



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

**CONTROL HORMONAL DE LA ACTIVIDAD  
PROTEOLITICA EN CAPA DE ALEURONA  
DE TRIGO**

**T E S I S**

que para obtener el Título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :

**MARIA ISABEL MUGGENBURG RODRIGUEZ VIGIL**

1982

México, D. F.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## Indice

	pag.
Objetivo	i
Resumen	ii
Capitulo I. Introducción y Antecedentes	1
1.1. Estructura del grano de trigo	2
1.2. Composición química del grano.	3
1.3. Proceso de germinación.	3
1.4. Bioquímica de la germinación.	5
1.5. Las hormonas vegetales.	11
1.6. Modo de acción de las hormonas vegetales en la capa de aleurona.	13
1.7. Proteasas.	16
Capítulo II. Materiales y Métodos.	19
2.1. Material biológico.	20
2.2. Material de vidrio.	20
2.3. Reactivos.	20
2.4. Esterilización del material.	21
2.5. Esterilización e imbibición de las semillas	21
2.6. Aislamiento de la capa de aleurona.	21
2.7. Incubación de la capa de aleurona.	22
2.8. Extracción de proteasas de la capa de aleurona	25
2.9. Preparación del sustrato para medición de la actividad proteolítica.	25

2.10.	Eliminación de compuestos del extracto de la capa de aleurona que causan interferencia.	26
2.11.	Cuantificación del rendimiento de proteasas purificadas en las minicolumnas.	28
2.12.	Determinación de la actividad proteolítica.	28
2.13.	Determinación de pH óptimo de la proteasa.	30
2.14.	Cálculo de Km de la proteasa.	31
2.15.	Efecto de calcio sobre la inducción de proteasa.	31
2.16.	Extracción de proteasa de semilla germinada.	32
2.17.	Aislamiento de aleuronas en escala grande.	32
2.18.	Purificación de proteasas por cromatografía de afinidad.	33
2.19.	Radiomarcaje de proteasa en capa de aleurona.	35
2.20.	Extracción y purificación de alfa-amilasa.	36
2.21.	Determinación de actividad de alfa-amilasa.	37
2.22.	Electroenfoque analítico de proteasas purificadas.	38
2.23.	Electroenfoque preparativo de proteasas purificadas.	40
2.24.	Electroforésis en geles de acrilamida-SDS	42
2.25.	Detección de proteasas radioactivas por fluorografía.	46
2.26.	Cálculos de peso molecular.	47
Capítulo III. Resultados y Discusión.		48
3.1.	El ensayo de proteasas.	49
3.2.	Eliminación de compuestos de bajo peso molecular que interfieren en el ensayo de proteasas.	53
3.3.	pH óptimo de actividad proteolítica inducida por AG <sub>3</sub>	56

3.4. Determinación de Km.	56
3.5. Inducción hormonal de la actividad proteolítica en la capa de aleurona de trigo.	60
3.6. Purificación de proteasas	64
3.7. Determinación del pI de proteasas por electroenfoque.	67
3.8. Determinación del peso molecular de proteasa y de alfa-amilasa inducidas por AG <sub>3</sub> .	68
Conclusiones	75
Bibliografía.	76

CAPITULO I

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

### 1.1 Estructura del grano de trigo.

El grano de trigo, como todas la gramíneas, consta de un fruto de una sola semilla (denominado cariopsis), con dos cubiertas externas intimamente unidas (fig. 1.1). El pericarpio o cobertura del fruto, esta formado por una pared larga y delgada de células rectangulares. La testa, o cobertura de la semilla, puede estar formada por una capa delgada, o una doble capa de células. La capa interna de la testa es pigmentada y da el color característico del grano. El pericarpio y la testa protegen al grano contra el medio ambiente y los microorganismos.

En la semilla se diferencian dos partes de origen genético distinto: el endospermo y el embrión.

El endospermo consta de dos tejidos principales, el endospermo **almidonoso** y la **capa de aleurona**. El endospermo harinoso esta formado por células de pared delgada, las cuales tienen diferentes tamaños, forma y composición, dependiendo de su localización dentro del tejido. Estas células no son viables y contienen principalmente almidón y protefnas. El almidón se encuentra en forma de gránulos empacados juntos, en una matriz de la proteína de reserva. La capa de aleurona consiste de una sola fila de células cúbicas, desprovistas de almidón. Las células cuboidales de la aleurona estan vivas y respiran, pero no tienen capacidad para dividirse, ni de crecer. Su citoplasma es denso y rico en protefnas, lípidos y numerosos organelos.

El embrión se encuentra formado por el escotelo y el eje em-

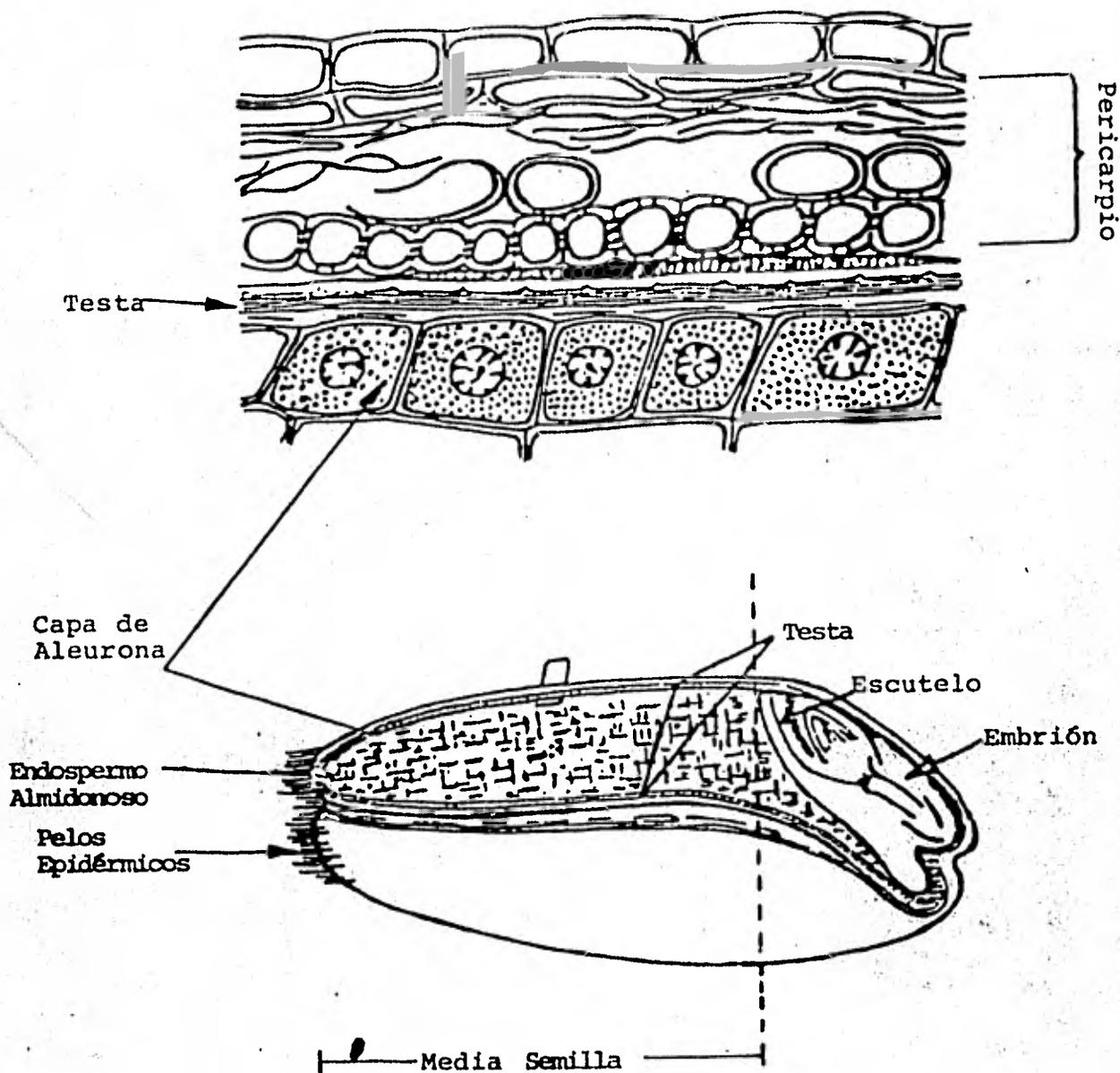


Fig. 1.1 ESTRUCTURA DEL GRANO DE TRIGO.

brionario. El eje embrionario es donde se encuentra la planta en potencia, consistiendo de: el tallo (o plúmula) envuelto en una funda (coleoptilo), y la raíz rudimentaria (radícula) envuelta en otra funda (coleorhiza). Por debajo de la plúmula, el eje embrionario se conecta con el escotelo, único cotiledón de la semilla. El escotelo sirve para conectar el eje embrionario con el endospermo, y funciona principalmente como haustorio para transferir nutrientes desde el endospermo a la planta en desarrollo.

### 1.2. Composición química del grano.

Los componentes principales del grano de trigo son almidón, proteínas, lípidos y minerales en proporciones de 70 %, 13 %, 2 % y 1-2 % respectivamente. En el endospermo se encuentra todo el almidón y un 70 % de las proteínas. El escotelo y la capa de aleurona son ricos en lípidos, principalmente triglicéridos (Tavener y Laidman, 1972 b). Las más altas concentraciones de proteína se encuentran en el eje embrionario (33 %), el escotelo (26 %) y la capa de aleurona (19 %), con menores concentraciones en el endospermo almidonoso, el pericarpio y la testa. Un 70 % del contenido de minerales de la semilla se encuentra acumulado en la capa de aleurona, principalmente en forma de sales poco solubles de fitato de potasio y magnesio. Las sales de calcio y hierro se encuentran en concentraciones más bajas. (Pomeranz, 1973).

### 1.3. Proceso de germinación.

Las semillas germinan cuando las condiciones del medio ambiente son favorables. Tales condiciones incluyen: humedad y temperatura adecuadas, composición propia de gases de la atmósfera y, para algunas semillas, la ausencia o presencia de luz (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1978).

Se ha definido a la germinación de las siguientes maneras:

"la secuencia de pasos morfogénicos que dan por resultado la transformación del embrión en plántula" (Berlyn, 1972), o "aquellas actividades que provocan la ruptura de la testa por emergencia de la radícula" (Mayer y Shain, 1974). En trigo hay poca movilización de las reservas del endospermo durante este período. Por lo tanto, para los propósitos de este trabajo, la germinación comprenderá aquellos eventos que ocurren durante los primeros días del crecimiento de la plántula.

El primer paso que ocurre durante la germinación es la absorción de agua por la semilla, a lo cual se le llama proceso de imbibición. La semilla de trigo muestra un rápida imbibición en las primeras horas, seguida por una meseta. La absorción de agua sigue durante la emergencia de la radícula y desarrollo de la plántula (Marcus, 1966). La imbibición provoca un aumento de la actividad metabólica del grano. Este proceso es catalizado por enzimas hidrolíticas sintetizadas y secretadas por la capa de aleurona. Los compuestos de bajo peso molecular producidos en el endospermo por acción de estas hidrolasas, son absorbidos por el escotelo y aprovechados para el desarrollo de la planta durante su fase heterotrófica

de crecimiento.

#### 1.4. Bioquímica de la germinación.

Los procesos bioquímicos de la germinación y sus mecanismos de control han sido objeto de estudio en muchas ocasiones. En esta sección se tratará principalmente el comportamiento de los tejidos del endospermo durante la germinación, y, en forma particular, del control y desarrollo de las actividades enzimáticas en la capa de aleurona. Dichas enzimas son generalmente inducidas en las células de aleurona por factores que provienen del embrión (hormonas) y se clasifican según el tipo de proceso que catalizan.

##### Catabolismo de carbohidratos.

Los carbohidratos de reserva del grano son degradados por acción de alfa-amilasa, beta-amilasa y beta-1,3-glucanasa principalmente.

Haberlandt fue el primero en descubrir que la actividad diastásica responsable de la digestión del endospermo de la semilla, tenía su origen en las capas de cobertura del grano y que el embrión es necesario para esta actividad (Jones, 1973). La actividad amilolítica aumenta durante la germinación por efecto de factores hormonales que emergen del embrión. Experimentos independientes de Yomo (1960) y Paleg (1960) demostraron que el embrión podía ser substituído por el ácido giberélico ( $AG_3$ ) en cebada. Esta propiedad del  $AG_3$  fue demostrada también en trigo, avena (Paleg y col., 1962) y arroz (Ogawa e Inamura, 1965). Reportes de la presencia de gi-

berelinas naturales en el eje embrionario y su liberación hacia el endospermo, apoyaron la sugerencia de que las giberelinas son las hormonas responsables para el desarrollo de actividad amilolítica en el endospermo (Radley, 1966; Mc Leod y Palmer, 1966; Cohen y Paleg, 1967). Esta respuesta amilolítica al  $AG_3$  se localiza exclusivamente en la capa de aleurona (Mc Leod y Millar, 1962; Briggs, 1964), y la degradación del almidón de reserva es catalizada por dos enzimas principales: la alfa-amilasa y la beta-amilasa.

La beta-amilasa es una exo-glucanasa con origen en las capas periféricas del endospermo harinoso. Se encuentra presente en la semilla no germinada en forma inactiva, y se cree que el  $AG_3$  estimula su activación (Mc Leod y Millar, 1962; Briggs, 1963). Se ha sugerido que la liberación de la beta-amilasa a partir de los componentes insolubles de la fracción de glúten del endospermo, se debe al rompimiento de los enlaces disulfuro por algún factor procedente de la capa de aleurona (Rowell y Goad, 1962 a). Este factor podría ser glutatión, tioles e incluso proteasas.

La alfa-amilasa es una endo-glucanasa y tiene mayor importancia en la degradación del almidón. Esta enzima es sintetizada de novo en la capa de aleurona en respuesta a la acción del  $AG_3$ . Posteriormente la enzima es secretada hacia el endospermo almidonoso. La primera evidencia para síntesis de novo de alfa-amilasa, se basó en los resultados obtenidos con antibióticos. Inhibidores de la transcripción de ácidos nucleicos (Actinomicina D) y de la síntesis de proteínas (ciclohexitida) evitaron la estimulación hormonal de alfa-ami-

lasa en capa de aleurona de cebada (Varner y col., 1965; Chrispeels y Varner, 1967a; 1967b). Se apoyó la sugerencia de síntesis de novo por estudios con la incorporación de aminoácidos radioactivos a la molécula de la enzima (Varner y Chandra, 1964) y se comprobó por estudios de gradiente de densidad cuando se imbibieron semillas en  $H_2O^{18}$  (Filner y Varner, 1967).

Las giberelinas no son las únicas hormonas que influyen la síntesis de alfa-amilasa (Tomos y Laidman, 1979). Se ha reportado una interacción secuencial de citocininas y  $AG_3$  (Eastwood y Laidman, 1969) y una respuesta sinérgica entre el ácido indolacético (AIA) y  $AG_3$  (McLeod y col., 1966). El ácido abscísico (ABA) inhibe la producción de alfa-amilasa en grano entero, media semilla y capa de aleurona de cebada (Addicott, 1968; Chrispeels y Varner, 1966; Chrispeels y Varner, 1967a; Jacobsen, 1973). Se ha reportado una inhibición semejante en capa de aleurona de trigo (Gómez, Arreguín y Varty, 1980), y una estimulación de síntesis por etileno (López, Arreguín y Varty, 1978; López, 1981).

La capa de aleurona libera también otras enzimas del catabolismo de carbohidratos como la maltasa (Briggs, 1963) y la beta-1,3-glucanasa (Pollard, 1969). Esta última enzima ayuda a la degradación del material que compone las paredes celulares del endospermo, por donde debe abrirse paso a las otras hidrolasas. La degradación parcial de la pared celular de la capa de aleurona es un requisito previo para la liberación de la alfa-amilasa desde las células. (Taiz y Jones,

1970). Aunque la liberación de beta-glucanasa es dependiente del  $AG_3$ , su síntesis en la capa de aleurona es independiente de esta hormona (Bennet y Chrispeels, 1972).

#### Catabolismo de proteínas.

La hidrólisis de las reservas proteínicas del endospermo por acción de proteasas, provee de aminoácidos y péptidos los cuales son transportados por el escotelo hacia la plántula en desarrollo (Enari y Mikola, 1977).

La capa de aleurona de cebada produce proteasas en respuesta a  $AG_3$  (Rowell y Goad, 1964). La mayor parte de estas son liberadas hacia el endospermo harinoso, donde hidrolizan rápidamente las proteínas de reserva (Popov y Karpilenko, 1974). La hidrólisis de las proteínas de reserva se realiza por la acción de endopeptidasas, cuya síntesis de novo es dependiente del  $AG_3$  (Jacobsen y Varner, 1967), y por carboxipeptidasas, las cuales son sintetizadas independientemente del efecto de esta hormona (Mikola y Kolehmain, 1972). Jacobsen y Varner (1967) sugirieron que el control de síntesis de alfa-amilasa y proteasa por el  $AG_3$ , se realiza por el mismo mecanismo, pues encontraron similitudes de los efectos de cicloheximida, actinomicina y ABA.

En trigo se ha reportado la inducción hormonal de carboxipeptidasas en el grano, y algunos casos en que se han encontrado altos niveles de estas enzimas en semillas no germinadas (Preston y Kruger, 1976b).

Se reportó que el AMP cíclico puede incrementar la actividad proteolítica en semillas sin embrión, pero en un nivel menor al inducido por  $AG_3$  (Galsky y Lippincott, 1969). La relación entre este fenómeno y la acción del  $AG_3$  in vivo es desconocida.

