

Clorofilasa en hojas de citrus. I. Extracción, medida y factores que influyen en la actividad del enzima

POR

S. NAVARRO, A. L. GARCIA y L. GALINDO

ABSTRACT

Different ways of preparation of the material containing the enzyme and for determination of chlorophyllase activity in homogeneous and heterogeneous media, in Citrus Limon (Verna variety) are studied.

The way to prepare the enzymatic material is that of «acetonetic powder» and in order to determine its activity an homogeneous medium has been used, in which the enzyme has been extracted with the buffered media: Tris 0,041 M — Glycin 0,32 M — Glucose 0,70 M + Dodecyl hydrogen sulfate (sodium salt) 0,5 %, pH = 8,50.

The activity is expressed as % of hydrolysed chlorophylls in the reaction time.

At the same time, several factors of the reaction media influencing on the activity, such as: acetone concentration, citrate concentration, pH and temperatura, are studied.

INTRODUCCION

El enzima clorofilasa (clorofila-clorofilida-hidrolasa E.C.3.1.14.) puede actuar «in vivo» tanto en la biosíntesis de la clorofila catalizando la esterificación del ácido propiónico residual en la posición 7 (ani-



llo D) de la clorofilida *a*, con el fitol (1, 2, 3, 4, 5), como en la hidrólisis de la clorofila para dar lugar a clorofilida + fitol (6, 7, 8, 9, 10, 11). Esta doble acción no permite concretar la verdadera función fisiológica del enzima clorofilasa; lo que es indudable, es que su participación en el proceso fotosintético es fundamental.

Son numerosas las investigaciones orientadas a encontrar los materiales que lo contienen en gran cantidad. Así, se ha comprobado gran actividad en especies de *Heracleum*, *Lamium* y *Dhalia* y mucho menos en *Urtica*, *Cucurbita* y *Phaseolus*.

Hasta ahora, no se ha podido establecer un método de preparación del enzima que sea aplicable a todos los tejidos vegetales, ya que la metodología seguida es función del material de partida: plántulas de vegetales superiores, hojas, cloroplastos aislados, células de algas (8, 10, 12, 13, 14), así como, polvos acetónicos procedentes de distintos vegetales (15, 16, 17, 18).

Sin embargo, con la información parcial obtenida de cada uno de ellos, se podría abordar el estudio del enzima procedente de cualquier material.

En este trabajo se consideran diferentes formas de preparación del enzima procedente de hojas de Limonero Verna y distintos factores del medio de reacción que afectan a la actividad clorofilasa de dicho material.

MATERIAL Y METODOS

I. PREPARACIÓN DEL MATERIAL ENZIMÁTICO

Para la preparación del material que contiene el enzima se han elegido los siguientes:

- a) *Material fresco*. Las hojas recién cogidas se lavan, secan y trocean. Las muestras así preparadas constituyen el material para la extracción del enzima con un tampón, o para su incubación directa (15, 19).
- b) *Polvos acetónicos*. Muestras preparadas según a), se trituran con acetona (enfriada a -20°C) en un homogeneizador. Las suspensiones se filtran a través de un embudo de placa porosa del número 5; los residuos se lavan repetidamente con el mismo disolvente hasta eliminación de todo resto de pigmentos. Seguidamente se secan a temperatura ambiente y se trituran. Por úl-

timo, se pasan por un tamiz de 0,2 mm de luz y se almacenan a temperatura baja. Este material constituye los «polvos acetónicos» (15, 20, 21).

- c) *Polvos desecados*. Muestras idénticamente preparadas como se indica en a), se desecan durante una hora a 40-50° C y se trituran finamente. Los triturados, que contienen el enzima y sustrato (clorofilas), no evolucionan hasta su incubación en disoluciones acuosas de acetona o metanol (15).

II. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO

Otro lote de hojas, preparadas como se indica anteriormente, se trituran con acetona previamente enfriada (4 ml/g) y los homogeneizados se filtran en una placa porosa del número 5. El extracto se conserva en frigorífico a -20° C durante varios días y antes de utilizarlo, se filtra de nuevo con el fin de eliminar la mayor parte de los carotenoides que precipitan a esta temperatura.

