



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ALGUNAS
ENZIMAS DE LA RUTA DE BIOSINTESIS DE
CAPSAICINOIDES EN CALLO DE CHILE
(Capsicum annum L.)**

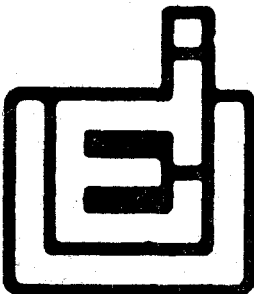
TESIS DE LICENCIATURA

PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

JUDITH E. GOMEZ PERALTA



IZTACALA, EDO. DE MEXICO

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
DE ALGUNAS ENZIMAS DE LA RUTA
DE BIOSINTESIS DE CAPSAICINOIDES
EN CALLO DE CHILE (*Capsicum annum* L.).**

Tesis de licenciatura: Judith E. Gómez Peralta.

Asesor: Dr. Neftali Ochoa Alejo.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco sinceramente a todos aquellos que de una manera u otra contribuyeron a la realización de este trabajo, y muy especialmente:

-A la Unidad del CINVESTAV-Irapuato por las facilidades otorgadas.

-Al CONACYT por la beca que me fue otorgada así como por el financiamiento de este trabajo que forma parte del proyecto "Producción de capsaicinoides por células del género Capsicum en cultivo sumergido". PVT/AI/NAL/85/3155.

-Al Dr. Neftalí Ochoa Alejo por su asesoría, apoyo y consejos.

-A todo el personal de los laboratorios de Cultivo de Tejidos y Fitoquímica por su amistad y su ayuda invaluable.

-A mis compañeros y amigos de maestría, sobre todo a aquellas con quienes compartí dos años de convivencias y que me ayudaron regalándome su amistad y compañía. Azucena, Ma. de Jesús y Paulina.

-A todos mis amigos que no menciono aquí pero que han compartido conmigo lo más bello, la vida.

DEDICATORIA.

Este es mi trabajo de casi dos años y quiero dedicarlo :

A las personas que mas amo;

 Mi familia.

 Rubén, Paty, Miguel y Othón

 Gracias por aceptarme y quererme como soy.

 Mamá y Papá

 Gracias por todo el amor, comprensión y apoyo

 y sobre todo por ser lo que son, unos buenos padres.

" -¿Que sucederá con nosotros ¿Quién de veras queda en pie
- Ah, en otro tiempo yo fui ...
Vulnerado de muerte está mi corazón
Cual si estuviera sumergido en chile,
mucho se angustia,mucho arde ...
¿A donde pues nuestro señor

Lamento de Moctezuma,
a la llegada de los
españoles.
(León Portilla,1961).

CONTENIDO

	No. pág.
-RESUMEN	1
-INTRODUCCION.	
1.-GENERO <u>Capsicum</u>	2
2.-BOTANICA DEL GENERO <u>Capsicum</u>	3
-ANTECEDENTES.	
1.-CULTIVO DE TEJIDOS	5
2.-CAPSAICINA	6
3.-CAPSAICINOIDES	6
4.-ASPECTOS BIOSINTETICOS DE LOS CAPSAICINOIDES.	
4.1.-LOCALIZACION DE LOS CAPSAICINOIDES EN FRUTOS	7
4.2.-ACUMULACION DE LOS CAPSAICINOIDES EN FRUTO	8
4.3.-EFECTO DE LA LUZ	8
4.4.-IDENTIFICACION DE PRECURSORES DE LOS CAPSAICINOIDES	9
4.4.1.-Grupo acilo	9
4.4.2.-vainillilamina	
4.5.-RUTA DE BIOSINTESIS	10-11
4.5.1.-Fenilalanina amonio liasa (PAL)	12
4.5.2.-Acido cinámico 4-hidroxilasa (AC4H)	13
4.5.3.-Acido cumárico 3-hidroxilasa (AC3H)	13

4.3.4.-Acido cafeico o-metil	
transferasa (ACOMT)	14
4.3.5.-Capsaicinoide sintetasa	
(CS)	15-16
-OBJETIVO	17
-MATERIAL Y METODOS	
1.-MATERIAL BIOLÓGICO	
1.1.-ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO	
DE CALLOS	18
1.2.-OBTENCION DE FRUTOS	
DE CHILE	19
2.-DETERMINACIONES ENZIMATICAS	
2.1.-FENILALANINA AMONIO LIASA	
(FAL)	20
2.1.1.-Extracción	20
2.1.2.-Ensayo	20
2.2.-ACIDO CINAMICO	
4-HIDROXILASA (AC4H)	
2.2.1.-Extracción	21
2.2.2.-Ensayo	21
2.3.-ACIDO CUMARICO	
3-HIDROXILASA (AC3H)	
2.3.1.-Extracción	22
2.3.2.-Ensayo	22
2.4.-ACIDO CAFEICO O-METIL	
TRANSFERASA (ACOMT)	

2. 4. 1. -Extracción	23
2. 4. 2. -Ensayo	23
2. 5. -CAPSAICINOIDE SINTETASA	
(CS)	
2. 5. 1. -Extracción	24
2. 5. 2. -Ensayo	24
2. 6. -DEFINICION DE ACTIVIDAD	
ESPECIFICA	25
3.-DETERMINACION DE PROTEINAS	25
4.-ESPECTROS DE ABSORCION	25
-RESULTADOS	
1.-CRECIMIENTO DE CALLO	26
1. 1. -CURVA DE CRECIMIENTO	
DE CALLO (FIG. 1)	27
2.-DETERMINACIONES ENZIMATICAS	
EN CALLO	26
2. 1. -DETERMINACION DE FAL	
(FIG. 2)	28
2. 2. -DETERMINACION DE AC4H	
(FIG. 3)	29
2. 3. -DETERMINACION DE AC3H	
(FIG. 4)	30
2. 4. -DETERMINACION DE ACOMT	
(FIG 5)	31
2. 5. -DETERMINACION DE CS	
(FIG. 6)	32

3.-CRECIMIENTO DE CHILE	33
3.1.-CURVA DE CRECIMIENTO DE CHILE (FIG. 7)	34
4.-DETERMINACIONES ENZIMATICAS EN CHILE	33
4.1.-DETERMINACION DE FAL (FIG. 8)	35
4.2.-DETERMINACION DE AC4H (FIG. 9)	36
4.3.-DETERMINACION DE AC3H (FIG. 10)	37
4.4.-DETERMINACION DE ACOMT (FIG. 11)	38
4.5.-DETERMINACION DE CS (FIG. 12)	39
-DISCUSION	40-41
-CONCLUSIONES	42
-BIBLIOGRAFIA	43-52

-APENDICE

TABLAS	Página
TABLA I	
Preparación medio MS	53-54
TABLA II	
Cromatografía en capa fina	55-56
TABLA III	
Determinación de proteínas	
Método Bradford	57
TABLA IV	
Crecimiento callo	60
TABLA V	
Crecimiento chile	60
TABLA VI	
Actividades enzimáticas callo	61
TABLA VII	
Actividades enzimáticas chile	61
FIGURAS	
Fig. A) Curva patrón de proteínas Macro	58
Fig. B) Curva patrón de proteínas Micro	59
ESPECTROS DE ABSORCION	
Acido cinámico (Fig. C)	62
Acido cumárico (Fig. D)	63
Acido cafeico (Fig. E)	64

Acido ferúlico (Fig. F)	65
Capsaicina (Fig. G)	66
CURVAS PATRON	
Acido cinámico (Fig. H)	67
Acido cumárico (Fig. I)	68
Acido cafeico (Fig. J)	69
Acido ferúlico (Fig. K)	70
Capsaicina (Fig. L)	71

RESUMEN

El cultivo de células indiferenciadas de algunas plantas es una fuente potencial de importantes productos químicos como los capsaicinoides, grupo de compuestos encontrados en los frutos de chile que le confieren su sabor picante característico. En este trabajo se realizaron determinaciones de la actividad de algunas de las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de capsaicinoides: Fenilalanina amonio liasa (FAL); ácido cinámico 4-hidroxilasa (AC4H); ácido cumárico 3-hidroxilasa (AC3H); ácido cafeico o-metil transferasa (ACOMT) y capsaicinoide sintetasa (CS), esto en callos de chile (*Capsicum annuum* L. cv Tampiqueño 74; tipo serrano) durante periodos de quince días. Los resultados obtenidos mostraron un patrón similar para todas con un pico de máxima actividad en el séptimo día después del cultivo excepto AC4H que lo tuvo hasta el decimoprimer día. Del mismo modo se determinó la actividad de estas enzimas en fruto, en diferentes etapas de desarrollo después de su floración obteniéndose los valores más altos a los treinta días (que corresponde también a la mayor talla de fruto). Estos valores fueron superiores a los de callo, aunque las diferencias entre los valores máximos obtenidos para chile fueron para FAL 50%, AC4H 35% y AC3H 25% mayores que los valores más altos de callo, sin embargo para ACOMT y CS los valores máximos de actividad en chile fueron aproximadamente cinco y seis veces respectivamente mayores que en callo. Por lo que puede ser que la actividad de estas enzimas sea una limitante en la síntesis de capsaicinoides en callo.

INTRODUCCION

Desde tiempos tribales se ha descrito el uso de algunos vegetales como condimentos alimenticios que se han conservado en la alimentación actual y que incluso forman parte de la identidad cultural de varios pueblos y países.

Tal es el caso de las especias como la pimienta que llegó a tener un gran valor comercial cuando fue introducida en Europa. Colón por su parte en su descubrimiento de América, no encontró estas especias orientales, pero en su lugar conoció al chile que se encontraba ampliamente distribuido y utilizado a lo largo de todo el Caribe, México, América Central y del Sur (Pickersgill, 1969).

1.-GENERO Capsicum.

El fruto de *Capsicum* conocido como chile, paprika, pimiento o ají dependiendo del tipo y la forma en que es utilizado, fue una de las primeras especies de las que se conocieron datos arqueológicos, fechados de 5000 a 7000 años a. de C. en México, América Central y del Sur (Govindarajan, 1986).

Actualmente es uno de los aditivos alimenticios más populares no solo en estas regiones sino en muchas partes del mundo como India, China, Sureste de Asia, Japón, Estados Unidos, Inglaterra e incluso Europa y Africa. Alrededor de un cuarto de la población mundial adulta usa chiles en su dieta diaria (Moore, 1970).

2. BOTANICA DEL GENERO

Capsicum

Se le ha asignado el género *Capsicum* correspondiente a la familia de las solanáceas, en la cual también se encuentran otras especies económicamente importantes como la papa, el jitomate y el tabaco. En 1753 Linneo reconoció dos especies de chile, *C. annuum* y *C. frutescens*, posteriormente en 1767 añadió dos más. Durante los siguientes años y hasta la fecha se han descrito otras especies de *Capsicum* basándose principalmente en los caracteres de los frutos (Purseglove, 1981).

Capsicum annuum L. se encuentra ampliamente distribuido en el sur de Estados Unidos, México, América Central y del Sur. *Capsicum annuum* var *annuum* posee un gran número de cultivares y es el chile de mayor importancia económica.

Existe una gran variedad de formas cultivadas en la parte centro de México, donde muchas regiones tienen sus distintos cultivares.

La forma cultivada de *C. annuum* muestra una gran variabilidad, sobre todo respecto al fruto. Presenta formas herbáceas o subarborescentes, erectas y muy ramificadas, de 40 a 100 cm de talla, es usualmente de maduración rápida y de crecimiento anual. El fruto es de tipo baya indehisciente con muchas semillas, en forma pendular o erecta y usualmente nace individualmente a la altura de los nudos. Es extremadamente variable en talla, forma, color y grado de pungencia, su anchura es de arriba de 8 mm y va de 0.8 a 30.0 cm de largo.

de forma lineal, cónica o globular. El fruto inmaduro puede ser verde, amarillento o purpurino, y ya maduro cambia a rojo, naranja, amarillo o purpúreo.

ANTECEDENTES

1.-CULTIVO DE TEJIDOS.

El cultivo de tejidos es un método ampliamente utilizado para la reproducción de células vegetales, las que debido a su totipotencialidad celular pueden ser mantenidas en estado indiferenciado o inducirse a la diferenciación de órganos e incluso plantas completas con el uso de reguladores de crecimiento (Bhojwani y Razdan, 1983). Las células diferenciadas son sin embargo una fuente potencial de importantes productos vegetales tales como fenilpropanoides, terpenoides y alcaloides (Staba, 1980), los cuales pertenecen al grupo de compuestos denominados metabolitos secundarios. La producción de estos metabolitos mediante cultivos celulares varía con respecto a los valores reportados en tejidos diferenciados de plantas *in vivo*, pudiendo ser mayor menor o estar ausentes (Evans et al., 1986). Con el propósito de aumentar la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares se han manejado varias estrategias como son: selecciones de líneas celulares sobrepductoras (Staba, 1980), inmovilización celular en matrices rígidas como poliuretano (Lindsey y Yeoman, 1984) y la adición al medio de cultivo de precursores, reguladores de crecimiento y nutrientes (Lindsey, 1985). Esto permitiría el uso de este sistema en una producción a nivel comercial con gran futuro.

El cultivo de tejidos ofrece también ventajas y perspectivas para la realización de estudios fisiológicos y biosintéticos en células vegetales como la determinación de enzimas en rutas metabólicas (Gamborg, 1966). Tal es el caso de la ruta de biosíntesis de los capsaicinoides, compuestos pertenecientes al grupo de los metabolitos secundarios, encontrados en los frutos de chile a los que se les atribuye su sabor picante característico y que han sido descritos en cultivos celulares de éste (Lindsey, 1986).

2.-CAPSAICINA.