#### Catabolismo de triglicéridos.

Los triglicéridos almacenados en la capa de aleurona de trigo se degradan progresivamente durante la germinación. Si se quita el embrión de la semilla seca, se encuentra que cerca del 20 % de las reservas son degradadas rápidamente en las primeras 24 horas de imbibición, tiempo después del cual la movilización cesa. En la capa de aleurona aislada se encuentra que se suprime totalmente el catabolismo de triglicéridos. Estas observaciones llevan a pensar que existen dos factores que controlan el catabolismo de triglicéridos: un factor embionario y un factor que emana del endospermo almidonoso (Tavener y Laidman, 1972b).

La actividad controlada por el factor embionario corresponde a la actividad de lipasa del tejido (Tavener y Laidman, 1972b). Este factor no puede ser remplazado por el  $AG_3$ , pero la actividad lipolítica puede ser inducida en medias semillas por ciertos compuestos nitrogenados, como hidroxilamina y glutamina en presencia de auxinas. El factor del endospermo puede ser remplazado por citocininas sintéticas (Tavener y Laidman, 1972a).

El incremento de la actividad lipolítica en el tejido de aleurona, coincide con la activación del metabolismo de ácidos grasos. La

presencia del embrión o de giberelinas exógenas induce a las enzimas responsables del ciclo del glioxilato y de la beta-oxidación (Doig y Laidman, 1972; Doig y col., 1975a). Estas mismas enzimas están presentes en la capa de aleurona de cebada (Jones, 1972).

### Catabolismo de minerales.

La degradación y liberación de minerales es uno de los papeles más importantes de la capa de aleurona de los cereales, debido a que este tejido es la principal fuente de reserva de minerales, los cuales se almacenan como sales de hexafosfato de inositol (fitina). Este material poco soluble se hidroliza durante la germinación por acción de la enzima fitasa. La fitasa es producida en la capa de aleurona y escotelo durante los primeros días de la germinación (Peers, 1953). Este incremento de actividad cesa al retirar el embrión y no se logra remplazar este efecto por acción del  $AG_3$  (Eastwood y Laidman, 1971a). Algunos compuestos nitrogenados, como glutamina, logran un aumento en la actividad de fitasa del grano sin embrión. El efecto de glutamina se aumenta ligeramente por acción sinérgica de AIA (Eastwood y Laidman, 1971a).

La liberación de macronutrientes desde la capa de aleurona puede ser disminuída por sustancias similares a las citocininas. El desprendimiento de iones es promovido por un factor liberado por el embrión, el cual puede ser remplazado por el  $AG_3$  (Eastwood y Laidman, 1971b). Por tanto, parece que participan dos hormonas en el control de la liberación de iones por las células de aleurona.

### 1.5. Las hormonas vegetales.

En el trabajo descrito en esta tesis se utilizaron tres hormonas vegetales. En esta sección se describirán algunas de las propiedades biológicas de estas tres hormonas.

#### Giberelinas.

Las giberelinas estimulan el crecimiento de plantas. Provocan alargamiento en los tallos, aumento de superficie en las hojas, y floración en algunas especies de plantas que requieren de temperaturas frías, como zanahoria, col y nabo. La aplicación de giberelinas en los tallos produce un incremento pronunciado de la división celular en el meristemo subapical (Sachs y col., 1960). Uno de los efectos más notables de este grupo de hormonas es el que produce sobre ciertas plantas enanas, provocando que crezcan hasta alcanzar su altura normal. En semillas de diversas especies las giberelinas terminan con el periodo de latencia e inician la germinación. Se ha observado también, que las giberelinas incrementan el tamaño de muchos frutos jóvenes como las uvas y los higos. (Weaver, 1980).

La mayor parte de los estudios sobre la acción de las giberelinas a nivel molecular, se ha hecho por los efectos que tienen en la formación de enzimas. En el endospermo de cebada estimulan la producción de  $\alpha$ -amilasa, proteasa y ribonucleasa (Paleg, 1961; Srivastorva y Meredith, 1962; Chrispeels y Varner, 1968). En hojas, estimulan la síntesis de RuDP-carboxilasa (Treharne y Stoddart, 1968) y nitrato reductasa (Lips y Roth-Bejarano, 1969). En otros tejidos el AG<sub>3</sub> suprime la formación de enzimas. En trozos de caña de azúcar

inhibe la formación de invertasa y peroxidasa (Glaziou y col., 1968). Sin embargo, se ha observado que estas mismas enzimas pueden ser estimuladas por  $AG_3$  en cortes de tubérculos.

#### Acido abscísico.

Por lo general se considera al ABA como una hormona inhibitoria, la cual interactúa con las hormonas promotoras del crecimiento. Es inductor general del envejecimiento, acelera la abscisión de las hojas, como son los cítricos (Cooper y col., 1968), así como la abscisión de flores y frutos en plantas como la vid. (Weaver y Pool, 1969). El ABA juega un papel muy importante en el movimiento de los estomas de las hojas, ejerciendo un efecto regulativo en la transpiración. La germinación de varias semillas puede ser inhibida por aplicación de ABA exógeno (Milborrow, 1974). Varios eventos inducidos por el  $AG_3$  en capa de aleurona de cebada son susceptibles a inhibición por ABA (Ho y Varner, 1976).

#### Etileno.

El etileno, única hormona gaseosa, estimula la germinación y el crecimiento de brotes, el crecimiento de varios granos, bulbos, estacas de madera dura y raíces. Provoca abscisión prematura de hojas, frutos jóvenes y otros órganos. Ayuda a acelerar la maduración de los frutos cosechados como plátano, mango y melón. En unas especies el etileno también puede inducir la floración.

En 1927, Regeimbal y Harvey reportaron que el etileno incrementa la cantidad de proteasa e invertasa extraída de frutos de piña. A veces la inducción de enzimas no depende exclusivamente de la acción de etileno. En algunos casos donde los tejidos sufren una herida, se incrementan las actividades enzimáticas y la función del etileno es la de reducir el período "lag" o de incrementar la velocidad de síntesis. La beta-1,3- glucanasa, enzima málica, fenilalanina amonio liasa y peroxidasa son algunos ejemplos de enzimas cuya formación no depende exclusivamente de la acción del etileno (Abeles, 1973) .

Los efectos fisiológicos del etileno sobre la inducción de enzimas se han estudiado utilizando inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida) y de la síntesis de ARN (actinomicina D). La síntesis de varias enzimas asociadas con efectos de etileno es bloqueada por cicloheximida (Abeles, 1973). En muchos casos también se puede bloquear la síntesis enzimática con actinomicina D como son: celulasa (Abeles, 1969), enzima málica (Rhodes, 1968) y peroxidasa (Osborne, 1968a). Sin embargo, la actinomicina no afecta la síntesis de otras enzimas susceptibles a la cicloheximida, como son la beta-1,3-glucanasa (Abeles, 1970), peroxidasa (Gahagan, 1968; Ridge, 1979) y fenilalanina amonio liasa (Riov, 1969). Lo anterior sugiere que pueden ser incrementados algunos sistemas enzimáticos por efecto de etileno, sin requerir de la síntesis de ARN por efecto de dicha hormona (Abeles, 1972).

#### 1.6. El modo de acción de las hormonas vegetales en la capa de aleurona.

Se han hecho muchos estudios para conocer el mecanismo de ac-

ción del  $AG_3$  en la inducción de enzimas hidrolíticas, especialmente de alfa-amilasa, en la capa de aleurona de cereales. Las células de la capa de aleurona son capaces de sintetizar proteínas en ausencia del  $AG_3$  (Varner y col., 1965). Aunque en la presencia de la hormona se sintetizan una gran cantidad de nuevas proteínas, no se encuentra un aumento en la síntesis de proteínas totales (Díaz de León, 1978), lo cual indica, que dentro del mismo tejido el  $AG_3$  estimula y deprime la formación de enzimas específicas.

Como ya se mencionó (secc. 1.4.) la alfa-amilasa inducida por  $AG_3$  es sintetizada de novo, y su formación esta inhibida por inhibidores de la transcripción (Filner y Varner, 1967; Jacobsen y Zwar, 1974; Varner y Ho, 1974). Hay la evidencia de que el  $AG_3$  aumenta la incorporación de bases y ribonucleósidos marcados en ARN poli (A) en capa de aleurona de cebada (Jacobsen y Zwar, 1974) y trigo (Varty y Laidman, 1977). El ARN traducible para alfa-amilasa aparece después de la inducción con  $AG_3$  y se incrementa con el tiempo de exposición a esta hormona. (Higgins y col., 1976), indicando que el  $AG_3$  actúa a nivel de transcripción para controlar la expresión de los genes para alfa-amilasa. Se ha sugerido que la hormona pudiera estar actuando también a nivel post-transcripcional en el control de la traducción del ARN m (Bernal y col., 1978; Ho, 1978).

El ABA inhibe el efecto del  $AG_3$  sobre la inducción de alfa-amilasa en capa de aleurona de cebada (Chrispeels y Varner, 1966;1967b) y trigo (Collins, Jenner y Paleg, 1972). Ho y Varner (1976) sugerían que el efecto de ABA sobre la síntesis de alfa-amilasa se debe a la

inhibición de traducción mediante una molécula reguladora cuya formación depende en la activación de un gene regulador por ABA. Esta sugerencia ha sido apoyada por el trabajo de traducción in vitro de Mayer (1980), quien reportó la presencia de un ARNm de alfa-amilasa en tejido tratado con ABA. Sin embargo, Jacobsen (1978) reportó que el ABA inhibe la acumulación de ARNm traducible y no afecta la traducción de mensajeros existentes. Estudios sobre el modo de acción de ABA en capa de aleurona de trigo indican que la hormona inhibe la síntesis de alfa-amilasa tanto a nivel de transcripción como de traducción, y que el efecto de inhibición de traducción es directo y no requiere del control por medio de un gene regulador (Gómez, 1982; Gómez, Arreguín y Varty, 1980).

Además de la inhibición de la síntesis de alfa-amilasa, el tratamiento de la capa de aleurona de cebada con ABA, provoca la formación de varios péptidos tanto in vivo, así como cuando el ARNm de la capa de aleurona es traducido en un sistema de germen de trigo in vitro (Ho, 1979; Jacobsen y col., 1980). Estos péptidos fueron formados tanto en ausencia como en presencia de AG<sub>3</sub>, tienen corta vida y son sensibles a los inhibidores de la traducción y de la transcripción. El ácido faséico, el cual es un inhibidor de la formación de alfa-amilasa inducida por AG<sub>3</sub>, no induce la formación de estos péptidos (Dashek, Sing y Walton, 1979; Ho, 1979). Estos resultados sugieren que los péptidos no están relacionados con los inhibidores de la formación de alfa-amilasa, o que el ABA y el ácido faséico inhiben la síntesis de alfa-amilasa por diferentes mecanismos.

Se ha reportado que el etileno estimula al liberación de alfa-amilasa en capa de aleurona de cebada (Jones, 1968; Ho, Abroms y Varner, 1977; 1982) y de trigo (López, Arreguín y Varty, 1978). También se ha reportado que el etileno estimula la síntesis de alfa-amilasa en la aleurona de trigo (López, Arreguín y Varty, 1978; López, 1981) y cebada (Eastwell y Spencer, 1982). Jacobsen (1973) reportó que el etileno es capaz de interactuar con el  $AG_3$  par anular parcialmente el efecto inhibitorio de ABA sobre la síntesis de alfa-amilasa. Una acción similar entre ABA,  $AG_3$  y etileno ha sido reportada en capa de aleurona de trigo (Gómez, 1982) donde parece que el etileno reversa la inhibición de ABA sobre al traducción, pero no lo hace sobre la transcripción.

### 1.7. Proteasas.

Las proteasas son hidrolasas que actúan sobre los enlaces peptídicos. Se ha propuesto que el termino "proteasa" sea utilizado para describir a todas las enzimas capaces de romper enlaces peptídicos; que a las endopeptidasas se les llame "proteinasas" y a las exopeptidasas se les nombre simplemente "peptidasas" (Barret, 1980).

La mayor parte de las proteinasas de plantas pertenecen a las sulfidril-proteinasas (un grupo de proteinasas que requieren un grupo sulfidril, generalmente dado por cistefna, en el centro catalítico), las cuales se han dividido en ácidas (activas a pH entre 3.0 y 4.0) y alcalinas (activas cerca del pH 8.0). Las sulfidril-proteinasas que se han extraído, purificado y caracterizado en plantas, provienen principalmente de semillas y hojas. Las familias más estudiadas en este aspecto

son: Caricaceae, Bromeliaceae, Moraceae, Gramineae y Leguminosae. Gran parte de los estudios sobre enzimas proteolíticas se han hecho en papaína aislada del fruto de Carica papaya.

En gramíneas se han obtenido sulfidril-proteinasas y proteinasas ácidas provenientes de diversas especies. En algunos casos, se han extraído de semillas y en otros, de hojas. Se ha reportado alto grado de pureza de estas enzimas. En semilla germinada de cebada se encontraron cuatro enzimas proteolíticas, aparentemente endopeptidasas (Popov y Karpilenko, 1974; Enari y Mikola, 1977). Se demostró que esta enzima purificada es capaz de hidrolizar rápidamente las proteínas del endospermo de cebada (Popov y Karpilenko, 1974). Otra de las endopeptidasas de cebada es una metalo-proteínasa con pH óptimo entre 5.5 y 8.5 (Mikola y Enari, 1970).

La semilla germinada de maíz contiene dos endopeptidasas (Abe y col., 1977; Melville y Scandalios, 1972; Ott y Scandalios, 1976) Una de ellas tiene pH óptimo de 3.0 frente a hemoglobina como sustrato, y un peso molecular de 52,000 (Abe y col., 1977). La otra tiene un pH óptimo de 7.5 y un peso molecular de 52,000-58,000. (Ott y Scandalios, 1976).

Las proteasas vegetales se utilizan ampliamente en la industria alimentaria. La mayor parte de estas son sulfidril-proteinasas y se han aislado de plantas dicotiledóneas (higo, papaya, euforbia), como en monocotiledóneas (piña y cereales). Las enzimas más conocidas que se aplican en esta industria son: papaína, ficina y bromelina. La papaína es la enzima que tiene mayor producción y uso.

Los usos de las enzimas proteolíticas en la industria alimentaria son:

- clarificación y estabilización de la cerveza. Cuando se elabora la cerveza, las proteínas quedan solubles mientras están a temperatura ambiente, pero al enfriarse, se pueden precipitar y provocar turbidez. Este fenómeno ocurre porque las proteínas se combinan con material fenólico, carbohidratos y metales pesados. La papaína digiere a las proteínas a un pH ligeramente ácido (4 -5 ), evitando la precipitación de proteínas al enfriar la cerveza. Por medio del proceso de pasteurización la enzima es desnaturalizada posteriormente.
- Ablandamiento de carnes. Cuando se mata al animal, el músculo queda muy rígido o duro, debido a procesos metabólicos y enzimáticos. Para reblandecerlo, se deja "Madurar" la carne, con el fin de que las enzimas proteolíticas (endógenas) la suavicen; o se puede acelerar el proceso por adición de enzimas proteolíticas (exógenas) como papaína, ficina o enzimas microbianas.
- Hidrolizados de proteína. Los hidrolizados enzimáticos de proteína de soya, glúten de trigo o proteína de leche, toman en ocasiones un sabor amargo. Ney observó que el sabor amargo de los péptidos se relaciona con la proporción de aminoácidos hidrofóbicos presentes (Mendizabal, 1980). Por tanto, el sabor de un hidrolizado depende de la proteasa particular que se utilice para liberar péptidos. La aplicación de proteasas es un medio atractivo para obtener mejores propiedades de las proteínas de los alimentos sin deteriorar el valor nutritivo (Alder-Niessen, 1977).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

## 2.1 Material biológico.

Las semillas de Triticum aestivum var. Potam S-70 fueron proporcionadas por Productora Nacional de Semillas (PRONASE). Durante todo el trabajo se utilizaron semillas de la cosecha 1978, las cuales se guardaron a 4 °C. Se prepararon endospermos (medias semillas sin embrión) por medio de un corte transversal con bisturí, para quitar el embrión y el escotelo. ( Fig. 1.1)

## 2.2 Material de vidrio.

Todo el material de vidrio utilizado fue lavado con detergente, enjuagado con una solución diluida de ácido clorhídrico, y finalmente enjuagado con agua destilada antes de secar.

## 2.3 Reactivos.

Los reactivos utilizados fueron todos de grado analítico, obtenidos de las casas Merck, Sigma y Baker. Las sustancias radioactivas fueron adquiridas de "Amersham International" y consistieron en:

- <sup>35</sup>S - metionina (110 mCi/mmol).
- <sup>14</sup>C - ovalbumina metilada ( 36  $\mu$ Ci/mg. )
- <sup>14</sup>C - mezcla de proteínas metiladas (0.833  $\mu$ Ci de cada proteína / ml) que contenía:
  - <sup>14</sup>C - miosina metilada (P.M. 200,000).
  - <sup>14</sup>C - fosforilasa-b metilada (P.M. 92,500).
  - <sup>14</sup>C - albumina bovina metilada (P.M. 69,000).
  - <sup>14</sup>C - ovalbumina metilada (P.M. 46,000).

$^{14}\text{C}$  - anhidrasa carbónica metilada (P. M. 30,000).

$^{14}\text{C}$  - lisozima metilada (P. M. 14,300).

#### 2.4 Esterilización del material.

Todo el material de vidrio utilizado para incubación del material biológico se esterilizó en autoclave durante 20 min. a 15 lb. de presión. Todas las soluciones empleadas en la incubación de aleuronas se esterilizaron por filtración en membrana "Millipore" de  $0.22\ \mu$ .

#### 2.5 Esterilización e imbibición de medias semillas.

Con el fin de impedir el crecimiento de microorganismos localizados dentro del pericarpio, se esterilizaron las medias semillas por infiltración al vacío durante 20 minutos con una solución de hipoclorito de sodio que contenía 0.19 % de cloro activo. Después de este tiempo se enjuagaron las semillas o endospermos cuatro veces con agua destilada estéril para eliminar los residuos de cloro presentes. El material esterilizado por este procedimiento se trasladó, en campana de flujo laminar "Veco", a cajas petri estériles que contenían dos hojas estériles de papel filtro "Whatman No. 541" y 8 ml de agua destilada estéril. Se incubó el material durante 24 horas en la obscuridad a  $28^{\circ}\text{C}$ , en cámara de crecimiento "LMS".

