

# El complejo fenolasa en algunos frutos

POR

JOSE ANTONIO LOZANO TERUEL

## I

### INTRODUCCION

En los laboratorios de Química Orgánica y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Murcia, bajo la dirección del profesor D. Antonio Soler Martínez, se viene realizando desde hace bastantes años una labor investigadora sobre Química y Bioquímica de frutos. Por otra parte, nuestra íntima relación con la Asociación Nacional de Investigación de la Conserva Vegetal, nos ha hecho vivir cotidianamente los problemas de tipo tecnológico que se presentan en la Industria Conservera.

Por estas dos razones, surgió espontáneamente la necesidad de investigar los aspectos científico y tecnológico de los sistemas enzimáticos responsables de la oxidación de los fenoles en los frutos.

Más por razones tecnológicas que científicas, escogimos como material de trabajo albaricoque, melocotón y alcachofa, productos cuya elaboración industrial presenta, a menudo, problemas graves de pardeamiento. Al hacer esta elección nos dábamos cuenta de las dificultades impli-



cidas en el trabajo con frutos que, como el albaricoque, poseen una temporada de maduración y recolección muy corta, lo que obliga a que los estudios «in vivo» se hayan de realizar a una marcha demasiado forzada. En cambio, los estudios de propiedades de los enzimas «in vitro» se han podido efectuar gracias a que los polvos acetónicos que hemos conseguido han conservado su actividad casi intacta a través de un año o más tiempo.

Nuestro plan de trabajo, en esquema, ha consistido en profundizar en el conocimiento de la naturaleza y modo de acción de los enzimas del complejo fenolasa en los tres frutos citados anteriormente, así como en el estudio de las propiedades íntimamente relacionadas con los problemas tecnológicos planteados, tales como la estabilidad frente al calor, tiempo, etc.

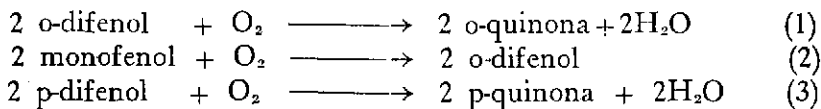
Desde un principio, comprobamos que la fenolasa de alcachofa se comportaba de igual modo que la procedente de otras fuentes ya estudiadas anteriormente, y también se nos hizo evidente que el sistema de albaricoque es igual que el de melocotón y ambos distintos al de alcachofa, por lo cual hemos insistido en toda nuestra investigación sobre la fenolasa de albaricoque y, con ésta como referencia, hemos observado sus analogías y diferencias con la de melocotón y alcachofa.

II

ANTECEDENTES

*Terminología.*—El complejo fenolasa se descubrió en 1895 (1, 2), y desde tal fecha hasta nuestros días un gran número de investigadores ha intentado profundizar en su naturaleza y papel biológico; para ello, se han usado enzimas extraídos de diferentes fuentes y con capacidad para oxidar distintos sustratos, lo cual ha conducido a una cierta confusión en la terminología utilizada para describir este sistema enzimático. En la bibliografía son todavía usuales los términos tirosinasa, polifenoloxidasa, polifenolasa, fenolasa, catecoloxidasa, catecolasa, cresolasa, dopaoxidasa, lacasa, etc., que hacen referencia a los sustratos sobre los que actúa o al origen del enzima.

Todos estos nombres se utilizan para designar los enzimas que catalizan las siguientes reacciones:

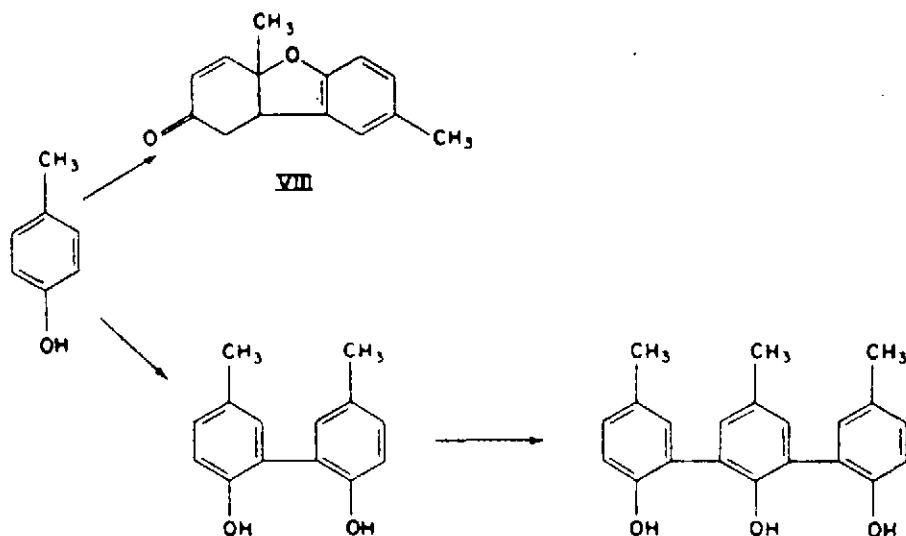


Los términos expuestos anteriormente, corresponden de un modo aproximado a cualquiera de las siguientes reacciones:

- Catecoloxidasa, catecolasa, dopaoxidasa. . . . . (1)
- Cresolasa . . . . . (2)
- Lacasa . . . . . (3)
- Tirosinasa . . . . . (1) y (2)
- Polifenoloxidasa, polifenolasa . . . . . (1) y (3)
- Fenolasa . . . . . (1) (2) y (3)



Sin embargo este criterio no es totalmente rígido. Por ejemplo, se ha dado el nombre de lacasa (3) a un enzima que es capaz de producir la oxidación del p-cresol, no produciendo el o-difenol de la ecuación (2) sino productos de condensación del tipo siguiente:



En el *Report of the Commission on Enzymes* de la International Union of Biochemistry (4), se dan nombres sistemáticos a los enzimas conocidos y se clasifican a los que actúan sobre difenoles y sustancias relacionadas como dadores de electrones y con oxígeno como aceptor, en los dos tipos siguientes:

- o-difenol:  $O_2$  oxidoreductasa, que cataliza (1) y (2)  
 p-difenol:  $O_2$  oxidoreductasa, que cataliza (3).

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que:

- 1) Este sistema de nomenclatura todavía no se ha hecho de uso común.
- 2) El complejo fenolasa, según su origen, posee distinta afinidad para sus posibles sustratos, por lo cual aun dentro de las reacciones (1), (2) o (3), tendríamos que hacer distinciones que dependerían de los sustratos transformables o no por cada uno de los preparados enzimáticos estudiados.

Por ello, nosotros, que vamos a tratar las reacciones (1) y (2), decidimos llamar catecolasa y cresolasa a las actividades enzimáticas respectivas.

*Mecanismo de acción.*—Respecto a la actividad catecolasa, en conjunto, no hay grandes discrepancias aunque presenta el problema de que constituye un enzima que no se ha podido purificar totalmente y cuyo mecanismo de acción no se conoce del todo. Está bien establecido que contiene cobre (5), que es necesario para su actuación.

Las discusiones más apasionadas se han centrado sobre la naturaleza y forma de actuación de la actividad cresolasa y aunque es un problema planteado desde hace unos 30 años, todavía sigue sin resolver. Actualmente existen dos tendencias totalmente opuestas: la hipótesis indirecta, no enzimática, defendida por Kertesz y Zito (6) y la indirecta o enzimática hacia la cual se inclinan la mayoría de los investigadores (7) de este campo y cuyo portavoz más representativo es Mason.

Según Mason, se deben tener en cuenta los siguientes hechos experimentales comprobados:

1.º—La relación actividad cresolasa/actividad catecolasa de un preparado enzimático es fácilmente alterable por la acción de diversos factores y sobre todo por el proceso de purificación, en el que generalmente se pierde la actividad cresolasa. Por otra parte, aunque se pueden obtener preparados de alta actividad catecolasa (sin apreciable actividad cresolasa), los preparados más puros de cresolasa siempre poseen una importante actividad catecolasa.

2.º—Durante la acción catecolasa, cobre radioactivo en disolución puede intercambiar con el cobre del enzima, pero el fenómeno es menos ostensible en el caso de la actividad cresolasa.

3.º—Las dos actividades están asociadas a los mismos componentes aislables y caracterizables electroforéticamente y por ultracentrifugación.

4.º—Ambas actividades se inhiben de un modo semejante, tanto por inhibidores de cobre, como por medio de sustratos competitivos.

5.º—La actividad cresolasa es estereoespecífica hacia ciertos sustratos.

6.º—En la acción catecolasa dos átomos de  $\text{Cu}^{+2}$  se reducen a  $\text{Cu}^{+1}$  por cada molécula de *o*-difenol. Una molécula de monóxido de carbono se puede unir a dos átomos de cobre del enzima.

7.º—Para eliminar la necesidad de un período de inducción, la actividad cresolasa requiere la presencia de *o*-difenoles, hidroquinona o de ciertos reductores como ácido ascórbico y  $\text{NADH}_2$ . La duración de dicho período es variable con los preparados y su grado de purificación, aumentando, en general, al ser mayor la purificación.

8.º—El oxígeno que produce la hidroxilación del monofenol a difenol durante la acción cresolasa, procede de la atmósfera y no del agua del medio de reacción.

De los dos primeros puntos, Mason deduce que las dos actividades en-

zimáticas son independientes, aunque pueden darse en la misma molécula de proteína.

De 3.º, 4.º y 5.º, concluye que ambas actividades deben estar íntimamente asociadas y de los restantes hechos interpreta que cresolasa es una actividad enzimática que en el centro activo posee dos átomos de  $\text{Cu}^{+1}$ , los cuales pasan a este estado procedente del  $\text{Cu}^{+2}$  inicial, como consecuencia de la acción de difenoles u otros reductores.

Si durante la purificación del enzima se separan los dos átomos de cobre o solamente se pierde uno, se provoca la pérdida de actividad cresolasa (que necesita de dos cobres), pero no necesariamente de la actividad catecolasa, que no debe precisar tal condición de estructura.

A partir de estas ideas Mason elabora una hipótesis, según la cual la actividad cresolasa se manifiesta cuando dos átomos de cobre ocupan en la molécula del enzima una configuración espacial determinada.

Kertesz y Zito apoyan su teoría de que la actividad cresolasa no es de carácter enzimático en algunos hechos experimentales distintos a los anteriores utilizados por Mason. Suponen que la hidroxilación del monofenol no es enzimática, sino que se debe a una acción directa realizada por la quinona (u otro producto relacionado) procedente de la oxidación enzimática de un difenol por catecolasa. Para explicar la actividad cresolasa, medida en presencia de ácido ascórbico u otros reductores, acuden a otros mecanismos. Sobre todo, estos investigadores insisten en la crítica de los hechos experimentales en los que se basa la teoría de Mason y no los consideran suficientemente demostrativos de las conclusiones que la teoría enzimática ha extraído de ellos.

Nosotros, a lo largo de este trabajo, intentaremos relacionar los resultados que obtengamos con estas dos hipótesis y al final deduciremos nuestras propias conclusiones.

*Papel biológico.*—El posible papel biológico del complejo fenolasa y sus sustratos se ha estudiado hasta ahora en los aspectos de participación en los procesos de:

- a) Respiración.
- b) Biosíntesis.
- c) Pardeos.

a) *Respiración.*—Los enzimas del complejo fenolasa están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Lo mismo sucede con sus sustratos y con otros enzimas capaces de reducir los productos de oxidación de los fenoles. Esta ha sido razón para pensar que el sistema fenolasa tiene algún cometido en la respiración de tejidos vegetales. La discusión se centra principalmente en si es o no una oxidasa terminal.

En los trabajos de Mason (8), Bonner (9) y Boswell (10) se describen los resultados obtenidos por los investigadores en este campo. Las dos líneas principales de trabajo han sido, por una parte la de los defensores de la intervención de fenolasa como oxidasa terminal, ya que comprueban notables aumentos en el consumo de oxígeno y en el desprendimiento de dióxido de carbono al adicionar sustratos fenólicos, naturales o no, a «slices» o discos de tejidos. Por otro lado, los que rechazan esa hipótesis, se basan en sus propios datos de inhibidores más o menos específicos de fenolasa sobre la respiración, especialmente la acción del monóxido de carbono y su reversibilidad por la luz. Los resultados les hacen pensar que fenolasa no es una oxidasa terminal.

Estos dos grupos de experimentos han sido sometidos a una severa crítica (11), de la cual resulta que, hasta el presente, ninguno de ellos es demostrativo y que en el futuro el problema se debe abordar bajo otros puntos de vista.

Aparte de la hipótesis de actuar como oxidasa terminal, el ya citado Bonner señala la posibilidad de que el papel de la fenolasa en la respiración de plantas se debe considerar en términos de transporte de electrones en sistemas anaeróbicos, actuando como aceptores de electrones el citocromo c en mitocondrias y el citocromo f en cloroplastos.

b) *Biosíntesis*.—Las sustancias fenólicas naturales se consideran relacionadas en general con la biosíntesis de otras sustancias, entre las que citaremos:

1.—Tropolonas.

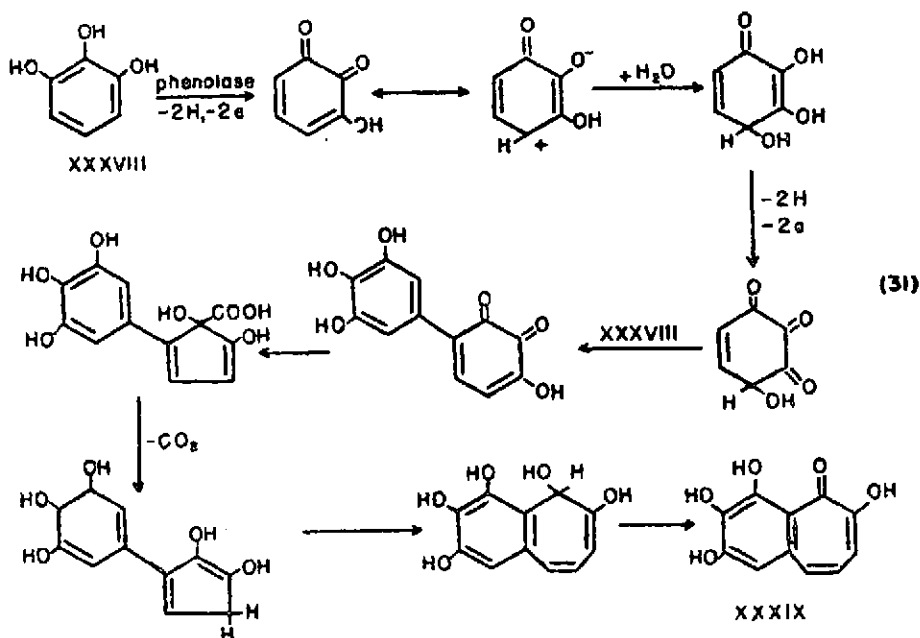
2.—Flavonoides.

3.—Ligninas.

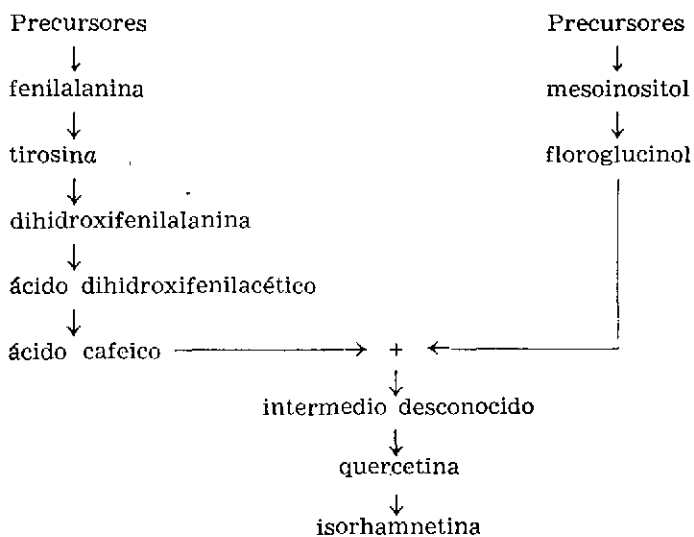
*Tropolonas*.—La hipótesis que consideramos más aceptable es la de Critchlow (12). Según ella, las benzotropolonas se originarían a partir del ácido gálico, a través de un mecanismo análogo al de formación de purpurogalina a partir del pirogalol (13) cuyo esquema se expone a continuación:

*Flavonoides*.—Por ensayos de copulación entre gametos masculinos y femeninos del alga verde de «*Chlamydomonas eugametos*», copulación que requiere la presencia de cantidades catalíticas de isorhamnetina (14), se ha deducido un esquema en el cual por condensación de ácido cafeico (procedente probablemente de fenilalanina) y floroglucina, resultaría un

intermedio (¿chalcona?) que a su vez pasaría a quercetina y ésta a isorhamnetina. Este esquema parece adecuado para explicar la síntesis de los



diversos compuestos flavonoides que poseen una estructura  $C_6, C_3, C_6$ , y se expone a continuación:





*Lignina*.—Freudenberg (15) supone, igual que otros investigadores, que el complejo fenolasa actúa en la transformación del alcohol coniferílico a lignina, pero, por otra parte, parece que otras sustancias distintas al alcohol coniferílico también pueden actuar como precursores de la lignina.

c) *Pardeos*.—La acción fenolasa primaria termina en la etapa quinona, pero en la realidad, el proceso continúa con reacciones poco conocidas de condensación, oxidación y descarboxilación dando lugar a sustancias coloreadas y a este proceso lo denominamos reacciones de pardeo.

Existen pardeos funcionales, como son los que dan origen a la cutícula que rodea algunas semillas, pero, eventualmente, se producen pardeos cuando se rompe por algún medio la estructura celular, con lo que los enzimas fenólicos se ponen en contacto total con sus sustratos naturales. Aparte del aspecto negativo de este pardeo no funcional (ejemplos: los pardeos producidos durante la recolección, almacenaje o industrialización de los frutos), existe un aspecto positivo que se investiga actualmente, pues constituye un sistema de defensa del fruto contra algunos agentes externos, principalmente la infección por picaduras de insectos. Este sistema de defensa, según Cole (16) y Williams (17), actúa por acción de fenolasa sobre sus sustratos, originando unos productos coloreados, que se ha demostrado inhiben la actividad pectinasa, segregada por el microorganismo infectante y que sería necesaria para destruir las pectinas y, de este modo, facilitar, la propagación de la infección.

#### COMPLEJO FENOLASA DE ALBARICOQUE, MELOCOTÓN Y ALCACHOFA

Hemos encontrado pocas referencias de estudios sobre este complejo en albaricoque, melocotón y alcachofa, ya que, lo general consiste tan sólo en citar su existencia.

Unicamente hemos localizado el trabajo «Oxidasas del albaricoque» de Tabey y Cruess publicado en 1949 (18). Estos autores tras unas consideraciones previas, exponen unos métodos de medida colorimétrica para fenolasa y peroxidasa. Estudian el pH óptimo de medida para fenolasa (pH 7) y peroxidasa (pH 5) y el efecto inhibitor de diversas sustancias a varias concentraciones y un solo pH de medida: cianuro sódico, azida sódica, azúcares, etc. También realizan unas pocas experiencias de estabilidad del enzima, así como unas pruebas de congelación de albaricoques durante meses en diversos medios de preservación. Pero desde la fecha de publicación de dicho trabajo han aparecido nuevos enfoques sobre este tipo de enzimas y mejores técnicas de medida, por lo cual los resultados que obtuvieron no deben considerarse totalmente definitivos, apar-

te de que su estudio no es muy profundo y se limita a unas cuantas propiedades. Efectivamente, bastantes resultados obtenidos por nosotros difieren de los del citado estudio y también creemos haber aportado algunas nuevas propiedades de las que hasta ahora no se tenía conocimiento y en general intentamos interpretar nuestros datos a la luz de las teorías existentes sobre este sistema enzimático.

## PARTE EXPERIMENTAL

## III

PROCEDIMIENTOS DE MEDIDA DE ACTIVIDADES  
ENZIMATICAS

En la bibliografía (19), hemos encontrado diferentes técnicas utilizadas para las medidas de actividades ascórbico-oxidasas, polifenoloxidasas y peroxidadas. Con este motivo se han utilizado procedimientos colorimétricos, polarográficos, manométricos, espectrofotométricos, etc.

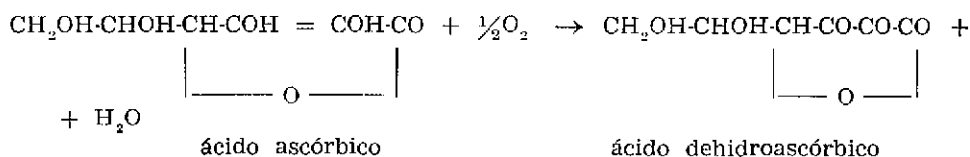
En el transcurso del presente trabajo hemos ensayado varios de ellos y enumeramos a continuación aquellos que hemos puesto a punto por considerarlos los más adecuados a los problemas que se nos presentaron.

## A.—MEDIDA DE ACTIVIDAD ASCÓRBICO-OXIDASA

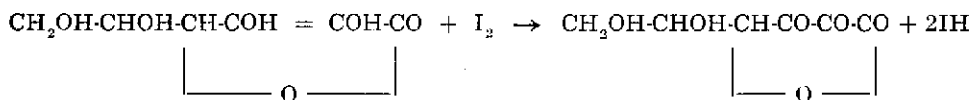
a) *Procedimiento manométrico.*—En un matraz de aparato Warburg se coloca en la rama lateral la disolución enzimática y en el matraz un medio tamponado con la cantidad adecuada de sustrato (ácido ascórbico) disuelto en él. En el recinto interior central situamos una disolución de hidróxido potásico al 10 % embebida sobre papel de filtro para ofrecer mayor superficie de reacción con el posible CO<sub>2</sub> existente. En el tiempo 0, se hace la mezcla del enzima con el medio de reacción y se mide en el manómetro, a diversos intervalos, el oxígeno absorbido. La temperatura se fija (25° C) por medio del termostato del aparato y la agitación se conserva constante (120 movimientos por minuto).

b) *Procedimiento iodométrico.*—En un medio tamponado existe una cantidad determinada de ácido ascórbico, que sirve de sustrato a la disolución enzimática agregada en el tiempo 0. Durante un cierto período de tiempo se agita (con agitador magnético) el medio de reacción y se finaliza la actuación enzimática añadiendo una cantidad adecuada de ácido metafosfórico al 10 %. El ácido ascórbico inicial se conoce con el correspondiente blanco. La valoración del ácido ascórbico no oxidado se realiza con una disolución de yodo 0,01 N ó 0,005 N y con indicador de engrudo de almidón. La diferencia entre el ácido inicial y el final nos da el ácido oxidado por la acción del oxígeno, gracias al papel catalizador del enzima, o sea la actividad ascórbico-oxidasa durante el período de tiempo considerado.

La justificación de estas técnicas es sencilla. El enzima ascórbico-oxidasa cataliza que el oxígeno del aire oxide el ácido ascórbico hasta ácido dehidroascórbico. La formulación más simple para la reacción es:



En el procedimiento manométrico se mide el oxígeno consumido y en el iodométrico, se valora el ácido ascórbico presente:



*Medida tipo experimentación.*—La medida *tipo* iodométrica la establecimos así: Se colocan en un vaso de 50 ml, 5 ml de tampón fosfatocítrico 0,2 M pH 7 y 1 ml de disolución de ácido ascórbico  $10^{-2}$  M. Se añade 1 ml de disolución de enzima y se deja actuar durante 5 minutos, al finalizar los cuales se interrumpe la reacción por la adición de 5 ml de ácido metafosfórico del 10 % y se procede a la valoración con yodo 0,005 N. El blanco consiste en sustituir la disolución con el enzima activo por otra previamente hervida, a fin de desnaturalizar al enzima, o por 1 ml de agua bidestilada.

No hemos podido detectar la existencia cierta de una actividad ascórbico-oxidasa de alguna consideración en albaricoque, melocotón y alcachofa. En los dos primeros casos los ligeros indicios de oxidación del ácido ascórbico se deben a su autooxidación en las condiciones de realiza-

ción de la medida. La comprobación la hicimos manométrica y iodométricamente.

En la alcachofa, los resultados de las mediciones son un poco más altos, debido a que trabajamos con homogenados crudos y en ellos coexisten una intensa actividad fenolasa y una cantidad apreciable de sustratos naturales (fenoles) que, por tal razón, se oxidan, lo cual determina que parte del ácido ascórbico presente se utilice en reducir los productos de oxidación de los fenoles.

La confirmación aparece en los datos de la tabla n.º 1. La oxidación desapareció al someter la preparación enzimática a una diálisis contra agua destilada a 0° C, durante dos horas. Lo mismo sucedía al utilizar polvos acetónicos como fuente del enzima. En ambos casos se han eliminado los fenoles endógenos.

Los datos de la tabla 1 corresponden a medida *tipo* y los valores volumétricos se han convertido a  $\mu\text{l}$  de  $\text{O}_2$ . Aunque solamente se indica un grupo de valores, en realidad representan un hecho confirmado por una extensa y múltiple experiencia.

TABLA N.º 1

## ASCORBICO OXIDASA EN ALCACHOFA

Enzima	Oxidación de ácido ascórbico en 5 minutos. $\mu\text{l. O}_2$
A	10
B	2
C	2
D	1

Enzima A: Homogenado directo.

Enzima B: Homogenado directo dializado.

Enzima C: Procedente de polvo acetónico previo.

Enzima D: Inactivada por ebullición durante diez minutos.

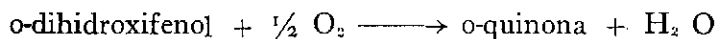
Está claro al comparar A con los otros tres preparados que la actividad fenolasa es la responsable del pequeño valor de A. Además, como no hay diferencias entre B, C y D, ello significa la existencia de una autooxidación de valor despreciable.

## B.—MEDIDA DE ACTIVIDAD CATECOLASA

a) *Procedimiento manométrico*.—En esencia, es el mismo que para la medida de ascórbico-oxidasa, con la variante de la adición al tampón de la cantidad adecuada de una disolución del sustrato, catecol.

b) *Procedimiento iodométrico*.—Está basado en el método de Mikhlin y Bronovitskaya (20) y consiste en tener un medio tamponado conteniendo el sustrato catecol y la cantidad adecuada de ácido ascórbico (determinable por un blanco). Tras añadir la disolución enzimática, se mantiene un corto período de tiempo (2-3 minutos) la agitación magnética y se finaliza la acción enzimática por la adición de una disolución de ácido metafosfórico del 10 %. El ácido ascórbico no oxidado se valora con disolución diluída de iodo (0,01 N ó 0,005 N). La diferencia entre el ácido ascórbico inicial y el final nos mide la actividad enzimática durante ese período.

La razón de utilizar estas técnicas se encuentra en que la catecolasa, determina que el oxígeno del aire oxide en una primera etapa el o-difenol hasta la quinona correspondiente. En resumen la reacción total es:



En el procedimiento manométrico se mide el oxígeno consumido. En el iodométrico, la función del ácido ascórbico es reducir la o-quinona según se va formando hasta el o-dihidroxifenol, a costa de pasar a ácido dehidroascórbico. Por tanto, la concentración de o-dihidroxifenol permanece prácticamente constante; la desaparición de ácido ascórbico nos mide la o-quinona total formada equivalente al o-dihidroxifenol transformado o lo que es igual a la actividad enzimática.

Para evitar repeticiones en la exposición de condiciones vamos a establecer desde ahora una medida tipo de la actividad catecolasa y en lo sucesivo se entenderá que todas las mediciones se han efectuado de acuerdo con este tipo salvo indicación contraria.

*Medida tipo catecolasa*.—En un vaso Pirex de 50 ml se colocan 5 ml de tampón ácido cítrico-fosfato disódico 0,2 M, pH 7 y se agregan 1 ml de disolución de catecol 0,1 M y 1 ml de disolución de ácido ascórbico  $3 \cdot 10^{-2}$  N. En el tiempo 0 se vierte al medio 1 ml de disolución enzimática de concentración adecuada y durante 3 minutos se somete a una moderada agitación mediante un agitador magnético cuidando que no se produzca espuma (peligro de desnaturalización de proteínas). Al finalizar dicho período se interrumpe la reacción por la adición de 5 ml de ácido metafosfórico al 10 % que proporciona la acidez suficiente e inactiva el

enzima. A continuación de poner 1 ml de engrudo de almidón al 2 por mil, se procede a la valoración del ácido ascórbico presente mediante una disolución de iodo 0,005 N.

La medida del blanco es análoga, previa sustitución del enzima activo por agua bidestilada o por enzima inactivado por un tratamiento a 100° C durante 10 minutos. La diferencia entre el valor del blanco y el activo nos da el ácido ascórbico transformado que con fines comparativos siempre lo expresaremos relacionándolo con  $\mu\text{l}$  de  $\text{O}_2$  absorbidos, teniendo en cuenta que en condiciones normales de presión y a 25° C, 1 ml de iodo 0,005 N equivale a 30, 55  $\mu\text{l}$  de  $\text{O}_2$  en la oxidación del ácido ascórbico.

c) *Factores que intervienen en la medida de catecolasa.*—La condición más apetecible de una buena medida de actividad enzimática es que el resultado numérico sea directamente proporcional a la cantidad de enzima actuante. Para asegurar este aspecto es preciso un control previo de cada uno de los factores que intervienen en las mediciones. Son:

1. *Autooxidación del ácido ascórbico.*—Conviene asegurar el grado en que son de procedencia enzimática las oxidaciones del ácido ascórbico. En la tabla n.º 2 se muestran los resultados obtenidos trabajando en el aparato Warburg a 30° C y 120 oscilaciones por minuto. Se utilizaron tampones ácido cítrico - fosfato disódico y fosfato monosódico - fosfato disódico 0,1 M, con pH variables entre 3 y 7. En cada matraz se situaron 2,5 ml de tampón y 0,5 ml de ácido ascórbico 0,1 M.

Según estos datos, que corresponden a una de las varias operaciones realizadas, coincidentes entre sí, hay un incremento en la autooxidación con el aumento de pH, con un máximo próximo al pH 6. El oxígeno absorbido es el que se utiliza en la oxidación del ácido ascórbico.

En todas las medidas manométricas de catecolasa hay largos tiempos de actuación y se ha de tener en cuenta este fenómeno de autooxidación, por lo cual siempre hemos realizado en tales casos blancos con enzima hervido.

TABLA N.º 2

## AUTOOXIDACION DEL ACIDO ASCORBICO

pH tampón	ABSORCIONES DE OXIGENO EN $\mu$ l					
	10 minutos	20'	30'	40'	50'	60'
7,9	3	10	18	23	31	40
6,85	4	12	20	28	36	45
5,85	13	29	41	54	66	77
4,75	2	5	8	11	16	19
3,90	0	3	4	6	9	10
2,95	0	3	3	3	6	6
H <sub>2</sub> O	0	2	4	6	6	9

Aparato Warburg a 30° C y 120 oscilaciones por minuto.

En las medidas iodométricas de actividad catecolasa el tiempo de actuación es de tres minutos y la concentración del ascórbico  $3 \cdot 10^{-2}$  N, con una autooxidación del orden de  $0,5 \mu$ l de O<sub>2</sub>, o sea menos de 0,02 ml de la disolución de iodo 0,005 N, cantidad que corresponde a la sensibilidad del método volumétrico de valoración escogido. En este caso, sería posible desechar el efecto de la autooxidación, aunque en la práctica no lo hemos hecho así sino que lo hemos tenido en cuenta (blancos de actividad catecolasa). Con los resultados obtenidos, hemos podido tener siempre la seguridad de que los procesos que medíamos eran totalmente enzimáticos.

2. *Concentración de ácido ascórbico.*—Deseamos conocer si el ácido ascórbico limitaba la velocidad de reacción en las condiciones normales de actividad catecolasa, problema discutido en algunos trabajos sobre fenolasas (21). Algunos autores han señalado que el ácido ascórbico inactiva los complejos fenolasa estudiados por ellos, mientras que otros afirman que tales hechos se originan por errores.

En nuestro caso, preparamos, para aclarar este problema, un extracto enzimático concentrado y estudiamos en él el efecto de la concentración del ácido ascórbico sobre la actividad del enzima. Las medidas corresponden a las «tipo» con la sola variación de las cantidades de ácido ascórbico.

Los resultados se expresan en la tabla n.º 3 y en la gráfica n.º 1.



TABLA N.º 3

EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL ACIDO ASCORBICO SOBRE LA MEDIDA DE CATECOLASA

ácido ascórbico en el medio	Catecolasa $\mu\text{l} \cdot \text{O}_2$	% ascórbico oxidado sobre el inicial
$2,84 \cdot 10^{-3}$ M	42,7	15,1
$2,72 \cdot 10^{-3}$ M	42,4	18,5
$1,70 \cdot 10^{-3}$ M	41,0	25
$1,42 \cdot 10^{-3}$ M	41,2	29,6
$1,14 \cdot 10^{-3}$ M	41,2	35,5
$0,85 \cdot 10^{-3}$ M	40,8	47,2
$0,57 \cdot 10^{-3}$ M	40,1	69

De tales datos deducimos que dentro de las condiciones utilizadas, la medida de actividad enzimática es independiente de la cantidad de ácido ascórbico presente.

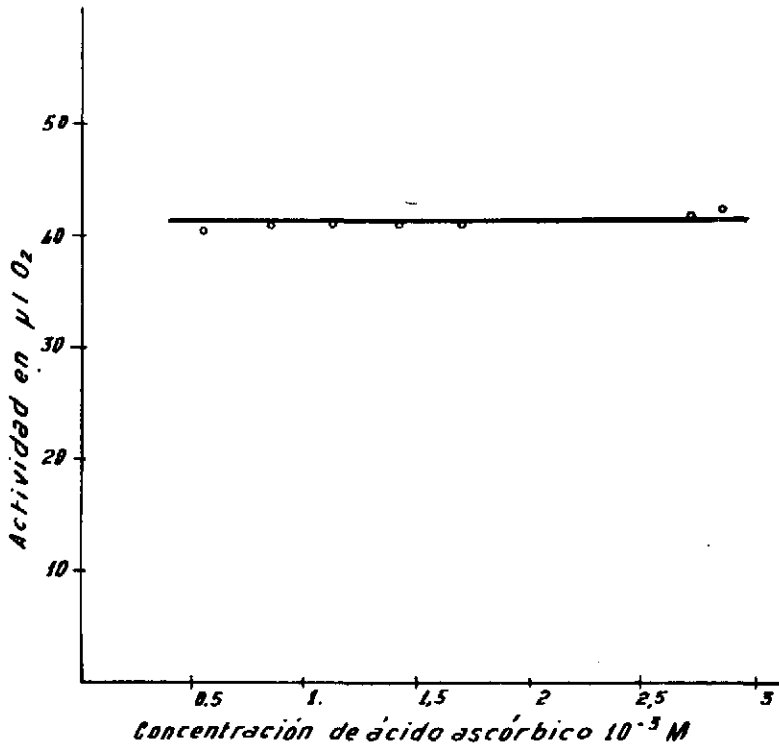
En todas las medidas de catecolasa que figuran en el presente trabajo, el nivel de ácido ascórbico ha sido superior al mínimo que aparece en la tabla n.º 3, por lo cual este factor no ha sido nunca limitante.

