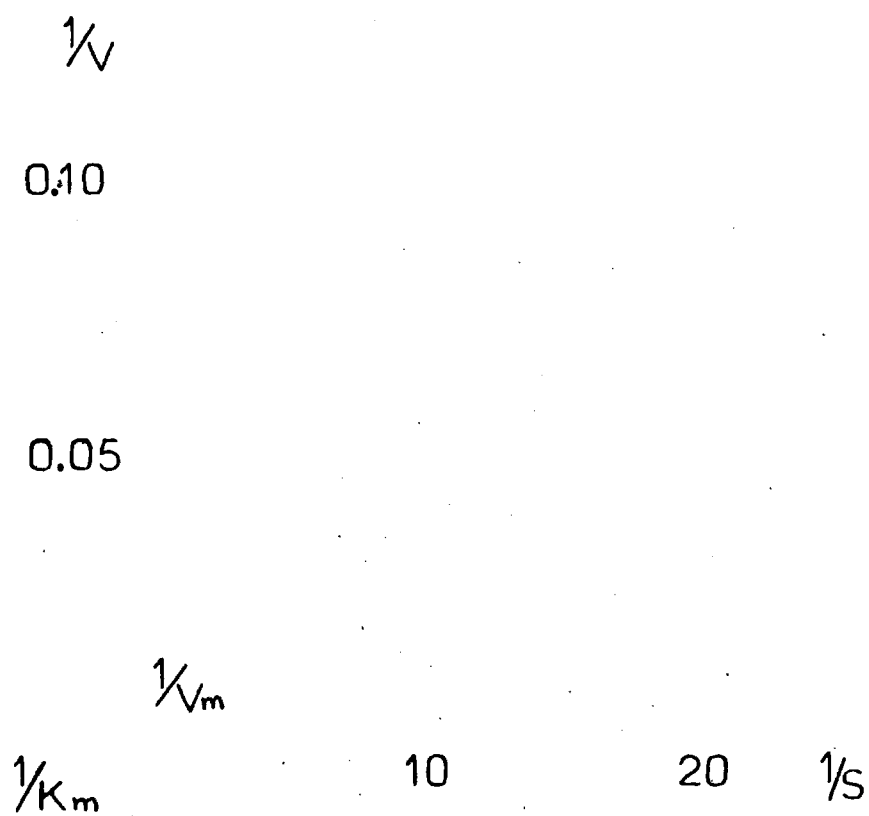


Fig.13 δ -ALA dehidrasa. K_m y V_m medias de embriones y endospermos. $K_m = 1,32 \cdot 10^{-2} M$ y $V_m = 45,3 \mu g/30'$

Para la determinación del pH óptimo é inhibidores respecto a la actividad enzimática, se partió de una mayor cantidad de piñones y se siguieron igualmente las manipulaciones referidas en el ESQUEMA I.

Los piñones de que se partió fueron estratificados 64 días y se pusieron a germinar, se emplearon germinados con radícula de 0'1 cm. a 1 cm. de longitud.

Las actividades enzimáticas y actividades enzimáticas específicas de plántulas y endospermos se incluyen en la T A B L A XXVIII, y los valores de estos datos se representan en la T A B L A XXIX.

T A B L A XXVIII

PLANTULAS (referido a 300 ml).			ENDOSPERMIOS (referido a 300 ml)		
Paso 12	Proteínas.	244'8 mg	Paso 12	Proteínas	310'2 mg
	Actividad enzimática.	2'7 mg/h		Actividad enzimática	2'08 mg/h
	Actividad enzimática específica.	11'05 $\mu\text{g}/\text{h}/$ mg prot		Actividad enzimática específica	6'70 $\mu\text{g}/$ h/mg prot
Eluato	Proteínas.	14'82 mg	Eluato	Proteínas.	12'0 mg
	Actividad enzimática.	1'09 mg/h		Actividad enzimática	0'98 mg/h
	Actividad enzimática específica.	73'96 $\mu\text{g}/\text{h}$ mg prot.		Actividad enzimática específica.	81'90 $\mu\text{g}/$ h/mg prot
Relación de proteínas del pa- so 12 al eluato.			Relación de proteínas del paso 12 al eluato.		
16'48			25'85		
Relación de la actividad enzi- mática específica del eluato al paso 12.			Relación de la actividad enzimática específica del eluato al paso 12.		
6'69			12'22		

T A B L A XXIX

	FRACCION.	VOLUMEN. ml.	PROTEINAS mg/ml.	ACTIVI- DAD EN- ZIMATI- CA. mg/h.	ACTIVI- DAD EN- ZIMATI- CA ESPE- CIFICA. mg/h/1 mg prot.	ACTIVI- DADES HIDRAES mg/h/ ml.	ACTIVI- DAD TO- TAL. (mg h/ml) x Vol.	RENDI- MIEN- TO. %	PURIFICA- CION. Rela- cion de ac- tividades enzimáticas específicas del eluato ó 4º paso al 1º.
PLANTULAS (con d-ALA)	Paso 1º	300	0'814	2'70	11'05	9'00	2700	100	-
	Eluato	40	0'049	1'10	73'96	27'40	1096'2	40'60	6'69
ENDOSPERMOS (con d-ALA)	Paso 1º	300	1'034	2'08	6'70	6'93	2089	100	-
	Eluato	40	0'040	0'98	81'90	24'57	983	47'28	12'22

Se practicaron las determinaciones de Km y Vm en los eluatos de embriones y endospermos (véase Fig.13) con los siguientes resultados incluidos en la TABLA XXX, como se puede observar los valores de Km de embriones y de endospermos, así como de su valor medio de los eluatos de estas semillas estratificadas 64 días, puestas a germinar y germinadas con una longitud de radícula de 0'1 a 1 cm., son muy semejantes a las cifras medias obtenidas de la Tabla XXVII y por eso no se realiza su representación gráfica.

T A B L A X X X

	EMBRIONES.	ENDOSPERMOS.	VALOR MEDIO. (embriones mas endospermos)
Km	$1'43 \cdot 10^{-2} \text{L}$	$1'35 \cdot 10^{-2} \text{L}$	$1'39 \cdot 10^{-2} \text{L}$
Vm	62'50 $\mu\text{g}/30'$	47'62 $\mu\text{g}/30'$	55'06 $\mu\text{g}/30'$

A continuación se incluyen las Figuras 14 y 15 que representan los pH óptimos 7'8 de la d-ALA dehidrasa en el paso 1º y eluato de plántulas y endospermos de los pinones estratificados 64 días, puestos a germinar después y germinados con plántulas de radícula de 0'1 a 1 cm. de longitud.

En la Figura 16 se puede comprobar cómo a medida que aumenta la concentración del ácido levulínico (eje de abscisas) disminuye la concentración de PBG (eje de ordenadas) demostrándose así su carácter inhibitorio.

En las Figuras 17, 18, 19 y 20 se puede seguir el mismo razonamiento que para la Fig. 16 y comprobarse que el cianuro sódico, malonato sódico, arsenito sódico, y azida sódica ejercen igualmente de manera significativa su poder de inhibición sobre la d-ALA dehidrasa.

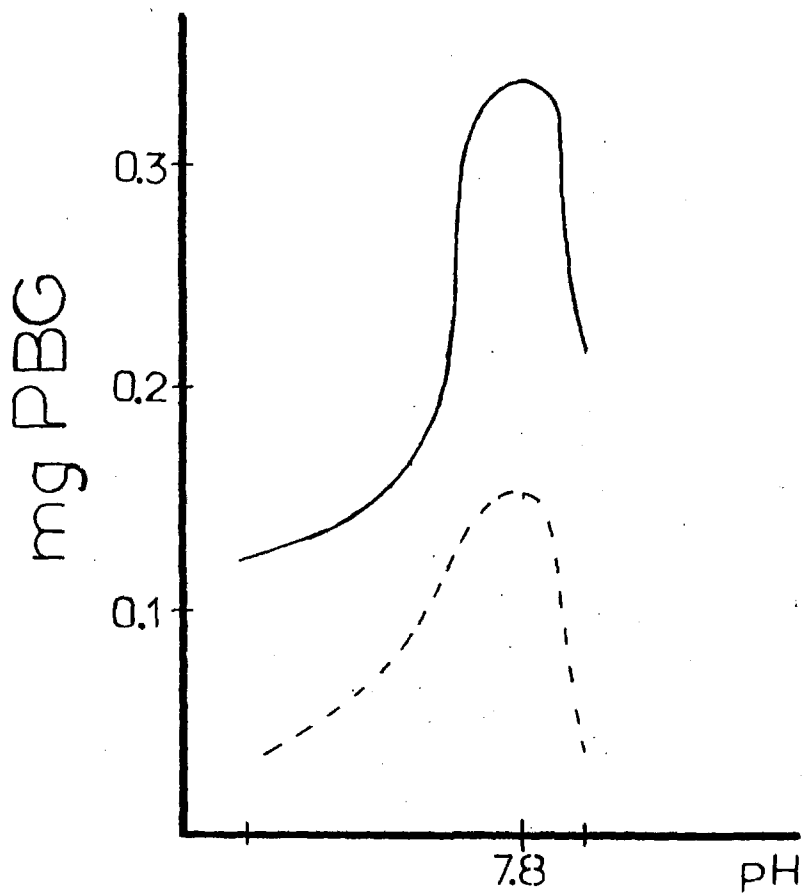


Fig.14 δ -ALA dehidrasa. Paso 1°. pH

óptimo 7,8. Plántulas(—); Endos-

permos(-----)

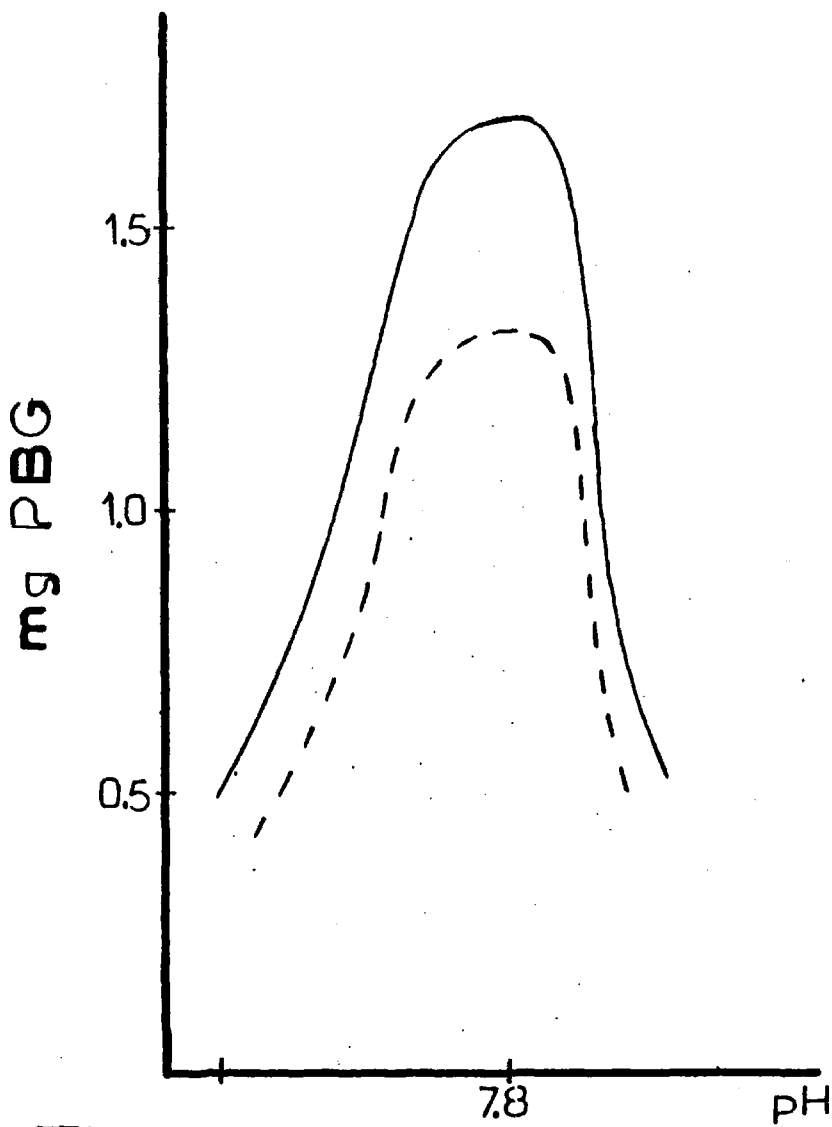


Fig.15 δ -ALA dehidrasa. Eluato.

pH óptimo 7,8. Plántulas(—); En-

dospemos(-----)

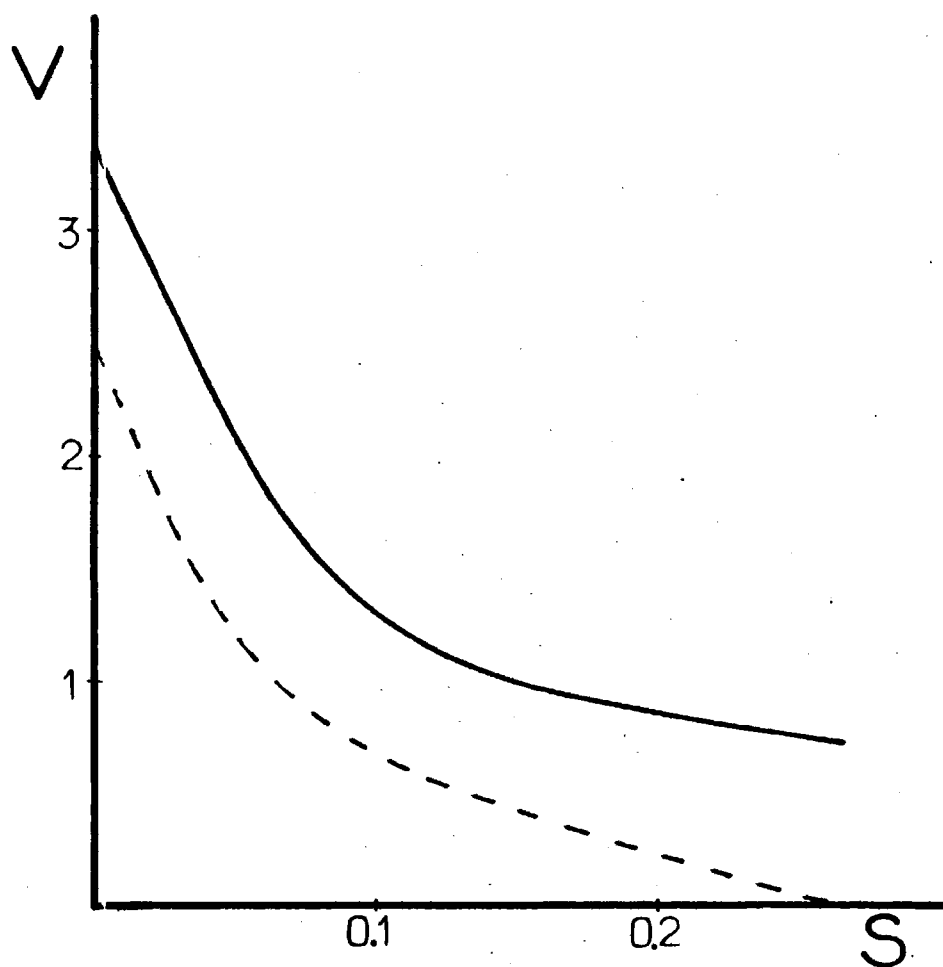


Fig.16 δ -ALA dehidrasa. Inhibición con ác. levulínico. Plántulas (—); Endospermos (-----)