#### 2.6 Aislamiento de la capa de aleurona.

Transcurridas las 24 horas de imbibición, las medias semi-llas fueron esterilizadas nuevamente con solución de cloro activo al 0.15 % durante 20 minutos sin infiltración al vacío. Se lavaron 4 veces con agua destilada estéril, y se realizó la separación de la capa de aleurona (unida al pericarpio y testa), eliminando el almidón por medio de disección manual. Todas estas manipulaciones se realizaron bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

### 2.7. Incubación de la capa de aleurona.

Se colocaron 30 aleuronas en matraces Ehrlenmeyer de 50 ml que contenían 4 ml de una solución amortiguadora de succinato de sodio 5 mM (pH 5.8), con cloruro de calcio 20 mM, cloramfenicol 50  $\mu$ g/ml y estreptomicina 50  $\mu$ g/ml,  $\pm$  las hormonas vegetales enumeradas en la tabla 2.1. Cada matríz fue cerrado herméticamente con tapones de rosca y septa de hule cubierta con teflón para evitar la producción o absorción de olefinas durante las incubaciones (fig. 2.1.). En los experimentos en los que se deseaba eliminar el etileno endógeno producido por el tejido, se introdujo un pequeño tubo en el centro del matríz con 0.3 ml de una solución de perclorato de mercurio 0.25 M en ácido perclórico 0.25 M. que actúa como adsorbente del etileno (Osborne, 1973; López T., 1981). Con el fin de determinar el efecto del etileno exógeno sobre la actividad proteolítica, se inyectaron 65  $\mu$ l de una solución saturada del gas (a 4 °C) en cada matríz, con el fin de tener una concentración atmosférica final de 135 ppm.

EXPERIMENTO	Hg ( ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	HORMONAS E INHIBIDORES
control	+	—
inducción con AG <sub>3</sub>	+	AG <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M
efecto de ABA	+	AG <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M + ABA 10 <sup>-5</sup> M AG <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M + ABA 10 <sup>-4</sup> M
efecto de etileno	-	AG <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M + 135 ppm de etileno
dependencia en la síntesis de proteínas	+	AG <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M + 25 μg / ml de cicloheximida.
dependencia en la transcripción de ARN	+	AG <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M + 25 μg / ml de cordicepina.

Tabla 2.1 . Resumen de las condiciones experimentales empleadas en el estudio sobre el control de la actividad proteolítica en la capa de aleurona de trigo.

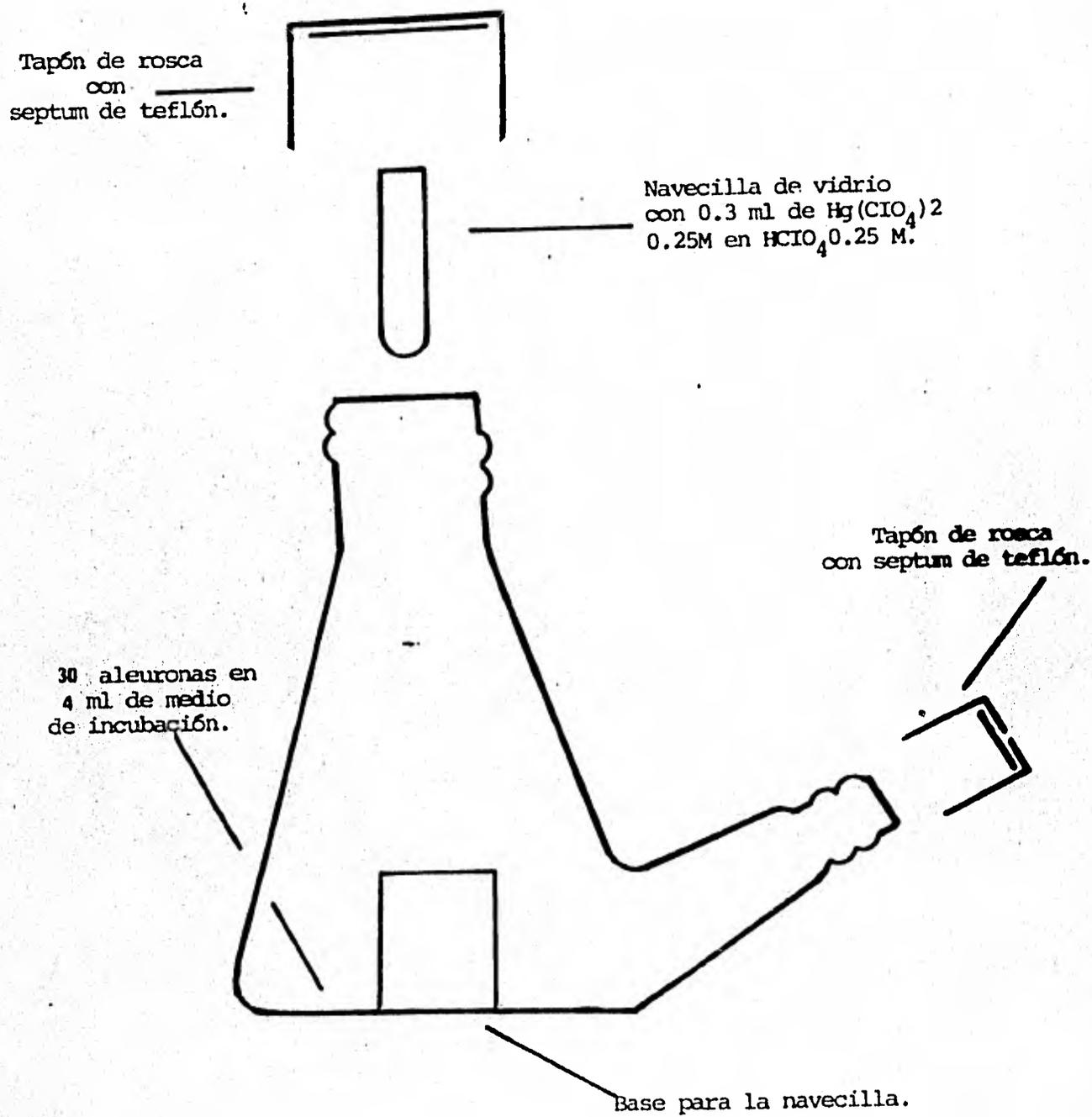


Figura 2.1. Matraz de incubación.

Se incubaron las aleuronas con agitación, a 28 °C, durante distintos tiempos, antes de extraer y determinar la actividad proteolítica.

#### 2.8. Extracción de proteasas de la capa de aleurona.

Se molieron las 30 aleuronas con el medio de incubación y 3 ml de una solución amortiguadora citrato (0.1M)/fosfato (0.2 M), - pH 3.5, en homogenizador "Ultraturrax" a un cuarto de su velocidad, durante 2 min a 4 °C. Se centrifugó el extracto en centrífuga clínica, a velocidad máxima, durante 5 min. Se tomaron 4.5 ml del sobrenadante para medir la actividad proteolítica.

#### 2.9. Preparación del sustrato para medición de actividad proteolítica.

Para evitar la interferencia de grupos amino libres en la determinación de la actividad proteolítica, el sustrato proteínico fue metilado con formaldehído en presencia de borohidruro de sodio (Dunn y Brotherton, 1971; Lin y col., 1969; Means y Feeney, 1968).

Se calentaron 600 ml de una solución amortiguadora de boro - (0.1 M) pH 9.0, a una temperatura de 50 °C. Se agregaron poco a poco 6 g de hemoglobina, agitando rápidamente hasta su disolución total. Se agregaron 1.2 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % para decolorar al sustrato, y se esperaron 15 min. para eliminar el exceso del peróxido. Se enfrió la mezcla en hielo y se mantuvo a 4 °C para realizar la reacción de metilación. Se añadieron unas gotas de 2-oc-tanol a la solución de hemoglobina para evitar la espuma. Se agrega-

ron 1.2 g de borohidruro de sodio con agitación continua, y se añadieron lentamente, 12 ml de formaldehído (200  $\mu$ l/ 30 seg.). Se continuó agitando rápidamente durante 10. min. más. Se ajustó nuevamente el pH a 9.0 y se repitió la metilación con el fin de lograr la metilación completa del substrato. Finalmente, se bajó el pH a 6.0 con ácido acético y se dializó contra agua destilada. La solución desalinizada fue liofilizada y la hemoglobina metilada se guardó a -20 °C.

#### 2.10. Eliminación de compuestos del extracto de la capa de aleurona que causan interferencia.

El ensayo de actividad proteolítica depende de la detección de grupos amino liberados del substrato metilado por acción de proteasas. Como los extractos de la capa de aleurona contenían altos niveles de aminoácidos libres que hacían prácticamente imposible la determinación de la actividad de las proteasas, pareció esencial eliminar estos compuestos de bajo peso molecular por la siguiente técnica cromatográfica (Feller, 1977):

Se emplearon mini-columnas (7.0 x 0.8 cm) empacadas con Sephadex G-25 equilibrado con una solución amortiguadora de citrato (0.05 M)/fosfato (0.1M), pH 3.5. (Fig. 2.2.) Se centrifugó la mini-columna durante 5 min a 4,000 rpm, seguidos por otros 5 min. a 7,400 rpm. Así se vació el volumen intersticial de la columna. Después se cargó la columna con 2.0 ml de extracto enzimático y se dejó en reposo durante 10 min. a 4 °C, para equilibrarse. Finalmente se centrifugó a 4,000 rpm durante 5 min. Las proteínas pasaron a

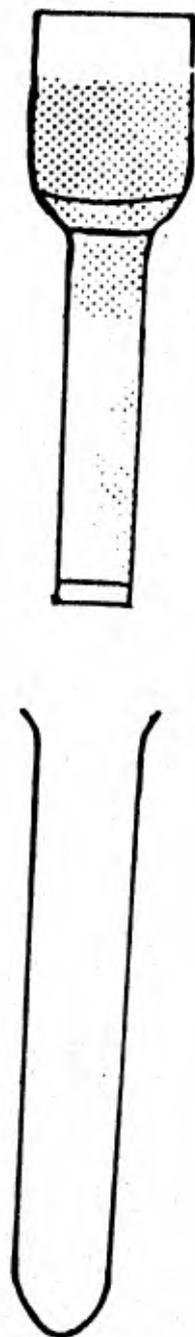


Fig. 2.2. minicolumna (7.0 x 0.8 cm).

traves de la columna y fueron colectadas en tubos de centrifuga. Los componentes de bajo peso molecular permanecieron atrapados en la matriz del gel.

## 2.11. Cuantificación del rendimiento de proteínas purificadas en las minicolumnas.

Aunque el rendimiento de proteínas purificadas en las minicolumnas fue bastante alto, no fue completamente reproducible (ver secc. 3. 2.) Para evitar errores en la determinación de actividad proteolítica producidos por este fenómeno, se decidió cuantificar el rendimiento de proteínas por medio de la introducción de un marcador radioactivo en el extracto enzimático. Esto se realizó mezclando en el extracto unos microlitros de  $^{14}\text{C}$  -ovalbumina metilada. Se tomó una alícuota de  $100\mu\text{l}$  del extracto antes y después de pasar por la columna. Se depositó cada alícuota en viales de centelleo líquido que contenían  $400\mu\text{l}$  de agua destilada y 5.0 ml de líquido de centelleo "Instagel". Se determinaron las cpm en un analizador de centelleo líquido "Philips" equipado con una calculadora "Hewlett Packard 97S". Por la diferencia en cuentas se sacó el porcentaje de proteínas eluidas, dato que fue usado para corregir la actividad proteolítica determinada subsecuentemente.

## 2.12. Determinación de actividad proteolítica.

Se utilizó un método en el cual todos los grupos liberados por la acción de proteasas sobre un substrato metilado pueden ser deter-

minados sin necesidad de precipitar el exceso de proteína (no hidrolizada) (Lin y col., 1969 ; Dunn, 1971). Los grupos amino libres se determinaron por su reacción con el ácido 2,3,5- trinitrobencensulfónico (TNBS). Este método es relativamente sencillo y de alta sensibilidad debido al alto coeficiente de extinción del complejo TNBS-amino a 420 nm.

#### Reactivos.

Substrato: N,N'-dimetil hemoglobina al 0.2 % (p/v).

Se disolvieron 0.1 g de N,N'-dimetil hemoglobina en 50 ml de solución amortiguadora. Se filtró y se guardó a 4 °C.

Solución amortiguadora: Citrato (0.05 M)/ fosfato (0.1 M).

Se disolvieron 2.29 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , 1.42 g de ácido cítrico monohidratado, y 1.17 g de cloruro de sodio en 150 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 3.5 y se aforó a 200 ml.

Solución amortiguadora: borato (2.0 M) pH 9.0.

Se disolvieron 12.366 g de ácido bórico en 45 ml de sosa (2.0 M) a 60 °C. Se aforó a 100 ml con agua destilada a 60 °C. Se mantuvo la solución a 60 °C hasta el momento de usar. Esta solución se preparó el mismo día que se usó.

TNBS: ácido 2,3,5-trinitrobencensulfónico al 0.1 %.

Se disolvieron 0.05 g de TNBS en 50 ml de agua destilada. Se guardó en refrigeración resguardada de la luz. Esta solución se preparó el mismo día en que se usó.

### Ensayo de actividad proteolítica.

Se mezclaron 1.5 ml de hemoglobina metilada y 1.5 ml de extracto enzimático semipurificado y se incubó a 30 °C con agitación. A tiempo cero y a diferentes intervalos de tiempo ( cada 15 ó 30 min. ) se tomaron alícuotas de 0.5 ml de la mezcla de reacción y se depositaron en tubos que contenían previamente, 2.0 ml de la solución amortiguadora de boratos, y 0.5 ml de agua destilada. Se mezclaron y se llevaron inmediatamente a 4 °C. Para desarrollar el color se agregó 1.0 ml de TNBS a cada tubo. Se agitaron perfectamente y se incubaron en - obscuridad a 50 °C durante 30 min. El color resultante se midió a 420 nm en un espectrofotómetro "Unicam SP 600".

### Cálculo de actividad proteolítica.

A la mezcla de reacción enzimática se le midió su densidad óptica a 420 nm trazandose estos valores contra el tiempo de incubación. Se sacó la pendiente como medida de la velocidad de degradación de la hemoglobina. Se corrigió la pendiente con el porcentaje de proteína eluido de las minicolumnas. Se definió una unidad de actividad proteolítica como la cantidad de enzima que produce un cambio de densidad óptica de 0.0001 por minuto a 30 °C.

$$\text{Unidades de actividad proteolítica / 30 aleuronas} = \frac{\Delta D. O._{420} / \text{min} \times 10^4}{\text{factor de recuperación}}$$

## 2. 13. Determinación de pH óptimo de la proteasa de aleuronas.

Se incubaron 120 aleuronas en 12.0 ml de medio con  $AG_3$  durante 24 hs. a 28 °C, como se describió en la sección 2.7. Se preparó un extracto enzimático moliendo el tejido en el medio de incubación. Después de centrifugar (secc. 2.8.) y eliminar compuestos de bajo peso molecular (secc. 2.10.), se mezclaron alícuotas del extracto con volúmenes iguales de diferentes soluciones de N, N - dimetil hemoglobina al 0.1 % (p/v) preparadas con distintas soluciones amortiguadoras de pH 3.4 hasta pH 9.0. Se midió la actividad proteolítica para cada pH por el método ya descrito.

#### 2.14. Cálculo de $K_m$ de la proteasa.

Se prepararon soluciones de N, N'-dimetil hemoglobina en diferentes concentraciones, manteniendo el pH constante con una solución amortiguadora de citrato/fosfato pH 3.5. Se determinó la actividad proteolítica (ver secc. 2.12.) de un extracto de aleuronas inducidas con  $AG_3$  por el método descrito anteriormente (ver secc. 2.7., 2.8. y 2.10.) para cada concentración de sustrato. Se determinó el valor de  $K_m$  de la enzima graficando los valores de actividad enzimática contra concentración de sustrato por el método de Lineweaver-Burk.

#### 2.15. Efecto de calcio sobre la inducción de proteasa en aleuronas.

Para determinar si el calcio es esencial para la inducción y estabilidad de la proteasa, como en el caso de la amilasa, se incubaron aleuronas durante 24 horas en medio de incubación que consistió

en succinato de sodio 5mM (pH 5.8) con  $AG_3 10^{-6}$  M (ver secc. 2.7.). Se comparó la actividad proteolítica con la actividad inducida en tejido incubado en presencia de calcio.

#### 2.16. Extracción de proteasa de semillas germinadas.

Se esterilizaron 200 g de semillas enteras por infiltración al vacío con una solución de cloro activo al 0.19 %. Después de enjuagar con agua destilada estéril, se pusieron los granos a germinar en la obscuridad a 28 °C, en charolas que contenían dos hojas de papel filtro y agua destilada estéril. Después de 72 horas, se separaron los tallos y raíces y se molieron los endospermos en una solución amortiguadora citrato (0.05 M) / fosfato (0.1 M) pH 3.5, a 4 °C, agregando polivinilpirrolidona al 0.1 % y mercaptoetanol 10 mM para evitar oxidación de las enzimas. Se centrifugó el extracto a 15,000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se llevó a 60 % de saturación con sulfato de amonio, con el fin de precipitar la actividad proteolítica. Se dejó reposar a 4 °C durante la noche y se colectó el precipitado por centrifugación a 17,000 rpm durante 20 min. El precipitado se redisolvió en solución amortiguadora citrato / fosfato pH 3.5. Se dializó contra agua destilada, se centrifugó para eliminar cualquier material insoluble y se liofilizó. La preparación enzimática quedó así lista para su purificación por cromatografía de afinidad.