Por otra parte, al utilizar el procedimiento manométrico de medida, hemos comprobado repetidamente que la presencia del ácido ascórbico no afecta la velocidad de la reacción, de donde se deduce la ausencia de posibles efectos activadores o inhibidores del ácido ascórbico sobre el enzima.

3. *Tiempo*.—Para determinar el tiempo óptimo de actuación (valoración iodométrica), realizamos un ensayo de medida de actividad a lo largo del tiempo. Obtuvimos los resultados expresados en la tabla n.º 4 y en la gráfica n.º 2 de los que se deduce que no existe linealidad con la actividad a lo largo del tiempo, aun en intervalos pequeños.

Con la finalidad de aclarar el problema cinético planteado, repetimos el ensayo con un tiempo máximo de actuación de 70 minutos, en lugar de los 4 minutos. Medimos la actividad en distintos tiempos y los resultados que recogemos en la tabla n.º 5 y en la gráfica n.º 3, representan uno de los varios ensayos efectuados.

Indudablemente las medidas de actividad no responden a una cinética de orden cero. Las posibles causas de tal comportamiento serían: a) alguna de las sustancias reaccionantes está en concentraciones limitantes; b) el enzima se inactiva durante su actuación.

Gráfica nº 1

*Efecto de la concentración del ácido ascórbico sobre la medida de la actividad catecolasa.*

TABLA N.º 4  
INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ACTUACION SOBRE  
LA MEDIDA DE CATECOLASA

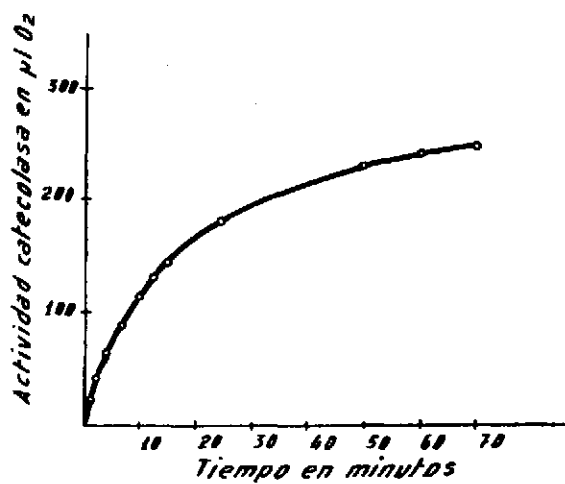
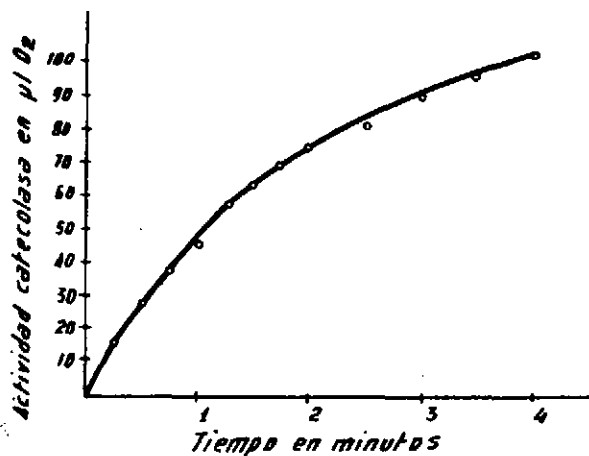
Tiempo de actuación	Actividad $\mu\text{l} \cdot \text{O}_2$
0' 0''	0
0' 15''	16
0' 30''	27
0' 45''	38
1'	45
1' 15''	57
1' 30''	63
1' 45''	69
2'	74
2' 30''	81
3'	90
3' 30''	96
4'	102

Medio de reacción: el «tipo» multiplicado por 20 el volumen.

Medidas individuales efectuadas sacando muestras de 1 ml a distintos tiempos y tras verter sobre 5 ml de ácido metafosfórico del 10 %, se valoran.

TABLA N.º 5  
INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ACTUACION SOBRE LA MEDIDA  
DE CATECOLASA

Tiempo de actuación	Actividad $\mu\text{l} \cdot \text{O}_2$
1'	22
2'	41
3'	49
4'	64
5'	70
6'	80
7'	89
8'	98
9'	106
10'	112
11'	117
13'	130
15'	142
18'	159
25'	182
50'	233
60'	240
70'	246

*Gráficas nos 2 y 3*

*Inactivación del enzima catecolasa durante su actuación.*

Respecto a la posibilidad a) nosotros suponemos que, aparte del enzima, en la reacción sólo tienen participación el catecol y el oxígeno. El ácido ascórbico podría limitar la velocidad en la etapa no enzimática de reducción de la quinona, pero ya hemos demostrado anteriormente que no ocurre así en nuestras condiciones de medida. El catecol posee un nivel constante de concentración a lo largo del tiempo, pues su producto de oxidación se va reduciendo inmediatamente. En cuanto al oxígeno, demostraremos más tarde que no es factor limitante en las condiciones de estos ensayos.

Parece lógico pensar que hemos de desechar la posibilidad de que existan otras sustancias desconocidas que puedan limitar la reacción, por lo cual debemos deducir que la disminución de actividad a lo largo del tiempo se debe a una inactivación del enzima en el transcurso de su actuación.

En la bibliografía (22), existen referencias sobre este tipo de inactivación así como discrepancias en torno a la cinética del fenómeno, pues autores que en principio señalaron una inactivación del enzima de orden 3/2, posteriormente se inclinan por una de primer orden.

En el período considerado por nosotros, la gráfica de la reacción parece representar una cinética de primer orden. En efecto, en la ecuación

$$K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$$

los cálculos correspondientes efectuados con datos de

la experiencia recogida en la tabla n.º 5 y gráfica n.º 3 nos dieron los valores expuestos a continuación:

$$\begin{aligned} K &= 0,96 \cdot 10^{-3} \text{ sg}^{-1} \\ t_{1/2} &= 720 \text{ segundos} \\ a &= 250 \mu\text{l O}_2 \end{aligned}$$

Hemos comparado los valores de una reacción teórica de primer orden, que responda a las características de las constantes anteriores, obtenidas a partir de los datos experimentales, y comprobado la coincidencia existente, que nos lleva a pensar en una destrucción del enzima según una cinética de primer orden. Los datos se exponen en la tabla n.º 6.

De acuerdo con todo lo expuesto anteriormente, en las medidas de actividad catecolasa no es práctico utilizar distintos tiempos de actuación en medidas comparativas, por lo cual en tales casos siempre hemos escogido un mismo tiempo de reacción (2 ó 3 minutos), que es lo suficientemente alto para que la medida de actividad quede lejos del error experimental y es lo bastante bajo para que la medida sea cómoda. Por otra parte, se deduce de nuestra técnica experimental que la inactivación del

enzima no se debe a la presencia de los productos de oxidación enzimática del sustrato.

4) *Acceso de oxígeno y concentración del enzima.*—Dawson y Scharf (21) en 1958 señalaron la inexactitud de las conclusiones de algunos trabajos sobre tirosinasas publicados por varios autores con anterioridad. Uno de los errores citados era la insuficiente agitación del medio de reacción.

Al establecer un tiempo constante (3 minutos) de medida de la actividad catecolasa, hemos demostrado que los factores hasta ahora considerados no nos limitan la actividad cuando deseamos utilizar fines comparativos.

TABLA N.º 6

ORDEN DE LA INACTIVACION DEL ENZIMA CATECOLASA  
EN SU ACTUACION

Tiempo de actuación	Actividades	
	Valor teórico	Valor gráfico
12 minutos	123	123
24 minutos	184	180
36 minutos	215	212
48 minutos	230	231
60 minutos	238	240

Para comprobar hasta qué punto el acceso de oxígeno puede afectar la velocidad de reacción, hemos realizado un estudio comparado de dos condiciones diferentes de actuación: Sin agitación y con agitación normal (agitador magnético). Las cantidades empleadas en el medio de reacción fueron las «tipo» excepto en el enzima, cuyo volumen variamos en ambos casos desde 0 a 2 ml, completando con agua bidestilada cuando la cantidad era inferior a los 2 ml. Por tanto, el medio de reacción siempre tiene una misma concentración de todas las sustancias, excepto de enzima.

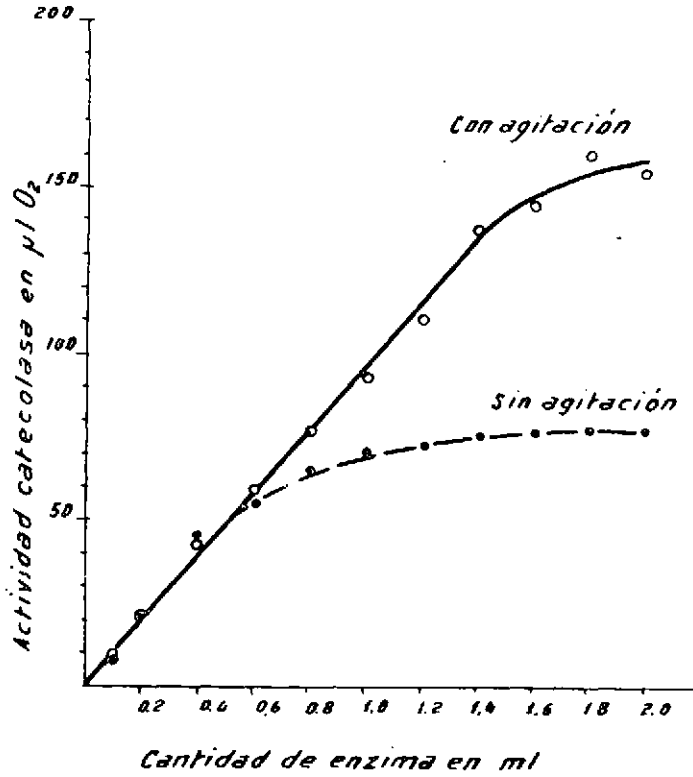
Los resultados obtenidos se expresan en la tabla n.º 7 y en la gráfica n.º 4. Y de ellos, comprobamos que se presenta una primera zona lineal que al aumentar la concentración del enzima deja de serlo. Veremos después que la concentración de catecol utilizada en las medidas «tipo» es varias veces superior a su  $K_m$ , por lo cual no limita la velocidad. De ahí, según los datos anteriores llegamos a la conclusión definitiva de que el oxígeno limita la acción enzimática de la catecolasa si su acceso es insuficiente. Este es el caso de poca o ninguna agitación o aun cuando la agitación es notable, si la concentración del enzima es elevada, pues entonces la necesidad de oxígeno para alcanzar la saturación es mayor que el suministrado por tal agitación, cuya finalidad es aumentar la cantidad de oxígeno que llega hasta el medio.

TABLA N.º 7

INFLUENCIA DEL ACCESO DE OXIGENO SOBRE LA MEDIDA  
DE CATECOLASA

ml de enzima	Actividades en $\mu\text{l} \cdot \text{O}_2$	
	Sin agitación	Con agitación
0,1	8,3	10,3
0,2	20,5	20,8
0,4	44,8	41,8
0,6	54	59,5
0,8	64,7	78,5
1,0	69,2	93
1,2	72,2	111
1,4	73,8	138
1,6	75	144
1,8	77	160
2,0	77	153

Grafica nº 4.



*Influencia del acceso de oxígeno  
sobre medida de catecolasa.*



Con disoluciones enzimáticas procedentes de melocotón y alcachofa también se han confirmado plenamente los resultados anteriores. En todas las medidas que aparecen en este trabajo, se ha operado en la zona lineal de la gráfica 4, o sea cuando el oxígeno no frena todavía la reacción. Para conseguir esto se ha diluido el enzima cuando ha sido necesario, hasta obtener una actividad adecuada.

5) *Concentración del sustrato.*—Posteriormente expondremos los resultados del estudio de la actuación del enzima sobre catecol y otros sustratos a distintas concentraciones de éstos. Según los valores de  $K_m$  encontrados para el catecol ( $2,4 \cdot 10^{-3}$  M), como en la medida tipo de catecolasa, nosotros empleamos 1 ml de catecol  $10^{-1}$  M en un volumen total de reacción de 8 ml la concentración de catecol es  $1,25 \cdot 10^{-2}$  M, o sea, es 5 veces superior a la  $K_m$ , por lo cual en nuestras medidas estamos por encima de la concentración crítica del sustrato.

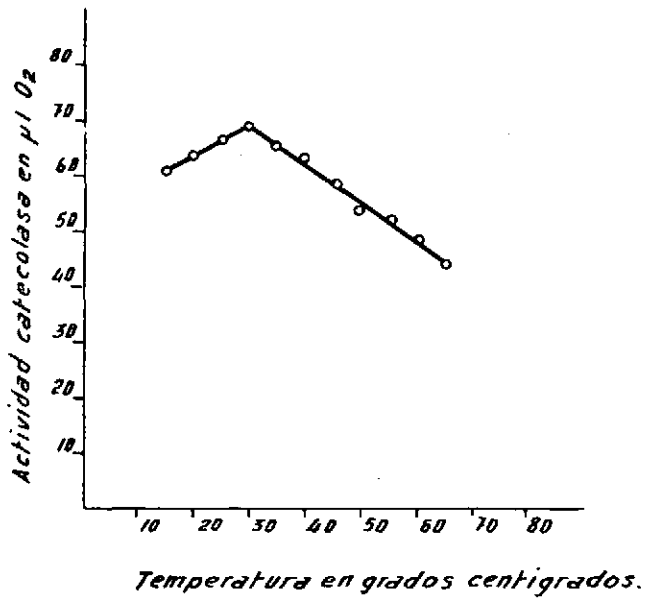
6) *Temperatura de medida.*—Es interesante estudiar la influencia de la temperatura de actuación de un enzima sobre la medida de su actividad, por lo cual, respetando la medida tipo de catecolasa realizamos los oportunos ensayos y blancos, con los resultados que aparecen en la tabla n.º 8 y en la figura n.º 5 que nos indican la presencia de un máximo definido para una temperatura de 30° C.

En general, todas las medidas de catecolasa que aparecen en el presente trabajo, las hemos efectuado a una temperatura de 25° C que proporciona una medida suficientemente alta que no tiene problemas de mantenimiento debido a las condiciones climáticas de esta región.

TABLA N.º 8

TEMPERATURA OPTIMA DE ACTUACION DE LA ACTIVIDAD CATECOLASA

Temperatura de medida	Actividad en $\mu\text{l} \cdot \text{O}_2$
15° C	61,3
20° C	63,7
25° C	66,2
30° C	68,7
35° C	65,3
40° C	63,2
45° C	58,5
50° C	54
55° C	52
60° C	48,5
65° C	44

*Grafica n.º 5*

*Temperatura óptima para la medida  
de actividad catecolasa*

### C. MEDIDA DE ACTIVIDAD CRESOLASA

a) *Procedimiento manométrico.*—Utilizamos un método semejante al expuesto para ascórbico oxidasa, pero se sustituye el ácido ascórbico por el nuevo sustrato p-cresol.

b) *Procedimiento iodométrico.*—El ensayo es análogo al reseñado para ascórbico oxidasa pero adicionando además p-cresol como sustrato.

Inicialmente para intentar detectar cresolasa en albaricoque, melocotón y alcachofa, usamos el método manométrico con resultados negativos, lo cual coincide con lo hallado por Tabey y Cruess (18) en su trabajo sobre albaricoque. Esto parecería indicar la ausencia de cresolasa en esos materiales. Ensayos iodométricos con un tiempo de actuación de 3 minutos mostraban signos no despreciables de actividad, hecho que fue confirmado cuando aumentamos el tiempo de actuación hasta 10 minutos.

En la bibliografía (23) se cita la posible existencia de períodos de inducción previos a la actuación del enzima cresolasa y entre los procedimientos para evitarlos se ha utilizado el poner catecol o ácido ascórbico en el medio de reacción. Comprobamos la veracidad de tal hecho con nuestros preparados y los tiempos de inducción fueron variables, desde unos pocos minutos en el caso de albaricoque, hasta más de 60 minutos en todos los ensayos con melocotón. En estas circunstancias, nuestros resultados positivos con el método iodométrico se explican porque la presencia de ácido ascórbico elimina o acorta el período de inducción y sucede una u tra cosa según la concentración de la vitamina C. La presencia de gelatina, utilizada por algunos autores (23), en nuestro caso no tienen efecto sobre el período de inducción ni sobre la magnitud de la actividad.

Efectuamos estos primeros ensayos de actividad con homogenados crudos. Las experiencias posteriores para el estudio del enzima las hemos realizado, generalmente, con extractos de polvos acetónicos y, en tales condiciones, hemos comprobado que el ácido ascórbico no siempre es capaz de evitar el período de inducción. Estos casos negativos han coincidido con el uso de polvos acetónicos «envejecidos», y entendemos por tales los que están preparados varios meses o bien aquellos cuya conservación ha sido defectuosa (ausencia de vacío). Para fines explicativos es bastante significativo el ensayo resumido en la tabla n.º 9 y n.º 10.

A la vista de estos resultados deducimos:

1.º La actividad cresolasa del polvo acetónico se pone de manifiesto claramente en presencia de catecol. Esta actividad viene expresada por la diferencia de consumos de oxígeno de B y F, puesto que este último corresponde a la oxidación de la cantidad catalítica de catecol, debida a la acción de la actividad catecolasa presente.

2.º En la concentración usada, el ácido ascórbico por sí solo no ha sido capaz de eliminar el período de inducción, lo cual se pone de manifiesto en el ensayo C. Como las medidas se siguieron hasta los 60 minutos, podemos deducir que en este polvo acetónico el período de inducción es mayor que dicho tiempo. Los resultados del ensayo E están de acuerdo con este supuesto.

3.º La presencia del ácido ascórbico en cantidades catalíticas no afecta sensiblemente la cuantía de la acción cresolasa inducida por la pequeña cantidad de catecol añadida.

Para comprobarlo basta comparar los ensayos A y B.

TABLA N.º 9

## FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MEDIDA DE CRESOLASA

*Composición de los matraques Warburg*

Tampón fosfato 0,2 M pH 7 ml	Acido ascórbico $2 \cdot 10^{-3}$ M ml	p-cresol $10^{-1}$ M ml	Catecol $10^{-1}$ M ml	Agua ml	Enzima ml	Enzima inactivo ml
A - 2	0,5	0,5	0,01	—	0,5	—
B - 2	—	0,5	0,01	0,5	0,5	—
C - 2	0,5	0,5	—	0,01	0,5	—
D - 2	—	—	0,01	1,0	0,5	—
E - 2	—	0,5	—	0,5	0,5	—
F - 2	—	—	0,01	0,5	0,5	—
G - 2	—	—	0,01	—	—	0,5

TABLA N.º 10

Operaciones efectuadas a 30° C y 120 oscilaciones por minuto

MEDIDAS DE ACTIVIDAD CRESOLASA EN  $\mu\text{l} \cdot \text{O}_2$ 

	10'	20'	30'	40'	50'	60'
A	13	32	54	76	98	115
B	5	26	48	71	94	109
C	0	1	0	0	2	2
D	7	10	16	19	21	22
E	0	0	1	1	0	1
F	5	11	16	19	21	22
G	0	0	1	3	3	5

Puesto que el ácido ascórbico no siempre evita el período de inducción en polvos acetónicos y es éste el material que utilizaremos en adelante para el estudio del enzima, la medida de actividad cresolasa la haremos siempre en presencia de catecol. Para determinar la concentración óptima de éste, realizamos una serie de ensayos manométricos variando su concentración tal como aparece en las tablas 11 y 12.

De las citadas tablas se deduce que la cantidad óptima de catecol es la que corresponde a una relación aproximada de 50 entre las concentraciones iniciales de p-cresol y catecol. Esto corresponde a los ensayos C y C'. En estas condiciones, la actividad cresolasa es la mayor y el consumo de oxígeno correspondiente a la actividad catecolasa no llega a interferir seriamente sobre cresolasa. De todas formas, siempre que hemos medido cresolasa hemos hecho un ensayo en blanco sin cresol, para deducir al consumo del activo el correspondiente a la actividad catecolasa procedente de la pequeña cantidad de catecol presente.

Como en el método iodométrico es forzosa la presencia del ácido ascórbico en una concentración alta, interesaba conocer su posible oxidación no enzimática en presencia de p-cresol. Hicimos las comprobaciones y ensayos oportunos y resultó que dicha autooxidación no viene afectada por la presencia del p-cresol. Por tanto, al hacer la corrección con el «blanco», se hace implícitamente la deducción correspondiente a la autooxidación.

TABLA N.º 11

## CONCENTRACION DE CATECOL EN LA MEDIDA DE CRESOLASA

*Composición de los matraces Warburg*

	Tampón fosfato 0,2 M pH 7 ml	Catecol 0,1 M ml	Cresol 0,1 M ml	Agua ml	Enzima ml
A	2	0,001	0,5	—	0,5
A'	2	0,001	—	0,5	0,5
B	2	0,005	0,5	—	0,5
B'	2	0,005	—	0,5	0,5
C	2	0,01	0,5	—	0,5
C'	2	0,01	—	0,5	0,5
D	2	0,05	0,5	—	0,5
D'	2	0,05	—	0,5	0,5
E	2	0,1	0,5	—	0,5
E'	2	0,1	—	0,5	0,5

TABLA N.º 12

MEDIDAS DE ACTIVIDAD CRESOLASA  $\mu\text{l O}_2$ 

	10'	20'	30'	40'	50'	60'
A	2	3	11	16	22	39
A'	0	0	2	3	3	5
Diferencia	2	3	9	13	19	34
B	7	17	28	37	47	56
B'	1	4	5	7	8	9
Diferencia	6	13	23	30	39	47
C	13	30	47	57	65	74
C'	0	3	6	10	13	15
Diferencia	13	27	41	47	52	59
D	22	48	66	74	88	97
D'	4	20	30	44	55	59
Diferencia	18	28	36	30	33	38
E	32	57	70	77	87	97
E'	14	36	49	65	83	91
Diferencia	18	21	21	12	4	6

De un modo semejante a lo que hicimos con catecolasa podemos denominar medida tipo iodométrico de cresolasa la expuesta a continuación.

*Medida tipo de cresolasa.* En un vaso de 50 ml se colocan 5 ml de tampón fosfato-cítrico 0,2 M pH 5; 1 ml de disolución de ácido ascórbico  $2,15 \cdot 10^{-2}$  M; 1 ml de disolución de p-cresol 0,1 M y 0,05 ml de disolución de catecol 0,1 M. En el tiempo 0 se añade 1 ml de disolución del enzima y la actuación se prolonga durante 10 minutos, al final de los cuales se interrumpe el proceso por la adición de 5 ml de ácido metafosfórico al 10 %, tras lo cual se valora el ácido ascórbico residual con iodo 0,0 05 N.

Para conocer la actividad cresolasa, al valor así obtenido se le resta el correspondiente a un ensayo semejante al anterior, pero sustituyendo el p-cresol por agua bidestilada.

Realizamos ensayos para conocer el probable efecto de la concentración del oxígeno sobre la velocidad de reacción. Los resultados de las medidas tipo se exponen en la tabla n.º 13, de la que es fácil deducir que la agitación y, por tanto, el acceso de oxígeno es un factor limitante de la medida de actividad. Por ello, en tales medidas hemos utilizado siempre el concurso del agitador magnético.

Debido a las características de funcionamiento del aparato Warburg, en el método manométrico de medición de cresolasa la agitación es siempre menor que en el iodométrico. En el Warburg, normalmente, hemos trabajado a 120 oscilaciones por minuto, mientras que corrientemente el agitador magnético utilizado en el proceso iodométrico mantiene una agitación más eficaz.

TABLA N.º 13

## INFLUENCIA DEL ACCESO DE OXIGENO SOBRE LA ACTIVIDAD CRESOLASA

Actividades en $\mu\text{l} \cdot \text{O}_2$		
	$\mu\text{l} \text{O}_2$	%
Cresolasa sin agitación	18,6	
Blanco (sin cresol) con agitación	5	
Diferencia	13,6	61 %
Cresolasa con agitación	27	
Blanco (sin cresol) sin agitación	5	
Diferencia	22	100 %

Por ello, con una agitación fija de 120 oscilaciones por minuto establecimos manométricamente que en las condiciones normales de realización de las medidas hay suficiente linealidad entre actividad y concentración del enzima. Los resultados de tales pruebas se recogen en las tablas n.º 14 y 15 y en la gráfica 6, y de ellas dedujimos los límites de concentración de nuestros preparados de cresolasa.

Aparte del estudio sobre albaricoque, con estos procedimientos hemos medido también actividades cresolasa en melocotón, a pesar del hecho ya señalado de que con este último fruto existen períodos previos de inducción, eliminables por catecol, de más de 60 minutos, notablemente superiores a los que se presentan en albaricoque, cuyo rango más general es de 10-40 minutos.

*Estudio crítico de la medida y de la acción cresolasa.*—Respecto al mecanismo de la acción cresolasa existen en la bibliografía gran diversidad de opiniones, de entre las cuales destacan dos teorías bien definidas, que se han expuesto ya en los Antecedentes.

La escuela de Columbia sostiene, junto con la casi totalidad de investigadores que se han ocupado de este asunto, que la reacción consiste en una hidroxilación del sustrato, catalizada por un enzima cresolasa, cuya actividad catalítica parece estar localizada en la misma molécula del enzima catecolasa, aunque no necesariamente en los centros activos de esta última actividad.

Kerstesz y Zito creen que la acción primaria también es una hidroxilación de sustrato monofenólico, pero sin poseer naturaleza enzimática, sino que se debe a la acción de una quinona (procedente de un o-difenol) o de ciertos reductores (ácido ascórbico, NADH, etc.) sobre el monofenol.

TABLA N.º 14  
MEDIDA DE CRESOLASA  
*Composición de los matraces*

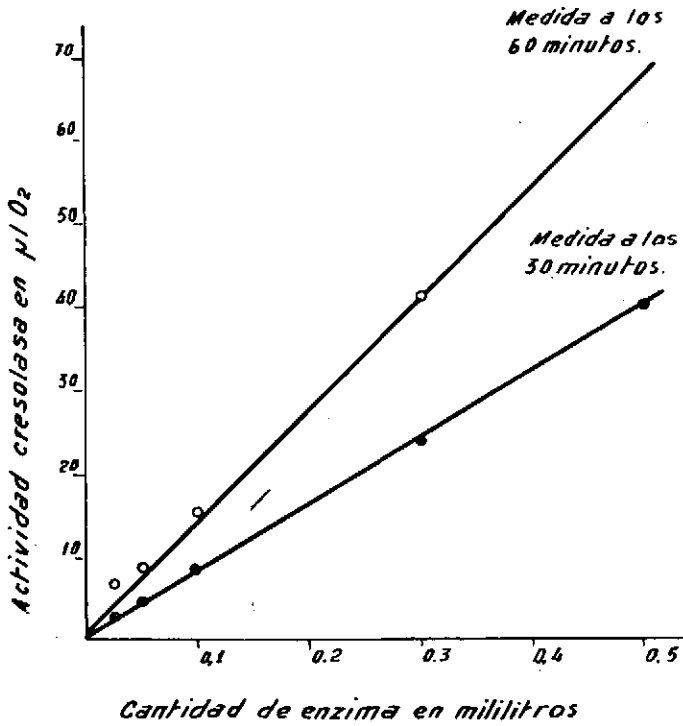
	Tampón 0,2 M, pH 7 ml	p-cresol 0,1 M ml	Catecol 0,1 M ml	Agua ml	Enzima ml
A	2	0,5	0,01	0,475	0,025
A'	2	—	0,01	0,975	0,025
B	2	0,5	0,01	0,45	0,05
B'	2	—	0,01	0,95	0,05
C	2	0,5	0,01	0,40	0,10
C'	2	—	0,01	0,90	0,10
D	2	0,5	0,01	0,20	0,30
D'	2	—	0,01	0,70	0,30
E	2	0,5	0,01	—	0,50
E'	2	—	0,01	0,50	0,50

TABLA N.º 15  
ABSORCION DE OXIGENO  $\mu\text{l O}_2$

	10'	20'	30'	40'	50'	60'
A	0	1	3	4	6	8
A'	0	0	0	0	1	1
Diferencia	0	1	3	4	5	7
B	3	3	7	10	11	13
B'	0	1	2	2	3	4
Diferencia	3	4	5	8	8	9
C	5	9	13	16	19	22
C'	1	2	4	5	6	8
Diferencia	4	7	9	11	13	14
D	8	16	29	37	45	50
D'	2	3	5	6	8	9
Diferencia	6	13	24	31	37	41
E	13	29	48	60	70	80
E'	3	6	8	11	13	15
Diferencia	10	23	40	49	57	65



Grafica nº. 6.



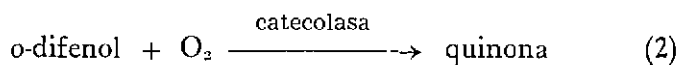
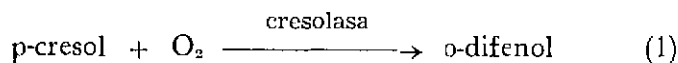
*Correspondencia entre actividad cresolasa medida, y cantidad de enzima presente.*



Cada una de estas dos hipótesis expone datos experimentales en su apoyo, pero ninguna de las dos resuelve todos los problemas que presenta el estudio de cresolasa. La verdadera actividad cresolasa es probable que no responda a ninguno de los dos supuestos extremos citados anteriormente.

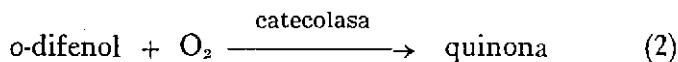
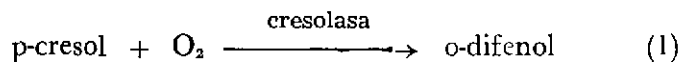
Nosotros, a continuación, vamos a intentar hacer una revisión de los métodos de medidas, con la advertencia, de que suponemos en todos los casos la presencia de una concentración muy pequeña de catecol para eliminar el período de inducción y de que no tomaremos en consideración el efecto de este catecol sobre la actividad catecolasa del enzima, pues ello se restará siempre del total al hacer el oportuno ensayo en blanco.

Según la hipótesis enzimática, en presencia de una cantidad catalítica de catecol y ausencia de ácido ascórbico (manométricamente) ocurriría así:



El oxígeno que se mide en este método es la suma del consumido por la acción cresolasa y por la actuación de catecolasa, cuyo sustrato es proporcionado por la reacción (1).

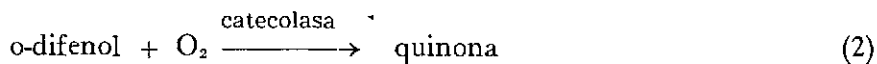
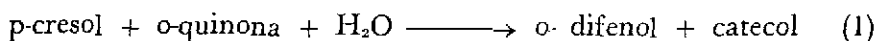
Todavía dentro de la teoría enzimática, la actividad en presencia de catecol y de concentración adecuada de ácido ascórbico, transcurrirá según el esquema próximo:



quinona + ácido ascórbico  $\longrightarrow$  o-difenol + ácido dehidro-ascórbico (3).

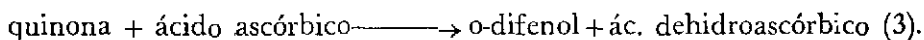
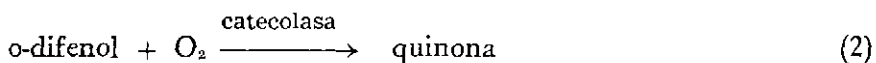
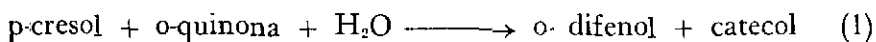
Manométricamente, cuentan las reacciones catalizadas por cresolasa y por catecolasa, con la característica, debida a la presencia de ácido ascórbico de que para esta última actividad se sirve como sustrato en cada instante del o-difenol producido por la cresolasa de un modo acumulativo, pues la quinona originada en (2) se reduce inmediatamente para dar el sustrato inicial de catecolasa. Iodométricamente, medimos el ácido ascórbico total empleado en la reducción de la quinona procedente de (2) por una acción catecolasa cuyo suministro de sustrato procede de dos fuentes: actividad cresolasa y reducción de la quinona.

Si admitimos las afirmaciones de Kerstesz y Zito, manométricamente y en ausencia de ácido ascórbico, hemos de expresar las reacciones así:



El oxígeno es una medida del o-difenol producido en la primera reacción, no enzimática.

En presencia de ácido ascórbico:



Manométricamente, el oxígeno corresponde a la acción catecolasa, cuyo o-difenol le es proporcionado en las reacciones (1) y (3). Iodométricamente, el ácido ascórbico se relaciona con la quinona total formada por la catecolasa, cuyo sustrato procede de las dos reacciones vistas anteriormente.

En conclusión, en ningún caso es posible controlar por sí sola la actividad cresolasa, enzimática o no, pues, 1.º) el o-difenol producido por cresolasa actúa como sustrato de catecolasa; 2.º) hasta el momento presente se han conseguido preparaciones muy purificadas de catecolasa sin actividad cresolasa, pero nunca se ha obtenido cresolasa sin que posea una gran acción catecolasa. Por todo ello, todavía no hay métodos adecuados para medida de cresolasa y los ya existentes se basan en un control indirecto en el que forzosamente interviene catecolasa. Por tanto, lo cierto es que podemos tener la seguridad de que los resultados de los procedimientos manométricos y iodométricos no corresponden a una acción individual cresolasa enzimática. Por el contrario, puede discutirse en ellos el grado de participación de la actividad catecolasa procedente de la «acción cresolasa», enzimática o no. De todos modos, como la catecolasa, por sí sola, no tiene actividad cresolasa aun sin conocer con exactitud la verdadera situación, seguiremos llamando actividad cresolasa a la causa que produce la hidroxilación del p-cresol hasta el o-difenol correspondiente.