El estudio químico de los componentes estimulantes de la pungencia de *Capsicum* se da a principios del siglo XIX. Bucholz en 1816, logra extraerlos con solventes orgánicos y muestra que forman sales en alcalis. Tresh en 1846 los cristaliza y los llama capsaicina. Mick propone una estructura similar a la de vanilina en 1898, pero es hasta veinte años después que Nelson y Dawson establecen la estructura de la capsaicina como 8-metil-6-nonenoil vanillilamida (Govindarajan, 1986).

3.-CAPSAICINOIDES.

La aplicación de nuevos métodos de separación de mayor precisión y fineza ha llevado a la identificación de un número de compuestos estrechamente relacionados con la capsaicina. Kosuge et al., (1964), propusieron la existencia de no solo uno sino una mezcla de compuestos responsables de la pungencia del chile a los que denominaron capsaicinoides y

describen dos: capsaicina y dihidrocapsaicina. Bennett y Kirby (1968) a su vez mencionan otros tres: nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina.

Otros compuestos homólogos de cadena corta son las octanoil y nonoil vanillilamidas mencionadas por Jurenitsh et al., (1978), y la decilvanillilamina por Kosuge y Furata (1970). Por último se han descrito también dos homocapsaicinas (I y II), dos homodihidrocapsaicinas y dos nordihidrocapsaicinas en mezclas naturales de capsaicinoides (Heresh y Jurenitsh, 1979). La norcapsaicina un pequeño homólogo de la capsaicina, ha sido sintetizado químicamente pero aún no ha sido identificada naturalmente. Cabe hacer notar que la capsaicina y la dihidrocapsaicina son los constituyentes dominantes en los frutos formando juntos cerca del 80% del total de los capsaicinoides (Govindarajan, 1986).

4.-ASPECTOS BIOSINTETICOS DE LOS CAPSAICINOIDES.

Análisis químicos macroscópicos y microscópicos *in vivo* e *in vitro* han sido realizados en las últimas décadas para definir la biosíntesis de los capsaicinoides.

4.1.-LOCALIZACION DE LOS CAPSAICINOIDES EN FRUTO.

Como ya se ha mencionado los capsaicinoides se encuentran en los frutos de *Capsicum*. En estudios posteriores se ha observado que dentro de éstos se concentran en tejidos pericárpicos y no en semillas o pedúnculos, observaciones histoquímicas los localizaron en placenta y

discrepancias, aunque existen discrepancias entre cual es el mayor sitio de síntesis de estos dos, pero se sugiere que se sintetizan en ambos y se acumulan en placenta (Iwai et al., 1979).

Por microscopía electrónica de células epidermales de placenta se han observado pequeñas vesículas parecidas a vacuolas con gránulos electrodensos en las que probablemente se localizan los capsaicinoides y a las que se les ha denominado capsisomas (Fujiwake et al., 1980a).

4.2.-ACUMULACION DE CAPSAICINOIDES EN FRUTO.

Se ha estudiado la formación de capsaicinoides durante el periodo de crecimiento y maduración del fruto en algunas especies y variedades de chile, detectándose el inicio de su producción entre los días 10 y 20 a partir de iniciada la floración (anthesis) y la máxima producción entre los 30 y 40 días (Balboa et al., 1968; Iwai et al., 1979; Hall et al., 1987).

4.3.-EFECTO DE LA LUZ.

La presencia de luz afecta la síntesis de capsaicinoides aumentándola e incluso induciéndola como se ha demostrado en *C. annuum* var. *grossum*, que normalmente no presenta una pungencia apreciable, pero bajo condiciones de luz continua estos lícan a acumularse; sin embargo, no se detectan en condiciones de obscuridad. Esto puede ser explicado por la inducción o activación por luz de los sistemas enzimáticos que participan en la biosíntesis de los precursores de los capsaicinoides (Iwai et al., 1977a).

4. 4. -IDENTIFICACION DE PRECURSORES DE LOS CAPSAICINOIDES.

Nelson en 1920 demostró por hidrólisis de la capsaicina la participación de la vanillilamina y de un ácido graso ramificado en su síntesis (Bennett y Kirby, 1968).

4. 4. 1. -Grupo acilo.

Lette y Loudon (1968) utilizaron como precursores del ácido graso, al ácido, mevalónico a la leucina y a la valina marcadas radioactivamente encontrando una mayor incorporación de valina. (Koop *et al.*, 1980) posteriormente demostraron que la valina es el precursor directo de las mitades acilo de los ácidos grasos de cadenas con un número par de carbonos, mientras que la leucina y la isoleucina actúan como precursores directos de los ácidos grasos con cadenas impares. Independientemente Suzuki *et al.*, (1981b) reportaron que la valina se incorpora dentro de la capsaicina y de la dihidrocapsaicina que son las vanillilamidas con un número par de carbonos en la cadena de su ácido graso correspondiente, mientras que la leucina se incorpora en los capsaicinoides minoritarios, nordihidrocapsaicina y homodihidrocapsaicina, que son vanillilamidas de cadena impar.

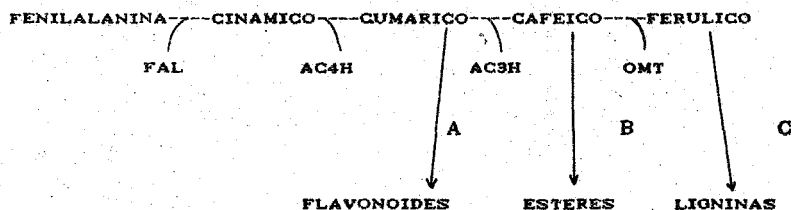
4. 4. 2. -Vanillilamina.

Bennett y Kirby (1968) utilizaron también marcaje radioactivo de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, ambos sintetizados por la vía del ácido shikímico,

que se involucra en la biosíntesis de otros compuestos fenólicos (Goodwin y Mercer, 1983). En este caso se obtuvo una alta incorporación de la fenilalanina. Por su parte Lette y Louden (1968) confirmaron estos resultados.

4.5. -RUTA DE BIOSÍNTESIS.

Con la determinación de la fenilalanina como precursor de la parte aromática de los capsaicinoides, se planteó una vía que incluye el ácido cinámico y sus derivados hidroxilados, siguiendo un camino bien establecido en otras plantas para la biosíntesis de compuestos como flavonoides, esteres y ligninas (Fig. 1)



A) Involucra la activación del grupo carboxilo de p-cumarato y su condensación con unidades 3 [C₂] vía malonil-CoA.

B) Formación de esteres de glucosa de varios ácidos Co-C₃ vía UDP glucosa.

C) Los carboxilos de p-cumarato y ácido ferulico son activados vía CoA ligasas y los CoA esteres resultantes son reducidos en aldehidos y alcoholes, los que son subsecuentemente polimerizados oxidativamente a lignina por peroxidasas

(Stafford, 1981).

La formación y distribución de los intermediarios y enzimas participantes han sido investigadas por Fujiwaka *et al.*, (1982a, 1982b).

Las enzimas que intervienen en la conversión de L-fenilalanina en los diferentes ácidos fenólicos ha sido establecida como sigue: L-fenilalanina $\xrightarrow{\text{FAL}}$ Acido trans cinámico $\xrightarrow{\text{AC4H}}$ Acido cumárico $\xrightarrow{\text{AC3H}}$ Acido cafeico $\xrightarrow{\text{ACOMT}}$ Acido ferúlico $\xrightarrow{\text{CS}}$ Capsaicinoides (Fig.2).

RUTA DE BIOSINTESIS DE CAPSAICINOIDES

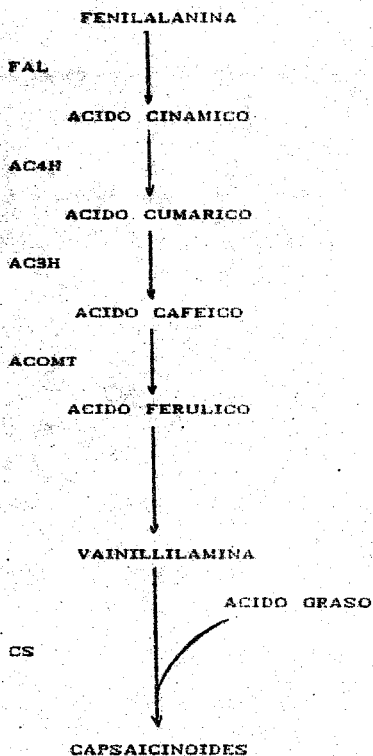
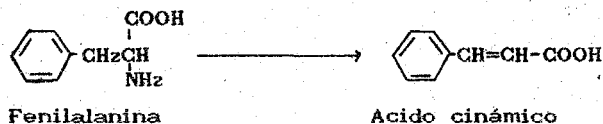


Figura 2. Ruta de biosíntesis de los capsaicinoides. FAL, Fenilalanina amonio liasa; AC4H, ácido cinámico 4 hidroxilasa; AC3H, ácido cumárico 3 hidroxilasa; ACOMT, ácido caféico o-metil transferasa y CS capsaicinoide sintetasa (Iwai *et al.*, 1978; Fujiwake *et al.*, 1980a y 1980b).

4.5.1. -Fenilalanina amonio liasa (FAL).

La biosíntesis de muchos compuestos fenólicos vegetales tales como los ácidos fenólicos, flavonoides, ligninas y fenilpropanoides se inicia con la actuación de la fenilalanina amonio liasa, enzima descrita por Koukol y Conn (1961). Esta enzima participa en la eliminación del grupo amonio de la fenilalanina para dar ácido trans cinámico.



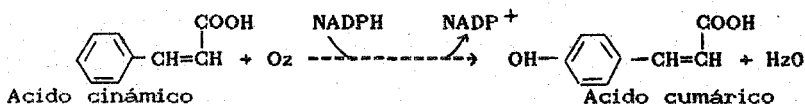
Por este motivo es una enzima que ha recibido una gran atención en estudios de regulación de biosíntesis de fenóles (Cunha, 1987; Hahlbrock *et al.*, 1971, 1973; Wescott 1976). Se ha encontrado en plantas, en ciertos hongos y en algunas algas, pero no ha sido reportada para animales. Se ha encontrado que la enzima intacta posee un peso molecular de alrededor de 330,000D y que es tetramérica con subunidades idénticas o muy similares, con dos sitios activos por tetramero. Actúa a un pH óptimo de alrededor de 8.7, sin necesidad de cofactores. Se ha encontrado en citoplasma,

microsomias y en la fracción mitocondrial. Se ha mencionado también que es inducida por luz (Zucker, 1965), etileno y ácido giberélico (Hanson y Haver, 1981).

4. 5. 2. -Acido cinámico 4-hidroxilasa (AC4H).

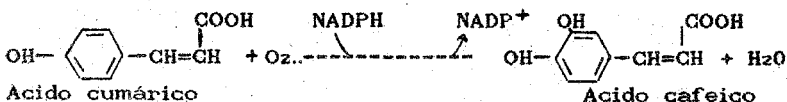
Una regulación de compuestos fenólicos a nivel de hidroxilación del ácido cinámico ha sido propuesta por Russell y Conn (1967). En este paso interviene la ácido cinámico 4-hidroxilasa, que es una monooxigenasa vegetal ampliamente distribuida (Oba y Conn 1988; Russell 1971).

Esta enzima cataliza la incorporación de un grupo hidroxilo en la posición 4 del ácido cinámico para dar origen al ácido cumárico.



3. 5. 3. -Acido cumárico 3-hidroxilasa (AC3H).

Por su parte, la enzima ácido cumárico 3-hidroxilasa cataliza la incorporación de otro grupo hidroxilo, pero en este caso en la posición 3 del ácido cumárico para dar origen al ácido caféico (Stafford, 1974).



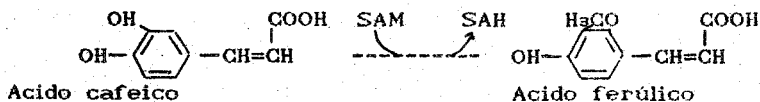
Tanto la AC4H como la AC3H han sido clasificadas como

oxigenasas microsomales que requieren oxígeno molecular y mercaptoetanol como cofactores, NADPH como agente reductor así como un pH óptimo de 7.5 para AC4H y de 6 para AC3H. Ambas enzimas se han encontrado asociadas a membranas y son citocromo p-450 dependientes; el hierro del citocromo se combina con O₂, el cual entonces reacciona con el sustrato y es hidroxilado bajo acción catalítica de la enzima. El hierro sufre cambios redox e interacciona con el agente reductor NADPH. El grupo hidroxilo es entonces introducido en el carbono específico correspondiente a la molécula del sustrato (Butt y Lamb, 1981).

También son estimuladas por luz (Halbrock et al., 1971), y heridas (Camm y Towers, 1973)

4.5.4. -Acido cafeico o-metil transferasa (ACOMT).

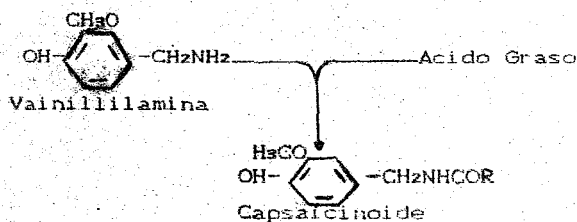
La metilación de compuestos polifenólicos reduce la reactividad química de los grupos fenólicos. Esto incrementa la evidencia de que las transmetilaciones pueden jugar un papel crucial en la dirección de intermediarios dentro de la ruta de biosíntesis de estos compuestos. La reacción catalizada por esta enzima involucra la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil metionina (SAM) al ácido cafeico para producir ácido ferúlico (Poulton et al., 1976).



