

ACTIVIDAD DE CLOROFILASA DURANTE LA MADURACIÓN DEL BANANO BOCADILLO (*MUSA ACCUMINATA*) (SIMONS)

CLOROPHYLLASE DURING BABY BANANA (*MUSA ACCUMINATA*) (SIMONS) RIPENING

Marcela Castro-Benítez¹, Luz Patricia Restrepo-Sánchez², Carlos Eduardo Narváez-Cuenca³

Resumen

La enzima clorofilasa, presente en la corteza del banano bocadillo (*Musa accuminata*), fue extraída, parcialmente purificada y caracterizada empleando como sustrato clorofila (Chl-a) proveniente también de la corteza de la fruta. Además, se evaluó la intensidad respiratoria, la producción de etileno y la actividad de clorofilasa durante el almacenamiento del banano bocadillo a 20 °C. La caracterización parcial de la clorofilasa indicó que esta enzima tiene un pH óptimo de 7,0, temperatura óptima de 40 °C y K_M y V_{MAX} de 0,034 μ M Chl-a y 364 μ M Chl-a hidrolizada/min/mg proteína, respectivamente. El ensayo de almacenamiento de los frutos indicó que el climaterio se da luego de 11 días de la cosecha, en el cual la intensidad respiratoria, la producción de etileno y la actividad de clorofilasa fueron máximas. El color verde de la corteza desapareció paulatinamente hasta llegar al climaterio, momento en el que predominó el amarillo. Este estudio permite proponer una relación directa entre la actividad de clorofilasa y la degradación de clorofila.

Palabras clave: banano bocadillo, clorofila, clorofilasa, *Musa accuminata*.

Abstract

The chlorophyllase (Chlase) of baby banana's peel (*Musa accuminata*) was extracted, partially purified and characterized using as substrate chlorophyll (Chl-a) extracted from peel of the fruit. The activity of the Chlase was compared with respiratory intensity and ethylene production during storage of the baby banana at 20 °C. The characterization of enzyme showed follow optimal conditions: pH 7.0, 40 °C, K_M 0.034 μ M Chl-a, and V_{MAX} 364 μ M Chl-a hidrolizada/min/mg protein. The storage test of the fruit showed both a climacteric maximum and Chlase maximum after 11 days. In this moment, the green color of the peel disappeared and permitted to see yellow color. This research permits to propose a direct relation between Chlase activity and less of Chl.

Key words: baby banana, chlorophyll, chlorophyllase, *Musa accuminata*.

INTRODUCCIÓN

El banano bocadillo o bananito (*Musa accuminata*) es clasificado como fruto exótico y ha tomado un lugar importante dentro de las exportaciones de frutas del país. Además de Colombia, el bananito se cultiva en Costa Rica, Ecuador, México, Venezuela y Kenya. Las ex-

portaciones de banano bocadillo desde Colombia se han realizado principalmente a Alemania, Francia, Inglaterra y Suiza y, en menor grado a Austria, Canadá, Bélgica, España, Estados Unidos, Holanda y Suecia. Esta fruta se cultiva en condiciones de la zona cafetera, es decir entre 1.000 y 2.000 msnm, con temperaturas entre 16 y 30 °C, precipitación entre 1.800 y 2.000 mm,

¹ Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias. Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Correo electrónico: <marcela.castro@javeriana.edu.co>.

² Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Correo electrónico: <lprestrepos@unal.edu.co>.

³ Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Correo electrónico: <cenarvaezc@unal.edu.co>.

con suelos de acidez neutra, ricos en cenizas volcánicas y topografía quebrada.

El banano bocadillo puede ser almacenado por encima de 12 °C (su temperatura crítica). Por debajo de esta temperatura el bananito sufre lesiones por frío reflejándose principalmente en fluctuaciones de la intensidad respiratoria, bajos niveles de ácidos carboxílicos y azúcares; estas lesiones se evidencian con manchas oscuras en los haces vasculares, encharcamiento y cristalización en algunas zonas de la corteza, alta contaminación fúngica, pérdida de sabor y aroma, pardeamiento y falta de la transición de color verde a amarillo en la corteza (Bustos y Coy, 1995; Díaz y Porras, 1998). En un intento por conservar por un mayor tiempo la calidad sensorial del banano bocadillo en el grupo de investigación “Estudio de los cambios químicos y bioquímicos de alimentos frescos y procesados” del departamento de Química (Universidad Nacional), se ha recurrido al uso de inhibidores de etileno (Pardo, 2002), choques con CO₂ (Suárez y Ariza, 1996) y choques térmicos (Serrato, 1999), solos o combinados con refrigeración por debajo de 12 °C con resultados poco alentadores, observándose en estos casos alteraciones en la maduración normal, dentro de las cuales se ubica la permanencia anormal del color verde en la corteza de los frutos, lo que permite proponer que estos tratamientos inhiben la degradación de la clorofila.

