

EFECTO DE DIFERENTES ACIDOS ORGANICOS SOBRE LA DESCARBOXILACION DEL ACIDO GLUTAMICO EN *Chlorella*

M. J. DELGADO, M. D. SUAREZ y E. GARCIA-PEREGRIN

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto de algunos ácidos mono y dicarboxílicos sobre la descarboxilación del ácido glutámico a GABA en suspensiones celulares de *Chlorella fusca*. Los ácidos láctico, propiónico y succínico inducen una clara descarboxilación del ácido glutámico, mientras que el acético y malónico prácticamente no producen ningún GABA. Cuando el ácido malónico 0.01 M se adiciona junto a NaF o succínico a la misma concentración, se observa una disminución en la producción de GABA. Los ácidos láctico y acético a concentración 0.5 M producen una mayor cantidad de GABA que a concentración 0.01 M, mientras que con propiónico y malónico la cantidad de GABA es mayor a menos concentración (0.01 M). Estos resultados parecen sugerir que la descarboxilación del ácido glutámico inducida por ácidos no es un efecto inespecífico.

ABSTRACT

The effect of some monocarboxylic and dicarboxylic acids on decarboxylation of glutamic acid to GABA in cell suspensions of *Chlorella fusca* is studied. Lactic, propionic and succinic acids induce a clear decarboxylation of glutamic acid, whereas acetic and malonic acids produce only a little or no amount of GABA. When 0.01 M malonic acid is added together NaF or succinic acid at the same concentration, a decrease in the GABA production is observed. 0.5 M lactic and acetic acids produce a higher amount of GABA than at the 0.01 M concentration, whereas with propionic and malonic acids the GABA amount is higher at the lower concentration (0.01 M). These results seem to suggest that glutamic decarboxylation induced by acids is not a nonspecific effect.

RESUMÉ

On a étudié l'influence des acides mono et dicarboxyliques sur la décarboxylation de l'acide glutamique á GABA dans les suspensions cellulaires de *Chlorella fusca*. Les acides lactique, propionique et succinique provoquent une claire décarboxylation de l'acide glutamique tandis que

l'acide acetique et l'acide malonique empêchent la production de GABA. L'acide malonique 0.01 M additionné auprès de NaF ou de l'acide succinique á la même concentration diminue la formation de GABA. Les acides lactique et acetique 0.5 M produisent plus GABA que á concentration 0.01 M. Cepedant la quantité de GABA formé dans la presence de l'acide propionique et succinique est plus grand á mesure que leur concentration diminue. Ces resultats suggerent que la decarboxylation de l'acide glutamique n'est pas un effect non specifique.

INTRODUCCION

La presencia del ácido γ -aminobutírico (GABA) en vegetales superiores ha sido consignada desde hace tiempo destacándose la notable proporción en que se halla, siendo uno de los aminoácidos libres en mayor concentración. En los distintos organismos el GABA puede originarse por descarboxilación del ácido glutámico o por transaminación de éste con el semialdehido succínico con formación simultánea de ácido α -cetoglutámico. Sin embargo, el carácter reversible de la segunda reacción frente al irreversible de la primera hace que deba considerarse a la descarboxilación del glutámico como la vía principal y casi exclusiva de formación de GABA.

El metabolismo del ácido γ -aminobutírico ha sido muy poco estudiado en algas. Concretamente en *Chlorella* parece proceder de la descarboxilación del ácido glutámico, tanto en células normales como en extractos liofilizados (1). En *Chlorella pyrenoidosa* se ha observado la inducción por NaF de un brusco desprendimiento de CO_2 a partir de algunos ácidos orgánicos, así como la inhibición por cianuro de esta descarboxilación (2). Asimismo Warburg *et al.* (3) demostraron cromatográfica y manométricamente que el NaF produce un rápido y considerable aumento en la cantidad de CO_2 desprendido, acompañado de una disminución del ácido glutámico, confirmando de esta manera que la reacción descarboxilante del glutámico es la principal vía de formación de GABA en *Chlorella*. Por otra parte se ha demostrado que el glutámico juega un importante papel en las reacciones luminosas de la fotosíntesis, insinuándose una acción cooperativa con la clorofila, el CO_2 y el fosfato (4-8). En 1970, Lane y Stiller (9) indicaron que distintas sustancias y tratamientos podían inducir la descarboxilación del glutámico

