

ESTABLECIMIENTO DE UN METODO PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE L-FENILALANINA AMONIO LIASA (PAL) EN CAFETO

por

M. F. Almario*, C. Ocampo* y V. Montes de Gómez**

Resumen

Almario, M.F., C. Ocampo V. Montes de Gómez: Establecimiento de un método para la determinación de enzimática del L. Fenilalanina Amonio Liasa (PAL) en Cafeto. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 19 (72):137 - 140, 1994. ISSN 0370-3908.

Se estableció un método de medida de la actividad de PAL en extractos crudos de material foliar de cafeto, mediante la cuantificación del ácido trans-cinámico, producto de la reacción de PAL, por cromatografía líquida de alta eficiencia, después de su extracción con cloroformo. Igualmente se estudió el comportamiento de esta enzima en segundos pares de hojas de materiales resistentes a *Hemileia vastatrix* Berk & Br (Híbrido de Timor y var. Colombia) y de una variedad susceptible (var. Caturra). De acuerdo con los resultados obtenidos, no se encontraron diferencias significativas en la actividad basal de PAL entre los materiales resistentes a la roya, var. Colombia y el H. de Timor, siendo de $10,6 \pm 3,0$ y $13,18 \pm 3,0$ Kat/mg proteína respectivamente. Estos materiales resistentes, presentaron valores basales de actividad mayores a los encontrados para la variedad Caturra, registrando esta última un valor de actividad basal de $3,57 \pm 0,6$ p Kat/mg. proteína.

Palabras claves: *Coffea* ssp., fenilalanina amonio liasa, metabolismo fenilpropanoide.

Abstract

In this work a method was established for measuring the activity of PAL in crude extracts of coffee leaves. The product of the PAL reaction trans-cinnamic acid, was quantitated by high performance liquid chromatography, after its extraction with chloroform.

The presence of the enzyme in leaves of resistant (Timor Hybrid and Colombia) and susceptible varieties (caturra) to *Hemileia vastatrix* Berk & Br., was studied.

According to the results, there is no significant difference in the basal activity of PAL among rust resistant materials. In the varieties Colombia and Timor Hybrid; the values were $10,6 \pm 3,0$ and $13,18 \pm \mu\text{Kat/mg protein}$, respectively. These resistant materials showed basal values of activity greater than those found for the Caturra variety, ($3,57 \pm 0,6$ pKat/mg protein).

Abreviaturas.- PAL: L-fenilalanina amonio liasa; DTT: ditiotreitól; PVPP: polivinilpolipirrolidona; P/V: peso a volumen; ODS: octadecilsilano; HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia; AU: unidades de absorbancia.

Introducción

Entre las enfermedades que atacan al Cafeto, la roya causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, Berk & Br., ha sido considerada desde fines del siglo pasado como la de mayor gravedad. El efecto de la roya en la

disminución de la producción es gradual y los costos del control químico se incrementan a medida que se propaga la enfermedad. La alternativa que permite mantener la producción y evitar los costos del control químico es el empleo de variedades resistentes.

Para estudiar las causas de esta resistencia, es necesario identificar a nivel bioquímico, los mecanismos que intervienen en ella, estudiando las enzimas de las rutas metabólicas posiblemente involucradas en la capacidad de resistencia de las plantas.

* Asistente de Investigación e investigador científico respectivamente del laboratorio de Investigaciones sobre la Química del Café (LICQ). Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

** Profesor Asociado Departamento de Química Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá, Colombia.

Entre estas enzimas tenemos la L-fenilalanina amonio liasa (E.C. 4.3.1.5) descrita por primera vez en cebada (Koukol and Conn 1961), la cual cataliza la conversión de la L-fenilalanina a ácido trans-cinámico (Figura No.1)