En la disolución obtenida se determina la concentración de clorofilas aplicando las ecuaciones de Arnon basadas en los coeficientes de extinción de Mc Kinney (22, 23).

III. DETERMINACIÓN INICIAL DE LA ACTIVIDAD CLOROFILASA

A) Medios heterogéneos

Para la determinación de la actividad clorofilasa se han preparado medios de reacción a partir de:

- a) *Material fresco*. Se tritura con acetona del 80 % en la relación 1 : 10. A la suspensión se adiciona citrato sódico en la proporción 10 : 5. Se incuba a 30-32° C durante una, dos o más horas. En estas condiciones el medio de reacción es aproximadamente $4 \cdot 10^{-2}$ M en citrato y 0,30 mM en clorofilas; la concentración de acetona se mantiene alrededor del 60 %.
- b) *Polvos acetónicos*. 100 mg se incuban a 30-32° C con 10 ml de disolución acetónica de clorofilas (sustrato) y 5 ml de citrato sódico 0,12 M durante el tiempo elegido.
- c) *Polvos desecados*. 100 mg de polvos (que contienen el enzima y sustrato) se incuban de la misma forma que en b), pero sin

añadir sustrato. El volumen de disolución de clorofilas se sustituye por otro de acetona.

Transcurrido el tiempo de reacción (dos horas), la suspensión se filtra y el residuo se lava con acetona del 80 % hasta que queda incoloro. Al filtrado se le añaden 25 ml de ClNa al 2 % y se completa con acetona del 80 % hasta 250 ml. En 100 ml de esta disolución se determinan conjuntamente clorofilas y clorofilidas. Otros 100 ml se tratan con 40 ml de éter de petróleo o n-hexano en un embudo de separación. La fase acetónica contiene las clorofilidas. Cada una de las disoluciones se aforan, con su disolvente respectivo, a 100 ml y se determinan por separado las concentraciones de clorofilas y clorofilidas.

La actividad clorofilasa se expresa, en principio, como porcentaje de clorofilas hidrolizadas en el tiempo de reacción considerado. Este método se basa en la insolubilidad de las clorofilidas en medios apolares tales como n-hexano o éter de petróleo (15, 16, 24).

B) *Medios homogéneos*

En medios heterogéneos parte del sustrato queda absorbido en la fase sólida del medio y el enzima no puede actuar sobre la totalidad del mismo. Por otra parte, para realizar una medida correcta de la actividad, es necesario efectuar lavados sucesivos de la fase sólida hasta conseguir la desorción del sustrato.

Para obviar esta dificultad se trató de obtener el enzima en disolución; para ello es necesario, en primer lugar, elegir el extractante adecuado como medio en el cual la alteración del enzima sea mínima y a la vez pueda extraer la máxima cantidad posible; en segundo lugar, concretar la acción del mismo sobre polvos acetónicos y hojas frescas.

Los medios tamponados ensayados son:

1. Sacarosa 0,5 M — Tris 0,05 M, pH = 7,80 (25).
2. Tris 0,041 M — Glicina 0,32 M — Glucosa 0,70 M, pH = 8,5 (26).
3. Tris 0,02 M — ClH, pH = 8,0 (18).
4. Citrato sódico 0,02 M — ClNa 0,4 M, pH = 7,0 (27).
5. Fosfato mono y disódico 0,067 M, pH = 6,5 (13).
6. Fosfato mono y disódico 0,01 M, pH = 6,5 (18).
7. Fosfato mono y disódico 0,001 M, pH = 6,7 (28).

Junto al medio tamponado, diversos investigadores utilizan detergentes en concentraciones que oscilan entre 0,1 y 1 % (19, 21, 29, 30).

Es por ello que a los distintos medios tamponados se les adicionó dodecil sulfato sódico (D. S. S.) al 0,5 %.