endógeno en *Chlorella*, siendo éste un efecto generalizado, no específico. Warburg *et al.* (10) habían llamado a este fenómeno "efecto ácido", explicando la descarboxilación en condiciones anaerobias por una acumulación del ácido láctico formado por fermentación.

En general, el metabolismo anaerobio en algas ha recibido poca atención. Gaffron (11) y Michels (12) demostraron que algunas especies del género *Chlorella* y *Scenedesmus* producen ácidos durante largos periodos de anaerobiosis. De acuerdo con los ácidos principalmente originados, Weis y Mukerjee (13) reconocen tres tipos de fermentación en las algas. En el primero, representado por *C. pyrenoidosa*, solo se produce ácido láctico a partir de glucosa. En el segundo, tipificado por *C. ellipsoidea*, no se produce ningún ácido, mientras que en el tercero de los tipos mencionados los productos de la fermentación son los ácidos láctico y acético. Sin embargo, Syrett y Wong (14) trabajando con *C. vulgaris* que pertenece al último de los grupos reseñados, pusieron de manifiesto la formación de cantidades considerables de ácido fórmico junto al láctico y acético, así como cantidades menores de anhídrido carbónico y de hidrógeno. Posteriormente, Kessler (15) ha estudiado ampliamente el efecto de la incubación en anaerobiosis y en oscuridad sobre las reacciones fotosintéticas en especies de algas con y sin hidrogenasa, poniendo de manifiesto que la inhibición de la producción fotosintética de oxígeno en anaerobiosis es mucho más fuerte en algas sin hidrogenasa que en algas con hidrogenasa.

En un trabajo anterior, nosotros hemos demostrado que las células de *C. fusca* cultivadas en aerobiosis prácticamente no contienen GABA, pero que el NaF 0.01 M induce una clara producción de este ácido, especialmente cuando su presencia se mantiene durante periodos prolongados de tiempo (16). Por otra parte, conocida la formación de ácidos orgánicos como productos finales de la fermentación en *Chlorella*, hemos llevado a cabo el estudio de su posible influencia sobre la reacción catalizada por la glutamato descarboxilasa. En el presente trabajo se pone de manifiesto el efecto de distintos ácidos utilizados a diferentes concentraciones, sobre la producción de GABA en células de *C. fusca*, en un intento de contribuir a la elucidación del mecanismo puesto en juego durante esta reacción, normalmente incrementada en condiciones anaerobias.

MATERIAL Y METODOS

Las experiencias se han llevado a cabo en *Chlorella fusca* Shihira et Kraus 211-15. El alga se cultivó autotróficamente a temperatura ambiente en el medio de cultivo descrito por Vega *et al.* (17) con NO_3K 8 mM como fuente de nitrógeno. El crecimiento celular se determinó normalmente por medida del cambio de absorbancia a 660 nm. Las células se recogieron en fase logarítmica de crecimiento, por centrifugación a 3000 g. Posteriormente se sometieron a dos lavados con el medio de cultivo desprovisto de nitrógeno. Las células recogidas se suspendieron en medio S* de Warburg (3) conteniendo 5 g de $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 2,5 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$. El pH se ajustó a 3,8.

Las reacciones se llevaron a cabo por incubación a 20°C de las suspensiones celulares en presencia de los diferentes ácidos ensayados. La extracción y determinación de los aminoácidos se realizó tal como se ha descrito previamente (16).

