

ACTIVIDAD CATALASICA DEL HABA
(*Vicia faba*)
EN CONDICIONES EXPERIMENTALES.

FRANGIS FUCHS TREMMEL

TESIS

FACULTAD DE CIENCIAS U. N. A. M.
BIOLOGIA



MEXICO, D. F.

1952



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

✦

*A mis queridos padres,
que con su esfuerzo me
dieron esta carrera.*

✦

✦

*Con mi agradecimiento al
Dr. Roberto Llamas, Director
del Instituto de Biología por
su valiosa ayuda.*

✦

✦

*Al Dr. Juan Roca
con sincera estimación.*

✦

S U M A R I O

CAPITULO I: INTRODUCCION

CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS

CAPITULO III:

A.) INFLUENCIA DE LOS
IONES SOBRE LA ACTIVIDAD
CATALASICA

pH óptimo

Activadores e inhibidores

B.) INFLUENCIA DEL FAC-
TOR TIEMPO SOBRE LA
ACTIVIDAD CATALASICA

C.) TEMPERATURA DE GER-
MINACION

D.) LA CATALASA DURANTE
LA GERMINACION DEL
HABA.

CAPITULO IV: DISCUSION Y CONCLUSIO-
NES

BIBLIOGRAFIA

CAPITULO I

I N T R O D U C C I O N

El objeto de este trabajo es el de estudiar la actividad catalásica que desarrolla el haba *Vicia faba* durante la germinación. La catalasa, como observó Loew (9) al aislarla en 1901 de las hojas del tabaco, es un cuerpo capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno con desprendimiento de oxígeno molecular, y no posee ninguna otra propiedad enzimática. Se le ha encontrado, en grandes cantidades, tanto en tejidos de procedencia animal como vegetal, siendo una de las enzimas más ampliamente distribuidas.

Muchos han sido los autores que la estudiaron; entre ellos podemos citar a Wolff y Stoecklin (21), quienes en 1911 idearon un método para purificar catalasa de eritrocitos y obtuvieron una catalasa amarilla en solución, libre de hemoglobina. En 1914 Waentig y Gierisch (20) concentraron catalasa por repetida precipitación alcohólica, diálisis y adsorción. Ellos consideraron a la catalasa como una proteína con un grupo prostético que contiene Fe.

Sumner (15) ha obtenido la catalasa en forma cristalizada y ha logrado establecer que es una combinación de proteína con un compuesto pirrol-ferruginoso (hem) siendo, por lo tanto, un cuerpo análogo a la hemoglobina. En 1937 Sumner y Dounce (16) cristalizaron catalasa del hígado de buey; algo más tarde obtuvieron catalasa cristalina del hígado de cordero y en 1939 Dounce y O. Frampton (4) lograron obtenerla del hígado de caballo.

También se ha estudiado en toda clase de vegetales. En estos, la cantidad de catalasa es baja, comparada con la del hígado

y eritrocitos. Esta puede ser la razón por la cual ninguna catalasa vegetal se ha aislado en estado puro. El contenido catalásico varía grandemente en las diferentes partes de las plantas, encontrando Zeile (22) fuertes concentraciones en semillas germinadas.

La catalasa es diferente en su naturaleza de otras enzimas, ya que su poder de descomponer peróxido de hidrógeno es limitado, consumiéndose la catalasa durante la reacción.

Según Loew (9) 1901 la catalasa existe en dos formas: una insoluble en agua y la otra soluble, a las que ha designado como alfa y beta catalasa respectivamente. Appleman 1910 (1) encontró que la catalasa insoluble de la papa podía ser separada de la soluble con papel filtro común y corriente. Aproximadamente un 50% del total de la enzima pasa a través del filtro, lo que indica que los dos tipos se encuentran en las mismas proporciones. Tanto las peroxidases como las catalasas descomponen peróxido de hidrógeno con formación de agua y oxígeno, pero mientras las peroxidases separan oxígeno en estado activo, probablemente como oxígeno atómico, la catalasa lo libera como molecular u oxígeno inactivo. La catalasa tiene por lo tanto que atacar dos moléculas del peróxido simultáneamente.

Un segundo punto de diferencia es que mientras la catalasa actúa únicamente sobre el agua oxigenada, las peroxidases actúan sobre diversos peróxidos orgánicos. El oxígeno molecular es incapaz de actuar sobre substancias tan importantes como la glucosa, el ácido láctico y el ácido úrico, los cuales son oxidados en el organismo; de modo que aunque la catalasa está muy ampliamente distribuída, su función es problemática, excepto en el caso de las plantas verdes, donde Usher y Priestley (18) hicieron importantes investigaciones sobre el papel que desempeña esta durante la función clorofiliana. De acuerdo con estos investigadores en la fotosíntesis intervienen tres factores: El cloroplasto del protoplasma, la clorofila misma y la catalasa. Por medio del pigmento, que actúa como sensibilizador óptico y químico, la energía luminosa es empleada para producir una reacción entre el bióxido de carbono y el agua, formando formalde-

hido y peróxido de hidrógeno. Ambos cuerpos son tóxicos y si se permite su acumulación las células mueren; el formaldehído es, sin embargo, polimerizado rápidamente por el protoplasma del cloroplasto, y el peróxido de hidrógeno se descompone en oxígeno y agua por medio de la catalasa.