En cuanto a la justificación de los procedimientos de medida que hemos utilizado, hay que tener presente que el gran número de determinaciones para el estudio de propiedades, aconseja seguir el método iodométrico por ser mucho más rápido que el manométrico.

Si la reacción de oxidación de los o-difenoles se detuviera en la etapa quinona, se podría dejar actuar el enzima en ausencia del ácido ascórbico y añadir éste al final de la reacción para reducir la quinona formada. En realidad, la quinona sufre transformaciones posteriores y el ácido ascórbico ya no actúa sobre esos productos resultantes, por lo cual debe estar presente desde el comienzo de la reacción. El inconveniente de este procedimiento estribaría en que al reducir la quinona conforme se va formando, el o-difenol correspondiente se irá acumulando en el medio de reacción, con lo cual la actividad catecolasa aumentaría. Para tener una idea adecuada de la magnitud relativa de estas dos reacciones, en las condiciones en que efectuamos nuestras medidas, realizamos un ensayo manométrico de actividades cresolasa en presencia y ausencia de ácido ascórbico, ambas en presencia de cantidad catalítica de catecol. Cada una de las determinaciones se acompaña con su correspondiente blanco, en ausencia de p-cresol. Los resultados son los de la tabla n.º 16.

A los 10 minutos, duración del método iodométrico, el exceso de actividad debido a la presencia de ascórbico es 20-25 % sobre la del medio en que no hay ácido ascórbico. Esto nos indica que en presencia de ácido ascórbico estamos midiendo una actividad catecolasa extra, pero ya señalamos antes la imposibilidad de medir una actividad cresolasa pura. Por otra parte, este exceso de actividad catecolasa es una consecuencia de la acción cresolasa previa, por lo cual, tanto sin ascórbico como con ascórbico, la medida total suma una acción cresolasa directa y otra indirecta a través de catecolasa. Por ello, el método tipo usado por nosotros es utilizable en las medidas comparativas.

TABLA N.º 16

## RELACION ENTRE ACIDO ASCORBICO Y CRESOLASA

*Composición de los matraces*

	Tampón fosfato 0,2 M ml	p-cresol 0,1 M ml	ascórbico 3.10 <sup>-2</sup> N ml	catecol 0,1 M ml	agua ml	enzima ml
A	2	0,4	0,4	0,02	—	0,4
A'	2	—	0,4	0,02	0,4	0,4
B	2	0,4	—	0,02	0,4	0,4
B'	2	—	—	0,02	0,8	0,4

*Absorciones de oxígeno  $\mu l O_2$* 

	5'	10'	20'	30'	40'	50'	60'
A	19	42	82	121	159	196	236
A'	5	9	17	27	36	44	51
*Dif.	14	33	65	94	123	152	185
B	15	35	68	102	142	183	219
B'	4	9	15	24	31	38	46
*Dif.	11	26	53	78	111	145	173

\* La diferencia es lo que llamamos actividad cresolasa.

En cuanto al efecto de la temperatura sobre la medida de la actividad cresolasa determinada según el método tipo obtuvimos los resultados de la tabla n.º 17 y de la gráfica n.º 7.

A la vista de la forma un tanto irregular de la gráfica repetimos varias veces el ensayo y siempre observamos la presencia de un mínimo alrededor de los 30° C. Hemos de tener presente los siguientes factores: 1.º) Presencia de actividad catecolasa; 2.º) Tiempo prolongado de medida; 3.º) Facilidad de inactivación de cresolasa en relación con catecolasa.

Consideramos imposible de establecer la explicación exacta de este comportamiento con los conocimientos actuales sobre estas enzimas. Lo único que podemos hacer es emitir una hipótesis que explique lo mejor posible el fenómeno y que esté de acuerdo con lo concebido hasta ahora. Podemos suponer (y después volveremos sobre este tema) que la acción cresolasa es de tipo enzimático y depende de algún modo del estado de ciertos átomos de cobre en la proteína. En la primera zona de temperaturas bajas, al ir aumentando éstas, coinciden dos fenómenos: por una

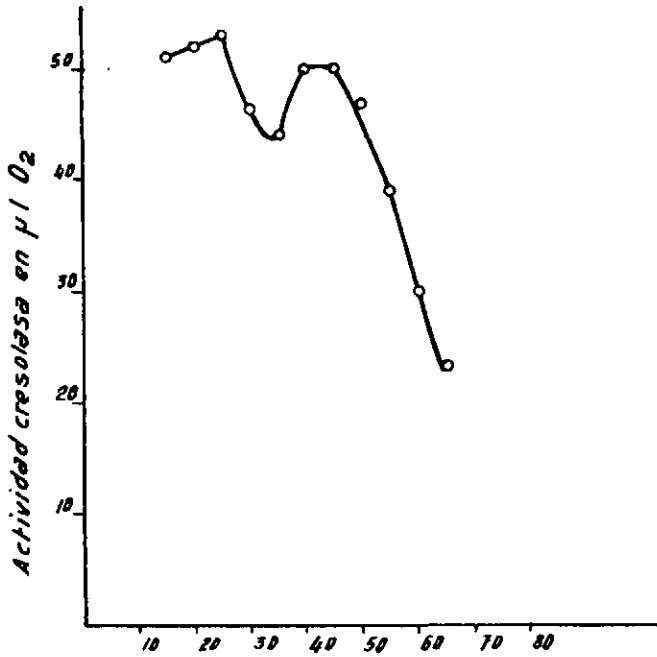
parte, la inactivación de la acción cresolasa, que en otros ensayos hemos comprobado es muy sensible a la temperatura; por otra parte, en este rango va aumentando con la temperatura la actividad catecolasa por la cual el resultado final es una mínima variación de la actividad medida.

TABLA N.º 17

## EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA MEDIDA DE ACTIVIDAD CRESOLASA

Temperatura de medida	Actividad cresolasa	
	$\mu\text{l O}_2$	%
15°	51	96 %
20°	52	98 %
25°	53	100 %
30°	46	87 %
35°	44	83 %
40°	50	95 %
45°	50	95 %
50°	47	89 %
55°	39	73 %
60°	30	57 %
65°	23	43 %

Grafica no. 7



Temperatura de medida en grados centigrados.

Efecto de temperatura sobre la  
medida de actividad cresolasa.



UNIVERSIDAD DE MURCIA  
FACULTAD DE VETERINARIA  
BIBLIOTECA

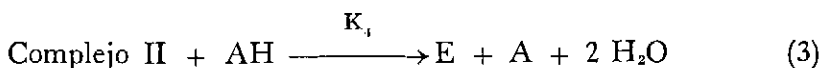
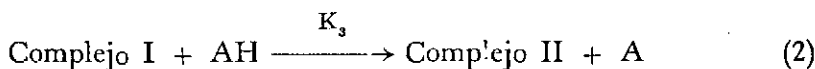
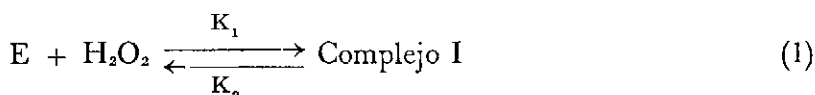


En el siguiente tramo descendente, la inactivación de cresolasa supone más que el aumento en la actividad catecolasa. A partir de los 30° C, la energía suministrada es suficiente para que el cobre que tomaba parte de cresolasa, pueda actuar en la actividad catecolasa, por lo cual, en total, observamos un aumento en esta actividad, hasta el instante en que la inactivación, por calentamiento, predomina sobre el efecto favorable. Así, sería lógica la gráfica estudiada, que es la suma de varias actuaciones complejas.

#### D. MEDIDA DE ACTIVIDAD PEROXIDASA

En esencia, salvo unas modificaciones que lo hacen más sencillo y cómodo, hemos utilizado el método fotocolorimétrico del guayacol (24) que mide la oxidación de este fenol. Con este procedimiento, medimos a 470 m $\mu$  la densidad óptica que nos señalará la concentración de tetraguayacol formado en la oxidación enzimática del guayacol en presencia de peróxido de hidrógeno. Como criterio, en vez de comprobar el tiempo preciso para un cambio de 0,05 unidades de densidad óptica, hemos escogido el del cambio en un minuto de la densidad óptica de la disolución, comenzando a contar el tiempo en el instante que empieza la reacción.

El papel del peróxido de hidrógeno es el de aceptor de los electrones procedentes del sustrato reducido. Si llamamos al dador de electrones en la forma reducida AH (guayacol en este caso) y al enzima E, de acuerdo con Chance (24), podemos escribir aquí que



$e$  = Concentración de enzima.

$a_0$  = Concentración inicial de dador.

$x_0$  = Concentración inicial de sustrato.

De las ecuaciones (1) y (3) se establece que:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{e}{\frac{1}{k_4 \cdot a_0} + \frac{1}{k_1 \cdot x_0}}$$



Si en el ensayo las condiciones las escogemos de tal modo que  $k_4 \cdot a_0 \gg k_1 \cdot x_0$ , entonces  $\frac{dx}{dt} = K_1 \cdot x_0 \cdot e$ . Si en la medida ocurre que  $K_1 \cdot x_0 \gg k_4 \cdot a_0$ , el resultado es que  $\frac{dx}{dt} = k_4 \cdot a_0 \cdot e$ . El procedimiento experimental es el mismo para ambas modificaciones y sólo varía la concentración utilizada de peróxido de hidrógeno.

Hemos realizado la puesta a punto del método con extractos enzimáticos procedentes de alcachofa y comprobamos posteriormente la validez del procedimiento para trabajos con albaricoque y melocotón.

En definitiva, el proceso tipo de medida de peroxidasa que hemos seguido es el siguiente:

Se ponen en un tubo de colorímetro Probus-Arrosu 5 ml de tampón fosfato monosódico-fosfato disódico 0,1 M, pH 7; 2 ml de disolución de guayacol (20 mM) y 1 ml de disolución enzimática. Se equaliza previamente el aparato y en el tiempo 0 se añade 40  $\mu$ l de disolución de peróxido de hidrógeno (10 mM) y se miden las transmisiones ópticas a 460 m $\mu$  cada 15 segundos. La actividad peroxidasa es la diferencia entre las densidades ópticas (multiplicada por 10) en el intervalo de 1 minuto, siempre que en él, el incremento de la densidad óptica frente al tiempo sea lineal.

De nuestras numerosas experiencias, comprobamos que para que exista tal linealidad es preciso que las diferencias ( $\times 10$ ) de las densidades ópticas durante el minuto de actuación del enzima estén entre los valores de 0,2 y 0,9, unidades.

Como confirmación y para demostrar al mismo tiempo que en estas condiciones la medida de actividad peroxidasa es proporcional a la cantidad de enzima presente, vamos a exponer unos datos escogidos entre los muchos ensayos que efectuamos. En todos los casos completamos el volumen del enzima hasta 1 ml con agua bidestilada.

TABLA N.º 18

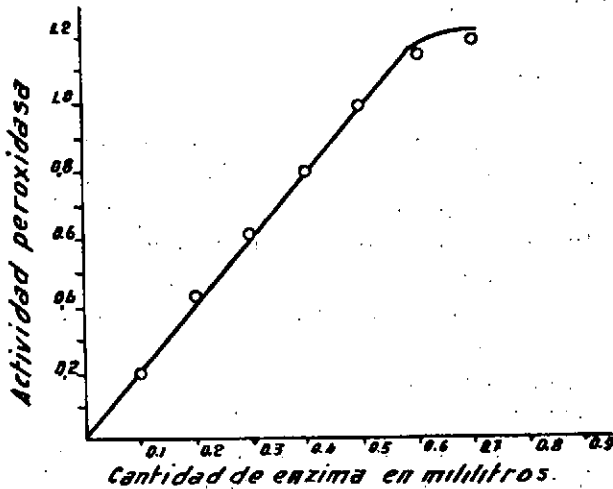
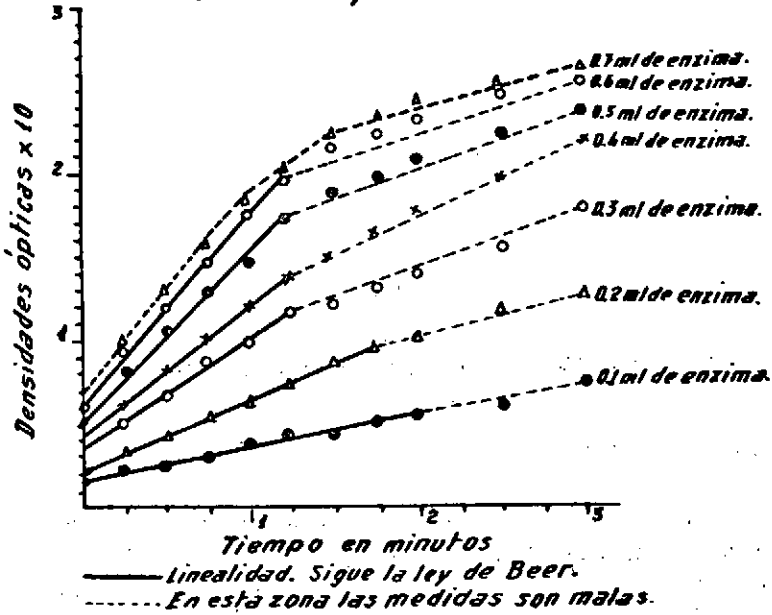
## MEDIDA COLORIMETRICA DE PEROXIDASA

*Cantidad de enzima y densidades ópticas (· 10)*

	0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml	0,4 ml	0,5 ml	0,6 ml	0,7 ml
tiempo de medida							
0"	0,16	0,22	0,36	0,41	0,51	0,60	0,65
15"	0,21	0,34	0,51	0,62	0,81	0,92	0,97
30"	0,25	0,41	0,68	0,81	1,05	1,19	1,28
45"	0,31	0,54	0,86	1,01	1,28	1,47	1,55
60"	0,36	0,64	0,97	1,19	1,49	1,74	1,81
75"	0,41	0,76	1,14	1,39	1,76	1,94	2,00
90"	0,46	0,84	1,19	1,49	1,86	2,13	2,19
105"	0,51	0,92	1,31	1,64	1,93	2,22	2,33
120"	0,54	1,00	1,42	1,78	2,08	2,33	2,44
150"	0,60	1,14	1,68	1,94	2,22	2,44	2,51
180"	0,71	1,25	1,79	2,18	2,33	2,56	2,60
D:10	0,20	0,42	0,61	0,78	0,98	1,14	1,16
Actv/ml	2,00	2,10	2,03	1,95	1,96	1,90	1,66

Por tanto, de los datos expuestos en la tabla 18 y gráficas 8 y 9, tenemos la seguridad de que en nuestras condiciones medimos una actividad proporcional a la cantidad de enzima.

Gráficas nos. 8 y 9.



Medidas colorimétricas de peroxidasa.  
Validez del método.

## IV

## EXTRACCION DEL SISTEMA ENZIMATICO

## A.—MEDIDA DE PROTEINAS

En los estudios de extracción y purificación interesa conocer no solamente la actividad absoluta, sino la específica, que nosotros mediremos como actividad (en  $\mu$  l de  $O_2$ ) por unidad de peso de proteínas.

El procedimiento que seguimos para determinar proteínas es el colorimétrico de Folin-Cicalteau (25).

## B.—MATERIAL DE PARTIDA

Nuestra intención es hacer un estudio de las propiedades de los enzimas catecolasa, cresolasa y peroxidasa en materiales con temporadas cortas de producción, sobre todo en el caso de albaricoque, por lo cual nuestro propósito inicial fue la obtención de polvos acetónicos que conservaran la actividad durante un gran período de tiempo ( $\sim$  1 año) mantenidos en las condiciones adecuadas: temperatura baja ( $-20^\circ C$ ) y ausencia de aire. Efectivamente ocurrió así, lo que ha hecho posible en cualquier instante tener una fuente de enzima adecuada.

También podría surgir el problema de un cambio de propiedades por el hecho de someter los materiales estudiados a tal operación. Comprobamos que, aparte de lo ya tratado sobre el período de inducción en cresolasa de albaricoque, las demás propiedades no sufren cambios sensibles, lo cual nos permite una seguridad total para usar los polvos acetónicos. Como resultado de nuestros ensayos escogimos el procedimiento siguiente para albaricoque y melocotón:

Se parten los frutos en trozos pequeños y se someten a congelación.



Una parte de tejido se tritura en un Turmix adecuado con acetona, evitando la presencia de piezas de cobre en el aparato (aparición de actividades anormalmente altas), a gran velocidad (16.000 r.p.m.), durante 4 minutos al cabo de los cuales se filtra rápidamente por Buchner y el residuo se somete sucesivamente a la misma operación durante 3 veces más, para lo cual se utilizan volúmenes de acetona iguales al de la primera operación. El polvo blanco resultante se extiende sobre papel de filtro, se deja secar a la temperatura ambiente y se guarda a presión reducida y  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se hace necesario el uso de 4 operaciones de extracción, con tiempos relativamente prolongados, pues en caso contrario quedan suficientes residuos de sustratos naturales en el polvo acetónico, lo cual motiva pardeamientos posteriores durante el proceso de secado.

Este procedimiento no va bien para alcachofa porque:

- 1.º) El tejido es más difícil de triturar,
- 2.º) En alcachofa las cantidades de enzima y sustrato son mucho mayores que en albaricoque y melocotón.

Por ello, en este caso, previamente a las extracciones con acetona, sometimos los trozos de tejido congelados y mezclados con nieve carbónica a una trituración en seco, mediante un triturador de sólidos, con lo que el material ya está suficientemente desmenuzado para extraerlo con acetona.

Cuando hemos trabajado con homogenados crudos, los preparamos por trituración en un mortero en presencia de arena y con el tampón apropiado en cada caso, sometiendo el producto a la adecuada centrifugación posterior.

### C.—CONDICIONES DE EXTRACCIÓN

Aunque las actividades catecolasa, cresolasa y peroxidasa se consideran solubles en agua, hemos estudiado el efecto de varios tampones extractores. Como base de trabajo hemos tomado la actividad catecolasa, a la que dedicaremos más atención por los problemas científicos y técnicos que plantea. Además, hemos comprobado que cresolasa se comporta de un modo análogo.

En cuanto a la naturaleza del tampón extractor, hicimos ensayos previos en los que mantuvimos el resto de factores y variamos el tipo de extractor: agua bidestilada, ácido cítrico-fosfato disódico, fosfato monosódico-fosfato disódico, ácido acético-acetato sódico, ácido-clorhídrico-veronal.

A partir de los datos obtenidos, hemos escogido como más adecuados el fosfato-fosfato y el fosfato-cítrico, dentro de los rangos de pH de cada

uno de ellos. Presentan la ventaja de que extraen más actividad y estabilizan mejor el enzima. Las extracciones son del mismo tipo para esos dos tampones en la zona común de pH.

Hemos estudiado también el tiempo de contacto entre extractor y polvo acetónico, realización o no de la operación en un aparato Waring-Blendor, presencia de lisozima (enzima destructora de las paredes celulares), relación sólido-líquido, etc. y así llegamos a la conclusión de que:

- 1.º La adición de lisozima no proporciona mejores resultados.
- 2.º El proceso más conveniente consiste en tratar una parte de polvo acetónico con 100 partes de tampón fosfato durante 4 minutos en el homogeneizador, al final de cuyo período se somete el líquido a centrifugación durante 10 minutos a 6.000 g. con lo cual se obtiene una disolución clara y apta para ser utilizada.

Todas las operaciones se realizan a 0° C y el enzima se guarda a esta temperatura si se utiliza pronto, o congelado a -20° C si se desea conservar algunos días.

Operando según las indicaciones anteriores y utilizando medidas tipo de actividad catecolasa a pH 7, obtuvimos los resultados resumidos en las tablas núms. 19, 20 y 21, correspondientes a los distintos tampones y fuerzas iónicas utilizadas. Hemos escogido en este ensayo el pH 7 de medida por ser el más usado en la bibliografía al tratar enzimas de este tipo.

En la gráfica 10 se representan estos resultados y en ella observamos que las mejores extracciones son las realizadas con los tampones fosfato-cítrico 0,1 M, pH 5. Para corroborarlo hicimos 4 extracciones, en condiciones análogas con tampones de pH 5, pero con distintas fuerzas iónicas, tal como aparece en la tabla n.º 22 y en la gráfica n.º 10.

De estos datos, se establece claramente que:

- 1.º Con medidas de actividad a pH 7, el tampón fosfato-cítrico 0,1 M, pH 5 es el más útil.
- 2.º A pH altos, la fuerza iónica no afecta la extracción.

Hemos de hacer notar que las propiedades del enzima varían con el pH de extracción, por lo cual si las medidas de actividad las hubiésemos realizado a pH más bajo, por ejemplo 5, los resultados no serían iguales. Por el contrario, en estas condiciones hemos obtenido mejores resultados al subir el pH, pero sobre esta cuestión trataremos más adelante.

TABLA N.º 19

## CONDICIONES DE EXTRACCION DE CATECOLASA

Tampones 0,2 M.—Fosfato-fosfato y fosfato-cítrico

Tampón extractor	pH Extracto	Actividad $\mu$ l O <sub>2</sub> /min	Proteínas mg/ml	Actividad específica $\mu$ l O <sub>2</sub> /min mg proteínas
H <sub>2</sub> O	7,0	5,35	0,092	58
3,0	3,1	1,51	0,066	23
4,0	3,8	5,35	0,078	68
4,5	4,7	8,78	0,088	100
5,0	5,1	9,78	0,092	107
5,5	5,6	9,78	0,095	103
6,0	6,1	7,55	0,106	71
7,00	7,0	6,05	0,116	52
6,0	5,95	7,25	0,098	73
7,0	7,0	5,55	0,106	54
8,0	7,5	6,05	0,122	41

TABLA N.º 20

Tampones 0,1 M.—Fosfato-fosfato y fosfato-cítrico

Tampón extractor	pH Extracto	Actividad $\mu$ l O <sub>2</sub> /min	Proteínas mg/ml	Actividad específica $\mu$ l O <sub>2</sub> /min mg proteínas
pH 4,0	4,15	5,90	0,075	79
pH 5,0	5,0	12,20	0,087	140
pH 6,0	6,05	8,15	0,123	66
pH 7,0	7,0	6,51	0,145	45
pH 7,0	7,1	6,11	0,133	46
pH 8,0	7,5	5,90	0,160	37

TABLA N.º 21

## CONDICIONES DE EXTRACCION DE CATECOLASA

Tampones 0,01 M.—Fosfato - fosfato y fosfato - cítrico

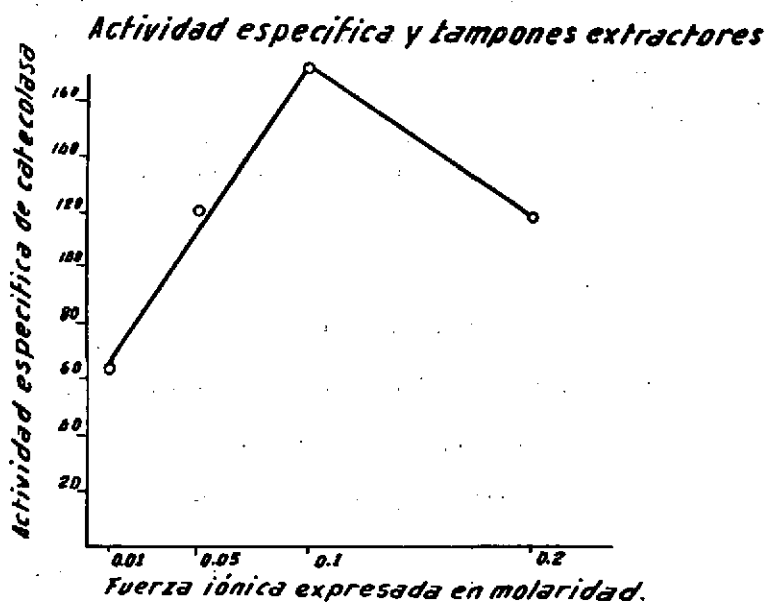
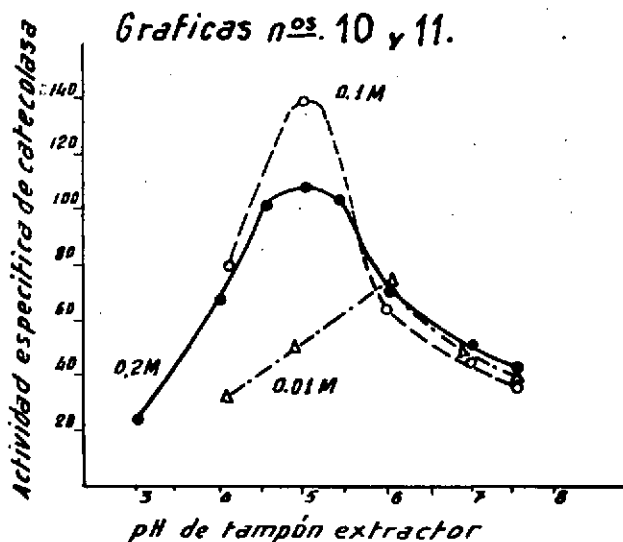
Tampón extractor	pH Extracto	Actividad $\mu$ l O <sub>2</sub> /min	Proteínas mg/ml	Actividad específica $\mu$ l O <sub>2</sub> /min mg proteínas
pH 4,0	4,1	2,80	0,090	31
pH 5,0	4,9	4,55	0,093	49
pH 6,0	5,9	8,65	0,120	72
pH 7,0	6,8	6,10	0,126	48
pH 7,0	7,0	7,12	0,145	49
pH 8,0	7,45	5,80	0,124	41

TABLA N.º 22

Tampones fosfato - cítrico pH 5

Tampón extractor	pH Extracto	Actividad $\mu$ l O <sub>2</sub> /min	Proteínas mg/ml	Actividad específica $\mu$ l O <sub>2</sub> /min mg proteínas
0,2 M	5,15	9,15	0,077	118
0,1 M	5,15	10,9	0,070	156
0,05 M	5,10	8,05	0,067	120
0,01 M	5,05	3,56	0,057	62





**Fuerza iónica conveniente para el extractor de pH 5**



En un punto tratado anteriormente hemos expresado la similitud de cresolasa y catecolasa en cuanto a su extracción. La mayor diferencia que nosotros hemos encontrado es la de que la manipulación con cresolasa es más delicada y la inactivación se puede producir con más facilidad.

En el ensayo que exponemos a continuación operamos con tampones extractores fosfato-cítrico y fosfato-fosfato a distintos pH en las mismas condiciones señaladas antes para catecolasa. La medida de cresolasa la hicimos en el aparato Warburg a 30° C y 120 oscilaciones/minuto con cantidades análogas a las señaladas en el procedimiento relatado anteriormente. A cada preparado enzimático le restamos su blanco correspondiente sin p-cresol, con los resultados plasmados en la tabla n.º 23 y en la gráfica n.º 12.

De lo anterior se deduce que:

1.º) Igual que en catecolasa, el pH óptimo de extracción es el 5, con medidas de actividad pH 7.

2.º) La extracción a pH bajos inactiva el enzima muy considerablemente.

En otras medidas realizadas aparte se comprobó la analogía con catecolasa respecto al hecho de que hay mayor extracción a pH altos si la medida se efectúa a pH 5.

Respecto al fruto melocotón es válido todo lo escrito anteriormente para albaricoque, según se desprende de todos los resultados que hemos obtenido al comparar el comportamiento de la fenolasa de los dos frutos.

TABLA N.º 23

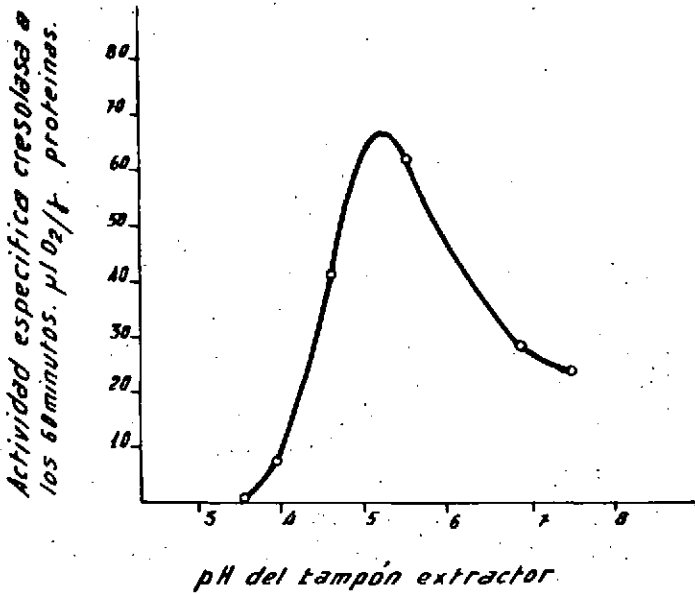
CONDICIONES DE EXTRACCION DE CRESOLASA

Tampón extractor 0,1 M

Actividades en  $\mu$  l O<sub>2</sub> absorbidos

pH Extractor	10'	20'	30'	40'	50'	60'	mg prot./ml
3,5	0	0	0	0	0	0	0,072
3,9	0	0	1	2	4	6	0,078
4,9	1	6	15	24	30	35	0,086
5,5	1	13	26	39	53	61	0,098
6,9	3	10	18	27	37	42	0,145
7,4	2	11	18	27	38	41	0,160

*Grafica nº 12.*



*Condiciones de extracción de la actividad cresolasa.*

En el caso de la alcachofa, ya adelantamos que las propiedades de fenolasa son independientes del pH del extractor, por lo cual los mejores resultados se obtienen extrayendo con tampones de pH altos, por ejemplo el fosfato-fosfato 0,1 M de pH 8.

## PURIFICACION DE FENOLASA

Para estudiar las propiedades del sistema fenolasa o de cualquier otro enzima es de desear obtenerlo de la forma más pura posible, para evitar la interferencia de otras sustancias que puedan desfigurar los resultados del comportamiento del enzima en estudio.

En primer lugar, la purificación de un enzima es un problema generalmente difícil, y por otra parte, estamos tratando con un complejo enzimático de los que han resistido en mayor grado los intentos de su purificación.

Desde los primeros ensayos renunciamos a la purificación de cresolasa, puesto que se trata de un enzima muy sensible a cualquier tipo de manipulación y centramos nuestro interés en la actividad catecolasa, pero desgraciadamente los resultados han sido bastante deficientes y sólo hemos conseguido purificaciones de unas 5 veces respecto al material de partida. Para control nos basamos en la actividad específica que medimos como  $\mu$ l de O<sub>2</sub> absorbidos en un minuto/mg de proteína, con medidas de actividad realizadas siempre a pH 7.

Si partimos de un polvo acetónico de albaricoque y extraemos en las condiciones óptimas, podemos pasar desde una actividad específica de 40 hasta 120 en la disolución enzimática final y se extrae el 80 % de la actividad total inicial. Si extraemos primero el polvo acetónico con agua y el residuo lo tratamos con el tampón, podemos elevar la actividad específica hasta 140.

Cuando intentamos precipitar el enzima mediante la adición de sulfato amónico, comprobamos que una concentración del 60 % de saturación de sulfato amónico no produce ningún precipitado a las 24 horas de adicionar la sal y conservar la disolución por debajo de 0° C. Por ello, en nuevas experiencias, utilizamos un 85 % de saturación y en vista de los resultados negativos hemos utilizado hasta 90 % de saturación y tras 24 horas de permanecer a -10° C, centrifugamos y obtuvimos un precipitado y un sobrenadante. Dializamos ambos con agua bidestilada a 0° C durante 18 horas y al medir actividades y proteínas en las dos disoluciones obtenidas resultó que en el sobrenadante dializado existía una mayor actividad específica, que pasó desde 130 al principio hasta 180 en el citado

sobrenadante. En esta disolución permanece hasta un 80 % de la actividad catecolasa existente antes de la adición del sulfato amónico.

En otros ensayos, añadimos diversas concentraciones de acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  a un mismo tipo de preparado enzimático y tras filtrar a vacío con lana de vidrio recoger y secar el precipitado, lo eluimos y medimos sus actividades específicas con los resultados expresados en la tabla n.º 24.

Por tanto, utilizando la concentración del 64 % en volumen de acetona para precipitar el enzima se consiguen purificaciones de hasta el 200 %.

Otro de los puntos que tratamos fue el de la adsorción y posterior desadsorción del enzima sobre un soporte adecuado. Con este fin utilizamos como adsorbentes papel de filtro, polvo de celulosa, dietilaminoetilcelulosa, aminoetilcelulosa, ecteolacelulosa, fosfato de celulosa, carboximetilcelulosa, citrato de celulosa y gel de fosfato cálcico.

Resultaron muy buenas adsorciones (100% de la actividad inicial) con papel de filtro (Whatman n.º 1) y dietilaminoetilcelulosa. En menor grado, también encontramos adecuado el gel de fosfato cálcico formado en la propia disolución enzimática por la adición de aniones fosfato y de cationes cálcicos. En todas las demás sustancias las adsorciones fueron pequeñas.

En el papel filtro dejado en contacto varias horas en forma de papilla con la disolución enzimática comprobamos que:

1.º) La cantidad de papel limita la adsorción. Con un gramo de papel, para lograr la adsorción más idónea la actividad total del enzima inicial no debe superar los  $350\mu\text{l}$  de oxígeno en las condiciones de medida, como se indica en la tabla n.º 25.

2.º) A pH altos, mayores que 7, son mejores las adsorciones que en inferiores a pH 5.

3.º) La actividad catecolasa del líquido enzimático tras la adsorción en buenas condiciones, oscila en su cuantía, pero si fijamos un valor, por ejemplo el 30 % de la actividad inicial, lo normal al comprobar la actividad catecolasa de la suspensión de una adsorción sobre el papel, es encontrar valores superiores al 100 %, de tal modo que sumadas las actividades catecolasa adsorbida y no adsorbida, pueden llegar hasta 150-170 % de la inicial. Este hecho lo interpretamos suponiendo que en la disolución enzimática original existe una sustancia que reprime la acción catecolasa y en la adsorción se separa del enzima. Otro fenómeno de este tipo lo estudiaremos cuando se vean los efectos de la 8-oxiquinoleína sobre el enzima.