RESULTADOS

Efecto de los ácidos láctico, acético y propiónico. Con objeto de estudiar la posible influencia de algunos ácidos monocarboxílicos sobre la producción de GABA, se llevaron a cabo una serie de experiencias con adición de láctico 0.2 M, acético 0.01 M y propiónico 0.01 M, todos ellos en forma de sal sódica y a pH 3,8. Las incubaciones se llevaron a cabo a 20°C durante 3 h. Como se puede apreciar en la Fig. 1, el ácido propiónico produce la mayor cantidad de GABA, acompañada de la desaparición prácticamente total del glutámico. El ácido láctico produce una menor cantidad de GABA, mientras que en presencia de ácido acético no se observa producción alguna de GABA. En la misma Fig. 1 se puede apreciar asimismo la gran formación de GABA en presencia de NaF 0.01 M.

Efecto de los ácidos malónico y succínico. Se ha ensayado la posible influencia de estos ácidos dicarboxílicos a concentración 0.01 M sobre la descarboxilación del ácido glutámico endógeno en *C. fusca*. Las reacciones se llevaron a cabo en condiciones semejantes a las anteriores. La Fig 2 muestra cómo el succínico produce una pequeña concentración de GABA, mien-

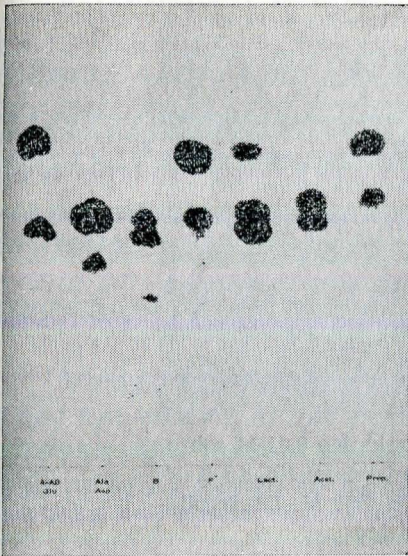


Fig. 1.—Efecto del ácido láctico 0.2 M, ácido acético 0.01 M y ácido propiónico 0.01 M sobre la producción de GABA en suspensiones celulares de *C. fusca*. Desarrollo cromatográfico

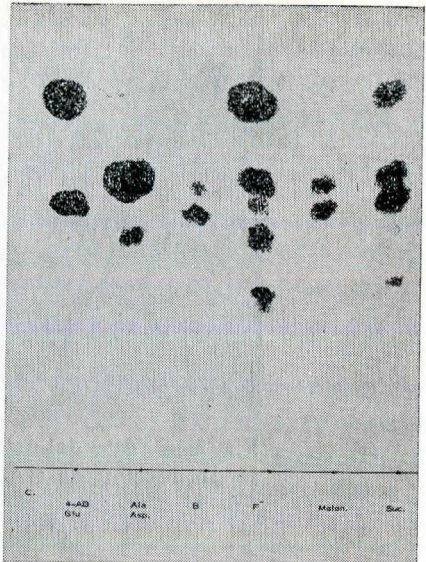


Fig. 2.—Efecto de los ácidos malónico y succínico a concentración 0.01 M sobre la producción de GABA. Desarrollo cromatográfico

tras que en presencia de malónico a la misma concentración no se observa formación alguna de GABA.

Por otra parte, como se aprecia en la Fig. 3, cuando el ácido malónico 0.01 M se suplementa junto al NaF o al ácido succínico a la misma concentración disminuye la formación de GABA debida a estos efectores.

Influencia de la concentración de los ácidos ensayados. Con objeto de investigar la influencia de la concentración de los efectores ácidos ensayados sobre la descarboxilación del glutámico endógeno, se realizaron una serie de experiencias paralelas en las que estos ácidos se adicionaron a las suspensiones celulares de *C. fusca* a concentración 0.01 M y 0.5 M.