Este paso es de gran importancia en la biosíntesis de ligninas (Higuchi *et al.*, 1967; Shimada *et al.*, 1970; Hadon y Northcote, 1976). Como ya se mencionó necesita SAM como donador del grupo metilo, tiene un pH óptimo de 6-8, y la presencia de iones como Mg parece no ser necesaria pero se ha visto que puede proporcionar en algunos casos una ligera estimulación y/o estabilización de la enzima (Finkle y Kelly, 1974). Tiene como mejores sustratos al ácido cafeico, ácido 5-hidroxiferúlico y 3,4,5-trihidroxicinámico (Rhodes *et al.*, 1976). Su actividad puede ser incrementada por etileno, infecciones, virus, heridas y hormonas que afectan la síntesis de ligninas (Poulton, 1981).

4.5.5. -Capsaicinoide sintetasa (CS).

Involucra la condensación de la vainillilamina con un ácido graso para originar el grupo de compuestos denominados capsaicinoides.



Se han realizado estudios en diferentes fracciones celulares de pericarpio y placenta como fuente de CS hallándose toda la actividad de síntesis en la fracción mitocondrial y microsomal de ambos (Iwai *et al.*, 1978).

Estudios posteriores mostraron la necesidad de

cofactores como ATP y Mg^{2+} , pues en ausencia de éstos la actividad disminuía más del 50%, mientras que el uso de acil-CoA y enzima aumentaba hasta más de seis veces la síntesis de capsaicinoides. Es por ello que se propusieron dos pasos en la síntesis: primero la formación de acil-CoA a partir de los componentes en presencia de ATP y Mg^{2+} y segundo la condensación con la vainillilamina para formar el capsaicinoide correspondiente (Fujiwake *et al.*, 1980b). Estos mismos autores midieron la especificidad de sustrato con diferentes donadores acilo de diferente número de carbonos, encontrándose que era mejor el que producía nordihidrocapsaicina, por lo que es posible que la composición de capsaicinoides varíe no tanto por la especificidad por el sustrato, sino por la abundancia relativa de los precursores acilo.

OBJETIVO

DETERMINAR LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE

-FENILALANINA AMONIO LIASA

-ACIDO CINAMICO 4-HIDROXILASA

-ACIDO CUMARICO 3-HIDROXILASA

-ACIDO CAFEICO O-METIL TRANSFERASA

-CAPSAICINOIDE SINTETASA

EN CALLOS DE CHILE PARA DETERMINAR LA FUNCIONALIDAD DE
LA RUTA DE BIOSINTESIS DE CAPSAICINOIDES EN TEJIDO
DESDIFERENCIADO.

MATERIAL Y METODOS.

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1. -ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE CALLOS.

Para la inducción y establecimiento de los cultivos de callo se utilizó el medio de Murashige y Skoog (1962) Tabla I, Apendice. Los callos se indujeron a partir de segmentos de hipocótilo de plántulas de treinta días obtenidas asepticamente a partir de la germinación de semillas de chile serrano var Tampiqueño 74 (*Capsicum annum* L.) obtenidas de semillas PRONASE, México.

Para ello las semillas fueron previamente remojadas en agua destilada durante una hora en agitación continua y un minuto en alcohol al 96%. Posteriormente en la campana de flujo laminar las semillas se trataron durante 15 minutos al vacío con una solución de blanqueador (cloralex) al 20% (v/v) conteniendo 0.1% de tween 20. Después se enjuagaron las semillas en un embudo büchner con un litro de agua destilada estéril. Las semillas se sembraron directamente en frascos grandes con 40ml de medio básico MS. Todo el material utilizado así como los frascos con medio fueron previamente esterilizados a 121°C y una presión de 1.05kg/cm² durante 15 minutos.

Allí se dejaron germinar y desarrollarse durante un mes al cabo del cual se obtuvieron plantulas de aproximadamente 15 cm de altura.

El cultivo de callos se estableció a partir de explantes

de hipocótilo inoculados en frascos gerber (cuatro explantes de aproximadamente 1.5cm de largo por frasco) conteniendo 20ml de medio MS adicionado con $6.25\mu\text{M}$ de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) y $0.44\mu\text{M}$ de BA (benciladenina). Este cultivo se dejó crecer durante un mes, manteniéndose bajo condiciones de luz continua, en un rango de temperatura de 25-27°C. A partir de los callos obtenidos se realizaron transferencias a medio nuevo cada 25 días para mantener el cultivo y llevar a cabo los ensayos enzimáticos; estos cultivos fueron mantenidos en las mismas condiciones de luz y temperatura descritos para la inducción de callo.

Para obtener la curva de crecimiento de los cultivos de callo se inocularon porciones de 1g de peso fresco en 10ml de medio en frascos gerber, y se incubaron en las condiciones antes descritas. A cada tercer día se colectaron tres muestras y se determinó el peso fresco.

1. 2. -OBTENCION DE FRUTOS DE CHILE.

De las plántulas obtenidas en condiciones asepticas (inciso 1.1) algunas fueron transferidas a suelo estéril en donde permanecieron por un periodo de aclimatación de un mes. Posteriormente fueron transferidas al invernadero hasta la producción de frutos. Los frutos fueron colectados a diferentes tiempos de maduración para hacer las determinaciones enzimáticas correspondientes.

2.-DETERMINACIONES ENZIMATICAS.

La determinación de la actividad de las diferentes enzimas se hizo tanto en tejido caloso como en los frutos de chile. Cada muestreo se realizó cada tercer día por triplicado durante periodos de 15 días a partir del subcultivo de callos. Para las determinaciones enzimáticas en frutos de chile se usó la misma metodología con 0.5g de chile y se tomaron chiles de diferentes tallas (dos frutos para cada extracción) cosechados a los 8, 15, 22, 30 y 50 días después de iniciada la floración.

2.1.-FENILALANINA AMONIO LIASA (FAL).

Se utilizó la metodología propuesta por Koukol y Conn (1961).

2.1.1.-Extracción.

Medio gramo de tejido caloso fue homogeneizado en frío en un mortero con 6.5ml de una solución amortiguadora Trizma HCl 0.05M pH 8.8 y mercaptoetanol 0.015M. El homogenado fue filtrado por doble gasa y centrifugado a 50,000Xg durante 30 min a 0°C. El sobrenadante fue recuperado y colectado manteniéndose a 4°C para ser usado en el ensayo de actividad de FAL.

2.1.2.-Ensayo.

La mezcla de reacción contenía 1.0ml de solución amortiguadora Trizma HCl 0.05M pH 8.8, 0.5ml de L-fenilalanina 10mM, 0.4ml de agua desionizada y 0.1ml de

sobrenadante . Se incubó a 37°C durante una hora y se paró la reacción con 0.5ml de HCl 6N.

La mezcla fue extraída con 15ml de éter dietílico en un embudo de separación, y se recuperó la fase orgánica, de la cual se evaporó el éter hasta la sequedad en un rotavapor a 22°C. El residuo se resuspendió con 3ml de NaOH 0.05N.

La cantidad de ácido cinámico producido fue determinada por la medición de la absorbancia a 290 nm, utilizando como blanco muestras bajo las mismas condiciones, cuya actividad fue inhibida con 0.5ml de HCl 6N antes de agregar el sobrenadante. Para ajustar a cero el espectrofotómetro se utilizó NaOH 0.05N.

2.2. -ACIDO CINAMICO 4-HIDROXILASA (AC4H).

Para esta enzima se siguió la técnica descrita por Lamb y Rubery (1975).

2.2.1.-Extracción.

Medio gramo de tejido fue homogeneizado en frío en un mortero con 6ml de solución amortiguadora Trizma HCl 0.1M pH 7.5 . El homogenado se filtró a través de una capa doble de gasa y fue centrifugado a 12,850Xg 20 minutos y a 0°C. El sobrenadante se utilizó como fuente enzimática.

2.2.-Ensayo.

La mezcla de ensayo contenía 1.5ml de solución amortiguadora Trizma HCl 0.1M (150 μ moles) pH 7.5, 0.25ml de mercaptoetanol 0.012 M (3 μ moles), 0.25ml de ácido cinámico 0.008M (2 μ moles), 0.25ml de glucosa-6-fosfato 0.02M

(5 μ moles), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (0.4 unidades), 0.25ml NADP 0.008M (2 μ moles) y 0.5ml de extracto de enzima. Se incubó a 30°C durante una hora en agitación vigorosa. La reacción se detuvo con la adición de 0.1ml de HCl 6N.

La mezcla fue llevada a pH 11 con NaOH 5N y fue extraída dos veces con 5ml de éter dietílico. Las fases orgánicas obtenidas en ambas extracciones fueron evaporadas en rotavapor a 22°C hasta la sequedad y resuspendidas con 3ml de NaOH 1.0M.

La formación de ácido cumárico fue medida espectrofotométricamente a 340 nm contra un blanco en el que la reacción fue detenida con HCl 6N antes de incubarla. Para ajustar a cero de absorbancia se utilizó NaOH 1.0M.

2.3. - ACIDO CUMARICO 3-HIDROXILASA (AC3H).

La actividad de esta enzima se determinó según Russell y Conn (1967), pero utilizando ácido cumárico como sustrato.

2.3.1.-Extracción.

El procedimiento fue el mismo que se utilizó para AC4H.

2.3.2.-Ensayo.

La mezcla de ensayo contenía 1.5ml de solución amortiguadora Trizma HCl 0.1M (150 μ moles) pH 7.5, 0.25ml de mercaptoetanol 0.012M (3 μ moles), 0.25ml de ácido cumárico 0.008M (2 μ moles), 0.25ml de glucosa-6-fosfato 0.02M (5 μ moles), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (0.4 unidades), 0.25ml de NADP 0.008M (2 μ moles) y 0.5ml de extracto de enzima. Se incubó a 30°C durante una hora en agitación

vigorosa. La reacción se detuvo con la adición de 0.1ml de HCl 6N.

La mezcla fue extraída dos veces con 5.0ml de éter dietílico y se recuperaron las fases orgánicas, se evaporó el éter en rotavapor a 22°C, hasta la sequedad. El residuo se resuspendió con 0.5ml de metanol absoluto.

Se desarrolló una cromatografía en capa fina y se raspó en el Rf indicado para ácido cafeico (Tabla II, apendice). La muestra se leyó a 316 nm contra un blanco que se inactivó con 0.1ml de HCl 6N antes de la incubación. Se ajustó a cero de absorbancia con metanol absoluto.

2.4.-ACIDO CAFEICO O-METIL TRANSFERASA (ACOMT).

La actividad de ACOMT fue determinada según Shimada et al.,(1970).

2.4.1.-Extracción.

Medio gramo de tejido fue homogeneizado, centrifugado y recuperado igual que para las hidroxilasas.

2.4.2.-Ensayo.

La mezcla de ensayo contenía 0.2ml de solución amortiguadora Trizma HCl 1M pH 8.0, 0.1ml de ácido cafeico 0.01M (1 μ mol), 0.1ml de 0.04M de MgCl₂ (4 μ moles), 0.1ml de 0.005M de S-adenosilmetionina (0.5 μ moles) y 1.0ml del extracto enzimático. La mezcla fue incubada a 30°C durante una hora y la reacción fue detenida con 0.1ml de HCl 1N.

Se extrajo dos veces con 2.5ml de éter dietílico, el éter se evaporó en rotavapor a 22°C hasta la sequedad y el

residuo se recuperó con 0.5ml de metanol absoluto.

Se desarrolló la cromatografía en capa fina de acuerdo con el inciso 2.3.2 y se raspo en el Rf indicado para ácido ferúlico (Tabla II, apendice). Se leyó el recuperado a 323nm, contra un blanco inactivado antes de iniciar la reacción. El ajuste de la absorbancia se hizo con metanol absoluto.

2.5. -CAPSAICINOIDE SINTETASA (CS).

Se siguió la técnica reportada por Iwai et al.,(1978).

2.5.1.-Extracción.

Medio gramo de tejido fue homogeneizado en frío en un mortero con 6ml de solución amortiguadora Trizma HCl 0.1M y pH 6.8, filtrando por doble gasa y centrifugando a 12,850Xg por 20 minutos a 0°C. Se recuperó el sobrenadante.

2.5.2.-Ensayo.

La mezcla de ensayo contenía 0.1ml de Trizma HCl 0.4M (μmol) pH 6.8, 0.025ml de vanillilamina 0.2M ($5\mu\text{moles}$), 0.025ml de ATP 0.04M ($1\mu\text{mol}$), 0.025ml MgCl_2 0.04M ($1\mu\text{mol}$), 0.025ml de ácido isocáproico 0.04M ($1\mu\text{mol}$) y 0.3ml de extracto enzimático. La mezcla fue incubada a 37°C durante una hora y la reacción fue detenida con 0.1ml de HCl 1N.

La mezcla fue extraída con 2.5ml de cloroformo el que se evaporó hasta la sequedad en un rotavapor a 50°C. El residuo se recuperó con 0.5ml de metanol absoluto. Se desarrolló la cromatografía en capa fina de acuerdo al con el inciso 2.3.2 y se raspó en el Rf indicado para capsaicina

(Tabla II, apendice). Se leyó el filtrado a 280nm contra un blanco inactivado. Para ajustar a cero se utilizó metanol absoluto.

2.6. -DEFINICION DE ACTIVIDAD ESPECIFICA.

La actividad específica de todas las enzimas en este estudio se define como los nmoles de producto liberados por 1mg de proteína en 1 minuto.

3.-DETERMINACION DE PROTEINAS.

El contenido de proteínas en los extractos enzimáticos fue determinado por el método de Bradford (1976) usando albumina de suero bovino como patrón (Tabla III y Figuras A y B, apendice)

4.-ESPECTROS DE ABSORCION.