TABLA N.º 24

## PRECIPITACION DE CATECOLASA EN ACETONA-AGUA

% acetona	Actividad $\mu$ l O <sub>2</sub> /min.	Proteínas mg/ml	Actividad específica
0	13	0,206	45
20	0,9	0,024	37
28	2,2	0,040	55
38	4,2	0,060	70
47	7,3	0,100	75
64	10,2	0,128	80
80	8,5	0,154	55
88	9,1	0,136	66

TABLA N.º 25

## ADSORCION DE CATECOLASA

Actividad total del enzima	Papel usado en la adsorción	% de la actividad no adsorbida respecto a inicial
300	0,4 g	53 %
210	0,4 g	47 %
170	0,4 g	30 %
140	0,4 g	16 %

También conseguimos buenos resultados con columnas de adsorción rellenas de papilla de papel, pero, desgraciadamente, ni con el procedimiento anterior ni con éste logramos nunca deadsorber el enzima utilizando ensayos típicos tales como series de tampones en los que variáramos la fuerza iónica y el pH o ambas cosas. Tampoco hubo éxito con disoluciones de sulfato amónico. En vista de tales circunstancias ensayamos un procedimiento drástico con cloruro sódico a pH alto, pero los resultados no fueron satisfactorios, pues aunque la desorción es mayor no es fácil evitar la desnaturalización del enzima provocada por el cloruro sódico.

Respecto a la dietilaminoetilcelulosa, las adsorciones eran fáciles de lograr con rendimientos del 85 %, bien dejando en contacto con la disolución enzimática en polvo del derivado celulósico o bien pasando el enzima por una columna del adsorbente. De todos los ensayos que efectuamos se deduce:

1.º) La capacidad de adsorción del DEAEC es mucho mayor que la del papel a igualdad de peso. Ello es lógico pensando que la adsorción es un fenómeno de superficie.

2.º) A pH altos la adsorción sobre DEAEC es notablemente superior que a pH bajos.

El problema, como en el caso del papel, consistía en la elución del enzima adsorbido. Obtuvimos resultados muy pobres con disoluciones de sulfato amónico como eluyentes. Con diversos rangos de tampones no tuvimos tampoco éxito, ni siquiera adicionándoles cloruro sódico.

Con gel de fosfato cálcico conseguimos adsorber un 70-80 % de la actividad catecolasa inicial con relativa facilidad, pero en ninguna de las numerosas condiciones que probamos fueron buenos los intentos de elución.



## V

## PROPIEDADES GENERALES DEL SISTEMA ENZIMATICO

## A.—ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS FRENTE A pH

Al estudiar el comportamiento del enzima catecolasa procedente de homogenados crudos de albaricoque, frente al pH de medida en las condiciones tipo, excepto en lo referente al tampón de medida, observamos resultados diferentes dependientes del pH de extracción.

Estos comportamientos distintos están ya bastante diferenciados para extracciones realizadas a pH 5 y 7, por lo que usamos estos dos tampones para exponer el fenómeno que se expresa en los datos de la tabla n.º 26 y en la gráfica n.º 13.

Queremos señalar que en la bibliografía no hemos encontrado precedentes de esta anomalía, que consideramos de bastante interés, por lo cual antes de seguir adelante intentamos aclarar si era específica solamente de albaricoque.

Repetimos los ensayos con un homogenado crudo de melocotón y observamos un comportamiento análogo (Tabla n.º 27 y gráfica n.º 14), mientras en alcachofa no se produce el fenómeno (Tabla n.º 28 y gráfica n.º 15).

Puesto que los estudios los realizamos con polvos acetónicos, ensayamos en éstos y comprobamos que se comportan exactamente igual que sus correspondientes homogenados. Debido a esa coincidencia ahorramos el repetir tablas y gráficas de resultados.

En vista de tales circunstancias hemos operado para el tratamiento de esta cuestión con disoluciones enzimáticas procedentes de polvos acetónicos de albaricoque.



TABLA N.º 26

VARIACION DE LAS PROPIEDADES DE CATECOLASA \*  
CON LA EXTRACCION

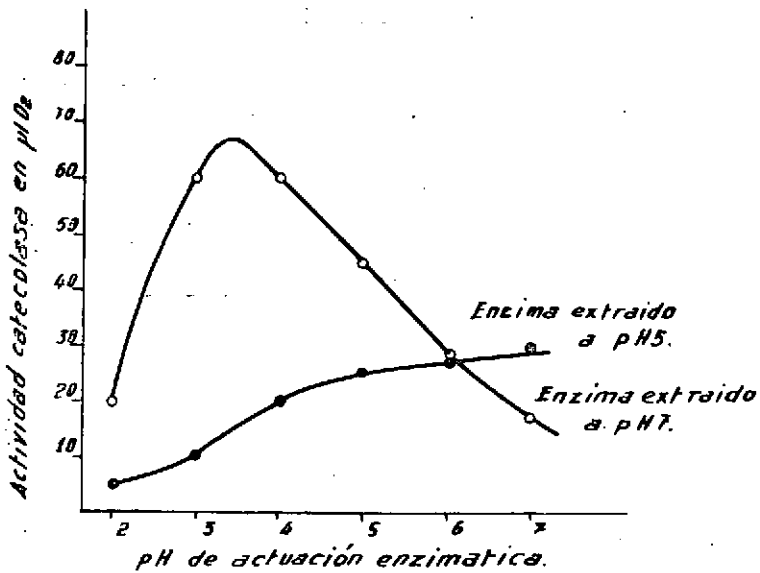
Actividad en  $\mu$  l de O<sub>2</sub>

pH de medida	enzima extraído a pH 5		enzima extraído a pH 7	
	Actividad	%	Actividad	%
7	30	100	17	28
6	27	90	28	47
5	25	83	45	75
4	20	66	60	100
3	10	33	60	100
2	5	11	20	33

\* Procedente de albaricoque.



Grafica nº 13.



*Variación de las propiedades de catecolasa de albaricogue con el pH del tampón extractor.*

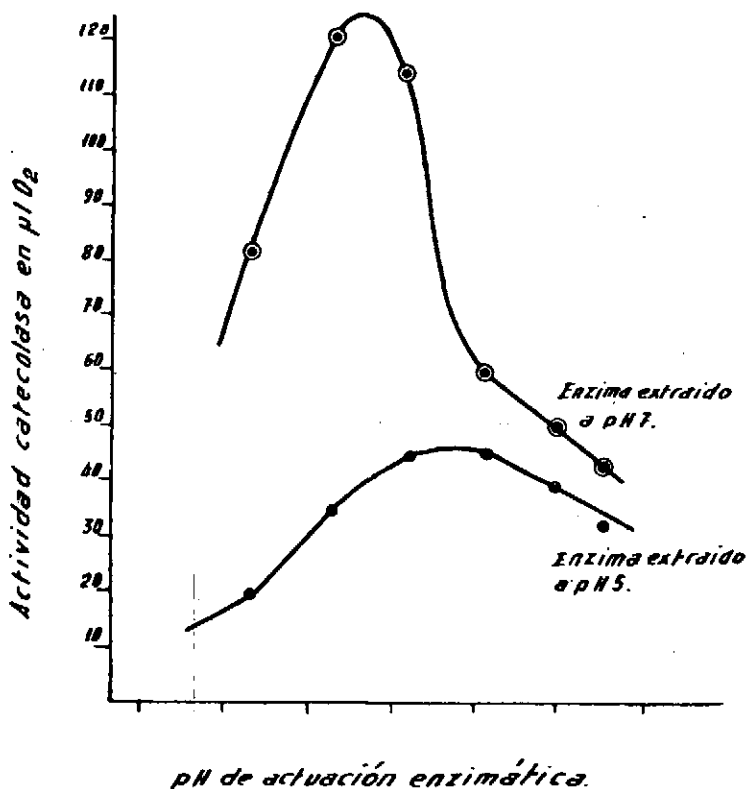
TABLA N.º 27

VARIACION DE LAS PROPIEDADES DE CATECOLASA \*  
CON LA EXTRACCIONActividad en  $\mu$  1 de O<sub>2</sub>

pH de medida	Enzima extraído a pH 5		Enzima extraído a pH 7	
	Actividad	%	Actividad	%
3,3	20	45	81	68
4,3	35	78	120	100
5,2	45	100	114	95
6,1	44	97	60	50
7,0	38	84	50	43
7,5	32	70	43	37

\* Procede de melocotón.

Grafica nº. 14



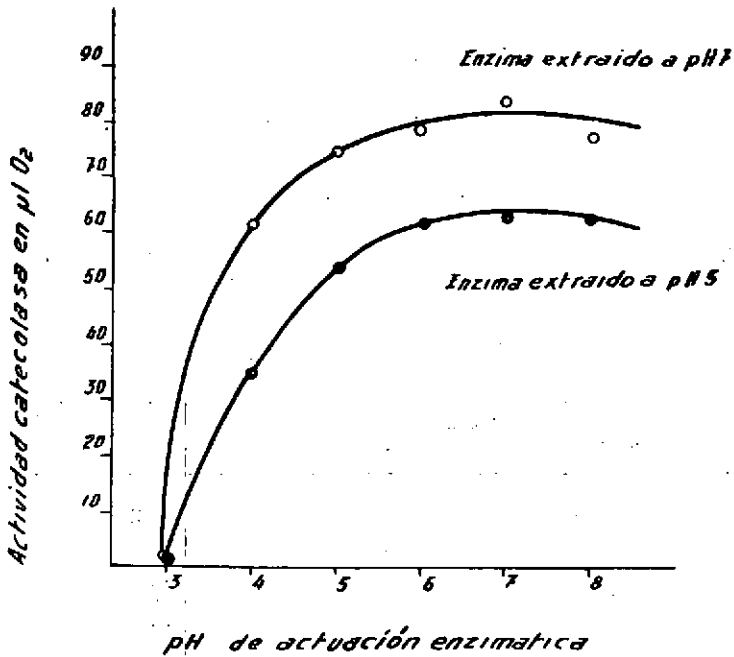
Variación de las propiedades de catecolasa de melocoton con el pH del tampón extractor.

## TABLA N.º 28

## ALCACHOFA

VARIACIONES DE LAS PROPIEDADES DE CATECOLASA  
CON LA EXTRACCIONActividad en  $\mu$  l de O<sub>2</sub>

pH de medida	Enzima extraído a pH 5		Enzima extraído a pH 7	
	Actividad	%	Actividad	%
3	1,5	2	1,5	2
4	35	55	61	72
5	54	86	75	89
6	62	99	79	94
7	63	100	84	100
8	62	99	77	92

*Grafica nº. 15.*

*Propiedades de catecolasa de  
alcachofa y pH del tampón  
extractor*

Entre las causas posibles de dos gráficas tan dispares, podríamos considerar las siguientes:

1.º) Actuaciones no enzimáticas en algunas de las condiciones de medida.

2.º) Existencia de dos enzimas de propiedades diferentes.

3.º) Formación de complejos entre el enzima y los fenoles naturales del fruto, con modificación de las propiedades del enzima.

4.º) Asociación del enzima a ciertas partículas, con lo cual tendríamos unas características distintas de las del enzima libre.

5.º) Variación de la estructura de la molécula del enzima ocasionada por el pH de extracción.

Hemos efectuado diversos ensayos encaminados a aclarar las posibilidades anteriores y a continuación iremos comentando algunos de ellos.

Aunque existen algunas desviaciones en el pH óptimo de actuación condicionadas al pH de extracción, las diferencias más notables en las propiedades están agudizadas en las distintas formas de las curvas construidas para cada tampón extractor, con las que expresamos actividad catecolasa frente al pH del medio de reacción. La evolución con el tiempo de las propiedades de las diversas disoluciones enzimáticas será tenida en cuenta como otro factor diferencial.

En las extracciones con tampón fosfato-cítrico 0,1 M, pH 5 ó 0,01 M, aun cuando el pH de máxima actividad está situado en el pH 5 de acondicionamiento, la zona de la derecha de la curva no tiene la pendiente que le correspondería a una forma de curva de campana; al contrario, ofrece un aplanamiento general, que con el tiempo (a veces ya desde el principio ocurre así) puede llegar a producir un segundo máximo en la región de pH 7.

En las extracciones efectuadas a pH 7, con tampones fosfato-cítrico o fosfato-fosfato, 0,1 ó 0,01 M, el pH de máxima actividad se encuentra algo más bajo que en las extracciones a pH 5. Además, la zona de la derecha de la curva posee una pendiente muy pronunciada. Por otra parte a igualdad de concentraciones y procedimientos de extracción, el valor absoluto de la actividad máxima es mucho mayor en las disoluciones enzimáticas obtenidas a pH 7 que en las conseguidas a pH 5. Para comprobar estos puntos basta observar la gráfica n.º 13 que ya expusimos anteriormente.

En varias ocasiones en que extrajimos la actividad enzimática con agua bidestilada, las disoluciones presentaron un comportamiento variable, de tal modo que al medir la actividad catecolasa de una misma preparación frente a pH distintos de acondicionamiento de medidas, en dos días diferentes, inmediatamente tras la extracción obtuvimos un resulta-

do y al repetir la misma operación al día siguiente el comportamiento había variado. Esto es un indicio de dos formas de un mismo enzima, que por las condiciones del medio y otras circunstancias pueden convertirse una en la otra.

También hemos comprobado que al realizar extracciones a distintos pH, para cada disolución y su residuo no extraído, eran muy similares los resultados obtenidos al efectuar las medidas de actividad frente al pH de actuación. Con esto queremos señalar que son del mismo tipo la disoluciones extraídas a pH 5 y la suspensión, también a pH 5, del resto no extraído. Igual ocurre con la disolución extraída a pH 7 y su parte no extraída. Ofrecen algunas variaciones y son diferentes entre sí las disoluciones de pH 5 y las de pH 7. Ello parece indicar, por una parte, que la hipótesis de dos enzimas distintos no tienen un fundamento claro en que apoyarse sobre todo si se hace un estudio cuantitativo de las partes extraídas y no extraídas del enzima en los dos pH considerados.

Comprobamos con resultados positivos en todas las ocasiones oportunas que las actuaciones de cada uno de los casos presentados, eran de naturaleza enzimática. Para ello, estudiamos blancos con el enzima inactivado por calor y activos sin sustratos o sin ácido ascórbico, o con ambos, pero en presencia de un inhibidor (dietilditiocarbamato sódico  $10^{-3}$  M) de la acción catecolasa.

Para conseguir disoluciones enzimáticas lo más libres posibles de cualquier partícula asociada, realizamos una extracción a pH 5 y otra a pH 7 con la utilización de Potter y arena de mar lavada y pulverizada previamente, para obtener un máximo rompimiento celular. Las trituraciones se efectuaron a  $0^{\circ}$  C, durante 60 minutos; después las suspensiones se centrifugaron a 11.000 g. durante 25 minutos, obteniendo unas disoluciones enzimáticas completamente claras y unos residuos totalmente homogéneos. Las medidas de actividad realizadas a varios pH se expresan en la tabla n.º 29.

Siempre habíamos comprobado, ya a simple vista, una mayor viscosidad en las disoluciones enzimáticas a pH 7 que en las condiciones de pH 5. Para demostrar que la presencia de las pectinas no influye en las medidas de actividad, adicionamos pectinasa a las dos preparaciones enzimáticas referidas en el párrafo anterior y tras 18 horas de actuación volvimos a medir las actividades frente al pH, con los resultados expuestos en la tabla n.º 30.



TABLA N.º 29

MEDIDAS DE ACTIVIDAD CATECOLASA EN  $\mu$  l O<sub>2</sub>/MINUTO

Tampones de medida

	pH 3		pH 4		pH 5		pH 6		pH 7	
	Activ.	%	Activ.	%	Activ.	%	Activ.	%	Activ.	%
Extracto a pH 5	4,6	49	9,2	98	6,7	71	9,4	100	7,6	81
Extracto a pH 7	15,8	57	27,5	100	25,5	93	18,6	68	11	40

TABLA N.º 30

MEDIDAS DE ACTIVIDAD CATECOLASA EN  $\mu$  l O<sub>2</sub>/MINUTO

Tampones de medida

	Activ.	%	Activ.	%	Activ.	%	Activ.	%	Activ.	%
Extracto a pH 5	2,5	25	5,3	53	7,3	73	9,9	100	9,9	100
Extracto a pH 7	11,6	47	24,6	100	21,6	88	20,4	83	16,8	69

De los datos de las dos tablas anteriores pueden deducirse varias consecuencias:

1.º) Recién efectuadas las extracciones, sus actuaicones son análogas a las de los tipos considerados con anterioridad. Por esta razón es improbable la presencia de partículas cuya asociación con el enzima a uno u otro pH, modifiquen sus propiedades.

2.º) No es de extrañar la existencia de dos máximos en el extracto reciente de pH 5, pues ya señalamos previamente la tendencia de un segundo máximo en la zona derecha de la curva. En las disoluciones obtenidas a pH 5 su presencia puede ser inmediata o requerir un cierto tiempo.

3.º) La adición de pectinasa no altera las propiedades generales de las disoluciones. Ello corrobora la primera deducción. Las pequeñas diferencias existentes entre el segundo grupo de medidas, tras 18 horas de efectuar las primeras, se deben achacar, como se comprobará después, a la tendencia del enzima a desplazar su máximo hacia los pH altos con el transcurso del tiempo.

Nos referimos ahora a otro grupo de ensayos destinados a aclarar las características del fenómeno que venimos tratando. Con tal fin, en una etapa previa, preparamos un extracto fenólico natural procedente de botes de conserva de albaricoque en agua, de la misma temporada. Para ello, trituramos una parte del fruto, durante cinco minutos, con tres partes de alcohol del 80 %, centrifugamos la suspensión (10 minutos a 6.000 r.p.m.) y el sobrenadante fue concentrado por destilación a presión reducida hasta un volumen mínimo.

Estudiamos a distintos pH las siguientes disoluciones enzimáticas:

A.—Extraída normalmente a pH 5.—Para medir su actividad se eluye hasta un volumen doble con tampón fosfato-cítrico pH 5.

B.—Parte de la disolución extraída normalmente a pH 5, se pasa a pH 7 con una disolución de fosfato disódico, de tal modo que la relación entre el volumen inicial y el final sea 1 : 2.

C.—Extraída normalmente a pH 7.—Se eluye después con tampón pH 7 en proporción 1 : 1.

D.—Parte de la disolución extraída normalmente a pH 7, se pasó a pH 5 con disolución de ácido cítrico, de tal modo que la relación de volumen inicial a final es 1 : 2.

E.—Extraída normalmente a pH 7, con la adición de 1 ‰ de ácido ascórbico para reducir las posibles trazas de fenoles naturales oxidados que pueden existir en la disolución obtenida del polvo acetónico.

F.—Extraída normalmente a pH 5, se le adicionó la cantidad correspondiente de extracto de fenoles de albaricoque, para reproducir las condiciones de extracción directa del tejido. Elución posterior con tampón pH 5 en relación 1 : 1.

G.—Extraída normalmente a pH 7, se le adicionó la cantidad correspondiente de extracto fenólico. Elución posterior con tampón pH 7 en relación 1 : 1.

De todas las preparaciones enzimáticas anteriores hicimos medidas de actividad catecolasa, a las 0 horas y a las 72 horas de su conservación a 0° C. Los resultados son los de la tabla n.º 31. En la gráfica n.º 16 están expresados en esta forma los resultados. En cada representación hemos expuesto las actividades de una de las disoluciones enzimáticas, medidas a distintos pH, con los valores obtenidos 1 hora y 72 horas tras su preparación.

Tras observar la tabla y las gráficas anteriores es posible deducir que:

1.º Tanto las extracciones efectuadas a pH 5, como las realizadas a pH 7, tienden con el tiempo a presentar su máximo de actividad en la región de pH 7.

En otros ensayos, con una disolución enzimática extraída a pH 7, comprobamos que después de 15 días de permanecer a 0° C conservaba actividad enzimática y al medirla frente a los distintos tampones de acondicionamiento, obtuvimos un solo máximo definido de pH 7; 15 días antes su comportamiento era el normal de los extractos de pH 7.

La tendencia indicada la observamos ya a las 72 horas en las gráficas A y C de las gráficas 16.

2.º) El ensayo E lo efectuamos con la finalidad de que el ácido ascórbico redujese durante la extracción cualquier fenol natural presente en el polvo acetónico. Comparando con C, se comprobaría en tal caso si el enzima se asocia a tales fenoles oxidados y si ésta es la causa de variación de propiedades. Con intención semejante proyectamos F y G. Con los datos suministrados por E, F y G, comparados con los ya conocidos, podemos asegurar con suficiente certeza que la variación de propiedades antes citada no tiene como causa una asociación de tal índole.

3.º) La presencia de los fenoles naturales del fruto no altera sustancialmente el comportamiento de las disoluciones enzimáticas. Ello es tanto más claro si se tiene en cuenta el pH de los preparados enzimáticos correspondientes tras adicionarles la suspensión fenólica.

4.º) La acción del ácido ascórbico protege de la inactivación del enzima con el tiempo.

5.º) Si el enzima extraído a pH 5, lo acondicionamos posteriormente a pH 7, su comportamiento tras la operación no es el del enzima extraído a pH 7, sino que conserva las propiedades del enzima extraído a pH 5.

6.º) Si el enzima extraído a pH 7 se acondiciona posteriormente a pH 5, su actuación no corresponde al tipo representado por tal pH, sino que es intermedia entre los dos modelos considerados.

7.º) El enzima extraído a pH 7 y pasado a continuación a pH 5, se inactiva algo en el cambio, pero sobre todo a lo largo del tiempo. En efecto, su actividad inicial es del orden de la del ensayo A, pero a las 72 horas ha disminuído muchísimo más que la del citado ensayo A.

Por todo ello, y tras tomar en consideración algunos factores que veremos más tarde (similitud en las inhibiciones de las dos clases de extractos e idéntica acción sobre amplias gamas de sustratos), hemos considerado desechadas las tres primeras hipótesis explicativas del fenómeno a que nos estamos refiriendo, clasificamos como poco probable la 4.ª y creemos que lo más adecuado es el 5.º supuesto, o sea la modificación de la estructura de la molécula del enzima, ocasionada por el pH del medio de extracción.

Todo indica hacia un grado de irreversibilidad de tal modificación en uno de los sentidos, o sea que por diversos tratamientos (acción del tiem-

TABLA N.º 31

## CAMBIO DE PROPIEDADES DE CATECOLASA CON LA EXTRACCION

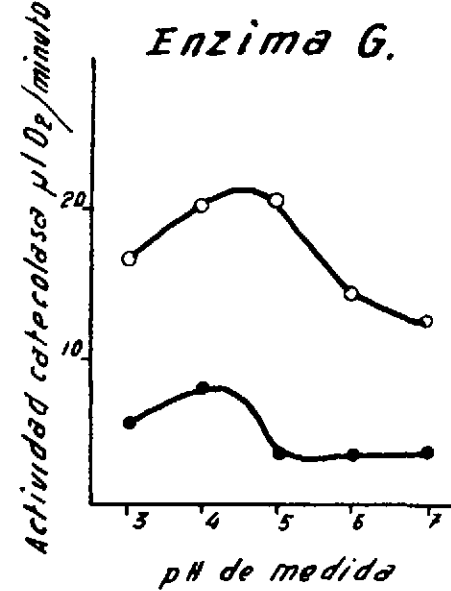
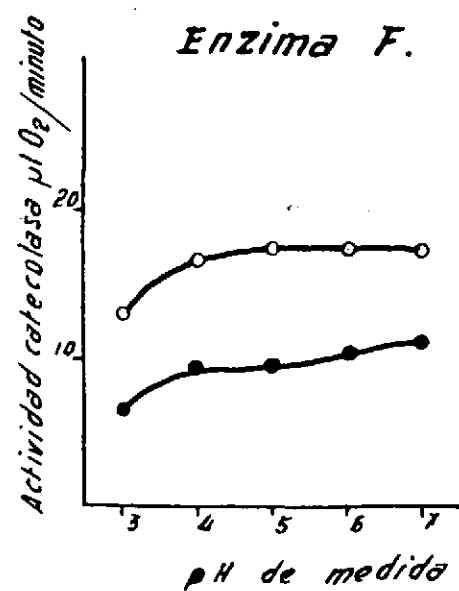
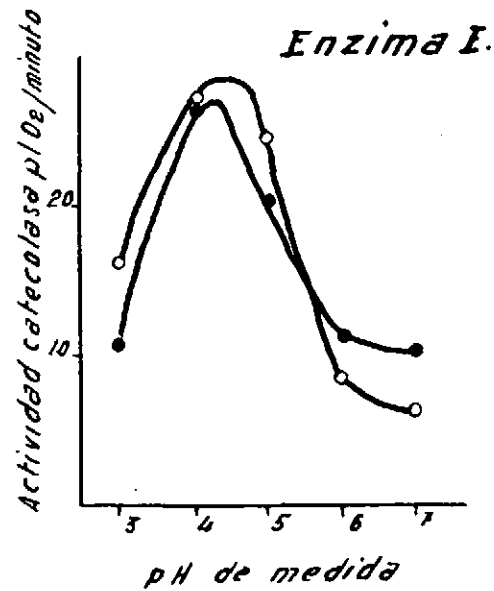
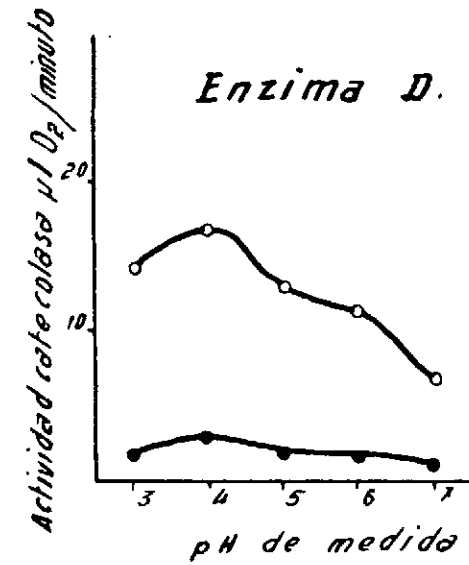
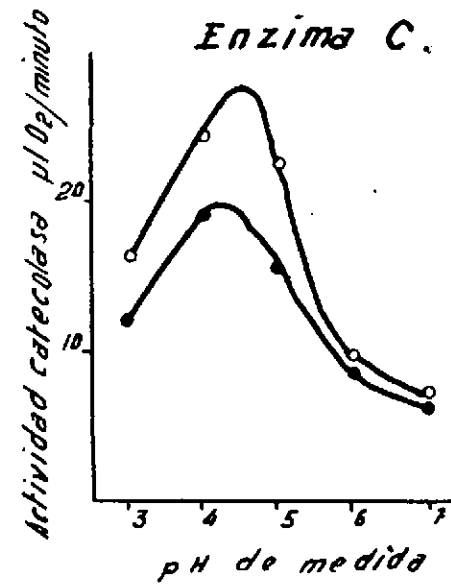
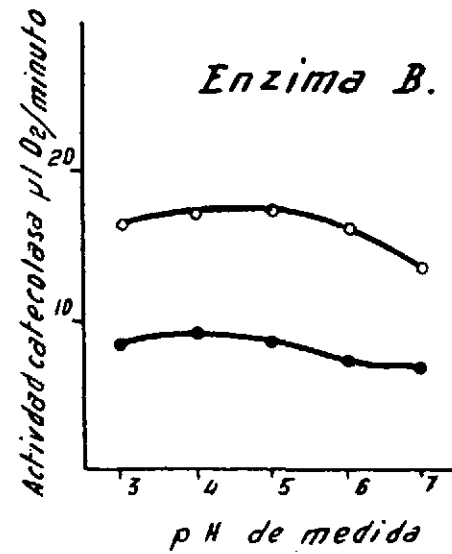
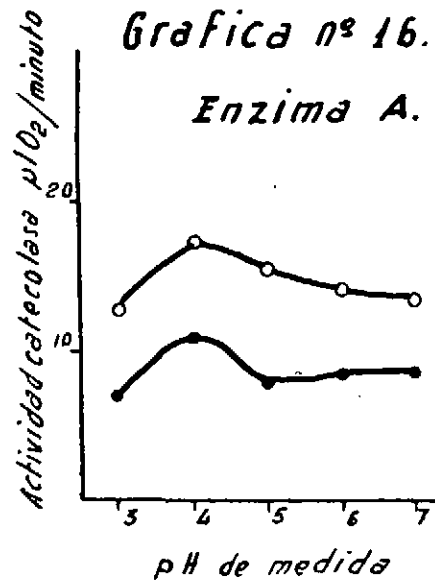
Actividades en  $\mu$  l. O<sub>2</sub>/minuto*Tampones de medida*

Enzima	Medida	pH 3		pH 4		pH 5		pH 6		pH 7	
		Actividad	%	Actividad	%	Actividad	%	Actividad	%	Actividad	%
A	1 hora	12,5	73	17,2	100	15,4	89	14,1	82	13,5	79
	72 horas	7,0	65	10,8	100	8,0	74	8,5	79	8,6	80
B	1 hora	16,3	96	16,9	100	16,7	99	16,0	95	13,3	79
	72 horas	8,3	90	9,2	100	8,4	91	7,1	77	6,9	75
C	1 hora	16,2	66	24,5	100	22,5	92	9,9	40	7,0	29
	72 horas	11,9	63	19,0	100	15,5	82	8,8	46	6,8	36
D	1 hora	14,0	84	16,7	100	12,6	75	11,0	66	6,8	40
	72 horas	1,6	58	2,8	100	1,5	54	1,3	47	0,7	25
E	1 hora	16,3	61	27,0	100	24,7	92	8,6	32	6,3	23
	72 horas	10,4	39	26,7	100	20,3	76	11,5	43	10,2	38
*F	1 hora	12,6	74	16,4	95	17,2	100	17,1	99	17,1	99
	72 horas	6,3	56	9,6	85	9,6	85	10,5	94	11,2	100
**G	1 hora	16,6	82	20,0	99	20,2	100	14,1	70	12,5	62
	72 horas	5,6	73	7,7	100	3,6	47	3,6	47	3,6	47

\* El pH de F era 4,3.

\*\* El pH de G era 5,8.

Los % se refieren a la actividad máxima.



○ medidas de actividad inmediatas.  
● medidas de actividad a las 12 horas.

*Cambios de propiedades de catecolasa con la extracción.*



po; del pH) es posible alterar el tipo representado por la extracción a pH 7, hacia el tipo representado por la extracción a pH 5, pero el proceso inverso no parece ser que tenga lugar.

*Variación de propiedades de cresolasa con la extracción.*—En primer lugar hemos de señalar que hemos comprobado que la actividad cresolasa presenta también una variación de propiedades al cambiar el pH del tampón extractor. Se hicieron unos ensayos para estudiar dicha actividad en las condiciones utilizadas antes con la catecolasa, empleando para ello las siguientes disoluciones enzimáticas.

A.—Extraída normalmente a pH 5.—Antes de medir actividad se eluye en proporción 1:1 con tampón fosfato-cítrico pH 5.

B.—Parte de la disolución extraída normalmente a pH 5 se pasa a pH 7 con una disolución de fosfato disódico, de tal modo que la relación entre el volumen inicial y final sea 1 : 2.

C.—Extraída normalmente a pH 7.—Se eluye con tampón pH 7 en relación 1 : 1.

D.—Parte de la disolución extraída normalmente a pH 7, se pasa a pH 5 con la adición de disolución de ácido cítrico, de tal manera que la relación entre el volumen inicial y el final sea 1 : 2.

Mediante el método tipo de medida comprobamos las actividades cresolasa de cada una de las disoluciones enzimáticas tras su preparación y 72 horas después de conservar a 0° C. De los resultados obtenidos siempre restamos los valores de los blancos, efectuados con agua bidestilada en lugar de cresol. Para los 10 minutos de actuación los valores están expuestos en la tabla n.º 32 y en la gráfica n.º 17.

No hay que olvidar, como comentamos a su debido tiempo, que al medir actividad cresolasa medimos simultáneamente una actividad catecolasa, por lo cual las variaciones que hemos comprobado anteriormente en catecolasa influirán en la medida de cresolasa.

A la vista de todo ello podemos deducir:

1.º) En la medida de actividad cresolasa, procedente de extracciones a distintos pH realizadas en medios tamponados diferentes, se presentan las mismas variaciones que ocurren con la catecolasa.

2.º) De acuerdo con lo conocido previamente, la actividad cresolasa es más sensible a pH bajos y a cambios de pH.

3.º) En la extracción a pH 7 dicha actividad es casi nula en medios tamponados a pH altos.

4.º) Existen condiciones de medida en las que la acción cresolasa es mínima o nula (véase gráficas anteriores), por ejemplo, la actividad medida a pH 7 en el extracto realizado a pH 7 (C) o en las actividades en todo el rango de pH con el enzima extraído a pH 7 y acondicionado a

pH 5 (D). En tales condiciones, sabemos por el estudio de la actividad catecolasa que aun tan sólo con 3 minutos de actuación en lugar de los 10 minutos necesitados en la cresolasa, si existe suficiente sustrato catecolasa, muestra unas actividades varias veces superiores a las obtenidas en estos ensayos de cresolasa. Por tanto, en tales condiciones, no falta la actividad catecolasa sino su sustrato y, por tanto, no ha actuado la actividad cresolasa, que es la que lo debía producir. Creemos que ello es bastante demostrativo de que la actividad cresolasa está afectada, también, por el pH de extracción y que la alteración que experimenta es cualitativamente semejante a la que tiene lugar en caso de actividad catecolasa, cuya actuación es enzimática. Si, como parece lógico, pensamos que las variaciones de comportamiento por el pH de extracción se deben a cambios en la molécula del enzima (en su área activa o en otra región), el razonamiento sería aplicable a las dos actividades, puesto que las dos actividades se afectan del mismo modo, y si consideramos que la acción catecolasa indudablemente es enzimática, la cresolasa también ha de tener una naturaleza enzimática.