#### 2.17. Aislamiento de aleuronas en escala grande.

4 000 endospermos se esterilizaron por el método ya descrito

(ver secc. 2.5.), fueron incubados durante 48 horas en una solución amortiguadora de succinato de sodio 5 mM (pH 5.8), con cloruro de calcio 20 mM, cloruro de sodio 10 mM y alfa-amilasa  $10\mu\text{g} / \text{ml}$ . - Posteriormente se lavaron las medias semillas cinco veces con agua destilada estéril, dejando las aleuronas limpias y libres de almidón. Se incubaron las 4 000 aleuronas durante 24 horas en una solución amortiguadora de succinato de sodio 5 mM (pH 5.8) con cloruro de calcio 20 mM y  $\text{AG}_3$   $10^{-6}$  M. Al terminar el periodo de inducción, se extrajo la proteasa por el método ya descrito (secc. 2.8.), se precipitó con sulfato de amonio al 60 % de saturación; se dializó contra agua destilada y se liofilizó (secc. 2.13.). La preparación quedó lista para su subsecuente purificación.

## 2.18. Purificación de proteasas por cromatografía de afinidad.

Se purificaron las proteasas de semillas germinadas y aleuronas aisladas por cromatografía de afinidad utilizando una columna de Sepharosa-4B unida a hemoglobina siguiendo el método de Cuatrecasas, 1970 y Chua y Bushuk, 1969.

### Activación de la Sepharosa-4B.

Se mezclaron 50 ml de una suspensión de Sepharosa - 4B con un volúmen igual de agua destilada. Posteriormente se agregaron 100 ml de una solución de bromuro de cianógeno al 10 % (p/v). Se mezclaron e inmediatamente se ajustó el pH a 11 con sosa 4 M. Se agitó suavemente durante 10 min., se filtro, y se lavó la Sepharosa activada con un litro de una solución de bicarbonato 0.1 M a  $4^\circ\text{C}$ . Se sus-

pendió la Sepharosa lavada en 50 ml de solución de bicarbonato de sodio 0.1 M (pH 9.0) y se le agregaron rápidamente 40 ml de una solución de hemoglobina al 4 % (disuelto en la misma solución amortiguadora). Se agitó suavemente la muestra durante 24 horas a 4 °C. Se filtró y se lavó la Sepharosa exhaustivamente con agua destilada hasta lograr la desaparición total del color en el agua de los lavados.

#### Soluciones amortiguadoras para cromatografía de afinidad.

Solución amortiguadora 1. acetato de sodio 0.05 M (pH 5.2).

Se mezclaron 79 partes de una solución de acetato de sodio (0.05 M) con 21 partes de una solución de ácido acético (0.05 M).

Solución amortiguadora 2. ácido acético 0.1 M (pH 3.0).

Solución amortiguadora 3. acetato de sodio 4.0 M (pH 4.5).

Se mezclaron 49 partes de una solución de acetato de sodio (4.0 M) y 51 partes de una solución de ácido acético (4.0 M).

#### Preparación de la columna para cromatografía de afinidad.

Se empacó una columna de 2.5 por 8.0 cm con la Sepharosa 4B-hemoglobina (volumen total: 31.4 ml). Se lavó la columna con la solución amortiguadora 1 hasta que desapareció todo residuo de hemoglobina en el eluido. Se repitió este paso con la solución amortiguadora 2. Se equilibró la columna nuevamente con la solución amortiguadora 1 antes de aplicar la muestra de proteasa.

### Purificación de la preparación enzimática.

Se aplicó la muestra disuelta en solución amortiguadora 1 a la columna de Sepharosa 4B- hemoglobina, por medio de una bomba peristáltica "LKB" con un flujo de 80 ml / hora. Se eluyó el primer pico con la misma solución amortiguadora hasta que la densidad óptica a 254 nm del eluyente bajo a cero. Se eluyó el segundo pico (la proteasa) con la solución amortiguadora 2. Se colectaron las fracciones (4.0 ml) por medio de un colector de fracciones "LKB Ultrorac". Los tubos en los que se colectaron las fracciones del segundo pico contenían 150  $\mu$ l de la solución amortiguadora 3 para elevar el pH y evitar la inactivación de la enzima. La temperatura se mantuvo a 4 °C durante la cromatografía. Se midió la actividad proteolítica de las fracciones del segundo pico. Se juntaron estas fracciones, se dializaron contra agua destilada, se liofilizaron y se guardó la proteasa purificada a -70 °C.

### 2.19. Radiomarcaje de la proteasa de la capa de aleurona.

Se incubaron 67 aleuronas en 6 ml de solución amortiguadora de succinato de sodio 5 mM (pH 5.8), con cloruro de calcio 20 mM,  $AG_3$   $10^{-6}$  M y 25  $\mu$ Ci  $^{35}$ S-metionina, durante 24 horas a 28 °C. Se molieron el medio y el tejido para extraer proteasas por el método ya descrito (secc. 2.8.). Se centrifugó el extracto a 19,000rpm durante 15 min. Se dializó el sobrenadante contra agua destilada y se liofilizó. Se redisolvió en solución amortiguadora 1 y se aplicó a una columna de Sepharosa 4B- hemoglobina (1.5 x 14.0 cm). Se eluyó la pro-

teasa purificada por el método ya descrito en la secc. 2.15. Se dializó contra agua destilada y se liofilizó.

## 2.20. Extracción y purificación de alfa amilasa.

Se esterilizaron 1 kg de semillas de trigo por el método ya descrito en la secc. 2.13. Se dejaron germinar en obscuridad a 28 °C durante 96 horas. Se molieron en el homogenizador "Ultraturrax" con 1,500 ml de solución amortiguadora de acetato de calcio 0.2 % (pH 6.0) agregando 5 ml de mercaptoetanol. Se pasó el homogenado a través de tres capas de gasa, se reajustó el pH a 6.0 y se calentó a 70 °C durante 20 min. con el fin de inactivar la beta-amilasa y otras enzimas. Después de enfriar a 4 °C, se centrifugó durante 30 min. a 12,000 rpm. Se precipitó la alfa-amilasa llevando el sobrenadante a un 60 % de saturación con sulfato de amonio. Después de dejar reposar durante 4 horas, se colectó el precipitado por centrifugación a 15,000 rpm durante una hora. Se lavó el precipitado y se redisolvió en acetato de calcio 0.2 % (pH 6.0). Se dializó la solución contra acetato de calcio 0.2 % (pH 6.0) y se concentró a un décimo de su volumen original por medio de liofilización.

El extracto dializado y concentrado se llevó a 40 % con etanol a 4 °C. Se centrifugó durante 15 min a 25,000 rpm, y se llevó el sobrenadante a pH 8.0 con una solución de "Trizma" base. Al sobrenadante se le agregó lentamente y gota por gota, 25 ml de una solución de glucógeno al 4.0 %, manteniéndose a 4 °C con agitación continua. Se llevó a 40 % de etanol otra vez, y se dejó agitando durante una ho-

ra. Se colectó el precipitado por centrifugación durante 30 min. a 25,000 rpm. Se lavó el precipitado de glucógeno-alfa-amilasa dos veces con 40 % de etanol, y finalmente se suspendió en una solución amortiguadora de acetato de calcio al 0.2 % (pH 6.0). Se incubó la suspensión durante 3 horas a 30 °C, con el fin de que la enzima hidrolizara el glucógeno y se liberase hacia la solución. Se centrifugó a 25,000 rpm durante 20 min., se dializó contra acetato de calcio al 0.2 % (pH 6.0) y se liofilizó a un décimo de su volumen original. El extracto purificado se pasó por una columna de ultrogel AcA 44 (10,000 - 130,000 daltons) equilibrada con acetato de calcio al 0.2 % (pH 6.0). Se midió la actividad de cada una de las fracciones eluidas. Se juntaron todas las fracciones con actividad amilolítica, se dializaron contra agua destilada y se liofilizaron. Se guardó la enzima purificada a -20 °C.

## 2.21. Determinación de actividad de alfa-amilasa.

La actividad de alfa-amilasa se determinó usando una modificación de la técnica de Briggs (1967), siguiendo la degradación de almidón por la disminución del color del complejo almidón-yodo.

Para el ensayo de alfa-amilasa se mezcló 1.0 ml del extracto enzimático (o dilución de éste) con 3.0 ml de solución de almidón. Se mezcló perfectamente y se incubó a 30 °C. A tiempo cero y a intervalos de 5 min., durante 30 min, se tomaron alícuotas de 0.1 ml de la mezcla de reacción que se adicionaron a 10.0 ml de solución yodo/yoduro de potasio. El color resultante se midió a 565 nm. en espec-

trofotómetro "Unicam SP 600". Para determinar la actividad enzimática se graficó la disminución en densidad óptica contra tiempo de reacción. Se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que produce un cambio de densidad óptica a 565 nm de 0.001 por minuto a 30 °C.

$$\text{Actividad de alfa-amilasa} = \Delta D.O._{565} / \text{min} \times \text{volúmen del extracto} \times f$$

donde f es el factor de dilución del extracto.

#### Reactivos.

Almidón: Se suspendieron 0.5 g de almidón soluble en 75 ml de agua destilada. La suspensión se hirvió durante dos minutos para disolver el amidón. Se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 1.0 ml de cloruro de calcio 1.0 M y 1.0 ml de una solución amortiguadora de acetato de calcio 1.3 M (pH 6.0). Se aforó a 100 ml con agua destilada.

Solución de yodo: Se preparó disolviendo 0.254 g de yodo y 4.0 g de yoduro de potasio en un litro de agua destilada.

#### 2.22. Electroenfoque analítico de proteasas purificadas.

Para el electroenfoque analítico de proteínas se utilizaron placas preparadas de rangos de pH 3.5 a 9.5 y pH 4.0 a 6.5 (LKB ampholine PAG plates 1804-101 y 1804-102 respectivamente) con 5 % de acrilamida y 3 % de entrecruzamientos.

Las soluciones de electrodo utilizadas fueron:

pH 3.5 - 9.5	ánodo: $\text{H}_3\text{PO}_4$ 1.0 M. cátodo: NaOH 1.0 M.
pH 4.0 - 6.5	ánodo: ácido glutámico 0.1 M en $\text{H}_3\text{PO}_4$ 0.5 M cátodo: $\beta$ - alanina 0.1 M.

Las placas se corrieron aplicando una potencia constante de 30 W a 10 °C durante 1.5 a 2.5 horas. Las muestras fueron depositadas sobre la superficie del gel por medio de piezas rectangulares de papel filtro "Whatman 3MM, Paratex", en diferentes concentraciones y distintas posiciones. Después de una hora se quitaron los aplicadores por si las proteínas se enfocaban abajo del éstos.

Al terminar el electroenfoque se fijaron las proteínas sumergiendo el gel en 200 ml de la solución fijadora durante 30 a 60 min. Se transfirió el gel a la solución destañadora durante 15 a 30 min con el fin de eliminar las anfolinas y ajustar el pH del gel al mismo de la solución teñidora. Se sumergió el gel en 250 ml de la solución teñidora a 60 °C durante 10 min. Se eliminó el exceso de colorante del gel por medio de varios lavados sucesivos con solución destañadora. Finalmente se transfirió el gel a una solución preservadora durante 30 a 60 min. Se cubrió la placa con una hoja de celofán y se dejó secar. Las proteínas aparecieron como bandas azules contra un fondo incoloro.

Solución fijadora: A 500 ml de agua destilada se agregaron 57.5 g de ácido tricloroacético y 17.25 g de ácido sulfosalicílico.

Solución teñidora: Se disolvieron 0.460 g de azul brillante de Coomassie R 250 en 400 ml de la solución destañadora.

Solución desteñidora: Se mezclaron 500 ml de etanol y 160 ml de ácido acético. Se aforó la mezcla a 2 litros con agua destilada.

Solución preservadora: Se mezclaron 40 ml de glicerol con 400 ml de la solución desteñidora.

## 2.23. Electroenfoque preparativo de proteasas purificadas.

Se utilizaron dos rangos de pH: 3.5 a 9.5 y 3.5 a 7.0. Este último se preparó mezclando 2.5 ml de anfolinas pH 3.5 a 5.0 y 2.5 ml de anfolinas de pH 5.0 a 7.0.

Para preparar la placa de electroenfoque preparativo, se remo jaron seis tiras de papel filtro para electrodo de electroenfoque "LKB" de 10.5 cm de longitud, en la mezcla de anfolinas seleccionadas diluídas diez veces con agua destilada. Se colocaron tres tiras de papel en cada extremo del molde. Se pesó el molde con las tiras de papel mojado. Se colocó la placa sobre un nivelador y se le introdujo la sus pensión del gel granulado (Ultradox) en la solución de anfolinas. Se pesó el molde otra vez. La suspensión de Ultradox fue preparada mezclando lentamente 4.0 g del gel seco con 100 ml de la solución de anfolina, la cual constaba de 5.0 ml de anfolinas y 95.0 ml de agua destilada.

Se colocó sobre la placa a un metro de altura, un secador de pelo con flujo muy suva de aire caliente, evitando que provocara la formación de ondas sobre el gel. Se dejó secar el gel hasta que perdió 40.0 % de su humedad ( determinado pesando el gel con el molde a intervalos frecuentes de tiempo ). Se transfirió la placa al aparato

de electroforesis "LKB Multiphor" a 10 °C. Se colocaron tiras de papel para electrodos en los extremos de la placa, empapandolas previamente en las siguientes soluciones:

ánodo :  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1.0 M.

cátodo: NaOH 1.0 M.

Para aplicar la muestra al gel, se disolvió la proteína desalinizada en 3.0 ml de la solución correspondiente de anfolinas diluidas diez veces. Se colocó el aplicador de muestra "LKB" en la mitad de la placa del gel, se sacó con una espátula el gel que ocupaba la zona marcada por el aplicador y se mezcló este gel con los 3.0 ml de la muestra. Se depositó esta mezcla en el espacio donde se había retirado el gel. Se quitó el aplicador y se dejó en reposo unos minutos para equilibrarse hidrostáticamente la zona. Se colocaron los electrodos y se aplicó un poder constante de 8 W durante 16 horas.

Al terminar el electroenfoco se retiraron las tiras de papel de los electrodos. Para detectar las zonas de proteínas se colocó una hoja de papel filtro (10.8 x 24.2 cm) sobre la superficie del gel, evitando la formación de burbujas de aire. Se retiró a los 2 min. y se se có durante 15 min en horno a 120 °C. Se lavó la hoja de papel en una solución de ácido tricloracético al 10 %, haciendo tres cambios cada 15 min. Se tizó el papel con 200 ml de una solución de azul brillante de Coomassie R 250 al 0.2 %, disuelto en una mezcla de metanol/agua/ácido acético (50 : 50 : 10). Se quitó el exceso de colorante con varios cambios de solución destefidora que consistió en metanol/ agua/ ácido acético (50 : 50 : 10). Las bandas de proteínas aparecen de color azul

contra un fondo blanco.

Para detectar el gradiente de pH y la actividad proteolítica en gel, se colocó el molde fraccionador "LKB" sobre el gel inmediatamente después de retirar el papel filtro. Por medio de este molde se dividió al gel en 30 porciones iguales, las cuales fueron retiradas con espátula y colocadas en tubos de centrifuga con 2.0 ml de agua - destilada. Se midió el pH de cada fracción con potenciómetro, se centrifugaron las fracciones a velocidad máxima en centrífuga clínica y se separaron los sobrenadantes colocandolos en bolsas de diálisis. Finalmente se dializaron los sobrenadantes contra agua destilada durante 24 horas para eliminar las anfolinas y poder medir la actividad proteolítica de cada fracción (ver secc. 2.12.).

## 2.24. Electroforésis en geles de acrilamida- SDS.

### Soluciones.

Solución A: 6.8 g de imidazol y 2.0 g de laurilsulfato de sodio (SDS) disueltos en un litro de agua destilada (pH 7.0).

Solución B: Se mezclaron 800 ml de la solución A con 800 ml de agua destilada para preparar la solución amortiguadora de los electrodos.

Solución C: Se disolvieron 1.0 ml de 2-mercaptoetanol y 1.0 g de SDS en 10.0 ml de solución A y se aforó a 100 ml con agua destilada.

Solución D: Se disolvieron 22.2 g de acrilamida y 0.6 g de N,N-metilen bis-acrilamida (ambos purificados especialmente para electroforesis) en agua destilada y se aforó a 100 ml.

	ml de solución para el gel al 5 %. ( T = 5.1 %, c = 2.6 % ).	ml de solución para el gel al 10 %. ( T = 10.2 % , c = 2.6 % : )
agua destilada	14.9	0
solución A	33.0	33.0
solución D	14.8	29.7
solución E	3.2	3.2
TEMED	0.1	0.1

Tabla 2.2. Preparación de geles para electroforésis.

Solución E : Se disolvieron 100 mg de persulfato de amonio en agua destilada, aforando a 10.0 ml. Esta solución se preparó en el momento en que se requería.

Solución F : Se disolvieron 35 mg de azul de bromofenol en 10.0 ml de la solución C.

Solución fijadora. se disolvieron 57 g de ácido tricloroacético y 17 g de ácido sulfosalicílico en una mezcla de 150 ml de metanol y 300 ml de agua destilada.

Solución teñidora: se disolvieron 1.25 g de azul brillante de Coomassie en una mezcla de 227 ml de metanol y 227 ml de agua destilada. Una vez disuelto el colorante en esta mezcla se agregaron 46 ml de ácido acético. Se filtró para eliminar residuos sólidos.

Solución destañadora: se mezclaron 300 ml de etanol y 100 ml de ácido acético que se aforaron a un litro con agua destilada.

Preparación de geles: se preparó la solución formadora de geles mezclando los componentes en el orden y proporciones que se indican en la tabla 2.2. Se mezclaron las soluciones de acrilamida e imidazol en un matraz kitasato. Se aplicó vacío a la mezcla durante 5 min. para eliminar el aire. Se agregaron el persulfato de amonio y TEMED y se mezcló cuidadosamente sin introducir aire. Se vació inmediatamente en el molde para la formación de geles previamente preparado. Después de 40 min. se sacó el gel polimerizado del molde y se guardó en cámara de humedad "LKB" durante 12 a 24 horas a temperatura ambiente.