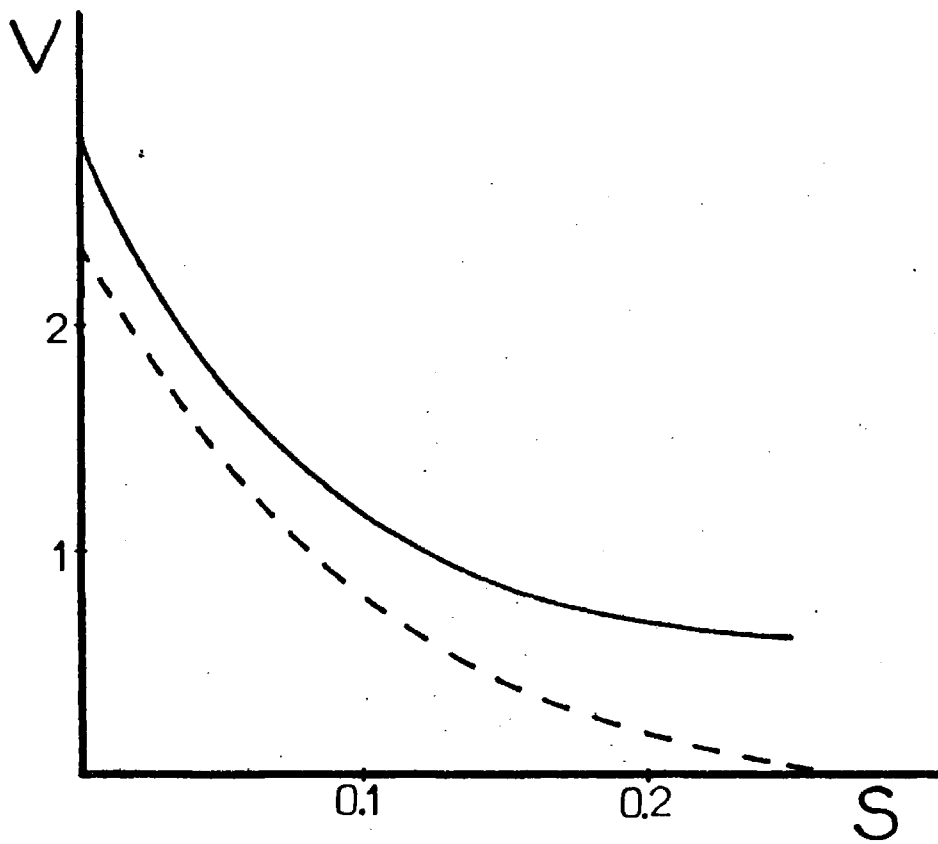


Fig.17 δ -ALA dehidrasa. Inhibición con cianuro sódico. Plántulas (—); Endospermos (-----)

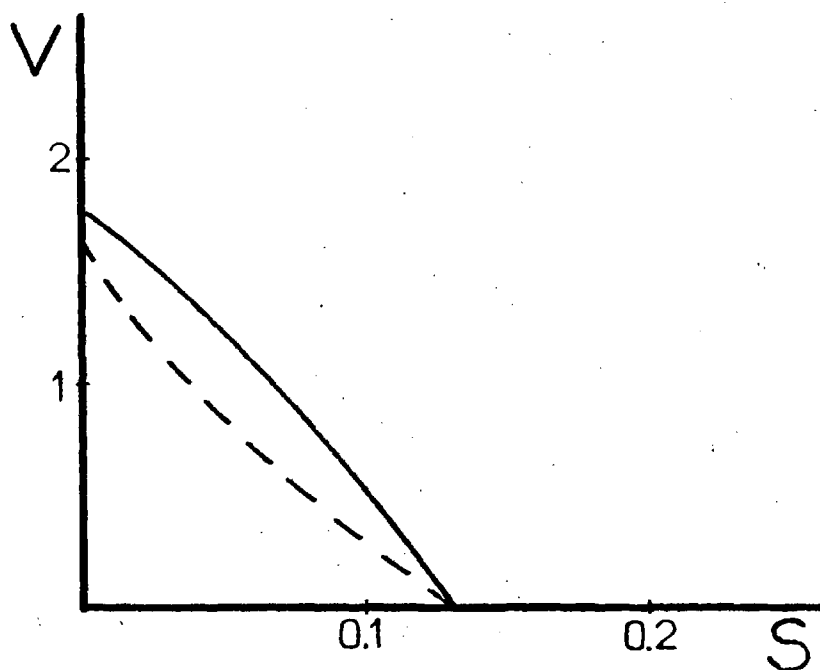


Fig.18 δ -ALA dehidrasa. Inhibición con malonato sódico. Plántulas (—); Endospermos (-----)

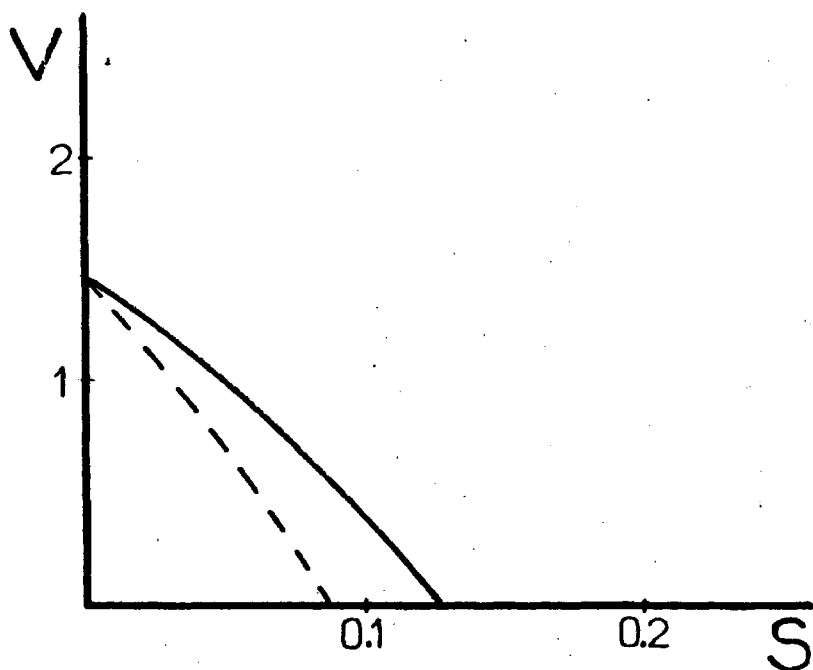


Fig.19 δ -ALA dehidrasa. Inhibición
 con arsenito sódico. Plántulas (—);
 Endospermos (-----)

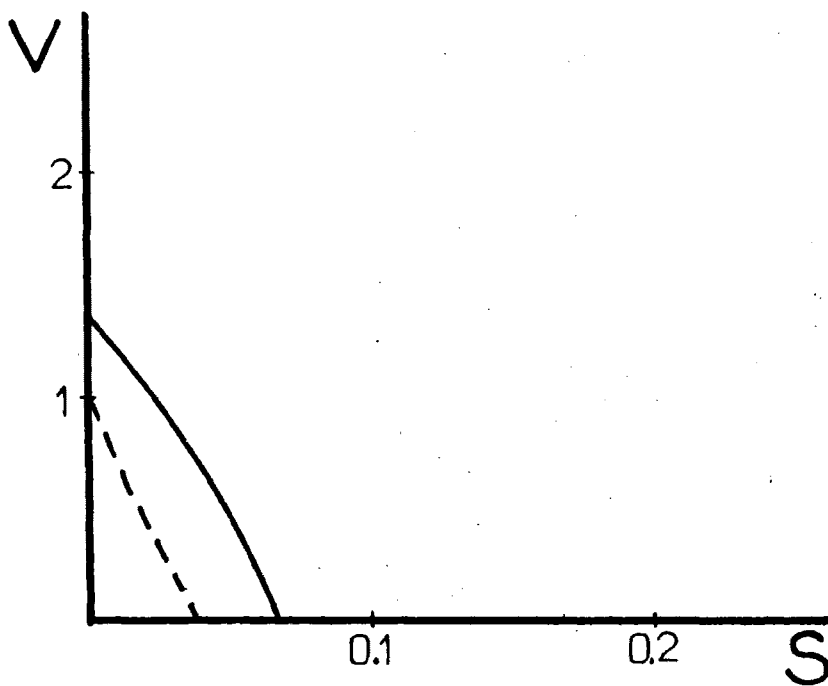


Fig.20 δ -ALA dehidrasa. Inhibición con azida sódica. Plántulas (—); Endospermos (-----)

Con el fin de establecer una comparación entre los valores obtenidos en las Figuras 16, 17, 18, 19 y 20 se consignan sus resultados en la TABLA XXXI, por orden de menor a mayor poder inhibidor y sus valores medios en relación con el blanco.

Tambien de incluye una gráfica con barras para establecer el orden de inhibición (véase Fig. 21), representando en el eje de ordenadas los valores medios de cada uno de los inhibidores (ácido levulínico, cianuro sódico, malonato sódico, arsenito sódico y azida sódica) tanto en plántulas como en endospermos.

T A B L A XXXI

MOLARIDAD. AC. LEVULINICO.	CLORURO SODICO.	IBALONATO SODICO.	ARSENITO SODICO.	ASIDA SODICA.
(g)	(v µg FBG)	(v µg FBG)	(v µg FBG)	(v µg FBG)
<u>PLANTULAS.</u>				
0'26	0'75	0'60	0	0
0'13	1'05	0'90	0	0
0'088	1'36	1'20	0'75	0'30
0'066	1'81	1'50	1'00	0'75
0'040	2'42	2'10	1'36	1'06
0'013	2'87	2'40	1'50	1'36

Valor medio.				
0'099	1'71 >	1'45 >	0'77 >	0'58 >
BLANCO	3'32	2'70	1'80	1'50
				0'32
				1'36
				Valor medio
				2'14
<u>ENDOSPERMIOS.</u>				
0'26	0	0	0	0
0'13	0'45	0'45	0	0
0'088	0'75	0'90	0'45	0
0'066	1'21	1'36	0'75	0'45
0'040	1'51	1'50	1'20	0'90
0'013	1'96	1'80	1'50	1'20

Valor medio.				
0'099	0'98 <	1'00 <	0'65 >	0'42 >
BLANCO	2'42	2'30	1'66	1'50
				0'10
				1'00
				Valor medio
				1'78

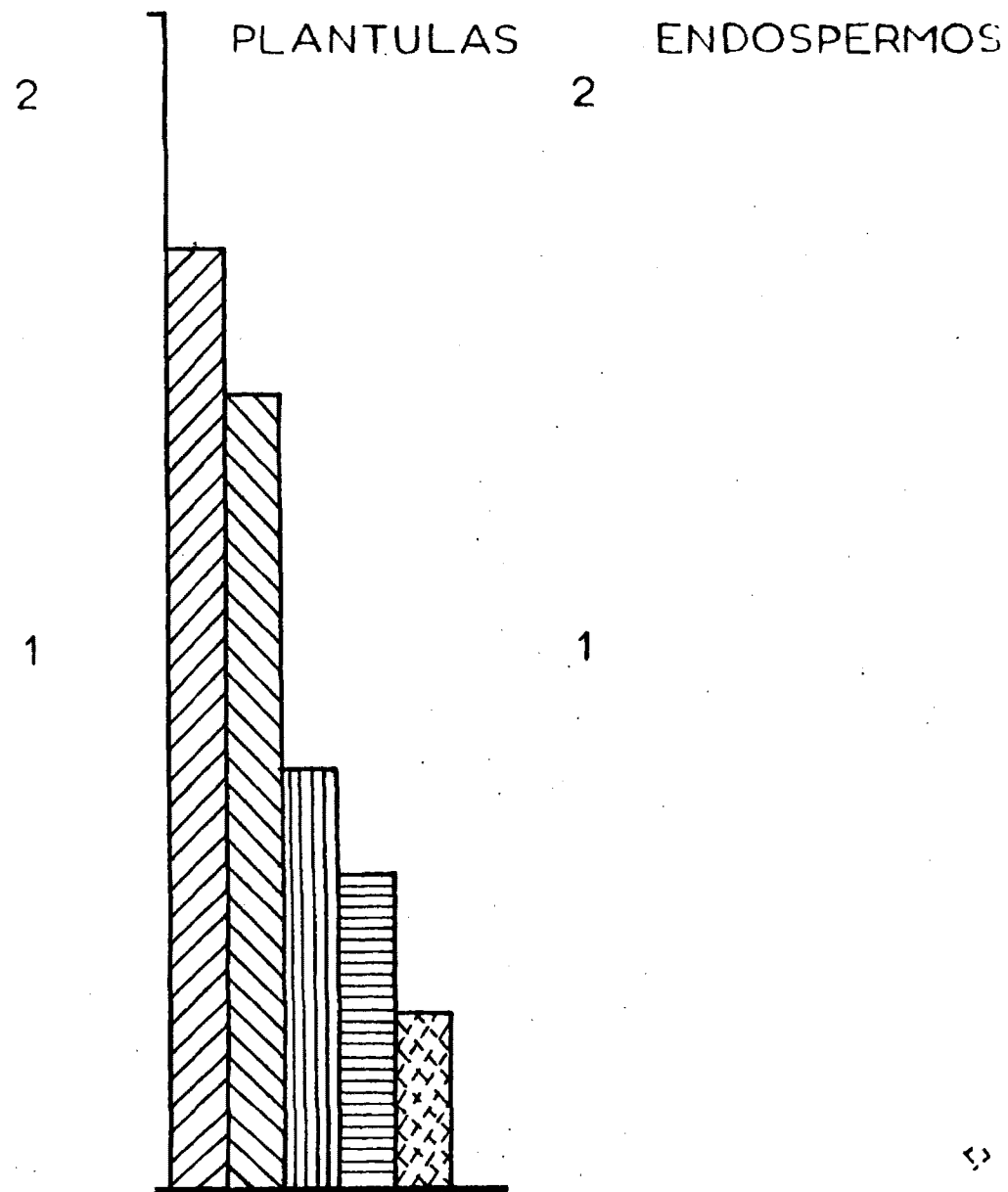


Fig. 21 δ -ALA dehidrasa. Inhibidores

□ Blanco; ▨ Ac. levulínico; ▩ CNNa;
 ▮ Malonato; ▯ Arsenito; ▧ Azida Na.

En las Figuras 22, 23, 24, 25, 26 y 27 se representan en plántulas y endospermos las gráficas correspondientes a la acción inhibitoria competitiva del ácido levulínico, cianuro sódico y malonato sódico, como se comprueba porque dan la misma máxima velocidad V_m que los controles (en los cuales no se emplea el inhibidor en la reacción enzimática), cortándose ambas rectas sobre el eje de ordenadas $1/v$.

Los piñones de que se parte se estratificaron 55 días y después se pusieron a germinar hasta apuntar la radícula.

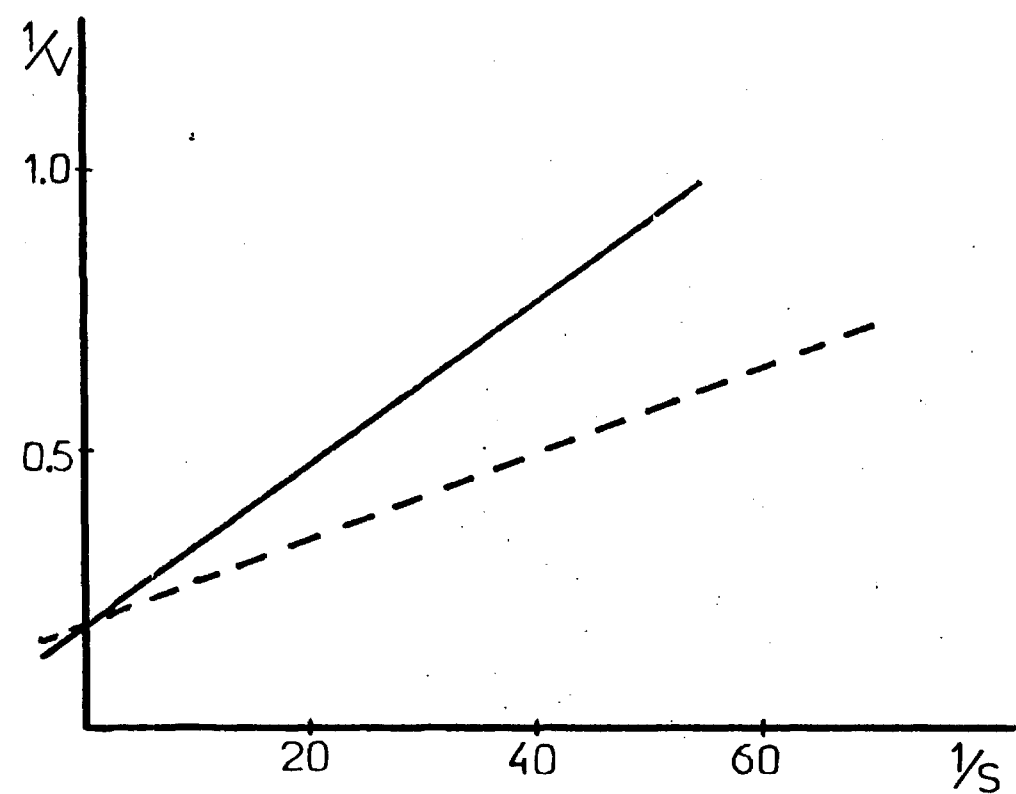


Fig.22 δ -ALA dehidrasa. Plántulas.