La clorofila (Chl) y otros pigmentos asociados a ella se encuentran en los cloroplastos. Estos cloroplastos tienen un sistema de membranas tilacoidales, que con frecuencia se comunican para formar pilas de sacos membranosos denominados grana y que se encuentran incrustados en el estroma. Los pigmentos —entre ellos la Chl—, y las enzimas —entre ellas la clorofilasa—, que controlan la fotosíntesis se localizan sobre las membranas tilacoidales en suborganelos denominados cuantosomas y en el estroma (Dixon y Webb, 1964). Durante la maduración de la mayoría de frutos se da un cambio de color verde a amarillo, rojo, entre otros; el color verde se debe a la presencia de Chl y la pérdida de

este color a su degradación. Las causas primordiales de esta degradación son los cambios de pH, el desarrollo de procesos oxidativos y la acción de clorofilasas. La clorofilasa (C. E. 3.1.1.14, Chlase) se ha relacionado no sólo con la hidrólisis del enlace éster del fitol, sino también con el catabolismo de la Chl (Funamoto et al., 2002; Guevara et al., 2003; Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera, 2002; Jacob-Wilk et al., 1999; Thomas y Janave, 1992; Trebitsht et al., 1993), en este sentido existen reportes en los que se indica una relación directa entre la pérdida de la Chl y la actividad de Chlase (Funamoto et al., 2002; Guevara et al., 2003; Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera, 2002; Jacob-Wilk et al., 1999; Trebitsht et al., 1993) mientras que otros muestran una relación inversa (Thomas y Janave, 1992). Si es cierto que la clorofilasa está involucrada en la degradación de la clorofila, la evaluación del efecto de algunos factores como la concentración de sustrato, el pH, la temperatura y el estado de madurez del fruto sobre la actividad de la clorofilasa, puede ayudar a explicar el efecto producido al aplicar diversos tratamientos, en los que se presenta como una de las causas de deterioro la falta de degradación del color verde en la corteza del fruto.

Este trabajo se planteó con el objetivo de caracterizar parcialmente la clorofilasa de la corteza de banano bocadillo y su asociación con algunos cambios fisiológicos durante la maduración de estos frutos a 20 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Adquisición de la muestra. Los frutos de banano bocadillo fueron cosechados en la Hacienda Palestina, un cultivo tecnificado localizado en Melgar (Tolima), Colombia. Los frutos se seleccionaron en estado 1 a 2 correspondiente al color verde entre 90 y 100% en su corteza. Se escogieron las manos de la parte media del racimo y se sumergieron en agua con sulfato de aluminio. Del lugar de cultivo fueron transportados en la madrugada, vía terrestre en ca-

miones no refrigerados, hasta bodegas en la ciudad de Bogotá D. C. (Colombia), lugar en donde fueron tomadas las muestras para los diferentes análisis.

Extracción y cuantificación de clorofilas. La clorofila fue extraída de la corteza de los bananos para realizar las pruebas de actividad de la clorofilasa con el sustrato endógeno. Debido a que la clorofila es fotosensible e inestable al calor, la técnica de extracción se llevó a cabo en condiciones de oscuridad o bajo luz roja en cuarto oscuro, a una temperatura máxima de 4 °C (Iriyama et al., 1974). Se seleccionaron 10 frutos en estado 1 a 2, se retiró la corteza y una muestra de 100 g de corteza fue homogenizada con 500 ml de metanol durante 3 min. El jugo de color verde, fue filtrado a través de algodón y centrifugado a 1.000 g durante 5 min. El sobrenadante obtenido fue mezclado con dioxano (1:7, extracto:dioxano). Posteriormente se adicionó agua destilada gota a gota (entre 80 a 100 ml), con agitación hasta la aparición de turbidez. La mezcla fue mantenida en reposo durante 1 h en un baño de hielo para permitir la cristalización de la clorofila. La fracción superior fue separada y de la inferior, densa, de color verde oscuro, fue obtenida la clorofila parcialmente purificada. Esta última fracción fue centrifugada a 10.000 g durante 5 min y el sobrenadante fue desechado. El pélet, rico en clorofila, fue sometido a un segundo proceso de purificación con la adición secuencial de metanol, dioxano y agua. La cuantificación de clorofilas a y b (Chl-a y Chl-b) se realizó por medida de la absorbancia a 649 y 665 nm, calculando su concentración de acuerdo a las siguientes ecuaciones (Klein y Vishniac, 1961):