Preparación de la muestra: se disolvieron aproximadamente 50 - 500  $\mu\text{g}$  de proteína en 250  $\mu\text{l}$  de solución C. Se incubó la solución en baño de agua a 92 °C durante 3 min. Se dejó enfriar y se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de solución F y 10  $\mu\text{l}$  de 2-mercaptoetanol . Se mezcló.

Electroforesis : antes de aplicar la muestra a la placa de poli-acrilamida, se realizó una pre-electroforésis pasando una corriente de 80 mA. durante 30 min. Enseguida se aplicaron 10  $\mu\text{l}$  de muestra a la placa y 10  $\mu\text{l}$  de las soluciones de proteínas estándares. Para la detección de bandas radioactivas se utilizó la mezcla de proteínas - marcadas con carbono-14 ya descrita en la secc. 2.3. Para la detección de proteínas con el colorante azul brillante de Coomassie se utilizaron las siguientes proteínas estándares, corriéndolas tanto individualmente como mezcladas.

<u>Proteína.</u>	<u>Peso Molecular.</u>
Lisozima	14, 300
$\beta$ -lactoglobulina	18, 400
Tripsinógeno	24,000
Pepsina	34,700
Ovalbumina	45,000
Albumina bovina	66,000

Se inició la electroforesis aplicando una corriente de 20 mA durante 10 min. con el fin de concentrar las muestras. Se aumentó la corriente a 100 mA, y se mantuvo constante durante 2 horas aproximadamente, a 5 °C.

Al terminar la electroforesis se sumergió la placa del gel en

250 ml de la solución fijadora. En el caso de las muestras radioactivas se sometió el gel fijado a la técnica de fluorografía (ver secc. 2.25.). Para teñir las proteínas no-marcadas se transfirió el gel a la solución teñidora durante dos horas. Se eliminó el exceso de colorante por medio de varios cambios sucesivos con la solución destañidora. Las bandas de proteínas aparecen de color azul contra un fondo blanco.

### 2.25. Detección de proteínas radioactivas por fluorografía.

Se transfirió el gel de la solución fijadora a 200 ml de dimetilsulfoxido (DMSO). Se hicieron tres cambios del DMSO cada media hora. Se sumergió el gel en 250 ml de una solución de 2,5-difeniloxazol (PPO) en DMSO al 20 % (p/p) durante tres horas. Se transfirió el gel impregnado a 500 ml de una solución acuosa de glicerol al 10 % (v/v) durante una hora para precipitar el PPO dentro de la matriz del gel (Bonner y Laskey, 1974). Se sacó el gel y se colocó en una placa de vidrio (12.5 x 26 cm). Se cubrió con una hoja de celofán humedecida en la solución de glicerol, y se puso a secar en estufa de alto vacío a 60 °C durante una hora. Se cubrió la superficie del gel con una placa delgada de plástico, y en la obscuridad se colocó una película de rayos-X (kodak G-mat RP), sobre la mica de plástico. La película se mantuvo en buen contacto con el gel por medio de una placa pesada de vidrio. Se envolvió todo con cuatro hojas de papel aluminio y se llevó al congelador a -70 °C durante 15 días. La película de rayos-X se reveló sumergiendola en solución reveladora Kodak R P X-Gmat du-

rante 4 min. Se lavó medio minuto en agua corriente y se transfirió a la solución fijadora Kodak RP X-Gmat durante 4 min. Finalmente se lavó 5 min. en agua corriente y se secó.

## 2.26. Cálculo de pesos moleculares.

Se graficó el peso molecular contra la movilidad relativa de cada una de las proteínas estadares para calibrar el gel de acrilamida-SDS. Por medio de esta calibración se lograron determinar los pesos moleculares desconocidos de las muestras, utilizando sus movilidades relativas. Se determinó la movilidad relativa de una banda por medio de la siguiente expresión:

$$\text{movilidad relativa} = \frac{\text{distancia de migración de la proteína}}{\text{distancia de migración del azul de bromofenol}} \times \frac{\text{longitud del gel antes de fijar}}{\text{longitud del gel después de fijar.}}$$

### CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1. El ensayo de proteasas.

Antes de iniciar los estudios sobre el control hormonal de la formación de proteasas por la capa de aleurona de trigo, fue necesario desarrollar el método de ensayo adecuado.

Como se mencionó en el capítulo anterior, la mayoría de los métodos para medir actividad proteolítica están basados en la liberación de grupos amino a partir de un substrato (comunmente caseína o hemoglobina). Debido a que todas las determinaciones colorimétricas para la detección de grupos amino reaccionan con los grupos amino terminal y  $\epsilon$ -amino del substrato proteínico, es necesario emplear un método que elimine la interferencia del substrato en la determinación. Esto se realiza generalmente mediante la precipitación ácida del substrato no hidrolizado, una vez que se ha concluido la reacción enzimática, detectando los grupos amino que quedan solubles en el medio ácido (aminoácidos libres y péptidos de bajo peso molecular). Estos métodos no presentan una cinética lineal, debido a que no detectan la hidrólisis parcial del substrato. Para evitar este problema se utilizó un método en el cual todos los grupos amino expuestos a la actividad proteolítica pueden ser determinados sin necesidad de precipitar el substrato. Naturalmente había que eliminar la interferencia del substrato, lo cual se llevó a cabo, metilando tanto los grupos amino terminales, como lo grupos  $\epsilon$ -amino del substrato protéico. La liberación de grupos amino por la acción de proteasas sobre este substrato se siguió por medio de su reacción con el ácido 2,3,5-trinitrobenzen-sulfónico (TNBS), Como se describió en la sección 2.12.

Aunque la metilación de la proteína ha sido realizada por métodos reportados en la literatura (Dunn y Brotherton, 1971; Lin y col., 1969), se observó que se mejoró la eficiencia de la metilación por dos reacciones sucesivas (secc. 2.9.) El resultado fue una disminución en la reactividad del sustrato con el TNBS a casi cero y, por lo tanto, una mejora en la densidad óptica de los testigos.

Como regla general el sustrato usado en la determinación es N,N'-dimetilcaseína, debido a que esta proteína no posee grupos cromóforos que pueden interferir en la determinación colorimétrica del complejo TNBS-amino. Aunque se preparó este sustrato se observó que como la caseína, la N,N'-dimetilcaseína no es soluble a pH inferior a 5.5, por lo cual su uso queda restringido para la determinación de proteasas neutras o alcalinas. Debido a que el pH óptimo de las enzimas bajo estudio en este trabajo era desconocido, fue necesario preparar la N,N'-dimetil hemoglobina, la cual es soluble desde pH 2.5 hasta pH 9.0; esperábamos de ser posible cambiar a la N,N'-dimetilcaseína, si encontrábamos una proteasa con una actividad máxima dentro del rango de pH en el que es soluble este sustrato. Como se verá posteriormente no fue el caso y todos los ensayos fueron realizados con la N,N'-dimetilhemoglobina como sustrato.

Como el grupo prostético de hemoglobina absorbe a la misma longitud de onda en la que el complejo TNBS-amino, la molécula de hemoglobina tuvo que ser parcialmente decolorada con agua oxigenada antes de metilarla. Se encontró que hay que realizar esta oxidación preliminar del grupo heme con mucho cuidado, porque una oxidación

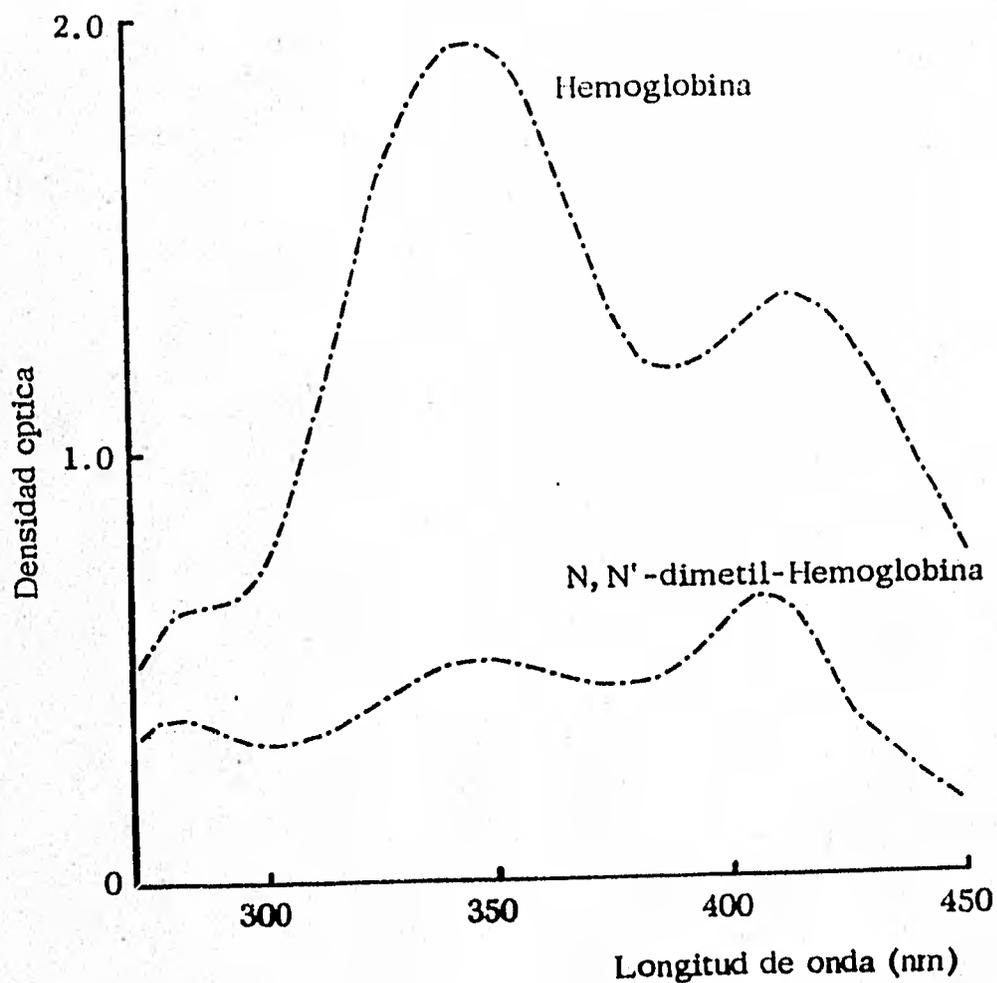


Fig. 3.1. Comparación espectral de la hemoglobina y la N, N'-dimetil hemoglobina después de reaccionar con TNBS. Obsérvese la apreciable disminución en la densidad óptica a 420 nm después de la oxidación y metilación.

excesiva desnaturaliza la proteína debido a un ataque sobre la globina. Las condiciones óptimas para esta reacción están descritas en la sección 2.12.

La efectividad combinada de la oxidación y la subsecuente metilación de la hemoglobina disminuyen la reactividad de la molécula hacia el TNBS, y con ello reducen su interferencia en las subsecuentes determinaciones de la actividad proteolítica como se ilustra en la Fig. 3.1.

La reacción del TNBS con los grupos amino es dependiente del pH, así como la intensidad del color del complejo TNBS-amino. Se requiere de un pH básico de alrededor de 9.0 para hacer cuantitativa la reacción y para asegurar la intensidad máxima del color. De acuerdo con los reportes en la literatura (Lin y col., 1969; Dunn y Brotherton, 1971), el cambio de pH puede lograrse agregando a la mezcla de reacción enzimática, una solución de bicarbonato de sodio al 4 % (pH 8.5). Aunque hay formación de color con este procedimiento, se obtuvieron grandes variaciones en los resultados, cuando se intentó determinar el pH óptimo de la proteasa de la capa de aleurona de trigo. Se probó la capacidad de la solución de bicarbonato de sodio al 4 % para cambiar el pH de la mezcla de reacción, usando una solución de glicina ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) disuelta en soluciones amortiguadoras con distintos pH. Se encontró con estos experimentos que el método reportado para elevar el pH es completamente inadecuado para ajustar el pH al requerido para formar el complejo TNBS-amino colorido, para los casos en los que la solución amortiguadora era infe-

rior a pH 6.0.

Se probaron otros métodos, para resolver este problema, incluyendo el de incrementar la concentración de bicarbonato al 10 %, y diversas concentraciones de distintas soluciones amortiguadoras para intentar llevar la mezcla de reacción enzimática a pH 8.5, independientemente de su pH inicial. El método adoptado, después de comprobar que era el más conveniente, fue reportado por Valet (1971) usando una solución amortiguadora de borato 2.0 M (pH 9.0) a 60 °C. Utilizando este procedimiento fue posible demostrar la linealidad en el desarrollo del color, llegando a densidades ópticas mayores que 2.0 a 420 nm con solución de TNBS al 1.0 %.

### 3.2. Eliminación de compuestos de bajo peso molecular que interfieren en el ensayo de proteasas.

Se ha encontrado que la capa de aleuroan de trigo contiene gran cantidad de material de bajo peso molecular que muestra reacción positiva con el TNBS. Esto dió como resultado que se obtuvieron lecturas de densidad óptica extraordinariamente altas en los blancos, impidiendo la obtención de determinaciones confiables en la actividad enzimática. Así que fue necesario buscar una técnica que eliminara estos compuestos de bajo peso molecular que interferían.

Los requisitos esenciales del método eran: alta eficiencia, recuperación cuantitativa de proteasas, rapidez, y que no provocara inactivación ni dilución de la enzima. Estos requisitos no los

alacanzan las técnicas normales de diálisis, ni de filtración molecular, debido a que consumen mucho tiempo y provocan una dilución inaceptable del extracto enzimático. Así pues, se desarrolló una técnica cromatográfica en minicolumnas de Sephadex G-25, que evitó estas desventajas y reunió los requisitos antes mencionados.

Aunque se adoptó el método descrito por Feller (1977), fue necesario realizar un gran número de experimentos con el fin de obtener las condiciones óptimas para el sistema, como son: capacidad de la columna, velocidad de centrifugación, tiempo de equilibrio, etc. Estos experimentos se llevaron a cabo usando soluciones de glicina al 0.002 % y caseína al 0.1 %. Esto sirvió para determinar la eficiencia de eliminación de aminoácidos y la de recuperación de proteínas, bajo diferentes condiciones de centrifugación, etc. Se muestran los resultados más importantes en la tabla 3.1 .

Se observó que lavando la columna, o sometiendo a dos centrifugaciones, se aumentó la contaminación del eluido con aminoácidos, sin mejorar la recuperación de proteína. Bajo las condiciones experimentales adoptadas finalmente (secc. 2. 10.) se optimizó el volumen de extracto purificado, se obtuvo un alto rendimiento de proteínas, y se retuvieron más del 90 % de los aminoácidos en la matriz de la columna. La variación en la recuperación de proteínas se resolvió mediante el uso de un marcador interno de  $^{14}\text{C}$  - ovalbumina metilada como se describió en la sección 2.11.

Substancia	Volúmen de carga de la columna.	Velocidad de la 1a. centrifugación.	Lavado.	Velocidad de la 2da. centrifugación.	% de recuperación.
Caseína	1 ml	4,000	1 ml	4,000	74 a 89
Glicina	1 ml	4,000	1 ml	4,000	23 a 36
Caseína	1 ml	4,000	- - -	7,000	68 a 89
Glicina	1 ml	4,000	- - -	7,000	19 a 30
Caseína	1 ml	4,000	- - -	4,000	82 a 92
Glicina	1 ml	4,000	- - -	4,000	7 a 19
Caseína	1 ml	4,000	- - -	- - -	76 a 91
Glicina	1 ml	4,000	- - -	- - -	5 a 10
Caseína	2 ml	4,000	- - -	- - -	84 a 90
Glicina	2 ml	4,000	- - -	- - -	5 a 8

Tabla 3.1. Condiciones experimentales para la purificación parcial del extracto enzimático en mini-columnas de Sephadex G-25.

### 3.3. pH óptimo de actividad proteolítica inducida por el ácido giberélico.

En la figura 3.2. se muestra el cambio en actividad proteolítica del extracto enzimático crudo al variar el pH. Solamente se observó un pico de actividad con valor máximo de pH de 3.5. La(s) enzima(s) inducida(s) por AG<sub>3</sub> fue completamente inactiva a pH superior al punto neutro. Esta última observación permitió detener la reacción enzimática durante el ensayo transfiriendo alícuotas de la mezcla de reacción a la solución amortiguadora de pH 9.0 y manteniéndola a 4 °C. (secc. 2.12.). En base a este estudio se utilizó un pH de 3.5 para todos los ensayos subsecuentes de actividad proteolítica.