La determinación de la actividad se realizó en material fresco y polvos acetónicos.

a) *Material fresco.* Tres gramos de hojas frescas se trituran en mortero de vidrio, previamente enfriado, con arena de mar lavada al ácido, adicionando alícuotos del tampón correspondiente hasta completar 25 ml, o bien homogeneizándolos en un triturador eléctrico con 25 ml de tampón.

La suspensión obtenida se deja en maceración durante veinticuatro horas. Después se pasa a través de una malla para eliminar partículas groseras y fibras y se centrifuga a 5.000 xg durante cuarenta minutos a 4°C. El sobrenadante, una vez filtrado, constituye el extracto enzimático.

b) *Polvos acetónicos.* Para todos los ensayos se tomó 1 g de polvos acetónicos preparados como ya se ha indicado, y 25 ml del tampón correspondiente. La suspensión se mantuvo en agitación durante ocho horas y seguidamente en maceración hasta completar las veinticuatro. Los extractos enzimáticos se obtienen de la misma forma que en el apartado anterior.

RESULTADOS Y DISCUSION

A) MEDIDA DE LA ACTIVIDAD CLOROFILASA

Los resultados obtenidos de la actividad clorofilasa en los dos medios considerados son los siguientes:

1. *Medio heterogéneo.*—Los datos relativos a la actividad clorofilasa se muestran en la tabla I.

TABLA I
Actividad clorofilasa en hojas de L. Verna, según los procedimientos seguidos para la preparación del material que contiene el enzima. Tiempo de reacción, dos horas

Muestra	ACTIVIDAD %		
	Mat. fresco	Polvos acet.	Polvos des.
1	26,45	32,07	11,22
2	27,05	32,61	10,97
3	26,91	32,84	10,42
4	26,88	32,45	10,60
5	26,71	32,03	10,31
Media	26,80	32,40	10,60

Los resultados nos hacen considerar que los procedimientos más adecuados para la preparación del material que contiene el enzima son los de polvos acetónicos y material fresco.

2. *Medio homogéneo*.—En este caso, y dados los resultados anteriores, los ensayos se efectuaron a partir de material fresco y polvos acetónicos.

Los resultados para el material fresco se exponen en la tabla II.

TABLA II

Actividad clorofilasa en función del extractante y del procedimiento de extracción (En %)

Extractante	H O M O G E N E I Z A C I O N							
	Mortero				Turmix			
	1	2	3	Media	1	2	3	Media
1	43,58	43,06	43,40	43,40	30,98	32,25	31,17	31,80
2	71,50	70,80	72,20	71,50	52,80	52,60	51,50	52,30
3	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	—	—

Los datos obtenidos indican que el extractante tris-glicina-glucosa (T. G. G.) más D. S. S., pH = 8,50, es de los ensayados el más apropiado para extraer el enzima a partir de hoja fresca.

En la tabla III se recopilan los datos de actividad relativos a extractos de polvos acetónicos.

TABLA III

Actividad clorofilasa (en %) de extractos de polvos acetónicos (muestras por triplicado)

Extractante	MUESTRA			
	1	2	3	Media
1	50,68	51,25	52,27	51,40
2	63,61	63,93	63,56	63,70
3	—	—	—	—
4	—	—	—	—
5	—	—	—	—
6	—	—	—	—
7	—	—	—	—

Del estudio comparativo de los datos obtenidos en las experiencias anteriores se deduce:

a) Para ambos tipos de material el tampón con el que se consigue un extracto con mayor actividad es T. G. G. + D. S. S. al 0,5 %.

b) El mayor porcentaje de actividad corresponde al extracto obtenido a partir de material fresco.

c) No puede afirmarse que esta diferencia (71,5 % frente a 63,7 %) sea debida al estado del material de partida, ya que no existe correspondencia entre el peso de material fresco y el de polvos acetónicos, puesto que ésta es función de la edad y del estado de desarrollo de la hoja.

d) El extracto correspondiente al material fresco contiene además el sustrato, por lo que aparecen en el medio instantáneamente clorofilidas.

e) Por todo ello, consideramos los polvos acetónicos como el material de partida más adecuado para la obtención del enzima en disolución.

B) FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD CLOROFILASA

Son varios los autores (15, 19, 21) que manifiestan la variación notable de la actividad dependiendo de las condiciones del medio de la reacción, como son: concentración del extractante, composición del tampón, temperatura, pH del medio, etc. Los factores considerados son: 1) pH del medio, 2) temperatura, 3) concentración de citrato y 4) concentración de acetona.

1) *pH*

Medio de reacción: Clorofilas = 63,80 μ M; Acetona = 35 %.

Condiciones: $\left\{ \begin{array}{l} \text{Citrato} = 12 \times 10^{-3} \text{ M.} \\ \text{Temperatura: } 32\text{-}33^{\circ} \text{ C.} \\ \text{Tiempo de reacción: } 15 \text{ minutos.} \end{array} \right.$

En la figura 1 se representan los resultados:

2) *Temperatura*

Medio de reacción: Clorofila = 96,70 μ M; Citrato = 12×10^{-3} M.

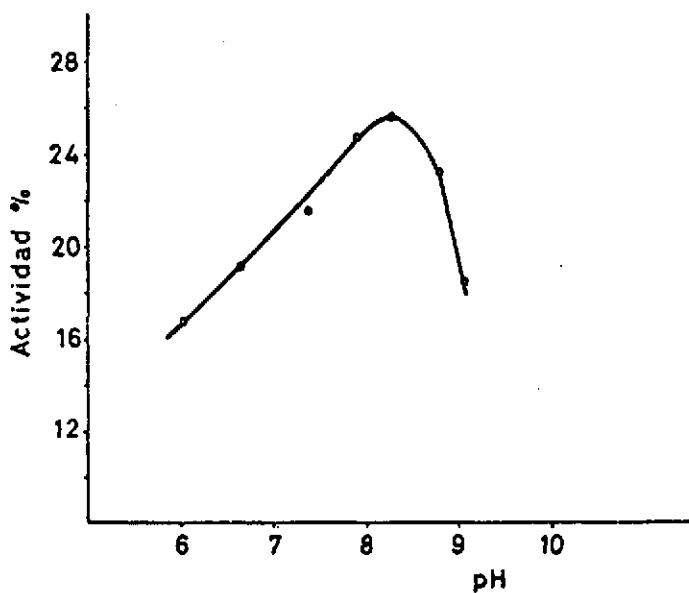


FIGURA 1

Variación de la actividad clorofilasa con el pH

Condiciones: { Acetona = 35 %.
pH = 8,3; tiempo de reacción: 15 minutos.

Los resultados se muestran en la figura 2.

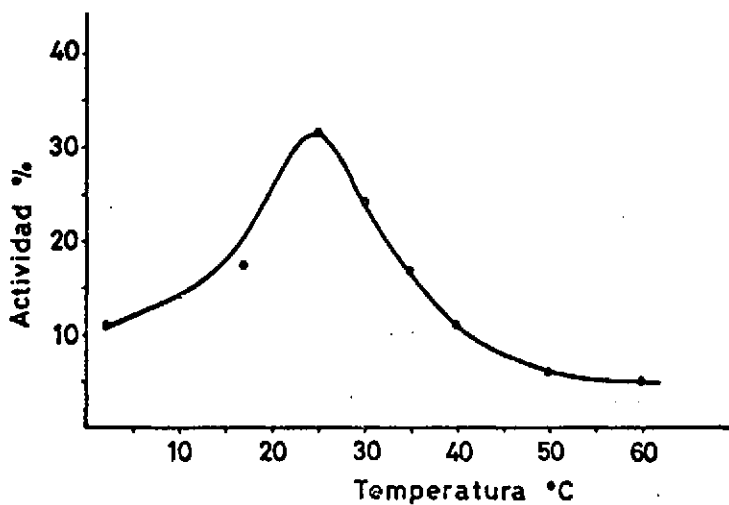


FIGURA 2

Variación de la actividad con la temperatura

3) *Concentración de citrato*

Medio de reacción: Clorofilas = 45,2 μM ; Acetona = 35 %.