$$\text{Chl-a (mg/ml)} = 11,63A_{665\text{nm}} - 2,39A_{649\text{nm}}$$

$$\text{Chl-b (mg/ml)} = 20,11A_{649\text{nm}} - 5,18A_{665\text{nm}}$$

$$\text{Chl-total (mg/ml)} = 6,45 A_{665\text{nm}} + 17,72A_{649\text{nm}}$$

En total, se efectuaron cinco extracciones y en cada extracto se cuantificó la clorofila.

Obtención del extracto enzimático y evaluación de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para poder caracterizar parcialmente la clorofilasa fue necesario extraerla de la matriz en estudio. La extracción se realizó en el flavedo de los frutos en estado 4 (50% verde, 50% amarillo en corteza), en condiciones de oscuridad, a una temperatura máxima de 4 °C (Dixon y Webb, 1964). Para aumentar la fuerza iónica y extraer la enzima que está interactuando con los organelos a través de interacciones iónicas se empleó buffer fosfatos y KCl; además, se empleó tritón x-100 para inestabilizar las membranas, pues se sabe que este tipo de enzimas están ligadas a través de enlaces covalentes a una fracción lipoproteica en los cloroplastos, insoluble en agua, denominada cloroplastina (Klein y Vishniac, 1961). Para iniciar el proceso de extracción se obtuvo el flavedo de un conjunto de cortezas provenientes de 12 bananos y éste fue homogenizado con acetona a -20 °C, en relación 1 a 2 (m:v) durante 3 min. La suspensión resultante fue filtrada al vacío y el residuo (polvos de acetona) lavado con acetona a -20 °C hasta lograr un filtrado incoloro. Los polvos de acetona fueron agitados durante 24 h con buffer fosfatos 100 mM, KCl 50 mM y Tritón x-100 0,24%, pH 7,0 (relación flavedo:extractante, 25:72, w:v). La suspensión resultante fue filtrada y centrifugada a 10.000 g durante 30 min, el sobrenadante fue la fracción denominada extracto crudo; al extracto crudo se le cuantificó la proteína y la actividad de clorofilasa. Para purificar parcialmente la enzima y concentrarla, el extracto crudo fue sometido a precipitación secuencial con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40, 60 y 80% así: al extracto crudo se adicionó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para hacer que la solución quedara al 40% a 4 °C, una vez lograda la precipitación de las proteínas se centrifugó a 10.000 g durante 1 h y se separó el sobrenadante del pélet. El sobrenadante proveniente de la precipitación anterior fue precipitado nuevamente con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pero al 60%; luego de la centrifugación, el nuevo sobrenadante fue precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80% y centrifugado. Cada uno de los pélets obtenidos, luego de la precipitación y centrifugación fue resuspendido en agua destilada y se sometió a diálisis

hasta fin de sulfatos; posteriormente, en cada extracto dializado se cuantificó la proteína y la actividad de clorofilasa.

Medida de la actividad de la clorofilasa. Para medir la actividad de clorofilasa durante el fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se adicionó un volumen de extracto enzimático que contuviese 0,1 mg de proteína sobre una solución que contenía 0,1 μM de Chl-a en buffer fosfatos 100 mM, pH 7,0 para un volumen final de 7,0 ml. La reacción se llevó a cabo en condiciones de oscuridad con agitación a 160 rpm durante 30 min e incubación a 37 °C. De la mezcla de reacción enzimática se tomaron 0,5 ml en el tiempo 0 y 30 min y se depositó sobre tubos que contenían una mezcla de acetona/hexano/KOH, 4/6/1 (v/v/v). La mezcla resultante se agitó y se centrifugó a 5.000 g durante 5 min. Al final, para evaluar la hidrólisis de la Chl-a se leyó la absorbancia a 667 nm en la fase de acetona: a esta longitud de onda se lee el contenido de clorofilida-a, generada por la hidrólisis de la Chl-a (Klein y Vishniac, 1961; Thomas y Janave, 1992; Trebitsht et al., 1993). Una unidad de actividad enzimática (U Chlase) fue definida como μM de Chl-a hidrolizada/min y la actividad específica como U Chlase/mg proteína. Para calcular la actividad específica se cuantificó la proteína, de acuerdo al método microkjeldahl (AOAC, 1990). Las extracciones fueron efectuadas por duplicado y sobre cada extracto se evaluó el efecto de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre la actividad específica de Chlase.