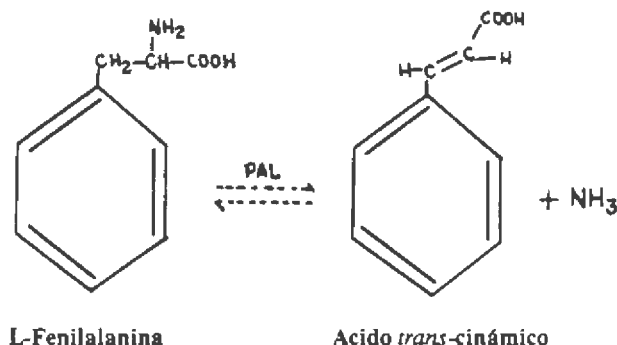


Figura 1. Reacción de deaminación de L-fenilalanina catalizada por PAL

La importancia de esta enzima radica en que es la primera enzima reguladora del metabolismo fenilpropanoide en plantas superiores, dentro del cual se encuentran varios de los productos que han sido relacionados con los mecanismos de defensa de las plantas contra patógenos. Muchos de estos compuestos presentan propiedades antimicrobianas. Algunos, las fitoalexinas, son producidas por la planta como respuesta a la infección debida a bacterias, virus u hongos, otros, de este metabolismo fenilpropanoide, modifican las paredes celulares, contribuyendo así a la resistencia a enfermedades.

En trabajos previos realizados conjuntamente entre el LICQ, y la Universidad Nacional de Colombia, fué posible detectar la actividad enzimática de PAL a partir de extractos crudos de hojas de cafeto pero sin lograr su cuantificación (Martínez y Restrepo, 1981). Posteriormente, Tobar y Zamora (1982) empleando la técnica de polvos de acetona pudieron determinar cuantitativamente, por espectrofotometría, la actividad de esta enzima en hojas sanas de diferentes variedades de cafeto.

Debido al alto costo y a los problemas actuales de Colombia para la consecución de la acetona, junto con la dificultad para procesar un elevado número de muestras al emplear esta técnica, en este trabajo se estableció un método alternativo para la medida de la actividad de PAL a partir de extractos crudos de hojas de cafeto.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal: segundos pares de hojas de ramas de *Coffea* spp., entendiéndose por esto, aquellas ubicadas en segundo término desde el extremo de la rama en dirección al tallo principal de la planta.

Preparación del extracto crudo a partir de hojas de cafeto.

Las hojas de cafeto recolectadas se sometieron a limpieza con agua destilada y secado posterior al aire.

Se pesaron (aproximadamente 1 g) y se pulverizaron en presencia de nitrógeno líquido, homogenizándose posteriormente a 4°C con una solución tampón de boratos 0.1 M pH 8.8, previamente enfriada, en una relación 1:5 p/v. Esta solución contenía DTT 3 mM y metabisulfito de sodio 5 mM junto con PVPP al 5% p/v, estos con el fin de evitar la oxidación de los extractos debido al alto contenido de fenoles presentes en el cafeto.

El homogenizado así obtenido, se centrifugó a 28.000 g. durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante final constituyó el extracto enzimático utilizado para la medición de la actividad de PAL.

La concentración de proteína, proveniente del extracto anterior, en la mezcla de reacción enzimática fué de 0.270 mg/ml, determinada por el método de Bradford. Como sustrato, se utilizó el aminoácido L-fenilalanina en una concentración final de 10 mM en solución tampón de boratos. El blanco de reactivos lo constituyó el extracto enzimático en la solución tampón de boratos en la misma concentración anterior.

Tanto los blancos como las mezclas de reacción se incubaron a 40°C durante un periodo de dos horas, tiempo en el cual se tomaron muestras cada 30 minutos, parando la reacción por la adición de 0.3 ml de HCl 6N a cada una ellas.

Posteriormente se adicionaron 1.5 ml de cloroformo, se agitó durante 30 minutos, se centrifugó a 1300 x g. por cinco minutos. De la fase orgánica, se tomó 1 ml y se evaporó.

La cuantificación espectrofotométrica del ácido trans cinámico se hizo de acuerdo con el método de Moerschbacher Col. (1986), determinando la absorbancia a 270 nm.