Se realizaron los espectros de absorción del ácido cinámico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico y capsaicina (Figuras C-G, apendice), y también se establecieron sus curvas patrón de concentración, que fueron linearizadas por el método de mínimos cuadrados para obtener la ecuación correspondiente (Figuras H-L, apendice).

Para estas mediciones así como para las de actividad enzimática se utilizó un espectrofotómetro DU-6 Beckman.

RESULTADOS.

1.-Crecimiento de callo.

La curva de crecimiento de callo (Fig 1, Tabla IV apendice) nos muestra que es a partir del decimoquinto día después del cultivo cuando el crecimiento parece entrar en la fase estacionaria y permanece en esta hasta el vigesimo día.

2.-Determinaciones enzimáticas en callo.

En cuanto a las actividades enzimáticas en callo, las actividades de FAL, AC3H, ACOMT Y CS alcanzaron sus valores máximos el séptimo día mientras que para AC4H el valor mayor estuvo dado el decimoprimer día después del cultivo aunque el séptimo día también registró un aumento de actividad. Las otras enzimas también tuvieron otros picos de actividad que fueron : para FAL el día 13; AC4H el día 13 y como ya se mencionó el día 7; AC3H el día 11; ACOMT el día 15 y por ultimo CS los días 11 y 13. Para CS la actividad a los días 3 y 5 no fue detectable. El experimento fue repetido con un segundo cultivo, y los cambios en la actividad fueron similares, lo mismo que los picos de actividad máxima, aunque las actividades fueron un poco menores que las medidas en el primer experimento (datos no mostrados).

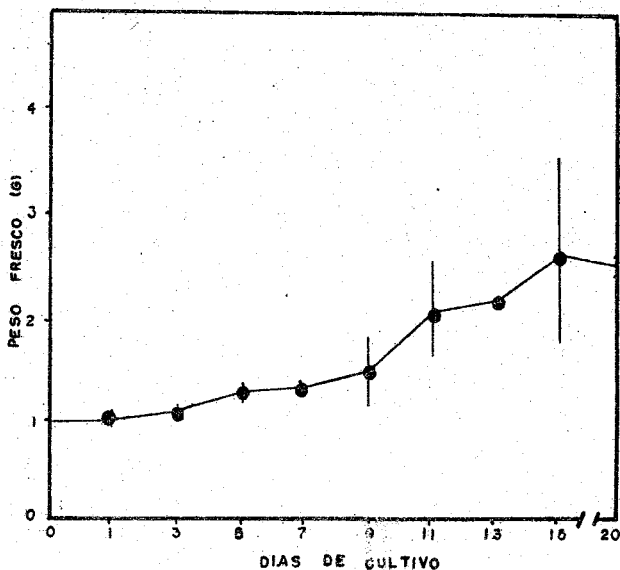


Figura 1.-Curva de crecimiento de callos de chile cultivados en el medio MS conteniendo $6.25 \mu\text{M}$ de 2,4-D y $0.44 \mu\text{M}$ de BA. Cada valor representa la media de tres replicas y las barras sus desviaciones estandar.

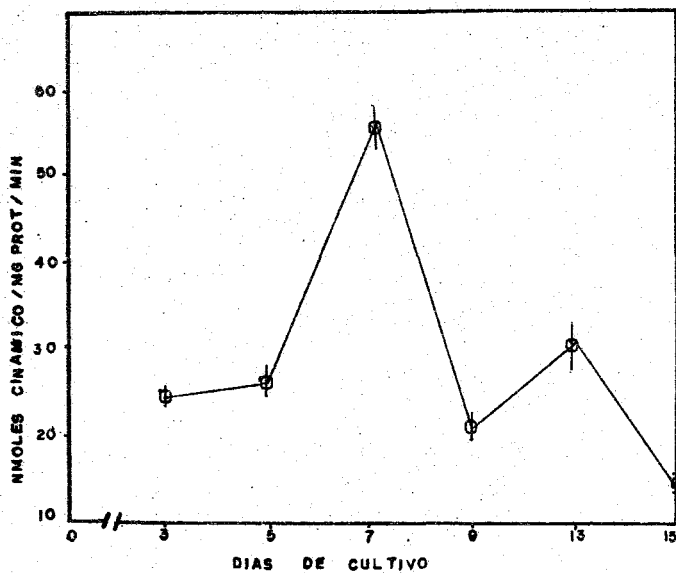


Figura 2.-Actividad enzimática de Fenilalanina amonio liasa (PAL) en callo de chile durante quince días de cultivo. Cada punto representa la media de tres replicas y las barras sus desviaciones estandar.

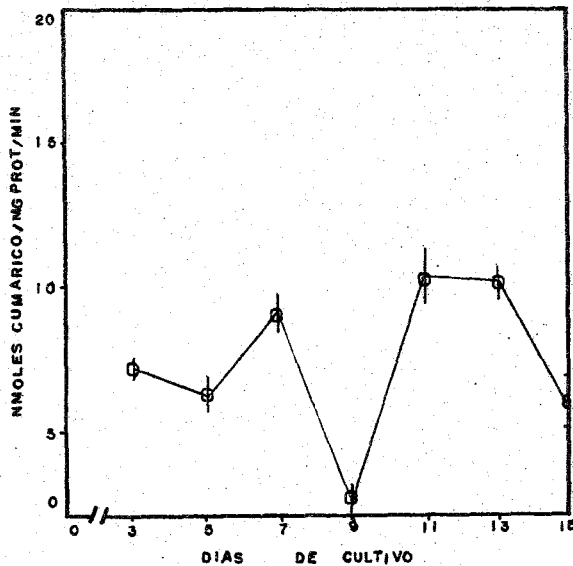


Figura 3.-Actividad enzimática de ácido cinámico 4-hidroxilasa (AC4H) en callo de chile durante quince días de cultivo. cada punto representa la media de tres replicas y las barras sus desviaciones estandar.

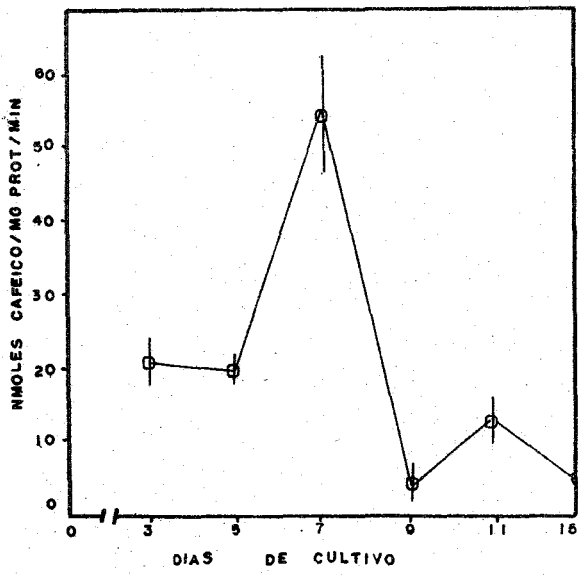


Figura 4.-Actividad enzimática de ácido cumárico 3-hidroxisasa (AC3H) en callo de chile durante quince días de cultivo. Cada punto representa la media de tres replicas y las barras sus desviaciones estandar.

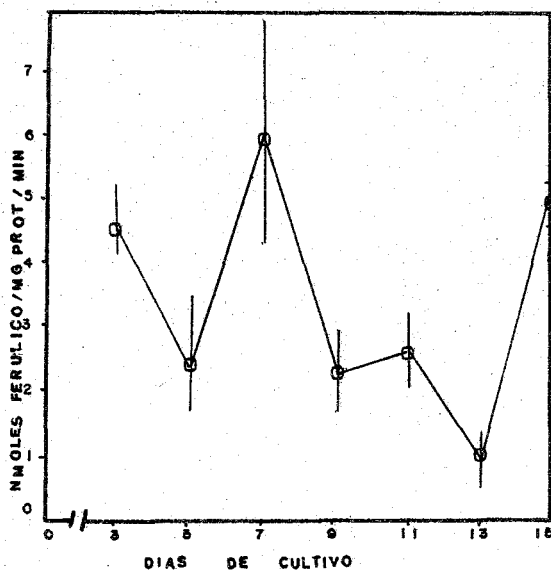


Figura 5.-Actividad enzimática de ácido cafeico o-metil transferasa (ACOMT) en callo de chile durante quince días de cultivo. Cada punto representa la media de tres replicas y las barras sus desviaciones estandar.

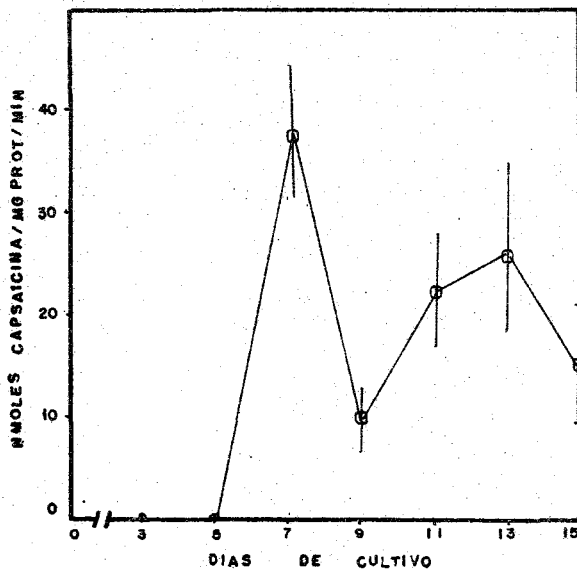


Figura 6.-Actividad enzimática de capsaicinoide sintetasa (CS) en callo de chile durante quince días de cultivo. Cada punto representa la media de tres replicas y las barras sus desviaciones estandar.

3.-Crecimiento del fruto.

La curva de crecimiento de chile tanto en talla como en peso (Fig.7, Tabla V apendice) nos muestra que el fruto de chile serrano Tampiqueño 74 (*Capsicum annuum* L.) alcanza su talla máxima hasta el día 30 después de iniciada la floración, aunque el crecimiento en peso continuó por el engrosamiento del fruto.

4.-Actividades enzimáticas en fruto de chile.

Las actividades enzimáticas en chile para FAL, AC4H, AC3H, ACOMT y CS (Figs. 8, 9, 10, 11 y 12 respectivamente, Tabla VII apendice) mostraron los picos de mayor actividad para todas el día 30 después de iniciada la floración, FAL y AC4H tuvieron un pequeño pico el día 15 y la actividad de CS no fue detectable hasta el día 22. Los valores obtenidos para chile fueron mayores que los que se obtuvieron en callo (Figs.2-6) aunque para las tres primeras fue menos notorio siendo los valores máximos de actividad en chile para FAL 50%, AC4H 35% y AC3H 25% mayores que los máximos obtenidos en callo, mientras que para ACOMT y CS la actividad llegó a ser hasta aproximadamente cinco y seis veces respectivamente mayores en chile que en callo (en el día 30 después de iniciada la floración).

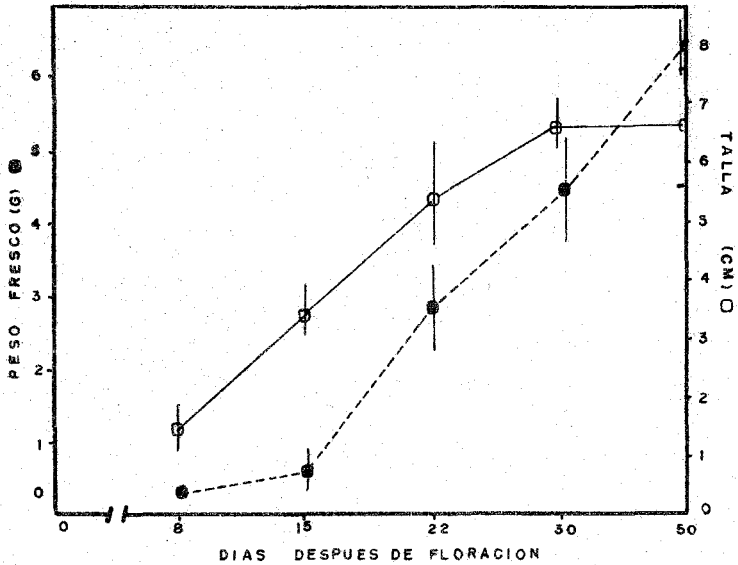


Figura 7.-Crecimiento de fruto de chile (*Capsicum annuum* L.) en peso fresco y en longitud después de iniciada la floración. Cada valor representa la media de tres replicas y las barras sus desviaciones estandar

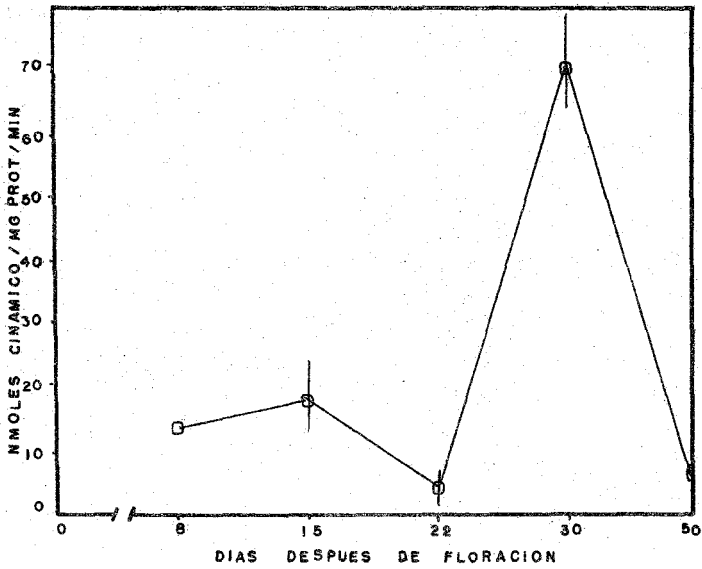


Figura 8.-Actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa (PAL) en fruto de Chile. Cada punto representa la media de tres replicas y las barras sus desviaciones estandar.