TABLA N.º 32

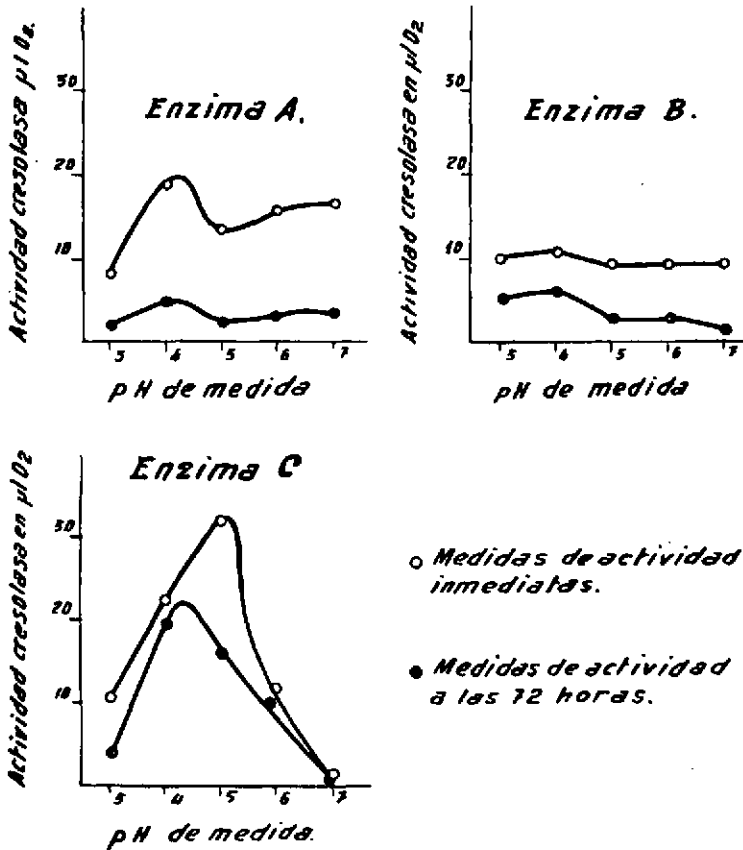
## VARIACION DE PROPIEDADES CON EL pH DE EXTRACCION

Medidas de actividad cresolasa en  $\mu\text{l} \cdot \text{O}_2$ 

Tampón de medida		TIPO DE ENZIMA			
		A	B	C	D
Actividad pH 3	1 hora	8,3	10	10,1	0,6
	72 horas	1,7	5,2	3,7	—
%	1 hora	42	95	32	50
	72 horas	36	85	19	—
Actividad pH 4	1 hora	19,5	10,7	22	1,2
	72 horas	4,8	6,1	19,6	—
%	1 hora	100	100	69	100
	72 horas	100	100	100	—
Actividad pH 5	1 hora	13,5	9,5	32	0,6
	72 horas	2,5	2,7	16,2	—
%	1 hora	69	92	100	50
	72 horas	52	43	83	—
Actividad pH 6	1 hora	16	9,5	11,5	0,8
	72 horas	3,2	2,7	11	—
%	1 hora	82	92	36	67
	72 horas	67	43	56	—
Actividad pH 7	1 hora	17	9,5	0,9	0,8
	72 horas	3,3	0,9	0,9	—
%	1 hora	87	92	3	67
	72 horas	69	15	4,5	—

Los % se refieren a actividades máximas.

Grafica nº 17.



*Variación de propiedades de cresolasa con la extracción.*

## B.—ESTABILIDAD DE FENOLASA FRENTE A pH, TIEMPO Y TEMPERATURA

## a) CATECOLASA DE ALBARICOQUE

1.—*Estabilidad de catecolasa frente a temperatura, pH y tiempo.*—El estudio de la influencia de estos factores sobre la estabilidad del enzima catecolasa presenta algún interés teórico, puesto que nos permite conocer algunas de sus propiedades, pero sobre todo posee un enorme interés práctico. La experiencia en la industria conservera de albaricoque, melocotón y alcachofa nos ha demostrado que muchos de los inconvenientes que se presentan durante la elaboración, sobre todo en el uso del producto por el consumidor, se deben a pardeos originados por una actividad fenolosa que no fue inhibida totalmente.

Para tratar este problema estudiamos extractos, procedentes de polvos acetónicos de albaricoque, extraídos con tampón 0,1 M, pH 5. En la disolución enzimática, separamos cuatro partes alícuotas que acondicionamos del modo siguiente:

- 1.º Hasta pH 3, por la adición de disolución de ácido cítrico.
- 2.º Hasta pH 4, por la adición de disolución de ácido cítrico.
- 3.º pH 5, el propio original.
- 4.º pH 6, por la adición de disolución de fosfato disódico.

De cada una de estas 4 disoluciones enzimáticas tomamos 4 muestras, que conservamos en termostatos diferentes, a temperaturas de 0° C., 20° C, 40° C y 60° C respectivamente, de tal modo que en cada temperatura existía enzimas de los distintos pH de conservación.

A tiempos diferentes de 0 horas, 2 horas, 17 horas, 24 horas, desde el comienzo del período de conservación, efectuamos medidas tipo de la actividad catecolasa de las 16 muestras diferentes.

Los resultados los expresamos resumidos en la tabla n.º 33 y con el fin de aclarar su interpretación, están en forma gráfica en la figura n.º 18, y de tales resultados es inmediato deducir las consecuencias siguientes:

1.º La estabilidad a pH 5 ó 6 es bastante mayor que a 4 ó 3. Por debajo del pH 5, para una misma temperatura, la inactividad del enzima es mayor si el pH es menor. Este hecho es interesante en la industria conservera para conseguir con el menor tiempo posible y la mínima temperatura, la inactivación enzimática que asegure la inexistencia posterior de pardeos en la fruta del bote. No hemos extendido más el rango de pH estudiados, pues interesan los normales de actuación del enzima en el fruto en fresco, o en conserva.

2.º La estabilidad térmica del enzima es considerable y aunque las temperaturas altas producen una inmediata caída de la actividad cateco-

lasa, el resto no inactivado se conserva bien a lo largo del tiempo. Este hecho explicaría la existencia de pardeos en conservas en las cuales la inactivación del enzima no ha sido total, por lo que resta un pequeño residuo sin inactivar.

2.—*Inactivación de catecolasa a temperaturas altas.*—Hemos observado que a temperaturas altas hay una gran inactivación del enzima en un corto período de tiempo. En el proceso de elaboración industrial de los frutos, el enzima debe inactivarse durante la esterilización, la cual requiere tiempos mínimos para evitar reblandecimientos. Por ello hicimos un grupo de ensayos de inactivación con tratamientos térmicos de cinco minutos a distintas temperaturas sobre enzimas acondicionados a diferentes pH.

Se realizó una extracción de enzima procedente de polvo acetónico y se dividió en 4 partes alicuotas, poniéndole a una de ellas disolución de ácido cítrico hasta pH 4. A otra se le añade disolución de fosfato sódico hasta pH 6 y la tercera se deja a su pH 5.

Sometimos muestras de cada una de estas 3 disoluciones enzimáticas a un tratamiento térmico de 5 minutos a 0° C, 60° C, 70° C, 80° C, 90° C, y 100° C. Al final de este período efectuamos las mediciones de catecolasa y se estableció como comparativo el ensayo que permanecía a 0° C, para así conocer el grado de inactivación ocasionado por la temperatura.

En la tabla n.º 34 se reflejan los resultados obtenidos, plasmados en forma gráfica en la figura n.º 19. De su estudio queda comprobado que:

1.º De acuerdo con los datos ya existentes la mayor parte de la actividad catecolasa se destruye con relativa facilidad, pero para lograr la inactivación total se precisa una temperatura muy alta.

2.º Con pH menores se consigue mayor inactivación a temperaturas más bajas.

TABLA N.º 33

ESTABILIDAD DE CATECOLASA DE ALBARICOQUE FRENTE  
A TIEMPO, pH Y TEMPERATURASActividades en  $\mu\text{l} \cdot \text{O}_2/\text{minuto}$ 

		Conservación a 0° C		Conservación a 20° C		Conservación a 40° C		Conservación a 60° C	
		Activ.	%	Activ.	%	Activ.	%	Activ.	%
Enzima a pH 3	0 horas	5,6	100	5,6	100	5,6	100	5,6	100
	2 horas	4,6	82	2,0	36	1,2	21	1,3	23
	17 horas	2,8	50	1,0	18	0,7	12	0,7	12
	24 horas	2,0	36	0,4	7	0,4	7	0	0
Enzima a pH 4	0 horas	15,8	100	15,8	100	15,8	100	15,8	100
	2 horas	14,1	89	8,1	51	5,1	32	1,5	9
	17 horas	7,1	45	3,3	21	2,0	13	1,0	6
	24 horas	6,1	38	2,1	13	0,7	4	0	0
Enzima a pH 5	0 horas	20,9	100	20,9	100	20,9	100	20,9	100
	2 horas	19,7	94	17,8	85	11,2	53	4,1	20
	17 horas	17,0	81	10,4	50	7,1	34	1,7	8
	24 horas	14,7	70	6,6	31	5,1	24	0	0
Enzima a pH 6	0 horas	17,9	100	17,9	100	17,9	100	17,9	100
	2 horas	16,3	91	15,3	85	8,1	45	2,2	12
	17 horas	13,4	75	8,1	45	6,3	35	1,7	9
	24 horas	12,0	67	6,2	34	4,4	24	0	0

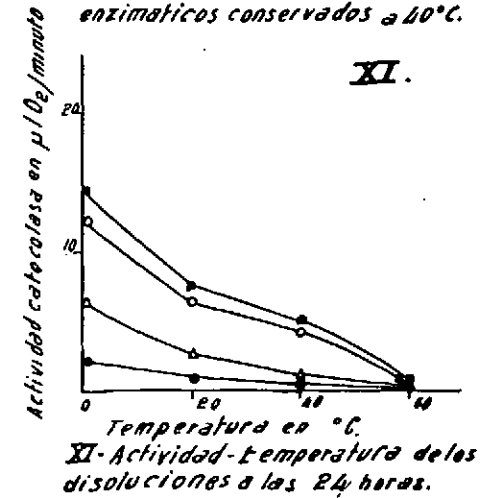
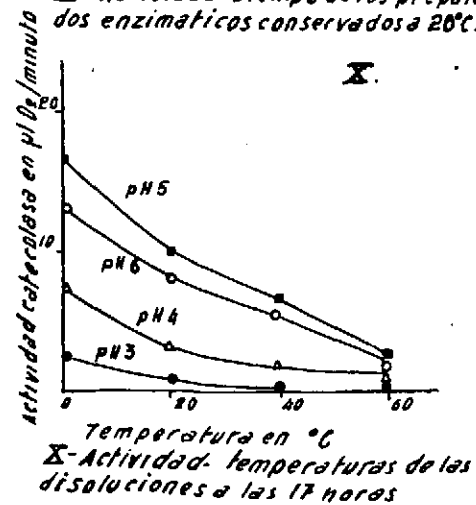
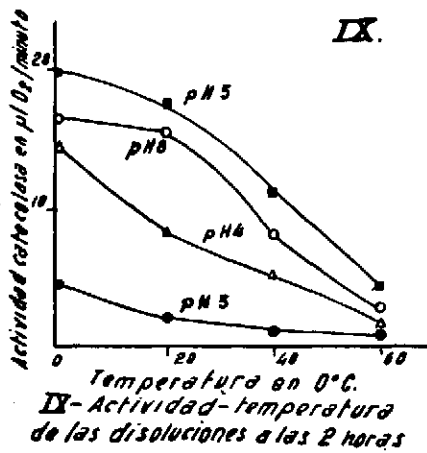
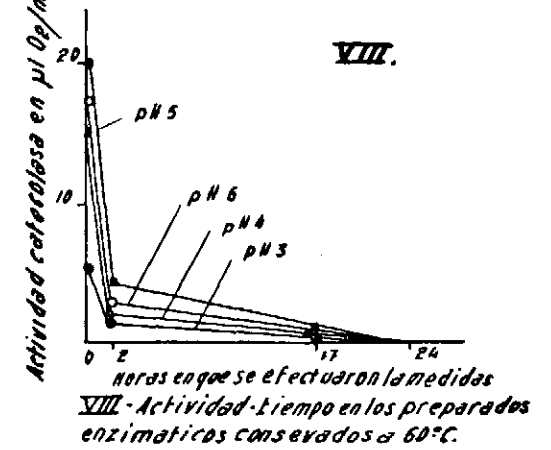
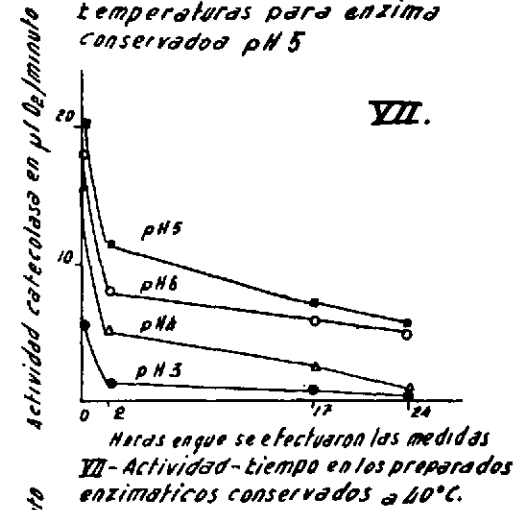
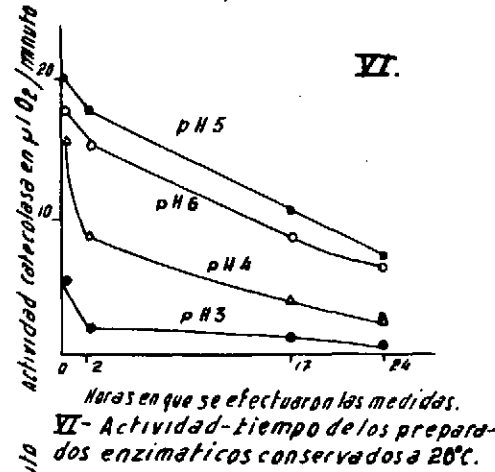
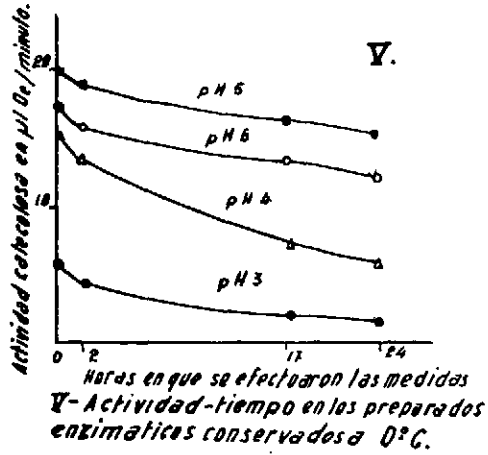
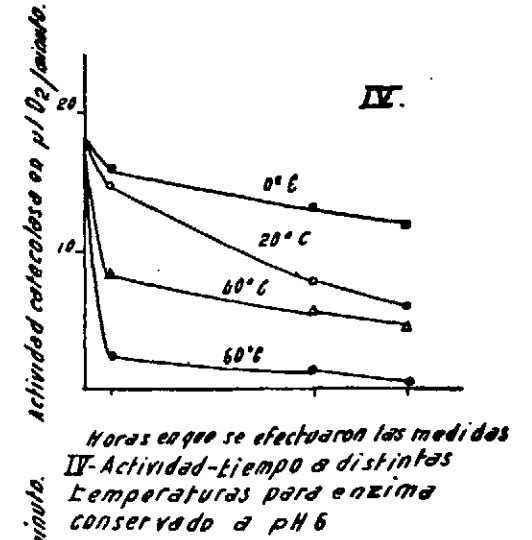
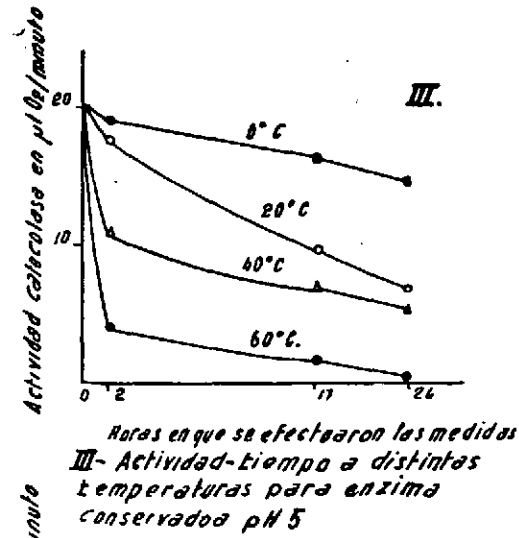
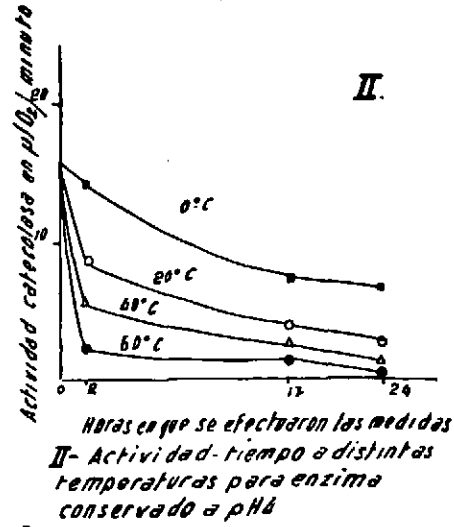
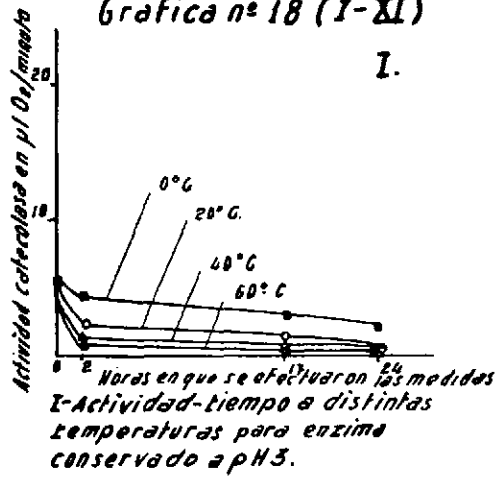
Los % se refieren a la actividad máxima como 100.

TABLA N.º 34

INACTIVACION DE CATECOLASA DE ALBARICOQUE  
POR CALENTAMIENTO

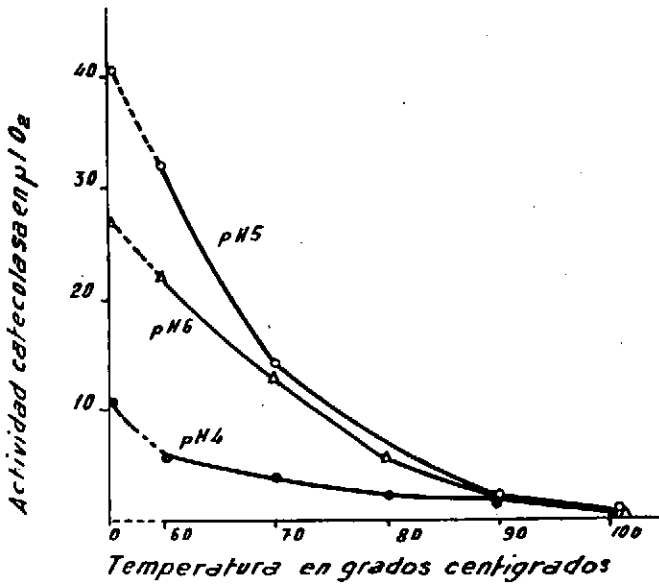
<i>Temperatura</i>	Enzima a pH 4	Enzima a pH 5	Enzima a pH 6
0° C			
μl O <sub>2</sub>	10,1	40,5	26,8
% Inactivación	—	—	—
60° C			
μl O <sub>2</sub>	5,5	32	22,3
% Inactivación	43 %	21 %	18 %
70° C			
μl O <sub>2</sub>	4	14	13,1
% Inactivación	61 %	65 %	51 %
80° C			
μl O <sub>2</sub>	2,4	9,15	5,5
% Inactivación	79 %	73 %	73 %
90° C			
μl O <sub>2</sub>	1,5	1,8	1,8
% Inactivación	82 %	95 %	93 %
100° C			
μl O <sub>2</sub>	0	0	0
% Inactivación	100 %	100 %	100 %

grafica nº 18 (I-XI)



Estabilidad de catecolasa de albaricque frente a tiempo, pH y temperatura.

Grafica nº. 19.



*Inactivación de catecolasa de albaricque por calentamiento.*





## b.—CRESOLASA DE ALBARICOQUE

1.—*Estabilidad de cresolasa frente a temperatura, pH y tiempo.* Hemos comprobado en ensayos anteriores que la actividad cresolasa es mucho menor estable que la catecolasa. Los ensayos siguientes son paralelos a los efectuados con catecolasa y confirman definitivamente esa afirmación y nos hacen pensar que la inactivación del enzima cresolasa no constituirá un problema serio en la elaboración normal de albaricoque y melocotón en las fábricas de conserva.

En la tabla n.º 35 y en su gráfica n.º 20, se expresan los resultados de los ensayos de estabilidad con el tiempo en relación con el pH y la temperatura.

Los resultados obtenidos los comparamos con los correspondientes a catecolasa (tabla n.º 33 y gráfica n.º 18) y deducimos de ellos que:

1.º Todos los datos obtenidos coinciden cualitativamente al señalar la igualdad de comportamiento de catecolasa y cresolasa.

2.º Por debajo de pH 5 de acondicionamiento, para una misma temperatura, la inactivación del enzima es mayor a pH menores.

3.º Tal como expusimos anteriormente, aun cuando el comportamiento general es idéntico, la cresolasa es mucho más sensible que la catecolasa a los efectos de pH bajos de acondicionamiento y al sometimiento del preparado enzimático a altas temperaturas.

2.—*Inactivación de cresolasa a temperaturas altas.*—Anteriormente hemos indicado que la inactivación de cresolasa no debería constituir ningún problema serio en la industrialización conservera de albaricoque y melocotón, pero a pesar de ello y para comprobar tal afirmación, se hizo un ensayo de inactivación con enzima acondicionado a distintos pH y sometida a temperaturas altas durante cinco minutos, tal como se hizo con catecolasa. Los resultados son los de la tabla n.º 36 y la gráfica n.º 21 y, en resumen, es posible destacar de ellos que el comportamiento corresponde a lo que se esperaba teniendo en cuenta los ensayos anteriores, y así, por ejemplo, con cinco minutos de permanencia a 70° C se ha conseguido una inactivación total de cresolasa.

TABLA N.º 35

ESTABILIDAD DE CRESOLASA DE ALBARICOQUE FRENTE  
A TIEMPO, pH Y TEMPERATURAActividades en  $\mu\text{l} \cdot \text{O}_2$ 

		Conservación a 0° C		Conservación a 20° C		Conservación a 40° C		Conservación a 60° C	
		Activ.	%	Activ.	%	Activ.	%	Activ.	%
Enzima a pH 3	0 horas	1,5	100	1,5	100	1,5	100	1,5	100
	2 horas	1	66	0	0	0	0	0	0
	17 horas	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0
Enzima a pH 4	0 horas	10,7	100	10,7	100	10,7	100	10,7	100
	2 horas	9,2	86	3,1	29	2,1	19	0	0
	17 horas	3,1	29	0,8	7	0,2	2	0	0
	24 horas	1,5	14	0,2	2	0	0	0	0
Enzima a pH 5	0 horas	18,6	100	18,6	100	18,6	100	18,6	100
	2 horas	18,3	98	15,3	82	9,2	49	1,5	8
	17 horas	16,5	89	5,3	28	4,6	25	0	0
	24 horas	13,5	72	2,4	13	2,1	11	0	0
Enzima a pH 6	0 horas	10,7	100	10,7	100	10,7	100	10,7	100
	2 horas	9,8	91	5,1	48	4,0	37	0	0
	17 horas	6,1	57	2,1	19	1,4	13	0	0
	24 horas	4,3	40	0,6	6	0,5	5	0	0

Los % se refieren a la actividad máxima.

## C.—CATECOLASA DE ALCACHOFA

1.—*Estabilidad de catecolasa frente a temperatura, pH y tiempo.*—Ha quedado señalado en esta Memoria que el comportamiento del complejo fenolasa de albaricoque y melocotón es diferente al de alcachofa. Por esta razón, repetimos con disoluciones enzimáticas procedentes de alcachofa, la serie de ensayos que, con fenolasa de albaricoque, se habían realizado y han quedado expuestos. Las condiciones experimentales fueron totalmente idénticas en ambos ensayos y los resultados obtenidos se exponen en la tabla n.º 37 y en la gráfica n.º 22. A la vista de estos datos debemos hacer resaltar que:

1.º El sistema catecolasa de alcachofa es más sensible que el procedente de albaricoque a los efectos de pH bajos (3 ó 4) y de temperaturas altas (60° C).

2.º Otra diferencia con el complejo fenolasa de albaricoque es el hecho de que el enzima procedente de alcachofa mantenido en condiciones de pH 5 ó 6 y a temperaturas moderadas (entre 20° C y 40° C) presenta un incremento no permanente de actividad catecolasa con el tiempo, cuyas causas no vamos a discutir en este trabajo donde sólo nos limitaremos a presentar este hecho que queda reflejado más claramente en la tabla n.º 38.

2.—*Inactivación de catecolasa de alcachofa por calentamiento.*

Se repitieron series de experiencias análogas a las efectuadas con el complejo fenólico procedente de albaricoque y los resultados que obtuvimos se sumarizan en la tabla n.º 39 y gráfica n.º 23 en las que se expresan la inactivación producida por tratamientos térmicos de 5 minutos de duración sobre diversas disoluciones enzimáticas acondicionadas a distintos pH.

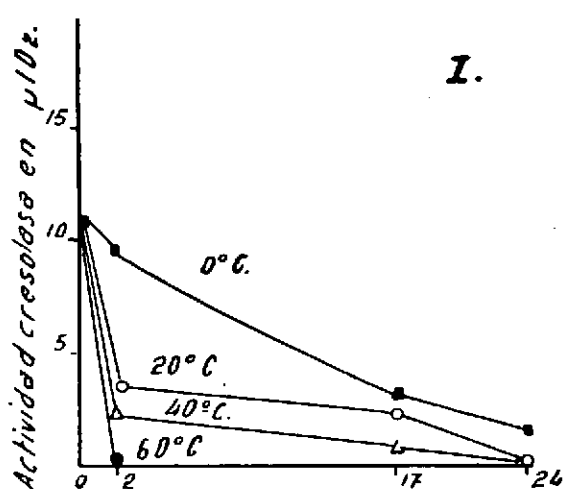
De los datos de la tabla n.º 39, se puede establecer que:

1.º Se confirma la mayor labilidad térmica de catecolasa de alcachofa en relación con catecolasa de albaricoque.

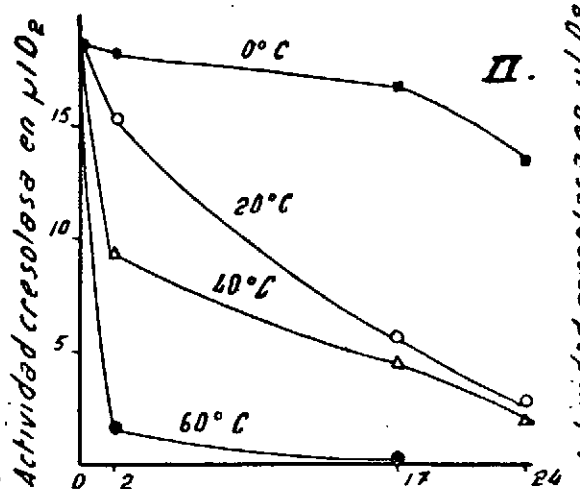
2.º Para lograr la inactivación total con 5 minutos de tratamiento térmico, se necesitan las siguientes temperaturas: 50° C para enzima a pH 3; 60° C si el pH es 4; 80° C a pH 5 y 90° C con pH 6.

En cuanto a cresolasa no es necesario insistir más ya que no plantea problemas tecnológicos por ser un enzima fácilmente inactivado por la temperatura.

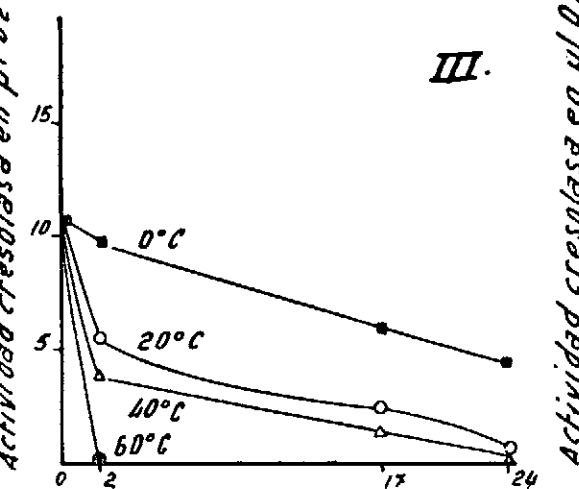
Gráfica nº 20 (I-VIII)



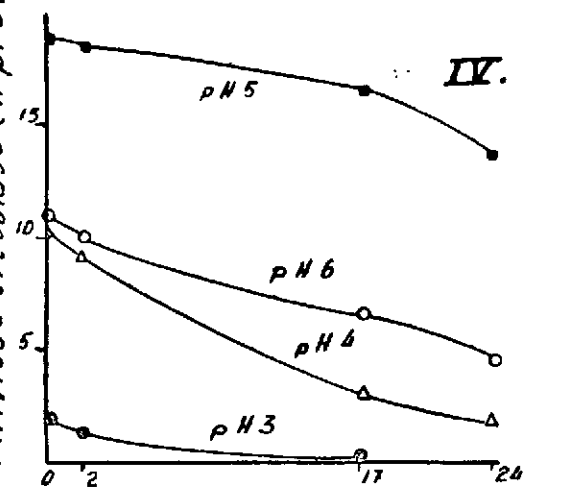
I- Actividad-tiempo a distintas temperaturas del enzima a pH 4



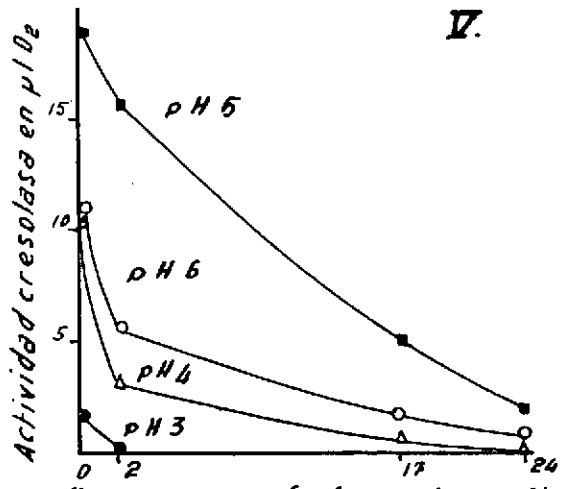
II- Actividad-tiempo a distintas temperaturas del enzima a pH 5



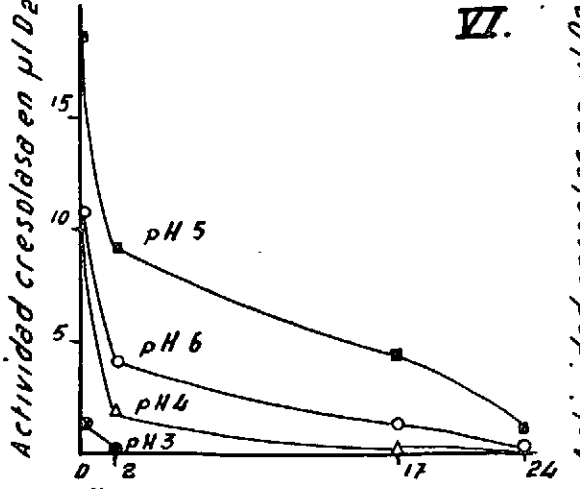
III- Actividad-tiempo a distintas temperaturas de enzima a pH 6



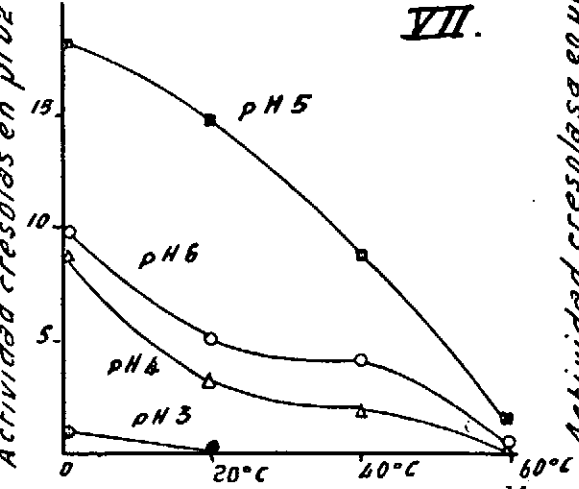
IV- Actividad-tiempo de las disoluciones enzimáticas a 0°C.



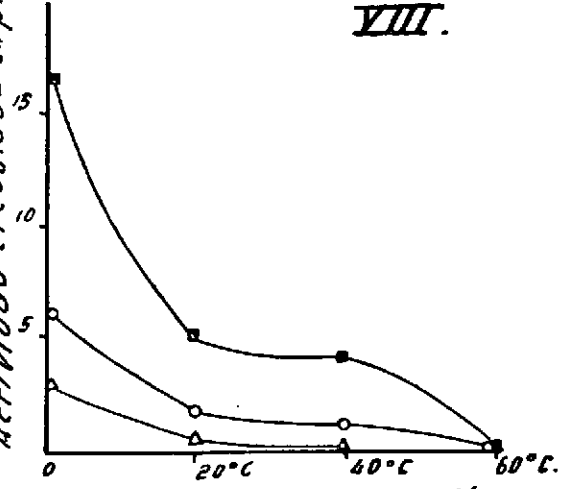
V- Actividad-tiempo de las disoluciones enzimáticas a 20°C.



VI- Actividad-tiempo de las disoluciones enzimáticas a 40°C.



VII- Actividad-temperatura de las disoluciones enzimáticas a las 2 horas.