Con ác. levulínico (-----) y sin ác. levulínico (—). Inhibición competitiva

VD

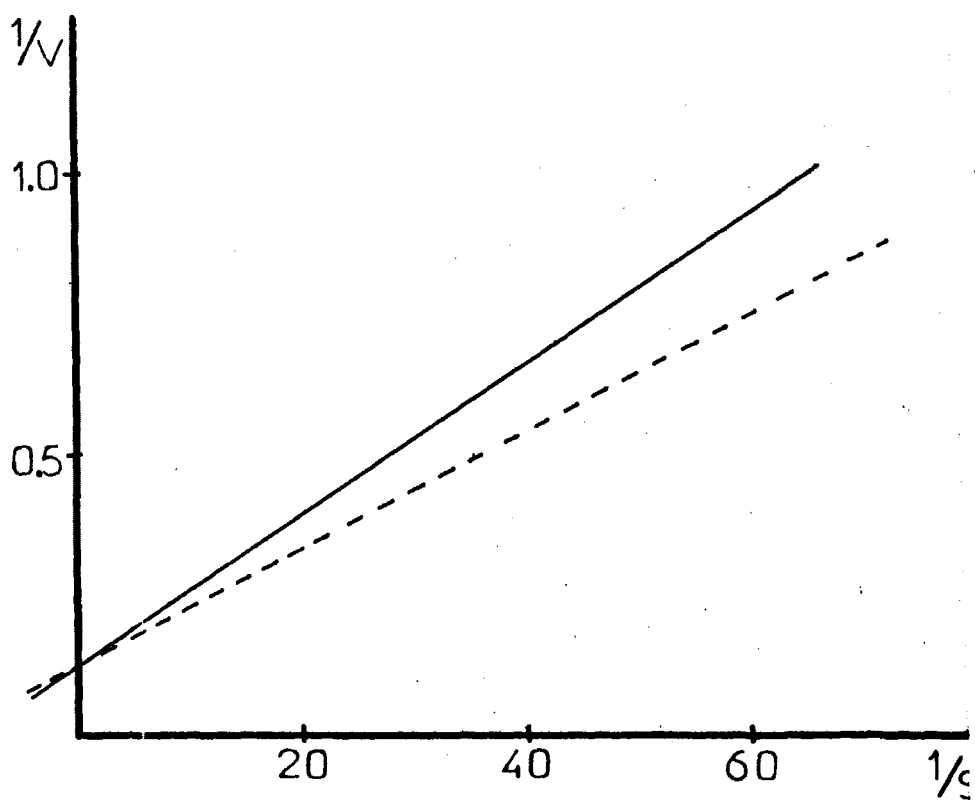


Fig.23 δ -ALA dehidrasa. Endospermos. Con ác.levulínico(-----) y sin ác.levulínico(——). Inhibición competitiva

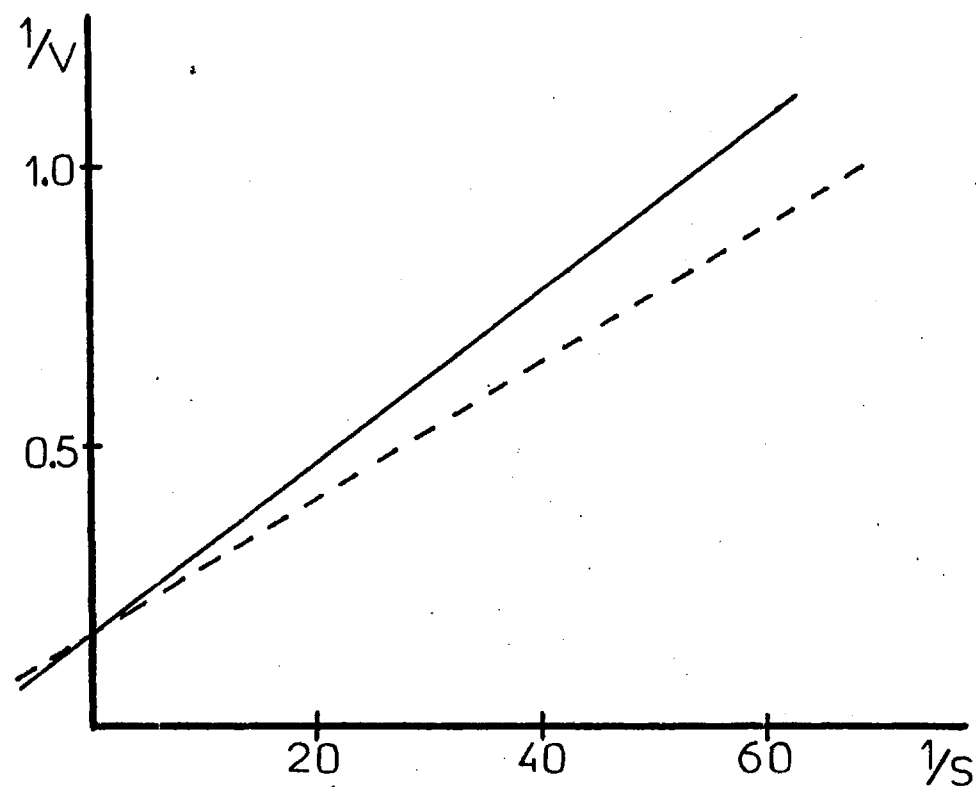


Fig.24 δ -ALA dehidrasa. Plántulas.

Con cianuro sódico (-----) y sin cianuro sódico (—). Inhibición competitiva

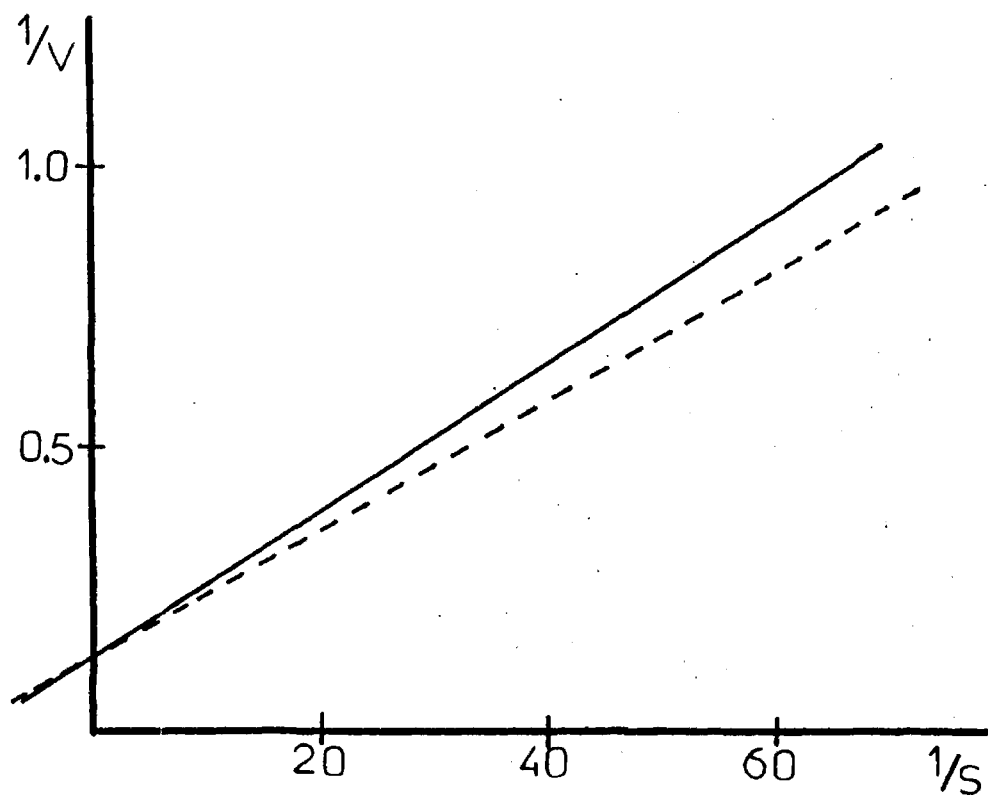


Fig.25 δ -ALA dehidrasa. Endospermos. Con cianuro sódico (-----) y sin cianuro sódico (—). Inhibició competitiva

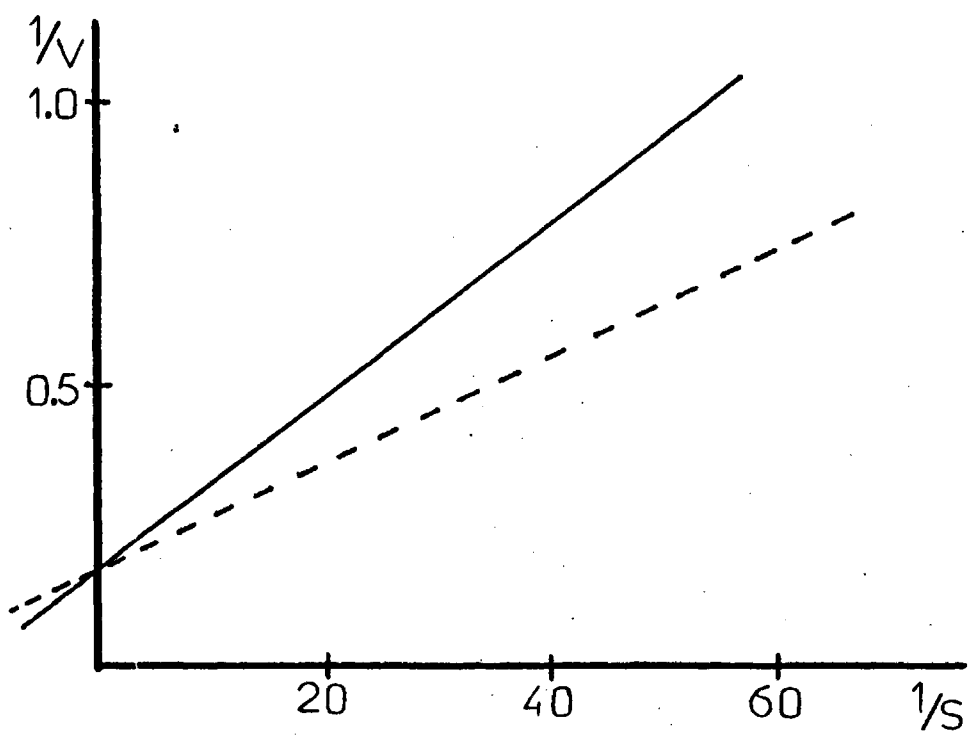


Fig. 26 δ -ALA dehidrasa. Plántulas.

Con malonato sódico (-----) y sin malonato sódico (—). Inhibición competitiva

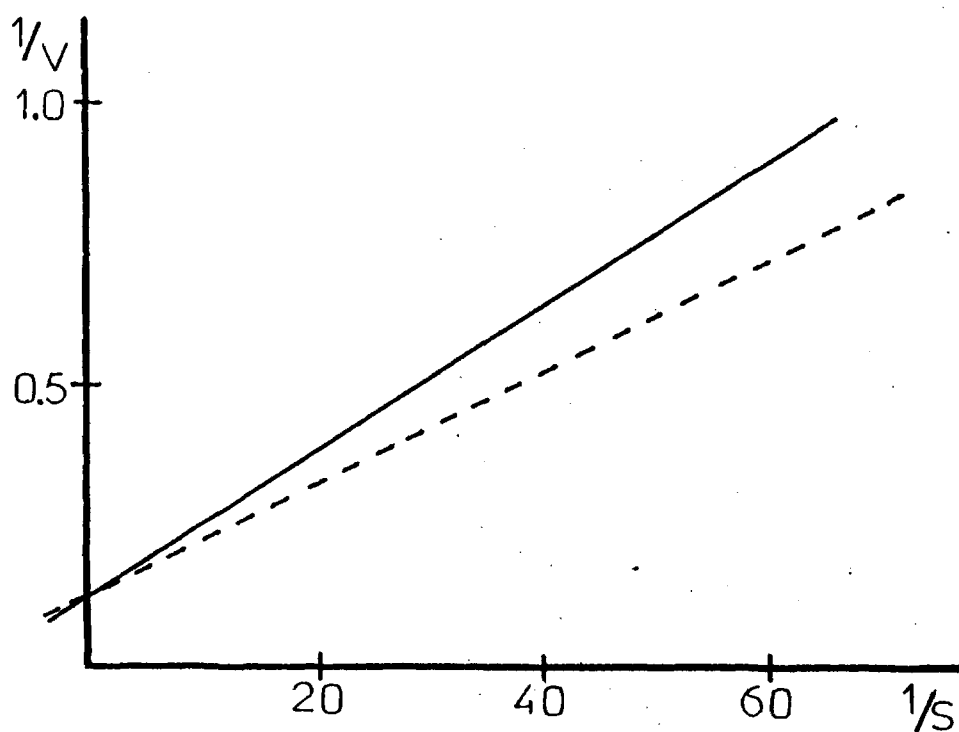


Fig.27 δ -ALAdehidrasa. Endospermos. Con malonato sódico (-----) y sin malonato sódico (—). Inhibición competitiva

4.2.3.- Porfirinas.

4.2.3.1.- Determinaciones previas.

Estas determinaciones se realizaron como tanteos orientadores para después proseguir la detección y caracterización de las mismas.

La extracción e incubación se verifican como en el apartado 4.1.3.2, haciendo una incubación con glicocola, piridoxalfosfato, Cl_2Mg , ATP y succinato (Experimento 1) y en la otra (experimento 2) se pone glicocola, piridoxalfosfato, Cl_2Mg y ATP, es decir, sin succinato.

Las determinaciones se han realizado expresando en protoporfirina las densidades ópticas halladas. Para ello se ha tomado como patrón la densidad óptica de máxima absorción 0'532 (pico en 409 nm) de una concentración diluida al 1/100 de una solución que contenía 10 $\mu g/ml$ (solución madre).

Los resultados en líquidos sobrenadantes, residuos y suma de ambos, es decir, el total en cada determinación se consignan en la TABLA XXXII.

T A B L A XXXII

PROTOPORFIRINA µg/g. de peso húmedo. (Según técnica de extracción I).				
Piñones puestos a germinar.	Experimento.	Sobrenadante.	Resíduo.	Total.
Sin abrir.	1	41'70	83'40	125'10
Sin abrir.	2	56'41	61'32	117'73
Abiertos.	1	91'45	1228'97	1320'42
ABIERTOS.	2	100'03	1300'42	1400'45
Embriones apuntando la radícula.	1	90'63	558'53	649'16
Embriones apuntando la radícula.	2	92'73	526'90	619'63
Plántulas de radícula 0'5 a 1 cm.	1	55'94	282'74	338'68
PLANTULAS DE radícula 0'5 a 1 cm,	2	43'84	290'30	334'14
Plántulas de radícula 2 a 2'5 cm.	1	31'91	290'30	322'34
Plántulas de radícula 2 a 2'5cm.	2	37'54	294'68	322'22
Plántulas de radícula 3 a 4 cm.	1	37'65	262'11	299'76
Plántulas de radícula 3 a 4 cm,	2	24'61	362'03	386'64

De los resultados de esta TABLA XXXIII se infiere que la protoporfirina IX en los estadios previos a la germinación experimenta un significativo aumento alcanzando su máximo nivel en la germinación propiamente dicha (piñones puestos a germinar y abiertos) para después a medida que la plántula se desarrolla y la radícula aumenta su longitud, disminuir gradualmente según se van consumiendo las materias de reserva del endospermo y se va formando clorofila.

En la TABLA XXXIII están recogidos los resultados obtenidos según la técnica de extracción II realizando una incubación con succinato, ATP, glicocola, piridoxalfosfato y Cl_2Mg y una cantidad tal de la fracción 1 que contenga 8 mg. de proteínas (experimento 1); la otra incubación se verificó adicionando ATP, glicocola, piridoxalfosfato y Cl_2Mg a una cantidad tal de la fracción 2 que contenga 8 mg de proteínas (experimento 2).