El residuo clorofórmico obtenido fué resuspendido en 50 μ l de la solución tampón de boratos, 20 μ l de los cuales fueron inyectados al cromatógrafo, provisto de una columna de ODS de 8x100 mm y 10 micras de diámetro interno. Como fase móvil se empleó una solución de metanol: agua (35:65) a un flujo de 2.0 ml/min. Para la cuantificación del ácido se realizó una curva patrón de este compuesto en el rango de 0.06 a 10 mM, bajo las condiciones anteriormente descritas.

La determinación de la actividad de PAL mediante la técnica de HPLC, consistió en un seguimiento del incremento en el área del pico característico del ácido trans cinámico producido en la mezcla de reacción. Estas medidas se efectuaron cada 30 minutos durante un período de dos horas.

La actividad de PAL se expresó como actividad específica en pkatales/mg proteína. La proteína se midió por el método de Bradford (Bradford 1976).

RESULTADOS Y DISCUSION

La cuantificación espectrofotométrica del ácido trans-cinámico no mostró diferencias significativas de absorbancia, en función del tiempo de reacción, debido a que al estar presente la cafeína en altas concentraciones, enmascara los pequeños incrementos del ácido trans-cinámico.

Estos resultados sugieren la posibilidad de que el cloroformo esté extrayendo además del ácido trans-cinámico, otros compuestos que interfieren en la determinación espectrofotométrica del ácido trans-cinámico, ya que aun el blanco presenta máximos de absorción en la región de 270 nm. En este último caso no puede atribuirse a la concentración basal de ácido trans-cinámico ya que esta es tan baja que en trabajos anteriores no ha sido posible su detección (Duque y López, 1987).

Teniendo en cuenta la presencia en hojas de café de compuestos solubles en cloroformo, que además de estar presentes en altas concentraciones, absorbieran en la región de 270 a 280 nm, se planteó la a la cafeína como posible interferente en la medida espectrofotométrica de la actividad de PAL. Esta se encuentra en altas concentraciones en la hoja, alcanzando una concentración en el líquido de lavado intercelular de 90-100 µg/ml (Sievers, 1983).

Por otra parte, este compuesto presenta una alta solubilidad en cloroformo, siendo aproximadamente dos veces más soluble en éste solvente que el mismo ácido trans-cinámico (Index Merck, 1983).

Lo anterior se comprobó mediante la comparación de la curva espectral del ácido trans-cinámico con el de la cafeína.

Es importante anotar, que el sustrato L-fenilalanina no es extraído por el cloroformo, bajo las condiciones aquí descritas, razón por la cual no es el interferente.

Como se observa en la Figura No.2 es posible separar el ácido trans-cinámico de la cafeína bajo las condiciones aquí descritas. De igual forma, en esta misma figura se observa el incremento en el área del pico correspondiente al ácido trans-cinámico en función del tiempo de reacción. Este incremento no se observó en los blancos correspondientes.

En el cromatograma inicial ($t=0$) el área del ácido trans-cinámico es $7,67 \times 10^{-4}$ AU*min correspondiente a una concentración de 0,012 nmoles/20 µl de inyección, confirmando los resultados de Duque y López (1987). A las dos horas de reacción el ácido trans-cinámico presenta un área de 482×10^{-4} AU*min, correspondiente a una concentración de 6,23 n moles/20 µl de inyección.

La cafeína permaneció constante a través del tiempo con un área de 1,39 AU*min (dato suministrado por el sistema de integración del equipo), la relación entre las áreas de la cafeína y el ácido trans-cinámico, que son un reflejo de la relación de concentraciones explica los resultados obtenidos por espectrofotometría en los cuales la cafeína enmascara la presencia del ácido trans-cinámico.

Se puede concluir, de acuerdo con estos resultados, que tanto el método de extracción como el de medida de la actividad de PAL permiten su determinación en café.