VIII- Actividad-temperatura de los disoluciones enzimáticas a las 17 horas

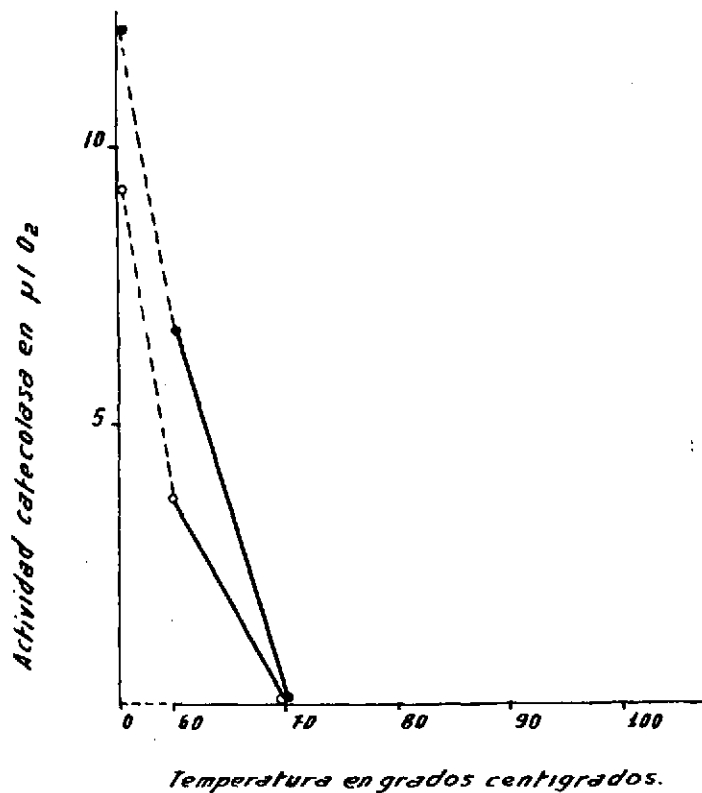
Estabilidad de cresolasa de albaricogue frente a tiempo, pH y temperatura.



TABLA N.º 36

INACTIVACION DE CRESOLASA DE ALBARICOQUE  
POR CALENTAMIENTOActividades en  $\mu$  O<sub>2</sub>

<i>Temperatura</i>	Enzima a pH 4	Enzima a pH 5	Enzima a pH 6
0° C	0	12,2	9,2
$\mu$ l O <sub>2</sub>	—	0	0
% Inactivación	—	0	0
60° C	0	6,7	3,7
$\mu$ l O <sub>2</sub>	—	55	41
% Inactivación	—	55	41
70° C	0	0	0
$\mu$ l O <sub>2</sub>	—	100	100
% Inactivación	—	100	100
80° C	0	0	0
$\mu$ l O <sub>2</sub>	—	100	100
% Inactivación	—	100	100
90° C	0	0	0
$\mu$ l O <sub>2</sub>	—	100	100
% Inactivación	—	100	100
100° C	0	0	0
$\mu$ l O <sub>2</sub>	—	100	100
% Inactivación	—	100	100

*Grafica nº. 21.*

*Inactivación de cresolasa de  
albaricoque por calentamiento.*

TABLA N.º 37

ESTABILIDAD DE CATECOLASA DE ALCACHOFA FRENTE  
A TIEMPO, pH Y TEMPERATURAActividades en  $\mu\text{l O}_2/\text{minuto}$ 

		Conservación a 0° C		Conservación a 20° C		Conservación a 40° C		Conservación a 60° C	
		Activ.	%	Activ.	%	Activ.	%	Activ.	%
Enzima a pH 3	0 horas	4,5	100	4,5	100	4,5	100	4,5	100
	2 horas	2,5	56	0	0	0	0	0	0
	17 horas	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0
Enzima a pH 4	0 horas	9,3	100	9,3	100	9,3	100	9,3	100
	2 horas	9,2	98	4,1	44	0,7	7	0	0
	17 horas	3,3	35	0,5	5	0	0	0	0
	24 horas	1,8	2	0	0	0	0	0	0
Enzima a pH 5	0 horas	11,9	100	11,9	100	11,9	100	11,9	100
	2 horas	11,4	96	8,0	67	1,7	14	0	0
	17 horas	7,0	59	1,0	8	0,7	6	0	0
	24 horas	6,1	51	26,0	220	2,3	21	0	0
Enzima a pH 6	0 horas	22,5	100	22,5	100	22,5	100	22,5	100
	2 horas	22	98	20	89	13,5	60	0	100
	17 horas	18,5	82	6,5	29	18,5	82	0	0
	24 horas	15,6	70	27,0	120	18,0	80	0	0

Los % se refieren a la actividad máxima como 100.

TABLA N.º 38

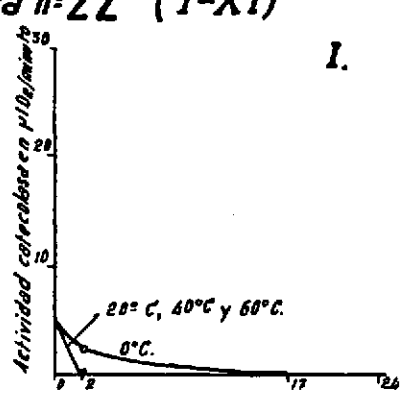
INCREMENTO DE ACTIVIDAD CATECOLASA DE ALCACHOFA CON  
TEMPERATURAS MODERADAS DE CONSERVACION Y pH 5 ó 6  
DE ACONDICIONAMIENTO

	<i>Tipo de enzima</i>			
	pH 5-20° C	pH 5-40° C	pH 6-20° C	pH 6-40° C
0 horas				
Actividad	11,9	11,9	22,5	22,5
%	100	100	100	100
2 horas				
Actividad	8,0	1,7	20,0	13,5
%	67	14	89	60
17 horas				
Actividad	1,0	0,7	6,5	18,5
%	8	6	29	82
24 horas				
Actividad	26,0	2,3	27,0	18,0
%	220	19	120	80
41 horas				
Actividad	25,0	2,3	25,0	2,4
%	210	19	110	11
70 horas				
Actividad	20,0	1,0	14,0	0
%	170	8	62	0

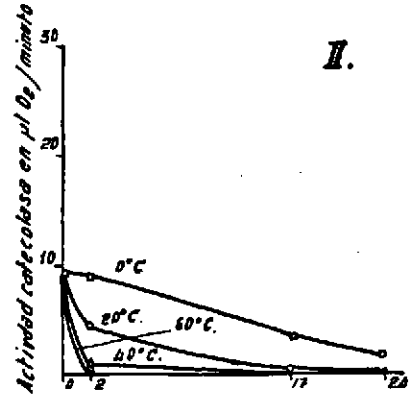
Las actividades se dan en  $\mu$  l de O<sub>2</sub>/minuto.  
Los % se refieren a la actividad inicial.



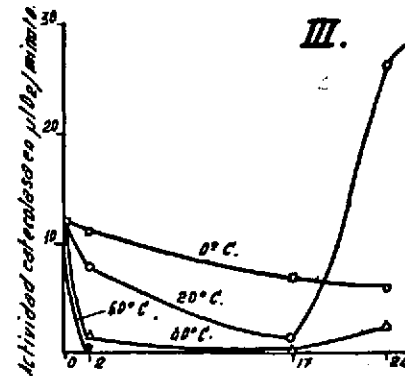
**Gráfica nº22 (I-XI)**



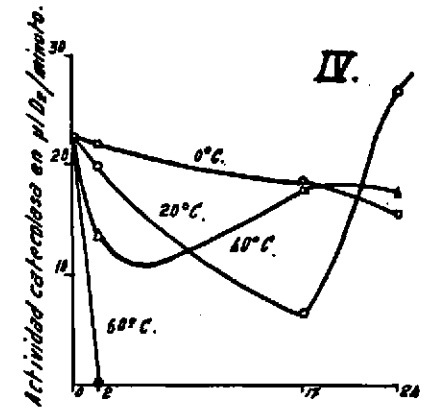
Horas en que se efectuaron las medidas.  
I.- Actividad-tiempo a distintas temperaturas para enzima conservado a pH 3.



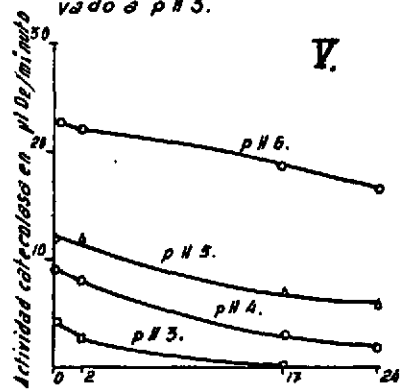
Horas en que se efectuaron las medidas.  
II.- Actividad-tiempo a distintas temperaturas para enzima conservado a pH 4



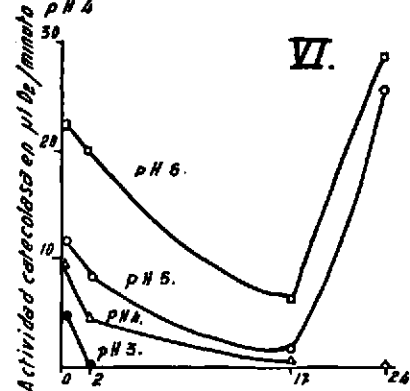
Horas en que se efectuaron las medidas.  
III- Actividad- tiempo a distintas temperaturas para enzima conservado a pH 5



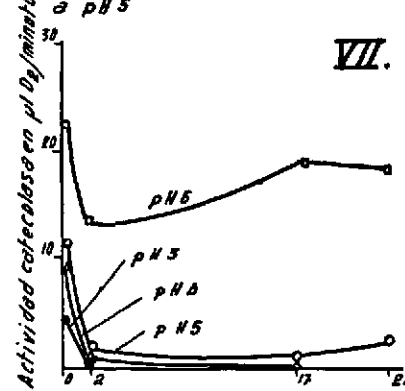
Horas en que se efectuaron las medidas.  
IV- Actividad- tiempo a distintas temperaturas para enzima conservado a pH 6.



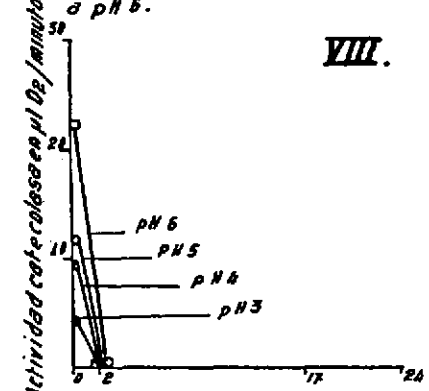
Horas en que se efectuaron las medidas.  
V.- Actividad-tiempo en los preparados enzimáticos conservados a 0°C.



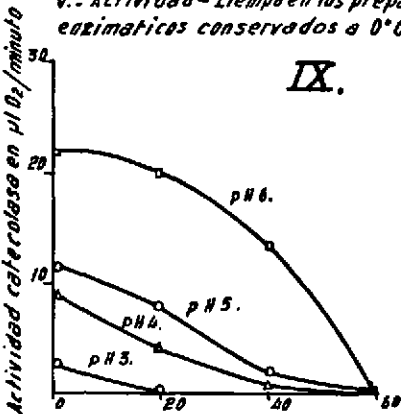
Horas en que se efectuaron las medidas.  
VI-Actividad- tiempo de los preparados enzimáticos conservados a 20°C.



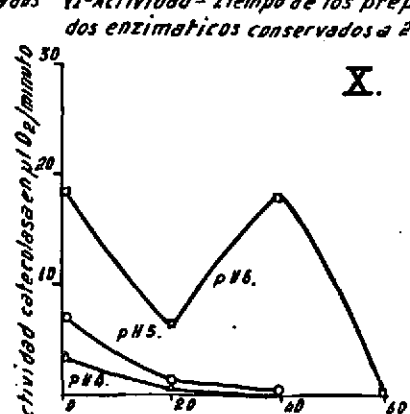
Horas en que se efectuaron las medidas.  
VII-Actividad-tiempo en los preparados enzimáticos conservados a 40°C.



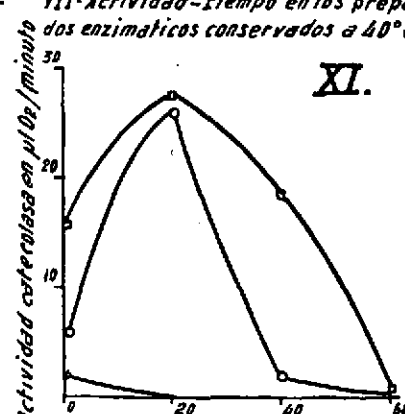
Horas en que se efectuaron las medidas.  
VIII-Actividad-tiempo en los preparados enzimáticos conservados a 60°C.



Temperatura en °C.  
IX.- Actividad- temperatura de las disoluciones a las 2 horas.



Temperatura en °C.  
X- Actividad- temperatura de las disoluciones a las 17 horas.



Temperatura en °C.  
XI-Actividad- temperatura de las disoluciones a las 24 horas.

**Estabilidad de catecolasa de alcachofa frente a tiempo pH y temperatura.**



TABLA N.º 39

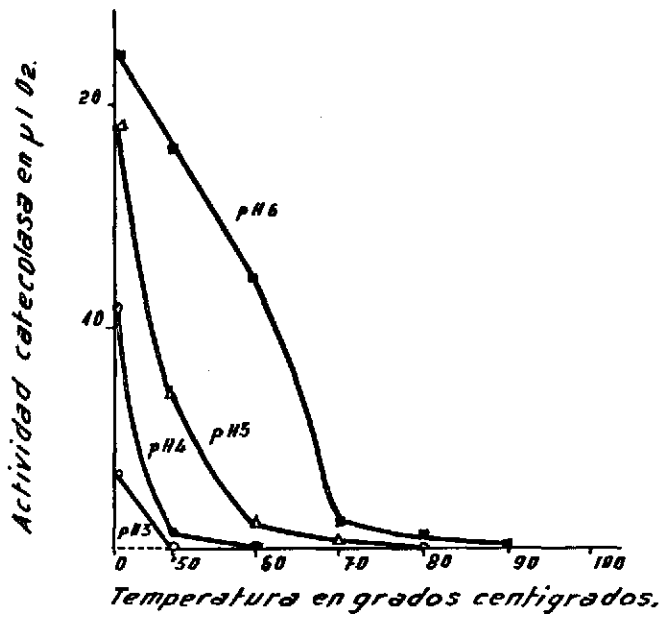
INACTIVACION TERMICA DE ACTIVIDAD CATECOLASA DE ALCACHOFA  
CON CINCO MINUTOS DE TRATAMIENTO*Enzima condicionado a*

Tratamiento térmico	pH 3		pH 4		pH 5		pH 6	
	Actividad	%	Actividad	%	Actividad	%	Actividad	%
0° C	3,6	100	11,6	100	19	100	22	100
50° C	0	0	0,5	4	7,2	38	18	82
60° C	0	0	0	0	1,2	6	12,3	65
70° C	0	0	0	0	0,5	3	1,2	6
80° C	0	0	0	0	0	0	0,3	1
90° C	0	0	0	0	0	0	0	0
100° C	0	0	0	0	0	0	0	0

La actividad está medida en  $\mu$  l de O<sub>2</sub>/minuto.

Los % se refieren a la actividad máxima.

GRAFICA N° 23.



*Inactivación de catecolasa de  
alcachofa por calentamiento.*

## VI

### SUSTRATOS DEL COMPLEJO FENOLASA

El estudio de la actuación del sistema fenolasa sobre diversos sustratos persigue dos fines:

1.º Cualquier información sobre la posible relación entre la estructura de una sustancia y su capacidad para actuar como sustrato nos puede ayudar a conocer el mecanismo de acción del enzima.

2.º Es interesante comprobar en que medida los fenoles naturales del fruto pueden actuar como sustratos del enzima. De este modo tendríamos un mayor conocimiento del papel biológico del enzima en los frutos.

En primer lugar, reunimos la mayor cantidad posible de sustancias con función fenol puras y probamos su capacidad para actuar como sustratos. Los ensayos se hicieron con disoluciones enzimáticas extraídas a pH 5 y a pH 7 de polvo acetónico de albaricoque. Comprobamos que no existían diferencias entre éstas. Por otra parte, hay que advertir que se adicionó al medio de reacción una cantidad catalítica de catecol para poder controlar y medir la posible existencia de actividades cresolasa. Según las indicaciones de Lavollay (26) repetimos los ensayos en medios alcohólicos del 5 %, para aumentar la solubilidad de algunas de las sustancias probadas. No existieron diferencias cualitativas debidas a la presencia de alcohol.

Como consecuencia de estos ensayos exponemos en las tablas n.º 40 y n.º 41 una clasificación de los fenoles según sean o no capaces de actuar como sustratos.

En la tabla n.º 40 se han clasificado como positivos fisetina, miricetina, ácido gálico e hidroquinona, a pesar de que las actividades que se obtuvieron con ellos tenían un valor bajo. En el caso de las dos primeras sustancias se observó que, aunque su solubilidad es muy pequeña, la actividad aumenta al incrementar la cantidad adicionada de estos flavonoides al medio de reacción, aun cuando éste estuviese saturado de antemano. Esto nos hace sospechar que la actividad observada se deba a impurezas o contaminaciones de esas sustancias con otras que pueden ser sustratos del enzima. Con la hidroquinona y el ácido gálico no existía ese problema de solubilidad, pero aun con concentraciones de ellos del orden de  $10^{-2}$  M en el medio, los valores de la actividad fenolasa al actuar sobre estos fenoles son muy bajos.

A la vista de las tablas n.º 40 y n.º 41, podemos indicar que el sistema fenolasa puede actuar como cresolasa sobre el p-cresol, pero no sobre el m-cresol, o-cresol ni p-nitrofenol, luego parece ser que, para su actuación, el grupo fenol debe llevar en posición *para* un sustituyente de 1.ª clase. La hidroquinona no es buen sustrato a pesar de ser un fenol con un sustituyente de 1.ª en *para* pero resulta que este sustituyente es otro grupo -OH y ya comprobaremos al estudiar inhibidores que este hecho puede provocar otros fenómenos.

Con un triturador adecuado, tratamos tejidos de fruto con mezcla alcohol-agua (80 % de alcohol), tras centrifugar el extracto líquido lo concentramos a presión reducida y comprobamos manométricamente que era capaz de ser sustrato del sistema fenolasa.

Desde el punto de vista comparativo, nos interesa saber la eficacia de la acción catecolasa sobre cada uno de los sustratos clasificados más arriba como positivos para tal enzima.

La cinética de enzimas dispone para este efecto de los términos  $K_m$  y  $V_m$ , que aparecen en la expresión de Lineweaver-Burk para la ecuación de Michaelis:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[s]} + \frac{1}{V_m}$$

en la cual:

$v$  = velocidad actual de la reacción en condiciones establecidas.

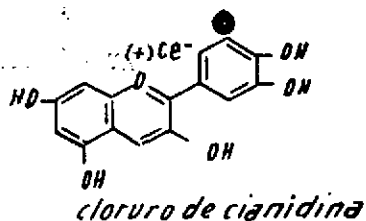
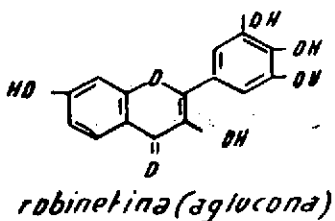
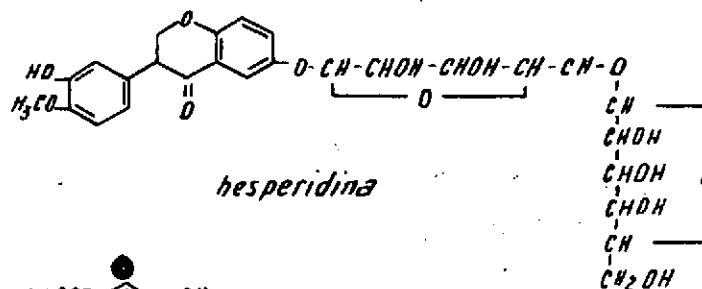
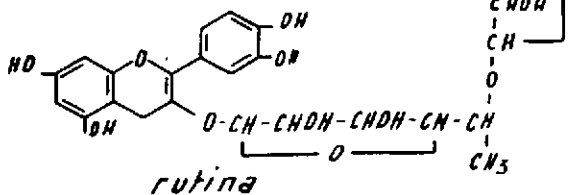
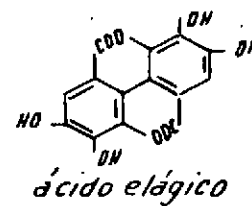
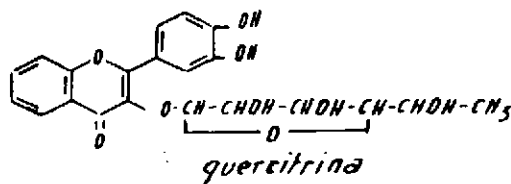
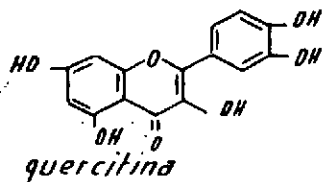
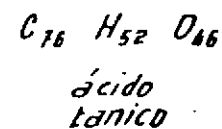
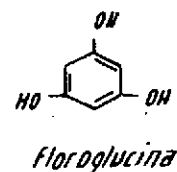
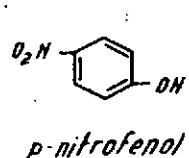
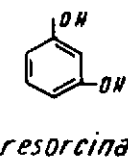
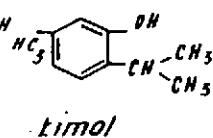
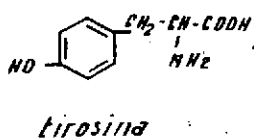
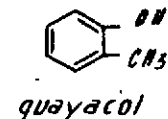
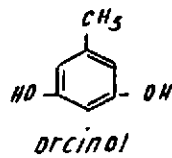
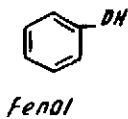
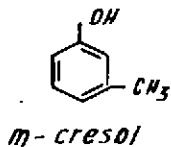
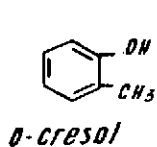
$V_m$  = velocidad máxima de la reacción cuando el enzima se encuentra saturado de sustrato.

$[s]$  = concentración del sustrato.

$K_m$  = constante de Michaelis.

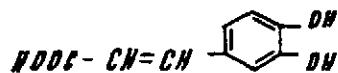
Un tratamiento más profundo sobre el significado de esta ecuación se encontrará en un buen libro de Enzimología.

## SUSTRATOS NEGATIVOS CON FENOLASA (ALBARICOQUE)

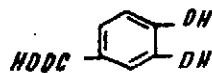


**TABLA Nº 41.**

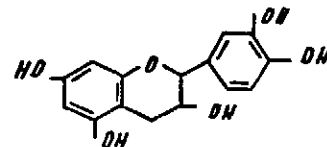
SUSTRATOS POSITIVOS CON  
FENOLASA (ALBARICOQUE)



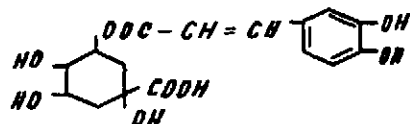
ácido cafeico



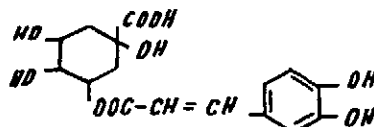
ácido protocatequico



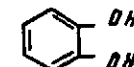
(+) catequina y (-) epicatequina



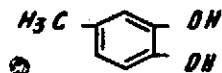
ácido clorogénico



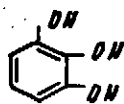
ácido isoclorogénico



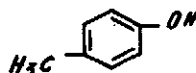
catecol



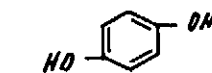
3.4 dihidroxi tolueno



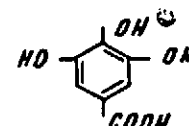
ácido pirogalico



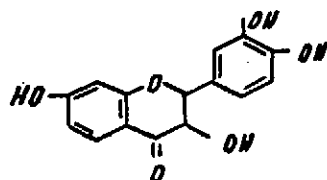
p-cresol



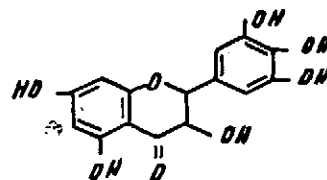
hidroquinona



ácido galico



fisetina



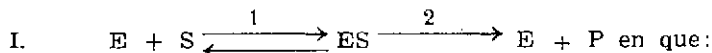
miricetina

TABLA Nº 40

Sin embargo, aquí hemos de señalar que  $V_m$  y  $K_m$  son constantes para un enzima en unas mismas condiciones de ensayo y, por ello, la representación de  $\frac{1}{v}$  frente a  $\frac{1}{s}$  es una recta, cuyo coeficiente angular es  $\frac{K_m}{V_m}$  y la ordenada en el origen es  $\frac{1}{V_m}$ . En medidas de actividad podemos variar la concentración de sustrato, con lo que tendremos distintas velocidades de reacción (actividades enzimáticas) y representando las correspondientes parejas de valores  $\frac{1}{v}$  y  $\frac{1}{s}$  obtendremos una recta con la cual calcularemos analíticamente  $K_m$  y  $V_m$ . En las tablas n.º 42 y 43 y en la gráfica n.º 24 se expresan los resultados de los ensayos efectuados a tal fin con diversos sustratos utilizando un mismo preparado enzimático y midiendo las actividades según el procedimiento tipo, excepto en lo referente a la concentración del sustrato que varía en cada medida, de acuerdo con lo señalado en cada tabla.

De los datos expuestos en las páginas anteriores y tras los cálculos correspondientes obtenemos los valores expresados en la tabla n.º 44.

Intentaremos dar un significado mecanístico a los resultados. La acción del enzima la expresamos por las reacciones:



E = enzima

S = sustrato

ES = complejo enzima-sustrato

P = producto de la reacción.

Por otra parte, en la gráfica n.º 25, representamos una curva típica de actividad enzimática frente a concentración de sustrato. Según ella, la velocidad máxima de actuación de un enzima ocurre cuando se encuentra saturado de sustrato, en cuyo instante la concentración del complejo ES es máxima y  $V_m$  nos mide la máxima formación de producto a partir del complejo antes citado, o bien la formación de complejo a partir del enzima y del sustrato, según que sea la etapa 2 ó la 1 la que limite la reacción global.



TABLA N.º 42

## CINETICA DE LA ACCION CATECOLASA SOBRE DIVERSOS SUSTRATOS

Sustrato: (—) epicatequina				Sustrato: hidrato (+) catequina			
A	B	C	D	A	B	C	D
$0,6 \cdot 10^{-3}$	46	1.500	$2,2 \cdot 10^{-2}$	$0,6 \cdot 10^{-3}$	40	1.500	$2,5 \cdot 10^{-2}$
$0,5 \cdot 10^{-3}$	40	2.000	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$0,5 \cdot 10^{-3}$	31	2.000	$3,2 \cdot 10^{-2}$
$0,3 \cdot 10^{-3}$	31	3.000	$3,2 \cdot 10^{-2}$	$0,3 \cdot 10^{-3}$	23	3.000	$4,4 \cdot 10^{-2}$
$0,25 \cdot 10^{-3}$	27	4.000	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$0,25 \cdot 10^{-3}$	18	4.000	$5,4 \cdot 10^{-2}$
$0,2 \cdot 10^{-3}$	22	5.000	$4,4 \cdot 10^{-2}$	$0,2 \cdot 10^{-3}$	16	5.000	$6,3 \cdot 10^{-2}$
$0,16 \cdot 10^{-3}$	19	6.000	$5,3 \cdot 10^{-2}$	$0,16 \cdot 10^{-3}$	13	6.000	$7,6 \cdot 10^{-2}$

Sustrato: catecol				Sustrato: ácido cafeico			
A	B	C	D	A	B	C	D
$2 \cdot 10^{-3}$	35	500	$2,8 \cdot 10^{-2}$	$0,6 \cdot 10^{-3}$	44	1.500	$2,3 \cdot 10^{-2}$
$1 \cdot 10^{-3}$	22	1.000	$4,5 \cdot 10^{-2}$	$0,3 \cdot 10^{-3}$	29	3.000	$3,4 \cdot 10^{-2}$
$0,6 \cdot 10^{-3}$	16	1.500	$6,1 \cdot 10^{-2}$	$0,2 \cdot 10^{-3}$	21	5.000	$4,7 \cdot 10^{-2}$
$0,5 \cdot 10^{-3}$	13	2.000	$7,4 \cdot 10^{-2}$	$0,16 \cdot 10^{-3}$	19	6.000	$5,3 \cdot 10^{-2}$
$0,4 \cdot 10^{-3}$	11	2.500	$9,1 \cdot 10^{-2}$				

Sustrato: 3,4 dihidroxitolueno				Sustrato: ácido clorogénico			
A	B	C	D	A	B	C	D
$1 \cdot 10^{-3}$	92	1.000	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$0,6 \cdot 10^{-3}$	52	1.500	$1,9 \cdot 10^{-2}$
$0,5 \cdot 10^{-3}$	62	2.000	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$0,5 \cdot 10^{-3}$	39	2.000	$2,6 \cdot 10^{-2}$
$0,3 \cdot 10^{-3}$	43	3.000	$2,3 \cdot 10^{-2}$	$0,3 \cdot 10^{-3}$	28	3.000	$3,6 \cdot 10^{-2}$
$0,25 \cdot 10^{-3}$	33	4.000	$3,0 \cdot 10^{-2}$	$0,25 \cdot 10^{-3}$	20	4.000	$4,9 \cdot 10^{-2}$
$0,2 \cdot 10^{-3}$	28	5.000	$3,5 \cdot 10^{-2}$	$0,2 \cdot 10^{-3}$	17	5.000	$5,9 \cdot 10^{-2}$
$0,16 \cdot 10^{-3}$	24	6.000	$4,2 \cdot 10^{-2}$	$0,16 \cdot 10^{-3}$	14	6.000	$6,9 \cdot 10^{-2}$

A = Concentración molar de sustratos en el medio: [s].

B = Actividad catecolasa en  $\mu 1 O_2$  : v.

C =  $1/ [s]$ .

D =  $1/ v$ .

TABLA N.º 43

## CINETICA DE LA ACCION CATECOLASA SOBRE DIVERSOS SUSTRATOS

Sustrato: ácido isoclorogénico				Sustrato: ácido pirogálico			
A	B	C	D	A	B	C	D
$1.10^{-3}$	57	1.000	$1,7.10^{-2}$	$1.10^{-3}$	16	1.000	$6,2.10^{-2}$
$0,5.10^{-3}$	35	2.000	$2,9.10^{-2}$	$0,5.10^{-3}$	11	2.000	$9,3.10^{-2}$
$0,3.10^{-3}$	30	3.000	$3,3.10^{-2}$	$0,3.10^{-3}$	9	3.000	$11.10^{-2}$
$0,25.10^{-3}$	27	4.000	$3,7.10^{-2}$	$0,25.10^{-3}$	8	4.000	$12,6.10^{-2}$
$0,2.10^{-3}$	24	5.000	$4,1.10^{-2}$	$0,20.10^{-3}$	7	5.000	$15.10^{-2}$
$0,16.10^{-3}$	20	6.000	$4,9.10^{-2}$	$0,16.10^{-3}$	6	6.600	$17.10^{-2}$

Sustrato: ácido protocatéuico			
A	B	C	D
$10.10^{-3}$	9	100	$11.10^{-2}$
$2.10^{-3}$	8	500	$13.10^{-2}$
$1.10^{-3}$	6	1.000	$16.10^{-2}$
$0,5.10^{-3}$	5	2.000	$22.10^{-2}$
$0,310^{-3}$	4	3.000	$22.10^{-2}$

Sustrato: miricetina y fisetina.

Su solubilidad es pequeña y aún en disoluciones saturadas la actividad es tan pequeña que no se pueden realizar medidas con un mínimo de seguridad.

Sustrato: ácido gálico

La actividad es muy pequeña ( $\approx 4 \mu\text{l O}_2$ ) aun a concentraciones de sustrato muy altas ( $\approx 10^{-2}$  M), por lo que no se pueden realizar medidas.

Sustrato: hidroquinona

Sucede igual que con ácido gálico lo que nos indica, que no son sustratos aceptables de catecolasa de albaricoque.

A = Concentración molar de sustratos en el medio: [s]

B = Actividad catecolasa en  $\mu\text{l O}_2$  : v.

C =  $1/ [s]$ .

D =  $1/ v$ .