T A B L A XXXIII

PROTOPORFIRINA µg/g. de peso húmedo. (Según técnica de extracción II).				
Piñones puestos a germinar.	Experimento.	Sobrenadante.	Residuo.	Total.
Abiertos.	1	845'44	306'03	1151'47
Abiertos.	2	744'16	473'36	1217'52
Embriones apuntando la radícula.	1	96'44	1019'19	1115'63
Embriones apuntando la radícula..	2	56'99	526'03	583'02
Plántulas de radícula 0'5 a 1 cm.	1	63'67	1992'25	2055'92
Plántulas de radícula 0'5 a 1 cm.	2	82'15	1530'13	1612'28
Plántulas de radícula 2 a 2'5 cm.	1	141'68	971'81	1113'49
Plántulas de radícula 2 a 2'5 cm	2	123'97	553'42	677'39
Plántulas de radícula 3 a 4 cm.	1	14'48	228'81	243'29
Plántulas de radícula 3 a 4 cm.	2	20'77	311'35	331'62

El máximo nivel de protoporfirina IX se alcanza en los piñones puestos a germinar y con radícula de 0'5 a 1 cm., para después ir disminuyendo a medida que la radícula aumenta de tamaño y de crecer nétamente cuando la plántula tiene una radícula de 3 a 4 cm., porque las reservas del endospermo prácticamente se han agotado.

Por otra parte se puede observar que los valores de la TABLA XXXIII de porfirinas totales, en cada uno de los estadios de germinación en lo que se refiere tanto al experimento 1 como al 2 son, en general, mayores que los correspondientes a los de la TABLA XXXII y en particular en los valores medios de la suma de todos los valores de los distintos estadios de germinación (piñones abiertos, embriones apuntando la radícula y plántulas de radícula de 0'5 a 1 cm., 2 a 2'5 cm. y 3 a 4 cm.)

En la TABLA XXXIV, incluida a continuación se consignan las cifras del contenido de proteínas por ml., halladas en los diferentes estadios de germinación de los piñones en las técnicas de extracción I y II y que sirven para tomar las cantidades apropiadas de contenido de 8 mg. de proteínas, para la ejecución de los experimentos consignados en la TABLA XXXIII.

T A B L A XXXIV

CONTENIDO DE PROTEÍNAS. (mg/ml.)		
Piñones puestos a germinar.	Técnica de extracción I	Técnica de extracción II
Sin abrir.	6'55	-
Abiertos.	3'00	4'26
Embriones apuntando la radícula.	2'28	3'78
Plántula de radícula 0'5 a 1 cm.	2'19	3'93
Plántula de radícula 2 a 2'5 cm.	2'03	3'29
Plántula de radícula 3 a 4 cm.	2'26	4'05

4.2.3.2.- Resultados cualitativos.

4.2.3.2.1.- CROMATOGRAMAS con fluorescencia roja.

Como ejemplo de los cromatogramas obtenidos sobre capa delgada insertamos tres cromatogramas tipo, con fluorescencia roja, de piñones cerrados, piñones abiertos y piñones germinados (véase Figuras 28, 29, y 30).

En estos tres cromatogramas se puede observar perfectamente separada la protoporfirina de la coproporfirina. Las manchas de protoporfirina presentan los R_f muy aproximados pues en el tercero aunque da algo mayor es porque la medida se efectuó desde el punto de partida al extremo superior de la mancha, pero realizándola desde dicho punto al centro de la mancha da un valor menor.

En los dos primeros cromatogramas la coproporfirina no sufre ningún desplazamiento, como ocurre con la coproporfirina patrón (Sigma); véase apartado 4.1.3.1.1., pero en el tercer cromatograma sufre un desplazamiento la mancha con un $R_f = 0'15$, más adecuado a los valores que se dan en la literatura.

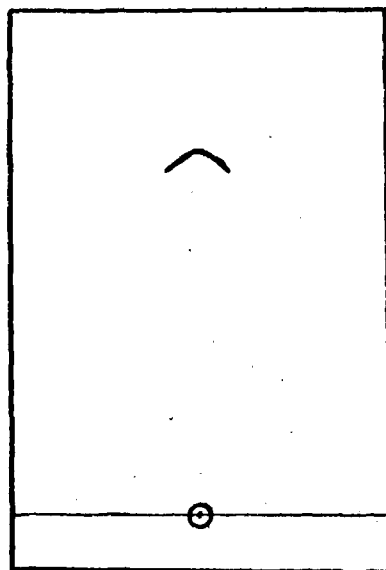


Fig.28 Cerrados:

Protoporfirina $R_f=0,58$

Coproporfirina $R_f=0$

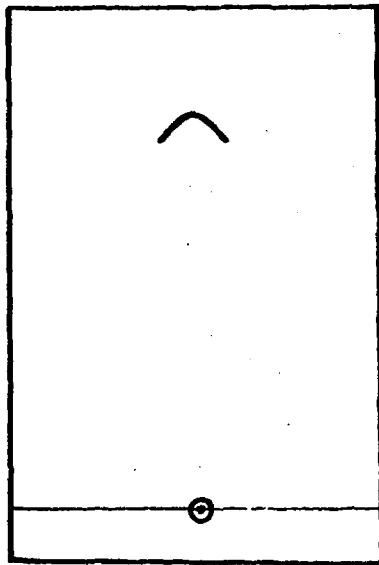


Fig.29 Abiertos:

Protoporfirina $R_f=0,66$

Coproporfirina $R_f=0$

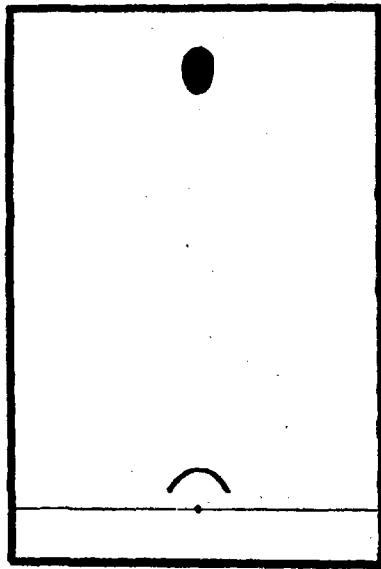


Fig. 30 Germinados (radícula 4 cm)

Protoporfirina $R_f=0,84$

Coproporfirina $R_f=0,15$

Los resultados generales de identificación por cromatografía en capa delgada de las porfirinas se insertan en las TABLAS XXIV, XXV y XXVI, en las que se incluyen los Rf de las manchas obtenidas en los cromatogramas.

En la TABLA XXIV se consignan los resultados de los piñones sin estratificar, cerrados y abiertos sometidos a una diversidad de tratamientos, con separación de proto y coproporfirina.

Los Rf de protoporfirina varían entre límites de 0'5 a 0'8 con una media de Rf de 0'70 y considerando solo los valores de coproporfirina desplazada del punto de partida el Rf medio es de 0'26.

La fluorescencia de las manchas fué blanca excepto en un caso que fué roja.

T A B L A XXXV

PIÑONES SIN ESTRATIFICAR. (Rf de las manchas de los cromatogramas).			
Fluores- cencia.	Tratamiento.	Protoporfirina. Rf	Coproporfirina. Rf
Blanca.	Sin tratamiento. Cerrados.	0'53	0
Blanca.	Puestos a germinar. Cerrados.	0'50	0
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina. Puestos a germinar. Cerrados.	0'70	0
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina. Puestos a germinar. Cerrados.	0'77	-
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina y d-ALA. Puestos a germinar. Cerrados.	0'60	0
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina y EDTA sin diluir. Puestos a germinar. Cerrados.	0'73	-
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina y EDTA diluido al 1/2. Puestos a germinar. Cerrados.	0'70	0
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina y EDTA diluido al 1/10. Puestos a germinar. Cerrados.	0'74	0
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina y griseofulvina saturada. Puestos a germinar. Cerrados.	0'71	0
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina y griseofulvina diluida 1/2. Puestos a germinar. Cerrados.	0'80	0
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina y griseofulvina diluida 1/10. Puestos a germinar. Cerrados.	0'80	0
Blanca.	Sumergidos 3 d. en etionina. Puestos a germinar. Cerrados.	0'50	0'16
Blanca.	Sumergidos 3 d. en treonina. Puestos a germinar. Cerrados.	0'49	0'16
Blanca.	Sin tratamiento. Abiertos.	0'65	0'32
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina. Puestos a germinar. Abiertos.	0'74	0

(Continúa en la página siguiente)

PIÑONES SIN ESTRATIFICAR. (Rf de las manchas de los cromatogramas).			
Fluores- cencia.	TRATAMIENTO.	Protoporfirina.	Coproporfirina.
		Rf	Rf
Roja.	Sumergidos 3 d. en tiamina. Puestos a germinar. Abiertos.	0'81	0'16
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina y EDTA sin diluir. Puestos a germinar. Abiertos.	0'80	0
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina y EDTA diluido al 1/2. Puestos a germinar. Abiertos.	0'74	0
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina y EDTA diluido al 1/10. Puestos a germinar. Abiertos.	0'77	0
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina y griseofulvina saturada. Puestos a germinar. Abiertos.	0'77	0'53
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina y griseofulvina diluida 1/2. Puestos a germinar. Abiertos.	0'80	0
Blanca.	Sumergidos 3 d. en tiamina y griseofulvina diluida 1/10. Puestos a germinar. Abiertos.	0'77	0
Valor Medio		0'70	0'26

En esta Tabla se sobreentiende que la puesta a germinar sigue inmediatamente a la inmersión de las semillas en la solución de tratamiento cuando la hay y los piñones puestos a germinar se realiza en cámara Jacobsen.

En la coproporfirina los círculos representan que el Rf fué cero pero que se observó fluorescencia; los trazos representan la ausencia de la misma.

En la TABLA XXAVI los resultados de los piñones estratificados, cerrados, abiertos y germinados sometidos igualmente a una serie variada de tratamientos, con separación también de proto y coproporfirina.

Los Rf de porfirinas varían entre límites de 0'41 y 0'84 con una media de 0'61 y los valores de coproporfirina teniendo en cuenta solo los valores en que hubo desplazamiento de coproporfirinas a partir del punto de partida, el Rf es de 0'15.

La fluorescencia de las manchas en los diferentes casos fué roja, excepto en cinco.

PINONES ESTRATIFICADOS=(Rf de las manchas de los cromatogramas)			
Fluorescencia.	Tratamiento.	Protoporfirina. Rf	Coproporfirina. Rf
Blanca.	Puestos a germinar.Cerrados.	0'71	-
Blanca.	Sumergidos 3 d.en tiamina.Cerrados.	0'58	0
Blanca.	Sumergidos 3 d.en tiamina.Puestos a germinar.Cerrados.	0'47	-
Blanca.	Sumergidos 3 d.en tiamina.Puestos a germinar.Cerrados.	0'59	-
Roja.	Sumergidos 3 d.en tiamina.Puestos a germinar.Cerrados.	0'62	0
Blanca.	Sumergidos 3 d.en tiamina.Puestos a germinar.Cerrados.	0'57	-
ROJA:	Sumergidos 3 d.en tiamina.Puestos a germinar.Cerrados.	0'58	0
Roja.	Sumergidos 3 d.en etionina.Puestos a germinar.Cerrados.	0'56	0
Roja.	Sumergidos 3 d.en treonina.Puestos a germinar.Cerrados.	0'41	0
Roja.	Sin poner a germinar.Abiertos.	0'68	0'14
Roja.	Puestos a germinar.Abiertos.	0'74	0'15
Roja.	Sumergidos 3 d.en tiamina.Sin poner a germinar.Abiertos.	0'65	0
Roja.	Sumergidos 3 d.en tiamina.Puestos a germinar. Abiertos.	0'63	-
Roja.	Sumergidos 3 d.en tiamina.Puestos a germinar.Abiertos.	0'80	0'15
Roja.	Sumergidos 3 d.en tiamina y d-ALA. Sin poner a germinar.Abiertos.	0'66	0
Roja.	Sumergidos 3 d.en tiamina y d-ALA. Puestos a germinar.Abiertos.	0'63	0'16

(Continúa en la Página siguiente)

T A B L A XXXVI. (Continuación)

PIÑONES ESTRATIFICADOS. (Rf de las manchas de los cromatogramas).			
Fluorescencia.	Tratamiento.	Protoporfirina. Rf	Coproporfirina. Rf
Roja.	Sumergidos 3 d.en etionina.Puestos a germinar.Abiertos.	0'46	0
Roja.	Sumergidos 3 d.en treonina.Puestos a germinar.Abiertos.	0'25	0
Roja.	Sumergidos 3 d.en tiamina.Radícula de 0 a 0'5 cm.Germinados.	0'46	-
Roja.	Sumergidos 3 d.en Tiamina.Radícula de 0'5 a 1 cm.Germinados.	0'66	0
Roja.	Sumergidos 3 d.en tiamina.Radícula de 1'5 a 2 cm.Germinados.	0'52	-
Roja.	Sumergidos 3 d.en tiamina.Radícula de 2'5 a 3 cm.Germinados.	0'66	0
Roja.	Estratificación seguida de germinación sobre la misma vermiculita, Radícula de 2'5 a 3 cm.Germinados.	0'66	0
Roja.	Estratificación seguida de germinación sobre la misma vermiculita. Radícula de mas de 4 cm.Germinados.	0'84	0'15
Valor Medio:		0'61	0'15

En esta Tabla se sobreentiende que la estratificación se efectúa a continuación de la inmersión y que los piñones estratificados y puestos a germinar ó germinados se germinan despues en cámara Jacobsen, excepto los dos últimos casos en que la germinación (como se indica en la Tabla) se realizó sobre la misma vermiculita.

En la coproporfirina los círculos representan que el Rf fué cero, pero se observó fluorescencia; los trazos representan la ausencia de la misma.

En la TABLA XXXVII se incluyen exclusivamente los valores Rf de las manchas con fluorescencia roja de protoporfirina y coproporfirina de piñones cerrados, abiertos y germinados de las dos TABLAS XXXV y XXXVI.

Por ello se puede apreciar que los valores de protoporfirina en general oscilan de 0'54 a 0'66 y 0'63 y los de coproporfirina desplazada a 0'15.

Se puede observar que los valores medios Rf de protoporfirina de piñones sin estratificar, TABLA XXXV (0'70); estratificados TABLA XXXVI (0'61) y los de los abiertos (0'66) y germinados (0'63) con fluorescencia roja, TABLA XXXVII, son muy análogos.

Lo mismo hay que decir respecto de los valores medios Rf de coproporfirina.

T A B L A XXVII

Rf de las manchas de los cromatogramas con fluorescencia roja.					
CERRADOS.		ABIERTOS.		GERMINADOS.	
Protoporfirina.	Coproporfirina.	Protoporfirina.	Coproporf#.	Protoporf#.	Coproporf#.
0'62	0	0'68	0'14	0,46	-
0'53	0	0'74	0'15	0'66	0
0'56	0	0'81	0'16	0'52	0
0'41	0	0'65	0	0'66	0
		0'63	-	0'66	0
		0'80	0'15	0'84	0'15
		0'66	0		
		0'63	0'16		
		0'46	0		
		0'55	0		
V.M.: 0'54	0	0'66	0'15	0'63	0'15

4.2.3.2.2.- Máximos de absorción (Bandas de Soret).

Se determinaron las curvas de absorción de coproporfirina (pico en 402 nm.) y protoporfirina (pico en 409 nm.) de piñones estratificados seguidos de germinación sobre vermiculita y radícula de 4 cm.; en piñones sumergidos tres días en tiamina y d-ALA, estratificados y puestos a germinar, pero cerrados; y en piñones sumergidos tres días en tiamina y d-ALA, estratificados y sin poner a germinar, pero abiertos. Para ello se siguió el método de extracción descrito en el apartado 4.1.3.5.1. y determinaron las curvas de absorción en cloroformo y en ClH 2N (después de eliminar el Cl₃CH al vacío) entre longitudes de onda de 380 a 430 nm. Las curvas todas muy semejantes resultaron con los máximos de absorción correctos en 402 y 409 nm., para la copro y protoporfirina respectivamente (véase las Figuras 31 y 32).