El papel fisiológico asignado a la catalasa es el de proteger a los organismos vivos contra daños ocasionados por el peróxido de hidrógeno. Actualmente se sabe que este peróxido de hidrógeno resulta de reacciones metabólicas normales.

La gran mayoría de los investigadores han encontrado una relación entre la actividad catalásica y la respiración. Se ha visto que en algunos casos la actividad catalásica y la intensidad de los fenómenos respiratorios son paralelas, deduciéndose en conclusión que una es la causa de la otra. (11)

Se ha observado también, en algunos casos, que la actividad catalásica es paralela a la actividad metabólica general del organismo.

Ya el haba había sido estudiado anteriormente por otros investigadores desde el punto de vista enzimático. Así tenemos a Jules Labarre y Saul Pfeffer (7), quienes estudiaron la acción de la alfa y beta amilasa y de la proteasa. En éste trabajo el objeto ha sido estudiar la actividad catalásica durante la germinación, con lo cual se viene a completar el estudio de este vegetal.



CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron para este trabajo semillas de haba *Vicia faba*, las cuales se hicieron germinar en una estufa de temperatura constante, controlada con termóstato. Las semillas fueron pesadas en lotes y germinadas sobre algodón saturado con agua destilada, en cápsulas de porcelana, que se colocaron dentro de la estufa a la temperatura y por el tiempo que se deseaba. La luz artificial se obtuvo con lámparas de 150 Watts, Flood Light, que funcionaban el tiempo requerido según el caso (unas 6 horas diarias aproximadamente).

EXTRACCION ENZIMATICA

Las semillas por estudiar son maceradas con mortero, en caso de que hayan germinado, o con molino de mano, tratándose de semillas secas, hasta formar una masa homogénea.

El tiempo de pulverización es limitado (de 2 a 5 minutos) pues la actividad catalásica es sensible, en algunos casos, a la agitación. El material triturado es diluído inmediatamente en agua destilada (5 ml. por cada gramo de semilla) dejándose reposar durante 30 minutos. Después del tiempo requerido se filtran los extractos por papel filtro y el líquido transparente así obtenido se utiliza como extracto enzimático.

DETERMINACION DE LA CATALASA

Los métodos que generalmente se emplean para determinar la acción catalásica son dos: el permanganométrico y el yodométrico.

En el primer caso se emplea como substrato el perborato de sodio en solución acuosa, determinándose la actividad catalásica por titulación con permanganato de potasio en presencia de ácido sulfúrico. Ordinariamente se añade una gota de cloruro de manganeso al 1% antes de la titulación, para evitar un período inicial de decoloración del permanganato.

El método utilizado en este estudio es el yodométrico, empleándose como substrato agua oxigenada, preparada a partir de una solución de perhidrol al 30%, del cual se toma 0.56 ml. por 100 c.c. de agua destilada; a 10 ml. de esta solución de agua oxigenada se añaden 10 ml. de Buffer pH 5, el fermento y agua, para formar un volumen de 25 c.c.

Después de haber actuado 30 minutos, se toman con pipeta 5 ml. de esta alícuota y se agregan a 5 ml. de ácido sulfúrico 2N y a un gramo de yoduro de potasio. Se titula después de media hora (para que se libere totalmente el yodo) con tiosulfato de sodio 0.05 N usando como indicador almidón soluble al 2%. La temperatura de acción es de 2°C, debido a que la catalasa es rápidamente inactivada por el agua oxigenada a temperaturas mayores. El pH 7 es el más favorable para la actividad catalásica; sin embargo, a este pH la destrucción del agua oxigenada es muy rápida, siendo imposible determinar su acción con exactitud; por tal motivo utilizamos para nuestros experimentos el pH 5, con el cual se retardaba la acción.

CINETICA DE LA ACCION ENZIMATICA

La ley de la acción de las masas establece que la velocidad de cualquier reacción química es proporcional a la concentración activa de los materiales reaccionantes. Esto es verdadero, se utilice o no un catalizador, aunque este último puede influenciar la magnitud de la constante de velocidad, el cual es el factor de proporcionalidad que hace posible igualar el tiempo de un experimento con las concentraciones de los reactivos o los productos finales. Se puede observar que las reacciones enzimáticas, cuyo curso puede ser descrito matemáticamente, pertenecen al orden

cero o al de primer orden. Para varias reacciones enzimáticas se ha encontrado que la cantidad del producto "X" es una función lineal del intervalo de tiempo "t", en otras palabras, "X" es constante durante unidades sucesivas de intervalos de tiempo. Esto es descrito como una reacción de orden cero. Como "X" es proporcional a "t" se puede escribir $X = kt$.

Las reacciones de primer orden se caracterizan por un ascenso lento y gradual en la velocidad de formación de "X", ya que su velocidad de producción está en función de la concentración del substrato sin reaccionar, $a - x$, el cual disminuye tanto como X aumenta.