Efecto de la concentración de sustrato, del pH y de la temperatura sobre la actividad enzimática. Para efectuar estos ensayos, el extracto enzimático fue obtenido como está descrito previamente, excepto que se hizo un único fraccionamiento, no secuencial, con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80%. Con el fin de conocer la afinidad de la clorofilasa por la clorofila, ambas extraídas a partir de la corteza del banano bocadillo, se estudió el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática para lo cual se ensayaron seis concentraciones de Chl-a comprendidas entre 0,001 y 0,1 μM en buffer fosfatos 100 mM a pH 7,0 y 40 °C y se calcularon los valo-

res de K_M y $V_{M\text{AX}}$. Para estimar el efecto del pH se evaluó la actividad enzimática a valores de pH entre 2,0 a 10,0 a 37 °C, empleando Chl-a 0,068 μM así: buffer glicina-HCl 100 mM, pH 2,0 y 3,0, acetatos 100 mM, pH 4,0 y 5,0, fosfatos 100 mM, pH 6,0 y 7,0, Tris-HCl, pH 8,0 a 10,0. Para evaluar el efecto de la temperatura los ensayos se efectuaron variando la temperatura entre 20 a 70 °C a intervalos de 10 °C en buffer fosfatos 100 mM, pH 7,0 empleando Chl-a 0,068 μM . Para obtener la temperatura deseada en los ensayos se empleó un baño termostataado con un intervalo de variación de 1 °C. Las extracciones fueron efectuadas por duplicado y sobre cada extracto se evaluó el efecto de la concentración de sustrato, del pH y de la temperatura sobre la actividad específica de Chlase.

Comportamiento del banano bocadillo durante su almacenamiento. Una cantidad de 120 bananos en estado 1 a 2 de maduración fueron almacenados a condiciones ambientales de Bogotá D. C. (20 °C, 90% HR) y monitoreados durante 24 días a diversos intervalos de tiempo. Durante los días 0, 5, 10, 11, 15, 19 y 24 se evaluó la intensidad respiratoria y la producción de etileno, de dos muestras diferentes de diez bananos, en un cromatógrafo de gases HP 3395 a unas condiciones descritas en un trabajo previo (Rubio, 1999). Durante los días 0, 5, 10, 15, 19 y 24 se efectuó la extracción de la Chlase por duplicado y en cada extracto se cuantificó su actividad con 0,068 μM Chl-a, a 40 °C, en buffer fosfatos 100 mM pH 7,0. En este ensayo de almacenamiento el diseño planteado fue completamente al azar; sobre los resultados obtenidos se efectuaron los ANOVA correspondientes y se evaluó la diferencia entre tratamientos (día de muestreo) de acuerdo a la prueba de Tukey.

RESULTADOS

El contenido de Chl-total (a+b) fue de 4,9 mg/100 g corteza. Una vez efectuado el fraccionamiento de las proteínas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se halló que en el extracto crudo (sin precipitación con sulfato de amonio) y con las precipitaciones al 40 y 60% de

esta sal no se obtuvieron actividades cuantificables de Chlase, mientras que al 80% la actividad fue de 3708 U Chlase/mg proteína, razón por la cual se decidió efectuar un único fraccionamiento (sin incluir la secuencia de precipitación 40 y 60%) con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80% de saturación. La evaluación del efecto de la concentración del sustrato, del pH y de la temperatura se muestra en las figuras 1 A-C, respectivamente. Una vez empleado el modelo de Lineweaver-Burk (figura 1A) se encontró la ecuación de trabajo: $(\text{U Chlase/mg proteína})^{-1} = 2,77 \cdot 10^{-3} + 9,5 \cdot 10^{-5} [\text{Chl-a}]^{-1}$ ($n = 4$, $r = 0,890^*$, correlación significativa). De esta ecuación se encontró un valor de V_{MAX} de 364 U Chlase/mg proteína, medida máxima de la velocidad de rompimiento del complejo enzima-sustrato. De otro lado, la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima, K_M , correspondió a $0,034 \mu\text{M}$ Chl-a. El pH mostró un gran efecto sobre la actividad de Chlase (figura 1B), con una máxima actividad a pH 7,0 y un descenso marcado al alejarse de este valor. De manera similar la Chlase posee un intervalo estrecho de actividad frente a la temperatura (figura 1C), con un máximo a 40°C y una caída súbita en su actividad a valores de temperatura diferentes de 40°C .