TABLA N.º 44

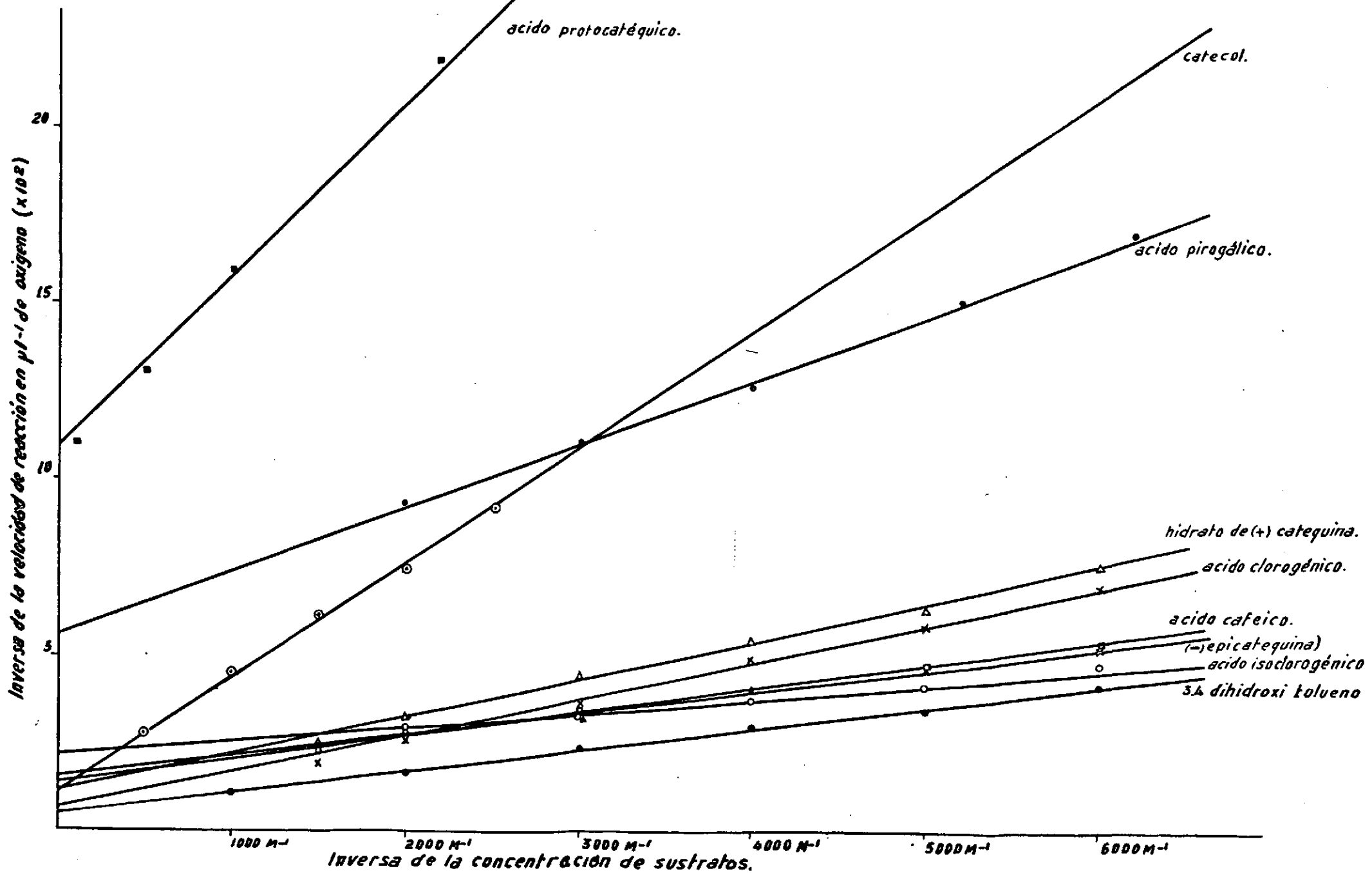
CONSTANTES DE MICHAELIS Y VELOCIDADES MAXIMAS DE DISTINTOS  
SUSTRATOS DE CATECOLASA DE ALBARICOQUE

<i>Sustrato</i>	Km (M)	Vm ( $\mu\text{l} \cdot \text{O}_2$ )	Vm/ 2 Km
Acido isoclorogénico	$0,36 \cdot 10^{-3}$	60	$85 \cdot 10^3$
Acido cafeico	$1,5 \cdot 10^{-3}$	80	$80 \cdot 10^3$
3-4 dihidroxitolueno	$1,4 \cdot 10^{-3}$	200	$70 \cdot 10^3$
(—) Epicatequina	$0,55 \cdot 10^{-3}$	10	$65 \cdot 10^3$
Acido clorogénico	$1,2 \cdot 10^{-3}$	140	$60 \cdot 10^3$
Hidrato de (+) catequina	$0,74 \cdot 10^{-3}$	80	$55 \cdot 10^3$
Acido pirogálico	$0,55 \cdot 10^{-3}$	25	$20 \cdot 10^3$
Catecol	$2,4 \cdot 10^{-3}$	80	$15 \cdot 10^3$
Acido protocatéuico	—	10	—

Si en la tabla n.º 44 consideramos el valor  $V_m$  para catecol (80), comparado con el 4-metilcatecol (200), ácido protocatéuico (10) y ácido cafeico (80), deducimos que con un sustituyente de 1.º en posición 4 ha aumentado la velocidad máxima ( $V_m$ ), mientras que un sustituyente de 2.º como el COOH la ha disminuído. Según la reacción I si la etapa 2 limita la velocidad, se comprende que un sustituyente de 1.º al ceder electrones al núcleo, sea por su efecto mesómero o por el inductivo, enriqueza electrónicamente a los grupos OH facilitando su oxidación (cesión de electrones). Con un sustituyente de 2.º ( $\text{NO}_2$ ) sucede lo contrario. Si la etapa limitante de la velocidad es la 1, los resultados anteriores significan que al formar un complejo con el enzima, el sustrato actúa cediendo electrones, con lo cual un sustituyente de 1.º facilitaría la formación de dicho complejo y uno de 2.º la dificultaría.

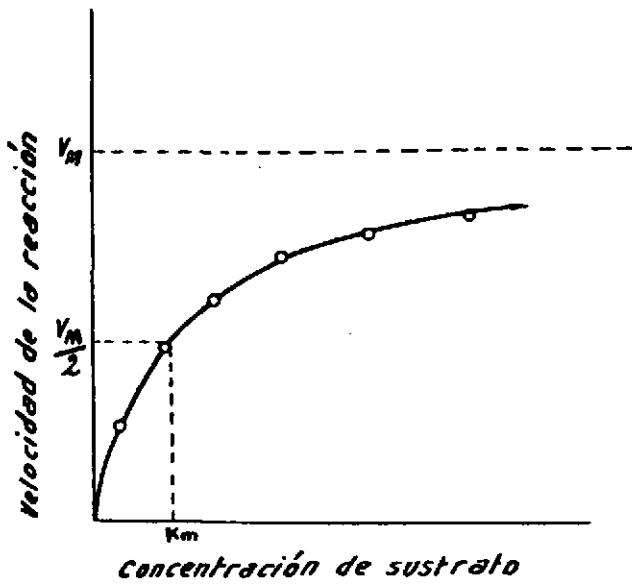
Grafica nº 24.

CINETICA DE LA ACCION DEL COMPLEJO FENOLASA DE ALBARICOQUE SOBRE DIVERSOS SUSTRATOS.





**Grafica nº 25.**



*Relación ante concentración de sustrato y velocidad de la reacción enzimática.*

El efecto de tres grupos  $-OH$  en posición vecinal, disminuye la  $V_m$  (catecol-pirogalol) (ácido protocatéquico-ácido gálico) y los datos expuestos no permiten deducir si la causa es dificultad estérica para formar el complejo (1.ª etapa de la reacción) o es la dificultad para romperse éste (2.ª etapa de la reacción).

En el caso de (+) catequina, (-) catequina, ácido clorogénico y ácido isoclorogénico, las estructuras no son sencillas y no es fácil interpretar correctamente los resultados.

En la ecuación I si hacemos  $v = \frac{0,5 V_m}{2}$ , resulta que  $K_m = s$ , de forma que  $K_m$  representa la concentración de sustrato necesaria para que la velocidad sea la mitad de la máxima, dándonos una idea de la concentración necesaria de sustrato para que el enzima se sature. A igualdad de  $V_m$  el «rendimiento» de un enzima será inversamente proporcional a su  $K_m$ . Por otra parte, a igualdad de  $K_m$ , será directamente proporcional a  $V_m$ .

Por ello, hemos escogido el cociente  $V/2 K_m$  como medida relacionada con lo que llamaremos *eficacia del enzima* para un determinado sustrato.

En la tabla n.º 44, de los 6 mayores valores de eficacia, 5 corresponden a sustancias fenólicas existentes en el fruto (comunicación personal de Miguel Párraga Luna, de nuestro Laboratorio). Del 6.º, 4 metil catecol, no se tienen actualmente referencias de su posible existencia en el fruto.

## VII

## INHIBICION DEL SISTEMA FENOLASA

Los inhibidores que hemos usado en estos ensayos los podemos clasificar en dos grupos, según la finalidad que se pretende.

En el primer grupo incluimos:

A. Dietilditio-carbamato sódico  $(C_2H_5)_2NCSSNa$ , que es un inhibidor específico de los enzimas cuya actuación depende del cobre.

B. Hidroxiquinoleína  $HOC_6H_3N : CHCH : CH$ , complejante del cobre pero no tan específico como el anterior.

C. Azida sódica  $N_3Na$ , complejante de metales. Posee poca especificidad.

D. p-cloromercuribenzoato sódico  $Cl Hg C_6H_4COONa$ , específico de grupos tioles.

Trataremos de interpretar los resultados de inhibición de estas sustancias con objeto de ayudar a la solución del problema que plantea la naturaleza de acción del enzima.

En el segundo grupo de inhibidores incluimos diversas sustancias más o menos relacionadas con los aspectos prácticos de elaboración y conservación de los frutos que venimos tratando.

**INHIBIDORES DEL PRIMER GRUPO.**—Hemos considerado de interés estudiar la inhibición, tanto de extractos enzimáticos obtenidos con tampón de pH 5, como los preparados a pH 7. Otro tipo de variación considerada fue la adición del inhibidor en el instante de la medida de actividad o con un período previo de incubación.

Efectuamos las medidas de los activos y de las correspondientes inhibiciones, a distintos pH, para establecer así la relación entre el grado de inhibición y la acidez del medio de reacción.



En todas las experiencias la concentración del inhibidor en el medio de reacción o de incubación fue  $10^{-3}$  M.

Por necesidades prácticas de los ensayos hubimos que introducir algunas variaciones en los métodos tipos de valoración de actividad catecolasa y cresolasa. Por ello, indicamos seguidamente las condiciones de medida.

*Medida de catecolasa sin incubación.*—5 ml de tampón de acondicionamiento; 1,5 ml de agua bidestilada; 1 ml de disolución de ácido ascórbico (0,02 M); 1 ml de disolución de catecol (0,1 M); 0,5 ml de disolución de inhibidor ( $2 \cdot 10^{-2}$  M) y 1 ml de disolución enzimática. Se interrumpe la actuación a los tres minutos con la adición de ácido metafosfórico y se valora el ácido ascórbico restante con disolución de iodo 0,005 N.

*Medida de catecolasa con incubación.*—5 ml de tampón de acondicionamiento; 0,6 ml de agua bidestilada; 1 ml de ácido ascórbico (0,02 M); 1 ml de catecol (0,1 M); 0,4 ml de disolución de inhibidor ( $2 \cdot 10^{-2}$  M) y 2 ml de mezcla incubada de enzima. A los tres minutos de actuación se añade el ácido metafosfórico y se valora el ácido ascórbico. Como en el caso anterior, se ha de hacer un blanco para restar el valor del activo y conocer así la verdadera actividad.

La mezcla incubada consiste en 1 parte de enzima, 0,1 parte de disolución de inhibidor ( $2 \cdot 10^{-2}$  M), y 0,9 partes de agua bidestilada y se deja incubar 18 horas a  $0^{\circ}$  C.

*Medida de cresolasa.*—Se sigue el mismo método que en el caso de la medida de actividad catecolasa, con cresol en presencia de una cantidad catalítica de catecol (0,005 ml 0,1 M). El tiempo de actuación es de diez minutos. El blanco se determina sustituyendo el p-cresol por agua bidestilada.

Los resultados de las medidas efectuadas se expresan en las tablas n.º 45 y n.º 46 y en la gráfica n.º 26.

A.—*Dietilditiocarbamato.*—En el caso del dietilditiocarbamato sódico (fig. 26 A) observamos que si no se preincuba, al medir la actividad frente a pH alto, la inhibición no es total. Como sí lo es con preincubación previa, estudiamos el período de incubación preciso para conseguir tal efecto.

Comprobamos que quince segundos de incubación resultan ser suficientes para que la inhibición sea total, es decir, es preciso que antes de la adición del catecol el enzima esté en contacto del dietilditiocarbamato. Sin embargo, al adicionar el enzima a un medio de reacción a pH 7 que contenga la mezcla de catecol y dietilditiocarbamato sódico, existe una pequeña actividad.

Los resultados se podrían interpretar como una competencia simple entre el sustrato y el inhibidor por ocupar el centro activo del enzima, y en este caso se conseguiría una inhibición total al cabo de un corto período de tiempo de reacción, al final del cual el dietilditiocarbamato sódico habría ocupado todos los centros activos. La actividad residual medida correspondería al período de tiempo en que el inhibidor no ha ocupado todos los centros activos y una pequeña cantidad de sustrato se está transformando aún.

TABLA N.º 45 A

## INHIBICION DEL EXTRACTO DE pH 5

Actividad catecolasa en  $\mu$  1 O<sub>2</sub>/ minuto

SIN INCUBACION				CON INCUBACION			
Tampón de medida	Inhibidor	Acti-vidad	% inhi-ción	Tampón de medida	Inhi-bidor	Acti-vidad	% inhi-ción
pH 3	—	21,2	94 %	pH 3	—	21,2	
	A	1,2	—2 %		A	0,5	98 %
	B	21,6	89 %		B	25,7	—21 %
	C	2,3			C	3,5	83 %
pH 4	—	27,1					
	A	0,2	99 %				
	B	25,8	5 %				
	C	2,9	90 %				
pH 5	—	21,2		pH 5	—	21,2	
	A	1,5	93 %		A	0	100 %
	B	21,2	0 %		B	25,9	—22 %
	C	4,4	79 %		C	19,8	12 %
pH 6	—	21,2					
	A	2,5	88 %				
	B	21,5	0 %				
	C	13,4	38 %				
pH 7	—	22,5		pH 7	—	22,5	
	A	6,1	73 %		A	0,3	99 %
	B	21,5	4 %		B	22,4	0 %
	C	18,7	17 %		C	19,8	12 %

TABLA N.º 45 B

INHIBICION DEL EXTRACTO DE pH 5  
 Actividad catecolasa en  $\mu$  1 O<sub>2</sub>/ minuto

SIN INCUBACION				CON INCUBACION			
Tampón de medida	Inhibidor	Acti- vidad	% inhi- bición	Tampón de medida	Inhi- bidor	Acti- vidad	% inhi- bición
pH 3	—	14,0		pH 3	—	14	
	A	1,2	91 %		A	3,1	78 %
	B	13,7	2 %		B	23	—64 %
	C	1,5	90 %		C	2,1	85 %
pH 5	—	17,7		pH 5	—	17,7	
	A	0	100 %		A	0,6	96 %
	B	16,2	9 %		B	21,8	—22 %
	C	0,	100 %		C	3,7	79 %
pH 7	—	23,5		pH 7	—	23,5	
	A	0,9	96 %		A	0,5	98 %
	B	17,7	24 %		B	18,3	12 %
	C	18,6	20 %		C	22,6	4 %

TABLA N.º 46 A

## INHIBICION DEL EXTRACTO DE pH 7

Actividad catecolasa en  $\mu$  l O<sub>2</sub>/ minuto

SIN INCUBACION				CON INCUBACION			
Tampón de medida	Inhibidor	Acti-vidad	% inhi-bición	Tampón de medida	Inhi-bidor	Acti-vidad	% inhi-bición
pH 3	—	19,5		pH 3	—	19,5	
	A	0,8	96 %		A	1,1	96 %
	B	19,5	0 %		B	25,7	-32 %
	C	2,3	88 %		C	6,0	70 %
pH 4	—	19,5		pH 4	—	19,6	
	A	0,8	96 %		A	1,1	95 %
	B	21,6	-11 %		B	24,8	-27 %
	C	3,2	83 %		C	8,6	56 %
pH 5	—	18		pH 5	—	18,0	
	A	0,9	95 %		A	0,61	97 %
	B	18,4	2 %		B	21	-16 %
	C	4,9	73 %		C	7,2	60 %
pH 6	—	9,7	70 %	pH 6	—	9,7	
	A	3,0	2 %		A	0,61	94 %
	B	9,6	36 %		B	11,5	-18 %
	C	6,2			C	6,4	34 %
pH 7	—	7,8	70 %	pH 7	—	7,8	
	A	2,3	0 %		A	0,0	100 %
	B	7,8	35 %		B	9,1	-16 %
	C	6,1			C	6,3	19 %

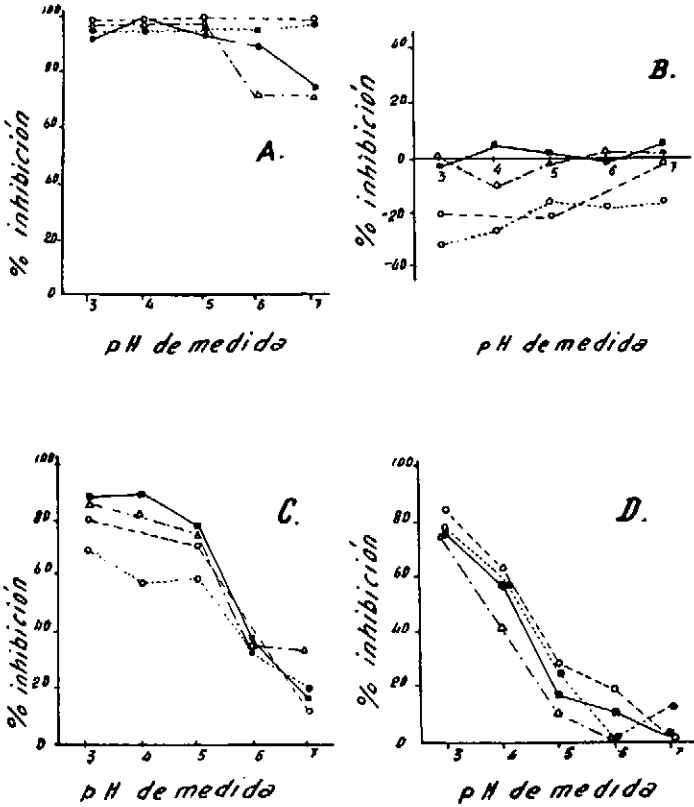
TABLA N.º 46 B

## INHIBICION DEL EXTRACTO DE pH 7

Actividad catecolasa en  $\mu$  l O<sub>2</sub>/ minuto

SIN INCUBACION				CON INCUBACION			
Tampón de medida	Inhibidor	Actividad	% inhibición	Tampón de medida	Inhibidor	Actividad	% inhibición
pH 3	—	58		pH 3	—	58	
	A	0	100 %		A	0	100 %
	B	62	—5 %		B	90	—55 %
	C	0	100 %		C	3	95 %
pH 5	—	8,7		pH 5	—	87	
	A	0	100 %		A	0,7	99 %
	B	83	5 %		B	120	—37 %
	C	12	87 %		C	19	78 %
pH 7	—	6		pH 7	—	6	
	A	0	100 %		A	0,3	95 %
	B	4	35 %		B	8,6	—40 %
	C	4	35 %		C	4,3	30 %

Grafica nº 26

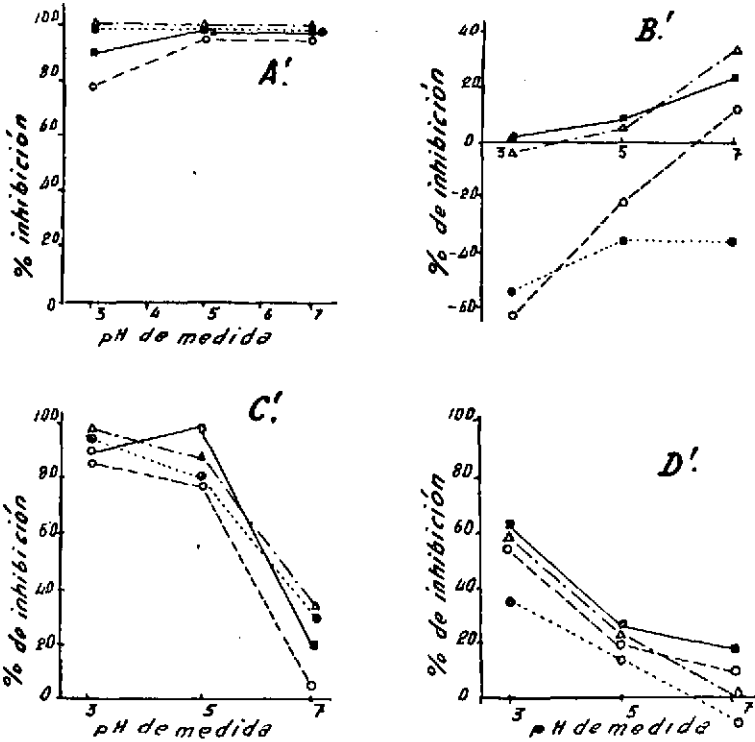


- A = Dietilditiocarbamato sódico
- B = 8-hidroxiquinoleína
- C = Azida sódica
- D = p-cloromercuribenzoato sódico
- Enzima extraído a pH 5.- Sin incubación con el inhibidor
- Enzima extraído a pH 5.- con incubación
- △ Enzima extraído a pH 7.- Sin incubación con el inhibidor
- Enzima extraído a pH 7.- con incubación

*Acción de inhibidores sobre catecolasa de albaricoque y relación con el pH.*



Grafica n= 26 B



A' = Dietilditiocarbamato sódico.

B' = 8hidroxiquinoleína

C' = Ázida sódica

D' = p-cloromeribenzoato sódico

■ — ■ Enzima extraído a pH 5. Sin incubación con el inhibidor.

○ — ○ Enzima extraído a pH 5. con incubación

▲ — ▲ Enzima extraído a pH 7. Sin incubación con el inhibidor

● — ● Enzima extraído a pH 7. Con incubación

*Acción de inhibidores sobre cresolasa de albaricoque y relación con el pH.*

Nuestros datos experimentales nos señalan que no ocurre así, pues hasta los diez minutos de comenzada la reacción de catecolasa, en presencia de catecol y de dietilditiocarbamato sódico, sigue existiendo una pequeña actividad residual.

Deseamos hacer notar que siempre que, en presencia del DDC, hemos encontrado esa pequeña actividad residual, simultáneamente va apareciendo en el medio un color amarillento que es similar al que se produce por la acción del DDC con una pequeña concentración de iones  $\text{Cu}^{+2}$  libres. En el caso de inhibición total, ese color no se presenta.

En este trabajo nos limitamos a señalar el fenómeno, pensando entrar en su estudio a fondo en una nueva fase posterior.

*B.—8-Hidroxiquinoleína.*—Esta sustancia (véase fig. 26 B), no tiene un marcado efecto inhibitor. Al contrario, en las medidas a pH bajo, de enzima incubado, muestra un claro efecto activador.

Dado que la 8-hidroxiquinoleína es capaz de complejar numerosos metales y habida cuenta de que cuando no hay incubación no se observa efecto activador, sospechamos la presencia en la disolución enzimática de alguna sustancia, posiblemente un metal, constituyente o no de la molécula del enzima, y que a pH bajo de medida tuviese un efecto inhibitor sobre catecolasa, y que la incubación con 8-hidroxiquinoleína diera lugar a la eliminación del metal y, de ahí, su efecto aparentemente activante.

Para comprobar esta hipótesis, preparamos una disolución enzimática procedente de polvo acetónico de albaricoque extraído a pH 5, tomamos tres partes alícuotas y las tratamos de modo que:

*A1* es la disolución enzimática a 0° C; *B1* es el resultado de dializar contra agua destilada a 0° C durante 4 horas; *C1* resulta de dializar 2 horas a 0° C contra 8-hidroxiquinoleína  $10^{-3}$  M y a continuación contra agua destilada el mismo tiempo y a la misma temperatura. Llamaremos *A2*, *B2* y *C2* a las fracciones *A1*, *B1* y *C1* guardadas 12 horas a 0° C para servir de testigos de las *A3*, *B3* y *C3* que son como las *A1*, *B1* y *C1* pero incubadas posteriormente 12 horas con 8-hidroxiquinoleína  $10^{-3}$  M.

Tras las oportunas correcciones de volúmenes se midieron las actividades de estas 9 fracciones a distintos pH, con los resultados expuestos en la tabla n.º 48.

Como conclusión de este resultado deducimos que:

1.º Los efectos de la diálisis contra agua o contra disolución de 8-hidroxiquinoleína son sustancialmente los mismos y análogos al efecto de incubar al enzima primitivo con 8-hidroxiquinoleína.

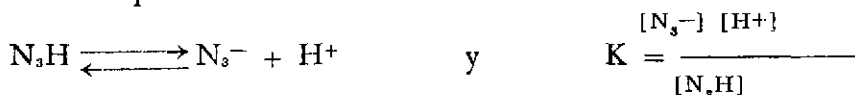
2.º La incubación que nos hace pasar de la etapa 2 a la 3 tiene efecto sobre A, pero no sobre B o C, o sea que parece existir un metal, fácilmente separable, cuyo efecto inhibitor se expresa a pH bajo, y que se



elimina con 8-hidroxiquinoleína (por incubación o diálisis) o por simple diálisis contra agua. El ión metálico en cuestión no puede caracterizarse directamente sobre el líquido dializador, por encontrarse en concentraciones mínimas. Esperamos llegar a su identificación en nuevos trabajos sobre este tema.

C.—*Azida sódica*.—Los resultados de inhibición con azida responden a una acción producida por el  $N_3H$  presente. En efecto, en la tabla n.º 49 expresamos los resultados de un ensayo de inhibición realizado a pH 5 con distintas concentraciones de azida, o lo que es lo mismo, con distintas concentraciones de  $N_3H$ , pues conocemos el pK ( $K_e = 1,8 \cdot 10^{-5}$ ) y deducimos que a pH 5 hay 36 % de  $N_3H$  respecto a la concentración total de azida.

Sabemos que:



y conocemos  $K$ ,  $H^+$  (por el pH del medio) y la suma  $[N_3^-] + [N_3H]$  que es la concentración de azida en el medio. Por tanto, en el ensayo de inhibición representado en la gráfica 26 C, es posible establecer una relación entre el tanto por ciento de inhibición y el  $N_3H$  presente a cada pH, y esta relación coincide exactamente con la que ya conocíamos experimentalmente antes (tabla n.º 43) a partir de las medidas hechas a pH 5, o sea, que en las medidas de inhibición por  $N_3Na$  realizadas a distintos pH, la inhibición depende tan sólo del  $N_3H$  presente y es independiente, respecto al comportamiento del enzima, del pH de medida.

TABLA N.º 47

## INHIBICION POR p-CLOROMERCURIBENZOATO SODICO

	Actividades en $\mu$ l. O <sub>2</sub> pH medida											
	3		4		5		6		7		8	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<b>CATECOLASA</b>												
<i>Extracto a pH 5</i>												
Normal	13,8	0%	44,5	0%	41	0%	45	0%	40,5	0%	45	0%
Sin incubación*	3,4	75%	18,7	58%	34	17%	40	11%	40,5	0%	42	8%
Con incubación	3,0	85%	16,8	62%	29	29%	36	20%	40,5	0%	42	8%
<i>Extracto a pH 7</i>												
Normal	19,9	0%	79	0%	84	0%	53,5	0%	49	0%	44,2	0%
Sin incubación*	5,5	73%	46	41%	76	10%	53	0%	50	0%	45	0%
Con incubación	4,6	77%	33,5	57%	61	27%	53	0%	42	14%	36,8	17%
<b>CRESOLASA</b>												
<i>Extracto a pH 5</i>												
Normal	14,0	0%			17,7	0%			23,5	0%		
Sin incubación*	4,9	65%			12,8	27%			18,9	19%		
Con incubación	6,1	56%			14	21%			21,4	10%		
<i>Extracto a pH 7</i>												
Normal	58	0%			87	0%			6	0%		
Sin incubación*	24	58%			64	25%			6	0%		
Con incubación	36	37%			75	14%			6	0%		

A = Actividad en  $\mu$  l. O<sub>2</sub>

B = Tanto por ciento de inhibición.

Sin incubación\* = El inhibidor se añade en el momento de realizar la medida.

TABLA N.º 48

EFFECTO DE LA DIALISIS CONTRA AGUA O DE LA ACCION DE LA  
8 OXIQUINOLEINA SOBRE LA ACTIVIDAD CATECOLASA MEDIDA  
a pH BAJOS

Enzima	Actividades en $\mu$ l O <sub>2</sub>				
	3	4	5	6	7
A 1	24	41	44	45	45
B 1	36	46	44	43	43
C 1	38	45	45	46	46
A 2	20	32	36	37	40
B 2	30	35	35	37	38
C 2	31	37	37	37	37
A 3	33	35	34	33	36
B 3	30	35	34	35	35
C 3	30	36	35	36	36

TABLA N.º 49

INHIBICION DE CATECOLASA POR AZIDA SODICA

Medidas de actividad efectuadas a pH 5.—Siempre N<sub>3</sub>H será el 36 % de la azida

Azda en el medio	N <sub>3</sub> H en el medio	% de inhibición
4.10 <sup>-6</sup> M	1,4.10 <sup>-6</sup> M	9
8.10 <sup>-6</sup> M	2,8.10 <sup>-6</sup> M	20
4.10 <sup>-5</sup> M	1,4.10 <sup>-5</sup> M	52
8.10 <sup>-5</sup> M	2,8.10 <sup>-5</sup> M	64
4.10 <sup>-4</sup> M	1,4.10 <sup>-4</sup> M	80
8.10 <sup>-3</sup> M	2,8.10 <sup>-3</sup> M	90

D.—*p*-cloromercuribenzoato sódico.—En la tabla n.º 47 y en la gráfica 26 D se han expresado los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición efectuados con esta sustancia. Aparte de las pequeñas discrepancias observadas con el enzima preincubado extraído a pH 7, en general, la inhibición a pH bajo es mucho mayor que a pH alto, por lo cual sospechamos que tal efecto inhibitorio no es debido a una acción sobre los grupos tiol del enzima, sino, y después volveremos sobre ello, al efecto del grupo carboxilo libre.

Para confirmarlo basta observar en la tabla 50 que con ácido benzoico la inhibición responde a las mismas variaciones frente al pH que en el caso del *p*-cloromercuribenzoato sódico y así, a pH 4 es del orden del 90 % y a pH 7 es bastante menor.

Como resumen de los ensayos efectuados con este primer grupo de inhibidores, hemos de hacer notar que, en líneas generales, la inhibición responde a unas mismas características en catecolasa y en cresolasa; en enzima extraído a pH 5 y en el extraído a pH 7.

TABLA N.º 50

VARIACION DE LA INHIBICION PROVOCADA POR EL ACIDO BENZOICO AL VARIAR EL pH DE ACTUACION

Actividad catecolasa en  $\mu$ 1 O<sub>2</sub>

	Medida a pH 4		Medida a pH 7	
	Actividad	Inhibición	Actividad	Inhibición
Extracto de pH 5	16,8	—	22	—
Extracto con ác. benzoico	1,5	91%	12,2	46%
Extracto de pH 7	54,8	—	49	—
d con ácido benzoico	1,5	97%	32	35%

En todas las condiciones las concentraciones de ácido benzoico en los medios de reacción fueron las mismas.

#### GRUPO SEGUNDO DE INHIBIDORES

Como pensamos en su interés práctico, la inhibición de las sustancias de este grupo se relaciona tan sólo con catecolasa, pues anteriormente hemos señalado que la inhibición o desnaturalización de cresolasa no ofrece graves problemas en la Industria Conservera.

*Azúcares.*—Estudiamos glucosa, sacarosa y fructosa en concentraciones en el medio de reacción que variaron desde un 5 % hasta un 30 %. En las medidas de catecolasa los resultados indican que no existe inhibición a concentraciones bajas y tan sólo existe un ligero efecto de hasta un 15 % de inhibición en concentraciones muy altas de azúcares, los cuales provocan una gran viscosidad y dificultan el acceso de oxígeno.

*Iones.*—Ensayamos, con concentraciones variables, las siguientes sustancias: cloruro sódico, cloruro potásico, fluoruro sódico, nitrato potásico, fosfato magnésico, acetato sódico. No tuvieron efecto inhibitor el fosfato magnésico ni el nitrato potásico, pero sí las otras cuatro sustancias, cuya actuación resumimos en la tabla n.º 51, aunque para que se hagan patentes los efectos inhibitorios del acetato sódico las concentraciones necesarias son demasiado altas. Debido a la similitud de resultados con cloruro sódico y cloruro potásico, y puesto que el nitrato potásico no es inhibitor, deducimos que los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  no afectan al enzima y que el efecto inhibitor es debido al ión halógeno, siendo bastante más acentuada la acción del ión fluor que la del cloro.

TABLA N.º 51

## INHIBICION DE CATECOLASA POR ALGUNOS IONES

CLORURO SODICO		CLORURO POTASICO	
Concentración	Inhibición	Concentración	Inhibición
$10^{-3}$ M	2 %	$10^{-3}$ M	10 %
$5.10^{-3}$ M	25 %	$5.10^{-3}$ M	19 %
$10^{-2}$ M	30 %	$10^{-2}$ M	29 %
$5.10^{-2}$ M	72 %	$5.10^{-2}$ M	68 %
$10^{-1}$ M	80 %	$10^{-1}$ M	80 %
$5.10^{-1}$ M	93 %	$5.10^{-1}$ M	90 %
1 M	100 %	1 M	100 %

FLUORURO SODICO		ACETATO SODICO	
Concentración	Inhibición	Concentración	Inhibición
$1.10^{-4}$ M	2 %	$6.10^{-1}$ M	1 %
$2.10^{-4}$ M	4 %	1.2 M	19 %
$1.10^{-3}$ M	33 %	2.4 M	40 %
$2.10^{-3}$ M	53 %		
$4.10^{-3}$ M	77 %		
$1.10^{-2}$ M	91 %		
$2.10^{-2}$ M	95 %		
$4.10^{-2}$ M	97 %		
$1.10^{-1}$ M	98 %		

*Agentes conservantes.*—Se ensayaron los efectos de las siguientes sustancias: ácido benzoico, ácido salicílico, ácido sórbico, nisina, lactato de tilosina, p-hidroxibenzoato de etilo, p-hidroxibenzoato de propilo, y bromoacetato de etilo.

Las tres primeras, resultaron tener una fuerte acción inhibitoria sobre la actividad catecolasa, mientras que las otras no la alteraban, lo cual nos hizo pensar que el efecto inhibitorio no se puede confundir con el efecto antiferméntico, sino que las sustancias que actúan como inhibidores lo hacen por alguna propiedad estructural. Como esos inhibidores tienen un grupo carboxilo libre conjugado con un sistema resonante bastante intenso, intentamos conocer si el efecto inhibitorio era propio de esta estructura, tal como se expone a continuación:

*Inhibición y estructura.*—Acudimos a un buen número de sustancias con estructuras carboxilo conjugadas con sistemas resonantes u otras estructuras relacionadas con ésta. Realizamos las medidas de catecolasa en presencia de una concentración de inhibidor de  $6,25 \cdot 10^{-3}$  M y los resultados finales se resumen en el cuadro n.º 52 en el que escribimos la fórmula estructural, el nombre y el número que indica el porcentaje que ha inhibido de actividad catecolasa. De los hechos expuestos en este cuadro se deduce que:

1.º En principio, el carboxilo conjugado con un sistema resonante intenso, tiene capacidad inhibitoria. Así, el ácido cinámico es el mejor inhibidor, mientras el ácido fenilacético no inhibe en absoluto.

2.º La inhibición es específica del  $-\text{COOH}$  libre; por esterificación desaparece la acción inhibitoria.

3.º El sistema resonante ha de estar constituido por lo menos por dos dobles enlaces (ácido sórbico); con un solo doble enlace (ácido crotonico) no es suficiente.