La constante de velocidad K para una reacción de primer orden es dada por la expresión:

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a - x} \quad \text{o} \quad K = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{C_1}{C_2}$$

CALCULOS

Para determinar la actividad catalásica se procedió a hacer los siguientes cálculos:

Partiendo de una solución de agua oxigenada 0.1 N que contiene 0.056 ml. de perhidrol en 10 ml. de agua destilada, cantidad sobre la cual actúan 0.1888 grs. de semilla, y tomando en cuenta los ml. de agua oxigenada descompuesta espontáneamente en el testigo, esto es el que no contenía fermento, se calculó de la siguiente manera: Si en 25 c.c. de la alícuota hay 0.056 ml. de agua oxigenada, en 5 ml. que tomamos de este habrá 0.0112 ml. de H_2O_2 . Si 5 ml. de tiosulfato equivalen a 0.0112 ml. de H_2O_2 , 2.6 ml. de tiosulfato (cantidad gastada por el que tenía fermento) corresponde a "X" ml. de agua oxigenada o sea:

$$\frac{0.0112 \times 2.6}{5} = 0.005824 \text{ (Cantidad de agua oxigenada que hay después de actuar el fermento)}$$

La diferencia entre 0.0112 y 0.005824 o sea 0.005376, es la cantidad de agua oxigenada descompuesta en 30 minutos por "X" cantidad de semilla. Tomando en cuenta los datos anteriores se calcula la cantidad catalásica de la semilla.

Todos los cálculos hechos en este trabajo se hicieron de la manera ya indicada anteriormente.



CAPITULO III

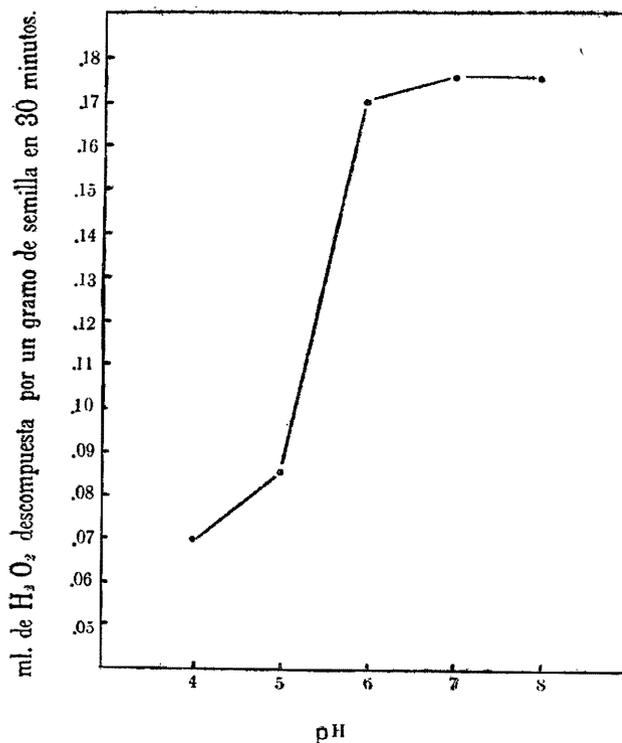
INFLUENCIA DE LOS IONES SOBRE LA ACTIVIDAD CATALASICA.—pH óptimo.

Una de las características de los fermentos es que actúan a determinado pH. La acidez o alcalinidad acentuada causan la destrucción del fermento, así como su exposición a grados menores de acidez o alcalinidad, pueden causar la inactivación reversible de algunas enzimas.

La explicación del pH óptimo se ha buscado en la disociación electrolítica de las proteínas. Hay evidencia, en el caso de algunas enzimas purificadas, de que su pH óptimo no difiere grandemente de sus propios puntos o zonas isoelectricas; pero la relación no es estrecha en el caso de todas las enzimas. Michaelis (40) y colaboradores encontraron que la actividad de la invertasa (sacarina) es máxima cuando su comportamiento como ácido o base es mínima.

La catalasa es por tanto un fermento que es influenciado también por el pH. En este trabajo se procedió a determinar la actividad catalásica bajo el efecto de distintos pH y se encontró que a los 7 días de germinación a 25°C el pH óptimo de la catalasa del haba es el de 7, con buffer de fosfatos. Los resultados

obtenidos se expresan en la siguiente gráfica:



Además se han hecho trabajos con relación a la influencia del pH sobre la actividad catalásica como los efectuados por Duer (2) con el *Bacillus mesentericus* en el cual encontró una actividad óptima a pH 9.2 cuando la concentración del agua oxigenada es 0.2 N.

ACTIVADORES E INHIBIDORES.

La velocidad de reacción para muchas enzimas puede aumentar notablemente por la presencia de ciertos compuestos o iones que se conocen con el nombre de activadores, estimulantes o protectores. Es de aconsejarse reservar el término de coenzima para aquellas sustancias que activan específicamente y permiten la acción enzimática y el término activadores para aquellas que únicamente modifican la velocidad de la reacción. Sin embargo, esta distinción no siempre es posible, porque muchos sistemas enzimáticos no han sido purificados hasta el grado necesario para poder deducir consecuencias ciertas.