Como puede verse en la Fig. 4, el ácido láctico 0.5 M produce una cantidad de GABA muy superior a la observada cuando se adiciona a concentración 0.01 M. Un efecto semejante se observa con el ácido acético. Sin embargo el ácido propiónico

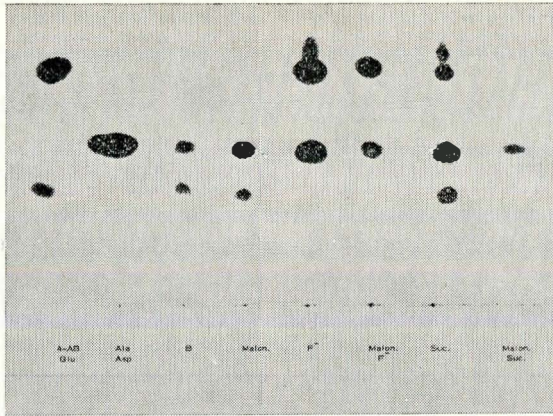


Fig. 3.—Efecto del ácido malónico 0.01 M sobre la producción de GABA en presencia de NaF 0.01 M o de ácido succínico 0.01 M. Desarrollo electroforético

0.5 M no origina prácticamente ningún GABA (Fig. 5), mientras que a concentración 0.01 M sí inducía una fuerte descarboxilación del glutámico.

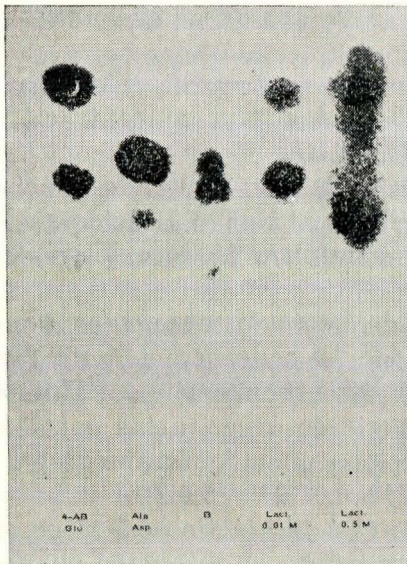


Fig. 4.—Efecto de la concentración de ácido láctico sobre la producción de GABA. Desarrollo cromatográfico

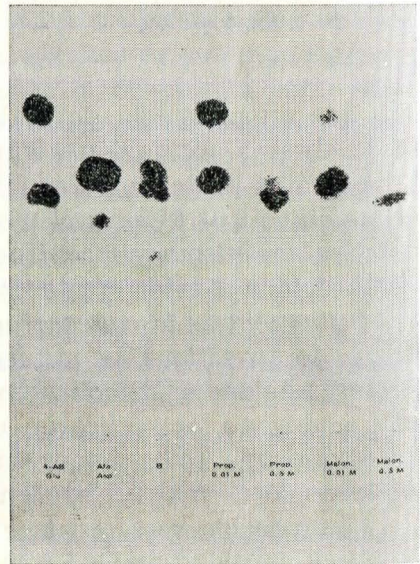


Fig. 5.—Efecto de la concentración de los ácidos propiónico y malónico sobre la producción de GABA. Desarrollo cromatográfico

Anteriormente se indicaba que en presencia de ácido malónico 0.01 M no se observaba ninguna cantidad de GABA. Sin embargo, aumentando considerablemente la cantidad de muestra desarrollada cromatográficamente o electroforéticamente se hace visible una pequeña cantidad de GABA. No obstante, cuando el malónico se adiciona a concentración 0.5 M, no se observa en las mismas condiciones experimentales ninguna formación de GABA.

DISCUSION

Aunque los trabajos sobre el metabolismo anaerobio en algas son escasos, se ha sugerido que las condiciones hipóxicas originan una ligera descarboxilación del ácido glutámico, si bien no se ha puesto de manifiesto actividad glutamato descarboxilasa "in vitro" (9). La descarboxilación que tiene lugar en anaerobiosis tiende a explicarse por un acúmulo del ácido láctico producido durante la fermentación. En este sentido parecía oportuno estudiar la influencia de éste y otros ácidos sobre la descarboxilación del ácido glutámico endógeno, en un intento para establecer una posible inducción del ciclo alternativo del GABA en algas.