Condiciones: { pH = 7,9; temperatura: 25° C.
Tiempo de reacción: 30 minutos.

Los resultados se muestran en la figura 3.

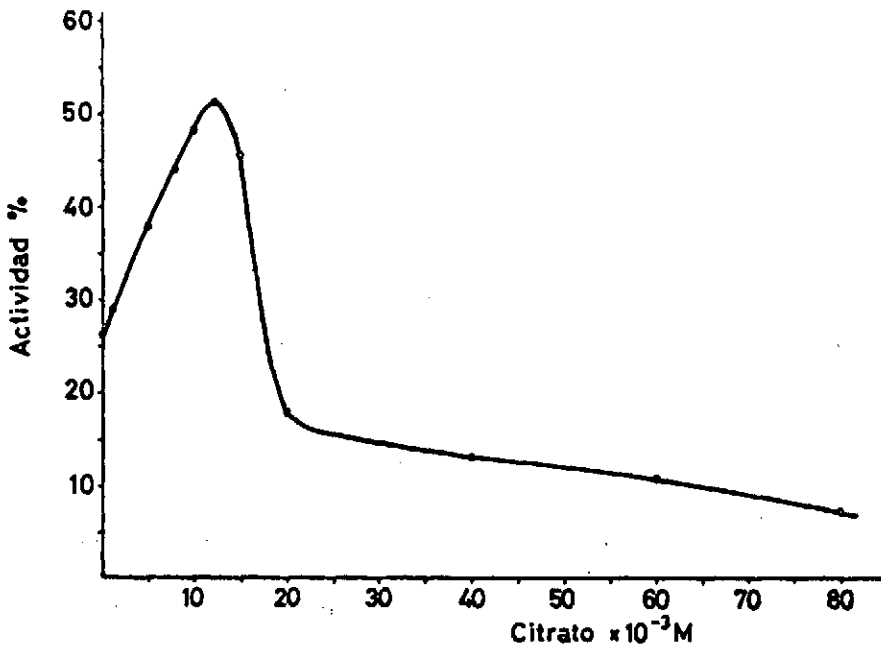


FIGURA 3

Variación de la actividad clorofilasa en función de la concentración de citrato sódico

4) *Concentración de acetona*

Medio de reacción: Clorofilas = 53 μM ; Citrato = $5 \times 10^{-3}\text{M}$.

Condiciones: { Extracto enzimático = 2 ml.
pH = 7,9; temperatura: 25° C.
Tiempo de reacción = 30 minutos.

Los resultados se exponen en la figura 4.

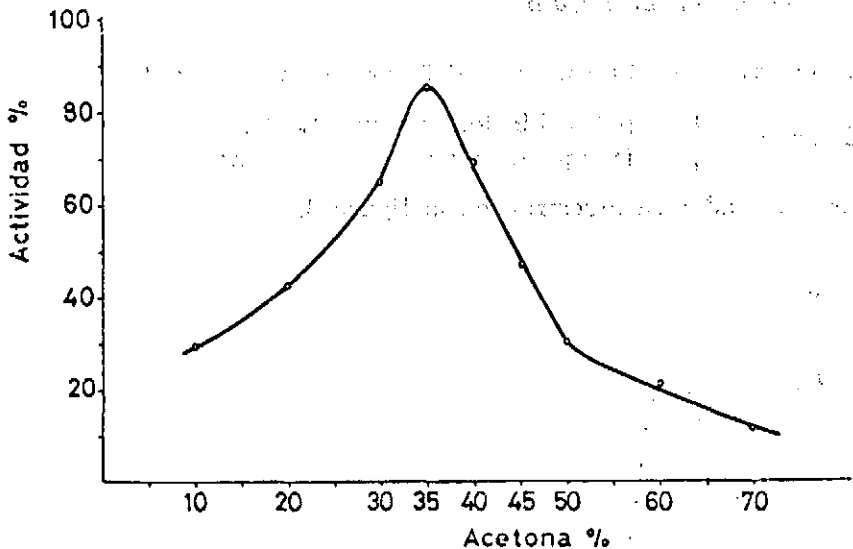


FIGURA 4

Variación de la actividad clorofilasa en función de la concentración de acetona en el medio

CONCLUSIONES

De los resultados de las experiencias anteriormente expuestas podemos deducir:

a) Las condiciones óptimas de reacción, en función de los factores considerados, son las siguientes:

Acetona = 35 %.