Como contraste y control se efectuaron las curvas de absorción de los eluatos de las manchas que dieron fluorescencia roja procedentes de cromatogramas realizados por la aplicación en la placa de protoporfirina patrón disuelta en cloroformo. El residuo de evaporación disuelto en 5 ml. de ClH 0'5N y después una parte alícuota diluida al 1/10, dieron sendas curvas con el mismo máximo de absorción en 409 nm.

(Véase la Figura 33).

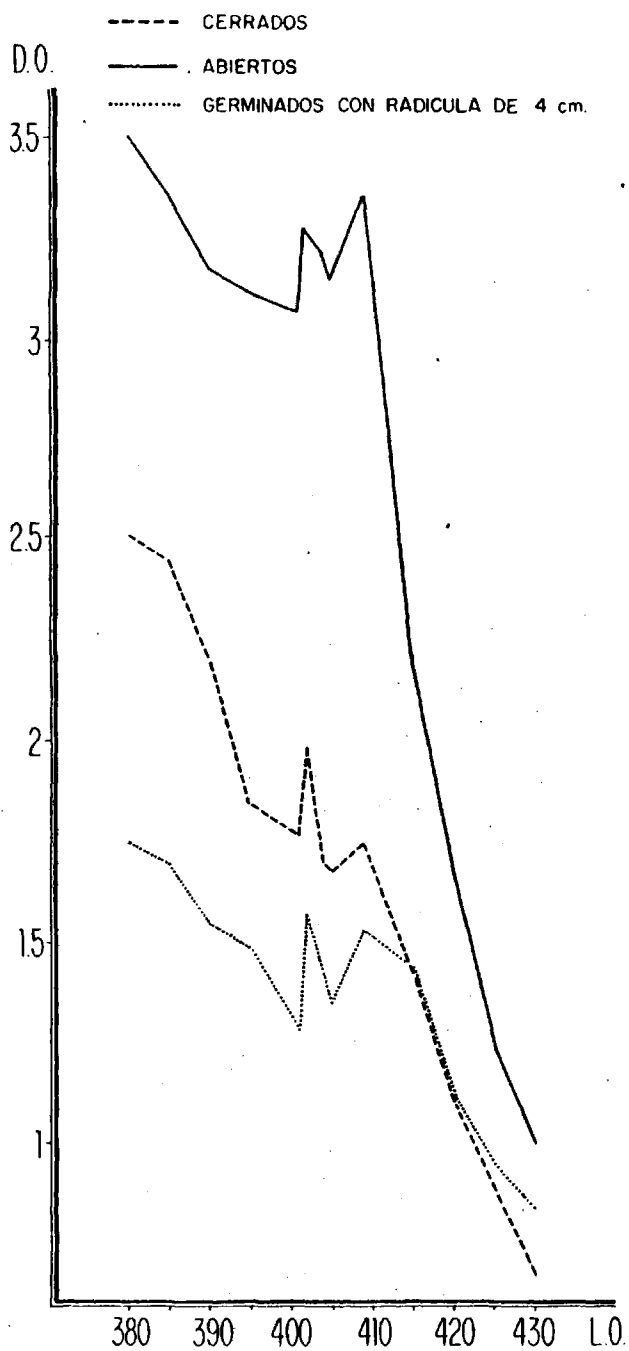


FIG. 31- COPRO Y PROTOPORFIRINA:
 MAXIMOS DE ABSORCION EN Cl_3CH .

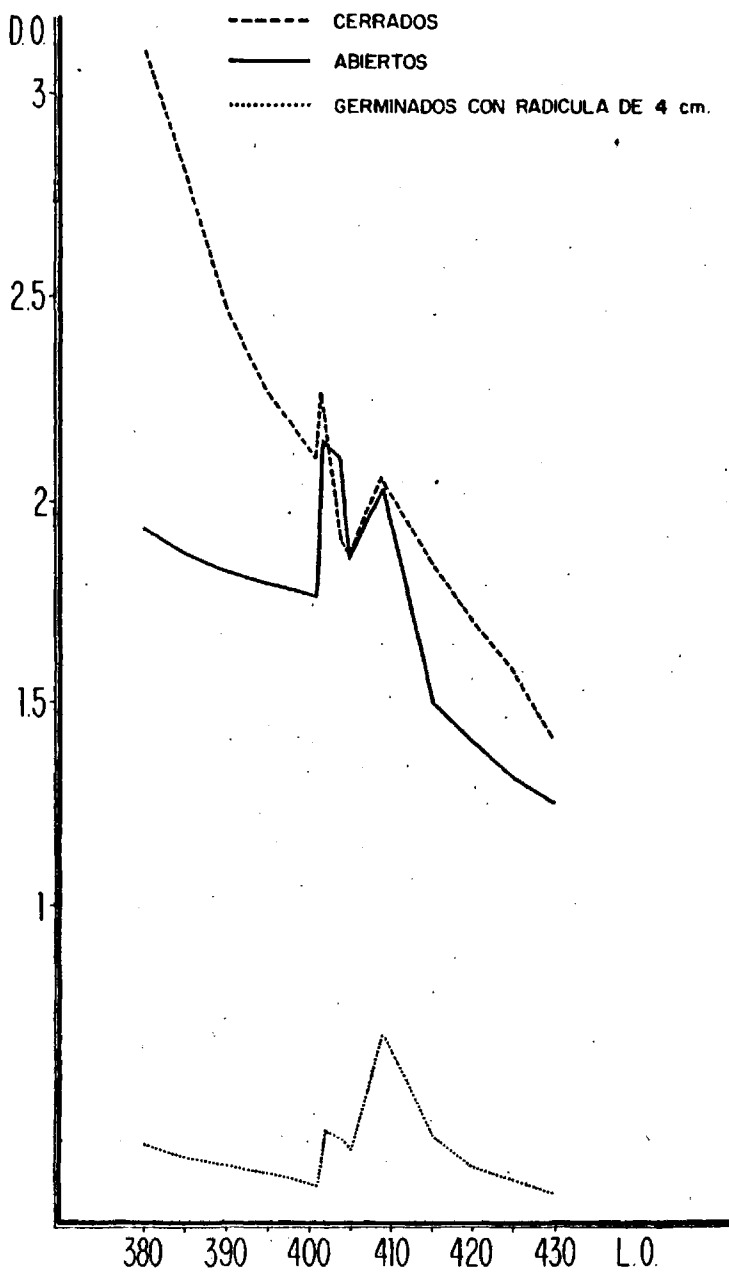


FIG. 32 - COPRO Y PROTOPORFIRINA:
MAXIMOS DE ABSORCION EN CIH2N.

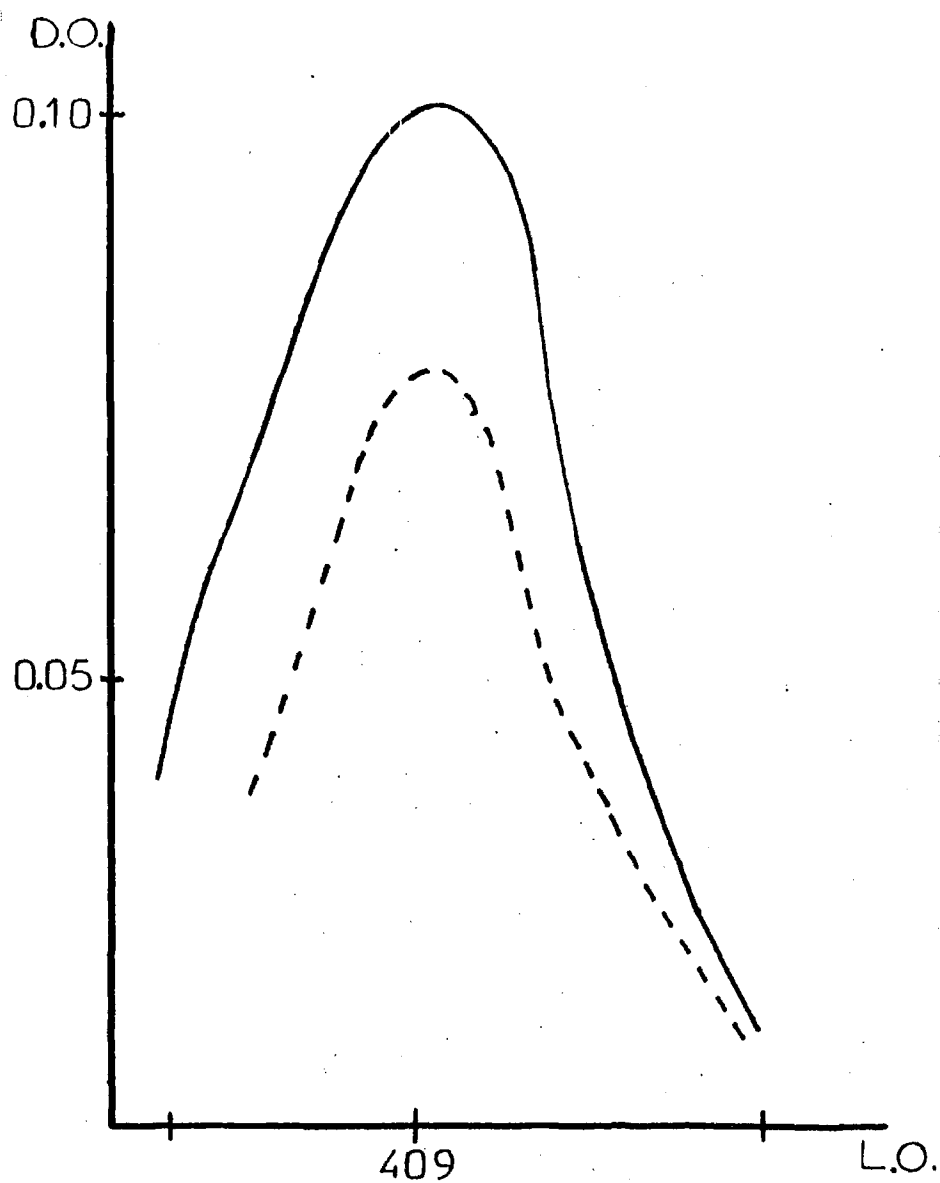


Fig.33 Protoporfirina patrón. Máxi-
 mos de absorción. Solución madre
 $1\mu\text{g}/1\mu\text{l}$ (—); dilución al $\frac{1}{10}$ (-----)

4.2.3.3.- Resultados cuantitativos.

4.2.3.3.1.- Porfirinas en piñones cerrados.

Se hicieron varias experiencias con piñones sin estratificar (sin tratamiento), estratificados y puestos a germinar, y también sumergidos durante 3 días en soluciones de tiamina (40 mg/100 ml de agua); tiamina y d-ALA (40 mg + 20 mg/100 de agua respectivamente); tiamina y EDTA (40 mg y 4.49 g/100 ml de agua respectivamente) de esta solución se preparan la diluida al 1/2 y al 1/10; tiamina (40 mg/100 ml de agua) y griseofulvina hasta tener solución saturada y preparar a partir de ésta la diluida al 1/2 y al 1/10; etionina (2 mg/100 mL de agua) y treonina (12 mg/100 ml de agua).

Después de estos tratamientos, en unos casos se estratificaron y luego se pusieron a germinar y en otros casos se pusieron directamente a germinar sin pasar por el proceso de estratificación.

Los resultados obtenidos quedan reflejados en las siguientes Tablas, en todas ellas se hace una comparación entre los piñones sin estratificar, los estratificados y puestos a germinar y los sometidos a los diferentes tratamientos reseñados anteriormente.

Por los resultados de la TABLA XXXVIII se deduce que la estratificación y puesta a germinar de los piñones incrementa el contenido de porfirinas de 12'20 $\mu\text{g/g.}$ a 11'65 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión con respecto a las semillas no estratificadas; que la tiamina en piñones estratificados y puestos a germinar aumenta significativamente de 14'86 $\mu\text{g/g.}$ a 13'40 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión con respecto a las no estratificadas en las mismas condiciones; a los simplemente estratificados 12'20 $\mu\text{g/g.}$ y a los no estratificados 11'65 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión.

Con la tiamina y d-ALA ocurre algo semejante que con la tiamina sola, pues aumenta el contenido de porfirinas en semillas estratificadas y puestas a germinar (53'43 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión) con respecto a las no estratificadas en las mismas condiciones (9'04 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión), a las simplemente estratificadas (12'20 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión) y a las no estratificadas (11'65 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión).

Así pues tanto la tiamina y d-ALA como la tiamina actúan como activadores de la biosíntesis porfirínica.

T A B L A XXXVIII

PIÑONES CERRADOS.						
TRATAMIENTO.	Protoporfirina. PE/S.		Coproporfirina. PE/S.		Proto.mas coproporfina. PE/S.	
	Peso fresco piñón total.	Peso seco embrión	Peso fresco piñón total	Peso seco embrión.	Peso fresco piñón total.	Peso seco embrión.
Sin tratamiento.No estratificados.	0'58	5'26	0'71	6'38	1'29	11'65
Estratificados.Puestos a germinar.	0'64	5'72	0'72	6'48	1'36	12'20
Sumergidos en tiamina.Sin estratificar.Puestos a germinar.	0'70	6'32	0'79	7'09	1'49	13'40
Sumergidos en tiamina.Estratificados.Puestos a germinar.	0'82	7'37	0'83	7'49	1'65	14'36
Sumergidos en tiamina,y d-ALA.Sin estratificar.Puestos a germinar.	0'45	4'09	0'55	4'95	1'00	9'04
Sumergidos en tiamina y d-ALA.Estratificados.Puestos a germinar.	2'32	25'42	3'11	28'02	5'35	53'43

174 -

Por la TABLA XXXIX se puede apreciar que la tiamina y EDTA introducidas durante la inmersión en agua de las semillas en el estadio previo a la germinación, no favorecen significativamente la formación de porfirinas (de 11'65 $\mu\text{g/g.}$ a 11'08 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión), pero que cuando disminuye la cifra de EDTA introducida (diluida al 1/2 y al 1/10) aumenta la cantidad de porfirinas a 18'24 y 24'29 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión. Hecho que parece demostrar que el EDTA tiende a disminuir ó bloquear la biogénesis de porfirinas, por formar un complejo con el magnesio ya que dicho ión es activador de la d-ALA sintetasa para la formación de d-ALA, primer paso intermediario en la biogénesis de protoporfirina.

Se deduce también que la tiamina y griseofulvina introducidas por inmersión en soluciones acuosas de las mismas y puestas a germinar favorecen nítidamente la biogénesis porfirínica con respecto a las semillas no tratadas de 11'65 $\mu\text{g/g.}$ a 31'81 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión; pero que la griseofulvina es un estimulante ó activador de la biogénesis de porfirinas, puesto que a medida que disminuye la cantidad introducida (diluida al 1/2 y al 1/10) es menor la porfirínica, de 31'81 a 21'71 y 13'81 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión.

T A B L A A N A

PIÑONES CERRADOS.						
TRATAMIENTO.	Protoporfirina. µg/g.		Coproporfirina. µg/g.		Proto.mas coproporfirina. µg/g.	
	Peso fresco piñón total	Peso seco embrión	Peso fresco piñón total	Peso seco embrión	Peso fresco piñón total.	Peso seco embrión.
Sumergidos en EDTA sin diluir y tiamina. Sin estratificar. Puestos a germinar.	0'58	5'22	0'65	5'86	1'23	11'08
Sumergidos en EDTA diluidos 1/2 y tiamina. Sin estratificar. Puestos a germinar.	0'99	8'95	1'03	9'30	2'03	18'24
Sumergidos en EDTA diluido 1/10 y tiamina. Sin estratificar. Puestos a germinar.	1'43	12'89	1'27	11'40	2'70	24'29
Sumergidos en tiamina y griseofulvina solución saturada. Sin estratificar. Puestos a germinar.	1'68	15'13	1'85	16'68	3'53	31'81
Sumergidos en tiamina y griseofulvina diluida al 1/2. Sin estratificar. Puestos a germinar.	1'26	11'32	1'15	10'39	2'41	21'77
Sumergidos en tiamina y griseofulvina diluida al 1/10. Sin estratificar. Puestos a germinar.	0'77	6'92	0'76	6'88	1'53	13'81

De la TABLA XI se deduce que la etionina en piñones estratificados y puestos a germinar aumenta significativamente de 55'05 $\mu\text{g/g.}$ a 14'86 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión con respecto a los no estratificados en las mismas condiciones, a los estratificados 12'20 $\mu\text{g/g.}$ y a los no estratificados 11'65 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión.