El ion cloro, por ejemplo, in vivo activa la amilasa pancreática, aunque los bromuros, iodatos, nitratos y tiocianatos, también son efectivos aunque en menor grado. Para enumerar otros ejemplos, la lipasa pancreática es activada por las sales biliares, albúmina y por el oleato de calcio, mientras que la papaína y la bromelina son activados por el ácido cianhídrico. Se pueden enumerar varias hipótesis en relación con este fenómeno, las cuales se pueden aplicar en ciertos casos y en otros no. Los activadores pueden actuar en unos casos como emulsificantes, en otros se explica su acción como peptizantes, o bien haciendo que el substrato reaccione más fácilmente con la enzima. Se ha demostrado que muchos de los activadores actúan como reactivos que estabilizan o protegen los grupos sulfhidrilos u otros existentes en la enzima e indispensables para su acción.

En contraposición a los activadores existen los llamados inhibidores enzimáticos. En general, toda sustancia que desnaturaliza o precipita prótidos puede considerarse como inhibidor, como las sales de mercurio, plata, cobre, así como alcohol, éter, etc.

Los halógenos, el agua oxigenada y otros agentes oxidantes, son perjudiciales a la acción enzimática por su efecto sobre determinados grupos funcionales como los radicales sulfhidrilos. Otros inhibidores actúan sobre el grupo prostético de las enzimas así el H_2S , HCN , inactivan las oxidasas porque fijan el hierro o cobre de dichas enzimas.

El efecto de estas sustancias, ya sea de activación o inhibición, depende grandemente de la concentración en que actúan, y puede o no manifestarse, de acuerdo con su concentración relativa.

Son diversas las sustancias estudiadas hasta la fecha y en este trabajo se demuestra que la catalasa del haba es un fermento que se activa por la cisteína y Vitamina C y se inhibe por el sulfato de cobre, cianuro de potasio, nitrato de calcio y nitrato de potasio. El sulfato de magnesio no tuvo efecto alguno.

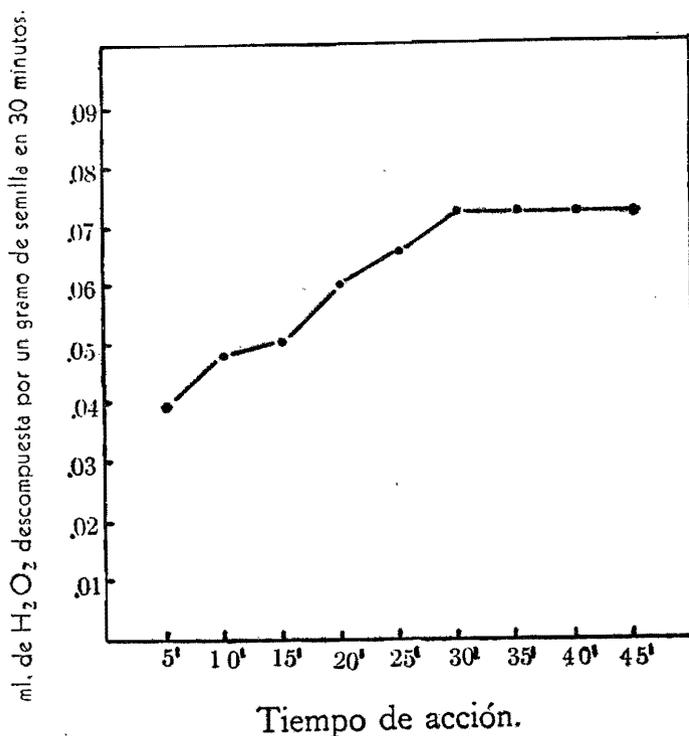
Los experimentos realizados para evidenciar lo anterior se expresan a continuación:

| Cantidad de extracto | Activador o inhibidor | ml. de H ₂ O ₂ descompuesta |
|----------------------|---------------------------|---|
| 0.032 | CuSO ₄ 0.01 M | 0.047 inhibió |
| 0.032 | | 0.11 testigo |
| 0.032 | KCN 0.01 M | 0.04 inhibió |
| 0.032 | | 0.11 testigo |
| 0.040 | CaNO ₃ 0.004 M | 0.067 inhibió |
| 0.040 | | 0.117 testigo |
| 0.040 | KNO ₃ 0.006 M | 0.089 inhibió |
| 0.040 | | 0.117 testigo |
| 0.032 | MgSO ₄ 0.01 M | 0.13 sin efecto |
| 0.032 | | 0.13 testigo |
| 0.032 | Vit. C 0.01 M | 0.182 activó |
| 0.032 | | 0.11 testigo |
| 0.029 | Cisteína 0.01 M | 0.118 activó |
| 0.029 | | 0.09 testigo |

INFLUENCIA DEL FACTOR TIEMPO SOBRE LA ACTIVIDAD CATALASICA.

Así como hemos visto que el pH, la temperatura, la concentración del substrato, etc. afectan la velocidad de reacción enzimática, debemos tomar en cuenta el tiempo de acción del fermento, pues como se expresa en la siguiente gráfica la acción catalásica aumenta hasta determinado tiempo después del cual es nula; por lo tanto deberá anotarse, previo conocimiento de la concentración del substrato y de la enzima, en qué tiempo se detiene la acción enzimática, para no incurrir en un error en la cuantificación de esta enzima.

El extracto que utilizamos para determinar la velocidad de acción del fermento, fué hecho con semillas germinadas durante 5 días a 25°C. El fermento actuó en una solución buffer pH 5 a 2°C. La acción se determinó cada 5 minutos, pudiéndose observar que ésta va en aumento hasta los 30 minutos, después de los cuales su acción es nula.