### 3.4. Determinación de Km.

El cambio en la velocidad de reacción de la actividad proteolítica a diferentes concentraciones de N,N'-dimetilhemoglobina se presenta en la figura 3.3. La actividad enzimática siguió una curva típica de Michaelis-Menten, llegando a su saturación alrededor de 1.0, % de concentración de sustrato. Sin embargo, no fue posible emplear esta concentración de N,N'-dimetil hemoglobina en los ensayos de actividad proteolítica rutinarios debido a la precipitación subsecuente del exceso de sustrato a pH 9.0 en presencia de TNBS. Este problema de solubilidad de la N,N'-dimetil hemoglobina a altos valores de pH no se observó con una concentración del sustrato de 0.1 %, la cual fue empleada en todos los ensayos enzimáticos. Para

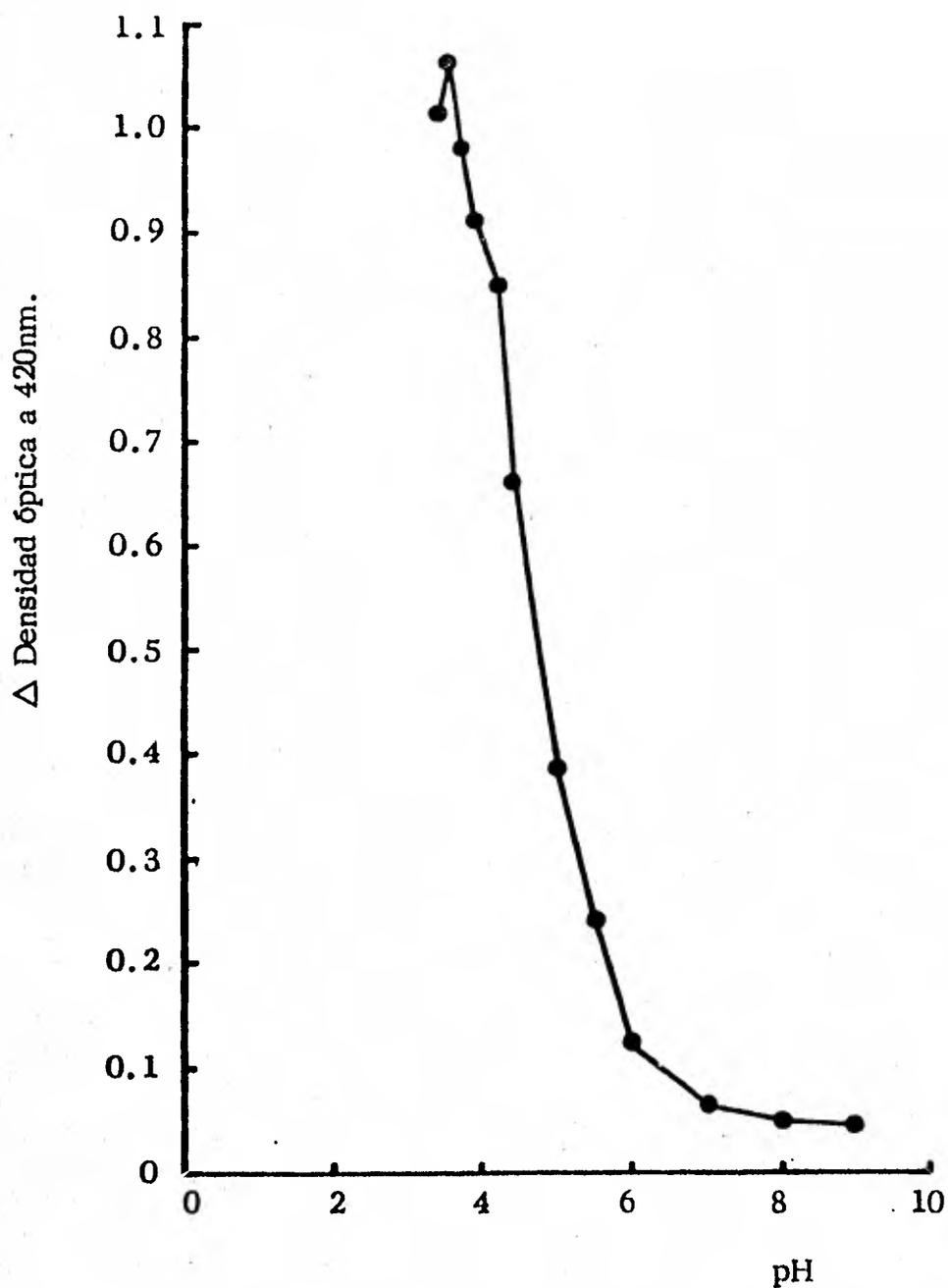


Fig. 3.2. Cambio de actividad proteolítica (expresada como  $\Delta$  D. O. <sub>420</sub> /unidad de tiempo) a diferentes pH de la mezcla de reacción. Los resultados son los valores promedio de cuatro determinaciones de experimentos separados.

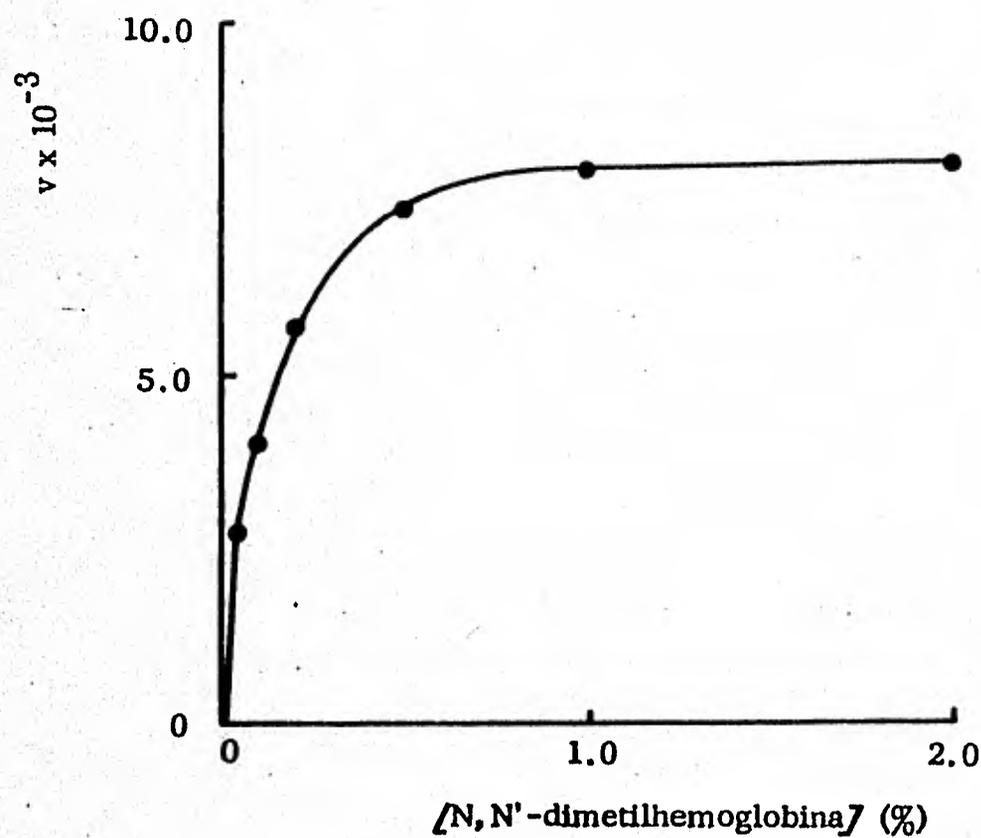


Fig. 3.3. Curva de Michaelis-Menten : (tasa de actividad proteolítica contra la concentración de substrato). Los resultados son el promedio de varias determinaciones.

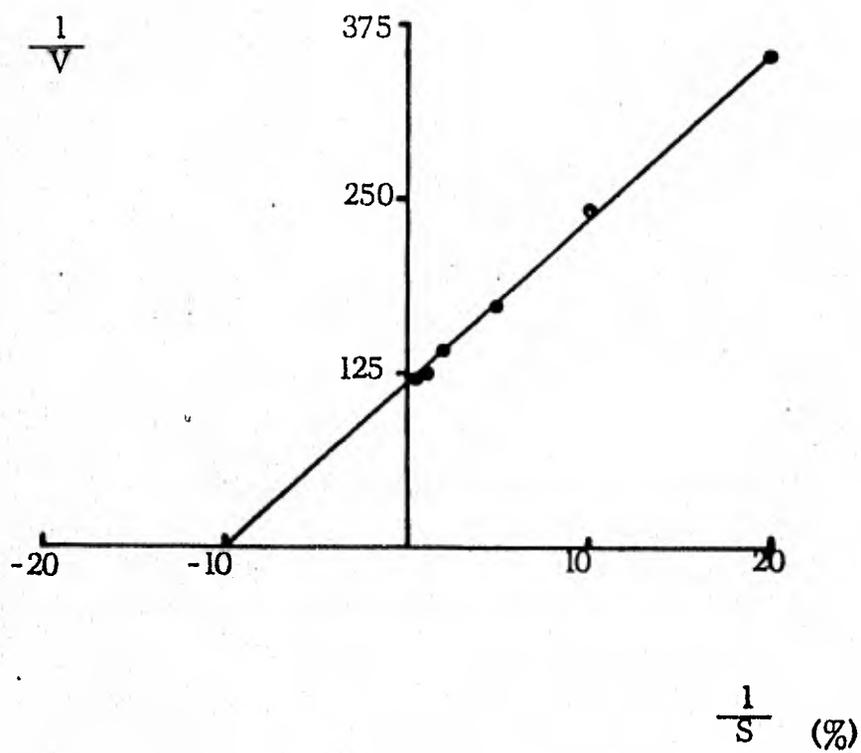


Fig. 3.4. . Gráfica doble recíproca de Lineweaver-Burk.

Determinación de  $K_m$  y Velocidad máxima.

determinar la  $K_m$  y la velocidad máxima del extracto enzimático se trazó una gráfica, doble recíproca de Lineweaver-Burk, obteniéndose valores para  $K_m$  y  $V_{max}$  de 0.102 % y 0.008  $\Delta D.O._{420} / \text{min.}$ , respectivamente. (Fig. 3.4.)

### 3.5. Inducción hormonal de la actividad proteolítica en la capa de aleurona de trigo.

La actividad proteolítica de la capa de aleurona de trigo permanece baja en ausencia de  $AG_3$ ; se observó un incremento significativo de actividad durante las primeras 24 horas de incubación (fig. 3.5.). Este bajo nivel de proteasa, formada independientemente de  $AG_3$ , quizá sea requerido para mantener la poza de aminoácidos del tejido, la cual se sabe aumenta gradualmente en ausencia de la hormona (Chittenden y col., 1978).

El  $AG_3$  produjo un dramático aumento en la actividad proteolítica de la capa de aleurona; siendo 4.5 veces mayor que la actividad del tejido control después de las 24 horas de incubación. Este incremento de actividad producido por efecto de  $AG_3$ , pudo apreciarse después de las 6 horas de incubación y alcanzó un máximo a las 30 horas. Después de este tiempo la tasa de autodegradación de la enzima fue mayor que su tasa de síntesis, y por lo tanto, la actividad proteolítica siguió disminuyendo hasta las 48 horas de incubación. Ya se ha reportado una disminución similar en la tasa de formación de alfa-amilasa después de las 30 horas de incubación (López T., 1981). Esta formación de actividad de proteasa inducida por  $AG_3$  en capa de aleurona de

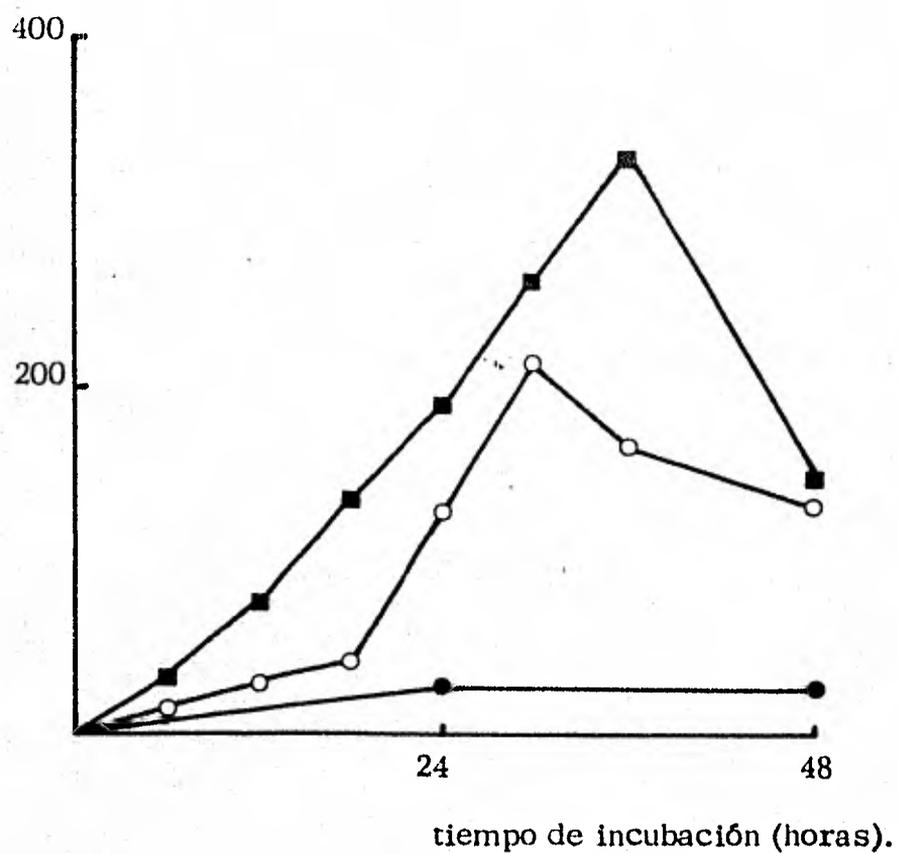


Fig. 3.5. Actividad proteolítica en capa de aleurona de trigo. cada uno de los valores que se presenta es la media de varios experimentos.

- control (ausencia de AG<sub>3</sub>)
- incubaciones con AG<sub>3</sub>
- incubaciones con AG<sub>3</sub> y etileno.

trigo es semejante a la reportada por Jacobsen y Varner (1967) para la cebada.

El etileno elevó la formación de proteasa inducida por  $AG_3$  en la capa de aleurona (fig 3.5. ). Este efecto promotor del gas fue evidente desde las primeras horas de incubación, indicando que el etileno es capaz de actuar desde los primeros eventos involucrados en la respuesta del tejido al  $AG_3$ . Además, el etileno prolongó el período de máxima actividad proteásica desde 30 a 36 horas; mostrando que el gas es capaz de estimular y mantener una tasa mas alta de la formación de proteasa, dentro de las células de aleurona, que el  $AG_3$  sólo. Después de las 36 horas la tasa de producción de la enzima mostró una rápida disminución, esto se debe quizá a la autólisis o inactivación de la enzima, lo cual se corrobora por la disminución de actividad enzimática total. Estas observaciones sobre la interacción sinérgica del etileno y el  $AG_3$  son sorprendentemente similares a las reportadas para la formación de alfa-amilasa en el mismo tejido (López, 1981). Sin embargo, el grado de estimulación de la formación de proteasa por el etileno no fue tan grande como para la alfa-amilasa. Mientras que la alfa-amilasa es muy estable bajo las condiciones de incubación empleadas en este trabajo, la proteasa no lo es.

El ABA inhibió la formación de proteasa inducida por el  $AG_3$  en capa de aleurona de trigo. (tabla 3.2.) La inhibición completa se alcanzó con ABA (mezcla racémica)  $10^{-4}$  M, mientras que con una concentración  $10^{-5}$  M de ABA (mezcla racémica) se encontró una inhibición total de la síntesis de alfa-amilasa, concentración que no fue lo suficientemente efectiva para lograr la inhibición completa

	UNIDADES DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA										
	T	R	A	T	A	M	I	E	N	T	O
	Control	AG <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M	ABA 10 <sup>-5</sup> M AG <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M	ABA 10 <sup>-4</sup> M AG <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M	cordicepina AG <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M	cicloheximida AG <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M					
0 horas	6.78	---	---	---	---	---					
24 horas	29.9	128.8	36.5	26.2	10.6	38.5					
48 horas	29.3	132.9	56.6	29.3	41.4	35.3					

Tabla 3.2. Efecto de ABA, cordicepina y cicloheximida sobre la actividad proteolítica inducida con AG<sub>3</sub> en la capa de aleurona de trigo.

Los resultados son la media de varias determinaciones.

de la formación de proteasa (López T, 1981; Gómez, 1982). La síntesis de alfa-amilasa y proteasa inducidas por  $AG_3$  presentan distintas sensibilidades al ABA. No se observó ningún efecto del ABA sobre la actividad proteolítica no dependiente de  $AG_3$ .

La cordicepina y la cicloheximida, inhibidores de la transcripción y traducción respectivamente, lograron inhibir completamente el efecto de  $AG_3$  (Tabla 3.) Esto podría indicar que la formación de proteasa inducida por  $AG_3$  en capa de aleurona de trigo es debida a una síntesis de novo de la enzima y que el  $AG_3$  puede estar actuando a nivel de transcripción para controlar la síntesis de proteasa por este tejido.

Mientras que para la formación de alfa-amilasa inducida por  $AG_3$  en capa de aleurona de cereales hay un requerimiento absoluto de calcio, este requisito no fue observado para la formación de proteasa; ya que se encontraron las mismas cantidades de actividad proteolítica cuando la enzima fue inducida en presencia de calcio, que cuando este elemento fue omitido del medio de incubación.

Todas las determinaciones de actividad proteolítica reportadas en esta sección fueron sometidas a análisis de variancia y a la prueba de rango múltiple de Student-Newman-Kuels para diferencias significativas. Todos los efectos de las hormonas, inhibidores, etc., descritos anteriormente fueron significativos a  $P = 0.01\%$  o valores menores.

### 3.6. Purificación de proteasas.

Como se describió en la sección 2.18. se realizó la purifi-

cación de proteasas aisladas de semillas germinadas y de aleuronas inducidas con  $AG_3$ , por medio de cromatografía de afinidad. La primera fuente de proteasa (semilla germinada) fue utilizada simplemente como una prueba del sistema experimental y para resolver problemas del diseño experimental. Una vez desarrollado el sistema con esta fuente de enzimas, relativamente abundantes, se llevaron a cabo las investigaciones con las proteasas inducidas por  $AG_3$  en la capa de aleurona.

El patrón de elución de proteínas extraídas de la capa de aleurona de trigo se muestra en la fig 3.6. El primer pico eluido con solución amortiguadora de pH 5.2 corresponde a las proteínas que no tienen afinidad para la hemoglobina y que no fueron retenidas por la columna. El segundo pico eluido con solución amortiguadora de pH 3.0 corresponde a las proteínas que se habían retenido en la columna.

