

1828

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

"DETERMINACION DE LA FENILALANINA AMONIO-LIASA EN  
EXTRACTOS DE HOJAS DE CUATRO VARIEDADES DE CA-  
FETO Y EN OTROS TEJIDOS VEGETALES "

Tesis de grado presentada en cumplimiento parcial de los requisitos  
exigidos por la Universidad para optar el título de "Químico " .

Por:

//  
MIGUEL TOBAR CARRIZOSA  
HUMBERTO ZAMORA ESPITIA

Bogotá, D. E. , septiembre de 1982

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO**  
BIBLIOTECA Y DOCUMENTACION

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. Virginia Montes de Gómez  
Directora Académica U. Nacional

Dra. Sielke Sievers  
Directora Asociada, LIQC

JURADOS:

Dr. Gerardo Pérez

Dr. Moisés Wassermann

Dra. Elisabeth López de Leal

T  
163.93  
T 628d

No. 58656 Fac. Ciencias Nat y Mat.  
Ej. I Vol.        Urb.         
Valor \$ 45.000<sup>00</sup> Don. ☒ Can.        Cont.         
Fecha VII-30-01 Recp. I

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Investigaciones sobre la química del café y de los productos naturales L.I.Q.C. de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia en el marco del proyecto Colombo-Alemán sobre la roya del cafeto.

Los autores expresan sus más sinceros agradecimientos :

A las doctoras Virginia Montes de Gómez y Sielke Sievers por su acertada dirección y permanente guía.

Al doctor Marco Quijano Rico, Director del L.I.Q.C. y a la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia por haber puesto a disposición las instalaciones de su laboratorio de Investigaciones.

A la sociedad Alemana de cooperación técnica (G.T.Z.) por su apoyo financiero.

A todo el personal del L.I.Q.C. y en particular a aquellas personas que en una u otra forma contribuyeron en la realización del presente trabajo.



## INDICE GENERAL

|                                                                                                  |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| PAGINA DEL TITULO .....                                                                          | i    |
| PAGINA APROBATORIA .....                                                                         | ii   |
| AGRADECIMIENTOS .....                                                                            | iii  |
| INDICE GENERAL .....                                                                             | iv   |
| INDICE DE TABLAS .....                                                                           | ix   |
| INDICE DE FIGURAS .....                                                                          | xi   |
| INDICE DE GRAFICAS .....                                                                         | xiii |
| INDICE DE APENDICES .....                                                                        | xiv  |
| RESUMEN .....                                                                                    | xv   |
| INTRODUCCION .....                                                                               | xix  |
| <br>                                                                                             |      |
| I. ESTADO ACTUAL DEL TEMA                                                                        |      |
| 1.1 Generalidades sobre el café .....                                                            | 1    |
| 1.1.1 Variedades objeto de estudio .....                                                         | 2    |
| 1.1.1.1 Pruebas de resistencia .....                                                             | 5    |
| 1.2 Función de la fenilalanina amonio-liasa en Mecanismos de<br>resistencia a enfermedades ..... | 5    |
| 1.3 Fenilalanina Amonio-liasa .....                                                              | 7    |
| 1.3.1 Generalidades .....                                                                        | 7    |

|         |                                                                                          |    |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.7   | Acción de la luz sobre la actividad de la PAL .....                                      | 29 |
| 2.3     | Metodología para la determinación de la P.A.L. en café .....                             | 30 |
| 2.3.1   | Toma de muestra .....                                                                    | 30 |
| 2.3.2   | Transporte .....                                                                         | 31 |
| 2.3.3   | Elaboración polvos de acetona .....                                                      | 31 |
| 2.3.4   | Extracción de la PAL .....                                                               | 32 |
| 2.3.5   | Optimización de Condiciones en la extracción enzimática<br>de la PAL .....               | 32 |
| 2.3.5.1 | Protección de grupos sulfihidrilo .....                                                  | 33 |
| 2.3.5.2 | Efecto de la fuerza iónica .....                                                         | 33 |
| 2.3.5.3 | Tiempo de agitación y velocidad de centrifugación .....                                  | 33 |
| 2.3.6   | Medida espectrofotométrica de la actividad enzimática<br>de la PAL .....                 | 34 |
| 2.3.7   | Pérdida de la actividad enzimática de la PAL con el tiempo ..                            | 34 |
| 2.3.8   | Efecto de la temperatura sobre la actividad de la PAL .....                              | 35 |
| 2.3.8.1 | Efecto en primeros y segundos pares de hojas de cafeto .....                             | 35 |
| 2.3.8.2 | Temperatura óptima enzimática .....                                                      | 35 |
| 2.3.9   | Efecto de la concentración de sustrato .....                                             | 36 |
| 2.3.10  | Efecto de la concentración de enzima .....                                               | 37 |
| 2.3.11  | Comparación de la actividad específica de la PAL en<br>cuatro variedades de cafeto ..... | 37 |
| 2.3.12  | Ultrafiltración .....                                                                    | 38 |
| 2.4     | Determinación proteica método de Folin ..                                                | 41 |

|       |                                                                                                                                                             |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| III.  | RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS .....                                                                                                                  | 44 |
| 3.1   | Resultados y discusión de resultados de los ensayos<br>efectuados a partir de discos de papa .....                                                          | 45 |
| 3.1.1 | Efecto de la temperatura y acción de la luz sobre la<br>actividad de la PAL .....                                                                           |    |
| 3.2   | Resultados y discusión de resultados de los ensayos<br>efectuados a partir de hojas de cafeto .....                                                         | 55 |
| 3.2.1 | Efecto de la fuerza iónica en la extracción enzimática<br>de la fenilalanina amonio-liasa. ....                                                             | 61 |
| 3.2.2 | Tiempo óptimo de agitación mecánica para la extrac-<br>ción de la fenilalanina amonio-liasa .....                                                           | 61 |
| 3.2.3 | Efecto del tiempo en la pérdida de actividad de la fe-<br>nilalanina amonio-liasa .....                                                                     | 65 |
| 3.2.4 | Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática<br>de la fenilalanina amonio-liasa. ....                                                             | 67 |
| 3.2.5 | Temperatura óptima para la estimación de la actividad<br>de la fenilalanina amonio-liasa. ....                                                              | 73 |
| 3.2.6 | Comparación de los niveles enzimáticos de la fenilala-<br>nina amonio-liasa en extractos de primeros pares de<br>hojas de cuatro variedades de cafeto ..... | 79 |
| 3.2.7 | Efecto de la concentración del sustrato L-fenilalanina<br>sobre la actividad de la fenilalanina amonioliase. ....                                           | 82 |
| 3.2.8 | Concentración óptima de extracto enzimático .....                                                                                                           | 85 |

## INDICE DE TABLAS

| Tabla No. | Contenido                                                                                                                                                     |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I         | Efecto de la temperatura sobre la actividad de la PAL proveniente de discos de papa previamente sometidos a diferentes . tiempos de exposición luminica. .... | 47 |
| II        | Efecto de la exposición previa de los discos de papa a la luz sobre la actividad de PAL a diferentes temperaturas de reacción. ....                           | 52 |
| III       | Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de la PAL en extractos de primeros pares de hojas de cafeto variedad Caturra ....                               | 62 |
| IV        | Tiempo óptimo de extracción enzimática de la PAL a partir de extractos de primeros pares de hojas de cafeto variedad Caturra. ....                            | 64 |
| V         | Pérdida de la actividad enzimática de la PAL con el tiempo en extractos provenientes de primeros pares de hojas de cafeto variedad Caturra ..                 | 66 |
| VI        | Efecto de la temperatura sobre la actividad de la PAL en extractos de primeros y segundos pares de hojas de cafeto variedad Catura ( Viotá ) ..               | 70 |
| VII       | Efecto de la temperatura sobre la actividad de PAL proveniente de primeros pares d e hojas de cafeto variedad Caturra (Viotá). ....                           | 75 |



|      |                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| VIII | Comparación de niveles enzimáticos de PAL en extractos de primeros pares de hojas de cuatro variedades de cafetos .....                                                                                                | 80 |
| IX   | Efecto de la concentración de L-fenilalanina sobre la actividad de PAL proveniente de extractos de hojas de cafeto primeros pares variedad Catimor A (Chinchiná) .....                                                 | 83 |
| X    | Estandarización de condiciones óptimas de concentración de extracto enzimático para la determinación de la actividad de PAL en primeros pares de hojas de cafeto variedad Catimor A (Chinchiná) .....                  | 87 |
| XI   | Comparación de los niveles enzimáticos de PAL en diferentes fracciones de extractos provenientes de primeros pares de hojas de cafeto variedad Caturra (Viotá) obtenidas con ultrafiltración por amicon 100.000 D..... | 89 |
| XII  | Comparación de los niveles enzimáticos de PAL en diferentes fracciones de extractos provenientes de primeros pares de hojas de cuatro variedades de cafeto obtenidas con ultrafiltración por amicon 300.000 D .....    | 94 |

## INDICE DE FIGURAS

### Figura No.

|   |                                                                                                                    |    |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Esquema de mejoramiento por hibridación , usando el Híbrido de Timor como progenitor resistente a la roya. ....    | 4  |
| 2 | Reacciones principales del metabolismo fenilproponoide .....                                                       | 8  |
| 3 | Esquema de activación de la molécula del fitocromo .....                                                           | 20 |
| 4 | Esquema general de preparación de polvos de acetona .....                                                          | 27 |
| 5 | Fraccionamiento del extracto enzimático de acuerdo al tamaño de sus moléculas. ....                                | 40 |
| 6 | Variación de la actividad de PAL en papa en función de la temperatura .....                                        | 49 |
| 7 | Variación de la actividad de PAL en papa a 25°C en función del tiempo .....                                        | 50 |
| 8 | Determinación de la actividad de la PAL en extractos de hojas de cafeto en presencia de 2-Mercaptoetanol .....     | 58 |
| 9 | Variación de la actividad de la PAL proveniente de extractos de hojas de cafeto en función de la temperatura. .... | 68 |



|    |                                                                                                                                        |    |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 10 | Variación de la actividad de la PAL a 25°C<br>en función del tiempo en hojas de cafeto . . . . .                                       | 69 |
| 11 | Efecto de la temperatura sobre la actividad<br>de la PAL proveniente de primeros pares<br>de hojas de cafeto variedad caturra. . . . . | 74 |

## INDICE DE GRAFICAS

### Gráfica No.

|   |                                                                                                                                                                                                       |    |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Efecto de la temperatura sobre la actividad de la PAL proveniente de discos de papa previamente sometidos a diferentes tiempos de exposición lumínica. ....                                           | 48 |
| 2 | Efecto de la exposición previa de los discos de papa a la luz sobre la actividad de PAL a diferentes temperaturas de reacción.....                                                                    | 53 |
| 3 | Efecto de la temperatura sobre la actividad de la PAL en extractos de primeros y segundos pares de hojas de cafeto variedad Caturra (Viotá). ....                                                     | 71 |
| 4 | Efecto de la temperatura sobre la actividad de PAL proveniente de primeros pares de hojas de cafeto variedad Caturra (Viotá) .....                                                                    | 77 |
| 5 | Efecto de la concentración de L-fenilalanina sobre la actividad de PAL provenientes de extractos de hojas de Cafeto primeros pares variedad Catimor A (Chinchiná) .....                               | 84 |
| 6 | Estandarización de condiciones óptimas de concentración de extracto enzimático para la determinación de la actividad de PAL en primeros pares de hojas de cafeto variedad Catimor A (Chinchiná). .... | 88 |



## RESUMEN

Determinación de la fenilalanina - amonio- liasa en extractos de hojas de cuatro variedades de cafeto y en otros tejidos vegetales.

Dada la importancia de la P.A.L. en el metabolismo fenilpropa- noide y siendo los isoflavonoides un tipo de fitoalexinas derivadas de éste es lógico considerar la P.A.L. dentro del estudio de los facto- res de resistencia ( en el caso concreto del café a la roya Hemileia vastatrix Berk. & Br. ). Dentro de este estudio es fundamental la de- terminación de los niveles endógenos de esta enzima y de los factores que pueden inducir a su actividad, constituyéndose este en el principal objetivo del trabajo.

En hojas de cafeto variedad Caturra hasta el momento solo ha sido posible detectar la presencia de la P.A.L. cuando el extracto se pro- ducía por homogenización directa de las hojas frescas con solución tam- pón en presencia de ácido ascórbico (Martínez et al. 1981), sin que fue- ra posible su cuantificación ; éste hecho dificulta el estudio de su re- lación con la resistencia a enfermedades, máxime cuando no era posi- ble partir de un material homogéneo como lo es el polvo de acetona.

En el presente trabajo se establece una técnica de extracción ba-

sada en el método normal de preparación de polvo de acetona a partir de material vegetal; pero considerando que la P.A.L. puede existir en forma inactiva y que por lo tanto para su determinación es necesario pasarse previamente a una forma activa; además se optimizan parámetros que permitan incrementar su actividad.

Para la preparación de polvo de acetona se utiliza una solución de 2-mercaptoetanol al 1 % V/V en acetona.

A partir de extractos de hojas de café variedad Caturra se estandarizaron los siguientes parámetros y condiciones de extracción P.A.L. fuerza iónica de la solución tampón extractora, tiempo de resuspensión del polvo de acetona en la solución tampón extractora; encontrándose como óptimas para la extracción: Solución tampón de boratos 0.1M pH 8.8 y un tiempo de resuspensión del polvo de acetona de 60 minutos (540 r.p.m.)

En lo referente a los factores que afectan la actividad enzimática se establece:

- La temperatura ejerce un efecto positivo sobre la actividad de la P.A.L. en el intervalo de 25-40°C en extractos provenientes de primeros y segundos pares de hojas de café, siendo mayor este efecto para primeros pares; por lo cual es aconsejable utilizar los polvos de acetona provenientes de primeros pares de hojas de café.



- La enzima no pierde actividad en un período de 4 horas después de obtenido el extracto si este se mantiene a 0°C.
- Al analizar el efecto de la concentración del sustrato (L-fenilalanina) sobre la actividad de la P.A.L., se encuentra que su concentración óptima es 4 mM y que por encima de esta concentración se presenta inhibición.

La fracción proteica que presenta actividad de P.A.L. tiene un peso molecular mayor de 300.000 Daltons.

Al comparar los niveles enzimáticos de la fenilalanina amonio-*lia*-sa en extractos de primeros pares de hojas de cafetos resistentes a la Hemileia vastatrix Berk. & Br. (grupo fisiológico A) como lo son el Híbrido de Timor y el Catimor A y susceptibles ( grupo fisiológico E ) así como el Caturra y el Catimor E ; se encuentra que los niveles mayores los presentan las variedades resistentes obteniéndose en escala descendente respecto a actividad específica total al siguiente orden : Catimor A (53.434  $\mu$ U.A./mg  $P_T$ ) Híbrido de Timor (17.697  $\mu$ U.A./mg  $P_T$ ), Caturra (10.516 U.A./mg  $P_T$ ) y Catimor E (6.772  $\mu$ U.A./mg  $P_T$ ).

La estandarización del método enunciado se efectuó después de demostrarse que no es el tratamiento con acetona el que impide la detección de la actividad de la P.A. L. para esto se prepararon polvos de acetona a partir de discos de tubérculos de papa donde ya se había

detectado y cuantificado la P.A.L. Al mismo tiempo se corroboró el efecto benéfico de la exposición del material vegetal a la acción lumínica hasta por períodos de 32 horas y del aumento de temperatura durante la reacción hasta  $40^{\circ}\text{C}$  , estableciéndose que a períodos mayores se sensibiliza la enzima al efecto desnaturalizante de temperaturas superiores a  $40^{\circ}\text{C}$ .

## INTRODUCCION

## INTRODUCCION

El café es uno de los cultivos más importantes del país cafetero y que un gran porcentaje de su producción es destinada para la exportación. En el departamento de Antioquia, el cultivo de café es el más importante y que genera una gran parte de la economía local. Sin embargo, el cultivo de café enfrenta varios problemas que afectan su producción y calidad. Uno de los principales problemas es la presencia de enfermedades y plagas que afectan a las plantas de café. En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivo general estudiar el comportamiento de las plantas de café frente a las enfermedades y plagas, con el fin de identificar las causas y efectos de estas enfermedades y plagas, y así poder implementar medidas de control y prevención que permitan mejorar la producción y calidad del café en el departamento de Antioquia.

La presente investigación se realizó en el departamento de Antioquia, específicamente en el municipio de Medellín, donde se encuentra el mayor número de plantas de café. El estudio se realizó en un área de 10 hectáreas, donde se cultivan diferentes variedades de café. El estudio se realizó durante el periodo de 2018 a 2020, con el fin de identificar las enfermedades y plagas que afectan a las plantas de café, y así poder implementar medidas de control y prevención que permitan mejorar la producción y calidad del café en el departamento de Antioquia.

Los resultados de la investigación se presentan en el presente trabajo, donde se describe el comportamiento de las plantas de café frente a las enfermedades y plagas, y se identifican las causas y efectos de estas enfermedades y plagas. Los resultados de la investigación se presentan en el presente trabajo, donde se describe el comportamiento de las plantas de café frente a las enfermedades y plagas, y se identifican las causas y efectos de estas enfermedades y plagas. Los resultados de la investigación se presentan en el presente trabajo, donde se describe el comportamiento de las plantas de café frente a las enfermedades y plagas, y se identifican las causas y efectos de estas enfermedades y plagas.

## INTRODUCCIÓN

La roya del cafeto Hemileia vastatrix Berk. & Br. no ha sido detectada en Colombia, pero se encuentra afectando varios países de América Latina.

Debido a que Colombia es un país cafetero y que un gran porcentaje de su economía podría verse afectado por incursión de la roya, la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia por intermedio de su laboratorio de investigaciones sobre la química del café y de los productos naturales (L. I. Q. C.), adelanta un programa de investigación efectuando estudios a nivel bioquímico sobre las causas de resistencia del cafeto a las enfermedades.

La resistencia o susceptibilidad de una planta a un determinado patógeno, y la virulencia o avirulencia de este, son la expresión de la interacción del complejo genético y citoplasmático del hospedero con el del patógeno.

Las fitoalexinas son sustancias de defensa con propiedades antimicrobiales, las cuales son producidas por la planta como respuesta a la infección debida a bacterias, virus, hongos etc.

La producción de fitoalexinas es inducida no solamente por microorganismos vivos, sino también por compuestos de origen microbiano que se han denominado elicitores, o pueden estimularse por diferentes tipos de tratamientos tales como exposición a luz ultravioleta, sales de metales pesados, poliaminas, etileno, inhibidores metabólicos, fungicidas y ribonucleasas.

Las fitoalexinas incluyen varios grupos de sustancias tales como las isoflavonoides las cuales son productos biosíntesis del metabolismo fenilpropanoide en el cual la fenilalanina amonio-liase juega el papel regulador en el paso de la L-fenilalanina a ácido transcinámico. Por consiguiente esta enzima puede jugar un papel importante en los mecanismos de resistencia.

Con el fin de correlacionar los niveles de actividad de la fenilalanina amonio-liase (P.A.L.) entre variedades de cafetos resistentes y susceptibles a las diferentes razas de la roya del cafeto Hemileia vastatrix Berk. & Br este trabajo se propone detectar la enzima y estandarizar la metodología que permita su cuantificación, para luego ver si existe alguna relación entre el contenido de P.A.L. y el grado de resistencia de la planta.

A fin de estandarizar la metodología se utilizará como material patrón tubérculos de papa (Solanum tuberosum var. Andigenum) en los cuales la P.A.L. ha sido ampliamente estudiada.



## CAPITULO I

### ESTADO ACTUAL DEL TEMA

## CAPITULO I

### ESTADO ACTUAL DEL TEMA

#### 1.1 GENERALIDADES SOBRE EL CAFE

El cafeto es un arbusto que pertenece a la familia de las Rubiáceas, al género *Coffea*; dentro del cuál la diversidad de especies es considerable. Sin embargo las comercialmente importantes en el mercado mundial son en su orden:

- *Coffea arábica*
- *Coffea canephora*

##### *Coffea arábica*

A esta especie pertenecen las variedades Típica y Borbón; siendo estas las originalmente cultivadas a partir de las cuales se han obtenido las variedades Caturra, Mundo Novo, Catuai y otras. Pertenecen al grupo fisiológico E y se caracterizan por ser tetraploides ( $2n=44$ ).

##### *Coffea canephora*

En esta especie la variedad Robusta es la comercialmente impor-

tante ; las otras son específicas al lugar de su origen. Se caracterizan por ser diploides ( $2n = 22$ ) y algunas de sus variedades pertenecen al grupo fisiológico A.

### 1.1.1 Variedades objeto de estudio

#### Caturra:

Variedad de la especie Coffea arábica proveniente del estado Minas Gerais del Brasil, la cual se introdujo en Colombia en 1952 y se difundió en la década del sesenta al setenta; especialmente valiosa por el aumento en la densidad de siembra, conllevando ésta a un aumento en la producción. Ha sido comprobado que ésta variedad es susceptible a la mayoría de las diferentes razas de Hemileia vastatrix Berk, & Br.

#### Híbrido de Timor.

Variedad probablemente obtenida por el cruzamiento espontáneo entre las especies Coffea arábica y Coffea canephora, originaria de las islas Timor. Variedad de porte alto, posee el mismo número de cromosomas que el Coffea arábica, es decir es tetraploide ( $2n = 44$ ). Esta variedad no es comercial pero su importancia radica en que posee varios genes de resistencia a las diferentes razas de la roya del cafeto Hemileia vastatrix Berk & Br; ya que hasta la fecha no

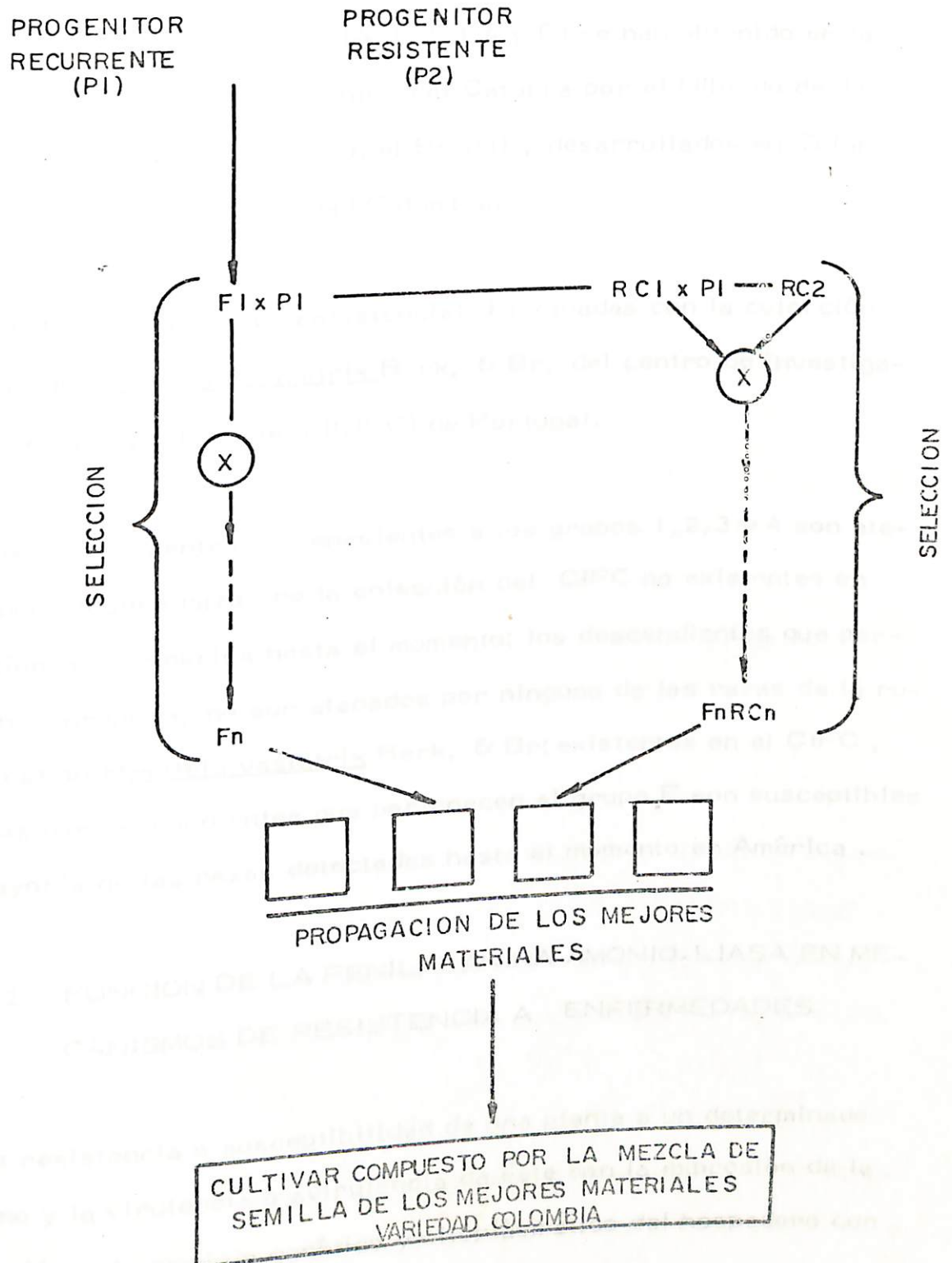
ha mostrado susceptibilidad frente a ninguna de ellas. Pertenecen al grupo fisiológico A.

### Catimor

En la actualidad en Colombia se adelanta un programa de mejoramiento, con el fin de obtener plantas resistentes a las diferentes razas de la roya del cafeto, ya que hasta la fecha se sabe que todas las variedades que se cultivan en Colombia con fines comerciales son susceptibles. Dentro del marco del programa de fitomejoramiento que se realiza en CENICAFE, se están efectuando cruces entre la variedad comercial Caturra y el Híbrido de Timor, que posee un comportamiento agronómico poco favorable pero que es una variedad transferente de resistencia, siendo ésta la alternativa más conveniente. Una vez obtenidos los híbridos, Moreno (1982) ; se continúa con una selección a través de varias generaciones teniendo en cuenta tanto la resistencia a la roya como su nivel de producción, adaptación a zonas cafeteras del país y calidad del grano. El esquema de mejoramiento seguido con el Híbrido de Timor y el Caturra se ilustra en la figura No. 1.

El hongo causante de la enfermedad es un microorganismo con un ciclo de vida de pocas semanas, lo que conlleva a una tasa de mutación alta en comparación con una planta perenne como lo es el cafeto; es necesario que las nuevas variedades mejoradas posean una estructura genética tal que asegure la resistencia contra la mayor cantidad de

# ESQUEMA DE MEJORAMIENTO POR HIBRIDACION, USANDO EL HIBRIDO DE TIMOR COMO PROGENITOR RESISTENTE A LA ROYA



$F_n$  = Generación

$RC_n$  = Recruzamiento



razas de la roya del cafeto por un tiempo lo más prolongado posible.

Seis grupos fisiológicos (A, 1, 2, 3, 4 y E) se han obtenido en la descendencia de los cruzamientos del Caturra por el Híbrido de Timor conocidos como Catimor en el Brasil y desarrollados en Colombia bajo el nombre de variedad Colombia.

1.1.1.1 Pruebas de resistencia: Efectuadas con la colección de razas de Hemileia vastatrix Berk. & Br. del centro de investigaciones de la roya del café (CIFC) de Portugal.

Los descendientes pertenecientes a los grupos 1, 2, 3 y 4 son atacados por algunas razas de la colección del CIFC no existentes en plantaciones de América hasta el momento; los descendientes que pertenecen al grupo A, no son atacados por ninguna de las razas de la roya del café Hemileia vastatrix Berk. & Br; existentes en el CIFC, mientras que descendientes que pertenecen al grupo E son susceptibles a la mayoría de las razas detectadas hasta el momento en América.