En el caso de algunas enzimas, preparadas en forma pura y de peso molecular conocido, es posible en un experimento in vitro, bajo condiciones controladas, medir el número de equivalentes moleculares del sustrato, transformadas por unidad de tiempo. Esto dió lugar al llamado "turnover number" de la enzima. En algunos casos se encontró una rapidez sorprendente. La enzima catalásica que cataliza la reacción $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ se acepta que transforma 2,500,00 moléculas de peróxido de hidrógeno por minuto y por molécula de enzima a 0°C . Esta velocidad sin embargo es excepcional. Otras enzimas estudiadas de este modo, muestran "turnover numbers" (moléculas de sustrato cambiadas por moléculas de enzima por minuto) de 1000 a 20000 a la temperatura ambiente.



TEMPERATURA DE GERMINACION.

La influencia del medio ambiente sobre los vegetales es evidente. Por ejemplo, la temperatura, humedad, luz etc. son factores importantes que deben tomarse en cuenta en el desarrollo de una planta. Muchos investigadores han estudiado el efecto de la temperatura in vitro sobre determinado fermento en cambio, sabemos poco sobre el efecto que causan estos factores sobre la actividad enzimática in vivo, o sea, en la célula viva y por lo tanto, sobre el metabolismo celular, como puede ser el metabolismo de los hidratos de carbono, de los prótidos o lípidos, y la oxireducción de diversas substancias.

Lantz (8) 1927, encontró que había una acumulación gradual de catalasa en el trigo germinado a 10°C, de manera que al final el contenido catalásico era casi igual al encontrado a los 20° y 30°C. A los 42°C la catalasa disminuyó marcadamente. El punto en que se destruye totalmente la catalasa fué encontrado sin embargo en la mayoría de los casos a los 65° y 80°C.

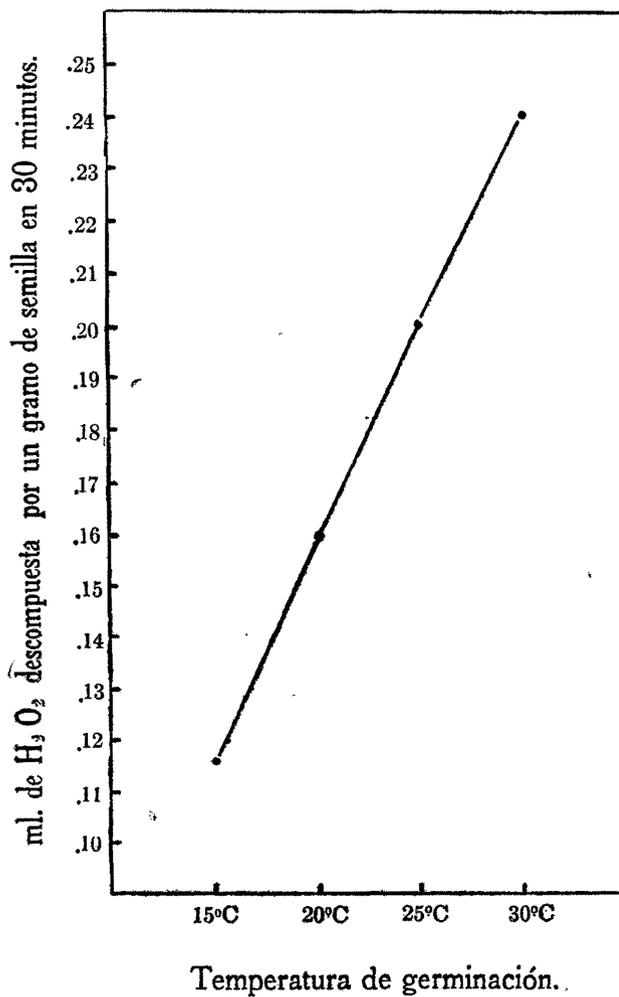
Crocker y Harrington (3) 1918 encontraron que las semillas de sorgo mueren y que su catalasa se destruye totalmente por calentamiento a 100°C por 5 horas. Calentamiento a 81°C por media hora redujo la actividad catalásica en un 30%, pero mejoró la germinación de las semillas. El calentamiento a 81°C por 17 horas redujo la actividad catalásica en un 90%.

Green, M'Endarfer, Orth y Burge (5) 1929 encontraron que el clima frío disminuía y el clima caliente aumentaba el contenido catalásico en las hojas del pino.

En 1942 Kneen, Miller y Sanstedt (6) encontraron que modificando la temperatura durante la germinación del embrión de trigo, se obtenían diferentes máximas de actividad.

Roca y Ondarza (13) hicieron estudios en maíces aclimatados a diferentes altitudes, sometiéndolos a distintas temperaturas, y observaron que los maíces aclimatados para alturas comprendidas entre 2200 y 2600 metros sobre el nivel del mar, fueron los que tuvieron mayor actividad enzimática comparados con los de alturas inferiores a estas.

En éste trabajo se estudió el efecto de la temperatura sobre la germinación y por lo tanto sobre la actividad catalásica, habiéndose obtenido los siguientes resultados:



Nota: Las semillas fueron germinadas por 5 días.