En la figura 2A se muestran los resultados de la producción tanto de CO_2 como de etileno y en la figura 2B la actividad de Chlase durante el almacenamiento del banano bocadillo. Para las tres variables de respuesta que aparecen en la figura 2 se obtuvo un efecto altamente significativo del día de almacenamiento. Los frutos manifestaron durante los cinco primeros días un nivel respiratorio bajo, en donde al ser desprendidos de la planta comienzan a utilizar sus propios metabolitos para obtener energía; como resultado de esto la producción de CO_2 se va haciendo cada vez mayor; hacia el día 10 se presenta un máximo en la tasa respiratoria. Los resultados de la producción de etileno muestran un comportamiento similar, con un máximo en el día 10, por lo que luego de 10 días de iniciado el almacenamiento se presenta un máximo respiratorio que corresponde al pico climatérico puesto que en ese día los frutos alcanzaron su mejor grado de madurez

organoléptica. El máximo climatérico encontrado en este trabajo coincide con los reportados en trabajos previos para esta misma especie, donde el punto climatérico oscila entre los días 10 a 12 luego de la cosecha (Bustos y Coy, 1995; Díaz y Porras, 1998; Pardo, 2002; Suárez y Ariza, 1996; Serrato, 1999).

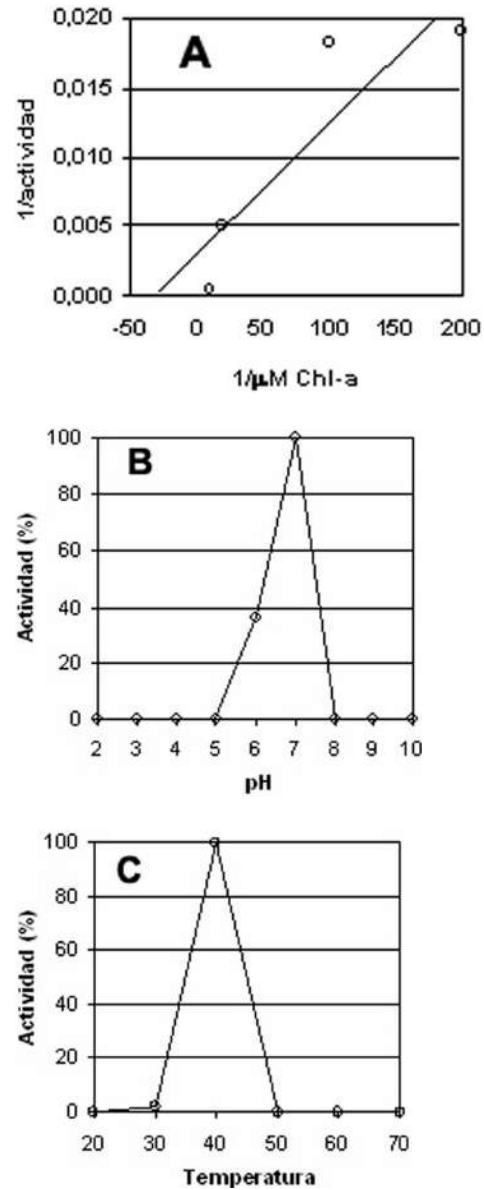


Figura 1. Efecto (A) de la concentración de sustrato-representación de Lineweaver-Burk (pH = 7,0; 37°C); (B) del pH ($0,068 \mu\text{M}$ Chl-a, 37°C); y (C) de la temperatura ($0,068 \mu\text{M}$ Chl-a, pH 7,0) sobre la actividad de clorofilasa extraída de la corteza de bananito (*Musa accuminata*). La U chlase fue definida como μM de chl-a hidrolizada/min y la actividad específica como U chlase/mg proteína. En los ensayos de pH y temperatura la máxima actividad fue expresada como 100%