## 1.2 FUNCION DE LA FENILALANINA AMONIO-LIASA EN MECANISMOS DE RESISTENCIA A ENFERMEDADES

La resistencia o susceptibilidad de una planta a un determinado patógeno y la virulencia o avirulencia de éste son la expresión de la interacción del complejo genético y citoplásmico del hospedero con

el del patógeno; teniendo en cuenta la acción del medio ambiente sobre : el hospedero, el patógeno y sobre la interacción entre ellos . La reacción de una planta está indicada por el tipo de infección; que da la medida de la virulencia del patógeno y determina la resistencia del hospedero (Browning et al 1981).

Las fitoalexinas son sustancias de defensa con propiedades antimicrobiales las cuales son producidas por la planta como respuesta a la infección debida a bacterias , virus, hongos, etc. (Grisebach et al. 1978) . La producción de fitoalexinas es inducida no solamente por microorganismos vivientes sino también por compuestos de origen microbiano que se han denominado elicitores (Billet et al 1980, Nishizawa et al. 1979) , o pueden estimularse por diferentes tipos de tratamientos tales como exposición al frío, luz ultravioleta, sales de metales pesados, poliaminas, etileno, inhibidores metabólicos, fungicidas y ribonucleasas.

En café se han efectuado ensayos con elicitores obtenidos a partir de aguas de lavado de uredosporas de la roya del cafeto Hemileia vastatrix Berk, & Br. autoclavadas (Beretta et al .1976) , las cuales en ensayos in vivo producen una alta resistencia contra una posterior infección fúngica.

Las fitoalexinas incluyen varios grupos de sustancias tales como los son: isoflavonoídes, sesquiterpenos, poliacetilenos, dihidrofenantrenos, etc. ( Grisebach et al. 1978) , el tipo de fitoalexinas producidas

por una planta esta relacionado con el género de las mismas; las de tipo isoflavonoídico son productos de biosíntesis del metabolismo fenilpropanoide (Smith et al. 1981) , (Figura No. 2) en el cual la fenilalanina amonio-liasa (P.A.L) juega el papel regulador en el paso de la L-fenilalanina a ácido trans-cinámico. Además las actividades de las enzimas son incrementadas por acción de elicitores sobre los tejidos de las plantas.

Ensayos efectuados sobre la germinación de uredosporas de Hemileia vastatrix Berk, & Br. (roya del cafeto) en presencia de derivados del ácido cinámico han mostrado que estas sustancias actúan como inhibidoras germinativos (Stahman et al. 1976).

### 1.3 FENILALANINA AMONIO-LIASA

#### 1.3.1 Generalidades

La fenilalanina amonio-liasa (P.A.L.) enzima involucrada en el metabolismo secundario de las plantas específicamente ubicada en la vía fenilpropanoide (Harborne et al. 1975, Rhodes et al. 1978, Swain et al. 1970, Yoshida, 1969) . (Figura No. 2) , cataliza la desaminación no oxidativa de la L-fenilalanina a sus productos de reacción ácido trans-cinámico y amoniaco (Hanson et al. 1972) , según la reacción.

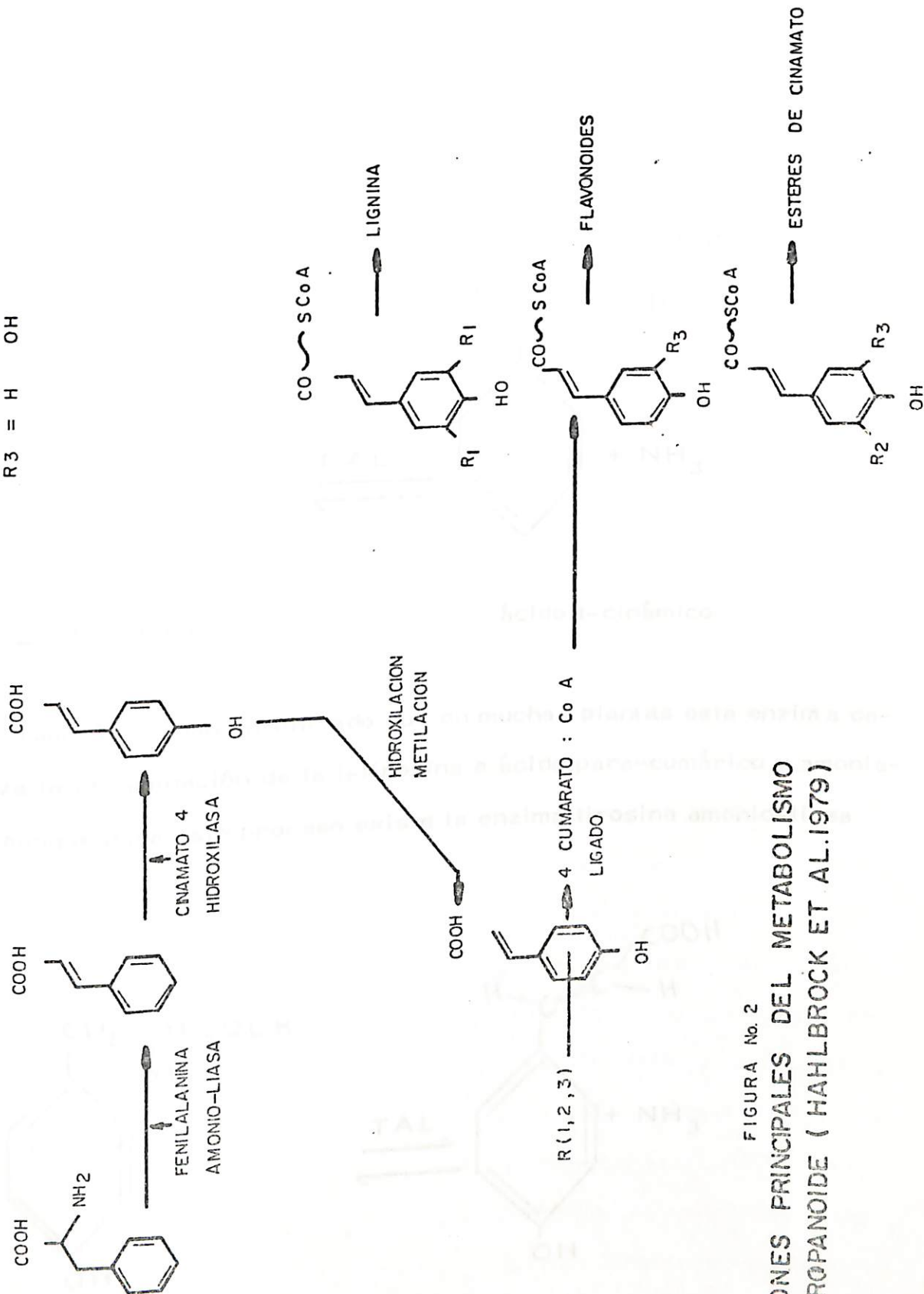
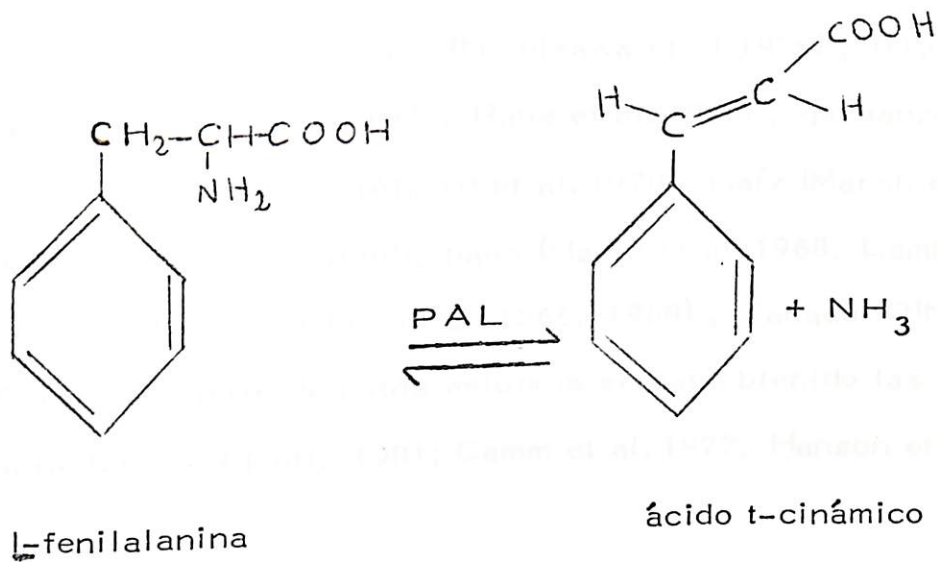
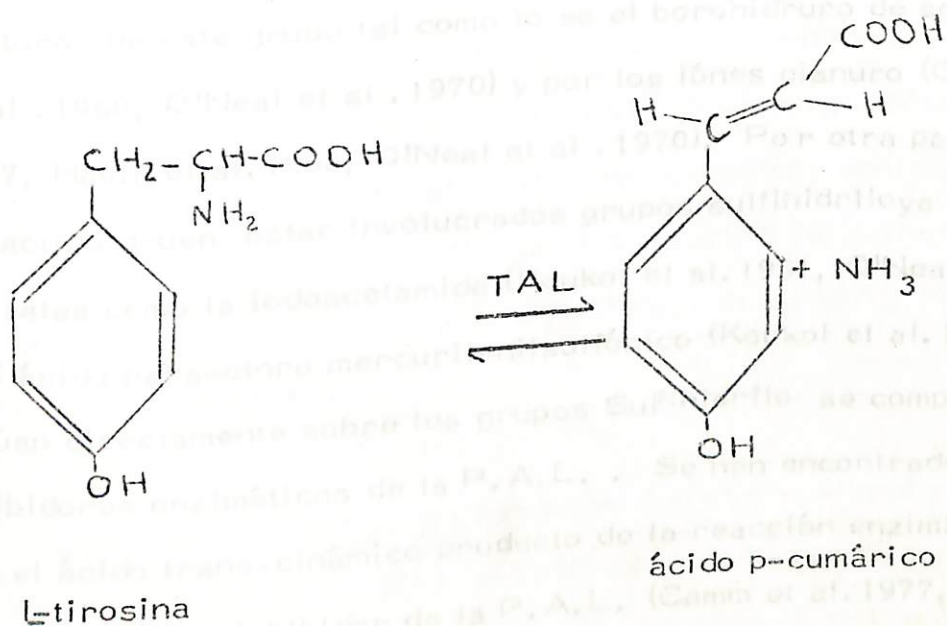


FIGURA No. 2  
 REACCIONES PRINCIPALES DEL METABOLISMO  
 FENIL PROPANOIDE (HAHLBROCK ET AL.1979)





También se han encontrado que en muchas plantas esta enzima cataliza la desaminación de la L-tirosina a ácido para-cumárico y amoníaco; aunque para este proceso existe la enzima tirosina amonio-liasa





La fenilalanina amonio-liasa ha sido estudiada en numerosas especies de plantas (Hollander et al. 1981), dentro de las cuales se citan las siguientes: Espinaca (Nishizawa et al 1979), fríjol (Dixon et al. 1980, Dudley et al. 1979, Rabe et al. 1970), garbanzos (Ahmed et al. 1970), guisantes (Ahmed et al. 1970), maíz (Marsh et al. 1968), mostaza (Acton et al. 1980), papa (Havir et al. 1968, Lamb et al. 1979), Smith et al. 1981, Zucker et al. 1965, 1968), Tabaco (O'Neal et al 1970) etc. A partir de estos estudios se han obtenido las siguientes características (Bell. 1981; Camm et al. 1977, Hanson et. al 1972):

La fenilalanina amonio-liasa es una globulina localizada en glioxisomas, peroxisomas y cloroplastos; siendo su actividad dependiente del genotipo, edad y desarrollo de órganos y tejidos. Es una proteína en cuyo sitio activo se encuentran grupos carbonilo; ya que la enzima es inhibida irreversiblemente en presencia de compuestos reductores de este grupo tal como lo es el borohidruro de sodio (Havir et al. 1968, O'Neal et al. 1970) y por los iones cianuro (Camm et al. 1977, Havir et al. 1968, O'Neal et al. 1970). Por otra parte en el sitio activo deben estar involucrados grupos sulfhidrilo que compuestos tales como la iodoacetamida (Koukol et al. 1961, O'Neal et al, 1970) y el ácido para-cloro mercurifenilsulfónico (Koukol et al. 1961), que actúan directamente sobre los grupos Sulfhidrilo se comportan como inhibidores enzimáticos de la P.A.L. Se han encontrado además que el ácido trans-cinámico producto de la reacción enzimática se comporta como retroinhibidor de la P.A.L. (Camm et al. 1977, Koukol et

al. 1961 ); por otra parte una acumulación del ácido trans-cinámico o del ácido Para-cumárico puede conllevar al desplazamiento de la reacción enzimática hacia la producción de sus respectivos sustratos ; ya que la reacción enzimática es una reacción de equilibrio químico (Hanson et al. 1972, Nari et al. 1974).

La fenilalanina amonio-liasa es estable y determinable espectrofotométricamente, no requiere de cofactor y posee un peso molecular promedio de 330.000 Daltons; siendo en algunas especies una enzima tetramérica la cual posee cuatro subunidades de idéntico peso molecular; mientras que en otras posee dos subunidades beta y dos subunidades alfa siendo las beta de mayor peso molecular (Nari et al. 1974); la enzima es activa en el rango de pH de 8.0-10.6; encontrándose un pH óptimo para su actividad de 8.8 (Camm et al. 1977).

### 1.3.2 Extracción Enzimática

La extracción enzimática de la P.A.L. se ha venido efectuando en numerosas especies de plantas mediante diversos métodos (Loomis et al. 1966), siendo el de polvos de acetona el más utilizado para este efecto. (Bruges et al. 1967, Havir et al. 1968 Koukol et al. 1961 , Lamb et al. 1976, Marsh et al. 1968 O'Neal et al. 1970, Rahe et al. 1970, Said et al. 1966).

Este método se basa en asegurar durante y después del proceso de extracción la menor pérdida posible de la actividad enzimática; eliminando además pigmentos y sustancias colo-

readas las cuales pueden interferir durante la medida espectrofotométrica.

Este método consta en la homogenización del material vegetal con acetona previamente enfriada a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; seguida de filtración al vacío y lavado exhaustivo utilizando el mismo solvente; manteniendo el polvo obtenido en temperaturas inferiores a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para la extracción enzimática final se suspende el polvo en solución tampón de boratos o fosfatos en el intervalo de pH de actividad enzimática; ajustando este posteriormente al pH óptimo enzimático para la realización de la reacción y la posterior medida del ácido transcinámico producto de la reacción.

### 1.3.3 Medida de la actividad enzimática

Dentro de los métodos de detección y determinación de la actividad de la L-fenilalanina amonio-*liasa*; los más frecuentemente utilizados son el espectrofotométrico y el de marcación radioactiva. El primero se basa en la cuantificación del ácido trans-cinámico uno de los productos de la reacción utilizando como sustrato el aminoácido L-fenilalanina y como enzima el extracto obtenido en el numeral 1.3.2, ya sea a  $\lambda = 268\text{nm}$  (Koukol et al. 1961, Moraes, 1981, Rahe et al. 1970) longitud de máxima absorción del ácido trans-cinámico o a  $\lambda = 290\text{ nm}$  (Havir et al. 1968, Nishizawa et al. 1979, Dudley et al. 1979) donde se disminuye así la interferencia producida por el sustrato L-fenilalanina, el cual presenta su longitud de máxima absorción en el mismo inter-



valo del producto de la reacción (apéndices I y II).

El método de marcación radioactiva consiste en la utilización del sustrato L-fenilalanina marcado en el carbono 3 con carbono catorce ( $C^{14}$ ) (Johnson et al. 1975 , O'Neal et al. 1970, Pometto et al. 1980 , Proksch et al 1981 , Schroder et al. 1976), incubando este con el extracto enzimático siguiendo el transcurso de la reacción durante un tiempo dado y posteriormente cuantificando el producto marcado .

La actividad específica enzimática se obtiene a partir de los valores de actividad determinados mediante los métodos anteriormente mencionados refiriendo estos al contenido proteico en el extracto enzimático presente en la mezcla de reacción.

Respecto a la extracción y medida de la actividad enzimática de la fenilalanina amonio-liase en hojas de cafeto, esta únicamente ha sido detectada cualitativamente (Martínez et al. 1981); pero no fué posible su cuantificación. Deben considerarse dos aspectos a este respecto: primero, si el nivel de la P.A.L. en hojas de cafeto es tan bajo lo cual no permite su detección espectrofotométrica; o si el método para la extracción enzimática de la P.A.L. utilizado no es el apropiado. Por lo consiguiente es necesario en la estandarización del método de extracción y detección enzimática utilizar un material vegetal el cual presente un elevado nivel de la P.A.L. y que haya sido ampliamente estudiado; para luego ser adaptado a hojas de cafeto. Como material

vegetal se escoge la papa (Solanum tuberosum var. Andigenum) por ser este de fácil adquisición y por poseer un contenido fenólico bajo. Además es posible observar efectos de diferentes factores sobre la actividad enzimática de la P.A.L.; para su aplicación posterior en hojas de cafeto.

#### 1.3.4 Inhibidores y activadores

Dentro de los estudios efectuados sobre la fenilalanina amonioliasa se han encontrado una serie de compuestos que modifican su actividad enzimática; bien sea inhibiéndola parcial o totalmente o incrementándola; los cuales han sido clasificados en los siguientes grupos:

1.3.4.1 Iones metálicos. Ha sido demostrado que la actividad catalítica de la P.A.L. es inhibida por la acción de algunos iones metálicos divalentes los cuales presentan un mayor o menor carácter inhibitorio dependiente de su concentración; se citan los siguientes:  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+2}$  entre otros (Havir et al. 1968, Iridall et al. 1974, Koukol et al. 1961, O'Neal et al. 1970). Sobresale el efecto del ión  $\text{Hg}^{+2}$  el cual presenta un marcado carácter inhibitorio el que parece ser debido a su interacción con los grupos sulfihídrilo presentes en el sitio activo de la enzima; ya que las sales de mercurio forman complejos con estos grupos. Además en presencia de EDTA (Havir et al. 1968, Iridall et al. 1974, O'Neal et al. 1970), y de Dietilditiocarbamato de sodio (O'Neal et al. 1970) complejantes de



iones metálicos divalentes se produce o no un incremento de la actividad enzimática dependiendo ésta de su concentración y de los iones presentes en los extractos enzimáticos; lo cual puede relacionarse con su actividad de complejante de iones metálicos que como se acaba de ver son inhibidores enzimáticos de la P.A.L.

1.3.4.2 Compuestos y reactivos sulfihidrilicos. Los compuestos sulfihidrilicos presentan activación o inhibición dependiendo de su estructura como monómeros o como dímeros y de su concentración (Koukol et al. 1961); así el glutatión (S-H) actúa como activador mientras que su dímero (GS-SG) no presenta alteración en la actividad (Iridall et al. 1974). De igual forma la L-cisteína (S-H) actúa como inhibidor (Koukol et al. 1961, Iridall et al. 1974) mientras que su dímero L-cistina (S-S) no presenta ningún tipo de inhibición. El 2-mercaptoetanol (S-H) dependiendo de su concentración (O'Neal et al. 1970), puede actuar como activador o no presentar ninguna alteración sobre la actividad enzimática.

Por otra parte algunos reactivos que interactúan con los grupos sulfihidrilo actúan como inhibidores de la fenilalanina amonio-líasa; así el ácido para-cloromercurifenilsulfónico y la iodoacetamida (Koukol et al. 1961) se comportan como inhibidores presentando el primero de ellos una inhibición del 100% debido a la incorporación del ión  $Hg^{+2}$  en la estructura de este compuesto ya que como se aclaró en el numeral 1.3.4.1 las sales de metales pesados son complejantes de los gru-

pos sulfhidrúlicos comprobándose así la presencia de estos grupos en el sitio activo de la fenilalanina amonio-*liasa*.

1.3.4.3 Agentes carbonílicos. En presencia de compuestos tales como borhidruro de sodio, semicarbazida, fenilhidrazina y compuestos que contengan iones cianuro (Havir et al 1968, Koukol et al. 1961, O'Neal et al 1970) que actúan directamente sobre grupos carbonílicos se presenta inhibición enzimática lo que conlleva a pensar en la presencia de un grupo carbonílico en el sitio activo de la fenilalanina amonio-*liasa* (Hansen et al. 1972, Havir et al. 1968).

1.3.4.4 Ácidos aromáticos. Otro tipo de compuestos que actúan como inhibidores de la actividad enzimática de la P.A.L. son numerosos ácidos aromáticos dentro de los cuales se pueden citar los siguientes: ácido *trans*-cinámico, ácido *o*-cumárico, D-fenilalanina, y algunos derivados de la fenilalanina y de la serina (Iridall et al. 1974, Koukol et al. 1961; O'Neal et al. 1970). Los ácidos gálico y giberélico (O'Neal et al. 1970) actúan por el contrario como activadores de la fenilalanina amonio-*liasa*.

1.3.4.5 Carbohidratos y polioles. La actividad enzimática de la fenilalanina amonio-*liasa* es inhibida totalmente por polioles tales como el D-manitol y el D-sorbitol a concentraciones de 200 mM; presentándose a ésta concentración una inhibición parcial por parte de la D-glucosa y D-manosa; sin que se presente a esta concentración inhibición

por parte de la sacarosa.

Analizando el manitol y sorbitol en comparación con la manosa y glucosa se observan como diferencias que en el manitol y sorbitol no se presenta capacidad reductora y que la estructura es abierta mientras que la manosa y glucosa presentan capacidad reductora y predomina la estructura cíclica piranósica.

Al examinar la sacarosa se observa que esta no posee capacidad reductora pero su estructura es la combinación de dos estructuras cíclicas furanósica y piranósica. El análisis de estas estructuras nos lleva a considerar que la parte básica para la inhibición no es la ausencia de capacidad reductora del manitol y sorbitol ya que la sacarosa no posee dicha capacidad; mientras que sí se nota diferencia entre si la estructura es abierta o cíclica lo cual conlleva a pensar que la inhibición requiere de la estructura lineal ya que es inhibida por azúcares que poseen estructura abierta únicamente (Koop et al. 1977), o que presenten equilibrio con esta estructura.

### 1.3.5 Efecto de la luz sobre la actividad de la fenilalanina amonio-liasa.

Un amplio rango de actividades metabólicas incluyendo fotosíntesis, fotorespiración, síntesis de clorofila, degradación de grasas ,



degradación de almidones, síntesis y degradación de ácidos nucleicos y síntesis de productos secundarios pueden ser regulados por fotocontrol ejercido sobre el nivel de actividades enzimáticas específicas.

Las únicas enzimas que responden a la luz en períodos de tiempo suficientemente cortos son: la lipoxigenasa, la pirofosfatasa inorgánica y la fenilalanina amonio-liasa. El fitocromo aparentemente actúa como depresor de la actividad de la lipoxigenasa mientras que eleva la actividad de la fenilalanina amonio-liasa. La activación e inactivación enzimática son procesos los cuales resultan de la modificación de las moléculas enzimáticas preexistentes para hacer estas catalíticamente más o menos activas respectivamente. Estas modificaciones pueden involucrar cambios covalentes en la estructura molecular de la enzima o cambios en interacciones alostéricas (Acton et al. 1980, Zucker, 1972).

La actividad de la P.A.L. está sujeta a fotocontrol en una amplia variedad de especies; en algunos casos es debido a la activación del fitocromo por acción de la luz (Quail .1976) mientras que en otros el incremento en la actividad enzimática es debido a la inducción por acción directa de la luz blanca, luz azul, luz ultravioleta y radiaciones gama (Acton et al. 1980, Ahmed et al. 1970 , Camm et al. 1977, Fritzenmeier et al. 1981, Johnson et al. 1975, Zucker .1965, 1972) o puede deberse a una combinación de ambos efectos.

### 1.3.6 El fitocromo

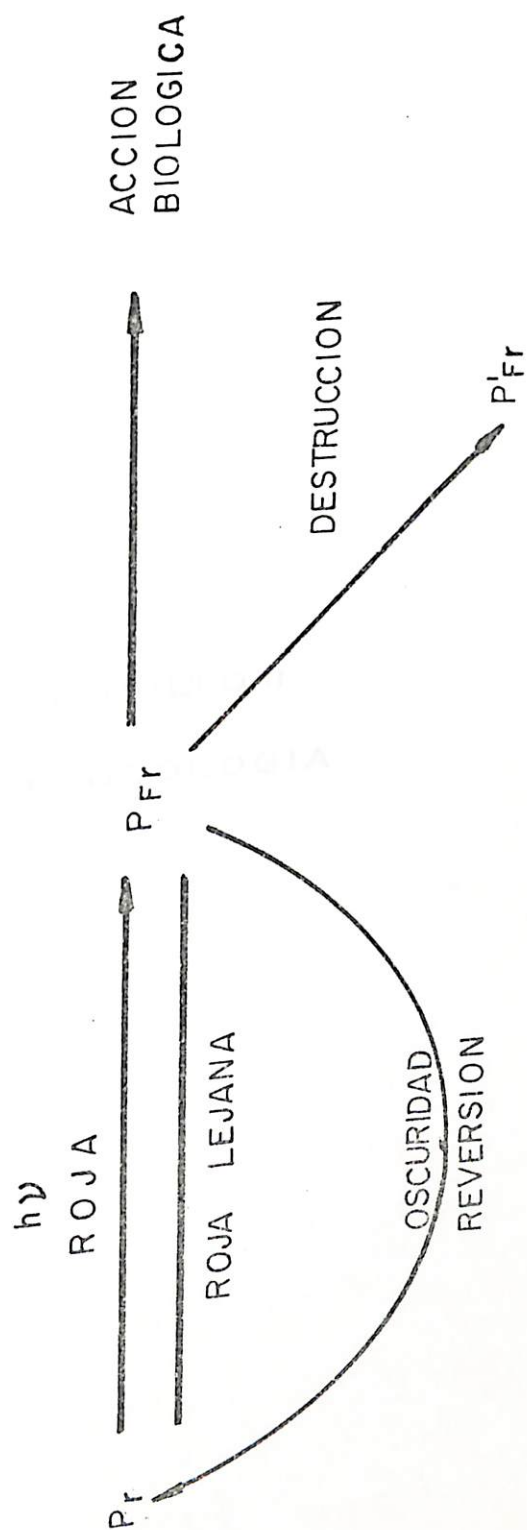
La cromoproteína azul-verde fitocromo es un regulador biológico reversible activado por la luz (Quail, 1976). Se conocen dos formas principales de la molécula. La forma  $P_r$  (absorbe en la región espectral de la luz roja  $\lambda_{\max} = 660 \text{ nm}$  y la forma  $P_{fr}$   $\lambda_{\max} = 730 \text{ nm}$ . La forma  $P_r$  es considerada biológicamente activa capaz de inducir respuestas biológicas medibles. Las dos formas son reversiblemente interconvertibles por acción de la luz roja-lejana (fototransformación). Mientras que la forma  $P_r$  es estable en la oscuridad. La  $P_{fr}$  en estas condiciones se transforma a la forma  $P_r$  o experimenta una pérdida irreversible de fotoactividad conocida como destrucción. Estas propiedades del fitocromo son resumidas en la figura No. 3.

La luz roja absorbida por la forma  $P_r$  transforma la molécula a la forma  $P_{fr}$  la cual a su turno induce una respuesta biológica. La molécula aislada del fitocromo consiste en una proteína y un cromóforo con un contenido de carbohidratos menor del 4%. El fitocromo es estable y soluble entre el intervalo de PH de 6.2-8.0 pero precipita y es desnaturalizado por encima y por debajo de este rango; su peso molecular ha sido un punto de amplia discusión y se han citado valores de 18000 y 359000 D. El grupo cromóforo es un tetrapirrol lineal el cual se halla unido a una estructura proteica.