Citrato = 12×10^{-3} M.

pH = 8,30.

Temperatura = 25° C.

b) En nuestro caso, y para un volumen de 50 ml, el medio de reacción debe estar formado por:

Agua destilada: 22,5 ml.

Acetona: 17,5 ml. (incluido el volumen acetónico del sustrato).

Citrato sódico: 6 ml 0,1 M.

Extracto enzimático: 2 ml.

Hidróxido sódico: 1 ml 0,1 M.

c) En los procedimientos de extracción del enzima se utilizó el método de Holden (15) para la medida de la actividad, pero éste tiene la

limitación de no poder realizar varias medidas sobre el mismo medio, ya sea para uno o distintos tiempos. En consecuencia, se modifica de la siguiente manera:

En un medio de 50 ml, preparado según b), se toman alícuotos de 2 ml y se llevan a un tubo de centrifuga provisto de cierre hermético, que contiene 5 ml de acetona. Después de agitar 30 segundos, se centrifuga a 5.000 xg diez minutos. Del sobrenadante se toman 4 ml y se adicionan a otro tubo análogo al anterior en el que se han puesto 8 ml de n-hexano o éter de petróleo (p. e., 40-60° C), 2 ml de acetona y 2 ml de disolución de ClNa al 5 % (19). Se agita durante 30 segundos y se centrifuga a 5.000 xg cinco minutos. La epifase contiene las clorofilas y la hipofase las clorofilidas. El valor de la absorción de la epifase a 663 y 645 nm y su diferencia respecto a un ensayo en blanco (en el que se sustituye el enzima por el extractante) da la actividad expresada en % en el tiempo de reacción considerado.