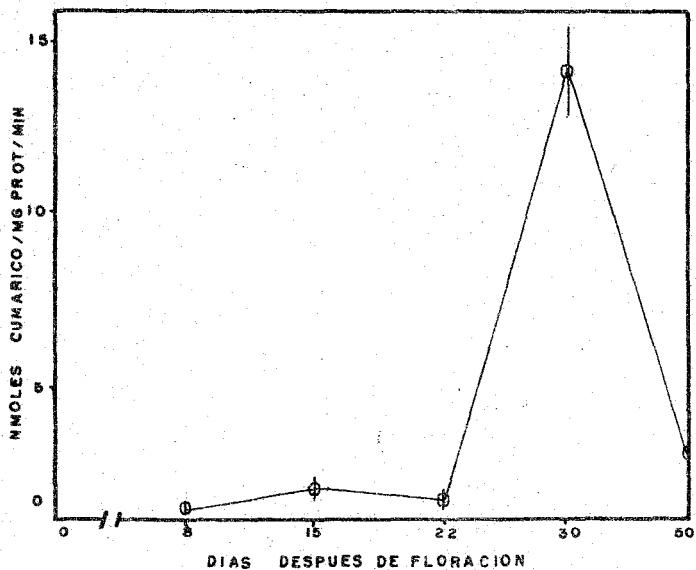


Figura 9.-Actividad enzimática de ácido cinámico 4-hidroxilasa (AC4H) en fruto de Chile. Cada punto representa la media de tres replicas y las barras sus desviaciones estandar.

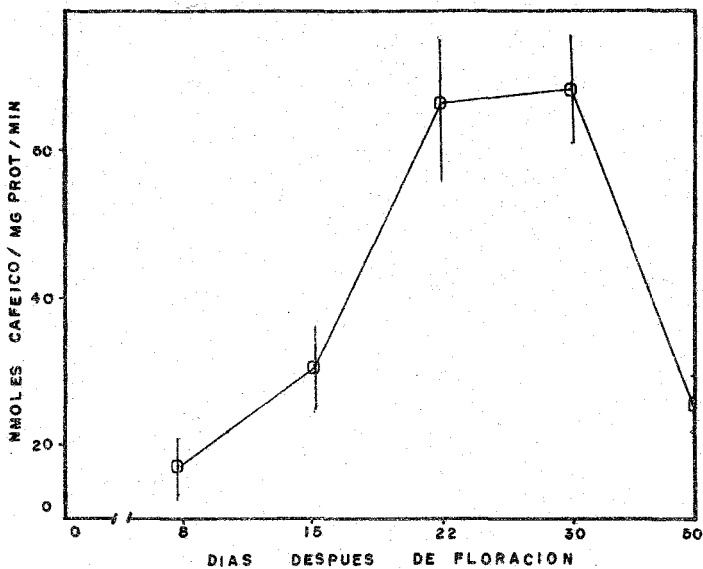


Figura 10.-Actividad enzimática de ácido cumárico 3-hidroxilasa (AC3H) en fruto de Chile. Cada punto representa la media de tres replicas y las barras sus desviaciones estandar.

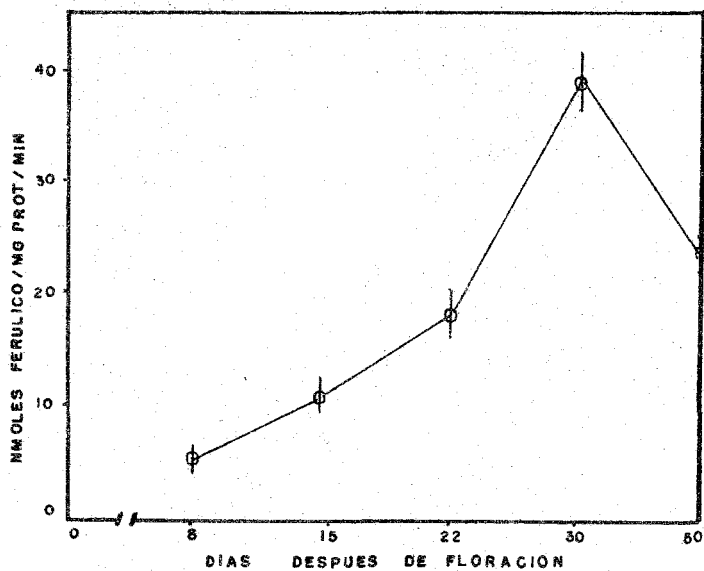


Figura 11.-Actividad enzimática de ácido cafeico o-metil transferasa (ACOMT) en fruto de Chile. Cada punto representa la media de tres replicas y las barras sus desviaciones estandar.

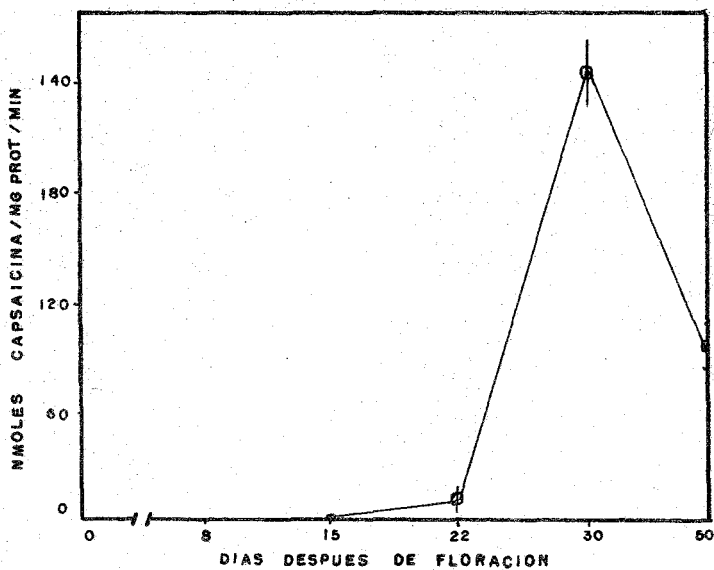


Figura 12.-Actividad enzimática de capsaicinoide sintetasa (CS) en fruto de chile. Cada punto representa la media de tres replicas y las barras sus desviaciones estandar.

DISCUSION

El crecimiento de callo parece entrar en su fase estacionaria de crecimiento en el decimoquinto día después del cultivo (Fig. 1), mientras que los picos máximos de actividad enzimática se dieron en el séptimo día, CS incluso fue en este día cuando empezó a registrar actividad (Figs. 2-6). La relación inversa entre metabolismo primario (en este caso crecimiento celular) y metabolismo secundario (síntesis de capsaicinoides) basada en la competencia en la utilización de precursores comunes propuesta por Lindsey y Yeoman (1985), podría explicarnos por qué CS no muestra actividad detectable los primeros días sino hasta el séptimo día cuando probablemente el metabolismo primario disminuye y la síntesis de capsaicinoides se inicia, en tanto que las otras enzimas (FAL, AC4H, AC3H y ACOMT) sí están activas pues intervienen también en otras rutas metabólicas, como la de producción de ligninas para la formación de la pared celular que parece ser la que más compite por los fenilpropanoides precursores de capsaicina (Hall *et al.*, 1987).

Por otro lado el fruto de chile alcanza su talla máxima el día 30 después de su floración, en el que se registró también el pico máximo de actividad para FAL, AC4H, AC3H, ACOMT y CS que hasta el día 22 empezó a tener actividad, lo que nos indica que la competencia entre el metabolismo primario y secundario ya mencionada también es notoria en

fruto, y que cuando el fruto alcanza su talla máxima y el metabolismo primario comienza a disminuir es cuando la producción de capsaicinoides se inicia (Hall et al., 1987). También podemos notar que FAL y AC4H mostraron un pequeño pico en el día 15 que no se ve reflejado en la actividad de CS que como ya se hizo notar solo a partir del día 20 presentó actividad, esto puede deberse a que los productos de FAL y AC4H están siendo utilizados en otras vías de síntesis como se mencionó para callo, lo mismo que los productos de AC3H y ACOMT que aunque no registraron este pico sí tuvieron actividad los días 8 y 15.

Comparando los valores encontrados en callo y en fruto se ha demostrado que la síntesis de capsaicina en callo y en cultivos celulares es menor que en fruto (Holden et al., 1987) como lo ha observado también Salgado Garciglia (comunicación personal) que trabajando en la misma variedad ha encontrado que la concentración de capsaicinoides en células en suspensión es 15 veces menor que en fruto, por lo que es de esperarse que la actividad enzimática también lo sea. Esto fue cierto para todas las enzimas pero la diferencia en las actividades de las tres primeras enzimas (FAL, AC4H Y AC3H) de callo con respecto a fruto son pequeñas y solo son notorias en los picos de mayor actividad, en los cuales los valores obtenidos para fruto fueron aproximadamente un 30% para FAL, un 35% para AC4H, y de un 25% para AC3H mayores que los valores máximos de callo, en cambio para ACOMT y CS los

diferencias fueron superiores, pues los valores de actividad máximos de Chile fueron cinco y seis veces respectivamente mayores que los de Callo, lo que indica que realmente existe una mayor actividad enzimática en Chile sobre todo en las últimas enzimas de la ruta de los capsaicinoides que se ve reflejada en la mayor producción de estos metabolitos en fruto.

CONCLUSIONES.

De todo lo mencionado anteriormente podemos concluir que la actividad de CS no fue detectable en los primeros días después del cultivo en callo ni en fruto en los primeros días después de iniciada la floración, mientras que FAL, AC4H, AC3H y ACOMT sí presentan actividad en esos días, por lo que, podemos suponer que otros metabolitos fenilpropanoides como la lignina, en cuya ruta biosintética intervienen estas enzimas, se está produciendo y que la síntesis de capsaicinoides se inicia cuando el metabolismo primario dado por el crecimiento celular y el crecimiento del fruto empieza a disminuir.

Por último comparando la funcionalidad de la ruta de biosíntesis de capsaicinoides en tejido indiferenciado podemos decir que los valores de actividad enzimática en callo en general fueron menores que en fruto pero solo ACOMT y CS mostraron una diferencia mayor resultando sus actividades

maximas 2015 veces mayores en tejido diferenciado (fruto) que en tejido dediferenciado (callo), por lo que puede ser que la actividad de estas enzimas sea una limitante en la síntesis de capsaicinoides en callo.

BIBLIOGRAFIA

- Balbba, S. L., Karawaya, M. S., y Girgis, A. N. (1986). The capsaicin content of *Capsicum* fruits at different stages of maturity, *Lloydia*. 31:272-280.
- Bennett, D. J., y Kirby, G. W. (1968). Constitution and biosynthesis of capsaicin. *J. Chem. Soc.* 442-446.
- Bhojwani, S.S. y Razdan, M.K. (1983). *Plant Tissue Culture Theory and Practice*. Elsevier. Amsterdam. 511 p.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Butt, V. S. y Lamb, C. J. (1981). Oxigenases and the metabolism of plants. In *The Biochemistry of Plants*. Vol.7. Stumpf y Conn Eds. Academic Press. New York. pp. 627-665.
- Camm, E. L. y Towers, N. H. (1973). Effect of ageing on enzymes of phenylpropanoid metabolism in *Solanum tuberosum* discs. *Phytochem.* 12:1575-1580.
- Cumha, A. (1987). The estimation of L-phenylalanine ammonia-lyase shows phenylpropanoid biosynthesis to be regulate by L-phenylalanine supply and availability. *Phytochem.* 26:2723-2727.
- Ebel, J., Schaller, B., Knobloch, H. K., Wellman, E., Grisebach, H. y Hahlbrock, K. (1974). Coordinated changes in enzyme activities of phenylpropanoid

- metabolism during the growth of soybean cell suspension cultures. *Biochim. Biophys. Acta.* 362:417-424.
- Finkle, B. J. y Kelly, S. H. (1974). Catechol o-methyltransferases in pampas grass. Differentiation of m- and p-methylating activities. *Phytochem.* 13:1719-1725.
- Fujiwake, H., Suzuki, T., Iwai, K. (1980a). Intracellular localization of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruit II The vacuole as the intracellular accumulation site of capsaicinoid in the protoplast of *Capsicum* fruit. *Plant Cell Physiol.* 21:1023-1030.
- Fujiwake, H., Suzuki, T., Oka, S. e Iwai, K. (1980b). Enzymatic formation of capsaicinoids from vanillylamine and iso-type fatty acids by cell-free extracts of *Capsicum annum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa. *Agric. Biol. Chem.* 44:2907-2912.
- Fujiwake, H., Suzuki, T. e Iwai, K. (1982a). Intracellular distributions of enzymes and intermediates involved in biosynthesis of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruits. *Agric. Biol. Chem.* 46:2685-2689.
- Fujiwake, H., Suzuki, T. e Iwai, K. (1982b). Capsaicinoid formation in the protoplasts from the placenta of *Capsicum* fruits. *Agric. Biol. Chem.* 46:2591-2592.
- Gamborg, O. L. (1966). Aromatic Metabolism in Plants. II Enzymes of the shikimate pathway in suspension cultures of plant cell. *Can. J. Biochem.* 44:791-799.