FIGURA No. 3

# ESQUEMA DE ACTIVACION DE LA MOLECULA DEL FITOCROMO



## CAPITULO II

## METODOLOGIA

## MATERIALES DEL LABORATORIO

## CAPITULO II

## METODOLOGIA

*Solanum tuberosum* L. var. *Andigena*

(Papa Sabanera)

## CAPITULO II

### METODOLOGIA

#### 2.1 MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO

##### 2.1.1 Materiales vegetales

Variedad de cafeto

Variedad de papa

Caturra rojo

Solanum tuberosum var. Andigenum

Híbrido de Timor

(Papa Sabanera)

Catimor A

Catimor E

##### 2.1.2 Reactivos

Acetona (grado R. A.)

Acido Bórico (grado R. A.)

Acido trans-cinámico (grado R. A.)

Carbonato de sodio (grado R. A.)

Eter etílico (grado R. A.)

Hidróxido de sodio (grado R. A.)  
 2- Mercaptoetanol (grado R. A.)  
 L-fenilalanina (grado R. A.)  
 Reactivo de folin-ciocalteu (grado R. A.)  
 Sulfato de cobre pentahidratado (grado R. A.)  
 Tartrato de sodio (grado R. A.)  
 Tetraborato de di-sodio decahidratado (grado R. A.)

### 2.1.3 Equipos de Laboratorio

Bala de nitrógeno con manómetro Matheson ref. 3104

Balanza analítica Mettler H. 64.

Cabina de flujo laminar Intermed.

Centrífuga Sorval RC-5B. Dupont.

Cuarto frío Warren

Espectrofotómetro Zeiss PMQ-3

Estufa Heraeus

Homogenizador Virtis S-23

Nevera

Plancha para agitación Heidolph

Potenciómetro Metrohm. 632

Tanque para nitrógeno líquido

Ultrafiltro. Amicon

Ultratermostato Colora K-5

Vortex Heidolph



## 2.2 ENSAYOS CON TUBERCULOS DE PAPA

### 2.2.1 Toma de muestra

Debido a que los tubérculos de Solanum tuberosum var Andigenum (papa sabanera) fueron adquiridos en el mercado común se omiten características de proveniencia, toma de muestra etc; controlando únicamente uniformidad de tamaño, y limitando la utilización de solamente aquellos tubérculos carentes de lesiones.

### 2.2.2 Preparación de discos de papa (Lamb. et al .1979)

En una cabina de flujo laminar previamente desinfectada con soluciones de hipoclorito de sodio al 2.5 % y etanólica al 70 % se preparan discos de Solanum tuberosum var. Andigenum (papa sabanera) mediante la secuencia siguiente:

- a. Los tubérculos una vez lavados con agua destilada y secados se sumergen en solución etanólica al 70 % durante un período de tres minutos (desinfección).
- b. Se preparan discos de 15mm de diámetro y 3 mm de espesor aproximadamente con la ayuda de un sacabocado.

c. Los discos se sumergen en agua estéril y se enjuagan con el fin de eliminar la mayor cantidad de almidón posible.

d. Se llevan estos a cajas de Petri que contengan papel de filtro previamente humedecido con 5 ml de agua estéril ( 5 discos por caja).

e. Se someten posteriormente a exposición de luz blanca intensidad de 2000 Luxes a tiempos definidos.

Nota: Todo el material empleado en la técnica descrita anteriormente fué previamente esterilizado en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  a una presión de 15 lbs durante un período de 30 minutos.

### 2.2.3 Preparación Polvos de acetona (Havir et al. 1968)

Una vez sometidos los discos de papa a la luz blanca de 2000 Luxes a tiempos de 0, 16, 20, 24, 28 y 40 horas, se pesan e introducen en recipientes plásticos , se enfrían posteriormente en nitrógeno líquido ; y se homogenizan en Virtis con acetona previamente enfriada a  $-20^{\circ}\text{C}$  en relación 1:20 Peso/Volumen durante 10 minutos. El homogenizado obtenido se filtra con ayuda de vacío a través de papel Whatman 40 y se efectúan lavados posteriores con el mismo solvente en relación 1:100 Peso./Volumen , y se obtiene un polvo de color blanco el

cual se seca a una temperatura de 4°C en cuarto frío . Para su conservación este se guarda hasta su utilización en nitrógeno líquido. El diagrama de flujo del proceso es representado en la figura No.4.

#### 2.2.4 Extracción enzimática de la P.A.L. (Havir et al. 1968 , Zucker , 1968).

Polvos de acetona de Solanum tuberosum var. Andigenum (papa sabanera) se suspenden en relación 1:100 Peso/Volumen con solución tampón de boratos 0.1M, pH8.8, durante un período de 15 minutos con agitación en baño de hielo y se centrifugan durante 10 minutos a 2000 xg (4500 r.p.m.) a una temperatura de 4°C, el sobrenadante es filtrado a través de papel Whatman 40 constituyéndose este en el extracto enzimático utilizado en la medida espectrofotométrica de la actividad de la P.A.L.

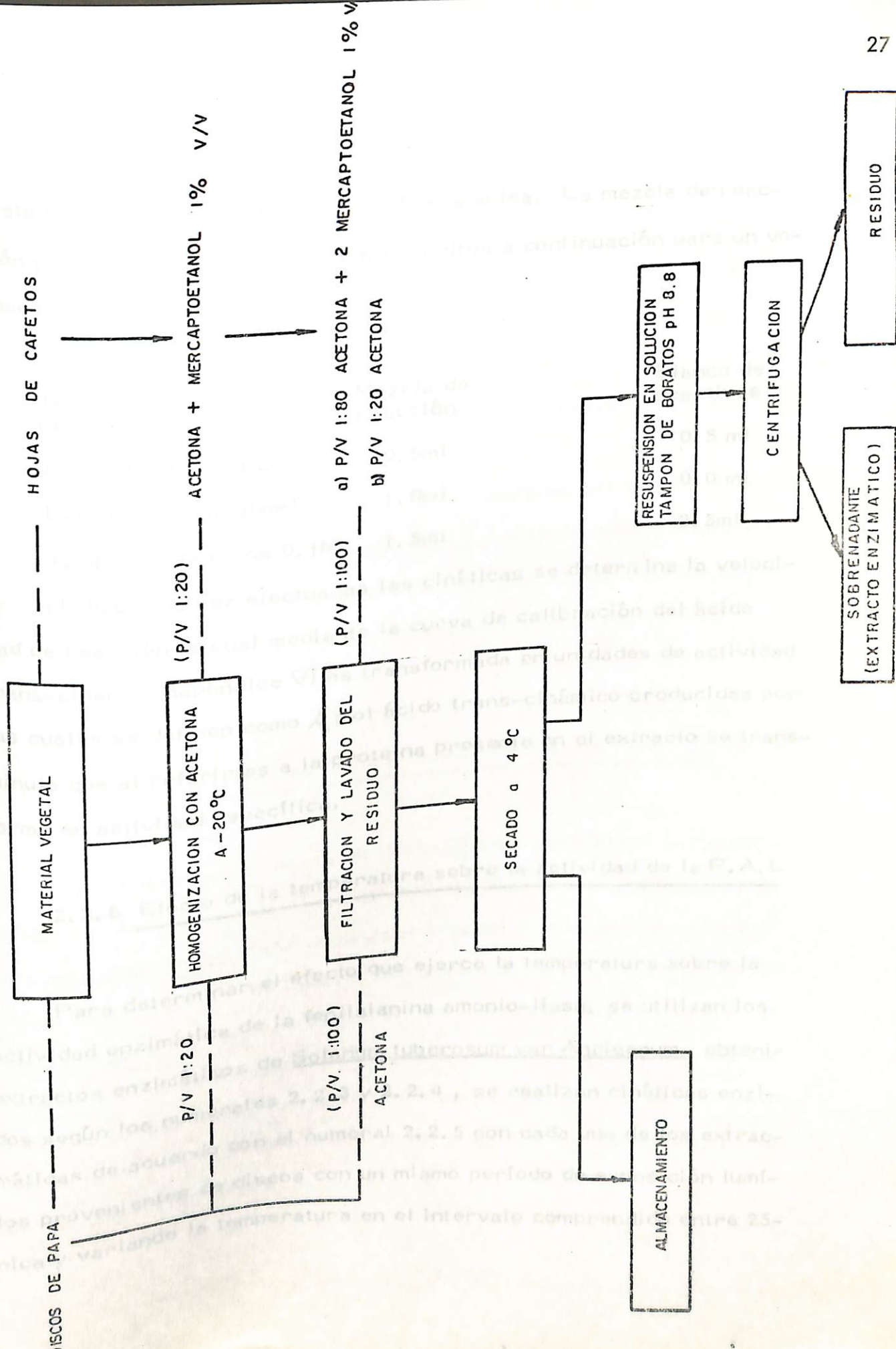
#### 2.2.5 Medida espectrofotométrica de la actividad enzimática de la P.A.L. (Havir et al. 1968, Nishizawa et.al 1979 ).

Extractos enzimáticos provenientes de discos de Solanum tuberosum var. Andigenum (papa sabanera) expuestos a luz blanca intensidad de 2000 Luxes por períodos de 0, 16, 20, 24, 28 y 40 horas son utilizados en la determinación de la actividad de la P.A.L. Las condiciones espectrofotométricas se resumen en el apéndice III. Como sus



# ESQUEMA GENERAL DEL PREPARACION DE POLVOS DE ACETONA

I



trato es utilizado el aminoácido L-fenilalanina. La mezcla de reacción y el blanco de reactivos son descritos a continuación para un volumen de 3.0 ml

| Reactivo utilizado            | Mezcla de reacción | Blanco de reactivos |
|-------------------------------|--------------------|---------------------|
| Extracto enzimático           | 0.5ml              | 0.5 ml              |
| L-Fenilalanina 30mM           | 1.0ml              | 0.0 ml              |
| Tampón de boratos 0.1M pH 8.8 | 1.5ml              | 2.5ml               |

una vez efectuadas las cinéticas se determina la velocidad de reacción la cual mediante la curva de calibración del ácido trans-cinámico (apéndice V) es transformada en unidades de actividad las cuales se definen como  $\mu\text{mol ácido trans-cinámico producidos por minuto}$  que al referirlas a la proteína presente en el extracto se transforma en actividad específica.

#### 2.2.6 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la P.A.L

Para determinar el efecto que ejerce la temperatura sobre la actividad enzimática de la fenilalanina amonio-*liasa*, se utilizan los extractos enzimáticos de Solanum tuberosum var Andigenum obtenidos según los numerales 2.2.3 y 2.2.4, se realizan cinéticas enzimáticas de acuerdo con el numeral 2.2.5 con cada uno de los extractos provenientes de discos con un mismo período de exposición lumínica y variando la temperatura en el intervalo comprendido entre 25-



40°C , a partir de la misma mezcla de reacción; es decir inicialmente se efectúa la cinética enzimática a 25°C , se interrumpe el registro y se aumenta la temperatura a 30°C se estabiliza la temperatura y se sigue esta nueva cinética durante un tiempo determinado el que permita observar una variación y así sucesivamente para cada temperatura en intervalos de 5°C, hasta alcanzar una temperatura de 40°C.

Como control del efecto de la temperatura se efectúa la cinética a 25°C del extracto enzimático obtenido a partir de discos de papa sabanera expuestos a la luz durante 24 horas por un período que abarque el intervalo de tiempo que se emplea en realizar las cinéticas anteriores.

#### 2.2.7 Acción de la luz sobre la actividad de la P.A.L.

Para observar el efecto de la luz sobre la actividad enzimática de la fenilalanina amonio--liasa se utilizan discos de Solanum tuberosum var. Andigenum (papa sabanera) expuestos a la acción de la luz blanca intensidad de 2000 Luxes por períodos de 0, 16, 20, 24, 28 y 40 horas procesados como se indica en los numerales 2.2.3 y 2.2.4, se efectúan cinéticas enzimáticas de acuerdo al numeral 2.2.5 , manteniendo la temperatura constante y utilizando extractos enzimáticos en la mezcla de reacción provenientes de muestras con diferentes períodos de exposición lumínica.

## 2.3 METODOLOGIA PARA LA DETERMINACION DE LA PAL EN CAFE

### 2.3.1 Toma de muestra

La toma de muestra se efectúa en dos localidades diferentes, en la finca Misiones situada en Viotá (Cundinamarca) se tomaron primeros y segundos pares de hojas de cafeto variedad Caturra rojo edad no determinada; entendiéndose por primer par las hojas correspondientes al extremo final de la rama, considerando como segundo par las inmediatamente adyacentes en dirección al tallo principal de la planta; en Chinchiná (Caldas) se tomaron hojas de primeros pares de cafetos de las variedades Híbrido de Timor, Caturra, Catimor A y Catimor E ( estas dos últimas variedades de la generación  $F_3$  ) los cuales poseen las siguientes edades de cultivo:

| <u>Variedad</u>  | <u>Fecha de siembra*</u>       |
|------------------|--------------------------------|
| Híbrido de Timor | 12 julio 1966 (16 años)        |
| Caturra          | 13 marzo 1957 ( 25 años)       |
| Catimor A y E    | Primer semestre 1975 ( 7 años) |

\* Datos adquiridos mediante comunicación personal de funcionarios de CENICAFE.

### 2.3.2 Transporte

Las hojas recolectadas son introducidas en bolsas plásticas ordenadas en tal forma que el haz de cada una de ellas esté en contacto con el envés de la anterior sin que se ejerza ninguna presión entre ellas. Las bolsas se introducen dentro de una caja de icopor que contiene bolsas de hielo seco herméticamente cerradas separadas por un tabique de cartón de un centímetro de espesor aproximadamente a cada lado del compartimiento de la muestra ; colocando posteriormente la tapa de icopor de la caja con el fin de obtener un intervalo de temperatura de 10-15°C . Este material se transporta y procesa el mismo día de la toma de la muestra.

### 2.3.3 Elaboración polvos de acetona

Las hojas de cafeto recolectadas y transportadas según los numerales 2.3.1 y 2.3.2, de las variedades en estudio se someten a limpieza con agua destilada se pesan y homogenizan en relación 1:20 Peso/Volumen con acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$ , que contenga 2-Mercaptoetanol al 1 % Volumen/Volumen ; hasta destrucción total del material vegetal . Posteriormente se filtra con ayuda de vacío a través de papel Whatman 40, y se efectúan lavados con acetona enfriada a  $-20^{\circ}\text{C}$  que contenga 2-Mercaptoetanol al 1 % Volumen/Volumen en relación 1:80 Peso/Volumen. Se lava finalmente con acetona enfriada a  $-20^{\circ}\text{C}$  en re-



lación 1:20 Peso/Volumen con el fin de remover el exceso de 2-mercaptoetanol que puede estar presente. Se obtiene así un polvo amarillo-verdoso, el cual se seca a 4°C en cuarto frío y se guarda posteriormente para su conservación en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización (Figura No.4.).

### 2.3 EXTRACCION DE LA P.A.L.

Polvos de acetona obtenidos según el numeral 2.3.3 se suspenden en relación 1:100 Peso/Volumen con solución tampón de boratos 0.1M pH 8.8 durante un período de una hora con agitación en baño de hielo y se centrifuga durante 30 minutos a 49.000 Xg (20.000 r.p.m) a 4°C. Se obtiene un sobrenadante el que se filtra a través de papel Whatman 40 el cual constituye el extracto enzimático.

#### 2.3.5 Optimización de condiciones en la extracción de la PAL

Debido a las diferencias entre el material vegetal que se emplea como modelo en la extracción enzimática de la fenilalanina amonio-lia-sa (discos de papa sabanera) y las hojas de cafeto de las variedades en estudio; se efectúan algunas modificaciones con el fin de adaptar los métodos tanto de preparación de los polvos de acetona, como de extracción enzimática descrito en los numerales 2.2.3 y 2.2.4. Estas



modificaciones son en su orden:

2.3.5.1 Protección de grupos Sulfihidrilo. De acuerdo a los numerales 1.2.1 y 1.2.4.2, la fenilalanina amonio-líasa posee en su estructura grupos sulfihidrilo (S-H), los cuales son susceptibles de formar puentes disulfuro (S-S), modificando la configuración del sitio activo y por lo tanto su actividad enzimática. Se efectúan por lo tanto ensayos en ausencia y presencia de un agente protector de los grupos sulfihidrilo como lo es el 2-mercaptoetanol.

2.3.5.2 Efecto de la fuerza iónica. Para determinar el efecto de la fuerza iónica en el proceso de extracción enzimática, se efectúa ensayos con solución tampón de boratos pH 8.8 de concentraciones 0.05 y 0.1 M.

2.3.5.3 Tiempo de agitación y velocidad de centrifugación. Se efectúan ensayos controlando tanto el tiempo de agitación mecánica de la suspensión de polvos de acetona en solución tampón de boratos 0.1M pH 8.8, en relación 1:100 Peso/Volumen, como la velocidad de centrifugación, parámetros con los cuales se obtiene una máxima extracción enzimática. Se realizan ensayos con tiempos de agitación mecánica de 15 minutos y una hora respectivamente; y velocidades de centrifugación de 2000 Xg (4.500 r.p.m) y 49000 Xg (20000 r.p.m)

### 2.3.6 Medida Espectrofotométrica de la actividad enzimática de la P.A.L.

Extractos enzimáticos provenientes de hojas de cafeto son utilizados en la determinación de la actividad de la P.A.L. Las condiciones espectrofotométricas se resumen en el Apéndice III como sustrato es utilizado el aminoácido L-fenilalanina. La mezcla de reacción y el blanco de reactivos son descritos a continuación para un volumen final de 3.0 ml.

| Reactivo utilizado               | Mezcla de reacción | Blanco de reactivos |
|----------------------------------|--------------------|---------------------|
| Extracto enzimático              | 0.5 ml             | 0,5 ml              |
| L-fenilalanina 30 mM             | 1.0 ml             | 0.0 ml              |
| Tampón de boratos 0.1M<br>pH 8.8 | 1.5 ml             | 2.5 ml              |

### 2.3.7 Pérdida de la actividad enzimática de la PAL con el tiempo

Extractos obtenidos a partir de polvos de acetona según los numerales 2.3.3 y 2.3.4, medidos espectrofotométricamente de acuerdo al numeral 2.3.6, se utilizan para determinar la pérdida de actividad enzimática con el tiempo. Una vez se obtenga el extracto, se efectúa una cinética la cual se considera como la correspondiente al

tiempo cero; el extracto se mantiene en baño de hielo con agitación mecánica por períodos de 4 y 8 horas después de los cuales se efectúan sus cinéticas correspondientes, para posteriormente comparar sus actividades enzimáticas con la del tiempo cero.

### 2.3.8 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la P.A.L

2.3.8.1 Efecto en primeros y segundos pares de hojas de cafeto. Polvos de acetona provenientes de primeros y segundos pares de hojas de cafeto variedad Caturra; obtenidos y procesados según numerales 2.3.1 , 2.3.3 y 2.3.4 , se utilizan para la determinación de la actividad enzimática de la P.A.L., en el intervalo de temperaturas de 25, 30 , 35 y 40°C. Las cinéticas se efectúan bajo las condiciones espectrofotométricas dadas en el apéndice III, y su medida se realiza acorde al numeral 2.3.6, manteniendo la misma mezcla de reacción para las temperaturas descritas anteriormente.

2.3.8.2 Temperatura óptima enzimática. Con el fin de obtener el intervalo de temperatura en el cual la enzima fenilalanina amonoliasa presente una máxima actividad, se realizan ensayos con extractos enzimáticos obtenidos según numerales 2.3.3 y 2.3.4; las medidas de las actividades se efectúan según el numeral 2.3.6 , bajo las condiciones espectrofotométricas reportadas en el apéndice III. Se parte de una misma mezcla de reacción, modificando solamente la tempera-



tura durante el transcurso de esta en el intervalo 30-60°C , utilizando tiempos de reacción en cada una de las temperaturas que permitan cuantificar cambios en las actividades enzimáticas correspondientes.

Como control de los ensayos que se realizan en los numerales 2.3.8.1 y 2.3.8.2 se sigue espectrofotométricamente la reacción enzimática de la P.A.L. manteniendo constante la temperatura a 25° C durante un tiempo que abarque el utilizado en la realización de la reacción enzimática con variación de temperatura.

#### 2.3.9 Efecto de la concentración de sustrato

Polvos de acetona provenientes de hojas de cafeto obtenidos y procesados según los numerales 2.3.3 y 2.3.4 , se utilizan en la determinación de la concentración óptima de sustrato . Las condiciones espectrofotométricas del ensayo son dadas en el apéndice III; los ensayos se efectúan a 40°C . Se parte de la mezcla de reacción descrita en el numeral 2.3.6 . Se procede a efectuar modificaciones de la concentración final del sustrato L-fenilalanina comprendidas entre el intervalo de 0.5-9.0 mM manteniendo constante el volumen de la mezcla de reacción (3.0 ml) para lo cual se efectúan variaciones en el volumen de la solución tampón de boratos 0.1M pH 8.8



### 2.3.10 Efecto de la Concentración de enzima

Polvos de acetona provenientes de hojas de cafeto obtenidos y procesados según los numerales 2.3.3 y 2.3.4, se utilizan en la determinación del extracto óptimo enzimático. Las condiciones espectrofotométricas del ensayo son dadas en el apéndice III, y los ensayos se realizan a 40°C partiendo de la mezcla de reacción enzimática descrita en el numeral 2.3.6. Se utiliza la concentración óptima del sustrato L-fenilalanina determinada en el numeral 2.3.9, modificando el volumen del extracto enzimático en el intervalo de 0.1-0.7 ml manteniendo constante el volumen final de la mezcla de reacción (3.0 ml), ajustando este con solución tampón de boratos 0.1M pH 8.8.

### 2.3.11 Comparación de la actividad específica de la P.A.L. en cuatro variedades de cafeto

Se compara la actividad específica de la fenilalanina amonio-liasa en las variedades de cafeto Caturra, Híbrido de Timor, Catimor A, y Catimor E a partir de extractos obtenidos de polvos de acetona preparados según el numeral 2.3.3 y procesados según el numeral 2.3.4. Al efectuarse la centrifugación se obtiene un sobrenadante (extracto enzimático 1) y un primer residuo el cual se resuspende con la misma relación peso/volumen de la muestra original y se reprocesa según el numeral 2.3.4 como si se tratase del polvo de acetona original. Se

consigue así un segundo sobrenadante (extracto enzimático 2) y un segundo residuo que se procesa como el primero obteniendo un tercer sobrenadante (extracto enzimático 3) y un tercer residuo. A cada uno de los extractos enzimáticos se les determina su actividad según el numeral 2.3.6.

#### 2.3.12 Ultrafiltración

Polvos de acetona provenientes de primeros pares de hojas de las variedades de cafeto en estudio, obtenidos según el numeral 2.3.3, se resuspenden en relación 1:100 Peso/Volumen en solución tampón de boratos 0.1 M pH 8.8 durante una hora en baño de hielo y se centrifugan posteriormente a 4°C durante 30 minutos a 49000 Xg (2000 r.p.m.) obteniéndose un sobrenadante (extracto enzimático 1) y un primer residuo. Se toma una alícuota del extracto enzimático una vez filtrado a través de papel Whatman 40 la cual se pasa a través de una membrana de Amicon de 100.000 a 300.000 Daltons, que retienen pesos moleculares superiores a su valor (retentato) y dejan pasar sustancias con pesos moleculares inferiores (eluato); utilizando nitrógeno gaseoso a una presión de 70 lb/plg<sup>2</sup>.

El residuo proveniente de la centrifugación se resuspende en la misma relación Peso/Volumen de la muestra original y se reprocesa como si fuese el polvo de acetona inicial obteniéndose un segundo so-

brenadante (extracto enzimático 2) y un segundo residuo. Del segundo extracto enzimático se toma una alícuota igual a la tomada del primer extracto y se pasan conjuntamente a través de la membrana de Amicon; se efectúan lavados del retentato con solución tampón de boratos 0.1M pH 8.8, y se lleva este finalmente al volumen original de una de las alícuotas con el tampón de boratos.

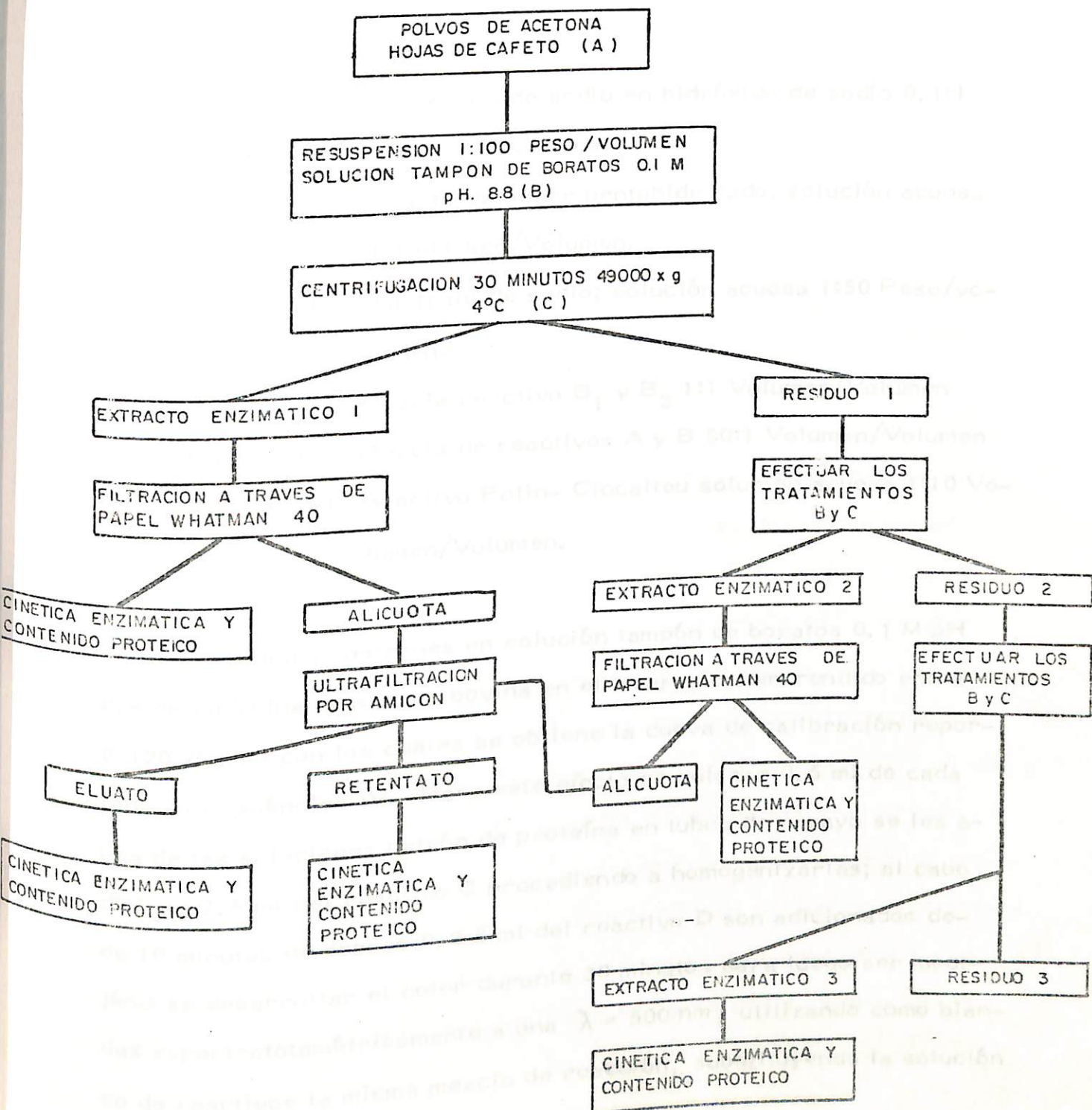
Nota: Todas las operaciones de filtración a través de la membrana de Amicon se realizan sobre baño de hielo a 4°C con agitación mecánica.