La extracción con cloroformo, aquí utilizada, además de eliminar los posibles compuestos interferentes,

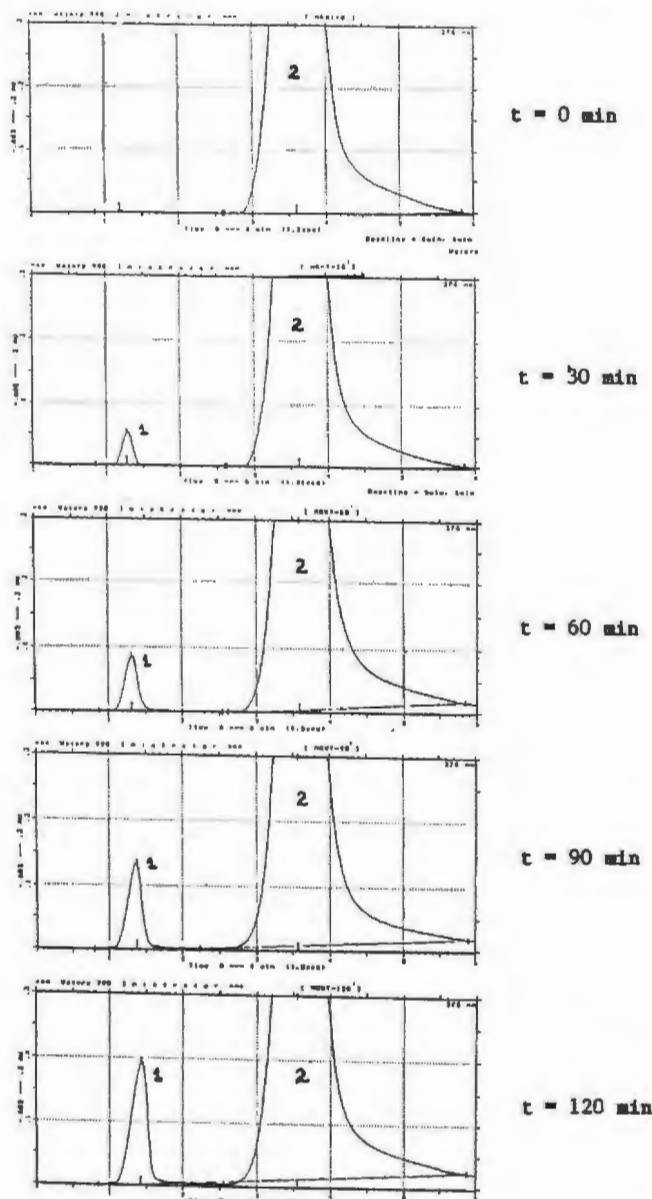


Figura 2. Determinación de la actividad del PAL por HPLC. El área del pico del ác. trans-cinámico (1) se evaluó a través del tiempo, a partir de extractos crudos de hojas de café

permite la concentración del ácido trans-cinámico producido, facilitando su cuantificación.

De igual manera, la medida de actividad de PAL por HPLC, permite emplear cantidades mayores del extracto enzimático en la mezcla de reacción, que en el método espectrofotométrico, con lo cual se produce una concentración mayor de ácido trans-cinámico.

Las medidas de actividad de esta enzima en hojas sanas de tres variedades de café permitió establecer mediante un análisis de varianza complementado con el test de Duncan, diferencias significativas entre las plantas resistentes a *H. Vastatrix* (Híbrido de Timor y var Colombia) y la susceptible (var. caturra).

De acuerdo con los resultados obtenidos (figura No.3) se encontraron niveles mayores de actividad de PAL en las variedades resistentes (Híbrido de Timor:

$13,18 \pm 3,0$ pKat/mg proteína y variedad Colombia: $10,6 \pm 3,0$ pKat/mg proteína) sin que se presentaran valores de actividad significativamente diferentes entre ellas. La variedad susceptible (caturra) mostró una actividad significativamente más baja: $3,57 \pm 0,6$ pKat/mg proteína.