Los experimentos consistieron en germinar varios lotes de semillas a la temperatura de 15°C, 20°C, 25°C y 30°C; encontrándose que a los 5 días la influencia de la temperatura de 30°C sobre la actividad catalásica del haba era mayor que la actividad desarrollada por los extractos de las semillas germinadas a las otras temperaturas.

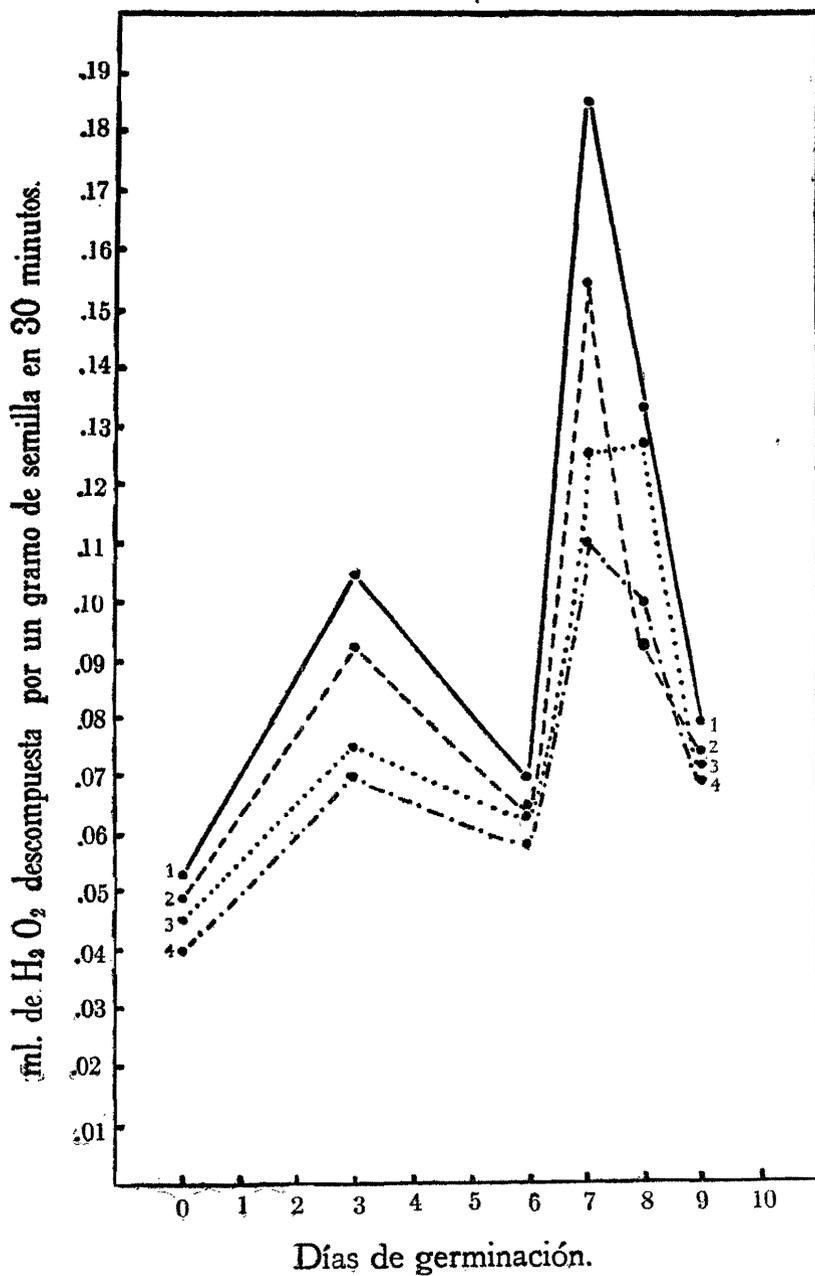


LA CATALASA DURANTE LA GERMINACION DEL HABA.

En estos experimentos hemos encontrado que el contenido catalásico en el haba sin germinar, alcanza a triplicarse al séptimo día de germinación de esta semilla. En efecto, cuando comparamos la actividad catalásica correspondiente a 1 gramo de haba sin germinar que es 0.053 ml. de agua oxigenada descompuesta a la temperatura in vitro de 2°C, con la de 1 gramo de haba germinada por 7 días, encontramos que la actividad aumenta a 0.185 ml. de agua oxigenada descompuesta a la misma temperatura.

Los experimentos se hicieron utilizando cuatro distintas diluciones del fermento y hemos encontrado que en la menor cantidad utilizada, o sea, la de 0.026 gramos, es con la que se obtienen mejores resultados. Esto es debido a que la proporción entre la cantidad de substrato utilizado en estos experimentos es la más adecuada para esta cantidad de enzima y en el tiempo de 30 minutos; o sea, que cuando elevamos a unidades la acción catalásica a partir de 0.026 gr., al hacerse los cálculos para expresar la acción correspondiente a 1 gramo de planta, obtenemos mayor actividad que cuando se parte de 0.052, 0.078 y 0.104 gramos.