Se efectúa la medida espectrofotométrica de la actividad de la fenilalanina amonio-*liasa* de los extractos enzimáticos 1 y 2 así como del eluato y retentato obtenidos de la ultrafiltración. Las condiciones espectrofotométricas son dadas en el apéndice III la mezcla de reacción se describe a continuación acorde a los numerales 2.3.9 y 2.3.10 para un volumen final de 3.0 mls.

| Reactivo utilizado            | Mezcla de reacción | Blanco de reactivos |
|-------------------------------|--------------------|---------------------|
| Extracto enzimático           | 0.5 ml             | 0.5 ml              |
| L- fenilalanina 30 mM         | 0.4 ml             | 0.0 ml              |
| Tampón de boratos 0.1M pH 8.8 | 2.1 ml             | 2.5 ml              |



# FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ENZIMATICO DE ACUERDO AL TAMAÑO DE SUS MOLECULAS





## 2.4 DETERMINACION PROTEICA METODO DE FOLIN

### Reactivos:

Reactivo A : Carbonato de sodio en hidróxido de sodio 0.1N  
1:50 Peso/Volumen.

Reactivo B<sub>1</sub>: Sulfato de cobre pentahidratado; solución acuosa  
1:100 Peso/Volumen.

Reactivo B<sub>2</sub>: Tartrato de sodio; solución acuosa 1:50 Peso/volumen.

Reactivo B : Mezcla reactivo B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> 1:1 Volumen/Volumen

Reactivo C : Mezcla de reactivos A y B 50:1 Volumen/Volumen

Reactivo D : Reactivo Folin- Ciocalteu solución acuosa 1:10 Volumen/Volumen.

Se preparan patrones en solución tampón de boratos 0.1 M pH 8.8 de albúmina de sangre bovina en el intervalo comprendido entre 0-120  $\mu$ g/ml con los cuales se obtiene la curva de calibración reportada en el apéndice IV. Para este efecto se colocan 0.5 ml de cada una de las soluciones patrón de proteína en tubos de ensayo se les adiciona 2.5 ml del reactivo C procediendo a homogenizarlas; al cabo de 10 minutos de reposo 0.25 ml del reactivo D son adicionados desarrollándose el color durante 30 minutos para luego ser medido espectrofotométricamente a una  $\lambda = 500$  nm, utilizando como blanco de reactivos la misma mezcla de reacción, substituyendo la solución

de proteína patrón por un volumen igual del tampón de boratos 0.1M pH 8.8

Para determinar el contenido proteico de los extractos enzimáticos provenientes tanto de tubérculos de papa como de hojas de café se toman 0.01 ml del extracto y se llevan a 0.5 ml con el tampón de boratos, efectuando las determinaciones como en el método anteriormente descrito.

Con el fin de evaluar las interferencias producidas por la coloración de los extractos se toman paralelamente 0.01 ml del extracto enzimático los cuales se llevan a 0.5 ml con solución tampón de boratos 0.1M pH 8.8 en tubos de ensayo y se les adiciona 2.5 ml, del reactivo C; se homogenizan y al cabo de 10 minutos de reposo se les adiciona 0.25 ml de solución tampón de boratos 0.1 M pH 8.8 en lugar de la solución de Folin-Ciocalteu, dejando un período de 30 minutos como en el método anterior al cabo de los cuales se efectúa las lecturas espectrofotométricas a  $\lambda = 500$  nm utilizando como blanco de reactivos 0.75 ml de solución tampón de boratos en presencia de 2.5 ml del reactivo C. Los valores de absorbancia obtenidos según el primer método (método de Folin-Ciocalteu) son corregidos substrayéndoles los valores de absorbancia debidos a la coloración de los extractos; determinándose así la absorbancia real de cada una de las muestras y con esta el contenido proteico haciendo uso de la curva de calibración reportada en el apéndice IV.

### III. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

### III. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en el presente estudio, los cuales se comparan con los obtenidos por otros autores (1981); muestran

los resultados de la actividad enzimática de la

en la variedad Caturra por el m-

en este trabajo esto puede ser de-

### CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

### CAPITULO III

#### RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados reportados por Martínez et al. (1981) ; muestran que no es posible la cuantificación de la actividad enzimática de la fenilalanina amonio-liasa en hojas de cafeto variedad Caturra por el método de polvos de acetona descrito en este trabajo; ésto puede ser debido a que el método de extracción enzimática no es el apropiado o a que el nivel enzimático de la P.A.L. es tan bajo en este material que no es posible su cuantificación.

Se procedió a utilizar como patrón un material vegetal en el cual la enzima hubiérase sido ampliamente estudiada con el fin de que tomando como base la metodología utilizada por Martínez et al. (1981) determinar algunos de los parámetros que influyen sobre la actividad enzimática de la P.A.L. para efectuar la comparación de los resultados obtenidos con los reportados para el mismo material vegetal en la literatura respecto al mismo parámetro; aplicando posteriormente la metodología estandarizada a hojas de cafeto; permitiendo esta secuencia dar respuesta a los interrogantes anteriormente citados.



Como material vegetal se escoge tubérculos de papa ya que en este la enzima ha sido ampliamente estudiada (Havir et al 1968, Lamb et al. 1979, Smith et al. 1981, Zucker et al 1.965, 1968); por ser este material de fácil adquisición, poseer un bajo contenido fenólico y presentar un menor contenido de pigmentos que puedan interferir en la medida espectrofotométrica del ácido transcinámico producto de la reacción enzimática.

### 3.1 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS DE LOS ENSAYOS EFECTUADOS A PARTIR DE DISCOS DE PAPA.

#### 3.1.1 Efecto de la temperatura y acción de la luz sobre la actividad de la P.A.L.

Mediante revisión bibliográfica se ha encontrado que dos de los Parámetros que inciden en la actividad enzimática de la P.A.L. son la temperatura y la luz. Para tubérculos de papa se ha observado un óptimo de exposición lumínica en el intervalo de 26-32 horas a temperatura ambiente (Zucker, 1965); y ha sido utilizada una temperatura de 40°C en la medida espectrofotométrica del ácido transcinámico producto de la reacción enzimática (Lamb et al. 1976, 1979). Para corroborar el intervalo de exposición lumínica de los discos de papa y la temperatura de reacción enzimática; se procede a efectuar cinéticas

a partir de un mismo extracto proveniente de discos de papa sabana (*Solanum tuberosum* var. *Andigenum*) expuestos a temperatura ambiente ( $20^{\circ}\text{C}$ ) a la acción de la luz blanca (2000 luxes) por períodos de tiempo comprendidos en el intervalo de 0-40 horas efectuando variaciones de la temperatura durante el desarrollo de la reacción enzimática en el rango de  $25-40^{\circ}\text{C}$  a intervalos de  $5^{\circ}\text{C}$  manteniendo más o menos constante el período de reacción enzimática para cada una de las temperaturas del ensayo (Figura No. 6.)

Los datos reportados en la tabla I muestran el efecto de la temperatura sobre la actividad de la P.A.L. en el intervalo de  $25-40^{\circ}\text{C}$ , a períodos de exposición lumínica constante comprendidos dentro del intervalo de 0-40 horas. Para cada período de exposición lumínica como se observa en la gráfica No. 1 se presenta un aumento de pendiente para cada incremento de  $5^{\circ}\text{C}$  en la temperatura a partir de  $25^{\circ}\text{C}$  lo cual corresponde a un aumento en la velocidad de reacción; presentándose por lo consiguiente un incremento en los valores de actividad específica; con excepción de los extractos provenientes de discos no expuestos a la luz los cuales no reportan actividad en ninguna de las temperaturas del ensayo.

Teniendo en cuenta que los cambios de pendiente registrados pueden deberse a la forma de la cinética y no al efecto producido por incrementos en la temperatura durante el desarrollo de la reacción y debido a que durante el período de estabilización en cada cambio de temperatura

TABLA I  
EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PAL  
PROVENIENTE DE DISCOS DE PAPA PREVIAMENTE SOMETIDOS  
A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICION LUMINICA

| Temperatura<br>(° C) | Tiempo de<br>Exposición a<br>la luz (hr) | Proteína<br>(mg/0.5 ml<br>de extracto) | Actividad<br>(U.A x 105)         | Actividad<br>específica<br>( $\mu$ U.A/mg<br>P) |
|----------------------|------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------|
| 25<br>30<br>35<br>40 | 00                                       | 0.635                                  | 0.000<br>0.000<br>0.000<br>0.000 | 0.000<br>0.000<br>0.000<br>0.000                |
| 25<br>30<br>35<br>40 | 16                                       | 0.813                                  | 0.540<br>1.210<br>1.547<br>1.883 | 6.642<br>14.883<br>19.028<br>23.161             |
| 25<br>30<br>35<br>40 | 20                                       | 0.620                                  | 0.873<br>1.210<br>2.220<br>3.230 | 14.081<br>19.516<br>35.806<br>52.100            |
| 25<br>30<br>35<br>40 | 24                                       | 0.590                                  | 1.547<br>2.220<br>2.893<br>4.237 | 26.220<br>37.627<br>49.033<br>71.814            |
| 25<br>30<br>35<br>40 | 28                                       | 0.650                                  | 1.547<br>2.557<br>2.893<br>5.892 | 23.800<br>39.338<br>44.508<br>90.646            |
| 25<br>30<br>35<br>40 | 40                                       | 0.694                                  | 0.873<br>1.547<br>1.883<br>2.557 | 12.579<br>22.291<br>27.133<br>36.844            |

Luz blanca Intensidad lumínica 2000 luxes  
U.A. (Unidad de actividad) = micromoles de ácido trans-cinámico  
por minuto.  
P Proteína presente en 0.5 ml de extracto



# EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA P.A.L. PROVENIENTES DE DISCOS DE PAPA PREVIAMENTE SOMETIDOS A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICION LUMINICA (\*)

(\*) Intensidad Luminica = 2000Luxes ( luz blanca)

$\lambda = 290 \text{ nm}$

pH = 8.8

[L-Fenilalanina]<sub>final</sub> = 10 mM

V mezcla de reaccion = 3.0 ml

ACTIVIDAD ESPECIFICA (  $\mu$ UA ) / mgr P.I

[PROTEINA]<sub>final</sub> =

0.197 mg/ml

0.217 mg/ml

0.207 mg/ml

0.231 mg/ml

0.271 mg/ml

0.212 mg/ml

TEMPERATURA ( °C )

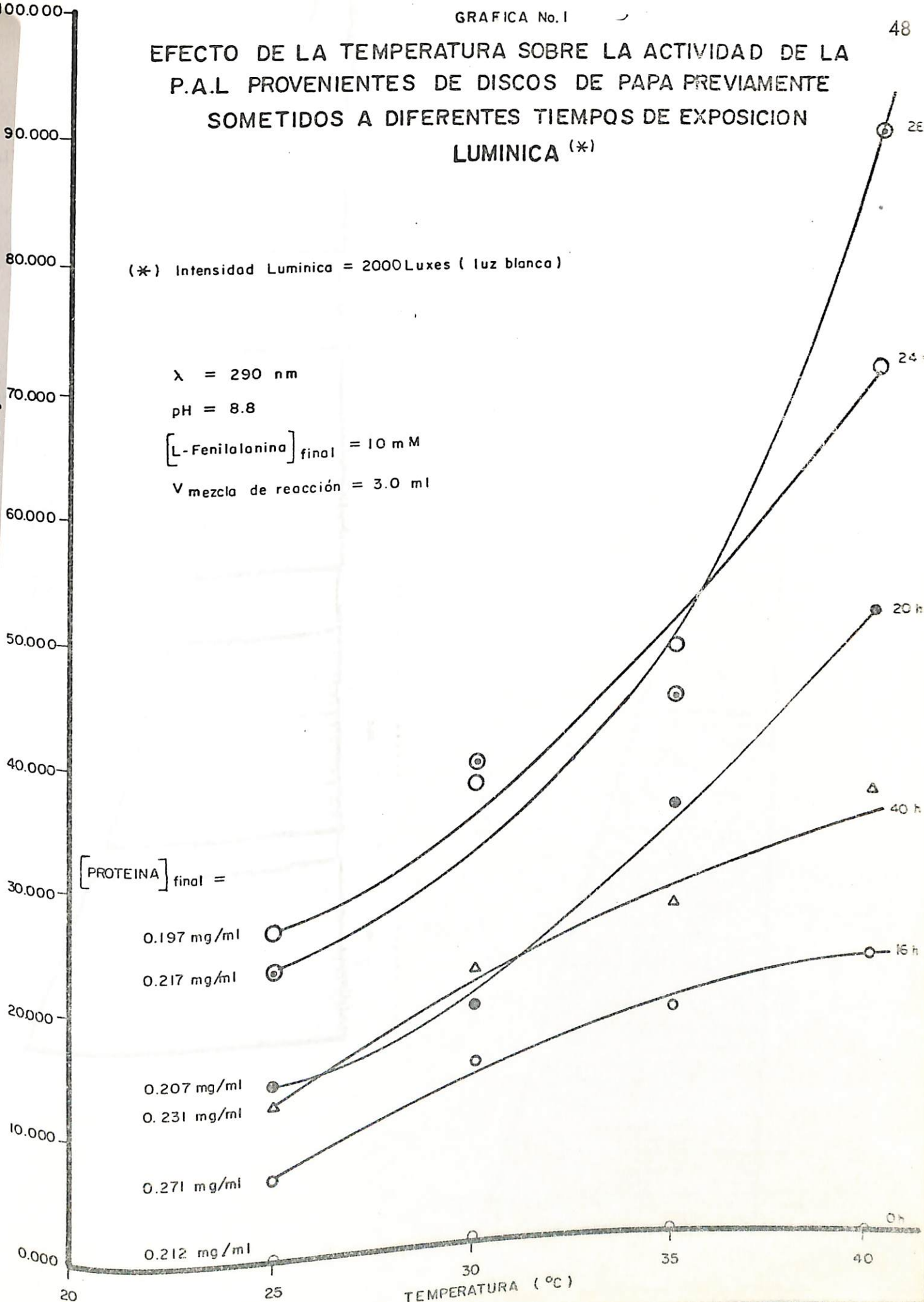




FIGURA No 6  
 VARIACION DE LA ACTIVIDAD DE PAL EN PAPA  
 EN FUNCION DE LA TEMPERATURA

EXPOSICION A LUZ BLANCA 2000 LUXES DE  
 LOS DISCOS DE PAPA = 24 horas  
 $\lambda = 290 \text{ nm}$   
 $[L\text{-}PHEYLALANINA]_{\text{inicial}} = 10 \text{ mM}$   
 $[PHOTOLINA]_{\text{inicial}} = 0.017 \text{ mg/ml}$   
 V mezcla de reaccion = 30 ml

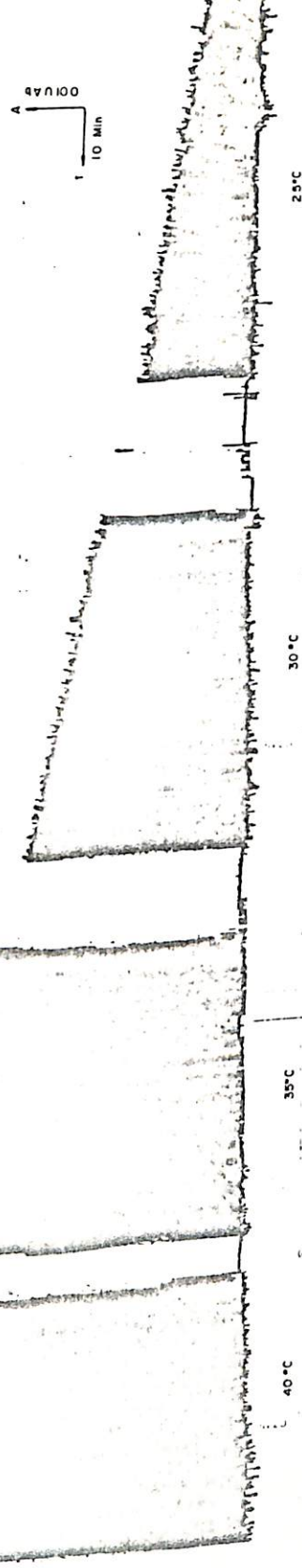
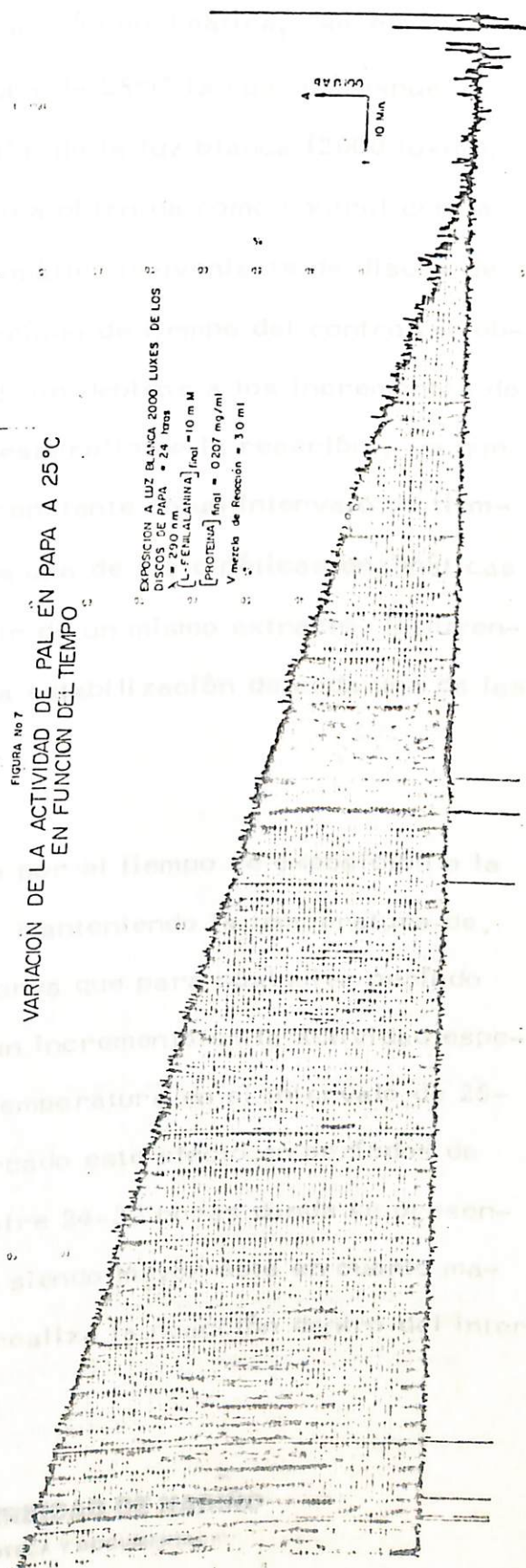


FIGURA No 7

VARIACION DE LA ACTIVIDAD DE PAL EN PAPA A 25°C  
EN FUNCION DEL TIEMPO



ra no se efectúa el registro de la reacción enzimática, se efectuó una cinética control a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  la cuál fué expuesta por un período de 24 horas a la acción de la luz blanca (2000 luxes), (figura No. 7). Comparando la cinética obtenida como control con la obtenida a partir de un extracto enzimático proveniente de discos de papa, iluminados durante el mismo período de tiempo del control, se observa cómo los cambios de actividad son debidos a los incrementos de temperatura efectuados durante el desarrollo de la reacción, ya que la pendiente del control permanece constante en un intervalo de tiempo mayor al gastado en realizar cada una de las cinéticas enzimáticas con variación de temperatura a partir de un mismo extracto. Incluyendo el período de tiempo gastado en la estabilización de cada una de las temperaturas de ensayo.

Al analizar el efecto producido por el tiempo de exposición a la luz sobre la actividad de la P.A.L. manteniendo la temperatura de reacción constante (Tabla II) se observa que para cualquier período de exposición lumínica se presenta un incremento en la actividad específica de la P.A.L. al aumentar la temperatura en el intervalo de  $25-40^{\circ}\text{C}$  (Gráfica No. 2) siendo más marcado este efecto en períodos de exposición lumínica comprendidos entre 24-32 horas donde se presenta un máximo de actividad específica siendo mayor este en cuanto mayor sea la temperatura a la cual se realiza la reacción dentro del intervalo de  $25-40^{\circ}\text{C}$ .



TABLA II

EFFECTO DE LA EXPOSICION PREVIA DE LOS DISCOS DE PAPA  
A LA LUZ SOBRE LA ACTIVIDAD DE PAL A DIFERENTES  
TEMPERATURAS DE REACCION

| Tiempo de exposición a la luz (hr) | Temperatura (° C) | Proteína (mgrs/0.5ml de extracto) | Actividad (U.A. x 10 <sup>5</sup> ) | Actividad específica (U.A./P) |
|------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| 00                                 | 25                | 0.635                             | 0.000                               | 0.000                         |
| 16                                 |                   | 0.813                             | 0.540                               | 6.642                         |
| 20                                 |                   | 0.620                             | 0.873                               | 14.081                        |
| 24                                 |                   | 0.590                             | 1.547                               | 26.220                        |
| 28                                 |                   | 0.650                             | 1.547                               | 23.800                        |
| 40                                 |                   | 0.694                             | 0.873                               | 12.579                        |
| 00                                 | 30                | 0.635                             | 0.000                               | 0.000                         |
| 16                                 |                   | 0.813                             | 1.210                               | 14.833                        |
| 20                                 |                   | 0.620                             | 1.210                               | 19.516                        |
| 24                                 |                   | 0.590                             | 2.220                               | 37.627                        |
| 28                                 |                   | 0.650                             | 2.557                               | 39.338                        |
| 40                                 |                   | 0.694                             | 1.547                               | 22.291                        |
| 00                                 | 35                | 0.635                             | 0.000                               | 0.000                         |
| 16                                 |                   | 0.813                             | 1.547                               | 19.028                        |
| 20                                 |                   | 0.620                             | 2.220                               | 35.806                        |
| 24                                 |                   | 0.590                             | 2.893                               | 49.033                        |
| 28                                 |                   | 0.650                             | 2.893                               | 44.503                        |
| 40                                 |                   | 0.694                             | 1.883                               | 27.133                        |
| 00                                 | 40                | 0.653                             | 0.000                               | 0.000                         |
| 16                                 |                   | 0.813                             | 1.883                               | 23.161                        |
| 20                                 |                   | 0.620                             | 3.230                               | 52.100                        |
| 24                                 |                   | 0.590                             | 4.237                               | 71.814                        |
| 28                                 |                   | 0.650                             | 5.892                               | 90.646                        |
| 40                                 |                   | 0.694                             | 2.557                               | 36.844                        |

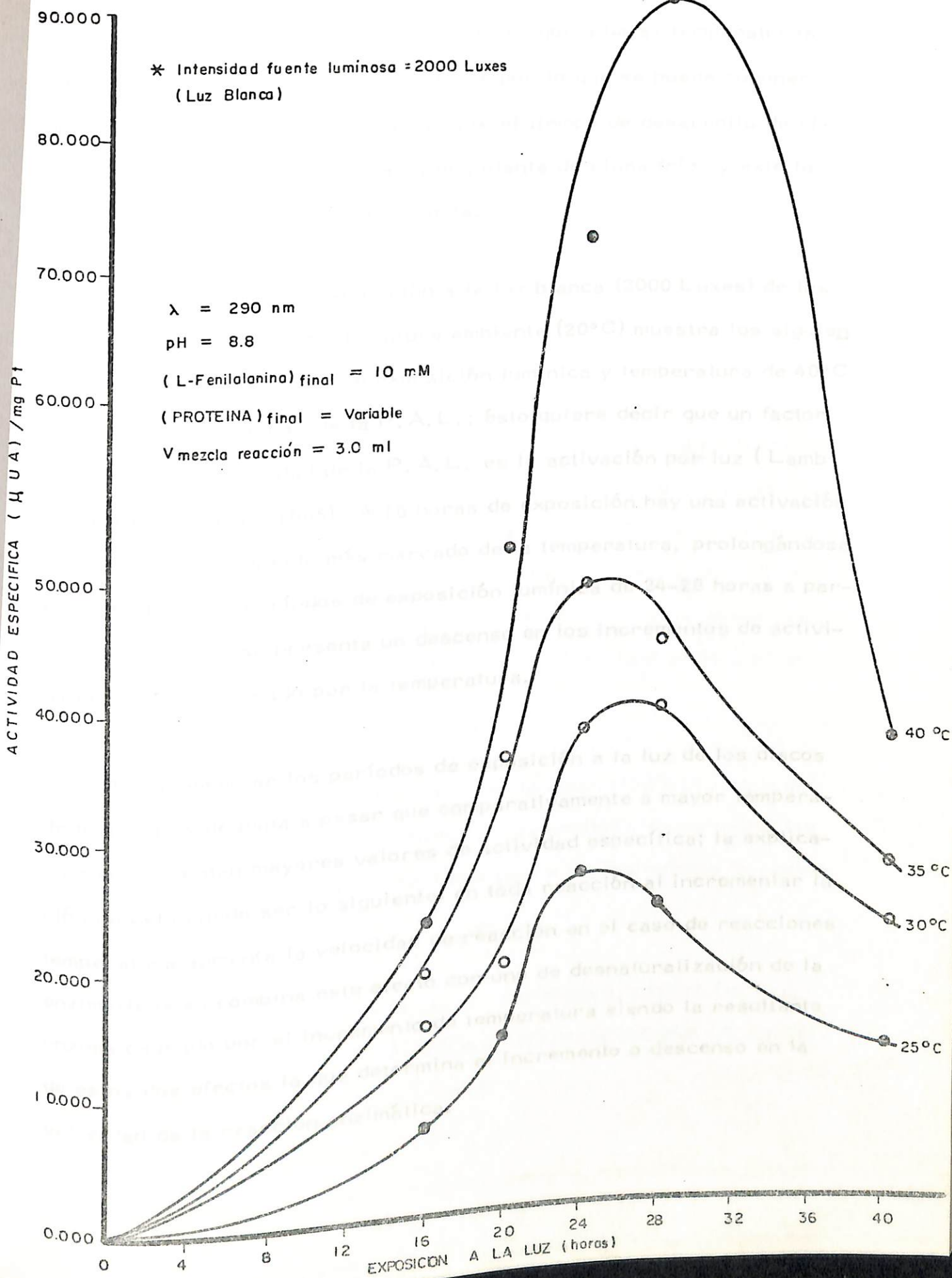
Luz blanca Intensidad 2000 luxes

U.A. (Unidad de actividad) = micromoles de ácido trans-cinámico producido por minuto

P = Proteína presente en 0.5 ml de extracto



# EFFECTO DE LA EXPOSICION PREVIA DE LOS DISCOS DE PAPA A LA LUZ \* SOBRE LA ACTIVIDAD DE PAL A DIFERENTES TEMPERATURAS 53 DE REACCION



La gráfica No. 2 nos muestra además que a bajas temperaturas también se presentan bajas actividades por lo que se puede suponer que esta enzima es poco activa durante el tiempo de desarrollo de vida del tubérculo dado que esta es una planta de clima frío, y este tubérculo no recibe iluminación directa.