Al medir la actividad proteolítica de cada pico se encontró que la columna había retenido cerca del 90 % de la actividad proteolítica total, lo cual coincide con lo reportado por Chua (1969) para este mismo sistema. El 10 % restante de la actividad proteolítica fue localizada en el primer pico. Si se pasa una vez mas la fracción de este pico, a travez de la columna, se vuelve a retener un 90 % de la actividad total aplicada por el complejo Sepharos 4B-hemoglobina, actividad que es elufda posteriormente al aplicar la solución amortiguadora de pH 3.0. Por lo anterior se sugiere que la retención del 90 % de la actividad proteolítica total por la columna, no se debe a la

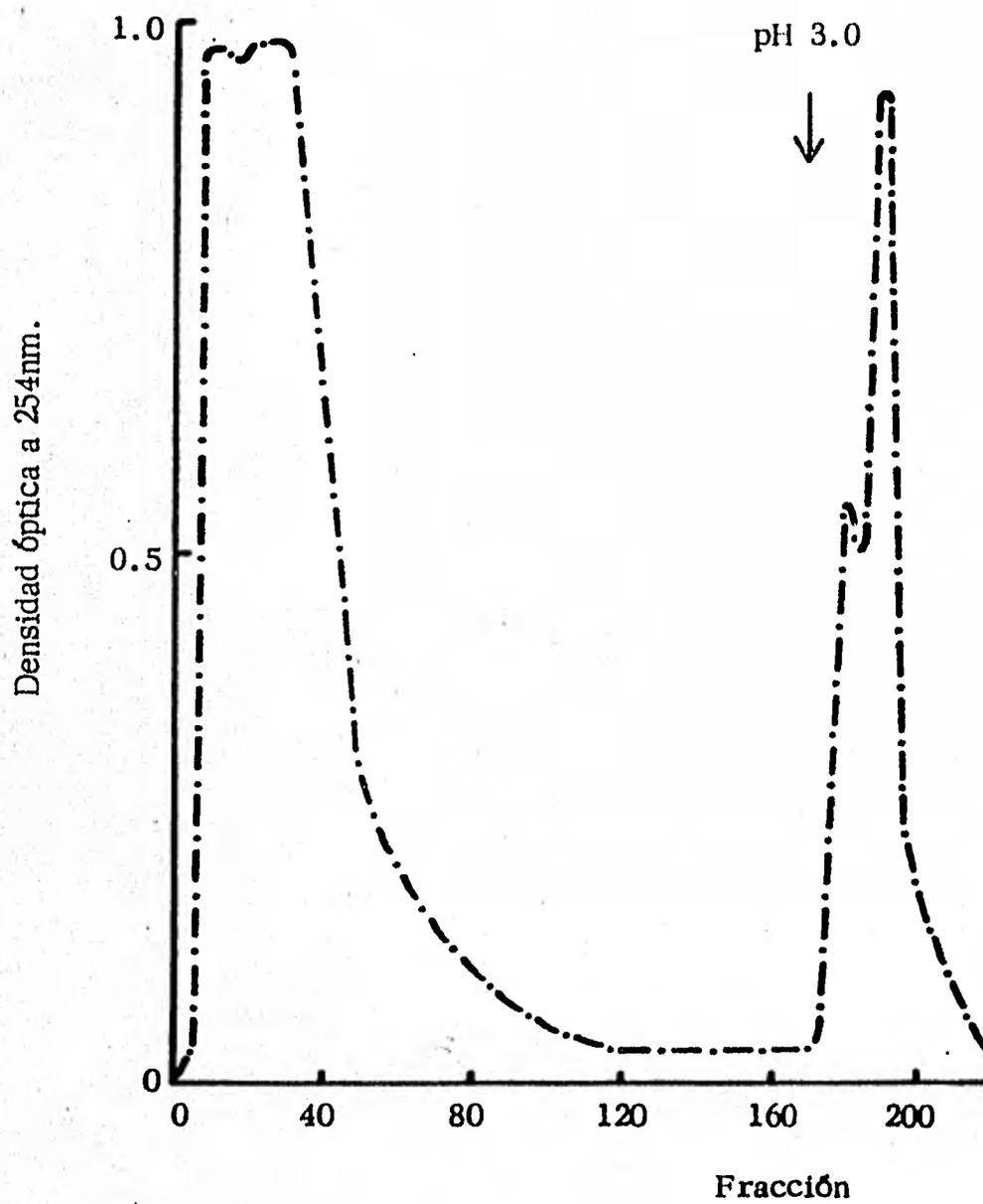


Fig. 3.6. Perfil de elución de proteínas de la columna de Sepharosa 4B-hemoglobina.

saturación de los sitios de unión; sino que es una característica de este sistema de cromatografía de afinidad. Estas observaciones se confirman con los hallazgos de Burger (1973).

La determinación de actividades específicas para los picos de la columna, demostraron que el paso por la columna aumentó 10 veces la pureza de la proteasa. Actividades específicas semejantes fueron encontradas con preparaciones de la proteasa que no habían sido sometidas a la purificación parcial por precipitación con sulfato de amonio; lo cual indica que este paso previo, no es necesario para la purificación de proteasas de la capa de aleurona por cromatografía de afinidad.

### 3.7. Determinación del punto isoeléctrico de proteasas por electroenfoque.

Se utilizaron muestras purificadas de proteasas para determinar sus puntos isoeléctricos. Al realizar el electroenfoque analítico en geles de acrilamida, se producía una zona difusa en lugar de una o más bandas definidas. Esto no fue una falla debida al sistema de electroenfoque, ya que preparaciones de enzimas no purificadas y muestras obtenidas del primer pico de la columna de cromatografía de afinidad, produjeron bandas angostas y claramente definidas. Se atribuye el problema a la presencia de péptidos de hemoglobina eluidos de la columna junto con las proteasas (Burger, 1973). La determinación de los puntos isoeléctricos no se pudo realizar por este método. Después del vano intento del sistema analítico,

se cambió al electroenfoque preparativo, método en el cual las proteasas pudieron ser detectadas por su actividad proteolítica, en lugar de la técnica de tinción general de proteínas. En la fig. 3.7. se muestra la distribución de actividad proteolítica de un extracto no purificado, en un gel de electroenfoque preparativo en función del gradiente de pH. La actividad proteolítica se distribuyó sobre un amplio rango de pH (4.5 a 6.0), indicando la posible existencia de varias isoenzimas. La máxima actividad fue observada alrededor de pH 5.2-5.4. Una vez determinada la amplitud aproximada de la zona de pH para el electroenfoque de la actividad proteolítica, inducida por  $AG_3$  en un gel de rango amplio de pH, se hizo una determinación más precisa del punto isoeléctrico en un gradiente de pH de 3.5 - 7.5. En la figura 3.8. se ilustra la distribución de la actividad proteolítica en ese gradiente de pH. Nuevamente la actividad enzimática se distribuyó entre pH 4.5 y 6.0 con una actividad máxima a pH 5.5. Se concluyó que la isoenzima mayoritaria inducida por  $AG_3$  tiene un pI entre 5.2 y 5.6.

### 3.8. Determinación del peso molecular de proteasa y alfa-amilasa inducidas por el $AG_3$ .

Los métodos normales de determinación de peso molecular de proteínas en geles de poliacrilamida- SDS y la tinción con azul brillante de Coomassie, no pudieron emplearse en este trabajo, debido a la contaminación de la proteasa purificada con péptidos de hemoglobina. Por lo tanto fue necesario marcar radioactivamente la proteasa inducida con  $AG_3$ . Esto se hizo incubando las capas de aleurona

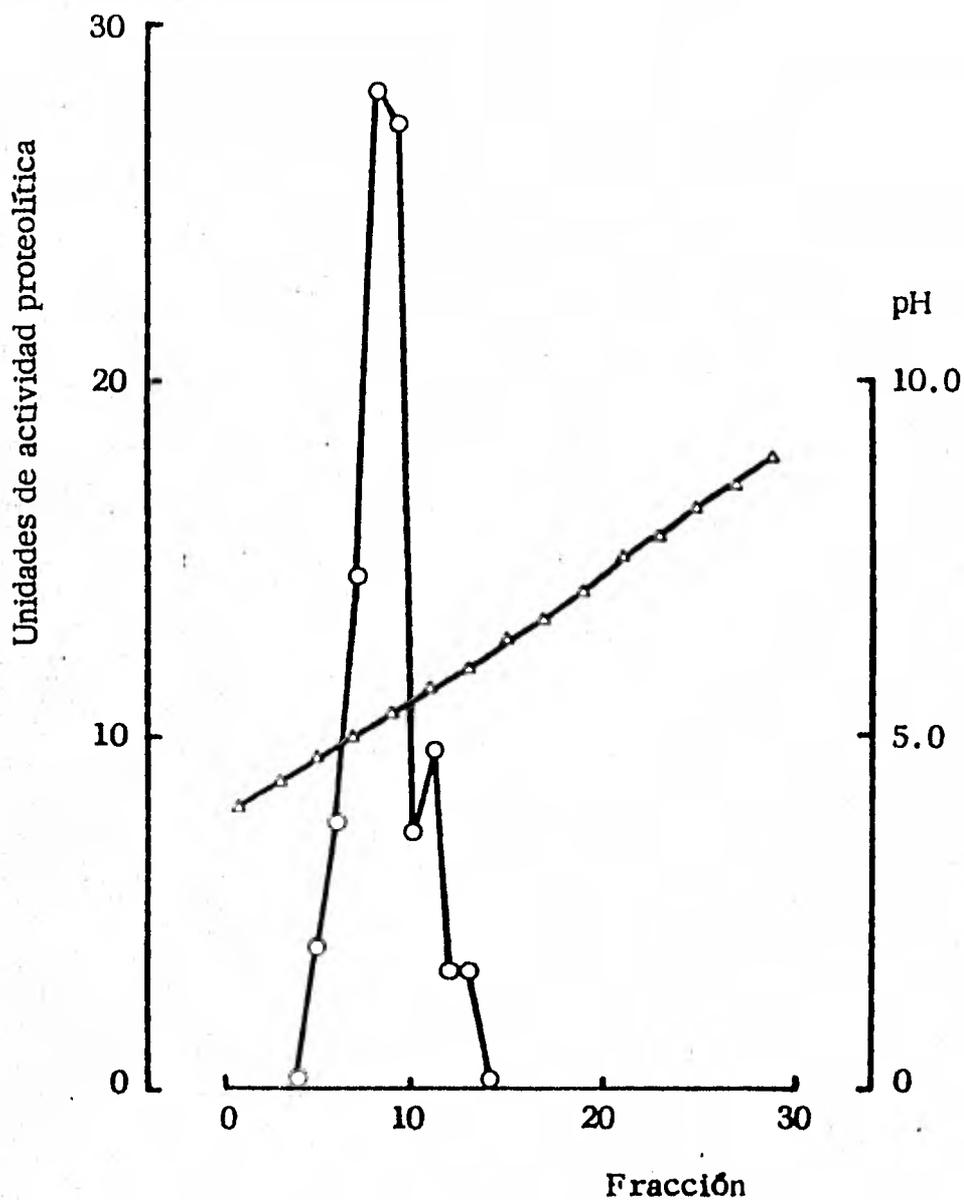


Fig. 3.7. Determinación del punto isoeléctrico de la proteasa inducida por AG<sub>3</sub> en capa de aleurona de trigo.

El isoelectroenfoque preparativo se llevó a cabo con una mezcla de anfólinas de pH 3.5 a 9.5.

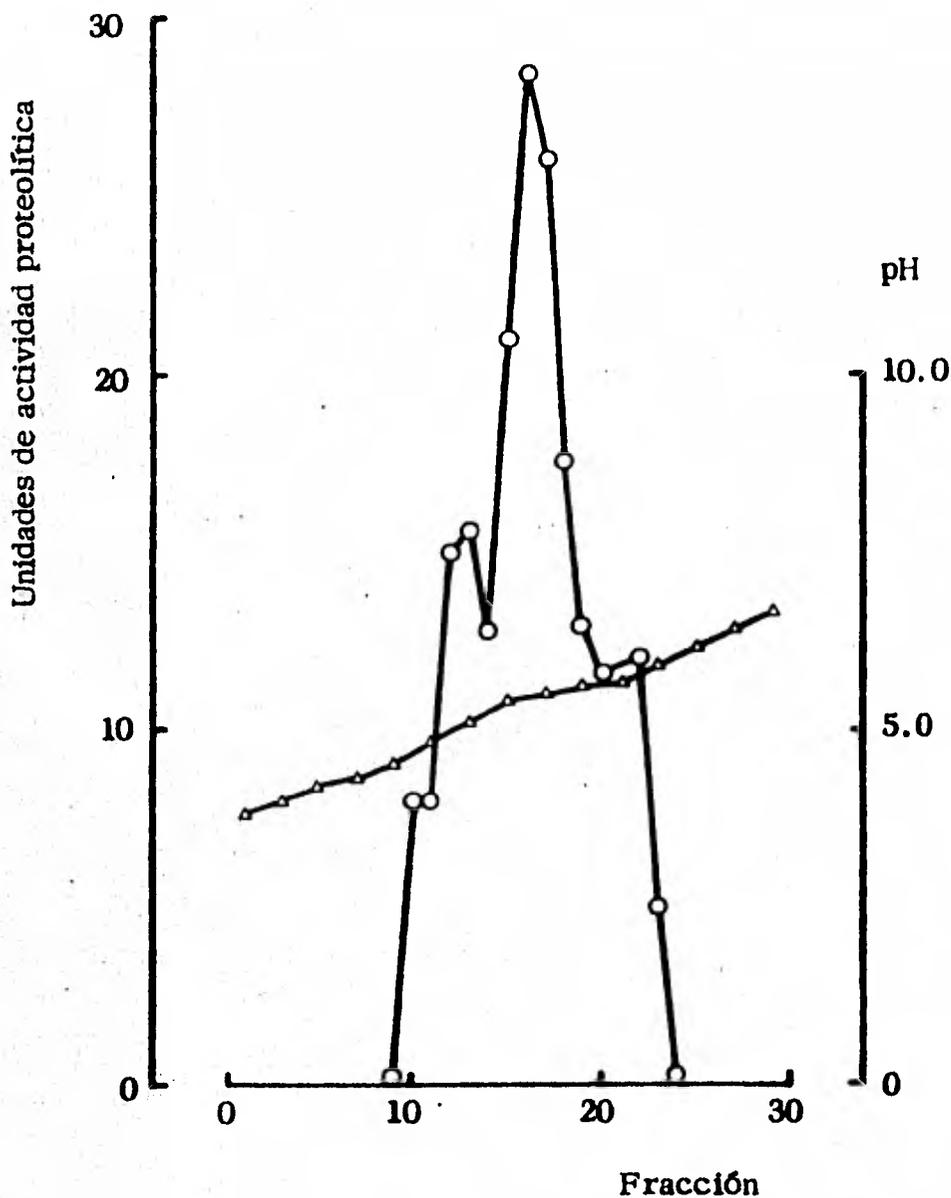


Fig. 3.8. Determinación del punto isoelectrico de la proteasa inducida por  $AG_3$  en capa de aleurona de trigo.

El isoelectroenfoco preparativo se llevó a cabo con una mezcla de anfólinas de pH 3.5 a 7.5.

con <sup>35</sup>S- metionina. La proteasa radioactiva fue purificada por cromatografía de afinidad y su peso molecular se determinó por radioelectroforesis por comparación con proteínas metiladas con C<sup>14</sup>, de pesos moleculares conocidos. El resultado de esta técnica se muestra en la fig. 3.9. Las movilidades relativas de las proteínas patrón fueron calculadas para realizar una curva de calibración, a partir de la cual se pudiera encontrar el peso molecular de la proteasa (fig. 3.10.) El peso molecular de la proteasa, inducida por AG<sub>3</sub> en la capa de aleurana de trigo, encontrado fue de 43,600 daltons.

Este valor de peso molecular de la proteasa es muy semejante a los 42,000 daltons reportados para alfa-amilasa de trigo por Tkachuk y Kruger (1974). Debido a la gran similitud entre estos valores de peso molecular, se decidió determinar el peso molecular de alfa-amilasa de Potam S-70 para confirmar que fue verdaderamente distinto del valor de proteasa. Se utilizó una preparación de alfa-amilasa con actividad específica de 290 U /mg de proteína. Se obtuvo una sola banda por electroforesis en gel de poliacrilamida - SDS, demostrándose así la pureza de la preparación enzimática. Se determinó el peso molecular de esta banda comparando su movilidad relativa con una curva de calibración (fig. 3.11.) El peso molecular calculado para alfa-amilasa fue de 42,000 daltons.

La proteasa inducida por AG<sub>3</sub> parece tener un peso molecular mayor que el de alfa-amilasa por 1,500 daltons. Aunque hay una completa confianza en la diferencia de pesos moleculares entre las dos proteínas, se sugiere se realicen experimentos donde se determine el peso molecular de las dos enzimas simultáneamente.

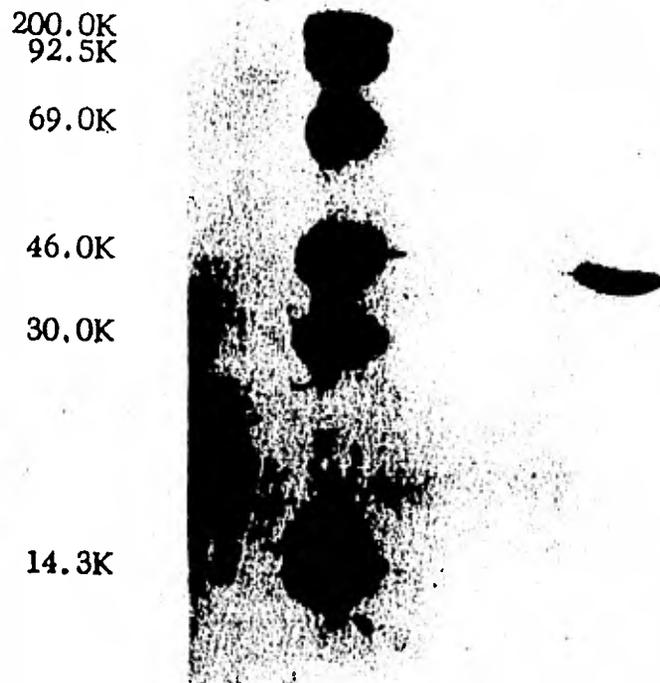


Figura 3.9. Determinación del peso molecular de la proteasa inducida por AG<sub>3</sub> en capa de aleurona de trigo.