Los resultados obtenidos se expresan a continuación:



NOTA: Curva Nr. 1.—Cantidad de extracto utilizado 0.026 grs.
 Curva Nr. 2.—Cantidad de extracto utilizado 0.052 grs.
 Curva Nr. 3.—Cantidad de extracto utilizado 0.078 grs.
 Curva Nr. 4.—Cantidad de extracto utilizado 0.104 grs.

En general, para experimentos de corto tiempo, la cantidad de cambios producidos es proporcional a la concentración de la enzima empleada. Schütz primeramente propone una regla: que el número de cambios producidos es proporcional a la raíz cuadrada de la concentración de la enzima utilizada. Esto fue anunciado después de un estudio hecho acerca de la acción de la pepsina cruda sobre la albúmina de huevo. Northrop (12) reexamina el problema usando pepsina cristalina y tripsina, y encuentra que esta observación puede deberse a los efectos inhibitorios de los productos de la reacción.

Se han hecho numerosos experimentos relacionados con la actividad catalásica durante la germinación. Crocker y Harrington (3), en 1918, observaron en las semillas sin germinar de sorgo (Sudan, grass y Johnson grass), que la actividad catalásica se duplica durante este proceso. Además de la catalasa, otras enzimas actúan durante la germinación de la semilla de haba como son la alfa, beta amilasa y la proteasa, como observaron Jules Labarre y Saul Pfeffer (7), quienes encontraron que una planta de haba contiene dos amilasas: alfa amilasa, cuya actividad máxima es aproximadamente a los 8 días de germinación, y beta amilasa, que alcanza su actividad máxima a los 10 días. La actividad óptima de las proteasas fué más o menos a los 8 días.

Hemos de citar además que la actividad catalásica se modifica según la variedad de semilla de que se trate; por ejemplo, Roca y Ondarza (14) encontraron en el frijol y maíz, que las enzimas estudiadas por ellos, como son la alfa, beta amilasa y la catalasa, varían en las distintas semillas. Cosa semejante ha de suceder en las variedades de haba.



CAPITULO IV

DISCUSION

Como pudo apreciarse en los experimentos efectuados con el objeto de demostrar la influencia del pH sobre la actividad catalásica del haba, se encontró que la máxima actividad es alrededor de 7. Este dato está de acuerdo con el pH de 6.8 utilizado por Sumner (17) para la determinación de la actividad catalásica, y con el de Roca y Ondarza (14) sobre la actividad catalásica del frijol.

Los experimentos sobre activadores e inhibidores se efectuaron utilizando varias sustancias como CuSO_4 , KCN, CaNO_3 , KNO_3 , las cuales tuvieron un efecto inhibitor sobre la catalasa. Otras en cambio, como la cisteína y Vitamina C, activaron a esta enzima. El MgSO_4 no tuvo efecto alguno.

La acción del KCN se debe al cianhídrico que fija el Fe del grupo prostético de esta enzima. Se estudió la acción del CaNO_3 y KNO_3 por la siguiente razón: La actividad catalásica se manifiesta en una forma muy acentuada en las raíces de las semillas en germinación y como estas sales existen normalmente en la tierra, se estimó conveniente estudiar el efecto sobre ésta función enzimática. Los resultados fueron de inhibición. El ion calcio puede combinarse con la proteína formando proteinato de calcio, poco soluble, no así el ion potasio, por lo que el ion NO_3 actúa probablemente como oxidante de la enzima.

Se decidió fijar en 30 minutos el tiempo más adecuado para la acción de la catalasa del haba, ya que como pudimos observar, en los experimentos efectuados con este objeto, que un tiempo más prolongado, daba como resultado una valoración inexacta de la enzima, ya que después de los 30 minutos el agua oxigena-

da había desaparecido completamente. El número de cambios producidos por una cantidad arbitraria de enzima, debía ser proporcional al tiempo de duración del experimento, en el caso de que ningún cambio se efectúe en la potencia de la enzima y que la concentración del substrato no fuera un factor de limitación; sin embargo, se ha visto que la acidez y la temperatura del medio ambiente juegan un papel determinante en el grado de inactivación. Consecuentemente puede asegurarse que el tiempo, la temperatura y el pH, están interrelacionados en la determinación de las condiciones óptimas. En general los experimentos de corto tiempo, de unos pocos minutos, pueden mostrar un óptimo a temperaturas altas y a pH ácidos, que no podrían ser empleadas para experimentos efectuados por horas y aún por días.

La temperatura es un factor de decisiva importancia sobre distintas funciones en los vegetales. Como hemos visto en este trabajo, la actividad catalásica en el haba aumenta en relación con la temperatura de germinación. El mecanismo por el cual se manifiesta la acción de la temperatura sobre la catalasa, así, como sobre otros fermentos es uno de los problemas que están por resolver.

La generalización de los principios de Van't Hoof (19) sobre las leyes que rigen la cinética de los gases en relación con la temperatura, se han aplicado a la bio-química originado el concepto del Q_{10} el cual expresa la relación de las velocidades de reacción a dos temperaturas con diferencia de 10°C . Para la mayoría de las reacciones enzimáticas Q_{10} está alrededor de 2 a temperaturas bajas, pero gradualmente disminuye hasta alcanzar la relación de 1, y finalmente un valor menor de la unidad, a temperaturas superiores. El efecto favorable de la temperatura sobre la velocidad de la reacción está contrabalanceado por la desnaturalización de la enzima la cual también aumenta con la temperatura hasta que los dos factores sean iguales abajo de los 50°C .