Por otra parte la exposición a la luz blanca (2000 Luxes) de los discos del tubérculo a temperatura ambiente ( $20^{\circ}\text{C}$ ) muestra los siguientes resultados: a 0 horas de exposición lumínica y temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  no se detecta actividad de la P.A.L.; ésto quiere decir que un factor decisivo en la actividad de la P.A.L. es la activación por luz (Lamb et. al. 1979, Zucker 1965). A 16 horas de exposición hay una activación de la enzima y un efecto más marcado de la temperatura, prolongándose este efecto hasta períodos de exposición lumínica de 24-28 horas a partir de los cuales se presenta un descenso en los incrementos de actividad específica causado por la temperatura.

Al incrementar los períodos de exposición a la luz de los discos de tubérculos de papa a pesar que comparativamente a mayor temperatura se presentan mayores valores de actividad específica; la explicación de ésto puede ser lo siguiente: en toda reacción al incrementar la temperatura aumenta la velocidad de reacción en el caso de reacciones enzimáticas se combina este efecto con uno de desnaturalización de la enzima causado por el incremento de temperatura siendo la resultante de estos dos efectos la que determina el incremento o descenso en la velocidad de la reacción enzimática.

La enzima sobreexpuesta a la acción de la luz a tiempos de exposición lumínica mayores de 28 horas es más susceptible a desactivarse; lo que quiere decir que el efecto de la luz sensibiliza a la enzima a desnaturalizarse por acción de la temperatura en comparación con el máximo obtenido.

De los ensayos anteriores se observa que partiendo de discos de papa sabanera ( Solanum tuberosum var. Adnigenum ), se obtiene un período de exposición lumínico a luz blanca de 2000 Luxes óptimo dentro del intervalo de 24-32 horas el cual está acorde con los resultados de Zucker (1965) el que reporta un intervalo óptimo de 26-32 horas de exposición lumínica (1000 ft-c) . Además se corroboró que la temperatura presenta un efecto positivo sobre la actividad de P.A.L. en el intervalo de 25-40°C ; y por lo tanto la utilización de 40°C como temperatura de experimentación para las cinéticas enzimáticas lo cual está acorde a los reportes de Lamb et al (1976, 1979).

Por otra parte se establece que con la metodología utilizada por Martínez et . al (1981) es posible extraer la enzima y estos extractos pueden ser sometidos a cuantificación y que por consiguiente la acetona no insolubiliza la P.A.L.

### 3.2 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS DE LOS ENSAYOS EFECTUADOS A PARTIR DE HOJAS DE CAFETO.



Una vez comprobada la técnica de extracción y evaluación de la fenilalanina amonio-líasa por el método de polvos de acetona a partir de tubérculos de papa, esta metodología se aplicó a hojas de cafeto variedad Caturra de primeros y segundos pares, encontrándose que no fué posible la detección y evaluación de la actividad enzimática de la P.A.L. a partir de este material, datos que coinciden con los reportados por Martínez et. al. (1981).

Como no se trata de un efecto de insolubilización, de la enzima por acción de la acetona se puede suponer que en el caso del café la P.A.L. se extrae en forma inactiva y por lo tanto no es posible su determinación.

Se procedió en base a revisión bibliográfica a la utilización de 2-mercaptoetanol (Lamb et al. 1976, 1979, Smith et al. 1981) el cual se emplea al 1 % V/V en la acetona que se utiliza en la preparación de los polvos; con el fin de proteger los grupos S-H (Hanson et al 1972, Havir et al. 1968, Nari et al. 1974), para impedir la formación de enlaces S-S que modifiquen la estructura enzimática impidiendo por lo consiguiente la medida de su actividad, en el caso de que esta requiera de tioles libres para su actividad, o que rompa puentes S-S y libere la enzima activa.

Mediante la modificación anteriormente descrita sobre el método de extracción de la fenilalanina-amonio-líasa fué posible la determinación de su actividad espectrofotométricamente (como en el caso de tubérculos de papa), en hojas de cafeto de la variedad Caturra en



primeros y segundos pares se utilizó una temperatura de 40°C para la reacción enzimática ya que en ensayos anteriores se observó que esta ejerce un efecto positivo sobre la actividad enzimática de la P.A.L.; produciéndose cinéticas similares a las obtenidas a partir de tubérculos de papa (figura No. 8.).

Al comparar las condiciones de extracción utilizadas en los ensayos con tubérculos de papa en los cuales se detecta actividad enzimática previa activación por luz con las condiciones de extracción utilizadas por Martínez et al. (1981) era de esperar que si la P.A.L. está presente en hojas de cafeto también se presentara actividad ya que estas están sometidas a la acción de la luz en los cultivos; pero los resultados reportados por los autores anteriormente citados muestran lo contrario.

La diferencia entre la metodología utilizada por Martínez et al (1981), y con la que se consiguió detectar actividad de la fenilalanina amonio-liasa en este trabajo a partir de extractos de hojas de cafeto radica en la utilización del antioxidante 2-mercaptoetanol adicionado durante el proceso de preparación de los polvos de acetona.

El hecho de que no sea necesario involucrar en la preparación de los polvos de acetona a partir de tubérculos de papa 2-mercaptoetanol para la detección de actividad enzimática espectrofotométrica-

FIGURA No.8

# DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PAL EN EXTRACTOS DE HOJAS DE CAFETO EN PRESENCIA DE 2-MERCAPTO ETANOL

VARIEDAD CAFETO = CATURRA (VIOTA)

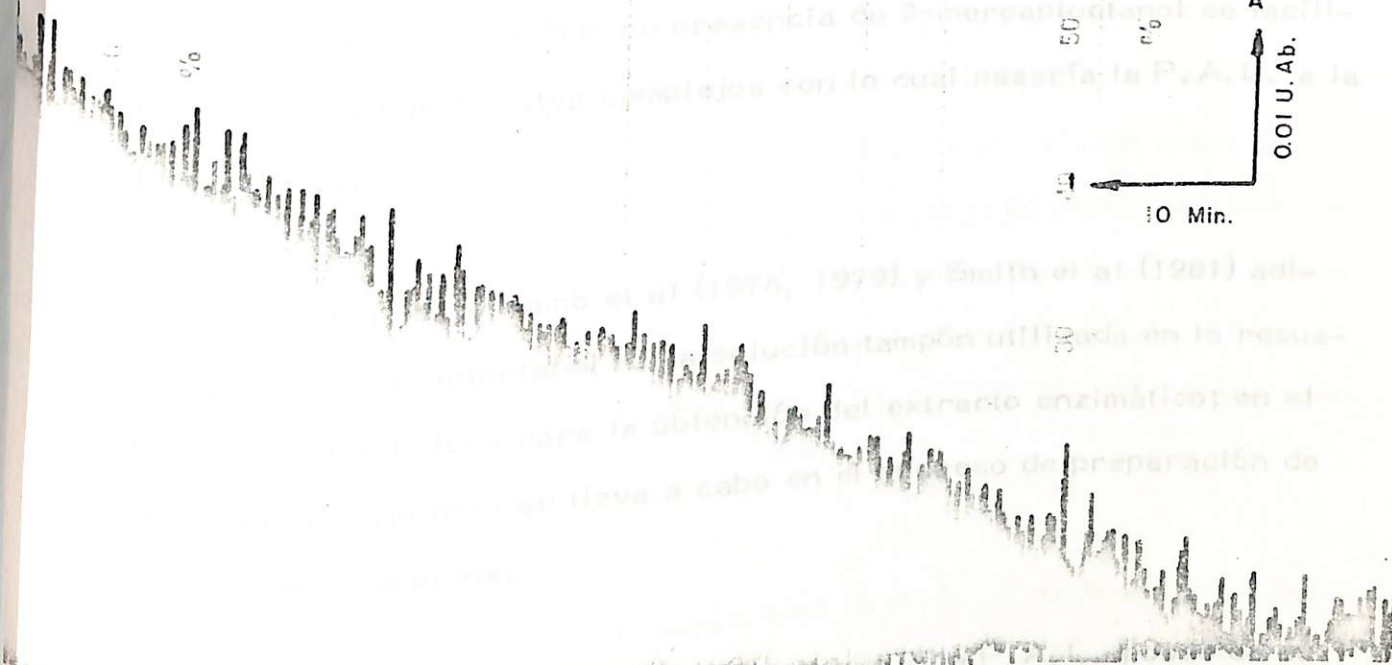
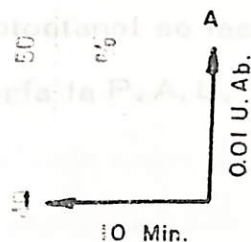
$\lambda = 290 \text{ nm}$

$T = 40^\circ \text{C}$

$[\text{L-FENILALANINA}]_{\text{final}} = 10 \text{ mM}$

$[\text{PROTEINA}]_{\text{final}} = 1.387 \text{ mg/ml}$

$V_{\text{mezcla reaccion}} = 3.0 \text{ ml}$



mente y que por el contrario este reactivo sea indispensable en la preparación de los polvos de acetona para poder detectar actividad en hojas de cafeto puede ser un indicio de sustancias inhibidoras de la actividad enzimática de la P.A.L. que están presentes en las hojas de cafeto formando un complejo con esta y no se presentan o se encuentran en niveles muy bajos en los tubérculos de papa; estos inhibidores pueden ser removidos en presencia de 2-mercaptoetanol, posiblemente por destrucción del complejo.

Mediante revisión bibliográfica se ha encontrado que la P.A.L. puede hallarse formando complejos con inhibidores (Hanson et al. 1981). Es posible por lo tanto que en presencia de 2-mercaptoetanol se facilite la destrucción de estos complejos con lo cual pasaría la P.A.L. a la forma activa.

Por otra parte Lamb et al (1976, 1979) y Smith et al (1981) adicionan el 2-mercaptoetanol en la solución tampón utilizada en la resuspensión de los polvos para la obtención del extracto enzimático; en el presente trabajo esto se lleva a cabo en el proceso de preparación de los polvos de acetona.

Debido a que existe la posibilidad de que la P.A.L. posee en su sitio activo grupos sulfhidrilo (S-H) dado que esta enzima es inhibida por el ácido para-cloromercurifenilsulfónico y por la iodoacetamida (Koukol et al. 1961) complejantes de grupos sulfhidrilo es posible que



el inhibidor posea grupos S-H y se encuentre unido a la proteína por puentes disulfuro ( S-S) los cuales serían destruidos por adición del 2-mercaptoetanol.

Además esto justificaría que el 2-mercaptoetanol en algunos casos actúe como activador de la P.A.L. ( O'Neal et al 1970).

Si se tiene en cuenta que la concentración de 2-mercaptoetanol en la solución de acetona (1 % V/V) la relación utilizada para la preparación del polvo de acetona es de 1:100 P/V y el segundo lavado se hace en relación 1:20 residuo/acetona , en la preparación del extracto se resuspende 1:100 en solución tampón de boratos y de este se toman 0.5 ml para un volumen final de 3 ml se puede ver claramente que la concentración de 2-mercaptoetanol presente en la mezcla de reacción es inferior a 0.305 mM por esto se puede descartar el efecto del 2-mercaptoetanol como antioxidante para evitar la formación de puentes disulfuro en la enzima durante la reacción. Luego su acción es más debida al paso de una forma inactiva (complejo con inhibidor) a una activa por rompimiento de puentes disulfuros.

Una vez determinada la presencia de la P.A.L. en hojas de cafeto se procedió a la estandarización de las condiciones de extracción para luego efectuar la estandarización de algunos parámetros.



### 3.2.1 Efecto de la fuerza iónica en la extracción enzimática de la fenilalanina amonio-liasa.

Con el fin de observar el efecto de la fuerza iónica de la solución tampón de boratos pH 8.8 en la extracción enzimática de la P.A.L. se efectuaron ensayos a partir de hojas de cafeto de la variedad Caturra del primer par y se utilizaron en la extracción enzimática soluciones tampón de boratos pH 8.8 0.05 y 0.1 M. Los datos reportados en la tabla III muestran que se presentan para las dos soluciones extractoras contenidos proteícos y actividades específicas totales del mismo orden; por consiguiente la fuerza iónica de la solución tampón de boratos a las concentraciones del ensayo no es un parámetro que tenga una influencia marcada en esta extracción por lo tanto en los ensayos posteriores se utilizará solución tampón de boratos 0.1M pH 8.8 en la extracción enzimática de la P.A.L.

### 3.2.2 Tiempo óptimo de agitación mecánica para la extracción enzimática de la fenilalanina amonio-liasa

Con el objeto de observar el efecto de el tiempo de resuspensión de los polvos de acetona provenientes de hojas de cafeto de la variedad Caturra del primer par, en solución tampón de boratos pH 8.8 0.1 M se efectuaron ensayos con tiempos de agitación mecánica de 15 y 60 minutos respectivamente (540 rpm).

EFFECTO DE LA FUERZA IONICA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA P.A.L. EN EXTRACTOS  
DE PRIMEROS PARES DE HOJAS DE CAFETO VARIEDAD CATURRA

| Variedad de Cafeto | Solución tampón de boratos pH 8.8 (moles/litro) | Proteína (mg/0.5 ml de extracto) | Actividad (U.A. $\times 10^5$ ) | Actividad específica ( $\mu$ U.A./mg P <sub>r</sub> ) | (%) Actividad específica |
|--------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------|
| C.V.1S             | 0.05                                            | 5.557                            | 8.725                           | 13.891                                                | 90.57                    |
| C.V.1R             |                                                 | 0.724                            | 0.908                           | 1.446                                                 | 9.43                     |
| Total (S+R)        |                                                 | 6.281                            | 9.633                           | 15.337                                                | 100.00                   |
| C.V.1S             | 0.10                                            | 5.483                            | 7.718                           | 12.930                                                | 72.52                    |
| C.V.1R             |                                                 | 0.486                            | 2.925                           | 5.900                                                 | 27.48                    |
| Total (S+R)        |                                                 | 5.969                            | 10.643                          | 17.830                                                | 100.00                   |

C = Caturra V = Viotá S = Primer Extracto 1 = Primeros pares de hojas de cafeto

R = Extracto proveniente de la resuspensión del residuo

P<sub>T</sub> = Proteína total en 0.5 ml de extracto

U.A. = (Unidad de actividad) = micromoles de ácido trans-cinámico producidos por minuto

Temperatura reacción = 40°C

La tabla IV muestra los resultados de este ensayo, a 15 minutos de agitación el contenido proteico del sobrenadante obtenido de la resuspensión del primer residuo es más del 50% del que se obtiene en el sobrenadante por lo consiguiente la extracción es deficiente. A 60 minutos de agitación mecánica el contenido proteico del sobrenadante del primer residuo corresponde aproximadamente al 2% del que se obtiene en el sobrenadante, y al analizar el sobrenadante de un segundo residuo dentro del mismo ensayo este ya no presenta ningún tipo de actividad y carece de proteína.

Al efectuar la comparación de las actividades específicas de los dos ensayos anteriores, se observa que a mayor tiempo de agitación, se obtiene un mayor porcentaje de actividad específica en el primer sobrenadante. Esto indica una mayor extracción, corroborándose este hecho con los porcentajes de actividad específica para cada uno de los sobrenadantes obtenidos a partir de los residuos.

De estos resultados el tiempo de extracción enzimática de la fenilalanina amonioliasa en solución tampón de boratos pH 8.8 0.1M a emplear en los posteriores ensayos es de 60 minutos y se efectuándose una sola extracción ya que el sobrenadante del primer residuo solo presenta el 6.36% de la actividad específica total.



TABLA IV

TIEMPO OPTIMO DE EXTRACCION ENZIMATICA DE LA P.A.L. A PARTIR DE EXTRACTOS  
DE PRIMEROS PARES DE HOJAS DE CAFETO VARIEDAD CATURRA

| Variedad de Cafeto  | Tiempo de Agitación minutos | Proteína (mg/0.5 ml de extracto) | Actividad (U.A x 10 <sup>5</sup> ) | Actividad específica (U.A/mg p) | (%) Actividad específica |
|---------------------|-----------------------------|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| C.V.1S              | 15                          | 2.598                            | 5.980                              | 13.597                          | 89.44                    |
| C.V.1R              |                             | 1.800                            | 0.706                              | 1.605                           | 10.56                    |
| Total (S+R)         |                             | 4.398                            | 6.686                              | 15.202                          | 100.00                   |
| C.V.1S              | 60                          | 4.665                            | 8.172                              | 17.143                          | 93.64                    |
| C.V.1R              |                             | 0.102                            | 0.555                              | 1.164                           | 6.36                     |
| C.V.1R <sub>2</sub> |                             | 0.000                            | 0.000                              | 0.000                           | 0.00                     |
| Total (S+R1)        |                             | 4.767                            | 8.727                              | 18.307                          | 100.00                   |

C = Caturra V = Viotá 1= Primeros Pares de Hojas S = Primer extracto

R<sub>n</sub> = Extracto proveniente de la resuspensión del residuo n

P<sub>T</sub> = Proteína total en 0.5 ml de extracto

U.A = (Unidad de actividad) = micromoles de ácido trans-cinámico producidos por minuto  
Temperatura de reacción = 40. °C.



### 3.2.3 Efecto de la pérdida de actividad enzimática de la fenilalanina amonio-liasa con el tiempo

Para poder saber el tiempo en el cual el extracto enzimático, mantenido en baño de hielo una vez extraído conserva la actividad específica observada inicialmente, se procedió a efectuar ensayos a partir de polvos de acetona provenientes de primeros pares de hojas de cafeto variedad Caturra los cuales se resuspendieron durante 60 minutos en solución tampón de boratos 0.1M, siguiendo la secuencia obtenida en la estandarización de parámetros.

Los datos reportados en la tabla V muestran que hay una pérdida de actividad enzimática aproximadamente del 29% respecto al control al cabo de 8 horas de preparado el extracto mientras que en períodos hasta de 4 horas este conserva su actividad original.

Lo anterior lleva a concluir que los períodos de determinación de la actividad específica de la fenilalanina amonio-liasa en ensayos a partir de un mismo extracto enzimático deben realizarse dentro de las 4 primeras horas donde la enzima es estable.

TABLA V

PERDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA P.A.L. CON EL TIEMPO EN EXTRACTOS  
 PROVENIENTES DE PRIMEROS PARES DE HOJAS DE CAFETO VARIEDAD CATURRA

| Variedad de cafeto | Tiempo posterior a la obtención al extracto (hr) | Proteína (mg/0.5 ml extracto) | Actividad (U.A $\times 10^5$ ) | Actividad específica ( $\mu$ U.A/mg P <sub>T</sub> ) | Actividad específica (%) |
|--------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------|
| C.V.1S             | 0.0                                              |                               | 8.172                          | 17.143                                               | 93.64 (control)          |
| C.V.1S             | 4.0                                              | 4.665                         | 8.172                          | 17.143                                               | 93.64                    |
| C.V.1S             | 8.0                                              |                               | 5.650                          | 11.852                                               | 64.74                    |
| C.V.1R             | 0.0                                              | 0.102                         | 0.555                          | 1.164                                                | 6.36                     |
| Total (S+R)        |                                                  | 4.767                         | 8.727                          | 18.307                                               | 100.00                   |

C = Caturra V = Viotá S = Primer extracto 1 = Primeros pares hojas de cafeto

R = Extracto proveniente de la resuspensión del sobrenadante

UA = (Unidad de actividad) = micromoles de ácido trans-cinámico producidos por minuto

P.T = Proteína total en 0.5 ml de extracto

Temperatura de reacción = 40°C

### 3.2.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la fenilalanina amonio-*liasa*

Con el fin de ver si la temperatura ejerce sobre la actividad enzimática de la P.A.L. en extractos obtenidos a partir de hojas de cafeto el mismo efecto que el presentado en extractos de tubérculos de papa, se realizaron ensayos en el intervalo de temperaturas de 25-40 °C utilizando como material vegetal hojas de cafeto variedad Caturra de primeros y segundos pares con el fin de comparar los niveles de actividad de la P.A.L. respecto a la edad y desarrollo de los tejidos ya que según revisión bibliográfica (Camm et al 1.973) este factor influye sobre los niveles de la fenilalanina amonio-*liasa*.

La tabla VI muestra que un aumento de temperatura conlleva a un incremento de actividad específica tanto en primeros como en segundos Pares de hojas de cafeto en el intervalo de 25-40°C (gráfica No.3), siendo mayor este efecto en primeros pares. Comparando los valores de actividad específica producidos por incrementos de 5°C en la temperatura a partir de 25°C se observa que en primeros pares los incrementos de actividad son del mismo orden de 25-30°C y de 30-35°C; mientras que de 35-40°C se presenta un aumento considerable (Figura No.9)

Por otra parte analizando el mismo efecto en segundos pares se ve que entre 25-30°C se presenta un incremento comparable al obtenido en



FIGURA No. 9  
VARIACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PAL PROVENIENTES DE EXTRACTOS  
DE HOJAS DE CAFETO EN FUNCION DE LA TEMPERATURA

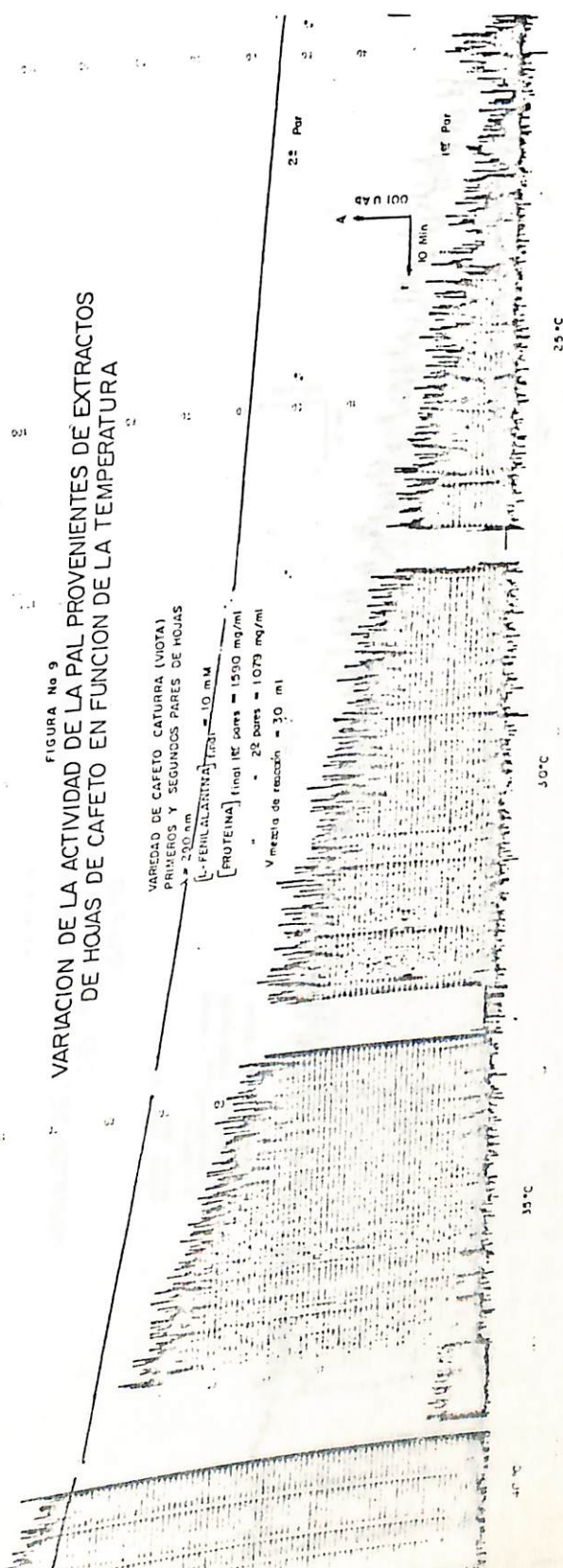




FIGURA No 10

Variedad Caturra (Vata)  
Primeros pases  
 $\lambda = 290 \text{ nm}$   
 $[L\text{-Fenilalanina}]_{\text{final}} = 10 \text{ mM}$   
 $[Proteína]_{\text{final}} = 1.928 \text{ mg/ml}$   
Volumen de reacción = 3.0 ml



TABLA VI

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA P.A.L. EN EXTRACTOS DE  
PRIMEROS Y SEGUNDOS PARES DE HOJAS DE CAFETO VARIEDAD CATURRA  
(VIOTA )

| Extracto<br>Soluble<br>par hojas | Temperatura<br>( ° C ) | Proteína<br>(mg/0.5ml<br>de extracto) | Actividad<br>(U.A.x10 <sup>5</sup> ) | Actividad<br>específica<br>( $\mu$ U.A/mg P) | $\Delta$ Actividad<br>específica/<br>5°C |
|----------------------------------|------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------|
| CV 1                             | 25                     |                                       | 1.447                                | 3.024                                        | 2.114                                    |
|                                  | 30                     | 4.769                                 | 2.445                                | 5.148                                        | 2.187                                    |
|                                  | 35                     |                                       | 3.498                                | 7.335                                        | 4.800                                    |
|                                  | 40                     |                                       | 5.787                                | 12.135                                       |                                          |
| CV2                              | 25                     |                                       | 0.605                                | 1.869                                        | 2.079                                    |
|                                  | 30                     | 3.237                                 | 1.278                                | 3.948                                        | 1.041                                    |
|                                  | 35                     |                                       | 1.615                                | 4.989                                        | 1.035                                    |
|                                  | 40                     |                                       | 1.950                                | 6.024                                        |                                          |
| Control 1 *                      |                        |                                       | 1.110                                | 2.041                                        | -                                        |

\* L a cinética control se dejó 4 horas y 30 minutos

C = Caturra

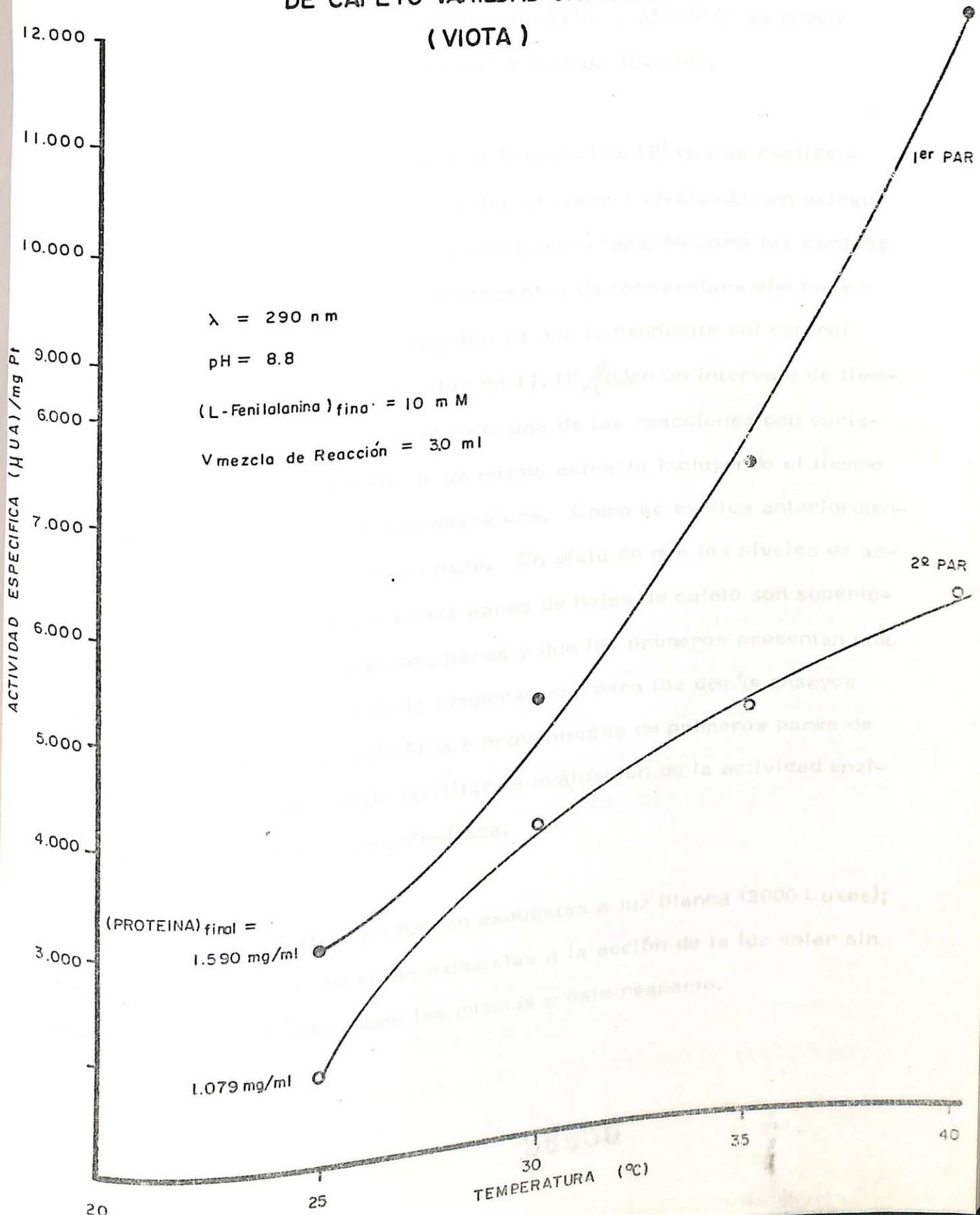
V = Viotá

1 = Primeros pares de hojas de cafeto

2 = Segundos pares de hojas de cafeto

U.A (Unidad de actividad) ; Micromoles de ácido trans-cinámico producidos por minuto

# EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA P.A.L. EN EXTRACTOS DE PRIMEROS Y SEGUNDOS PARES DE HOJAS DE CAFETO VARIEDAD CATURRA (VIOTA)



primeros pares, mientras que entre 30-35°C y 35-40°C es menor siendo constante el incremento en el rango de 30-40°C.