Con la treonina ocurre algo similar pues en los piñones estratificados y puestos a germinar la cantidad de porfirinas es de 17'07 $\mu\text{g/g.}$, mientras que en los no estratificados es de 14'31 $\mu\text{g/g.}$; en los simplemente estratificados es de 12'20 $\mu\text{g/g.}$ y en los no estratificados es de 11'65 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión.

De esto se deduce que tanto la etionina como la treonina son activadores de la biosíntesis porfirínica.

T A B L A. XL

PIÑONES CERRADOS.						
TRATAMIENTO.	Protoporfirina. µg/g.		Coproporfirina. µg/g.		Proto.mas Coproporfirina µg/g.	
	Peso fres- co piñón total.	Peso seco embrión.	Peso fres- co piñón total.	Peso seco embrión.	Peso fres- co piñón total.	Peso seco embrión.
Sumergidos en etionina. Sin estratificar. Puestos a germinar.	0'73	6'57	0'92	8'29	1'65	14'86
Sumergidos en etionina. Estratificados. Puestos a germinar.	3'17	28'57	2'94	26'48	6'12	55'05
Sumergidos en treonina Sin estratificar. Puestos a germinar.	0'80	7'22	0'79	7'09	1'59	14'31
Sumergidos en treonina. Estratificados. Puestos a germinar.	0'94	8'42	0'96	8'65	1'90	17'07

4.2.3.3.2.-Porfirinas en piñones abiertos.

Al igual que en los cerrados la estratificación y puesta a germinar de los piñones incrementa el contenido de porfirinas de 12'49 $\mu\text{g/g.}$ a 20'04 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión, con respecto a los no estratificados.

La tiamina en piñones estratificados y puestos a germinar aumenta el contenido de porfirinas de 10'72 $\mu\text{g/g.}$ a 18'22 $\mu\text{g/g.}$, peso seco embrión con respecto a los no estratificados en las mismas condiciones y también en relación a los no estratificados 12'49 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión.

Con la tiamina y d-AIA en las semillas estratificadas y puestas a germinar el contenido porfirínico es de 44'91 $\mu\text{g/g.}$, peso seco embrión que ha aumentado en comparación con los piñones estratificados y puestos a germinar sin ser sometidos a ningún tratamiento (20'04 $\mu\text{g/g.}$) y con los no estratificados (12'49 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión).

Por lo tanto también en este estadio de las semillas la tiamina y la tiamina y d-AIA actúan como activadores de la biosíntesis porfirínica. (TABLA XLI).

T A B L A X L I

PIÑONES ABIERTOS.						
TRATAMIENTO.	Protoporfirina. µg/g.		Coproporfirina. µg/g.		Proto.maas Coproporfirina. µg/g.	
	Peso fres- co piñón total.	Peso seco embrión	Peso fres- co piñón total	Peso seco embrión	Peso fres- co piñón total.	Peso seco embrión.
Sin tratamiento.No estratificados.	0'68	6'13	0'71	6'36	1'39	12'49
Estratificados. Puestos a germinar.	1'11	9'98	1'12	10'05	2'23	20'04
Sumergidos en tiamina. Sin estratificar. Puestos a germinar.	0'55	4'96	0'64	5'76	1'19	10'72
Sumergidos en tiamina. Estratificados. Puestos a germinar.	0'96	8'65	1'06	9'56	2'02	18'22
Sumergidos en tiamina y d-ALA.Estratificados. Puestos a germinar.	2'37	21'32	2'62	23'59	4'99	44'91

- 081 -

Según la TABLA XLII se deduce que la tiamina y EDTA introducidas durante el estadio previo a la germinación, no favorecen la formación de porfirinas con respecto a los piñones no estratificados (de 9'33 $\mu\text{g/g.}$ a 12'49 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión).

Pero cuando disminuye la cantidad de EDTA paralelamente aumentan las porfirinas a 10'48 y 14'98 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión.

Con esto se demuestra que al ir disminuyendo la cantidad de EDTA introducida en la semilla va siendo mayor la biogénesis porfirínica.

También se comprueba que la tiamina y griseofulvina introducidas por inmersión en soluciones acuosas de las mismas y puestas a germinar favorecen la síntesis de porfirinas con respecto a las semillas no tratadas de 12'49 $\mu\text{g/g.}$ a 24'02 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión, pero la griseofulvina es un activador de esta biosíntesis ya que a medida que disminuye la cantidad introducida es menor la porfirínica de 24'02 a 20'38 y 14'89 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión.

De esta misma TABLA XLII se deduce que en piñones estratificados y puestos a germinar tanto la etionina como la treonina aumentan en grandes proporciones las cantidades de porfirinas de 177'45 $\mu\text{g/g.}$ y 370'02 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión respectivamente, en relación a los simplemente estratificados y puestos a germinar (20'04 $\mu\text{g/g.}$) y a los no estratificados (12'49 $\mu\text{g/g.}$ peso seco embrión).

Así pues tanto la etionina como la treonina son muy buenos activadores de la síntesis porfirínica.

T A B L A XLII

PIÑONES ABIERTOS.

TRATAMIENTO.	Protoporfirina. µg/g.		Coproporfirina. µg/g.		Proto.mas Coproporfirina µg/g.	
	Peso fresco co piñón total.	Peso seco embrión	Peso fresco co piñón total.	Peso seco embrión	Peso fresco co piñón total.	Peso seco embrión.
Sumergidos en EDTA sin diluir y tiamina.Sin estratificar.Puestos a germinar.	0'48	4'33	0'56	5'00	1'04	9'33
Sumergidos en EDTA diluido 1/2 y tiamina.Sin estratificar.Puestos a germinar.	0'52	4'65	0'65	5'82	1'16	10'48
Sumergidos en EDTA diluido 1/10 y tiamina.Sin estratificar.Puestos a germinar.	0'78	7'02	0'88	7'96	1'66	14'98
Sumergidos en tiamina y griseofulvina sola saturada.Sin estratificar.Puestos a germinar.	1'27	11'47	1'39	12'55	2'67	24'02
Sumergidos en tiamina y griseofulvina diluida 1/2.Sin estratificar.Puestos a germinar.	1'08	9'69	1'19	10'69	2'26	20'38
Sumergidos en tiamina y griseofulvina diluida 1/10.Sin estratificar.Puestos a germinar.	0'71	6'38	0'95	8'51	1'65	14'89
Sumergidos en etionina.Estratificados.Puestos a germinar.	10'54	94'87	9'18	82'58	19'72	177'45
Sumergidos en treonina.Estratificados.Puestos a germinar.	20'45	184'07	20'66	185'95	41'11	370'02

En las TABLAS XLIII y XLIV se considera el efecto medio comparativo de los diversos tratamientos verificados con los piñones en los estadios seminales de cerrados y abiertos. Los resultados de cada tratamiento reseñado son la media de varios experimentos llevados a cabo en condiciones experimentales análogas. En semillas cerradas (TABLA XLIII) se observa que la estratificación seguida de las condiciones ambientales a que se someten los piñones (temperatura de 29° C. y grado de humedad constante) para llegar a su germinación, pero antes de que se verifique ésta, favorece la biosíntesis porfirínica (de 11'65 a 12'20 µg/g. peso seco embrión). El tratamiento con tiamina en piñones, sin estratificar, incrementa aún más las porfirinas (13'40 µg/g. peso seco embrión) y si este tratamiento va seguido de estratificación ésta aún aumenta más el contenido de porfirinas (14'86 µg/g. peso seco embrión). El tratamiento con tiamina y d-ALA estimula más la biosíntesis porfirínica (31'23 µg/g. peso seco embrión) por ser el d-ALA un compuesto sillar básico en la biosíntesis de porfobilinógeno, a su vez pieza fundamental de la biosíntesis de protoporfirina. En los tratamientos con EDTA y tiamina (17'87 µg/g. peso seco embrión); tiamina y griseofulvina (22'44 µg/g. peso seco embrión); etionina (34'96 µg/g. peso seco embrión) y treonina (15'69 µg/g. peso seco embrión), estos compuestos actuaron como activadores, ya que las cifras obtenidas son significativamente más altas que las que se obtuvieron con las semillas sin estratificar, sin tratamiento (11'65 µg/g. peso seco embrión).

En los piñones abiertos (TABLA XLIV) se aprecia que la estratificación seguida de germinación aumenta el contenido de porfirinas (20'04 $\mu\text{g/g}$. peso seco embrión) con respecto a las semillas no estratificadas (12'49 $\mu\text{g/g}$. peso seco embrión). En los tratados con tiamina, estratificados y puestos a germinar (18'22 $\mu\text{g/g}$, peso seco embrión) se aprecia un aumento de porfirinas en relación a los no estratificados en las mismas condiciones (10'72 $\mu\text{g/g}$. peso seco embrión) y a los simplemente no estratificados (12'49 $\mu\text{g/g}$. peso seco embrión). En los tratados con tiamina y β -ALA (44'91 $\mu\text{g/g}$. peso seco embrión); tiamina y griseofulvina (19'76 $\mu\text{g/g}$. peso seco embrión) ; Etionina (177'45 $\mu\text{g/g}$. peso seco embrión) y treonina (370'02 $\mu\text{g/g}$. peso seco embrión) dan valores más altos que los no sometidos a tratamiento, siendo especialmente significativo estos dos últimos (etionina y treonina). Sin embargo los piñones tratados con EDTA y tiamina dan valores más bajos (11'59 $\mu\text{g/g}$. peso seco embrión), que los estratificados y tratados con tiamina (18'22 $\mu\text{g/g}$. peso seco embrión), pero más altos que los no estratificados y tratados con tiamina (10'72 $\mu\text{g/g}$. peso seco embrión).

Por otra parte, si comparamos los valores obtenidos para los piñones abiertos (TABLA XLIV) con los de los piñones cerrados (TABLA XLIII) observaremos que aquellos, excepto en los tratados con EDTA y tiamina, son mayores que los de los segundos, prueba indicadora de que por ser más avanzado el estadio de germinación hay una mayor cantidad de porfirinas, siendo especialmente significativo en lo que atañe a los tratados con etionina (véase TABLA XLV), y treonina.

T A B L A XLIII

PIÑONES SERRADOS.

TRATAMIENTO.	Protoporfirina. µg/g.		Coproporfirina. µg/g.		Proto. más Coproporfirina µg/g.	
	Peso fres- co piñón total.	Peso seco embrión	Peso fres- co piñón total.	Peso seco em- brión	Peso fres- co piñón total.	Peso seco embrión.
Sin tratamiento. Sin estratificar.	0'58	5'26	0'71	6'38	1'29	11'65
Estratificados. Puestos a germinar.	0'64	5'72	0'72	6'48	1'36	12'20
Sumergidos en tiamina. Sin estratificar. Puestos a germinar.	0'70	6'32	0'79	7'09	1'49	13'40
Sumergidos en tiamina. Estratificados. Puestos a germinar.	0'82	7'37	0'85	7'49	1'65	14'86
Sumergidos en tiamina y d-ALA. Puestos a germinar.	1'64	14'75	1'83	16'48	3'18	31'23
Sumergidos en EDTA y tiamina. Puestos a germinar.	1'00	9'02	0'98	8'85	1'99	17'87
Sumergidos en tiamina y griseofulvina. Puestos a germinar.	1'24	11'13	1'26	11'32	2'49	22'44
Sumergidos en etionina. Puestos a germinar.	1'95	17'57	1'93	17'38	3'88	34'96
Sumergidos en treonina. Puestos a germinar.	0'87	7'92	0'87	7'87	1'74	15'69

T A B L A XLIV

PIÑONES ABIERTOS.						
TRATAMIENTO.	Protoporfirina. µg/g.		Coproporfirina. µg/g.		Proto. más Coproporfirina. µg/g.	
	Peso fres- co piñón total.	Peso seco embrión	Peso fres- co piñón total.	Peso seco embrión	Peso fres- co piñón total.	Peso seco embrión.
Sin tratamiento. Sin estratificar.	0'68	6'13	0'71	6'36	1'39	12'49
Estratificados. Puestos a germinar.	1'11	9'98	1'12	10'05	2'23	20'04
Sumergidos en tiamina. Sin estratificar. Puestos a germinar.	0'55	4'96	0'64	5'76	1'19	10'72
Sumergidos en tiamina. Estratificados. Puestos a germinar.	0'96	8'65	1'06	9'56	2'02	18'22
Sumergidos en tiamina y d-ALA. Estratificados. Puestos a germinar.	2'37	21'32	2'62	23'59	4'99	44'91
Sumergidos en EDTA y tiamina. Puestos a germinar.	0'59	5'33	0'70	6'26	1'29	11'59
Sumergidos en tiamina y griseofulvina. Puestos a germinar.	1'02	9'18	1'18	10'58	2'20	19'76
Sumergidos en etionina. Estratificados. Puestos a germinar.	10'54	94'87	9'18	82'58	19'70	177'45
Sumergidos en treonina. Estratificados. Puestos a germinar.	20'45	154'07	20'66	185'95	41'11	370'02

T A B L A XLV

COMPARATIVA ENTRE PIÑONES CERRADOS Y ABIERTOS.				
TRATAMIENTO.	CERRADOS.		ABIERTOS.	
	PROTO.MAS COPROPORFIRINA. µg/g.		PROTO.MAS COPROPORFIRINA. µg/g.	
	Peso fresco piñón total.	Peso seco embrión.	Peso fresco piñón total.	Peso seco embrión.
Sin tratamiento. Sin estratificar.	1'29	11'65	1'39	12'49
Estratificados. Puestos a germinar.	1'36	12'20	2'23	20'04
Sumergidos en tiamina. Estratificados. Puestos a germinar.	1'65	14'86	2'02	18'22
Sumergidos en tiamina y d-ALA. Puestos a germinar.	3'18	31'23	4'99	44'91
Sumergidos en etionina. Puestos a germinar.	3'88	34'96	19'72	177'45
Sumergidos en treonina. Puestos a germinar.	1'74	15'69	41'11	370'02

4.2.3.3.3.- Porfirinas en piñones germinados.

Despues de ser sometidos a tratamiento con tiemina, seguido de estratificación en frio, se observa un progresivo incremento de porfirinas que va en correlación con el crecimiento de la radícula y con el tamaño, por tanto, de la plántula.

(Véase T A B L A XLVI)

T A B L A XLVI

PIÑONES GERMINADOS.						
	PROTOPOFTIRINA.		COPROPOFTIRINA.		PROTO.MAS COPROPOFTIRINA.	
	µg/g.		µg/g.		µg/g.	
	Peso fres- co piñón total.	Peso seco embrión	Peso fres- co piñón total.	Peso seco embrión	Peso fres- co piñón total.	Peso seco embrión.
Radícula de 0 a 0'5 cm	1'20	10'82	1'53	14'22	2'78	25'04
Radícula de 0'5 a 1 cm	2'51	22'62	2'76	24'83	5'27	47'46
Radícula de 1'5 a 2 cm	2'59	23'50	3'36	30'27	5'95	53'57
Radícula de 2'5 a 3 cm	3'74	33'64	3'65	32'85	7'39	66'49
Radícula de 3'5 a 4 cm	4'91	44'17	3'96	35'62	8'86	79'79

Por último se incluye la FIGURA 34, dónde se representan los estimulantes más potentes de la biogénesis de porfirinas, figurando en el eje de ordenadas los valores medios de la suma de coproporfirina y protoporfirina expresado en $\mu\text{g/g}$. peso seco embrión.

Dichas sustancias van por este orden: treonina; tioni-
na; tiamina y d-ALA; tiamina y estratificación; tiamina y gri-
seofulvina en solución saturada; y estratificación, en compara-
ción con los piñones no estratificados ni sometidos a ningún
tratamiento que servirá de blanco ó patrón.

Así como la TABLA XLVII comparativa en piñones, cuyas por-
firinas fueron detectadas por su fluorescencia roja.