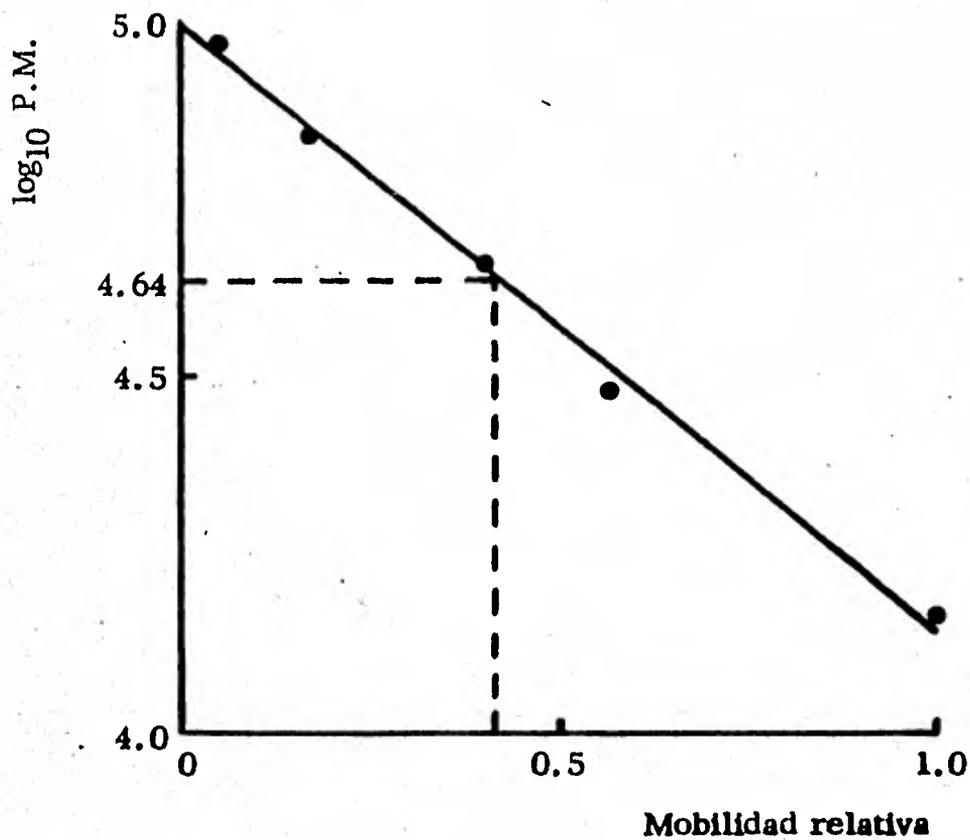


Fig. 3.10. Determinación del peso molecular de la proteasa inducida por AG<sub>3</sub> en capa de aleurona de trigo.

Se presenta la movilidad relativa de la proteasa, comparandola con una curva de calibración preparada con proteínas estándar de peso molecular conocido.

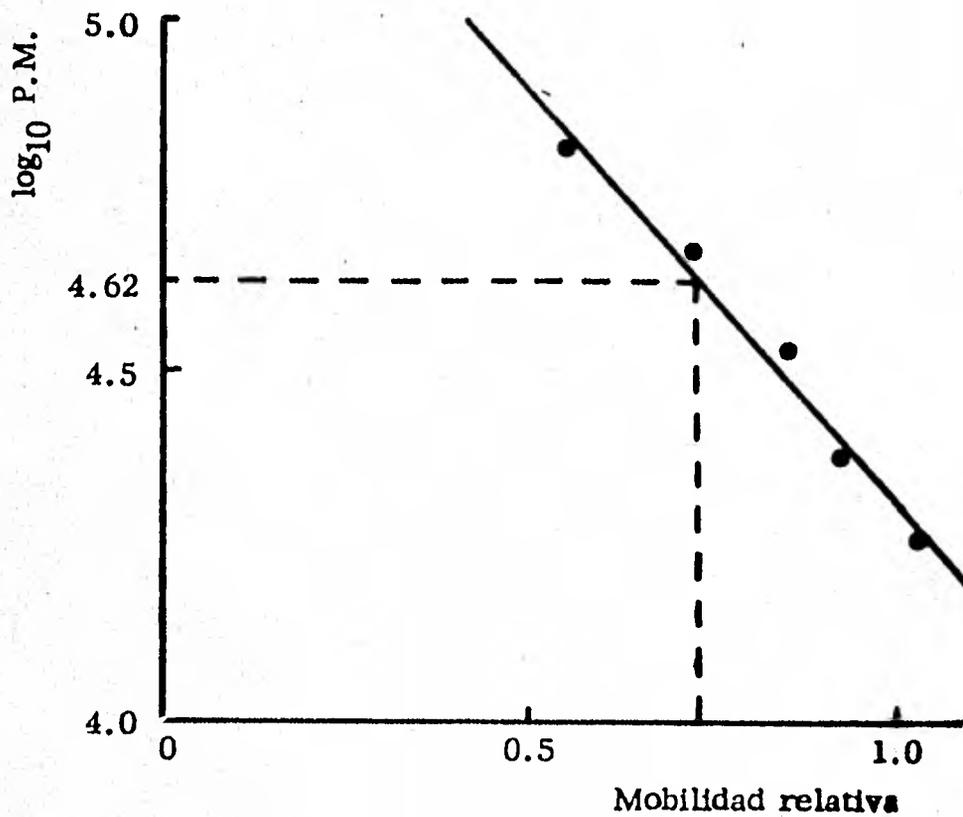


Fig. 3. 11. Determinación del peso molecular de alfa-amilasa de trigo. Se presenta la movilidad relativa de la alfa-amilasa purificada en relación a una curva de calibración preparada con proteínas estandar de peso molecular conocido.

## Conclusiones.

1. - El ácido giberélico induce la formación de proteasa por la capa de aleurona de trigo.
2. - Inhibidores de transcripción y traducción anulan el efecto del ácido giberélico.
3. - Existe un bajo nivel de proteasa en capa de aleurona de trigo, cuya formación es independiente del ácido giberélico.
4. - El ácido abscísico inhibe la formación de proteasa inducida por el ácido giberélico, pero no tiene efecto sobre la enzima sintetizada independientemente del ácido giberélico.
5. - El etileno estimula la velocidad de síntesis de proteasa inducida por el ácido giberélico en capa de aleurona de trigo.
6. - La proteasa inducida por el ácido giberélico es una proteasa ácida, con pH óptimo de 3.5 y  $K_m$  de 0.102 % frente a N, N'-dimetil-hemoglobina.
7. - La proteasa existe en varias formas isoenzimáticas con puntos isoelectricos entre 4.5 y 6. Las isoenzimas principales tienen puntos isoeléctricos de pH 5.2 y 5.6.
8. - El peso molecular aproximado de la proteasa es 43,600 daltons.

## Bibliografía

- Abe, (1977). citado por Ryan y Walker-Simmons en "The biochemistry of plants". (1981). Vol.6. Acad. Press. N.Y.
- Abeles, F.B. (1969), *Plan Physiol.*, 44, 447.
- Abeles, F.B., Forrence, L.E. (1970), *Plant Physiol.*, 45, 395.
- Abeles, F.B. (1972), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 23, 259
- Abeles, F.B. (1973), "Ethylene in plant biology". Academic. Press. N.Y.
- Addicot, F.T., Lyon, J.L., Ohkuma, K. Thiessen, W.E., Carns, H.R., Smith, D.E. (1968), *Science*, 159, 1493.
- Alder-Niessen, (1977), *Process. Biochem.*, 6, 18.
- Barret, A. (1980). *Fed. Proc.*, 39, 9.
- Bennet, P.A., Chrispeels, M.J., (1972), *Plant Physiol.*, 49, 445.
- Berlyn. (1972), citado por Koslowsky en "Seed biology". Vol II, (1972), Academic Press. N.Y.
- Bernal, L.I., Hamabata, A., Blanco, A., Varty, K. (1978), *Plant Physiol.*, 61, S-111.
- Bonner, W., Lasky, R, (1974), *Eur. J. Biochem.* 46, 83.
- Briggs, D.E., (1963), *J. Inst. Brew.* 69, 13.
- Briggs, D.E., (1964), *J. Inst. Brew.* 70, 14.
- Briggs, D.E., (1967), *J. Inst. Brew.* 73, 361.
- Burger, W.C., (1973), *Plant Physiol.*, 51, 1015.
- Chrispeels, M.J., Varner, J.E. (1966), *Nature*, 212, 1066.
- Chrispeels, M.J., Varner, J.E. (1967a), *Plant Physiol*, 42, 398.
- Chrispeels, M.J., Varner, J.E. (1967b), *Plant Physiol*, 42, 1008.
- Chrispeels, M.J., Varner, J.E. (1968),

- Chittenden, C., Laidman, D.L., Ahmad, N., Jones, W. (1978)  
Phytochem., 17, 1209.
- Chua, G.K., Bushuk, W. (1969), Bioch. Biophys. Res. Comm. 37, 545.
- Cohen, D., Paleg, L.E. (1967), Plant Physiol., 42, 1288.
- Collins, Jenner, Paleg, L.E. (1972), Plant Physiol., 49, 404.
- Cooper, W.C., Rasmussen, G.K., Rogers, B.J., Reece, P.C., Henry, W.H. (1968), Plant Physiol., 43, 1560.
- Cuatrecasas, P. (1970), J. Biol. Chem., 245, 3059.
- Dashek, W.V., Sing, B.N., Walton, D.C. (1979), Plant Physiol., 64, 43.
- Díaz de León, A.J.L. (1978) Tesis Profesional. Fac. de Quim. UNAM.
- Doig, R.L., Laidman, D.L. (1972), Biochem. J., 128, 88.
- Doig, R.L., Colborne, A.J., Morris, G., Laidman, D.L. (1975), J. Exp. Bot. 26, 387.
- Dunn, E., Brotherton, R. (1971), Analyst, 96, 159.
- Eastwell, K.C., Spencer, M.S. (1982), Plant Physiol., 69, 557.
- Eastwood, D.E., Tavener, R.J.A., Laidman, D.L. (1969), Nature, 221, 1267.
- Eastwood, D.E., Laidman, D.L. (1971b), Phytochem., 10, 1459.
- Enrai, T.M., Mikola, J. (1977), "Peptide transport and hydrolysis" CIBA Foundation Symposium No. 50. p.335. Amsterdam.
- Feller, Soong, Hageman. (1977), Plant Physiol., 59, 290.
- Filner, P., Varner, J.E. (1967), Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 68, 729.
- Gahagan, A.E., Holm, R.E. Abeles, F.B. (1968), Physiol. Plan., 21, 1270.
- Galsky, A.G., Lippincott, J.A. (1969), Plant Cell Physiol., 10, 607.
- Glaziou, K.T., Gayler, K.R., Waldron, J.C. (1968), "Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances". The Runge Press, Ottawa.

- Gómez T, M. (1982), Comunicación personal.
- Gómez T, M., Arreguín L, B., Varty, K. (1980) *Plant Physiol.*, 65, S-142.
- Higgins, T.J.V., Zwar, J.A., Jacobsen, J.V. (1976), *Nature*, 260, 166.
- Ho, D. T., (1978), *Plant Physiol.*, 61, S-111.
- Ho, D. T., (1979), *Plant Physiol.*, 63, S-80.
- Ho, D. T., Abroms , J., Varner, J. E. (1977), *Plant Physiol.*, 59, S-56.
- Ho, D. T., Abroms , J., Varner, J. E. (1982), *Plant Physiol.*, 69, 1128.
- Ho, D. T., Varner, J. E. (1976), *Plant Physiol.*, 57, 175.
- Jacobsen, J.V., Varner, J. E. (1967), *Plant Physiol.*, 42, 1596.
- Jacobsen, J.V. (1973), *Plant Physiol.*, 51, 198.
- Jacobsen, J.V., Zwar, J.A. (1974a), *Proc. Nat. Cereal Sci. USA.* 71, 3290.
- Jacobsen, J.V., Zwar, J.A. (1974b), *Aust. J. Plant Physiol.*, 1, 343.
- Jacobsen, J.V. (1978), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 28, 537.
- Jacobsen, J.V., Higgins, T.J.V., Zwar, J.A. (1980) en "The Plant seed: Development, preservation and germination". Ed. Rubenstein. Academic. Press. New York.
- Jones, R. L. (1968), *Plant Physiol.*, 43, 442.
- Jones, R. L. (1972), *Planta (Berl.)*, 103, 97.
- Jones, R. L. (1973), *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24, 571.
- Lin, Y., Means, G. E., Feeney, R. E. (1969), *J. of Biol. Chem.* 244, 789.
- Lips, S. H., Roth-Bejerano (1969), *Science*, 166, 109.
- López T, P. J. (1981) Tesis Profesional. Fac. de Quim. UNAM.
- López T, P. J., Arreguín L, B., Varty, K. (1978), *Plant Physiol.* 61, S-111.
- Marcus A., Volcani, T. (1966), *Plant Physiol.*, 41, 1167.
- Mayer, A. M., Poljakoff-Mayber, (1978), "The Germination of seeds". Pergamon Press. London.

- Mayer, A.M., Shain, Y. (1974), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25, 167.
- McLeod A.M., Millar, A.H. (1962), *J. Inst. Brew.* 68, 322.
- McLeod, A.M., Palmer, G.H. (1966), *J. Inst. Brew.* 72, 580.
- McLeod, A.M., Duffus, J.H., Horsfall, D.L. (1966) *J. Inst. Brew.* 72, 36.
- Melville y Scandalios. (1972), *Biochem. Genet.*, 7, 15.
- Mendizabal O, C. (1980), Tesis Profesional. Fac. de Química. UNAM.
- Means, G.E., Feeney, R.E., (1968), *Biochemistry*, 7, 2129.
- Mikola, J., Kolehmainen, L. (1972), *Planta*, 104, 167.
- Mikola, J., Enari, T.M. (1970), *J. Inst. Brew.* 76, 182.
- Milborrow, B.J. (1974), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25, 259.
- Ogawa e Inamura. (1965) *Proc. Jap. Acad.*, 41, 842.
- Osborne, D.J. (1973), "Biosynthesis and its control in plants".  
Ed. Milborrow. Acad. Press. pág. 127.
- Osborne, D.J. (1968a), *Soc. Chem. Ind.* 1968, 236.
- Ott y Scandalios. (1976), citado por Ryan y Walker - Simmons en "The  
*Biochemistry of plants*". (1981) Vol. 6. Acad. Press. N.Y.
- Peers, F.G. (1953), *Biochem. J.* 53, 102.
- Paleg, L.G. (1960), *Plant Physiol.*, 35, 293.
- Paleg, L.G. (1961), *Plant Physiol.*, 36, 829.
- Paleg, L.G. (1962), *Plant Physiol.*, 37, 789.
- Pollard, C.J., (1969), *Plant Physiol*, 44, 1227.
- Pomeranz, Y. (1973), *Cereal Chem.* 50, 504
- Popov y Karpilenko (1974), citado por Ryan y Walker-Simmons en "The  
*Biochemistry of plants*". (1981) Vol. 6. Acad. Press. N.Y.

- Preston y Kruger. (1976b), *Plant Physiol.*, 58, 516.
- Radley M. E. (1966), *Nature*, 210, 969.
- Regeimbal, L. O., Harvey, R. B. (1927), *J. Am. Chem. Soc.* 49, 117.
- Rhodes, M. J. C., Wooltorton, L. S. C., Galliard, T., Hulme, A. C.  
(1968), *Phytochem.* 7, 1439.
- Ridge, I., Osborne, D. J. (1970), *J. Exp. Bot.* 21, 720.
- Ridge, I., Osborne, D. J. (1970), *Nature*, 229, 205.
- Riov, J., Monselise, S. P., Kahan, R. S. (1969), *Plant Physiol.*, 44, 631.
- Rowell, E. V., Goad, L. S. (1964), *Biochem J.* 90, 12p.
- Rowell, E. V., Goad, L. S. (1962a), *Biochem. J.* 84, 738.
- Sachs, R. M., Lang, A., Bretz, C. F., Roach. (1960), *Am. J. Bot.* 47, 260.
- Srivastava, B. I. S., Meredith, W. O. S. (1962), *Can. J. Bot.*, 40, 1257
- Taiz, L., Jones, R. L. (1970), *Planta (Berl.)*, 92, 73.
- Tavener, R. J. A., Laidman, D. L. (1972a), *Phytochem.* 11, 981.
- Tavener, R. J. A., Laidman, D. L. (1972b), *Phytochem.* 11, 989.
- Tkachuk, R. J. E., Kruger. (1974), *Cereal Chem.* 51, 508.
- Tomos, A. D., Laidman, D. L. (1979), *Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur.*  
16, 119.
- Treharne, R. J., Stoddert, J. L. (1968), *Nature*, 220, 457.
- Valet, G. (1971), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 9, 491.
- Varner, J. E., Chandra, R. G., Chrispeels, M. J. (1965), *J. Cell and  
Comp. Physiol.* 66 suppl. 55.
- Varner, J. E., Chandra, R. G. (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 52, 100.
- Varner, J. E., Ho, D. T. H. (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71, 4783.
- Varty, K., Laidman, D. L. (1977), *Biochem. Soc. Trans.*, 5, 328.

Weaver, R.J., Pool, R.M. (1969), Jour. Amer. Soc. Agr. Hort. Sci.  
94, 474.

Weaver, R.J. (1980), "Reguladores del crecimiento de las plantas en  
agricultura". Ed. Trillas, México.

Yomo, H. (1960), Hakko Kyokaisky, 18, 600. citado en Chem. Abstracts  
(1961), 55, 26145.