Respecto a la cinética control (Figura No. 10) que se realiza a 25°C, esta muestra un efecto similar al control efectuado con extractos de tubérculos de papa; ya que se observa también como los cambios de actividad son debidos a los incrementos de temperatura efectuados durante el desarrollo de la reacción ya que la pendiente del control permanece constante y en un valor de 11.10 ~~U~~. En un intervalo de tiempo mayor al gastado en realizar cada una de las reacciones con variación de temperatura a partir de un mismo extracto incluyendo el tiempo de estabilización entre cada temperatura. Como se explica anteriormente para el control efectuado en papa. En vista de que los niveles de actividad de la P.A.L. en primeros pares de hojas de cafeto son superiores a los obtenidos en segundos pares y que los primeros presentan una respuesta mejor al efecto de la temperatura, para los demás ensayos se utilizarán extractos enzimáticos provenientes de primeros pares de hojas de cafeto con el fin de facilitar la evaluación de la actividad enzimática de la fenilalanina amonio-~~liasa~~ liasa.

Las hojas de cafeto no fueron expuestas a luz blanca (2000 Luxes); ya que estas en el campo están expuestas a la acción de la luz solar sin ningún control ejercido sobre las mismas a este respecto.



### 3.2.5 Temperatura óptima para la estimación de la actividad de la fenilalanina amonio-*liasa*

Teniendo en cuenta que un factor importante en la determinación de la actividad enzimática de la P.A.L. es la temperatura (Lamb et al 1976, 1979) se efectuaron ensayos con el fin de encontrar aquella temperatura en la cual el extracto enzimático presente una mayor velocidad de reacción, utilizando para ello un mismo extracto en la mezcla de reacción proveniente de los primeros pares de hojas de cafeto variedad Caturra; y efectuando variación de temperatura en el intervalo de 30-58°C para un primer ensayo (Figura No. 11) y de 40-60°C para un segundo ensayo.

Estos resultados son reportados en la tabla VII; los cuales muestran para el primer ensayo que un incremento de temperatura conlleva a un incremento de la actividad específica de la P.A.L. en el intervalo de 30-45°C a partir del cual se presenta un descenso en el incremento de la actividad enzimática siendo más marcado este efecto en el intervalo de 53-55°C.

La disminución en la absorción del trans-cinámico registrado a 58°C lo cual produce una pendiente negativa en la cinética del ensayo se debe a que el producto de la reacción enzimática (ácido trans-cinámico) empieza a transformarse a otro compuesto que no absorbe en

Figura No. 11  
EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PAL  
PROVENIENTE DE PRUEBAS PARES DE HOJAS DE CAFETO  
VARIEDAD CATURA



| Temperatura (°C) | Actividad específica (A/mg F) |
|------------------|-------------------------------|
| 20               | 5.290                         |
| 30               | 5.915                         |
| 40               | 12.695                        |
| 50               | 15.869                        |
| 60               | 10.849                        |
| 70               | 10.371                        |
| 80               | 9.891                         |
| 90               | 4.293                         |
| 100              | 9.947                         |
| 110              | 9.076                         |
| 120              | 13.493                        |
| 130              | 12.740                        |
| 140              | 11.174                        |
| 150              | 3.022                         |

TABLA VII

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE PAL  
PROVENIENTE DE PRIMEROS PARES DE HOJAS DE CAFETO  
VARIEDAD CATURRA ( VIOTA )

| Temperatura | Proteína<br>(mg/0.5ml<br>de extracto) | Actividad<br>( U. A $\times 10^5$ ) | Actividad<br>específica<br>( $\mu$ U. A/mg<br>P ) |
|-------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 30          | 4.323                                 | 2.287                               | 5.290                                             |
| 35          |                                       | 2.557                               | 5.915                                             |
| 40          |                                       | 5.488                               | 12.595                                            |
| 45          |                                       | 6.860                               | 15.869                                            |
| 48          |                                       | 4.690                               | 10.849                                            |
| 50          |                                       | 4.440                               | 10.271                                            |
| 53          |                                       | 4.276                               | 9.891                                             |
| 55          |                                       | 1.856                               | 4.293                                             |
| 58          |                                       | -4.300                              | -9.947                                            |
| 40          | 5.781                                 | 5.247                               | 9.076                                             |
| 45          |                                       | 7.800                               | 13.492                                            |
| 50          |                                       | 7.365                               | 12.740                                            |
| 55          |                                       | 6.460                               | 11.174                                            |
| 60          |                                       | 1.747                               | 3.022                                             |

U. A (Unidad de actividad) = Micromoles de ácido trans-cinámico producidos por minuto

P = Proteína presente en 0.5 ml de extracto

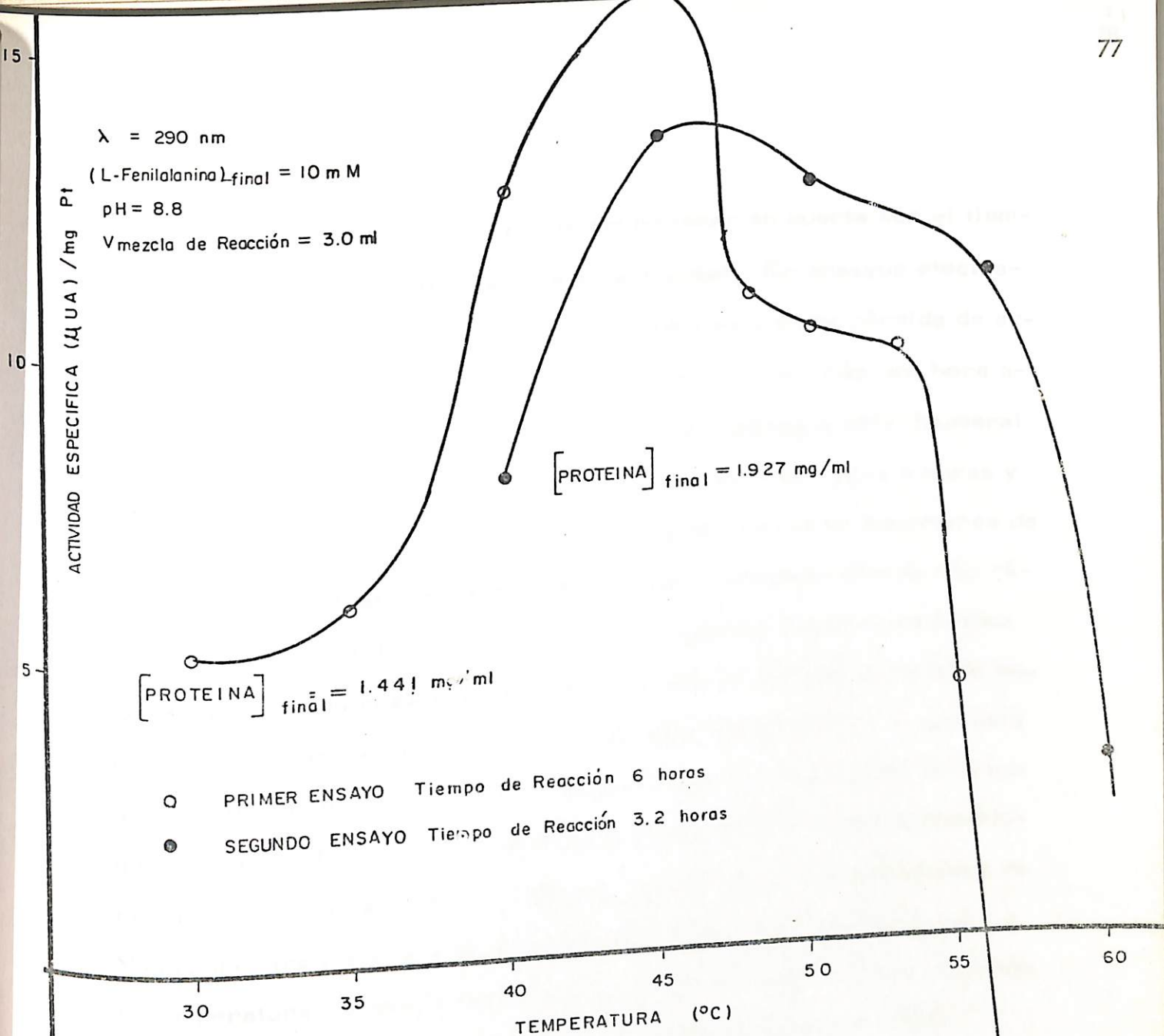
la misma región espectral, ya sea enzimáticamente o por otros mecanismos desconocidos que no son del caso analizar en el presente trabajo.

El segundo ensayo se efectúa a temperaturas comprendidas entre 40-60°C a intervalos de 5°C presentando un máximo en el mismo intervalo de temperatura del primer ensayo (45-60°C); a partir de este se observa un descenso en la actividad específica a medida que se incrementa la temperatura. Este segundo ensayo permite comprobar que el descenso de la actividad enzimática es debido al efecto de la temperatura sin descartar la posibilidad de una inhibición producida por el producto de reacción (ácido trans-cinámico), ya que en el primer ensayo el tiempo de reacción enzimática total es de 6 horas, gastándose un tiempo de 3.2 horas para alcanzar el máximo de actividad, mientras que en el segundo ensayo el tiempo de reacción enzimática total es de 3.2 horas lográndose el máximo de actividad en 1.6 horas.

La gráfica de actividad específica V/S temperatura (Gráfica No. 4) muestra como la temperatura es el factor de mayor influencia en la actividad enzimática ya que en ambos ensayos se presenta un máximo en el mismo intervalo de temperatura.

Si tuviese mayor influencia la acumulación del producto sobre la actividad enzimática de la P.A.L. que la temperatura, el máximo en el segundo ensayo se encontraría desplazado hacia temperaturas mayores.





GRAFICA No. 4  
 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE PAL  
 PROVENIENTES DE PRIMEROS PARES DE HOJAS DE CAFETO  
 VARIEDAD CATURRA(VIOTA)

Además otros factores que se deben tener en cuenta son el tiempo en el cual el extracto conserva su actividad. En ensayos efectuados manteniendo el extracto en baño de hielo existe una pérdida de actividad a partir de 4 horas de haberse obtenido éste, más una hora aproximadamente del tiempo de registro de la cinética a  $40^{\circ}\text{C}$  (numeral 3.2.3). Como en el primer ensayo la reacción total dura 6 horas y en el segundo 3.2 horas sometidas estas a temperaturas superiores de  $30^{\circ}\text{C}$ , es de esperar que en el primer caso el extracto pierda más rápidamente su actividad una vez haya alcanzado la temperatura óptima que en el segundo ensayo en el cuál el extracto enzimático ha sido expuesto un menor tiempo a temperaturas mayores de  $30^{\circ}\text{C}$ ; lo que esta acorde con Young et al (1966) quienes en estudios realizados en trigo analizaron el efecto del tiempo de exposición a temperaturas superiores a  $50^{\circ}\text{C}$  de la reacción enzimática de la P.A.L. Los resultados de Young muestran que la actividad enzimática desciende al incrementar la temperatura; y que la exposición durante 35 minutos de la reacción enzimática a  $60^{\circ}\text{C}$  conlleva a una pérdida de actividad del 100%.

En resumen tanto la temperatura mayor de  $50^{\circ}\text{C}$  como el tiempo de reacción enzimática pueden conllevar a una pérdida de actividad de la proteína aumentando la velocidad de desnaturalización.

De la discusión anterior y teniendo en cuenta que se presenta un máximo en  $45^{\circ}\text{C}$  se toman  $40^{\circ}\text{C}$  como temperatura de trabajo ya que en ésta es fácilmente evaluable la actividad específica de la fenilalanina

amonio-liasa; produciéndose una pérdida menor en la actividad de la P.A.L. por tiempo de exposición del extracto enzimático a temperaturas elevadas que si se realizaran los ensayos a 45°C.

### 3.2.6 Comparación de los niveles enzimáticos de la fenilalanina amonio-liasa en extractos de primeros pares de hojas de cuatro variedades de cafeto

Se realizan ensayos con el fin de determinar si existen diferencias de los niveles de actividad enzimática de la P.A.L. entre variedades de cafeto resistentes (grupo fisiológico A), y las variedades susceptibles (grupo fisiológico E) a la roya del cafeto Hemileia vastatrix Berk. & Br. .

Los resultados reportados en la tabla VIII, muestran los valores de actividad específica obtenidos a partir de extractos de primeros pares de *hojas de cafeto* de las variedades Caturra, Híbrido de Timor, Catimor A y Catimor E.

Si se comparan los niveles de actividad enzimática de la P.A.L. de las variedades progenitoras (Caturra (E), e Híbrido de Timor (A); se puede ver que la actividad específica obtenida es mayor para aquella variedad que posee caracteres de resistencia y un valor menor para la que se considera susceptibles. Por otra parte analizando los va-



TABLA VIII

COMPARACION DE NIVELES ENZIMATICOS DE P. A. L. EN EXTRACTOS DE PRIMEROS PARES  
DE CUATRO VARIETADES DE CAFETOS

| Variedad<br>Cafeto | Proteína<br>(mg/0.5ml<br>de extracto) | Proteína<br>(%) | Actividad<br>(U. A $\times 10^5$ ) | Actividad<br>específica<br>(U. A/mg P <sub>T</sub> ) | Actividad<br>específica<br>(%) |
|--------------------|---------------------------------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------|
| C. Ch. S           | 4.160                                 | 90.99           | 4.808                              | 10.516                                               | 100.00                         |
| C. Ch. R           | 0.412                                 | 9.01            | 0.000                              | 0.000                                                | 0.00                           |
| Total (S+R)        | 4.572                                 | 100.00          | 4.808                              | 10.516                                               | 100.00                         |
| HT. Ch. S          | 2.464                                 | 87.04           | 3.800                              | 13.423                                               | 75.85                          |
| HT. Ch. R          | 0.367                                 | 12.96           | 1.210                              | 4.274                                                | 24.15                          |
| Total (S+R)        | 2.831                                 | 100.00          | 5.010                              | 17.697                                               | 100.00                         |
| CA. Ch. S          | 4.561                                 | 89.57           | 17.592                             | 34.548                                               | 64.65                          |
| CA. Ch. R          | 0.531                                 | 10.43           | 9.617                              | 18.886                                               | 35.35                          |
| Total (S+R)        | 5.092                                 | 100.00          | 27.209                             | 53.434                                               | 100.00                         |
| CE. Ch. S          | 5.870                                 | 90.24           | 3.800                              | 5.842                                                | 86.27                          |
| CE. Ch. R          | 0.635                                 | 9.76            | 0.605                              | 0.930                                                | 13.73                          |
| Total (S+R)        | 6.505                                 | 100.00          | 4.405                              | 6.773                                                | 100.00                         |

C = Caturra HT = Híbrido de Timor CA = Catimor A CE = Catimor E  
Ch = Chinchiná

S = Primer extracto R = Extracto proveniente de la resuspensión del primer residuo

P<sub>T</sub> = Proteína total en 0.5 ml de extracto

U. A = Micromoles de ácido trans-cinámico producidos por minuto

Temperatura: de reacción = 40 °C

Nota: Los extractos provenientes de la resuspensión del segundo residuo no presentaron actividad y carecen de contenido proteico.



lores de actividad específica de los dos híbridos obtenidos a partir de los progenitores anteriormente mencionados como se observa que el híbrido que posee caracteres de resistencia presenta un nivel de actividad enzimática mayor a aquel que presenta caracteres de susceptibilidad.

Si se comparan los niveles de actividad de las variedades resistentes y susceptibles se observa que en las variedades consideradas como resistentes (grupo fisiológico A) se presenta un mayor nivel de actividad específica de la P.A.L. en la variedad mejorada (Catimor A) en comparación al progenitor resistencia (Híbrido de Timor).

Al comparar los valores de actividad específica de las variedades susceptibles; son más altos los valores de actividad específica en el progenitor (Caturra) que en la variedad descendiente (Catimor E). De lo anterior se obtiene la siguiente escala respecto a la actividad específica en orden descendiente: Catimor A ( $53.434 \mu\text{U}/\text{mg P}_T$ ), Híbrido de Timor ( $17.697 \mu\text{U}/\text{mg P}_T$ ), A Caturra ( $10.516 \mu\text{U.A.}/\text{mg P}_T$ ) y Catimor E. ( $6.772 \mu\text{U.A.}/\text{mg P}_T$ ) Es de anotar que los mayores niveles de actividad se presentan en las variedades resistentes pudiéndose tomar este hecho como un indicio de que la P.A.L. es una enzima importante en los mecanismos de defensa del cafeto contra la roya; sin olvidar que los niveles de actividad enzimática obtenidos son del orden de microunidades; aunque pueda que estos niveles aumentan la presencia de la infec-

ción fúngica (Hanson et al. 1981) .

En los ensayos posteriores para la optimización de parámetros se utilizaron polvos de acetona provenientes de primeros pares de la variedad mejorada Catimor A por ser más fácilmente evaluable la actividad específica de la fenilalanina amonio-*liasa*.

### 3.2.7 Efecto de la concentración del sustrato L-fenilalanina sobre la actividad de la fenilalanina amonio-*liasa*

Una vez optimizados algunos de los parámetros para la evaluación de la actividad enzimática de la fenilalanina amonio-*liasa* y puesto que esta enzima es inhibida por el producto de la reacción enzimática (ácido trans-cinámico) debe escogerse una concentración adecuada del sustrato L-fenilalanina para las condiciones del ensayo con el fin de que el ácido trans-cinámico producido no alcance niveles en los cuales pueda actuar como inhibidor (Iridali et al 1974, Koukol et al. 1961, o'Neal et al. 1969).

La tabla IX reporta los valores de actividad específica de la P. A.L. utilizando concentraciones del sustrato L-fenilalanina en el intervalo de 0.5-9.0 mM (Figura No. 12) . La gráfica de actividad específica v/S concentración de L-fenilalanina (gráfica No. 5) muestra como la parte inicial de la curva hasta concentraciones de sustrato 4 mM se ajusta a una cinética de Michaelis -Menten observándose a con-

TABLA IX

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE L-FENILALANINA SOBRE  
LA ACTIVIDAD DE PAL PROVENIENTE DE EXTRACTOS DE  
HOJAS DE CAFETO PRIMEROS PARES VARIEDAD CA-  
TIMOR A (CHINCHINA)

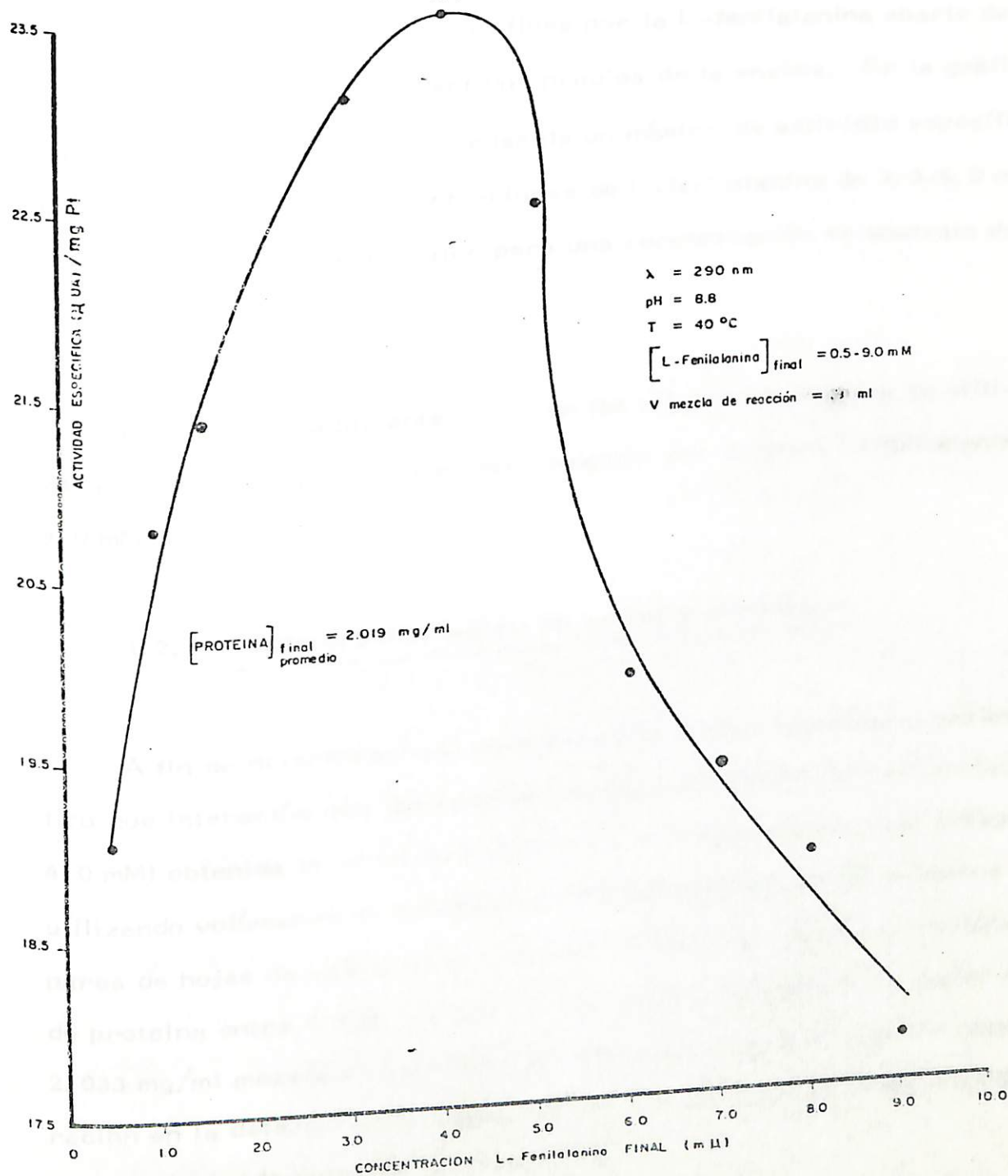
| L-fenilalanina<br>concentración<br>final (mM). | Proteína<br>(mg/0.5 ml<br>de extracto) | Actividad<br>(U.A. $\times 10^5$ ) | Actividad<br>específica<br>(U.A./mg P) |
|------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| 0.5                                            | 5.751                                  | 10.963                             | 19.063                                 |
| 1.0                                            |                                        | 11.970                             | 20.814                                 |
| 1.5                                            |                                        | 12.307                             | 21.400                                 |
| 3.0                                            |                                        | 13.317                             | 23.156                                 |
| 4.0                                            |                                        | 14.997                             | 26.077                                 |
|                                                |                                        |                                    |                                        |
| 5.0                                            | 6.361                                  | 14.327                             | 22.523                                 |
| 6.0                                            |                                        | 12.643                             | 19.876                                 |
| 7.0                                            |                                        | 12.307                             | 19.348                                 |
| 8.0                                            |                                        | 11.970                             | 18.818                                 |
| 9.0                                            |                                        | 11.300                             | 17.764                                 |
|                                                |                                        |                                    |                                        |

U.A (Unidad de actividad) = micromoles de ácido transcinámico produ-  
cidos por minuto

Temperatura reacción = 40°C

P = Proteína en 0.5 ml de extracto

GRAFICA No. 5  
 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE L-FENILALANINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE  
 PAL PROVENIENTES DE HOJAS DE CAFETO PRIMEROS PARES VARIEDAD  
 CATIMOR A (CHINCHINA)





centraciones superiores de sustrato una inhibición por exceso de L-fenilalanina, lo cual indica la posibilidad de que la enzima posea en su estructura uno o más sitios afines por la L-fenilalanina aparte del sitio activo o de los sitios activos propios de la enzima. En la gráfica No. 5. se observa que se presenta un máximo de actividad específica en el intervalo de concentraciones de L-fenilalanina de 3.0-5.0 mM presentándose el máximo valor para una concentración de sustrato de 4mM.

De los resultados anteriores en los siguientes ensayos se utilizará por lo consiguiente una concentración del sustrato L-fenilalanina. 4.0 mM.

### 3.2.8 Concentración óptima de extracto enzimático

A fin de determinar una concentración óptima de extracto enzimático que interactúe con las cantidad de sustrato óptimo (L-fenilalanina 4.0 mM) obtenida en el ensayo anterior ; se procede a efectuar ensayos utilizando volúmenes de extracto enzimático proveniente de primeros pares de hojas de cafeto de la variedad Catimor A, de concentraciones de proteína entre 0.339 - 2.372 mg/3ml mezcla de reacción a partir de 2.033 mg/ml mezcla de reacción se presentan interferencias por coloración en la determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática produciendo datos no tan confiables.

La tabla X muestra que se presenta un máximo en la velocidad de reacción para un volumen de extracto de 0.5 ml el cual corresponde a 1.694 mg de proteína referida a 3.0 ml del volumen de la mezcla de reacción (Ver gráfica No. 6).

Estos ensayos conllevan a la utilización de 1.694 mg de proteína en 3.0 ml de la mezcla de reacción; para una concentración del sustrato (L-fenilalanina) final de 4.0 mM.

### 3.2.9 Ultrafiltración a través de membrana de amicon 100.000 D de extractos de primeros pares de hojas de cafeto variedad Caturra

Una vez optimizados los parámetros que permiten una evaluación óptima de la actividad enzimática de la P.A.L., se procede a purificar el extracto enzimático a través de membrana de Amicon 100.000 Daltons (D), con el fin de eliminar sustancias interferentes; ya sea que actúen como inhibidores enzimáticos o que de una u otra forma interfieran en la evaluación espectrofotométrica de la actividad de la fenilalanina amonio-liase. Además esto permite saber si la proteína que produce la actividad posee un peso molecular superior a 100.000 D.