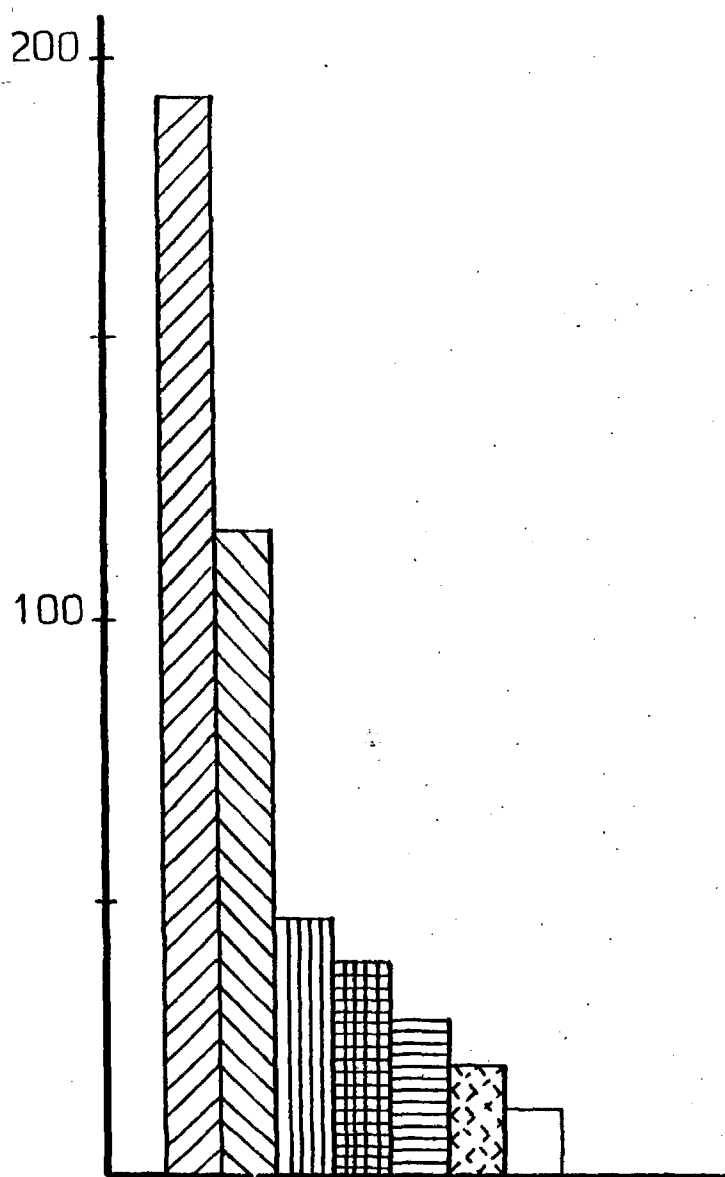


Fig.34 Estimulantes de porfirinogéne

sis. TREDONINA. ETIONINA. TIAMINA Y D-ALA. TIAMINA Y ESTRATIFICACION
 TIAMINA Y GRISEOFULVINA SOLUCION SATURADA. ESTRATIFICACION. SIN ESTRATIFICAR.

PIÑONES EN CUYAS PORFIRINAS FUE DETECTADA FLUORESCENCIA ROJA.

Tratamiento y estado del piñón.	Proto.más coproporfirina µg/g peso seco embrión.
-Estratificados.Sin poner a germinar.Abiertos.	17'21
-Estratificados.Puestos a germinar.Abiertos.	22'87
-Sumergidos en tiamina.Sin estratificar. Puestos a germinar.Abiertos.	14'33
-Sumergidos en tiamina.Estratificados. Sin poner a germinar.Abiertos.	17'86
-Sumergidos en tiamina.Estratificados. Puestos a germinar.Cerrados.	26'71
-Sumergidos en tiamina.Estratificados. Radícula de 0'a 0'5 cm.Germinados.	25'03
-Sumergidos en tiamina.Estratificados. Radícula de 0'5 a 1 cm.Germinados.	47'46
-Sumergidos en tiamina.Estratificados. Radícula de 1'5 a 2 cm.Germinados.	53'57
-Sumergidos en tiamina.Estratificados. Radícula de 2'5 a 3 cm.Germinados.	66'49
-Sumergidos en tiamina y d-ALA.Estratificados. Puestos a germinar.Cerrados.	53'43
-Sumergidos en tiamina y d-ALA.Estratificados. Sin poner a germinar. Abiertos.	40'77
-Sumergidos en etionina.Estratificados. Puestos a germinar. Cerrados.	55'05
-Sumergidos en etionina.Estratificados. Puestos a germinar.Abiertos.	177'45
-Sumergidos en treonina.Estratificados. Puestos a germinar.Cerrados.	17'07
-Sumergidos en treonina.Estratificados. Puestos a germinar.Abiertos.	370'02
-Estratificación seguida de germinación en la misma vermiculita.Radícula 2'5 - 3 cm.Germinados.	105'23
-Estratificación seguida de germinación en la misma vermiculita.Radícula mas de 4 cm Germinados.	54'35

5.-DISCUSSION.

5.- DISCUSION

Es evidente la presencia de d-ALA sintetasa; por la formación de d-ALA, que es susceptible de detectarse y valorarse en presencia de extractos que despliegan actividad d-ALA sintética y por la forma de extracción hasta llegar a extractos purificados de mucha mayor actividad enzimática específica, se confirma su existencia.

Para las determinaciones de actividades enzimáticas y actividades enzimáticas específicas en los pasos primero, segundo y tercero de extracción, en embriones, plántulas y endospermos (apartado 4.2.1.2.) partimos de piñones estratificados 90 días, puestos a germinar y cerrados; estratificados 90 días, puestos a germinar 28 días y abiertos; estratificados 90 días, puestos a germinar 30 días y germinados apuntando la radícula, con radícula de 1'5 a 2 cm. y con radícula de 3 a 4 cm.

El hecho de utilizar piñones estratificados 90 días es porque este periodo de tiempo es idóneo para una rápida germinación.

Por otra parte por la TABLA XII se deduce que la germinación implica un aumento de la actividad enzimática específica de la enzima tanto en los pasos primero y segundo como en el tercero de manera mas significativa, tanto en embriones como en endospermos y por la TABLA XIII que se logran unas purificaciones en el

paso tercero con respecto al primero en embriones entre límites que van del orden de 6'51 a 21'77 veces y en endospermos de 9'19 a 16'08 en abiertos y germinados, en correlación con el decrecimiento de proteínas.

Para la determinación de la constante de Michaelis y para soslayar las diferencias (aunque pequeñas) que pudieran presentar las circunstancias de su ejecución, como reactivos, manipulación, material, etc., hallamos las K_m de los extractos primero (bruto) y tercero de embriones, plántulas y endospermos de los diferentes estadios de pregerminación y germinación que dieron valores semejantes para después establecer así como K_m definitivo de la d-ALA sintetasa el valor medio total de $1'00 \cdot 10^{-2}$ H (véase TABLA XVII y Fig.2).

Para las determinaciones de pH y temperatura óptima; relación lineal entre proteínas y formación de d-ALA; activadores e inhibidores hubo que partir de mucha mayor cantidad de piñones que en experiencias anteriores para tener volúmenes de extractos lo suficientemente grandes que permitiesen, además de determinar las actividades enzimáticas específicas y enriquecimiento de la enzima y K_m en los pasos primero y tercero, efectuar las determinaciones antes apuntadas en el paso primero de piñones estratificados 92 días y germinados con radícula de 1'5 a 2 cm.

A parte de la determinación de pH óptimo, realizamos la de

la temperatura óptima de la actividad d-ALA sintetásica porque hay contradicciones entre los diversos autores respecto de la d-ALA sintetasa de otras fuentes, aunque parece ser que la opinión más generalizada es la 37° C. que coincide con la hallada por nosotros, tanto en embriones como en endospermos y que por otra parte creemos es la más adecuada.

En lo que respecta a la relación de la actividad d-ALA sintetásica y cifra de proteínas (Fig. 5) se demuestra que hay una proporcionalidad entre ambas, entre los límites estudiados, siendo de tipo lineal, como se demuestra por la correspondencia entre la cifra de proteínas (expresadas en $\mu\text{g}/1 \text{ ml}$) y el d-ALA formado expresado en μg . Esta relación de linealidad se ajusta a la más estricta lógica.

De los resultados obtenidos con los activadores e inhibidores empleados, tanto en plántulas como en endospermos, es natural que la etionina sea la que ejerza mayor activación porque es la que produce mayor estímulo de biosíntesis de porfirinas y para que éstas se formen han tenido que pasar por la fase previa de biogénesis de d-ALA y por ende de la activación de la enzima; la tiamina es un fuerte estimulante de la germinación como ya se comprobó en trabajos realizados en el Departamento de Bioquímica (Sanz Muñoz y Santos Ruiz, 1974 y Sanz Muñoz y Palacios Aleiz, 1972), y también de la formación de porfirinas (aunque menor que la etionina), y por consiguiente se desprende de ello naturalmen-

te que estimule la actividad enzimática. La hemina la empleamos porque la literatura refiere su influencia sobre la actividad d-AIA sintetásica. Por último el sulfato cúprico y férrico, por la naturaleza de sus cationes, ejercen una acción inhibitoria.

Es obvio también decir que la d-AIA dehidrasa se encuentra en la semilla de *Pinus pinast*; se demostró su presencia en embriones, plántulas y endospermos de piñones en diferentes estadios de germinación (Tesina M. Méndez Marco) por la formación de, porfobilinógeno detectable por la reacción de Ehrlich y medida espectral después de su color.

Para las determinaciones de actividades enzimáticas, actividades enzimáticas específicas y Im, se practicaron en las fracciones primer paso, cuarto paso y eluatos procedentes de embriones, plántulas y endospermos de piñones estratificados 55 días, puestos a germinar 5 días y cerrados; estratificados 90 días, puestos a germinar y abiertos y piñones estratificados 130 días y de ellos, apuntando la radícula, con radícula de 0'5 a 1 cm. de longitud y radícula de 3'5 cm. ó mayor. Aunque el tiempo de estratificación es diferente para los piñones cerrados, abiertos y germinados, sí se puede establecer una comparación por ser los cerrados un estadio de pregerminación, los abiertos constituir una iniciación de germinación y los germinados ya, una germinación propiamente dicha en tres fases de desarrollo de la plántula y por lo tanto de longitud de radícula.

Por la TABLA XXIII se deduce que la actividad enzimática específica, tanto en embriones como plántulas y endospermos de los diferentes estadios, aumenta notablemente del primer paso de extracción al eluato final.

Por las TABLAS XXV y XXVI se puede observar que la purificación de la d-ALA dehidrasa en embriones y plántulas oscila entre 2'99 y 22'85 veces del eluato con respecto al primer paso y en los endospermos de 2'05 a 17'78 veces.

Para la determinación de la constante de Michaelis de la d-ALA dehidrasa hacemos las mismas consideraciones que anteriormente expusimos en la d-ALA sintetasa y por eso fueron múltiples las gráficas y valores que obtuvimos para los pasos cuarto y eluato de los embriones, plántulas y endospermos de cada uno de los estadios de germinación anteriormente referidos. Así establecemos un valor medio de $1'32 \cdot 10^{-2}$ M (TABLA XXVII y Fig. 13).

Para la determinación de pH óptimo e inhibidores respecto de la actividad enzimática se partió de una mayor cantidad de piñones para poder obtener volúmenes de extractos suficientes para efectuar todas las determinaciones. Antes de realizar estas determinaciones se quisieron corroborar las actividades enzimáticas específicas de los pasos primero y eluato de plántulas y endospermos de piñones estratificados 64 días y germinados después con plántulas de radícula de 0'1 a 1 cm. de longitud (TABLAS XXVIII y XXIX.) La constante $1'39 \cdot 10^{-2}$ M de Michaelis (TABLA XXX) fue

prácticamente igual que el valor medio anteriormente determinado de $1.32 \cdot 10^{-2}$ M.

El pH óptimo se determinó igualmente en extractos de plántulas y endospermos procedentes de piñones estratificados 64 días y germinados después con plántulas de radícula de longitud de 0.1 a 1 cm. Las determinaciones se efectuaron en los pasos primero y eluatos de la extracción resultando siempre 7.8 (Fig. 14 y 15). Esto nos indica que en cualquier otro estadio de germinación la enzima funcionara a semejante pH óptimo.

En la literatura Beal y Castelfranco, 1974, se suele hacer referencia a los inhibidores de la d-ALA dehidrasa de otras plantas y de ellos los mas citados son el ácido levulínico, el cianuro sódico, malonato sódico, arsenito sódico, y azida sódica, por esto es por lo que se ha estudiado el efecto inhibitor de ellos sobre la enzima, con el resultado que se puede apreciar en las Fig. 16 a la 20 y 21, se manifiesta inhibición (TABLA XXXI).

Por otra parte y como el ácido levulínico ejerce una acción competitiva con la d-ALA dehidrasa respecto al d-ALA, inhibiendo la formación de LBG y acumulándose por ello d-ALA, quisimos comprobar si en efecto esta inhibición competitiva que se verifica en otras plantas se realizaba en la semilla de Pinus pinea. Por eso, tanto con el ácido levulínico como con el cianuro sódico y el malonato sódico, tratamos de ver si habia inhibición competitiva, para ello empleamos plántulas y endospermos pro-

cedentes de plfonas estratificadas 55 dias y germinados despues apuntando la radícula (Fig.22 - 27); la competitividad se de - muestra, porque de la misma Va que los controles en los cuales no se emplea el inhibidor en la reacción enzimática y se cortan sobre el eje de ordenadas 1/v.

Respecto de las porfirinas creímos conveniente, antes de entrar en la detección é identificación de las mismas, mediante C.C.D por su fluorescencia y despues por los espectros de absorción de las manchas fluorescentes, efectuar una orientación previa de la existencia de porfirinas por los espectros de absorción é identificación de las bandas de Soret y determinación cuantitativa en extractos obtenidos directamente y haciendo las incubaciones con arreglo al apartado 4.1.3.2. (TABLAS XXXII y XXXIII). Comprobados en efecto sus máximos de absorción, entonces realizamos las cromatografías en capa delgada. Los numerosos cromatogramas obtenidos (TABLA XXXVII) con dos manchas con fluorescencia roja (véase Fig.28,29 y 30 como representación de todos) indican que se detectan dos porfirinas con fluorescencia roja, característica a diferentes estadios de germinación. La de mayor Rf emigra siempre bastante con respecto al punto de partida, dando Rf algo diferentes, según sea el origen del estadio de germinación. Por el espectro de absorción con pico en 409 nm. (banda de Soret) de la mancha obtenida por cromatografía en capa delgada (Fig.33) por aplicación del patrón de protoporfirina idéntico al de los obtenidos por elución de las manchas problema, se infiere ser la protoporfirina.

La otra mancha fluorescente roja permanece generalmente en el punto de partida sin sufrir migración alguna, como ocurrió con los cromatogramas patrón que hicimos utilizando coproporfirina patrón, solamente en algún caso aislado como se puede observar en la Fig.30 se verifica una ligera emigración ($R_f = 0.15$).

En las TABLAS XXXV y XXXVI se consignan respectivamente los R_f de las manchas de los cromatogramas de deñones sin estratificar y estratificados, sometidos a diversos tratamientos y por ellas se puede observar que las manchas procedentes de los cerrados poseen, excepto una sola, fluorescencia blanca y la de los estratificados en su mayoría fluorescencia roja. Como quiera que la fluorescencia roja es característica de las porfirinas, ello hace descartar que las manchas con fluorescencia blanca provengan propiamente de porfirinas aunque estos compuestos, como después en el apartado 4.2.3.2.2, se pueda demostrar que las curvas de absorción obtenidas de extractos verificados según el apartado 4.1.3.5.1 den máximos correctos en 402 y 409 nm. (bandas de Soret) respectivamente para la copro y protoporfirina (Fig.31 y 32). De todo ello se deduce que las manchas con fluorescencia blanca, aunque no provengan de porfirinas, probablemente sean de compuestos emparentados como los correspondientes porfirinógenos, aunque esto no lo podamos asegurar con certeza.