BIBLIOGRAFIA

1. CHIBA, Y.; AIGA, I.; TAKAGI, K., y SASA, T., «Studies on chlorophyllase of *Chlorella protothecoides* in relation to the problem of chlorophyll formation», *Comp. Biochem. Biophys. Photosyn.*, Pap. Conf. 1967. Ed. Univ. of Tokyo Press, Japan (1967).
2. RAKHMANKULOVA, M. E.; KHODZHAEV, A. S., y AGZAMOV, A., «Relation between chlorophyllase activity and chlorophyll accumulation in the ontogenesis of cotton», *Dokl. Akad. Nauk Uzb. S. S. R.*, 27 (12), 43 (1970).
3. USPENKAYA, V. E., «Bacteriochlorophyll synthesis and chlorophyllase activity of sulfur-free purple bacteria», *Izv. Akad. Nauk, S. S. S. R., Ser. Biol.* (6), 882.
4. BEISENHERZ, W. W., y SCHNEIDER, H. A. W., «Localization of synthesis of enzymes of chlorophyll biosynthesis», *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 87 (1), 161 (1974).
5. TSONEVA, P., «Changes in the chlorophyllase activity and pigment content in *Pinus sylvestris* needles during one year», *God. Sofii. Univ., Biol. Fak.*, 67 (2), 139 (1976).
6. SIMPSON, K. L.; LEE, T.; RODRÍGUEZ, D. E., y CHICHESTER, C. O., «Metabolism in senescent and stored tissues», en *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Ed. Academic Press, New York (1976).
7. AIGA, I., y SASA, T., «Chlorophyllase of *Chlorella protothecoides*. II, Formation of atypical chlorophyllide a», *Plant Cell Physiol.*, 11 (1), 161 (1970).
8. VLASENOV, L. I., y VARIMOVICH, Zh., «V. Effect of phytochrome on the hydrolytic activity of chlorophyllase», *Metab. Str. Fotosin. App.*, 77 (1970).
9. SUD'INA, E. G.; LOZAVAYA, G. I.; DOVBYSH, E. F.; FOMISHINA, R. A., y BAVENKO E. I., «Role of structural organization for the chlorophyllase reaction in synthetic complexes», *Ukr. Bot. Zh.*, 30 (2), 155 (1973).
10. TERPSTRA, W., «Properties of chloroplasts fragments as deduce from internal chlorophyll chlorophyllide conversion». *Z. Pflanzenphysiol.*, 71 (2), 129 (1974).
11. TERPSTRA, W., y GOEDHEER, J. C., «Chlorophyllase and lamellar structure in *Phaeodactylum tricorutum*. I, Chlorophyll chlorophyllide conversion within lamellae», *Z. Pflanzenphysiol.*, 75 (2), 118 (1975).
12. BÜGER, P., «Chlorophyllase of *Chlorella vulgaris* Beijerinck», *Phytochemistry*, 4 (3), 435 (1975).
13. ELLESWORTH, R. K., «Chlorophyllase. I. Hydrolytic and esterification activities of chlorophyllase from wheat seedlings», *Photosynthetica*, 5 (3), 226 (1971).
14. SUD'INA, E. G.; LOZAVAYA, G. I.; DOVBYSH, E. F.; BABENKO, E. G., y FOMISHINA, R. N., «Chlorophyllase localization in chloroplasts», *Fiziol. Biokhim. Kul't. Rast.*, 5 (2), 154 (1973).
15. HOLDEN, M., «The breakdown of chlorophyll by chlorophyllase», *Biochem. J.*, 78, 359 (1961).
16. MCFEETERS, R. F., «Substrate specificity of chlorophyllase», *Plant Physiol.*, 55 (2), 377 (1975).
17. GANOZA, V. F., y MCFEETERS, R. F., «Chlorophyllase activity during pigmentation changes in *Chlorella protothecoides*», *Photosynthetica*, 10 (1), 1 (1976).
18. TERPSTRA, W., y WEIJMAN, A. C. M., «Spinach protein factor and chlorophyllase», *Planta*, 108 (4), 319 (1972).
19. OGURA, N., «Studies in chlorophyllase in tea leaves», *Plant Cell Physiol.*, 13 (6), 971 (1972).
20. HOLDEN, M., «Chlorophylls», en *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Ed. Academic Press, New York (1976).



21. MCFEETER, R. F.; CHICHESTER, C. O., y WHITAKER, J. R., «Purification and properties of chlorophyllase from *Ailanthus altissima*», *Plant Physiol.*, 47 (5), 609 (1971).
22. ARNON, D. I., «Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*», *Plant Physiol.*, 24, 1 (1949).
23. MACKINNEY, G., «The absorption of light by chlorophyll solutions», *J. Biol. Chem.*, 140, 315 (1941).
24. KLEIN, A. O., y VISHNIAC, W., «Activity and partial purification of chlorophyllase in aqueous systems», *J. Biol. Chem.*, 236, 2544 (1961).
25. TERSPTRA, W., «Properties of green particles obtained from spinach leaf homogenates», *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, 67, S., 255 (1972).
26. WRIGLEY, C. W., y WEBSTER, H. L., «The effects of stem rust infection on the soluble proteins of wheat leaves», *Aust. J. Biol. Sci.*, 19, 895 (1966).
27. BACON, M. F., y HOLDEN, M., «Chlorophyllase of sugar beet leaves», *Phytochemistry*, 9 (11), 115 (1970).
28. MCKENZIE, H. A., «pH and Buffers», en *Data for Biochemical Research. Preparation and Composition of Biochemical Reagents*, Ed. Oxford University Press, pág. 489 (1969).
29. ELLSWORTH, R. K.; TSUK, R. M., y ST. PIERRE, L. A., «Studies on chlorophyllase. IV, Attribution of hydrolytic and esterifying "chlorophyllase" activities observed in vitro to two enzymes», *Photosynthetica*, 10 (3), 312 (1976).
30. HERRMANN, F., y MEISTER, A., «Separation and spectroscopical properties of pigment-protein complexes in *Antirrhinum* chloroplasts», *Photosynthetica*, 6, 177 (1972).