El ensayo se efectúa utilizando extracto de primeros pares de hojas de cafeto variedad Caturra. La tabla XI muestra las actividades

TABLA X

ESTANDARIZACION DE CONDICIONES OPTIMAS DE CONCENTRACION  
DE EXTRACTO ENZIMATICO PARA LA DETERMINACION DE LA  
ACTIVIDAD DE PAL EN PRIMEROS PARES DE HOJAS DE  
CAFETO VARIEDAD CATIMOR A (CHINCHINA)

| Extracto<br>(ml) | Proteína<br>mg                  | Actividad<br>(U. A $\times 10^5$ ) | Actividad<br>específica<br>(U. A/mg<br>P) |
|------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------|
|                  | 3 ml de mezcla de reac-<br>ción |                                    |                                           |
| 0.1              | 0.339                           | 1.547                              | 15.226                                    |
| 0.2              | 0.678                           | 3.227                              | 15.873                                    |
| 0.3              | 1.016                           | 5.583                              | 18.311                                    |
| 0.4              | 1.355                           | 7.263                              | 17.863                                    |
| 0.5              | 1.694                           | 9.280                              | 18.260                                    |
| 0.6              | 2.033                           | 7.908                              | 12.968                                    |
| 0.7              | 2.372                           | 7.937                              | 11.155                                    |

U. A (Unidad de actividad) = micromoles de ácido trans-cinámico produ-  
cido por minuto

P = P proteína en 0.5 ml de extracto



ESTANDARIZACION DE CONDICIONES OPTIMAS DE CONCENTRACION  
DE EXTRACTO ENZIMATICO PARA LA DETERMINACION DE LA  
ACTIVIDAD DE PAL EN PRIMEROS PARES DE HOJAS DE  
CAFETO VARIEDAD CATIMOR A (CHINCHINA)

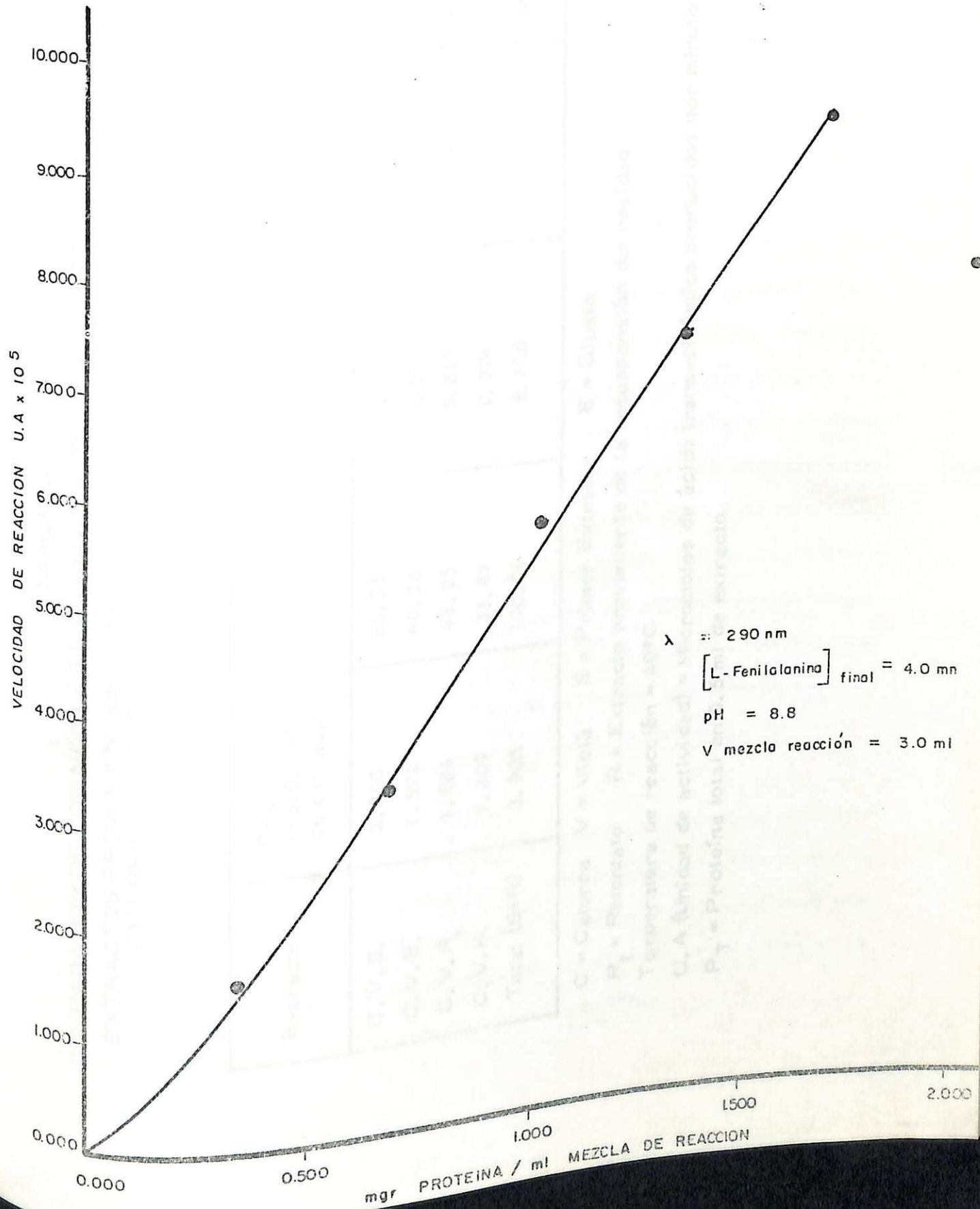




TABLA XI

COMPARACION DE LOS NIVELES ENZIMATICOS DE PAL EN DIFERENTES FRACCIONES DE  
EXTRACTOS PROVENIENTES DE PRIMEROS PARES DE HOJAS DE CAFETO VARIEDAD  
CATURRA (VIOTA) OBTENIDOS CON ULTRA FILTRACION POR AMICON

100.000 D

| Extracto           | Proteína<br>(mg/0.5ml<br>de extracto) | Proteína<br>(%) | Actividad<br>(U. A $\times 10^5$ ) | Actividad<br>específica<br>(U. A/mg P <sub>T</sub> ) | Actividad<br>específica<br>(%) |
|--------------------|---------------------------------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------|
| C.V.S.             | 2.598                                 | 66.53           | 5.980                              | 15.314                                               | 89.44                          |
| C.V.E.             | 1.572                                 | 40.26           | 0.000                              | 0.000                                                | 0.00                           |
| C.V.R <sub>t</sub> | 1.884                                 | 48.25           | 5.817                              | 14.896                                               | 87.00                          |
| C.V.R.             | 1.307                                 | 33.47           | 0.706                              | 1.808                                                | 10.56                          |
| Total (S+R)        | 3.905                                 | 100.00          | 6.686                              | 17.122                                               | 100.00                         |

C = Caturra V = Viotá S = Primer Extracto E = Eluato

R<sub>t</sub> = Retentato R = Extracto proveniente de la resuspensión del residuo

Temperatura de reacción = 40°C

U. A (Unidad de actividad) = Micromoles de ácido trans-cinámico producidos por minuto

P<sub>T</sub> = Proteína total en 0.5 ml de extracto

enzimáticas y los contenidos proteícos del sobrenadante (extracto crudo) , y del sobrenadante proveniente de la resuspensión del primer residuo los cuales presentan un 89.44 % y un 10.56 % de la actividad específica total respectivamente. Al pasar conjuntamente a través de la membrana de Amicon alícuotas iguales del sobrenadante y del sobrenadante proveniente de la resuspensión del primer residuo se obtiene un eluato (peso molecular menor de 100.000 D) y un retentato (peso molecular superior a 100.000 D) los cuales se llevan al volumen original de una de las alícuotas obteniéndose que el eluato no presenta ningún tipo de actividad; mientras que el retentato presenta el 87 % de la actividad específica total; presentándose una pérdida del 13 % en la actividad específica la que puede ser producida por el tiempo empleado en la ultrafiltración, ya que tratándose de membranas con un tamaño de poro tan pequeño el tiempo requerido para esta operación con los lavados que se le efectúan al retentato constituyen un tiempo de operación de aproximadamente 6 horas que de acuerdo con el ensayo reportado en el numeral 3.2.3 se pierde un % de actividad que puede corresponder a parte de la pérdida de actividad que presenta el retentato respecto a la actividad específica total del ensayo.

Además comparando la suma de los contenidos proteícos del eluato y del retentato con el del contenido proteíco total se obtienen que la suma de los primeros es el 88.51 % de la proteína total; existiendo una pérdida del 11.49 % la cual puede deberse a pérdidas producidas en la manipulación durante el proceso de ultrafiltración.

De lo anterior se concluye que la actividad es producida por la fracción protéica de peso molecular superior a 100.000 D; la cual está acorde a lo reportado en la literatura (Camm et al. 1977); la que reporta un peso molecular de 330.000 D para la fenilalanina amonoliasa correspondiendo esta al 48.25 % del contenido proteico total.

3.2.10 Ultrafiltración a través de membrana de amicon 300.000D  
de extractos de primeros pares de hojas de variedades  
de cafeto resistentes y susceptibles a la Hemileia vasta-  
trix Berk & Br

Con el fin de comparar los niveles de actividad de la fenilalanina amonoliasa en dos variedades de cafeto susceptibles (Caturra y Catimor E) y dos resistentes (Híbrido de Timor y Catimor A) a la roya del cafeto Hemileia vastatrix Berk & Br. se preparan extractos a partir de primeros pares de hojas de cada una de éstas.

Se determinaron las actividades tanto en el sobrenadante como en el sobrenadante obtenido a partir de la resuspensión del primer residuo para cada variedad siendo la suma de estas dos lo que constituye la actividad específica total.

Se toman alícuotas iguales tanto del sobrenadante como del sobrenadante obtenido a partir de la resuspensión del primer residuo y se



pasan conjuntamente a través de una membrana de amicon de 300.000 Daltons (D) llevando al volumen original de una de ellas tanto el retentato (Fracción de peso molecular mayor de 300.000 D) como el eluato (Fracción de peso molecular menor de 300.000 D).

Los datos reportados en la tabla XII muestran los resultados del ensayo anteriormente descrito para variedades de cafeto provenientes de las localidades: Viotá (Caturra) y Chinchiná (Caturra, Híbrido de Timor, Catimor A y Catimor E).

Al efectuar comparación de los valores de actividad específica total obtenidos en las cuatro variedades se observa que la secuencia en orden decreciente de actividad específica total es la siguiente: Catimor, A, Híbrido de Timor, Caturra y Catimor E; lo cual corrobora los resultados reportados en la tabla VIII.

Por otra parte las actividades específicas totales obtenidas para la variedad Caturra provenientes de Chinchiná y Viotá respectivamente presentan niveles de actividad más o menos del mismo orden lo cual muestra que los niveles enzimáticos de la P.A.L. son debidos a las características agronómicas de la variedad y no a las condiciones del cultivo.



Al analizar las fracciones en las cuales se presenta actividad *estas son producidas por aquellas que poseen pesos moleculares superiores a 300.000 D (retentato) en cada una de las variedades no* detectándose ninguna actividad en las fracciones de peso molecular inferior a 300.000D (Eluato); lo cual comprueba que la actividad específica es producida por una proteína que posee un peso molecular superior a 300.000D dato que corroboraría el peso molecular promedio reportado de 330.000D (Havir et al. 1968).

Se observa además por los datos reportados en la tabla XII que la operación de ultrafiltración conlleva a pérdidas por las razones dadas en el numeral 3.2.9.

Un hecho sobresaliente son los datos reportados para el Catimor E los cuales muestran que al pasar el extracto enzimático a través de la membrana de Amicón de 300.000D, se produce un incremento del 81.38% de la actividad específica total lo cual puede ser debido a que en el proceso de ultrafiltración es eliminada una sustancia que actúa como inhibidor enzimático de la fenilalanina amonio-liasa.

TABLA XII

COMPARACION DE LOS NIVELES ENZIMATICOS DE PAL EN DIFERENTES FRACCIONES DE  
EXTRACTOS PROVENIENTES DE PRIMEROS PARES DE HOJAS DE CUATRO VARIEDADES  
DE CAFETO OBTENIDAS CON ULTRAFILTRACION POR AMICON 300.000 D

| Variedad<br>Cafeto    | Proteína<br>(mg/0.5ml de<br>extracto) | Proteína<br>(%) | Actividad<br>(U.Ax10 <sup>5</sup> ) | Actividad<br>Específica<br>U.A./mgP | Actividad<br>específica<br>total U.A./<br>mf PT | Actividad<br>Específica<br>% |
|-----------------------|---------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------|
| C.V.S.                | 3.907                                 | 87.86           | 5.985                               | 15.319                              | 13.459                                          | 90.35                        |
| C.V.E.                | 0.982                                 | 22.08           | 0.000                               | 0.000                               | 0.000                                           | 0.00                         |
| C.V.R.t.              | 2.886                                 | 64.45           | 5.145                               | 17.827                              | 11.569                                          | 88.41                        |
| C.V.R                 | 0.540                                 | 12.14           | 0.639                               | 11.833                              | 1.437                                           | 9.65                         |
| Totales(S+R)          | 4.447                                 | 100.00          | 6.624                               |                                     | 14.896                                          | 100.00                       |
| C.Ch.S                | 4.160                                 | 99.57           | 4.910                               | 11.803                              | 11.752                                          | 100.00                       |
| C.Ch.E                | 1.512                                 | 36.19           | 0.000                               | 0.000                               | 0.000                                           | 0.00                         |
| C.Ch.R <sub>t</sub>   | 2.345                                 | 56.13           | 3.900                               | 16.631                              | 9.334                                           | 79.42                        |
| C.Ch.R <sub>t</sub>   | 0.018                                 | 0.43            | 0.000                               | 0.000                               | 0.000                                           | 0.00                         |
| Total (S+R)           | 4.178                                 | 100.00          | 4.910                               |                                     | 11.752                                          | 100.00                       |
| HT.Ch.S               | 3.832                                 | 99.48           | 6.253                               | 16.318                              | 16.233                                          | 100.00                       |
| HT.Ch.E               | 0.888                                 | 23.05           | 0.000                               | 0.000                               | 0.000                                           | 0.00                         |
| HT.Ch.R <sub>t</sub>  | 2.806                                 | 72.84           | 3.230                               | 11.511                              | 8.385                                           | 51.65                        |
| HT.Ch.R <sub>t</sub>  | 0.020                                 | 0.52            | 0.000                               | 0.000                               | 0.000                                           | 0.00                         |
| Total (S+R)           | 3.852                                 | 100.00          | 6.253                               |                                     | 16.233                                          | 100.00                       |
| C.A.Ch.S              | 3.773                                 | 100.00          | 13.653                              | 36.186                              | 36.186                                          | 100.00                       |
| C.A.Ch.E              | 1.110                                 | 29.42           | 0.000                               | 0.000                               | 0.000                                           | 0.00                         |
| C.A.Ch.R <sub>t</sub> | 1.929                                 | 51.13           | 9.953                               | 51.597                              | 26.380                                          | 72.90                        |
| C.A.Ch.R <sub>t</sub> | 0.000                                 | 0.00            | 0.000                               | 0.000                               | 0.000                                           | 0.00                         |
| Total (S+R)           | 3.773                                 | 100.00          | 13.653                              |                                     | 36.186                                          | 100.00                       |
| C.E.Ch.S              | 6.628                                 | 98.59           | 2.893                               | 4.365                               | 4.303                                           | 100.00                       |
| C.E.Ch.E              | 1.364                                 | 20.29           | 0.000                               | 0.000                               | 0.000                                           | 0.00                         |
| C.E.Ch.R <sub>t</sub> | 5.543                                 | 82.45           | 5.247                               | 9.466                               | 7.805                                           | 181.38                       |
| C.E.Ch.R <sub>t</sub> | 0.095                                 | 1.41            | 0.000                               | 0.000                               | 0.000                                           | 0.00                         |
| Total (S+R)           | 6.723                                 | 100.00          | 2.893                               |                                     | 4.303                                           | 100.00                       |

## Notas Tabla XI!

- C = Caturra HT = Hídrido de Timor CA = Catimor A CE = Catimor E  
 V = Viotá CH = Chinchiná S = Primer Extracto E = Eiuato  
 R = Extracto proveniente de la resuspensión del primer residuo  $R_t = re$   
 tentando  
 U.A = (Unidad de actividad) micromoles de ácido trans-cinámico produci  
 dos por unidad.  
 $P_T$  = Proteína total en 0.5 ml de extracto P = Proteína  
 Temperatura de reacción =  $40^{\circ}\text{C}$   
 Nota: Los extractos provenientes de la resuspensión del segundo residuo no  
 presentaron actividad y carecen de contenido protéico

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con el presente trabajo se demuestra que el *tratamiento* de las hojas con acetona no es en sí la causa de la inactivación de la P.A.L. en hojas de cafeto como lo afirma W. Moraes en su comunicación personal con el L. I. Q. C. (Martínez et al. 1981) ya que este mismo método aplicado a tubérculos de papa da resultados comparables a los reportados en la literatura.

Una de las causas que impide su determinación en polvos de acetona provenientes de hojas de cafeto puede ser la existencia en este material de complejos enzima-Inhibidor, los cuales ya han sido sugeridos para esta enzima en otros materiales (Hanson et al. 1981).

Una base que refuerza la anterior hipótesis son los resultados obtenidos en este trabajo mediante el uso de 2-mercaptoetanol durante el proceso de preparación de los polvos de acetona, que permite determinar y cuantificar la P.A.L. a partir de este tipo de material.

El diseño y estandarización de esta nueva técnica permite utilizar para el caso de la P.A.L. las ventajas que ofrece en estudios bioquímicos la utilización de materiales homogéneos como fuentes enzimáticas.

El hecho de que el 2-mercaptoetanol no sea indispensable durante la reacción misma indica que su papel no es el impedir la formación de puentes disulfuro intra moleculares, sino la de facilitar la producción de una P.A.L. activa a partir de una forma inactiva.

Este argumento es también aplicable para los resultados encontrados por otros autores que realizan la reacción en presencia de este reactivo.

Un estudio que se sugiere para aclarar el efecto del 2-mercaptoetanol es realizar electroforesis comparativas del extracto enzimático proveniente de polvos de acetona preparados en presencia y ausencia de este reactivo.

Otro estudio complementario será el establecer sí en extractos preparados a partir de polvos de acetona excentos de 2-mercaptoetanol se logra obtener actividad mediante la adición posterior de este antioxidante.

La concentración del sustrato (L-fenilalanina) óptimo para las condiciones utilizadas en este trabajo es de 4.m.M, presentándose un efecto inhibidor a concentraciones superiores, lo cual indica que además del sitio activo hay otros sitios que presentan afinidad por el sustrato causando una variación en la estructura del sitio activo.

Las variedades de cafeto resistentes como lo son el Catimor A y el Híbrido de Timor presentan niveles de P.A.L. superiores a los encontrados en las variedades susceptibles, lo cual puede ser un indicio de la existencia de una relación entre los niveles de esta enzima y los caracteres de resistencia.

Es conveniente realizar un estudio más profundo de esta relación el cual incluye un análisis estadístico de los resultados con lo que se pueda establecer si es significativa la diferencia encontrada entre variedades resistentes y susceptibles. Además deben establecerse las variaciones de los niveles de P.A.L. en presencia y ausencia de los microorganismos causantes de las royas del cafeto.

Tanto en papa como en café se observa un efecto benéfico de la temperatura en el rango de 25-40°C sobre la actividad enzimática de la P.A.L.

La exposición a la luz (luz blanca 2000 luxes) de discos de tubérculos de papa causa activación de la P.A.L. siendo este efecto máximo dentro del período de 24-32 horas de exposición, Con exposiciones más prolongadas aún cuando también se obtiene activación si se compara con el material no sometido a exposición lumínica, se produce una sensibilización de la enzima al efecto desnaturalizante de temperaturas superiores a 40°C.

Para estudiar el mecanismo de activación por la luz deben realizarse ensayos a diferentes longitudes de onda e incluyendo tiempos comprendidos entre 0-16 horas.

También es aconsejable ver el efecto de la luz sobre el extracto mismo.



## BIBLIOGRAFIA

AYERS, A. F. and CHIL, J. (1974) The effect of the aromatic amino acids on the growth of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 2, 2287.

AMORIM, L. M., AYERS, A. F. and LOPES, A. C. (1975) The effect of the aromatic amino acids on the growth of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 2, 2287.

AYERS, A. F., CHIL, J. and ALBERT, R. (1974) The effect of suspension culture of soybean cells on the growth of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 2, 2287.

## BIBLIOGRAFIA

- ACTON, G. J. FISCHER, W. and SCHOPPER, P. (1980); "Lag-phase and rate of synthesis in phytochrome-mediated induction of phenyl-alanine ammonia-lyase in mustard (Sinapis alba L.) cotyledons". *Planta*, 150, 53.
- AHMED, S. I. and SWAIN, T., (1970); "The effect of light on the activity of enzymes of the aromatic pathway in peas and mungbeans". *Phytochemistry*, 9, 2287.
- AMORIM, H. V. ALVAREZ, M. LOPES, C. R. CARVALHO A. and MONACO, L. C. (1978) "Análisis de compostos fenólicos en folhas de cafeeiros resistentes e susceptíveis a Hemileia vastatrix". *Turrialva V.* 28 N1 .57.
- AYERS, A. R. EBEL, J. and ALBERSHEIM, P., (1976); "Response of suspension cultured soybean cells to the elicitor isolated from Phytophthora megasperma var. Soiae, a fungal pathogen of soybeans". *Plant. Physiol.* 57, 775.

BELL, A., (1981) ; "Biochemical mechanisms of disease resistance  
Ann. rev. Plant. Physiol. 32 , 21.

BERETTA, M. J. MARTINS, E. and MORAES, W. (1976) ; "Induced protection to Hemileia vastatrix at a distance from the site of the inducing action in coffee plants". Instituto Biológico Campinas, Sao Paulo 3 , 66.

BEVAN, M. NORTHCOTE, D. H., (1979) ; "The interaction of auxin and cytokinin in the induction of phenylalanine ammonia-lyase in suspension cultures of Phaseolus vulgaris". Planta. 147 , 77.

BILLET, E. SMITH, H., (1980) ; "Control of phenylalanine ammonia-lyase and cinamic acid-4-hydroxylase in gherkin tissues". Phytochemistry 19 , 1035.

BOUDET, A. RANJEVA, R. et GADAL, P., (1971) ; "Propriétés allosteriques deux isoenzymes de la phenylalanine ammonia-lyase chez Quercus pendunculata". Phytochemistry, 10 , 1977.

BRUGES, J. CONTEIRAS, J., (1967) , "Aspectos bioquímicos de la resistencia del cafeto a la Hemileia vastatrix". Portugaliae Biológica Acta, 10 , 75.

CAMM, E. TOWERS, G.H., (1977) ; "Phenylalanine ammonia-lyase ".

Progress in Phytochemistry , 4 , 169.

DIXON , R.A. DEY, P.M. MURPHY , D.L. WHITEHEAD, I.M . (1981);

"Dose responses for Collectotrichum lindemuthianum; elicitor - mediated enzyme induction in french bean cell suspension cultures". Planta, 151 , 272.

DIXON , R.A. FULLER, K.W. (1976); "Effects of synthetic auxin levels on phaseollin production and phenylalanine ammonia-lyase

( P.A.L.) activity in tissue cultures of Phaseolus vulgaris L .

"Physiological Plant Pathology , 9 , 299.

DIXON , R.A. BENDALL, D.S. (1978), "Changes in the levels of enzymes of phenyl-propanoid and flavonoid synthesis during Phaseollin production in cell suspension cultures of Phaseolus vul-

garis ". Physiological Plant Pathology , 13 , 295.

DUDLEY, K. NORTHCOTE, D.H., (1979) ; "Regulation of induction of phenylalanine ammonia-lyase in suspension cultures of Pha-

seolus vulgaris". Planta, 146 , 433.

DUKE, S. NAYLOR, A., (1976) ; "Light control of anthocyanin biosynthesis in zea seedlings". Physiological Plant, 37 , 62.



EREZ, A., (1973); "Possible errors in quantitative determination of phenylalanine ammonia-lyase activity by spectrophotometric methods". Plant. Physiol. 51, 409.

FRITZEMEIER, K.H. KINDL, H., (1981); "Coordinate induction by U.V. light of stilbene synthase, phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate-4-hydroxylase in leaves of Vitaceae". Planta, 151, 48.

GRISEBACH, H. EBEL, J., (1978); "Phytoalexins, chemical defense substances of high plants". Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 17 635.

HABERLACH, G. BUDDE, D. SEQUEIRA, L. HELGESON, J.P. (1978); "Modification of disease resistance of tobacco callus tissues by cytokinins". Plant. Physiol, 62, 522.

HAHLBROCK, K. GRISEBACH, H., (1979); "Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids". Ann. Rev. Plant. Physiol, 30, 105.

HAHLBROCK, K. FUHLEN, E., (1972), "Relationship between growth of parsley and soybean cells in suspension cultures and changes in the conductivity of the culture medium" Planta, 108, 271.

HARBORNE, J.B. MABRY, T.J., (1975) ; "The flavonoids" Chapman and Hall London p.870.

HARGREAVES, J.SELBY, C., (1978) ; "Phytoalexin formation in cell suspension of Phaseolus vulgaris in response to an extract of bean hypocotyls ". Phytochemistry. 17 , 1099.

HAVIR, E. HANSON , K.R., ( 1968) ; "L-phenylalanine ammonia-lyase I Purification and molecular size of the enzyme from potato tubers". Biochemistry, 7 , 1896.

HAVIR, E. HANSON , K.R., (1968) ; "L-phenylalanine ammonia-lyase from potato tubers". Biochemistry, 7 , 1904.

HANSON , K.HAVIR, E., (1972); "Mechanism and properties of phenylalanine ammonia-lyase from higher plants "Recent advances in Phytochem, 4, 45.

HANSON K. HAVIR E., (1981) "Phenylalanine Ammonia-lyase" Stumpf. P.K. CONNE. E. en the Biochemistry of Plants" a comprehensive treatise Academic press Vol.7. cap. 20 p.609.

HAVIR, E. REID, P. MARSH Jr. V., (1971); "L-phenylalanine ammonia-lyase (maize) evidence for common catalytic site for L-phenylalanine and L-tyrosine". Plant. Physiol, 48 , 130.

HAVIR, E., (1981); "Phenylalanine ammonia-lyase; *Purification and* characterization from soybean cell suspension cultures". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 21 , 556.

HOLLANDER, H. AMRHEIN, N., (1981); "The estimation of phenylalanine ammonia-lyase (p. A.L.) activity in intact cells of higher plants tissue". *Planta* 152 , 374.

BRIDALL, S., SMITH H. (1974); "Properties of phenylalanine ammonia-lyase extracted from *Cucumis sativus* hypocotyls "Phytochemistry, 13 , 575.

JOHNSON, C. ATTRIDGE, T. SMITH, H. , (1975); "Regulation of phenylalanine ammonia-lyase synthesis by cinnamic acid its implication for the light mediated regulation of the enzyme". *Biochimica et Biophysica acta*, 385 , 11.

KOOP, M. FRITIG, B., HIRTH, L., (1977); "Phenylalanine ammonia-lyase activity of protoplasts *in-vitro* inhibition by manitol and *sorbitol*". *Phytochemistry* ,16 , 895.

KOOP, M. GEOFFROY, P. FRITIG, B., (1979); "Phenylalanine ammonia-lyase levels in protoplasts isolated from hypersensitive tobacco pre-infected with tobacco mosaic virus. *Planta* ,146, 451.



KOUKOL, J. CONN, E., (1961); "The metabolism of aromatic compounds in higher plants". J. Biol. Chem. 236 , 2692.