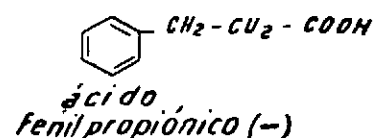
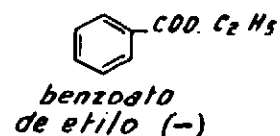
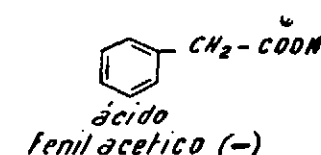
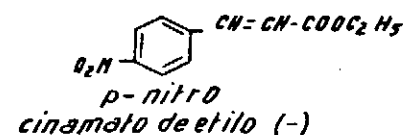
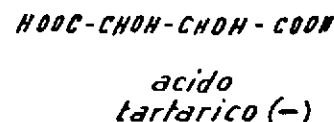
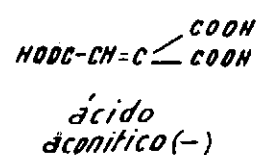
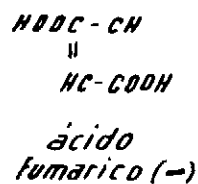
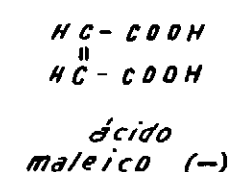
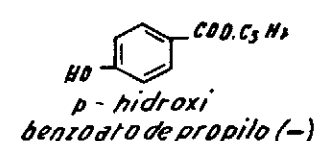
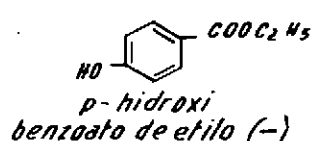
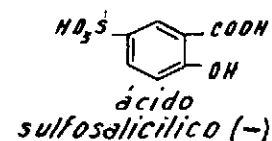
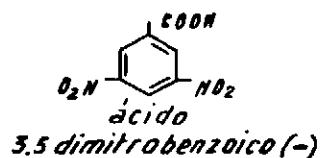
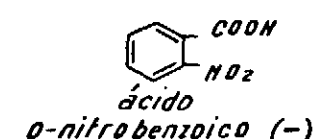
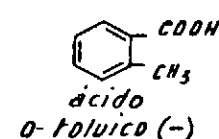
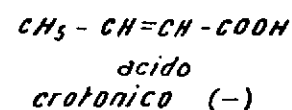
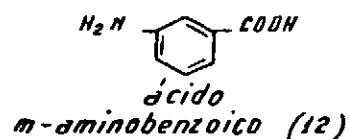
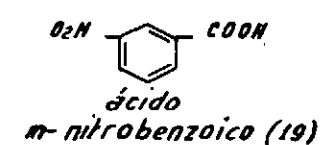
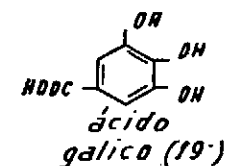
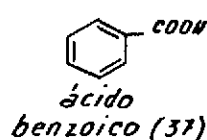
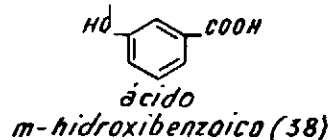
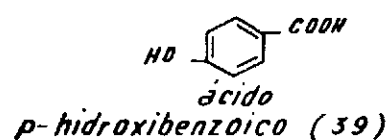
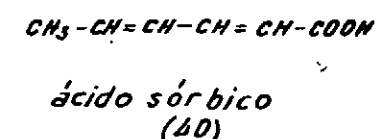
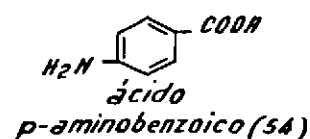
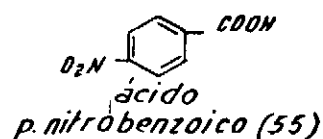
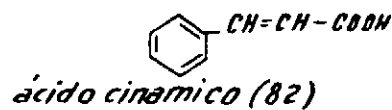
4.º La acción inhibitoria parece estar sometida a impedimento estérico notable, pues cuando el  $-\text{COOH}$  está más alejado del núcleo benzenico inhibe mejor (ácido cinámico y ácido benzoico). Además, los grupos en *orto* distintos del  $-\text{OH}$ , hacen desaparecer el efecto inhibitorio (ortonitrobenzoico y ácido ortotoluico, a pesar del poco volumen del grupo  $-\text{CH}_3$ ). Los grupos en *meta* distintos del  $-\text{OH}$  disminuyen (ácido m-nitrobenzoico, ácido m-aminobenzoico) o anulan (3,5 dinitro benzoico, ácido 3,5 dinitro salicílico y ácido sulfosalicílico) la acción inhibitoria. En cambio los sustituyentes en *para* no disminuyen e, incluso, aumentan la inhibición.

5.º Respecto del grupo  $-\text{OH}$ , consideremos las siguientes observaciones:

- a) Los tres ácidos hidroxibenzoicos tienen aproximadamente la misma capacidad inhibitoria.
- b) El ácido gálico es un inhibidor moderado y un mal sustrato.
- c) El pirogalol es peor sustrato que el catecol.
- d) El ácido cinámico es el más potente inhibidor mientras que el 3,4 dihidroxicinámico (ácido cafeico) es de los mejores sustratos.
- e) La capacidad para actuar como sustrato parece responder claramente a que los sustituyentes sean de 1.<sup>a</sup> o 2.<sup>a</sup> clase y en menor cuantía a las dificultades estéricas, mientras que la capacidad para inhibir parece independiente de la naturaleza del sustituyente (excepto para el -OH) y está muy relacionada con su volumen y proximidad.

De todo ello parece lógico pensar que el centro donde acude el -COOH inhibitor es distinto del centro activo de la acción catecolasa; ambos tienen distinta configuración estérica, pero deben estar situados lo suficientemente próximos para que una vez colocado el inhibidor en el centro de inhibición, dificulte el acceso de sustrato al centro activo, pero si el inhibidor tiene grupos -OH oxidables (caso del ácido cafeico) puede orientar dichos grupos al centro activo mientras el carboxilo está en el centro de inhibición, por lo que, en conjunto se favorece la formación del complejo enzima-sustrato y por tanto la acción catecolasa.

En la tabla n.º 53 exponemos inhibiciones frente a concentraciones de benzoato sódico, ácido salicílico y ácido sórbico. Pues estos datos, así como los que ya conocemos sobre acción de iones, sobre todo cloruro, tienen interés práctico por su aplicabilidad en el proceso de industrialización de los frutos tratados en este complejo.



ESTRUCTURAS DE INHIBIDORES

E INHIBICION

TABLA Nº 52







TABLA N.º 53

ACCION INHIBIDORA DE ALGUNOS ANTIFERMENTOS  
SOBRE CATECOLASA

BENZOATO SODICO		ACIDO SORBICO	
<i>Concentración</i>	<i>Inhibición</i>	<i>Concentración</i>	<i>Inhibición</i>
4.10 <sup>-4</sup> M	6 %	4.10 <sup>-4</sup> M	0 %
1.10 <sup>-3</sup> M	20 %	1.10 <sup>-3</sup> M	8 %
2.10 <sup>-3</sup> M	34 %	2.10 <sup>-3</sup> M	18 %
4.10 <sup>-3</sup> M	50 %	6,25.10 <sup>-3</sup> M	45 %
1.10 <sup>-2</sup> M	70 %		

## ACIDO SALICILICO

<i>Concentración</i>	<i>Inhibición</i>
1.10 <sup>-4</sup> M	0 %
2.10 <sup>-4</sup> M	0 %
4.10 <sup>-4</sup> M	4 %
1.10 <sup>-3</sup> M	8 %
2.10 <sup>-3</sup> M	17 %
4.10 <sup>-3</sup> M	35 %
1.10 <sup>-2</sup> M	66 %

## VIII

## RESPIRACION Y PAPEL BIOQUIMICO DE FENOLASA

En los estudios que hemos realizado sobre respiración, hemos encontrado grandes dificultades, que posiblemente han ocasionado que en las dos campañas investigadas, los resultados obtenidos no hayan correspondido a las esperanzas que teníamos previamente al respecto. En efecto, la temporada de maduración de albaricoque es muy corta y el trabajo en aparato Warburg sobre respiración requiere una cierta lentitud, por lo cual al obtener resultados interesantes en algunas experiencias no se puede insistir sobre el tema, pues el material biológico de partida ya no presenta las mismas características que poseía unos días antes.

Nuestros ensayos los hemos efectuado con «slices» de albaricoque en un medio tampón de volumen adecuado, midiendo el consumo de oxígeno y el desprendimiento de dióxido de carbono en cada caso.

Intentamos abordar los problemas de la variación del cociente respiratorio a lo largo de la maduración, la influencia del lavado de los «slices», la respiración de algunos azúcares y ácidos orgánicos, la inhibición del proceso respiratorio por dietilditiocarbamato sódico, y sobre todo el posible papel desempeñado por los fenoles y la fenolasa en la respiración.

Debido a las dificultades enunciadas al principio, los resultados en general no han sido lo suficientemente concluyentes para obtener interpretaciones claras sobre esos fenómenos.

En la bibliografía se encuentran datos sobre tirosinasa de patata y otros enzimas de este tipo, de los que se deducen que la adición a los «slices» de extractos fenólicos naturales procedentes del propio material biológico incrementan tanto el consumo de oxígeno como la producción de dióxido de carbono, y este estímulo continúa durante largos períodos de tiempo. Nosotros hemos trabajado con este tipo de experiencias y en-

contramos que con «slices» de albaricoque muy verdes y con un extracto fenólico procedente de una extracción alcohólica (en volumen 80 % de alcohol y 20 % de agua) de albaricoques verdes y en efecto, encontramos ese tipo de estímulo, tal como se refleja en la tabla n.º 54 y en la gráfica n.º 27.

Un examen riguroso del proceso nos indica que resultados como los anteriores no se pueden interpretar directamente como una demostración de que los fenoles naturales incrementa la respiración. En primer lugar, si tomamos los datos correspondientes al período de tiempo situado entre los 60 minutos y los 180 minutos, observamos que realmente no hay incremento en el oxígeno y sólo existe el del dióxido de carbono. El consumo inicialmente alto de oxígeno durante los primeros 60 minutos se puede achacar a la acción del sistema fenolasa de albaricoque al actuar sobre sus propios sustratos naturales que añadimos en la preparación fenólica. Respecto al dióxido de carbono, hemos de señalar que los extractos fenólicos naturales con los cuales se trabaja habitualmente, semejantes a nuestro propio extracto, llevan también una gran cantidad de los ácidos naturales del tejido, por lo cual la gran producción de CO<sub>2</sub> podría explicarse en términos de incremento del proceso metabólico de transformación de esos ácidos.

Nuestras medidas de la inhibición respiratoria provocada por la incubación de los «slices» con dietilditiocarbamato sódico 10<sup>-3</sup> M y otros ensayos efectuados, nos indican que existe alguna etapa en la que interviene el cobre, pero ello no es demostrativo de que tal etapa sea precisamente la de la actuación de fenolasa sobre sus sustratos.

Por otra parte, seguimos la tónica de otros trabajos publicados recientemente, citados en los Antecedentes, y comprobamos que efectivamente, la adición de catecol, p-cresol, ácido clorogénico, ácido cafeico, hidrato de (+) catequina a los «slices» provocan un aumento inmediato grandísimo (a veces llega hasta 300 %) del consumo de oxígeno y un incremento más moderado en el dióxido de carbono producido. Pero tampoco creemos que, en este caso, sea estrictamente correcto el deducir que hay incremento en la respiración, pues estas sustancias son sustratos de la fenolasa del fruto, lo cual explicaría el gran consumo de oxígeno. Por otra parte, en otros ensayos hemos comprobado que durante la acción fenolasa se produce CO<sub>2</sub> en una proporción aproximada del 24 al 25 % respecto al oxígeno consumido, por lo cual podríamos señalar esta acción fenolasa como causa de los resultados obtenidos.

TABLA N.º 54

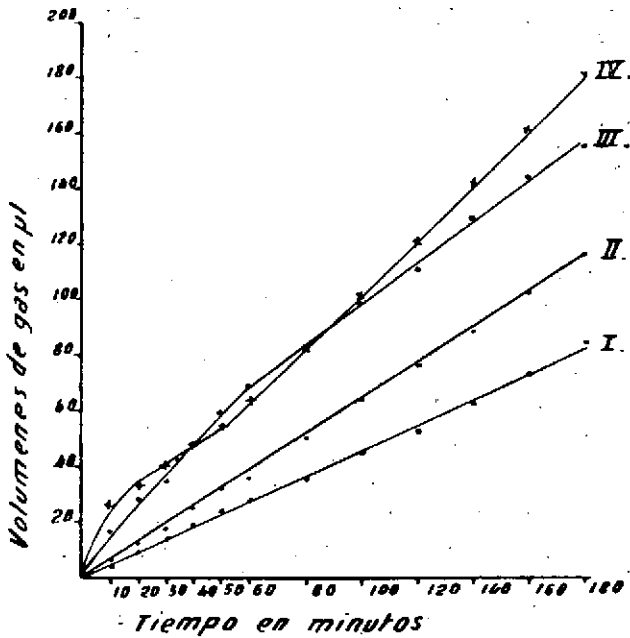
INFLUENCIA DE LA ADICION DE FENOLES NATURALES SOBRE LA  
RESPIRACION DE «SLICES» DE ALBARICOQUES VERDES

Valores en  $\mu\text{l} \cdot \text{O}_2$  ó  $\text{CO}_2$

Tiempo de medida	«Slices» normales		«Slices» con fenoles	
	$\text{O}_2$	$\text{CO}_2$	$\text{O}_2$	$\text{CO}_2$
10'	7	6	17	27
20'	13	12	28	34
30'	18	16	35	40
40'	26	20	48	49
50'	32	25	59	57
60'	36	28	69	65
80'	50	36	83	83
100'	64	45	98	101
120'	76	53	112	119
140'	89	63	129	142
160'	103	73	143	161
180'	117	84	157	181

Medidas realizadas en aparato Warbur, a 27°C y 120 oscilaciones/minuto.  
Los blancos con fenoles solos, son inapreciables.

Gráfica nº 27.



- I. Producción de CO<sub>2</sub> en "slices" normales*
- II. Absorción de O<sub>2</sub> en "slices" normales*
- III. Absorción de O<sub>2</sub> en "slices" con fenoles*
- IV. Producción de CO<sub>2</sub> en "slices" con fenoles*

*Influencia de la adición de fenoles naturales sobre la respiración de "slices" de albaricoques verdes.*

Lo que sí parece cierto es que el producto de oxidación del catecol inhibe la respiración, lo cual se comprueba cuando lo adicionamos en pequeña cantidad al medio de la respiración, pues, en otro caso (concentración alta), el efecto de catecolasa enmascararía la inhibición de respiración. Esta inhibición se comprueba en experiencias como la representada en la tabla n.º 55 y en la gráfica n.º 28 donde la adición de ácido ascórbico hace desaparecer ese efecto inhibitor, que es claro comparando los valores entre los 120' y los 180', ya que al principio actúa el sistema catecolasa sobre el catecol añadido.

El papel biológico del sistema fenolasa ha sido muy estudiado, desde que se descubrió la existencia de este enzima. Desgraciadamente, aunque el problema se ha abordado durante estos 30 años desde diferentes ángulos, sólo se han obtenido resultados muy parciales que, interpretados a la ligera, a veces han conducido a teorías en extremo opuestas. En general, se discute sobre si la acción fenolasa corresponde a una oxidasa terminal en una vía respiratoria, pero faltan los argumentos claros que tengan su base en experiencias definitivas y que ocasionan el que se tome partido por alguna de las teorías existentes. En realidad, el problema consiste en encontrar las técnicas precisas para poder abordar la cuestión adecuadamente. Por otra parte, es muy posible que el organismo cuente con diversos caminos respiratorios que se puedan utilizar dependiendo de las condiciones a que se encuentre sometido, de tal forma que cuando de una manera u otra se introducen en el sistema sustancias o agentes exógenos, a fin de estudiar el citado sistema, éste se puede modificar y la información que nos proporciona no correspondería a su actuación normal.

Con estas experiencias y consideraciones no creemos agotado el tema, ya que, por el contrario, se abren nuevas perspectivas que permitirán tratarlo con mayor profundidad.

TABLA N.º 55

INHIBICION DE LA RESPIRACION, POR EL PRODUCTO DE LA  
OXIDACION ENZIMATICA DEL CATECOL, EN «SLICES»  
DE ALBARICOQUE»

Valores en  $\mu$ l

Tiempo de medida	A		B		C	
	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
10'	7	6	17	5	19	11
20'	16	14	32	14	35	18
30'	25	20	44	20	50	24
40'	34	26	56	29	64	31
50'	40	30	65	34	78	37
60'	48	37	73	40	94	44
80'	65	48	89	51	120	59
100'	78	57	100	60	150	73
120'	94	68	111	69	185	86
140'	112	81	123	77	216	99
160'	128	92	134	85	246	112
180'	136	98	137	87	262	121

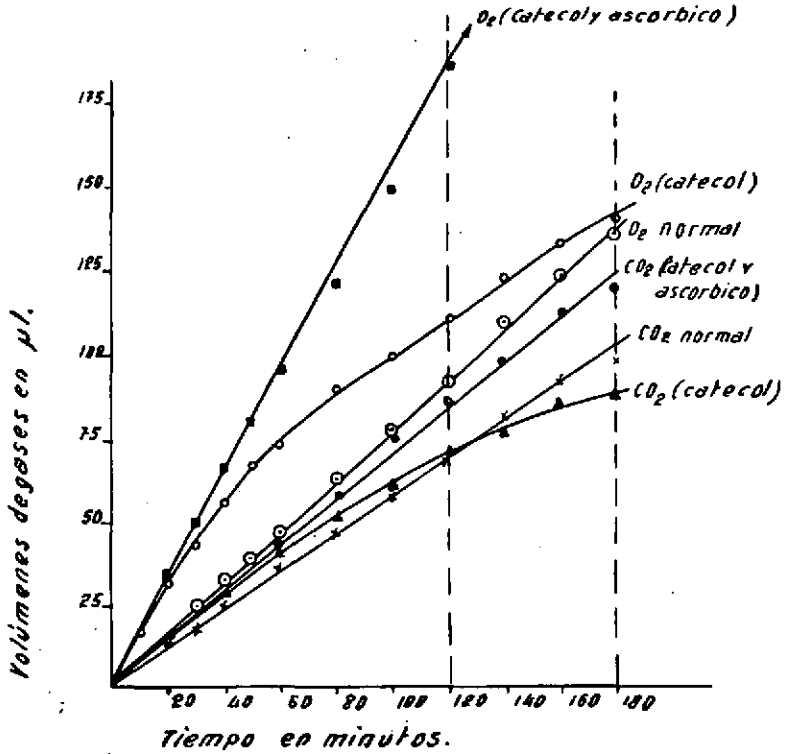
A = «Slices» normales.

B = «Slices» con la adición de 1,5  $\mu$ M de catecol.C = B con 30  $\mu$ M de ácido ascórbico. A los valores se les ha deducido los correspondientes a la autooxidación del ascórbico.

Medidas realizadas en aparato Warburg a 27°C y 120 oscilaciones por minuto.



Gráfica nº 28



*Inhibición de la respiración por el producto de la oxidación enzimática del catecol en "slices" de albaricoque*

## IX

### INACTIVACION POR CALOR DEL COMPLEJO FENOLASA EN FRUTOS

Al estudiar las propiedades del sistema fenolasa de albaricoque, comprobamos el comportamiento de catecolasa frente al calor, para lo cual medimos su inactivación en relación con diversas temperaturas y otros factores.

Desde el punto de vista práctico, interesa conocer si el comportamiento del enzima en mitades de fruto (proceso industrial ordinario) responde a las mismas características que el enzima en disolución al someterlo a tratamiento térmico en orden a su inactivación.

Para enfocar este problema tecnológico realizamos una serie de ensayos con frutos procedentes de una gran partida homogénea, de las que se obtienen normalmente en las fábricas de conservas tras el proceso de clasificación.

En distintos recipientes con agua mantuvimos temperaturas de 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 y 100° C respectivamente y pusimos grupos de 6 mitades de frutos durante dos y cinco minutos en ese medio. Tras esta operación y el enfriamiento rápido posterior, de cada uno de estos grupos de frutos tomamos muestras de cinco gramos, de modo que incluyesen todos los frutos y todas las zonas de una manera representativa, y, a continuación, extrajamos del modo usual la catecolasa residual y medimos su actividad normalmente.

Los resultados, comparados con la actividad de una muestra igual, pero sin tratamiento térmico, se expresan en la tabla n.º 56 y en la gráfica n.º 29.

TABLA N.º 56

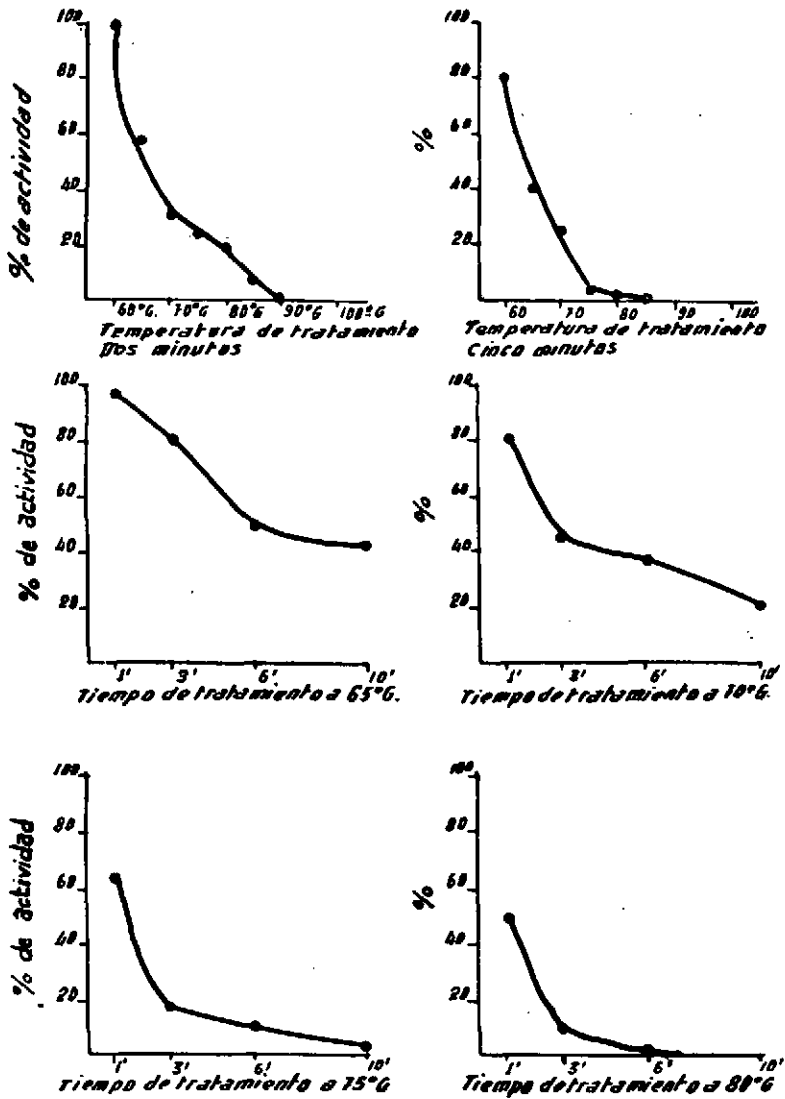
## INACTIVACION TERMICA DE CATECOLASA EN FRUTOS ENTEROS

Temperatura	Dos minutos % actividad inicial	Cinco minutos % actividad inicial
60°	99	80
65°	56	40
70°	29	25
75°	25	3
80°	18	2
85°	6	0
90°	—	—
100°	—	—

TABLA N.º 57

Temperatura	1' % actividad	3' % actividad	6' % actividad	10' % actividad
65°	97	80	50	53
70°	80	43	38	20
75°	63	18	10	3
80°	50	10	1	—

### Gráficas nºs 29 y 30



*Inactivación térmica de catecolasa en frutos enteros.*



Queda comprobado que en cinco minutos de tratamiento hacen falta temperaturas muy altas para tener la seguridad de una inhibición total y, como en el proceso de esterilización usual en fábricas no siempre se consiguen estas altas temperaturas en el centro del bote, realizamos una nueva serie de ensayos con temperaturas de 65, 70, 75 y 80° C, variando los tiempos de tratamiento de 0 a 10 minutos, con los resultados que se observan en la tabla n.º 57 y en la gráfica n.º 29.

De la serie de ensayos precedentes deducimos:

1.º Existe una gran similitud entre el comportamiento del enzima en el fruto y en disolución.

2.º Nuestra experiencia con elaborados realizados en fábricas nos indican que algunos de ellos se pardean tras cierto tiempo de permanecer abierto el bote, debido a una actividad catecolasa residual, cuya cuantía hemos medido en repetidas ocasiones y ha resultado ser muy baja, de tal modo que actividades residuales como las que quedan en el tratamiento a 75° C durante 10 minutos (gráfica 30) son suficientes para producir pardeos posteriores. Por ello, y a la vista de los datos anteriormente expuestos, en el proceso de esterilización, para tener un mínimo de seguridad se debe mantener una temperatura de 80° C en el punto más frío del bote al menos durante 8 minutos y si se quiere reducir este tiempo para evitar problemas de blandeo, hacen falta temperaturas superiores a los 80° C en el centro del bote.

## CONCLUSIONES

*Primera.*—En las medidas de actividades catecolasa y cresolasa se pueden usar métodos volumétricos, teniendo en cuenta cada uno de los factores que hemos estudiado.

*Segunda.*—La crítica de los procedimientos usuales en la determinación de cresolasa, nos demuestra que ninguno de ellos da una medida real de tal actividad. El método utilizado por nosotros tiene valor con fines comparativos.

*Tercera.*—Como ya se sabía, el enzima catecolasa se inactiva durante su actuación y nosotros hemos concluido que tal inactivación no se debe a los productos de oxidación enzimática del catecol. La citada inactivación responde a una cinética de primer orden.

*Cuarta.*—El período de inducción de la actividad catecolasa se evita en todos los casos por la adición de trazas de catecol, pero no siempre por la presencia de ácido ascórbico, por lo que sus respectivas formas de actuación deben diferir en algo.

*Quinta.*—Aunque generalmente es considerado el sistema oxidasa soluble en agua, en nuestros ensayos de extracción deducimos que algo de él está en forma particulada.

*Sexta.*—El comportamiento de catecolasa y cresolasa de albaricoque y melocotón frente al pH de medida depende del pH del tampón extractor y el fenómeno tiene las mismas características en ambos frutos, mientras que el comportamiento de fenolasa de alcachofa es independiente del pH d extracción. De los ensayos realizados, se deduce que dicha diferencia de propiedades debe tener su origen en alguna modificación estructural de la proteína. Existen dos formas bien definidas del enzima, de las cuales, una tiende a convertirse irreversiblemente en la otra.

*Séptima.*—El enzima catecolasa es bastante estable térmicamente en un rango amplio de pH. Así a 40° C, pH 5, al cabo de 24 horas conserva el 24 % de la actividad inicial. En cambio, la actividad cresolasa muestra una gran labilidad en la totalidad de sus comportamientos.

*Octava.*—La inactivación térmica del complejo fenolasa de albaricoque en disolución o en medios frutos, es del mismo tipo y demuestra, que para tener un mínimo de seguridad en tal inactivación, es necesario mantener una temperatura de 80°C durante 10 minutos o de 85°C durante 5 minutos.

El complejo fenolasa de alcachofa es más lábil frente a temperaturas altas y pH bajos.

*Novena.*—De los ensayos efectuados con el complejo fenolasa de albaricoque sobre diversas sustancias fenólicas, deducimos que no se trata de una tirosinasa pues no hidroxila la tirosina. La acción cresolasa del complejo precisa sustratos con requerimientos estéricos y electrónicos determinados.

La capacidad para actuar como sustrato de catecolasa, se favorece por la existencia de grupos de 1.ª clase en posición no contigua a los dos -OH y se dificulta por los grupos de 2.ª clase. Con sustituyentes de estructura compleja (fenoles naturales) los efectos son más difíciles de interpretar.

Los valores de lo que llamamos eficacia,  $V/2Km$  son mucho mayores para los sustratos naturales que para los no naturales. Hacemos excepción del 4-metilcatecol, que no tenemos referencia de su existencia en frutos, pero cuya eficacia es muy grande.

*Décima.*—En general los fenómenos de inhibición de catecolasa son semejantes para cresolasa. En medidas a pH altos, el dietilditiocarbamato sódico sólo inhibe totalmente cuando se preincuba el enzima con el inhibidor. La inhibición por azida a distintos valores de pH demuestra que el inhibidor es el  $N_3H$ . La 8-hidroxiquinoleína no actúa como inhibidor, pero elimina alguna sustancia (probablemente un metal) inhibidora a pH bajos, de forma que el efecto resultante es una activación en medidas a pH bajos.

La acción inhibidora del para-cloromercuribenzoato sódico a pH bajos se debe al efecto del grupo ácido conjugado con el sistema resonante del núcleo.

*Undécima.*—Los aniones fluoruro y cloruro muestran gran efecto inhibidor, más el primero que el segundo.

Lo estructura carboxilo libre conjugado con un sistema resonante de más de dos dobles enlaces ha mostrado una gran actividad inhibidora, con un centro de acción que parece ser distinto al centro activo de catecolasa, pero bastante próximo a él, de tal modo que una vez formado el complejo enzima-inhibidor, le resulte muy difícil al sustrato llegar hasta el centro activo catecolasa. Esta inhibición se dificulta claramente por efectos estéricos.

*Duodécima.*—Los estímulos en el consumo de oxígeno y en la producción de dióxido de carbono ocasionados por la adición de sustancias fenólicas, naturales o no, a «slices» de tejidos no se puede asegurar que sean respiratorios. Los productos de oxidación de fenoles, tales como los obtenidos por la acción de catecolasa sobre catecol, inhiben el proceso respiratorio normal.

*Décimotercera.*—De todos los datos obtenidos, especialmente los referentes a estabilidad, inhibición, comportamiento frente al pH y propiedades generales de cresolasa, llegamos a la conclusión de que esta actividad es de tipo enzimático, corroborando las afirmaciones de la escuela de Columbia y en contra de la hipótesis de Kertesz y Zito.



1. *El mundo de los animales*

2. *El mundo de las plantas*

3. *El mundo de los hongos*

4. *El mundo de los insectos*

5. *El mundo de los vertebrados*

6. *El mundo de los invertebrados*

7. *El mundo de los microorganismos*

8. *El mundo de los seres vivos*

9. *El mundo de los ecosistemas*

10. *El mundo de la biodiversidad*



## BIBLIOGRAFIA

- 1.—G. Bertrand, C. R., Acad. Sci., París, 118, 1215 (1894).
- 2.—E. Bourquelet y G. Bertrand, C. R., Soc. Biol., París, 47, 582 (1895).
- 3.—G. Fahraeus y H. Ljunggren, Biochim. Biophysica Acta, 46, 22 (1961) y 54, 192 (1961).
- 4.—Report of the Commissions on Enzymos of the International Union of Biochemistry, Pergamon Press, 1961.
- 5.—Kubewitz, F., Biochem Z. 299, 32 (1937).
- 6.—«Oxygenases». Phenolase por Denis Kerstes y Romano Zito, pág. 37. Editado por Osamu Hayaishi. Academic Press, 1962.
- 7.—Nelson, J. M., y Dawson, C. R., Adv. in Enzymol. 4, 99 (1944).  
Mallette, M. F., en «Cooper Metabolism», pág. 48. Editado por Johns Hopkins Press, Baltimore, 1950.  
Dawson, C. R. y Tarpley, W. B. en «The Enzymes». Vol. II, págs. 454-498. Academic Press, New York, 1951.
- 8.—Mason, H. S. Adv. in Enzymol. 16, 105 (1955).
- 9.—Mason, H. S. Nature, 177, 79 (1956).
- 10.—Mason, H. S. Adv. in Enzymol. 19, 79 (1957).
- 11.—Mason, H. S. Adv. in Enzymol. 16, 131 (1955).
- 12.—Bonner, J. D., Ann. Rev. Plant. Physiol., 8, 427 (1957).
- 13.—J. G. Boswell en «Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds», Editado por J. B. Pridham. Pergamon Press, 1963. Londres.
- 14.—Bonner, J. D., Ann. Rev. Plant Physiol., 8, 440 (1957).
- 15.—Critchlow, A., Haworth, R. D., y Panson, P. L., J. Chem. Soc., 1951, 1318.
- 16.—Barltrop, J. S., y Nicholson, J. S., J. Chem. Soc., 1948, 116.
- 17.—Moewns, F., Biol. Bull., 107, 293 (1954).
- 18.—Freudenberg, K. y Heel, W., Ber., 86, 190 (1953).
- 19.—H. Cole, Nature, Lond. 181, 1596 (1958).
- 20.—A. H Williams en «Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds», pág 87. Editada por J. B. Pridham. Pergamon Press, 1963. Londres.
- 21.—A. M. El Tabey y W. V. Cruess. Plant Physiol. 24, 307 (1949).
- 22.—Colowick-Kaplan en «Methods in Enzymology». Vol. II, págs. 764 y 817. Academic Press, 1955.  
etc., etc.
- 23.—D. M. Mikhin y Z. S. Bronovitskaya. Biokhimiya, 14, 379-81 (1949).
- 24.—W. Scharf y Charles R. Dawson, J. Amer. Chem. Soc. 80, 4627-31 (1958).  
Lloyd L. Ingraham. J. Am. Chem. Soc. 78, 5095-7 (1956).  
Parakutty Barnah y T. S. Swain, Biochem. J. 55, 392-9 (1953).  
P. Kovacs, Naturwissenschaften, 49, 395 (1962).  
L. P. Kendal, Biochem. J., 44, 442-54 (1949).
- 25.—Lloyd L. Ingraham y otros. J. amer. Chem. Soc., 74, 2623-6 (1952).  
Lloyd L. Ingraham y otros. J. Amer. Chem. Soc., 77, 2875-6 (1955).  
Isaac Asimov y Charles R. Dawson., J. Amer. Chem. Soc., 72, 820-8 (1950).
- 26.—Charles R. Dawson y Richard J. Magee en «Methods in Enzymology», vol. II, pág. 817, editado por Colowick y Kaplan, Academic Press, Nueva York, 1955.
- 27.—B. Chance y A. C. Maehly en «Methods in Enzymology», vol. II, pág. 764.
- 28.—Ennis Layne en «Methods in Enzymology», vol. III, pág. 447.
- 29.—J. Lavollay y otros en «Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds», editada por J. B. Pridham, 1963. Pergamon Press.