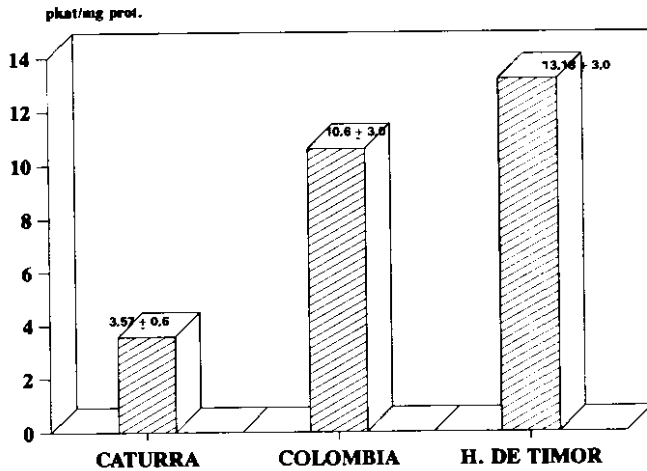


FIGURA 3. Actividades basales de PAL en tres variedades de café

CONCLUSIONES

Con este trabajo se confirmó la presencia de fenilalanina amonio liasa en hojas de café y se estableció que la cafeína, por tener su máximo de absorción en la región de 270 nm, estar en altas concentraciones en los extractos crudos de material foliar de café y ser soluble en cloroformo, impide la aplicación del método espectrofotométrico de Moerschbacher y Col., (1986) para la determinación de PAL en hojas de café.

El empleo de la cromatografía líquida de alta eficiencia en las condiciones aquí descritas, permite separar el ácido trans-cinámico de la cafeína, y por lo tanto hace posible la determinación de la actividad de PAL en el café.

El hecho de que las variedades resistentes a *Hemileia vastatrix* presenten actividades basales de PAL mayores que la variedad susceptible, sugiere la posibilidad de que esta enzima pueda jugar un papel en los mecanismos pasivos de resistencia del café a este hongo.

BIBLIOGRAFIA

- BRADFORD M., 1976A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal. Biochem.*, **72**:248-254.
- DUQUE A. & O. LOPEZ, 1987 Análisis de compuestos fenólicos presentes en explantes de hojas, callos y células en suspensión de café (*Coffea arabica* L.) Tesis de Grado, Departamento de Química y Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- KOUKOL J. & E. CONN, 1961 The metabolism of aromatic compounds in higher plants. Purification and properties of the Phenylalanine deaminase of *Herdeum vulgare*. *J. Biol. Chem.*, **236**: 2692 - 2698.
- MARTINEZ P. & P. RESTREPO, 1981 Detección y localización de la polifenoloxidasa y la L-fenilalanina amonio liasa en hojas de café caturra y efecto de un fungicida cuprico sobre la actividad de estas dos enzimas. Tesis de grado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- MERCK INDEX, 1983 Tenth Ed. Merck and Co. Inc. Rahway N.Y; USA.
- MOERSCHBACHER B., KOGEL H.K., NOLL U. & REISNER H.J., 1986 An elicitor of the hypersensitive lignification response in wheat leaves isolated from the rust fungus *Puccinia graminis* f.sp. tritici. Partial purification and characterization. *Z. Naturforsch* **41**, 830 - 838.
- SIEVERS, S., 1983 The intracellular washing fluid of *Coffea* leaves as tool to study resistance mechanism against *Hemileia vastatrix* Berk & Br. In Simposio sobre ferrugens de cafeeiro. Oeiras Portugal 7-20 -X- 1983. Sumarios das comunicacoes. Oeiras Centro de Investigacao das Ferrugens do cafeeiro. pp 24.
- TOBAR M. & H. ZAMORA., 1982 Determinación de la L-fenilalanina amonio liasa en extractos de hojas de cuatro variedades de café y en otros tejidos vegetales. Tesis de grado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.