Para confirmar la presencia de protoporfirina y coproporfirina y abundando y corroborando en lo anteriormente expuesto (véase apartado 4.2.3.2.2) hicimos una serie de extracciones se-

gún el método descrito en el apartado 4.1.3.5.1 y determinaron las curvas de absorción en cloroformo y CH_2Cl_2 (después de eliminar el CH_2Cl_2 al vacío) entre longitud de onda de 380 a 430 nm. Las curvas de gran similitud ofrecieron siempre, en los más diversos estadios de germinación y tratamientos, máximos en 409 y 402 nm. De ellas entresacamos las Fig. 31 y 32 como genuinas representantes.

Respecto a los valores cuantitativos de las porfirinas (proto y coproporfirina) en piñones cerrados sometidos a diversos tratamientos (TABLAS XXXVIII, XXXIX y XL) se concluirá que la estratificación incrementaba la cantidad de porfirinas, igualmente la tiamina, tiamina estratificación, tiamina d-ALA, griseofulvina, etionina y treonina y estas últimas aún más si se reforzaba el tratamiento con estratificación. El hecho de que la estratificación, la tiamina, la tiamina-estratificación y la tiamina d-ALA puedan estimular la biogénesis de porfirinas no tiene nada de extraño ya que estimulan la germinación aumentando la velocidad y tanto por ciento de germinación y por ende la de porfirinas. La etionina incrementa la actividad d-ALA sintetásica (Fig. 12) y por consiguiente favorece la formación de d-ALA y por tanto de PBG y porfirinas, no así están tan claros los estímulos de la griseo-fulvina y treonina:

En piñones abiertos que se sometieron a diversos trata -

nientos ocurren procesos semejantes a los cerrados (TABLAS XLI y XLII) la estratificación, la tiamina, la tiamina - d-AIA, tiamina - d-AIA - estratificación, actúan como activadores de la biosíntesis porfirínica, y la griseofulvina pero especialmente la etionina y treonina seguidos de estratificación son unos potentes activadores de la biosíntesis porfirínica; las razones para que ésto se verifique con las mismas que para los piñones cerrados.

Por otra parte en los piñones abiertos la formación de porfirinas es mayor que en los cerrados (TABLAS XLIII y XLIV) hecho natural, ya que los piñones abiertos constituyen un estado mas avanzado en la germinación que los cerrados.

En piñones germinados, después de tratados con tiamina seguido de estratificación, se comprobó un incremento de porfirinas que como es natural va en correlación con el tamaño de la plántula y por tanto con la longitud de la radícula (TABLA XLVI), es decir, en sentido creciente ó progresivo con el avance de la germinación.

6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES.

6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1.- Se ha detectado actividad enzimática d-ALA sintetasa en embriones, plántulas y endospermos de semillas de Pinus pinea en diferentes estadios de germinación.

2.- Se ha logrado purificar la d-ALA sintetasa en los diferentes estadios de germinación y se han alcanzado los máximos niveles: 21'77 veces en plántulas de piñones estratificados 90 días y germinados despues con radícula de 3 a 4 cm.; y 17'98 veces en endospermos de piñones igualmente estratificados 90 días y germinados con radícula de 1'5 a 2 cm.

3.- Se ha determinado la constante de Michaelis, el pH óptimo y la temperatura óptima de la d-ALA sintetasa.

4.- Se ha determinado la linealidad proporcional entre la concentración de proteínas y la actividad enzimática.

5.- Se ha comprobado la acción activadora sobre la d-ALA sintetasa de etionina, tiamina y hemina por el orden descrito, así como también el efecto inhibitor de los iones cúprico y férrico.

6.- Se ha demostrado actividad d-ALA dehidrásica en embriones, plántulas y endospermos de semillas de Pinus pinea en diferentes estadios de germinación.

7.- Se ha logrado purificar la enzima d-ALA dehidrasa de dichos estadios de germinación y se han alcanzado los máximos niveles de purificación, uno de 22'85 veces y otro de 17'78 en

plántulas y endospermos respectivamente de semillas estratificadas y germinadas después, apuntando la radícula.

8.- Se ha determinado la constante de Michaelis y el pH óptimo de la d-ALA dehidrasa.

9.- Se ha comprobado el efecto inhibitor sobre la actividad d-ALA dehidrasa de ácido levulínico, cianuro sódico, malonato sódico, arsenito sódico y azida sódica.

10.-La acción inhibitora del ácido levulínico, cianuro sódico y malonato sódico es ^{de} tipo competitivo.

11.-Se han identificado proto y coproporfirina en semillas de *Pinus pinea* en diferentes estadios de germinación por la fluorescencia roja y RF que dan las manchas obtenidas en cromatografía sobre capa delgada y espectralmente cuali y cuantitativamente por las bandas de Soret.

12.-La cifra de la totalidad de porfirinas se eleva de manera significativa en los estadios previos a la germinación y llega a su máximo nivel después en semillas germinadas abiertas y de radícula de longitud de 0.5 a 1 cm. Posteriormente desciende con el desarrollo de la plántula y aumento de la radícula para disminuir gradualmente por el agotamiento de las materias de reserva del endospermo.

13.-En piñones cerrados y abiertos la estratificación, la tiamina y la mezcla de tiamina y d-ALA actúan como activadores de la biosíntesis porfirínica, desplegándose mayor actividad en los segundos.

14.- La mezcla de tiamina y EDTA no favorece la formación de porfirinas.

15.- El EDTA tiende a disminuir ó bloquear la biogénesis de porfirinas por formar un complejo con el Mg^{++} , ión activador de la d-ALA sintetasa.

16.- La mezcla de tiamina y griseofulvina estimula netamente la biogénesis porfirínica, y destaca el segundo compuesto como un buen activador.

17.- La treonina y la etionina, acompañadas de estratificación, estimulan intensamente la formación de porfirinas, especialmente en los piñones abiertos.

18.- En los piñones cerrados y abiertos, después de ser sometidos a los distintos tratamientos, se comprueba que en estos últimos los valores de porfirinas son mucho mayores. Notoriamente los niveles son muy significativos en los tratados con etionina y treonina.

19.- En piñones germinados se da un progresivo incremento de los valores de porfirinas, en correlación con el crecimiento de la radícula y, por consiguiente, de la plántula.

20.- Los valores de porfirinas de piñones germinados, tratados con tiamina y seguidos de estratificación, aunque altos, son menores que en los abiertos tratados con etionina y treonina.

21.- Los estimulantes más potentes de la biogénesis de porfirinas son por este orden: treonina; etionina; tiamina y d-ALA; tiamina y estratificación; tiamina y griseofulvina en solución saturada; y estratificación.

7.- BIBLIOGRAFIA.

7.- B I B L I O G R A F I A.

- Adler, A. D., 1973. Ann. N. Y. Acad. Sci., 206 - 17.
- Bialek, R. W. y Soutka, A., 1965. J. Chromatog., 17, 127
- Battersby, A. R. H. y Donald, E., 1975. Porphyrins Metalloporphyrins, 61 - 122, Edit. Smith Kevin M. Elsevier Amsterdam.
- Beal, I. S., 1971. Plant. Physiol., 48, 316 - 19.
- Beal, I. S., y Castelfranco, P. A., 1974. Plant. Physiol., 53, 291 - 96 y 53, 297 - 303.
- Beal, I. S., Gough, S. P. y Granick, S., 1975. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, Nº 7, 2719 - 2723.
- Bogorad, L., 1958. J. Biol. Chem., 233, Nº 2, 501.
- Bogorad, L., y Granick, S., 1953. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 39, 1176.
- Brouillet, N., Arselin, G. y Volland, C., 1975. Biochimie, 57, Nº 5, 647.
- Burnham, B. F y Lascelles, J., 1963. Biochem. J., 87, 462.
- Bykhovskii, V. Ja., Zaitseva, N. I. y Bukin, V. N., 1969. Usp. Biol. Khim., 10, 199 - 229.
- Clotten, R., 1971. J. Chromatog., 63 (1), 185 - 91.
- Cheh, A. M. y Neilands, J. B., 1976. Struct. Bonding. Berlin, 29, 123 - 69.
- Chu, T. C y Chu, J. HWA., 1966. J. Chromatog., 21, 46 - 51.
- Chu, T. C. y Green, S. A. A. y Chu, J. HWA., 1951. J. Biol. Chem. 190, Nº 1, 643.

- Demole, E., 1958, *J. Chromatog.*, 1, 24.
- Doss, M., 1970, *a.Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 8 (3), 197-207.
- Doss, M., 1970, *b.Z. Anal. Chem.*, 252, (2-3), (104-11).
- Doss, M., 1972. *Progr. Thin Layer Chromatography Relat. Methods*, 3, 145 - 76, Edit. Niederwieser A. Ann. Arbor Sci. Publ. Ann. Arbor Mich.
- Doss, M., 1976. *Erg. Exp. Med.*, 20, 181 - 200.
- Doss, M. y Schmidt, A., 1971. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem*, 9 (5), 415 - 18.
- Doss, M. y Ulschofer, B. y Philipp-Dornaston, W. K., 1971. *J. Chromatog.*, 63 (1), 113 - 20.
- Edwards, A. M. y Elliott, W. H., 1975. *J. Biol. Chem.*, 250, № 7.
- Elder, G. H., Gary, C. H. y Nicholson, D. V., 1972. *I. Klin. Pathol.*, 25 (12), 1013 - 33.
- Ellsworth, R. K., 1969, *Anal. Biochem.*, 32, 377 - 80.
- Ellsworth, R. K., Perkins, H. J. y Snow, S. E., 1970. *J. Chromatog.*, 47 (3), 395 - 9.
- Falk, J. E. y Benson, A., 1953. *Biochem. J.*, 55, 101.
- Fischl, J., Eichhom, F., Ruttenberg, A. y Major, C.H., 1970. *Klin. Chem.*, 16 (4), 331 - 4.
- Frydman, B. y Frydman, R. B., 1975. *Acc. Chem. Res.*, 8 (6), 201 - 8.
- Frydman, R. B., Valasinas, A. y Frydman, B., 1973. *Enzyme*, 16 (1-6), 151 - 9.

- Gajdos - Török, M., 1969. Bull. Soc. Chem. Biol., 50, № 4, 925 - 928.
- Gerald, S., Krups, V., Murphy, W., Taub Ho y Blattel, R. A., 1975. Ann. Acad. Sci., 244, 472 - 80.
- Gibson, K. D., Matthew, M., Heuberger, A. y Tait, G. H., 1961. Nature, 192, № 4799, 204.
- Gibson, K. D., Heugerg, A. y Scott, J.J., 1955. Biochem. J., 61, 618.
- Gidari, A. S., Lane, S. E. y Levere, R. D., 1976. Biochim. Biophys. Acta., 451, 326 - 331.
- Granick, S., 1948. J. Biol. Chem., 172, 717.
- Granick, S., 1954. Science, 120, 1105.
- Granick, S., 1959. Plant. Physiol., 34, 28.
- Granick, S., 1961. J. Biol. Chem., 236, 1163.
- Granick, S., 1966, J. Biol. Chem., 241, 1359 - 1375.
- Granick, S. y Kappas, A., 1967. J. Biol. Chem., 242, 4887 - 4893.
- Granick, S. y Urata, G., 1963. J. Biol. Chem., 238, 821.
- Gratecos, K., 1972. Marseille Med., 109, 803 - 20.
- Grinstein, H. y Maxwell, M., 1948. J. Biol. Chem., 172, 459.
- Jensen, J., 1963. J. Chromatog., 10, 236.
- Jirsa, M, y Kordao, V., 1976. Cas. Lek., 115 (13), 394 - 396.
- Jones, O. T. G., 1963. Biochem. J., 87, 186.
- Kang Yeon-Jan y Spikes, J. D., 1976. Biochem. Biophys., 172 (2), 565 - 73.

- Kikuchi, G., 1973. Nippon Ika Daigaku Zasshi, 40 (6), 26 - 29.
- Kikuchi, G., 1976. J. Biochem., 79, Nº 4, 38.
- Kikuchi, G., Kumar Oh. Taluaga y Shemin, D., 1978. J. Biol. Chem. 237, 1214.
- Kozuru Mitsuo, Miyagi Ken, Ibayashi, 1977. Seigo Rinsho, 26 (8), 1399 - 405.
- Laver, W. G., Neuberger, A. y Udenfriend, S., 1958. Biochem.J., 70, 4 - 14.
- Lineweaver, H. y Burk, D., 1934, J. Am. Chem. Soc., 56, 658 -68.
- Lohr, J. B. y Friedman, H. G., 1976. Biochem. Biophys. Res. Comm., 69, Nº 4, 908.
- Lowry, O. H., Rosebraugh, N. J., Farr, A.L. y Randall, R. J., 1951. J. Biol. Chem., 193, 265 - 275.
- Martinez, C. A. y Mills, G. G., 1971. Elin. Chem., 17,(3). 199 - 205.
- Mauzerall, D., 1977. Encycl. Plant. Physiol. New. Ser., 5, 177 - 124.
- Mauzerall, D. y Granick, S., 1956. J. Biol. Chem., 219, 435.
- Meller, E., Belkin, S. y Harel, E., 1975. Phytochemistry, 14, 2399 - 2402.
- Méndez Marco, M., 1976. " Identificación del d-aminolevulinato en semillas de Pinus pinea en germinación". Tesis presentada en la Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid.

- Miller, J. W. y Teng, O., 1967. 7th. Int. Cong. Biochem. Tokyo, 1059 p.
- Naira Hajime, 1971, Igaku No Ayumi, (11), 605 - 609.
- Nicholas, R. E. H. y Rigminton, G., 1955. Biochem. J., 48, 306 y 55, 109.
- Nishida, G. y Labbe, R. F., 1959. Biochim. Biophys. Acta., 31, 519.
- Pozo Hernández, C., 1975. "Clorofilas en semillas de Pinus pinea germinantes" Tesina presentada en la Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid.
- Ramaswamy, N. K. y Madhusudanan Hair, P., 1973. Biochim. Biophys. Acta., 293, 269.
- Rebeiz, C. A., Aboon-Heider, M., Jaghi, M. y Castelfranco, P.A., 1970. Plant. Physiol., 46, (4), 543 - 549.
- Sanders, H. UK., Briquet, M., Foury, F., Drysdale, B. E y Hutton, J. R., 1975. J. Bio. Chem., 250, Nº 23, 9090.
- Sanz Muñoz, M y Palacios Alaiz, E., 1972. Anal. Real Acad. Farm. 38, Nº 4, 673 - 688.
- Sanz Muñoz, M. y Santos Ruiz, A., 1974. An. Quim., 70, 1119.
- Scharf, F., Clotten, R. y Schmidt, P., 1969. Aerztl. Lab., 15, 398 - 405.
- Schmidt, R. y Shemin, D., 1955. J. Am. Chem. Soc., 77, 506.
- Schneider Hausjoerg, A. W., 1973. Z. Pflanzenphysiol, 69. (1), 68 - 76.

- Shemin, D., 1976, J. Biochem., 79, N° 4, 37.
- Shemin, D. y Russell, 1953. J. Am. Chem. Soc., 75, 4873.
- Sislér, E. G. y Klein, W. H., 1963. Physiol. Plantarum., 16.315.
- Smith, E. M., 1977. Aromat. Heteroaromat. Chem., 5, 456 - 71.
- Strain, H. H. y Svec. Walter, A., 1975. Chromatography, 3 rd, 744-58.
- Tait, G. H., 1968. En Porphyrins and Related Compounds", Edit. T. W. Govolwin, Biochem, Soc. Symp., 28, 19 -34.
- Tait, G. H. y Gibson, K. D., 1961. Biochem. Biophys. Acta., 52, 614 - 616.
- Tio Tiong Ho, 1972. Ned. Tijdschr. Geneesk., 116, (25), 1048 - 57.
- Traverse, P. M. y Coquelet, M. L., 1970. Feuille., Biol., 11, (53), 45 - 48.
- Twarnick, G., Russell, B. y Bruce, F., 1971. J. Biol. Chem., 246, (22), 6880 - 6885.
- Wellburn, A. R., 1975. Phytochemistry, 14699 - 14701.
- With, T. L., 1967. Klin. Biochem., 1, 30.
- Xifra Wider de, E. A. y Batlle, A. M., 1973. Biochim. Biophys. Acta., 523, N° 1, Marzo 14.
- Xifra Wider de, E. A., Batlle, A. M. y Tigier, H. A., 1971. Biochim. Biophys. Acta., 235, 511 - 517.