Varios investigadores han empleado temperaturas de 37°C para sus estudios, por ser la temperatura del cuerpo humano. Para experimentos de corto tiempo la mayoría de las enzimas

de origen animal muestran un óptimo arriba de los 40°C, mientras que la mayoría de las enzimas de vegetales y microorganismos son más activos cerca de los 50°C in vitro.

Esta regla del Q_{10} también puede aplicarse a los experimentos efectuados en este trabajo en relación con la temperatura de germinación del haba.

Como era de suponerse, por las experiencias efectuadas ya anteriormente en el haba sobre el aumento de la actividad enzimática de la alfa, beta amilasa y proteasa en la germinación de esta semilla, efectuada por otros investigadores, se encontró en este trabajo, que también el contenido catalásico del haba aumenta durante la germinación, lo cual sucede de la siguiente manera: Hay un aumento gradual hasta el tercer día, para descender después al cuarto, quinto y sexto día, nuevamente asciende de una manera brusca al séptimo día, siendo entonces cuando tiene su máxima actividad.



CONCLUSIONES.

- 1.—La catalasa del haba tiene su mayor actividad a pH de 7 y 8.
- 2.—La catalasa se activa por la Vitamina C y en menor grado por la cisteína. Se inhibe por substancias como el CuSO_4 , KCN, KNO_3 y CaNO_3 y no presenta efecto alguno en presencia del MgSO_4 .
- 3.—La enzima mencionada aumenta durante el tiempo de acción del haba hasta los 30 minutos, después de los cuales su acción es nula.
- 4.—Se encontró una relación entre la actividad catalásica y la temperatura de germinación, observándose la mayor actividad en semillas germinadas por 5 días a los 30°C .
- 5.—El contenido catalásico durante la germinación del haba tiene su máxima actividad al séptimo día, en el cual llegó a triplicarse.

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

- 1.—Appleman, C. O., 1910. Some observations on catalase. *Bot. Caz.*, 50: 182 - 192.
- 2.—Bunzell, H. H. and Marjorie Kenyon 1932. On Rope Control, *Cereal Chemistry*. Vol. IX: 162 - 168.
- 3.—Crocker, W. and Harrington G. T., 1918. Catalase and oxidase content of seeds in relation to their dormancy, age, vitality and respiration *J. Agr. Res.*, 15: 137 - 174.
- 4.—Dounce, A. L. and Frampton, O., 1930. *Science*, 89, 300.
- 5.—Green, F. C., M. E. McEnderfer, O. S. Orth and W. E. Burge., 1929. Further study on the effect of summer and winter temperatures on the catalase of pine needles. *Proc. Roy. Irish Acad.*, 39 B: 156 - 159.
- 6.—Kneen, E., Miller B. S., and Sandstedt, R. M. 1942. The influence of the temperature on the development of the amylase in wheat germinated. *Cereal Chemistry*, XIX: II - 25.
- 7.—Labarre, J. et Pfeffer, S., Etudes sur les enzymes de la fève gourgane (*Vicia faba* L.) pendant la germination. *Revue Canadienne de Biol.* Vol. V. N. 2: 233.
- 8.—Lántz, C. W., 1930. Temperature and catalase activity in germinating corn. *Am. J. Bot.*, 35: 147 - 149.
- 9.—Loew, O., 1901. Catalase, a new enzyme of general occurrence, with special reference to the tobacco plant U. S. Dept. Agr. Report. No. 68.
- 10.—Michaelis, 1950. (Citado por Mitchell Ph. H.). *A textbook of biochemistry*. 226 - 238.
- 11.—Miller, E. C., 1938. *Plant Physiology* (988 - 996).
- 12.—Northrop J. H., *J. Gen. Physiology* 2, 471 (1920)
- 13.—Roca, J. y Ondarza, R., 1950. Papel de las enzimas en el proceso de la germinación. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* XI: 43 - 58.
- 14.—Roca, J. y Ondarza, R., 1951. Estudios sobre la actividad enzimática en el proceso de la germinación III. Catalasa en variedades de frijol. *An. Inst. Biolog.* XXII, No. 1.
- 15.—Sumner J. B., 1949. (Citado por Harrow B. *Biological Chemistry* 102).
- 16.—Sumner and Dounce, A. L., 1937. Crystalline catalase, *J. Biol. Chem.* 121 - 417.
- 17.—Sumner, J. B., 1941. *Advances in Enzymology* I: 163 - 176.
- 18.—Usher, F. L., and Priestley, J. H., 1910. (Citado por Bayliss W. M. *The nature of enzyme action*).
- 19.—Van't Hoof, 1938. (Citado por Gortner). *Outlines of Biochemistry* 1008 - 1009.
- 20.—Waentig, P. and Gierisch, W., 1914. *16 Fermentforschung* 1, 165.
- 21.—Wolff, J. and Stoecklin, E., 1911. *Compt. rend.* 152 - 729 .
- 22.—Zeile, K., 1931. *Z. Physiol. Chemistry* 195 - 39.