- Gilbert, A., Ranjeva, R. y Boudet, A. (1972). Recherches sur les enzymes catalysant la biosynthese des acides phénoliques chez *Quercus pedunculata*. III. Formation séquentielle, a partir de la phénylalanine, des acides cinnamique, p-coumarique et caféique, par des organites cellulaires isolés. *Physiol. Plant.* 27:240-243.
- Goodwin y Mercer. (1983). *Plant Phenolics*. In *Plant Biochemistry*. Pergamon Press. New York. 624 p.
- Govindarajan, V. S. (1986). *Capsicum* production, technology, chemistry and quality. Part III. Chemistry of the color, aroma and pungency stimuli. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 24:245-355.
- Hadon, L y Northcote, D. H. (1976). Correlation of the induction of various enzymes concerned with phenylpropanoid and lignin synthesis during differentiation of bean callus (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta.* 128:255-262.
- Hahlbrock, K., Ebel, J., Ortmann, R., Sutter, A., Wellman, E., y Grisebach, H. (1971). Regulation of enzyme activities related to the biosynthesis of flavone glycosides in cell suspension cultures of parsley (*Petroselinum hortense*). *Biochem. Biophys. Acta.* 244:7-15.
- Hahlbrock, K. y Wellman, E. (1973). Light-independent induction of enzymes related to phenylpropanoid metabolism in cell suspension cultured from parsley.

Biochem. Biophys. Acta. 304:702-706.

- Hahlbrock, K. (1976). Regulation of phenylalanine ammonia lyase activity in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* apparent rates of enzyme synthesis and degradation. Eur. J. Biochem. 63:137-145.
- Hall, R. D., Holden, M. A. y Yeoman, M. M. (1987). The accumulation of phenylpropanoid and capsaicinoid compounds in cell cultures and whole fruit of the chilli pepper, *Capsicum frutescens* Mill. Plant Cell Tissue and Organ Culture 8:163-176.
- Hanson, R. K. y Havar, E. A. (1981). Phenylalanine ammonia-lyase. In The Biochemistry of Plants. Vol.7. Stumpf y Conn Eds.. Academic Press. New York. pp. 576-621.
- Heresh, F. y Jurenitsh, J. (1979). Off-line mass spectrometric monitoring of HPLC effluents an improved identification and quantitation method for mixtures of similar compounds. Natural capsaicinoids. Chromatograph. 12:647-650.
- Higuchi, T., Shimada, M. y Ohashi, H. (1967). Role of Methyl trasferase in the lignification of bamboo. Agr. Biol. Chem. 31:1459-1465.
- Holden, M. A., Hall, R. D., Lindsey, K. y Yeoman, M. M. (1987) Capsaicin biosynthesis in cell cultures of *Capsicum frutescens*. In Plant and Animal Cell Process. possibilities. Webb y Mavituna Eds. EllisHorwood Lim. New York. pp.45-62.

- Iwai, K., Lee, K., Kobashi, M. y Suzuki, T. (1977a).
Formation of pungent principles in fruits of sweet
pepper *Capsicum annuum* L. var *grossum* during
postharvest ripening under continuous light. Agric.
Biol. Chem. 41:1873-1876.
- Iwai, K., Suzuki, T., Lee, K., Kobashi, M. y Oka, S.
(1977b). *In vivo* and *in vitro* formation of
dihydrocapsaicin in sweet pepper fruits. *Capsicum*
annuum L. var. *grossum*. Agric. Biol. Chem.
41:1877-1882.
- Iwai, K., Lee, K., Kobashi, M., Suzuki, T. y Oka, S. (1978).
Intracellular localization of the capsaicinoid
synthesis enzyme in sweet pepper fruits. Agric. Biol.
Chem. 42:201-202.
- Iwai, K., Suzuki, T. y Fujiwake, H. (1979). Formation and
accumulation of pungent principle of hot pepper fruits,
capsaicin and its analogues in *Capsicum annuum* var
annuum cv. Karayatsubusa at different growth stages
after flowering. Agric. Biol. Chem. 43:2493-2498.
- Jurenitsh, J., Kuberka, W., y Jentzsch, K. (1978). Gas
chromatographic determination of the content of
individual and total capsaicinoids in *Capsicum* fruits
after thin layer chromatographic separation. Sci. Pharm.
46:307-312.
- Koop, B., Jurenitsch, J. y Kubelka, W. (1980). Biosynthesis
of capsaicinoids in *Capsicum annuum* var *annuum*. Planta

Med. 39:289-293.

- Kosuge, S. y Furata, M. (1970). Studies on the pungent principles of *Capsicum*. XIV. Chemical constitution of the pungent principles. Agric. Biol. Chem. 34:248-255.
- Koukol, J. y Conn, E.E. (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of *Hordeum vulgare*. J. Biological. Chem. 236:2692-2698.
- Lamb, C. J. y Rubery, P. H. (1975). A espectrophotometric assay for transcinamic acid 4-hydroxylase activity. Anal. Biochem. 68:554-561.
- Lette, E. y Louden, M. (1968). Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. J. Am. Chem. Soc. 90:6837-6841.
- Lindsey, K. (1984). The synthetic potential of immobilised cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. *annuum*. Planta. 162:495-501.
- Lindsey, K. y Yeoman, M. (1984). The viability and biosynthetic activity of cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. *annuum* immobilised in reticulate polyurethane. J. Exp. Bot. 35:1684-1690.
- Lindsey, K. (1985). Manipulation by nutrient limitation of the biosynthetic activity of immobilised cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. *annuum*. Planta. 165:126-133.
- Lindsey, K. (1986). Incorporation of ^{14}C phenylalanine and

- ¹⁴C) cinnamic acid into capsaicin in culture cells of *Capsicum frutescens*. *Phytochem.* 25:2793-2801.
- León, Portilla, M. (1961). *Visión de los vencidos*. UNAM. México. 137 p.
- Moore, F. W. (1970). Food habits in non-industrial societies. In *Dimensions of nutrition*. Du Pont, J. Ed. Associated University Press. Colorado. pp. 460-582.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*15:473-497.
- Oba, K. y Conn, E. (1988). Induction of cinnamic acid 4-hidroxylase in developing maize seedlings. *Phytochem.* 27:2447-2450.
- Pickersgill, B. (1969). The domestication of chili peppers. In *The domestication and exploitation of plants and animals*. Ucko, B. J. y Dimbleby, G. W., Eds. Gerald Duckworth. London. pp. 587-611.
- Poulton, J., Halbrock, K. y Grisebach, H. (1976). Enzymic synthesis of lignin precursors. Purification and properties of the S-adenosyl L-methionine: caffeic acid 3-O-methyltransferase from soybean cell suspension cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* 176:449-456.
- Poulton, J. E. (1981). Transmethylation and demethylation reactions in the metabolism of secondary plant products. In *The Biochemistry of Plants*. Vol.7. Stumpf y Conn Eds. Academic Press. New York. pp. 667-723.

- Purseglove, J. W., Brown, E. G., Green, C. L. y Robbins, S. J. (1981). Chillies: *Capsicum* sp. In Spices Vol.1. Logman. New York. pp. 331-439.
- Rhodes, J. C., Hill, C. R., y Wooltorton, L. (1976). Activity of enzymes involved in lignin biosynthesis in swede root disks. *Phytochem.* 45:707-710.
- Rowland, B. J., Villalon, N. B. y Burns, E. (1983). Capsaicin production in sweet bell and pungent jalapeno peppers *J. Agric. Food. Chem.* 31:484-487.
- Russell, D. W. y Conn, E. E. (1967). The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* 122:256-258.
- Russell, D. W. (1971). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. X. Properties of the cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings and some aspects of its metabolic and developmental control. *J. Biol. Chem.* 246:3870-3878.
- Shimada, M., Ohashi, H., Higuchi, T. (1970). O-methyltransferases involved in the biosynthesis of lignins. *Phytochem.* 9:2463-2470.
- Staba, J. E. (1980). Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. CRC. Florida. 285 p.
- Stafford, H. A. (1974). Possible multienzyme complexes regulating the formation of C₆-C₃ phenolic compounds and lignins in higher plants. In Recent Advances in Phytochemistry. Vol.8. Runeckles y Conn Eds. Academic

Press. New York. pp. 53-79.

- Stafford, H. A. (1981). Compartimentalization in natural products biosynthesis by multienzyme complexes. In *The Biochemistry of Plants*. Vol.7. Stumpf y Conn Eds. Academic Press. New York. pp 117-137.
- Sugano, N., Itawa, R. y Nishi, A. (1975). Formation of phenolic acid in carrot cells in suspension cultures. *Phytochem.* 14:1205-1207.
- Suzuki, T., Fujiwake, H. e Iwai, K. (1980). Intracellular localization of capsaicin and its analogues, capsaicinoid, in *Capsicum* fruit. 1.-Microscopic investigation of the estructure of the placenta of *Capsicum annuum* var *annuum* cv. Karayatsubusa. *Plant Cell Physiol.* 21:839-853.
- Suzuki, T., Kawada, T., Iwai, K. (1981a). The precursors affecting the composition of capsaicin and its analogues in the fruits of *Capsicum annuum* var *annuum* cv. Karayatsubusa. *Agric. Biol. Chem.* 45:535-537.
- Suzuki, T., Kawada, T. e Iwai, K. (1981b). Biosynthesis of acyl moieties of capsaicin and its analogues from valine and leucine in *Capsicum* fruits. *Plant Cell Physiol.* 22:23-32.
- Suzuki, T. e Iwai, K. (1984). Constituents of red pepper species. Science of the pungent principle of *Capsicum* species. In *The alkaloids*. Vol.23. Brossi Eds. Academic Press. Florida. pp. 227-299.

- Wescott, R. J. y Henshaw, G. G. (1976). Phenolic synthesis and phenylalanine amonia-lyase activity in suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L. *Planta*. 131:67-73.
- Whitaker, R. J. y Hashimoto, T.(1986). Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 4. Cap. 10. Evans, Sharp y Ammirato Eds. McMillan. New York. pp. 264-287.
- Zucker, M. (1965). Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol*. 40:779-781.

APENDICE

TABLA I. PREPARACION DE MEDIO MS

Compuesto	Concentración	
	Stock	Medio MS
<u>Macronutrientes</u>		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1000 X (50ml) 22g	1ml/l
KNO ₃		1.9g/l
NH ₄ NO ₃		1.65g/l
KH ₂ PO ₄	400 X (50ml) 3.4g	2.5ml/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	400 X (50ml) 7.4g	2.5ml/l
<u>Fierro</u>		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	200 X (100ml) 0.557g	5ml/l
Na ₂ EDTA	0.745g	
<u>Micronutrientes</u>		
KI	1000 X (50ml) 0.0415g	1ml/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O ^(a)	(a) De una sol 2.5mg/ml se toma 0.5ml para la sol. anterior.	
HBO ₃	400 X (50ml) 0.124g	2.5ml/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O ^(b)	(b) De una sol. 25 mg/ml se toma 0.2 ml para la sol. anterior.	

MnSO₄.H₂O 400 X (50ml) 2.5ml/l
0.336g

ZnSO₄.7H₂O^(c) (c) De una sol
172mg/ml se toma
1.0ml para la
sol. anterior.

CuSO₄.5H₂O^(d) (d) De una sol
2.5mg/ml se toma
0.2ml para
sol. anterior.

Vitaminas

Glicina 100 X (250ml) 10ml/l
50mg
Piridoxina HCl 12.5mg
Ac. Nicotínico 12.5mg

Tiamina HCl^(e) (e) De una sol
2.5 mg/ml se toma
1.0ml
Inositol 2.5g

Sacarosa 30g/l

Gel rite 3g/l

pH 5.8

TABLA II. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Pasos	Material y Metodos
Preparación de capa adsorbente	-20g de silica gel. -44ml agua desionizada 0.22ml de fluoresceina.
Aplicación de la placa	En placas de vidrio (20X20cm) espesor de la capa 1mm (preparativa) Tiempo de fraguado 2-4 min.
Activación de la placa	En estufa a 100°C durante 1 hr
Aplicación de las soluciones problema	50 μ l de cada muestra a una distancia de 1.5 cm del borde inferior.
Desarrollo	Solvente. Benceno:Acido acético 4:1 (V/V). Altura 15cm a partir del punto de aplicación
Revelado	Indicador fluorescente(fluoresceina) Lámpara U. V.
Rf	Rfs obtenidos. A. Cafeico 0.2 (3/15cm) A.Ferulico 0.53 (8/15cm) Capsaicina 0.4 (6/15cm)

Recuperación

Raspado de la placa en el Rf
indicado \pm 1 cm
% de recuperación 80%.

Lectura

Se recupera con 4 ml de metanol en
un embudo Büchner filtrando por
papel Whatman No. 1. Y se lee el
filtrado a la longitud de onda
correspondiente.

TABLA III. DETERMINACION DE PROTEINAS

METODO BRADFORD (1976).

MACRO

200-1400 μ g/ml

50 μ l de la muestra + 2.5 ml del reactivo de Bradford (Bio Rad) diluido (Dilución 1:5 con agua).

MICRO

-25 μ g/ml

0.8 ml de muestra + 0.2 ml del reactivo de Bradford (Bio Rad) concentrado.