Los resultados obtenidos indican una mayor descarboxilación del glutámico por láctico 0.5 M que 0.01 M, es decir, una correlación entre la concentración de láctico suplementado y la formación de GABA. Algo semejante ocurre en el caso del ácido acético. Sin embargo, es muy interesante el efecto del ácido propiónico. Si bien a concentración 0.01 M produce la casi total descarboxilación del glutámico, a concentración 0.5 M no aparece prácticamente ningún GABA, siendo considerable la cantidad de glutámico presente en estas condiciones. Teniendo en cuenta la analogía estructural entre estos efectores ácidos, es difícil explicar su distinto comportamiento sobre la base del "efecto ácido" inespecífico de Warburg (10). Puesto que las experiencias se han hecho a un pH semejante, no puede invocarse un cambio en la protonización ni una diferencia en la influencia que sobre la variación del pH interno presentan estos efectores.

El ácido malónico 0.7 M fue descrito por Lane y Stiller (9) como un poderoso agente descarboxilante del glutámico en C.

pyrenoidosa. Sin embargo en la cepa empleada por nosotros de *C. fusca* no parece producir cantidad alguna de GABA e incluso disminuye la originada por NaF o por succinico. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente por Ugarte (18) en levadura deficiente respiratoria, en la cual el notable acúmulo de GABA observado en condiciones normales desaparece cuando se añade malónico al medio de cultivo. Cuando el malónico se suplementa a concentraciones superiores a 0.005 M, la ausencia de GABA es prácticamente total.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—WARBURG, O. und KRIPPAHL, G.: *Z. Naturforsch.* 11b, 718-727 (1956).
- 2.—BISHOP, N. I. and GAFFRON, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, 28, 35-44 (1958).
- 3.—WARBURG, O., KLOTZSCH, T. und KRIPPAHL, G.: *Z. Naturforsch.* 12b, 622-628 (1957).
- 4.—WARBURG, O. und KRIPPAHL, G.: *Z. Naturforsch.* 13b, 63-65 (1958).
- 5.—WARBURG, O. und KRIPPAHL, G.: *Z. Naturforsch.* 15b, 788-794 (1960).
- 6.—WARBURG, O. und KRIPPAHL, G.: *Biochem. Z.* 346, 418-428 (1967).
- 7.—WARTURG, O. und KRIPPAHL, G.: *Biochem. Z.* 346, 429-433 (1967).
- 8.—WARBURG, O., KRIPPAHL, G. und LEHMANN, A.: *Biochem. Z.* 346, 434-438 (1967).
- 9.—LANE, T. R. and STILLER, M.: *Plant Physiol.* 45, 558-562 (1970).
- 10.—WARBURG, O., GEWITZ, H. S. und VOLKER, W.: *Z. Naturforsch.* 12b, 722-724 (1957).
- 11.—GAFFRON H.: *Biochem. Z.* 280, 337-359 (1935).
- 12.—MICHELS, H.: *Z. Bot.* 35, 241-270 (1940).
- 13.—WEIS, D. S. and MUKERJEE, H.: *Plant Physiol.* 33, Sup. VIII (1958).
- 14.—SYRETT, P. J. and WONG, H. A.: *Biochem. J.* 89, 308-315 (1963).
- 15.—KESSLER, E.: *Arch. Mikrobiol.* 93, 91-100 (1973).
- 16.—DELGADO, M. J., SUAREZ, M. D. y GARCIA-PEREGRIN, E.: *Cuad. C. Biol.* (en prensa).
- 17.—VEGA, J. M., HERRERA, J., APARICIO, P. J., PANEQUE, A. and LOSADA, M.: *Plant Physiol.* 48, 294-299 (1971).
- 18.—UGARTE, M.: Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 1968.