LAMB, C. J. RUBERY, P. H., (1976); "Phenylalanine ammonia-lyase and cinnamic acid 4-hydroxylase product repression of the level of enzyme activity in potato tubers discs". Planta 130 , 283.

LAMB, C. J. DIXON, R. A., (1978); "Stimulation of the novo synthesis of L-phenylalanine ammonia-lyase during induction of phytoalexin biosynthesis in cell suspension cultures of Phaseolus vulgaris". Febs. Letters, 94 , 277.

LAMB, C. J. MERRITT, T. K., BUTT, V. S., (1979); "Synthesis and removal of phenylalanine -lyase activity in illuminated discs of potato tubers parenchyme". Biochimica et Biophysica Acts., 582, 196.

LOOMIS, W. D. BATTAILE, J., (1966); "Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes". Phytochemistry, 5 , 423.

MARSH, H. Jr. HAVIR, E. HANSON, R., (1968), "Phenylalanine ammonia-lyase III. Properties of the enzyme from maize seedlings". Biochemistry, 7 , 1915.



MARTINEZ, P. RESTREPO, P., (1981); "Detección y localización de la polifenoloxidasas y la fenilalanina amonio-lyasa en hojas de café Caturra y efecto de un fungicida cúprico sobre la actividad de estas enzimas". Tesis de grado, Depto. de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

MORAES, W. (1981); "Determinación cuantitativa de la actividad de la fenilalanina amonio-lyasa". Comunicación personal.

MORENO, G., (1982); "Avances en la obtención de variedades de café fé resistentes a la roya". Taller sobre la roya del café Himileia vastatrix Berk. & Ber. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia; Manizales Abril 12-17.

NARI, J. MOUTTET, C. FOUCHIER, F. RICHARD, J., (1974); "Sunbunit interactions in the enzyme L-phenylalanine ammonia-lyase". Eur. J. Biochem. 41, 499.

NEISH, A.C., (1961); "Formation of *m*- and *p*-Coumaric acids by enzymatic deamination of the corresponding isomers of tyrosine". Phytochemistry 1, 1.

NISHIZAWA, A. WOLOSIX, R. BUCHANAN, B., (1979); "Chloroplast, Phenylalanine ammonia-lyase from spinach leaves". Plant, 145, 7.

NOE, W. LANGEBARTELS, C. SEITZ, H.U., (1980), "Anthocyanin accumulation and PAL activity in a suspension culture of Daucus carota L." *Planta*, 149, 283.

O'NEAL, D. KELLER, C.J., (1970); "Partial purification and some properties of phenylalanine ammonia-lyase of tobacco". *Phytochemistry*, 9, 1373.

PARKHURST, J.R. HODGINS, D.S., (1971); "Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase activity in Sporobolomyces pararoseus" *Phytochemistry*, 10, 2997.

PROMETTO., A. CRAWFORD, L., (1980); "Enzymatic production of the lignin precursor trans-(U-<sup>14</sup>C) cinnamic acid from L-(U-<sup>14</sup>C) phenylalanine using L-phenylalanine ammonia-lyase". Short paper Department of Bacteriology and Biochemistry Idaho agricultural experiment station, University of Idaho, Moscow, 83, 843.

PROKSCH, M. STRACK, D. WEISSENBOCK, G., (1981); "Incorporation of (<sup>14</sup>C) phenylalanine and (<sup>14</sup>C) cinnamic acid in to leaf pieces and mesophyll protoplasts from oat primary leaf for studies on flavonoid metabolism and the tissue and cell level". *Z. Naturforsch*, 36, 222.

QUAIL, P. H., (1976); "Phytochrome" en Bonner J y J. E. Varner (ed) Plant Biochemistry, Cap. 21 P. 683.

RAHE, J. E. KUC, J. CHUANG, CH. M., (1970); "Cinnamic acid production as a method of assay for phenylalanine ammonia-lyase in acetone powders of Phaseolus vulgaris". Phytochemistry, 9, 1009.

RHODES, J. M. WOOLVERTON. L. S. C. (1978); "The biosynthesis of phenolic compounds in wounded plant storage tissues", Biochemistry of wounded plant tissues. Ed. Gunter Kahl. New York, 243.

RODRIGUEZ, C. I. Jr. BETTENCOURT, A. J. RIJO, L., (1975) "Roles of the pathogen and resistance to coffee rust" Ann. Rev. Phytopathol. 49).

SAID, E. BASYOUNI, E. L. NEISH, A. C., (1966), "Occurrence of metabolically-active bound forms of cinnamic acid and its phenolic derivatives in acetone powders of wheat and barley plants" Phytochemistry, 4, 683.

SCHRODER, J. BETZ, B. HAHNBROCK, K., (1976); "Light-induced enzyme synthesis in cell suspension cultures of Petroselinum hortense". Eur. J. Biochem. 67, 527.



SCHRODER, B. HAHNBROCK, K., (1977); "Messenger RNA -controlled increase of phenylalanine ammonia-lyase activity in parsley". Plant. Physiol. 440.

SIEVERS, S., (1980); "Subproyecto Bioquímica, 11QC-GT-Z". Informe interno del laboratorio de investigaciones sobre la química y física del café y los productos naturales de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

SMITH, B.C. RUBERY, P.H., (1981); "The effects of infection by Phytophthora infestans on the control of phenylpropanoid metabolism in wounded potato tissue". Planta, 151, 535.

SOLECKA, M. ROSS, J.A. MILLIKAN, D.F. (1968); "Evidence of substances interfering with the Lowry test for protein in plant leaf tissue". Phytochemistry, 7, 1293.

STAHMANN, A., MUSUMECI, M.R. MORALES, B.C.W., (1976); "Germination of coffee rust uredospores and their inhibition by cinnamic derivatives". Phytopathol. 66, 765.

SWAIN, T. WILLIAMS, C., (1970); "The role of phenylalanine in flavonoid biosynthesis". Phytochemistry, 9, 2115.



YOSHIDA, S., (1969) ; "Biosynthesis and conversion of aromatic aminoacids in plants". Ann. Rev. Plant. Physiol. 20 , 41.

YOUNG , M.R. NEISH, A.C., (1966) ; "Properties of the ammonia-lyases deaminating phenylalanine and related compounds in Trifolium aestivum and Pteridium aquilinum". Photochemistry , 5 , 1121.

ZUCKER, M., (1965) ; "Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue". Plant. Physiol. 40 , 779.

ZUCKER, M., (1968) ; "Sequential induction of phenylalanine ammonia-lyase and a lyase-inactivating system in potato tubers disks". Plant. Physiol, 43 , 365.

69. ZUCKER, M., (1972) ; "Light and enzymes". Ann. Rev. Plant. Physiol. 23 , 133.

## APENDICES

## APENDICE I

### CURVA ESPECTRAL ACIDO TRANS CINAMICO

Método : Espectrofotométrico

Aparato: Zeiss PM-Q 3

Rango: Ultravioleta

Longitud de onda: 250-322 nm

Rendija: 0.12nm

Velocidad registro: 600 nm/hora

Amortiguación : 1

Alto voltaje : 1

Escala del registro: 0-5

Tiempo celda: 4 seg.

Celdas: cuarzo

Temperatura: Ambiente

Blanco de reactivos: Solución tampón de boratos 0.1M pH 8.8

Muestra: Solución de ácido trans-cinámico  $1 \times 10^{-4}$  M en tampón de boratos 0.1 m pH 8.8

Volumen mezcla de reacción : 3.0 ml.

# FIGURA No. 12 CURVA ESPECTRAL ACIDO TRANS CINAMICO

RANGO = ULTRAVIOLETA

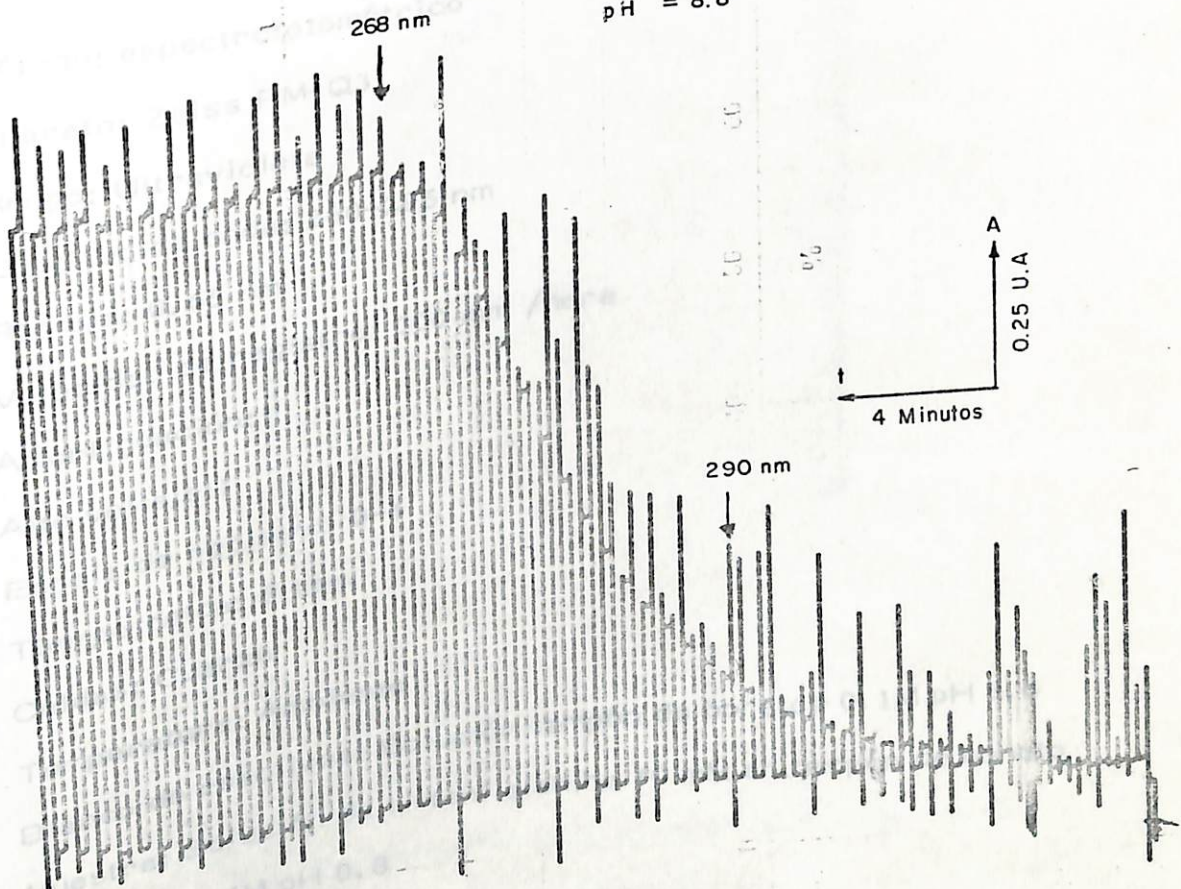
$\lambda = 250 - 322 \text{ nm}$

BLANCO DE REACTIVOS = SOLUCION TAMPON DE BORATOS 0.1 M

pH = 8.8

[ACIDO T-CINAMICO] = 0.5 mM EN SOLUCION TAMPON DE BORATOS 0.1 M

pH = 8.8





## APENDICE II

### CURVA ESPECTRAL L- FENILALANINA

Método: espectrofotométrico

Aparato: Zeiss PM-Q3

Rango: Ultravioleta

Longitud de onda: 260-295 nm

Rendija: 0.65 nm

Velocidad de registro: 300 mm /hora

Amortiguación: 1

Alto voltaje: 1

Escala de registro: 0-1

Tiempo celda: 8 seg.

Celdas: Cuarzo

Temperatura: Ambiente

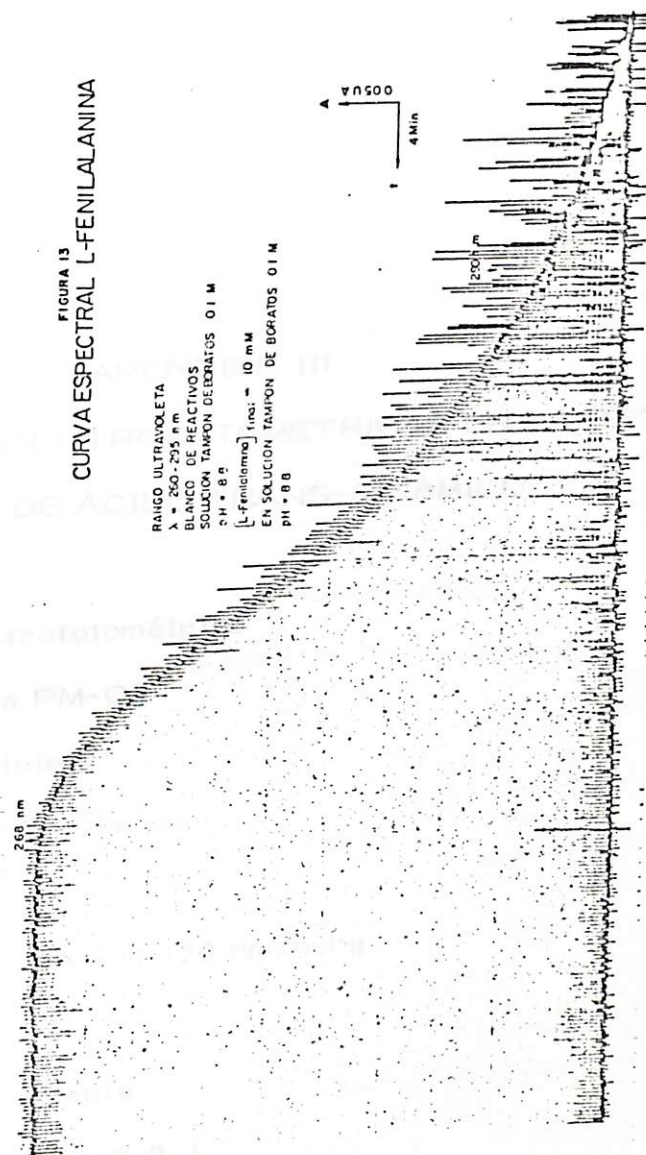
Blanco de reactivos: Solución tampón de boratos 0.1M pH 8.8

Muestra: Solución de L-fenilalanina 10 mM en tampón de borato

0.1M pH 8.8

Volumen mezcla de reacción : 3.0 ml

FIGURA 13  
CURVA ESPECTRAL L-FENILALANINA



### APENDICE III

#### CONDICIONES ESPECTROFOTOMETRICAS EN LA DETERMINACION DE ACIDO TRANS-CINAMICO

Método: Espectrofotométrico

Aparato: Zeiss PM-Q3

Rango: Ultravioleta

Longitud de onda: 290 nm

Rendija : Variable

Velocidad de registro: 120 nm/hora

Amortiguación : 1

Alto voltaje: Variable

Escala de registro: 0-0.1

Tiempo celda: 8 seg.

Celdas: Cuarzo

Temperatura: Variable dentro del rango de 25-40°C

Blanco de reactivos: 0.5 ml extracto enzimático

2.5 ml solución tampón de boratos 0.1M pH 8.8

Muestra

0.5 ml extracto enzimático

1.0 ml L-fenilalanina 30 mM en solución tampón  
de boratos 0.1 M pH 8.8 (ver numerales  
2.2.5 y 2.3.6)

0.4 ml L-fenilalanina 30 mM en solución tampón  
de boratos 0.1 M pH 8.8 (ver numerales  
2.2.5 y 2.3.6).

Volumen de la reacción: 3.0 ml completados con solución tampón  
de boratos 0.1 M pH 8.8



# APENDICE IV

## CURVA DE CALIBRACION DE PROTEINA

Método: Folín (espectrofotométrico)

Aparato : Zeiss PM-Q3

Rango : Visible

Longitud de Onda: 500 nm

Rendija : 0.65 nm

Amortiguación : 1

Alto voltaje : 1

Celdas : Vidrio

Blanco de reactivos: 0.50 ml de solución tampón de boratos 0.1M pH 8.8

2.50 ml reactivo C (ver numeral 2.4)

0.25 ml reactivo D (ver numeral 2.4)

Muestra: 0-120  $\mu$ g/ml albúmina de sangre bovina en solución tampón de boratos 0.1 M pH 8.8

2.50 ml reactivo C (ver numeral 2.4)

0.25 ml reactivo D (ver numeral 2.4)

Volumen mezcla de reacción : 3.25 ml

Concentrac.  
de proteína  
( $\mu$ g/0.5ml)

Absorbancia

0.178

50.0

0.189

55.0

0.211

60.0

0.220

65.0

0.233

70.0

0.257

75.0

0.274

80.0

0.289

85.0

0.299

90.0

0.320

95.0

TABLA XIII  
CURVA DE CALIBRACION DE PROTEINA PATRON ALBUMINA DE  
SUERO BOVINO EN SOLUCION TAMPON DE BORATOS  
0.1 M pH 8.8

| Absorbancia | Concentración<br>de proteína<br>( $\mu$ gr/0.5 ml) | Absorbancia | Concentrac.<br>de proteína<br>( $\mu$ gr/0.5 ml) |
|-------------|----------------------------------------------------|-------------|--------------------------------------------------|
| 0.000       | 0.0                                                | 0.178       | 50.0                                             |
| 0.013       | 2.5                                                | 0.189       | 55.0                                             |
| 0.017       | 5.0                                                | 0.210       | 60.0                                             |
| 0.028       | 10.0                                               | 0.220       | 65.0                                             |
| 0.038       | 12.5                                               | 0.238       | 70.0                                             |
| 0.049       | 15.0                                               | 0.257       | 75.0                                             |
| 0.060       | 17.5                                               | 0.274       | 80.0                                             |
| 0.067       | 20.0                                               | 0.289       | 85.0                                             |
| 0.076       | 22.5                                               | 0.299       | 90.0                                             |
| 0.086       | 25.0                                               | 0.328       | 95.0                                             |
| 0.100       | 30.0                                               | 0.345       | 100.0                                            |
| 0.130       | 35.0                                               | 0.364       | 110.0                                            |
| 0.145       | 40.0                                               | 0.393       | 120.0                                            |
| 0.158       | 45.0                                               |             |                                                  |

Pendiente =  $3.362 \times 10^{-3}$

Intercepto =  $2.314 \times 10^{-3}$

Coefficiente de correlación = 0.9989

## APENDICE V

## CURVA DE CALIBRACION ACIDO TRANS-CINAMICO

Método : Espectrofotométrico

Aparato: Zeiss PM-Q 3

Rango : Ultravioleta

Longitud de onda: 290 nm

Rendija: 0.20 mm

Amortiguación: 1

Alto voltaje: 1

Celdas: Cuarzo

Temperatura: Ambiente

Blanco reactivos: Solución tampón de boratos 0.1M pH 8.8

Muestra: Soluciones de ácido trans-cinámico  $1.0 \times 10^{-3}$  -  $1.0 \times 10^{-2}$  mol/ml

## GRAFICA No. 7

## CURVA DE CALIBRACION DE PROTEINA METODO DE FOLIN

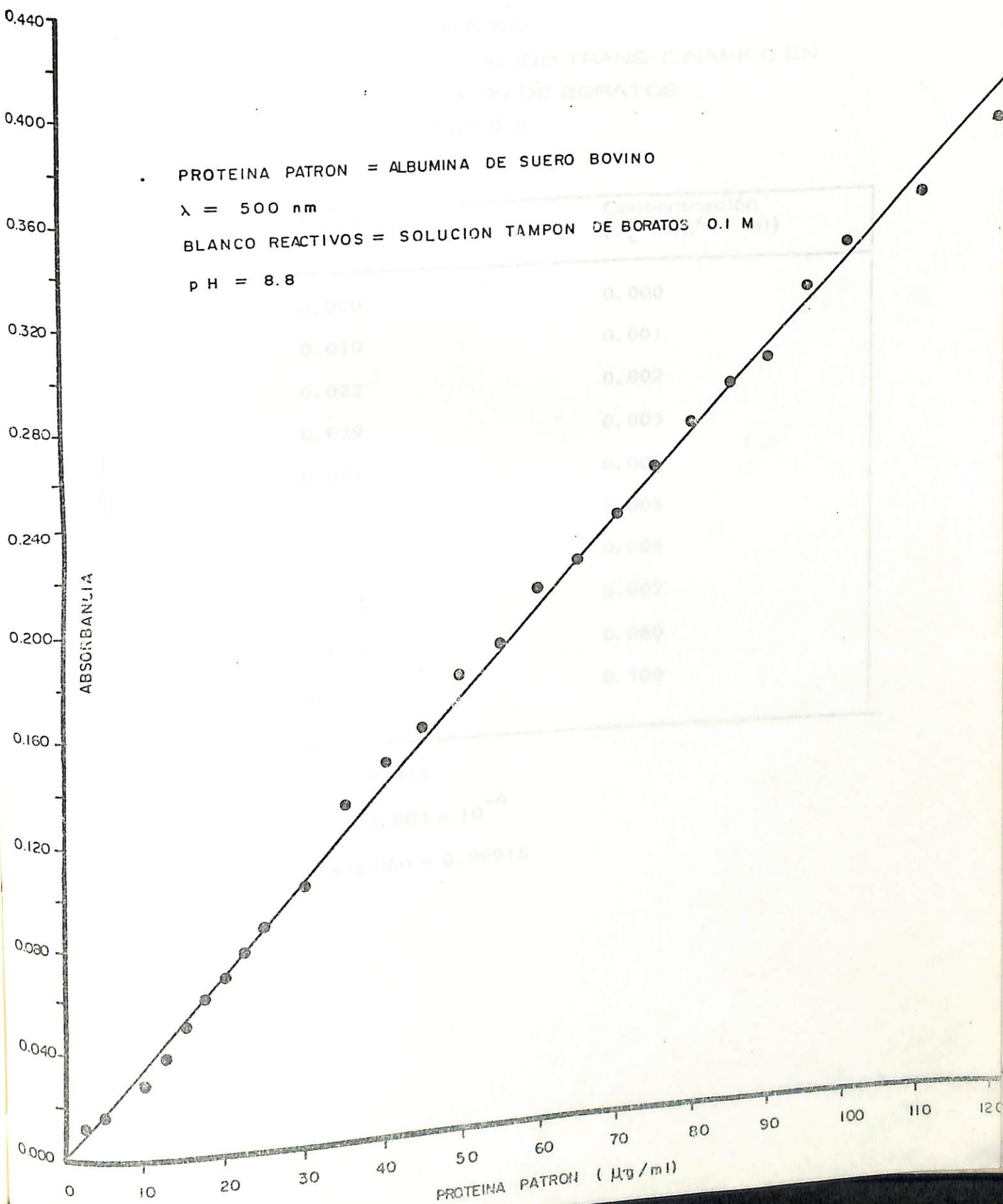




TABLA XIV  
CURVA DE CALIBRACION DEL ACIDO TRANS-CINAMICO EN  
SOLUCION TAMPON DE BORATOS  
0.1M pH 8.8

| Absorbancia | Concentración<br>( $\mu$ mol/l ml) |
|-------------|------------------------------------|
| 0.000       | 0.000                              |
| 0.010       | 0.001                              |
| 0.022       | 0.002                              |
| 0.029       | 0.003                              |
| 0.041       | 0.004                              |
| 0.051       | 0.005                              |
| 0.057       | 0.006                              |
| 0.070       | 0.007                              |
| 0.080       | 0.080                              |
| 0.010       | 0.100                              |

Pendiente : 9.913  
Intercepto :  $3.983 \times 10^{-4}$   
Coeficiente de correlación = 0.99915

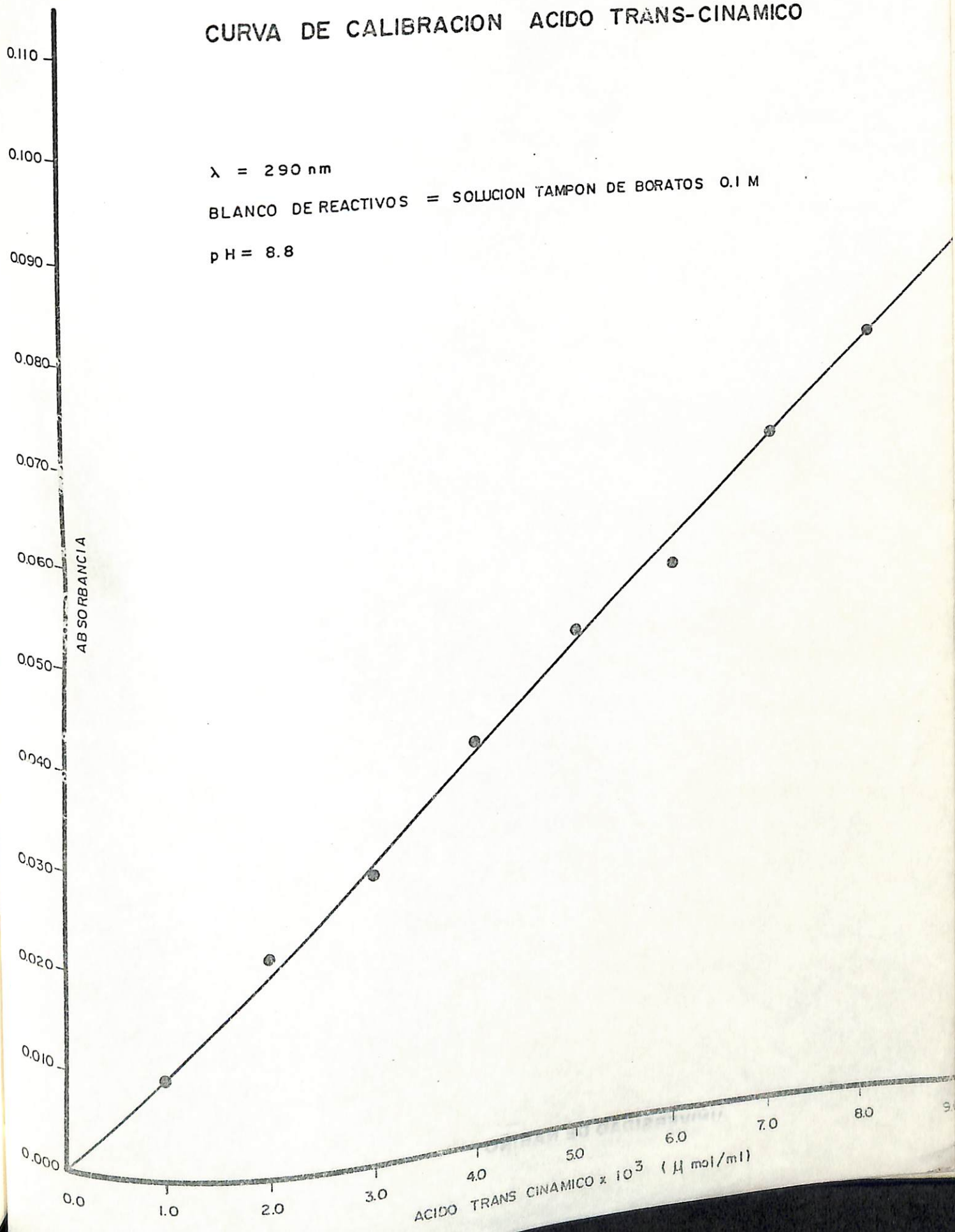
GRAFICA No. 8

## CURVA DE CALIBRACION ACIDO TRANS-CINAMICO

 $\lambda = 290 \text{ nm}$ 

BLANCO DE REACTIVOS = SOLUCION TAMPON DE BORATOS 0.1 M

pH = 8.8



T  
663.93  
T628d  
Ej.1

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO**

Inventario: 58656

Autor: Tobar Carrizosa, Miguel



T  
663.93  
T628d  
Ej.1

58656

**Universidad de Nariño  
Pasto (Nariño)**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO**  
BIBLIOTECA Y DOCUMENTACION

58656