Reposar 5 minutos a temperatura ambiente

Medir absorbancia a 595 nm

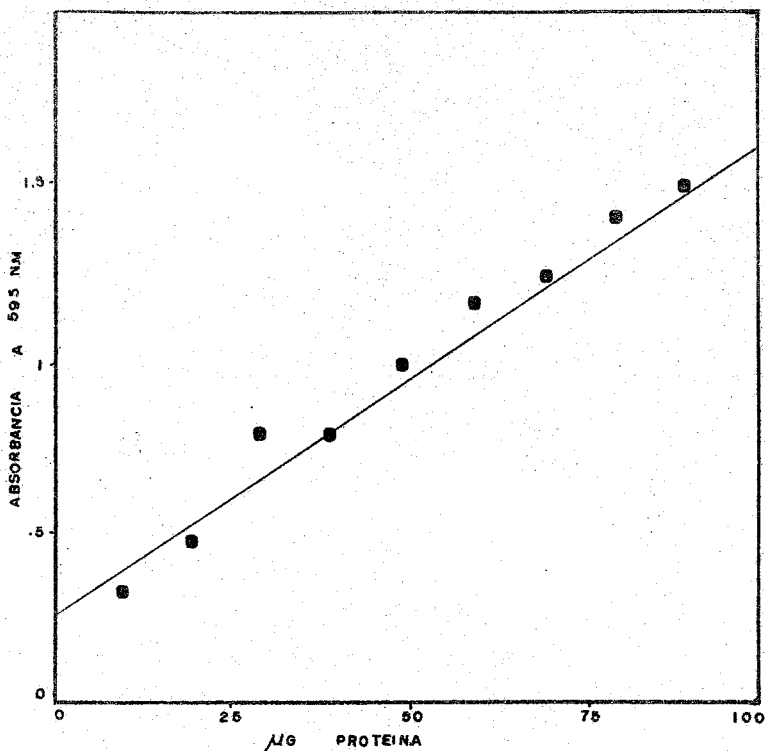


Figura A). Curva patrón de proteínas, determinadas por el método Bradford (Macro). Los puntos representan los valores experimentales y la línea la regresión polinomial obtenida por el método de mínimos cuadrados. La ecuación y la varianza también obtenidos por este método fueron.

Ecuación. $y = 2.617 \times 10^{-1} - 1.346 \times 10^{-2}(x)$

Varianza. -4.082×10^{-3}

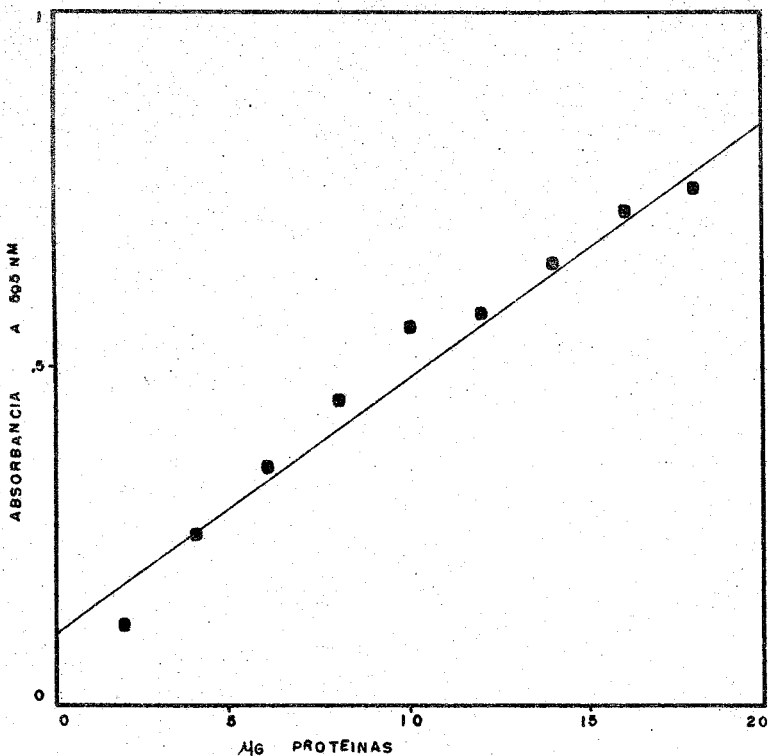


Figura B). Curva patrón de proteínas, determinadas por el método Bradford (Micro) Los puntos representan los valores experimentales y la línea la regresión polinomial obtenida por el método de mínimos cuadrados. La ecuación y la varianza también obtenidos por este método fueron.

Ecuación. $y = 1.031 \times 10^{-1} - 3.742 \times 10^{-2}(X)$

Varianza. -1.028×10^{-3}

TABLA IV.-CRECIMIENTO DE GALLO

DIA	PESO FRESCO (g) MEDIA (X)	DESVIACION ESTANDAR (S)
0	1.0	0
1	1.0	0
3	1.062	0.0362
5	1.2498	0.0840
7	1.3233	0.02877
9	1.4227	0.3551
11	2.1114	0.4278
13	2.1523	0.09956
15	2.6157	0.9818

TABLA V.- CRECIMIENTO DE CHILE

DIA	TALLA (cm) X	S	PESO FRESCO (g) X	S
8	1.5	0.5	0.3153	0.15
15	3.5	0.4	0.6277	0.22
22	5.5	1.0	2.8623	0.51
30	6.5	0.8	4.4067	1.3
50	6.5	0.5	6.5041	2.9

TABLA VI.- ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN GALLO

DIA	ENZIMA. MEDIA (DESVIACION ESTANDAR).				
	FAL	AC4H	AC3H	ACOMT	CS
3	14.5(2.0)	7.2(0.36)	21.6(3.2)	5.7(0.6)	ND*
5	16.7(2.1)	6.3(0.33)	20.3(1.3)	3.4(0.7)	ND
7	46.9(2.2)	9.2(0.47)	55.3(8.0)	7.1(1.7)	38.1(6.6)
9	10.7(1.7)	2.4(0.13)	4.4(0.5)	3.3(0.6)	9.5(2.7)
11	- - - -	10.5(0.96)	13.7(2.5)	3.8(0.5)	22.4(5.4)
13	20.8(4.2)	10.2(0.6)	- - - -	1.9(0.4)	26.6(8.8)
15	4.7(0.8)	5.3(0.7)	4.2(0.4)	6.5(0.3)	13.7(4.9)

TABLA VII.- ACTIVIDAD ENZIMATICA EN CHILE.

DIA	ENZIMA. MEDIA (DESVIACION ESTANDAR)				
	FAL	AC4H	AC3H	ACOMT	CS
8	14.2(1.7)	1.2(0.09)	16.6(4.5)	4.7(0.9)	ND*
15	18.8(5.8)	1.9(0.10)	29.9(5.5)	10.8(1.7)	ND
22	4.8(2.0)	1.5(0.14)	66.8(8.4)	17.9(1.9)	10.4(2.5)
30	71.9(6.6)	14(2.4)	68.9(7.4)	38.4(2.9)	248(17.7)
50	4.0(0.7)	1.2(0.06)	24(3.8)	22.1(2.3)	81(14.3)

* Actividad no detectable.

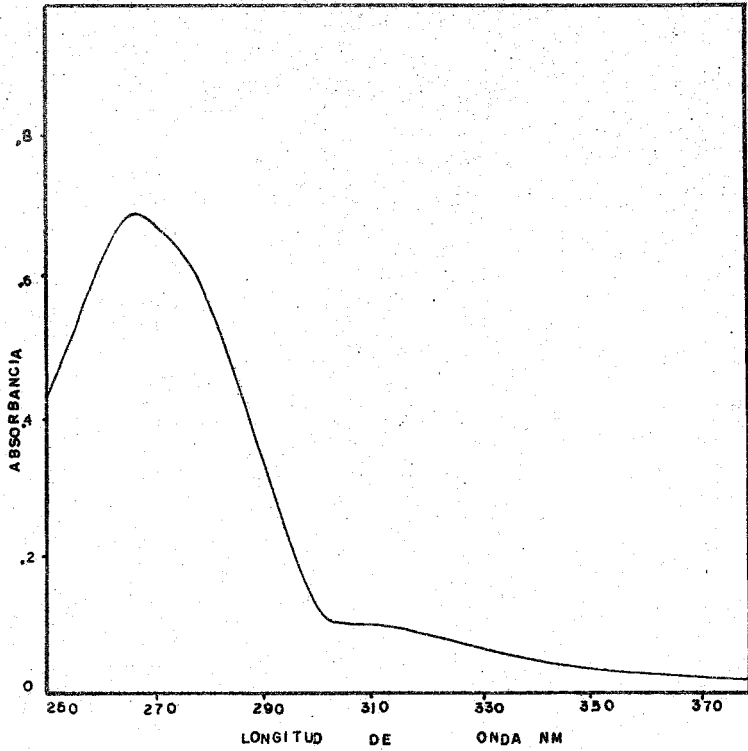


Figura (C).-Espectro de absorción del ácido cinámico en NaOH 0.05N.

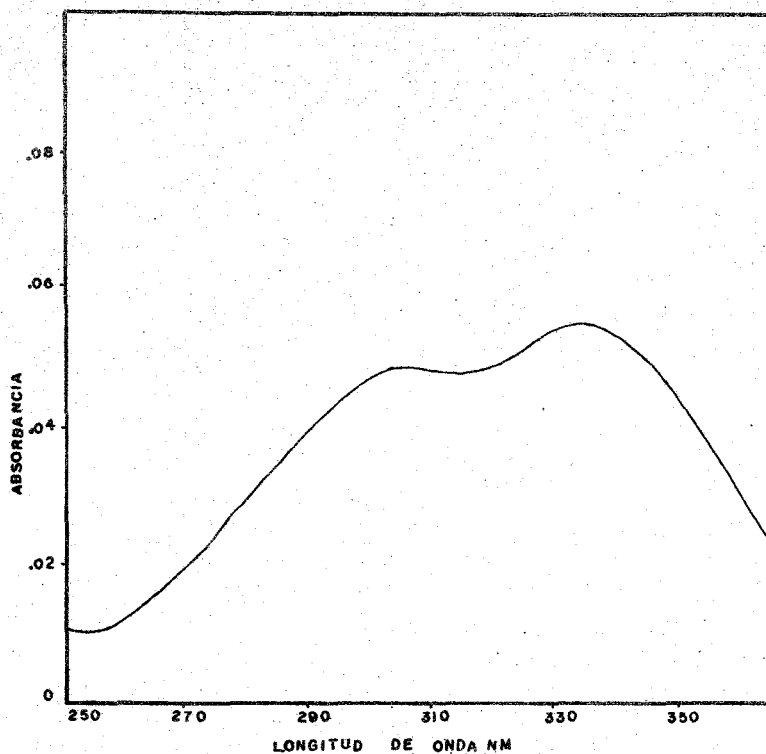


Figura (D).-Espectro de absorción del ácido cumárico en NaOH 1M.

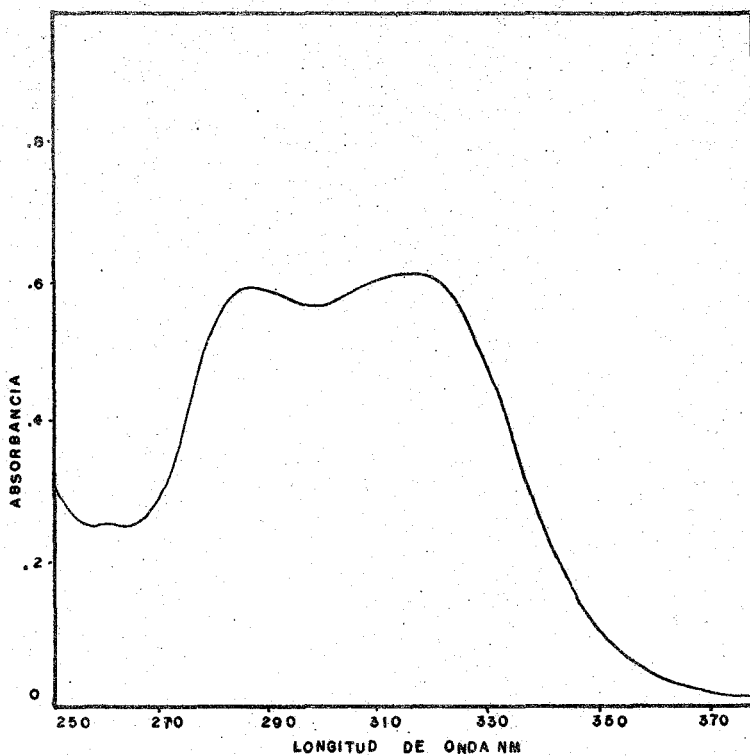


Figura (E).-Espectro de absorción del ácido cafeico en metanol absoluto.

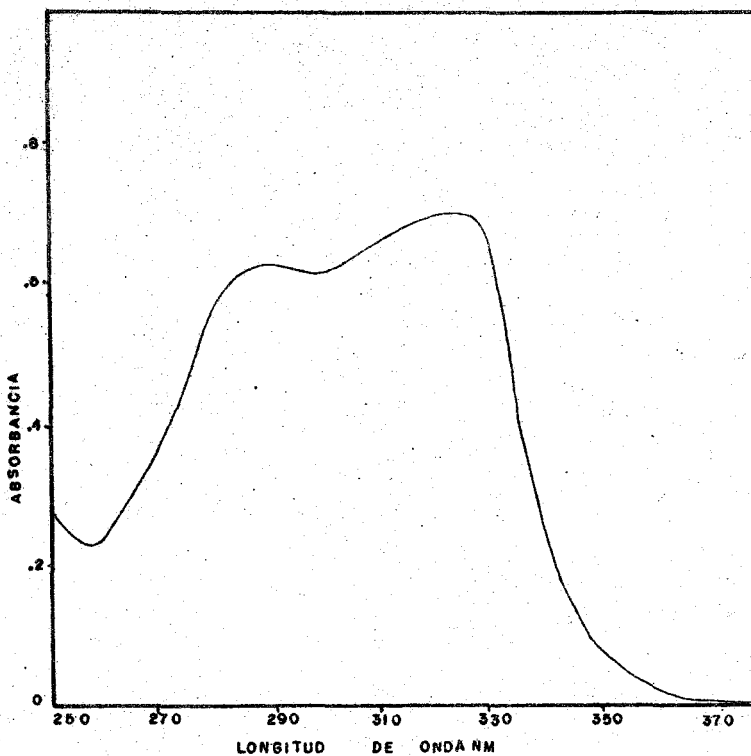


Figura (F).-Espectro de absorción del ácido ferúlico en metanol absoluto.

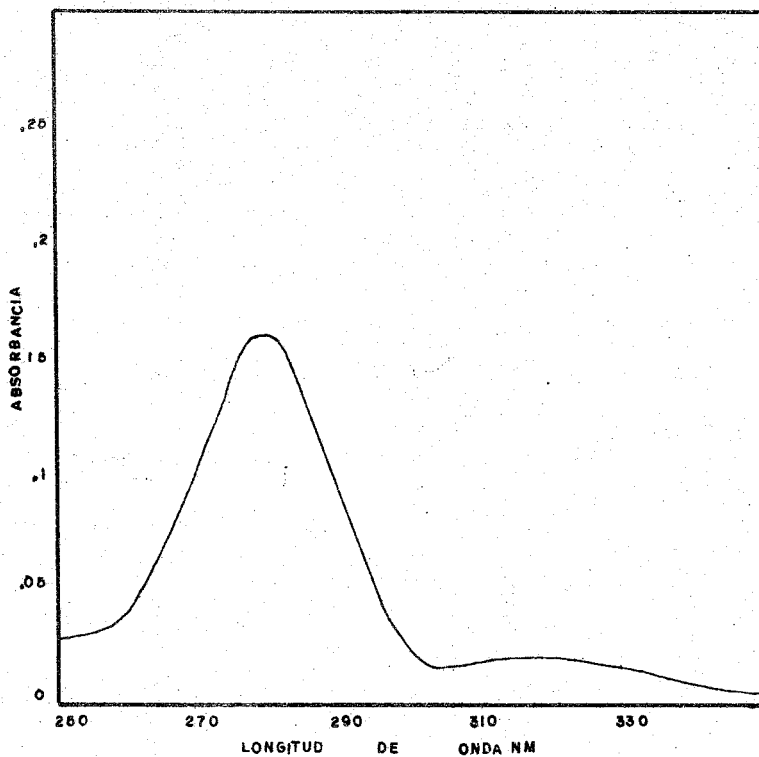


Figura (6).-Espectro de absorción de capsaicina en metanol absoluto.

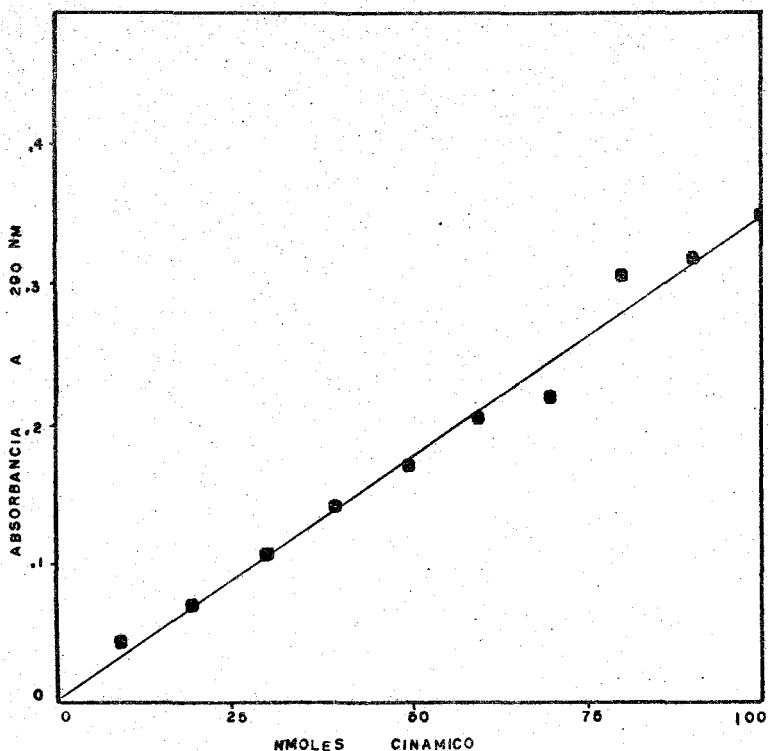


Fig. (H).-Curva patrón de concentración de ácido cinámico en NaOH 0.05N . Los puntos representan los valores experimentales y la línea la regresión polinomial obtenida por el método de mínimos cuadrados. La ecuación y la varianza obtenidas también por este método fueron:

Ecuación. $y = 1.267 \times 10^{-3} + 3.499 \times 10^{-3}(x)$

Varianza. -1.491×10^{-4}

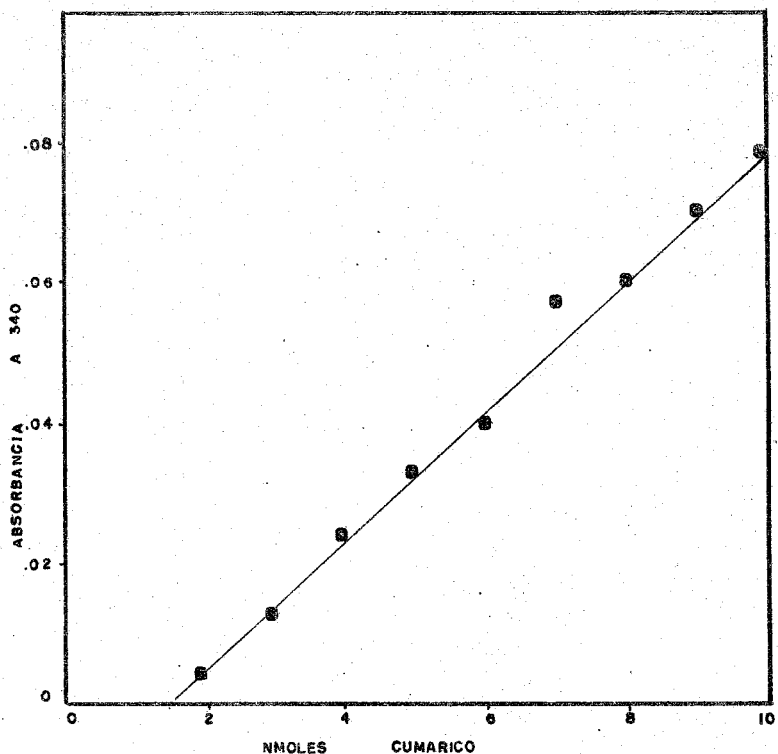


Fig. (D).-Curva patrón de concentración de ácido cumárico en NaOH 1M. Los puntos representan los valores experimentales y la línea la regresión polinomial obtenida por el método de mínimos cuadrados. La ecuación y la varianza obtenidas también por este método fueron:

Ecuación. $y = -1.287 \times 10^{-2} + 9.285 \times 10^{-3}(X)$

Varianza. -5.541×10^{-4}

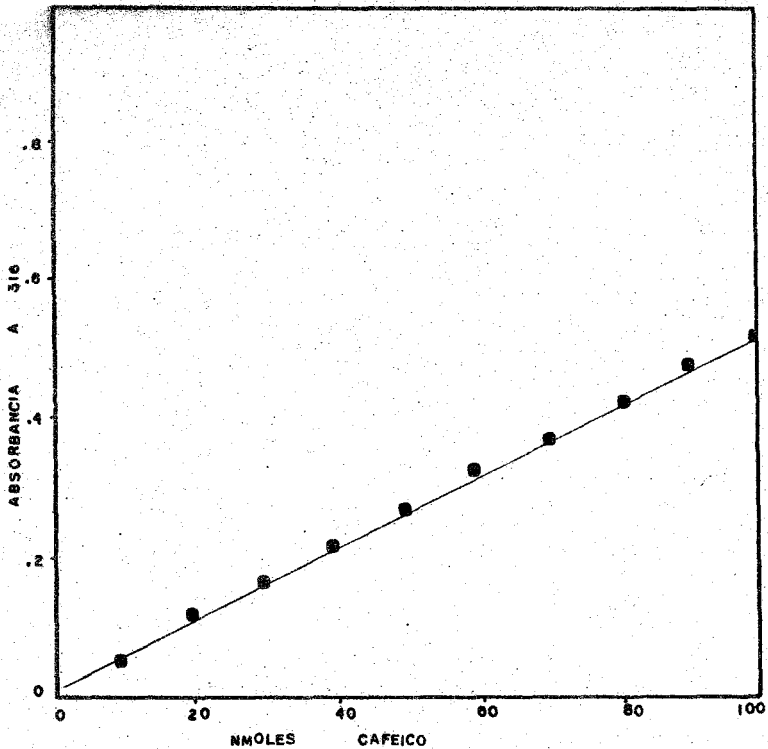


Fig. (J).-Curva patrón de concentración de ácido cafeico en metanol absoluto. Los puntos representan los valores experimentales y la línea la regresión polinomial obtenida por el método de mínimos cuadrados. La ecuación y la varianza obtenidas también por este método fueron:

Ecuación. $y = 7.860 \times 10^{-3} - 5.129 \times 10^{-3}(x)$

Varianza. -2.346×10^{-3}

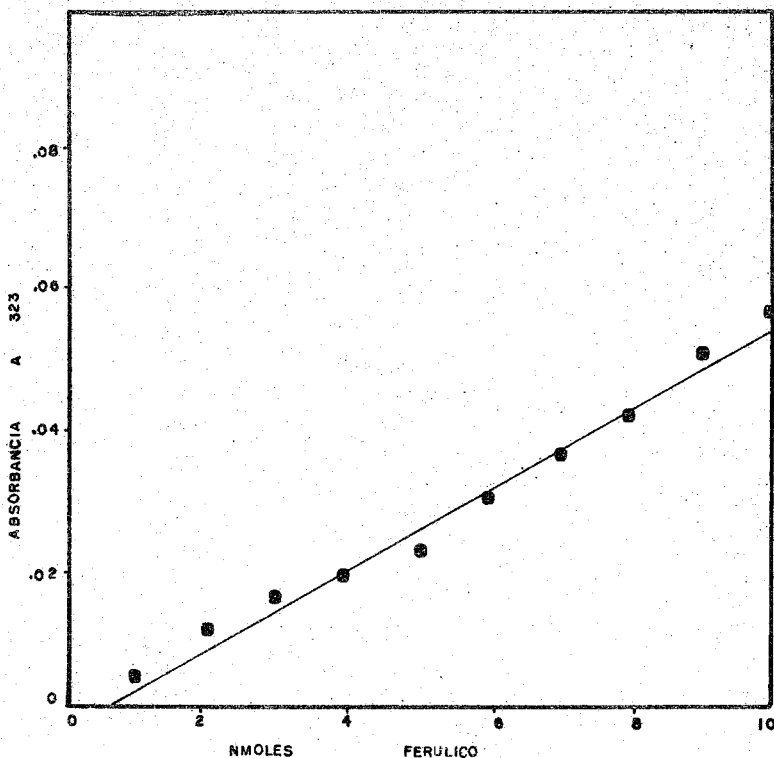


Fig. (K).-Curva patrón de concentración de ácido ferúlico en metanol absoluto. Los puntos representan los valores experimentales y la línea la regresión polinomial obtenida por el método de mínimos cuadrados. La ecuación y la varianza obtenidas también por este método fueron:

Ecuación. $y = -2.800 \times 10^{-3} + 5.691 \times 10^{-3}(x)$

Varianza. -3.862×10^{-6}

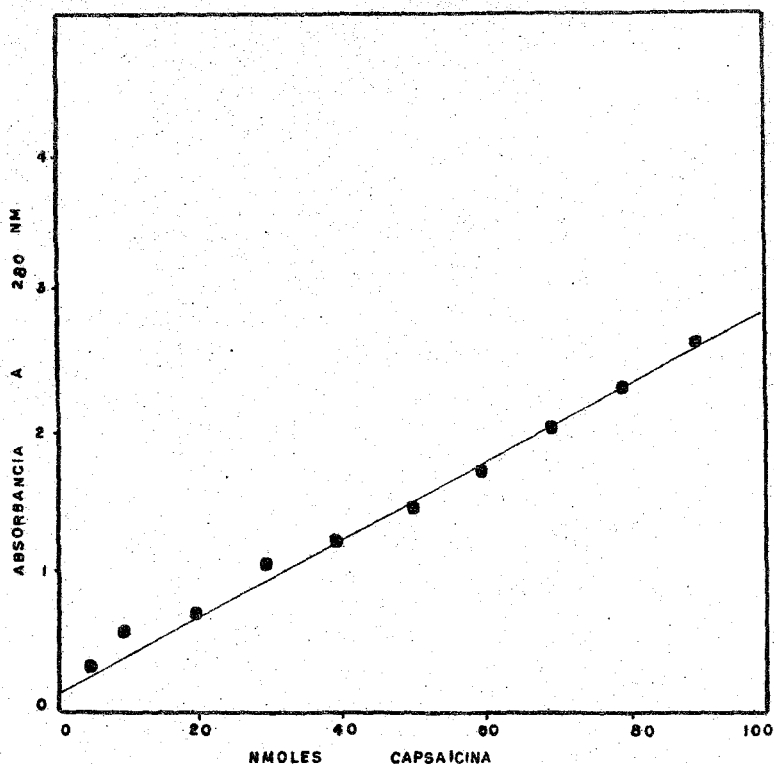


Fig. (L).-Curva patrón de concentración de capsaicina en metanol absoluto. Los puntos representan los valores experimentales y la línea la regresión polinomial obtenida por el método de mínimos cuadrados. La ecuación y la varianza obtenidas también por este método fueron:

Ecuación. $y = -1.359 \times 10^{-2} x^2 + 2.751 \times 10^{-3} x$

Varianza. -6.549×10^{-5}