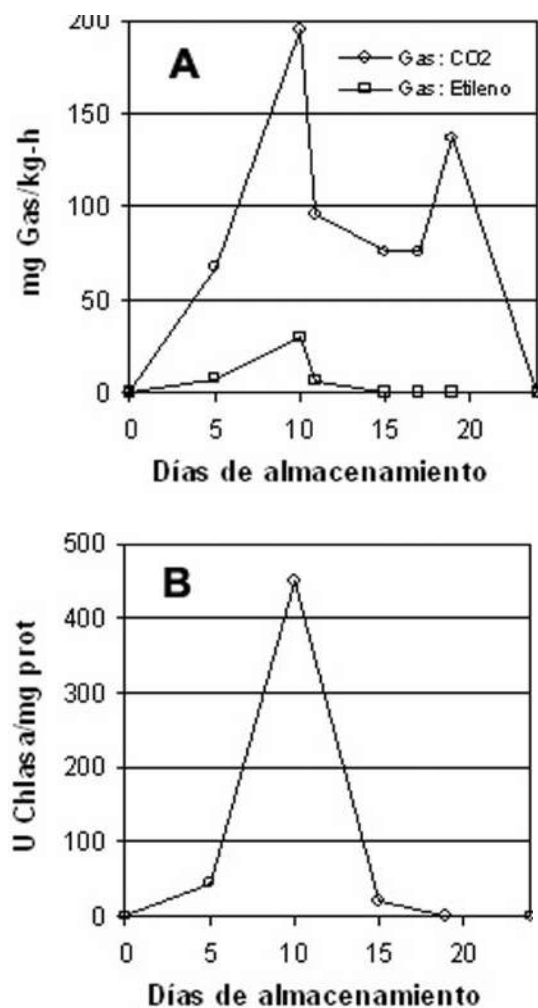


Figura 2. (A) Producción de CO₂ y etileno y (B) actividad de clorofilasa durante la maduración de bananito (*Musa accuminata*) a 20 °C, 90% HR. **Día 0:** frutos en madurez fisiológica, 90% verde y 10% amarillo en corteza. **Día 11:** Frutos en madurez sensorial, 100% amarillo en corteza. **Día 22:** frutos posclimatéricos, 70% amarillo y 30% manchas pardas en corteza

Por su parte, la Chlasea exhibió un máximo de actividad hacia el día 10 de almacenamiento, coincidiendo con el climaterio y con el momento en el que el color verde había desaparecido por completo de la corteza de los bananos para dar lugar al amarillo. De acuerdo a la prueba de Tukey los valores máximos observados en la producción de CO₂, etileno y actividad de Chlasea, todos en el día 10, son significativamente diferentes de los valores obtenidos en los otros días de almacenamiento.

DISCUSIÓN

La eficiencia en la obtención de Chl a partir de corteza de banano bocadillo es baja, cuando se compara con los contenidos de Chl (a+b) en corteza de banano subgrupo Cavendish (*Musa* grupo AAA) (6,7 mg/100 g) (Jacob-Wilk et al., 1999), en brócoli (95 mg/100 g) (*Brassica oleracea* L., cv Haitzu) (Funamoto et al., 2002), en nopalitos (*Opuntia* spp.), producto tradicional mexicano (15 mg/100 g) (Guevara et al., 2003), en hojas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) (190 mg/100 g) (Iriyama et al., 1974) y en habichuela (*Phaseolus vulgaris*) (10 y 20 mg/100 g, cvs. Perona y Bobby, respectivamente) (Monreal et al., 1999). Aunque la eficiencia obtenida con la corteza de banano no es tan buena, se prefirió usar esta fuente de Chl puesto que es de esperar que si ambos (sustrato y enzima) son de la misma fuente, la respuesta de la actividad enzimática podrá representar la situación real dentro de las células del fruto.

El valor de K_M obtenido para Chlasea de banano bocadillo está por debajo del ámbito de valores de K_M encontrados para esta enzima extraída de diferentes fuentes, el cual oscila entre 1 mM a 0,1 μ M (Salisbury y Ross, 1994). El valor de K_M es de gran utilidad para predecir la cantidad de sustrato que necesita la enzima *in vivo*, o la mezcla de reacción *in vitro*, para que se produzca la reacción enzimática; este valor también da una idea sobre la efectividad de la enzima, puesto que si el valor de K_M es bajo, la enzima requerirá menos sustrato para poder actuar. Esto significa que la Chlasea extraída de la corteza del banano bocadillo exhibe mayor afinidad por el sustrato que las extraídas de otras fuentes.

El intervalo estrecho de actividad de la Chlasea extraída de banano bocadillo frente al pH y a la temperatura difiere de los resultados obtenidos para esta enzima extraída de naranja Valencia verde-madura (*Citrus sinensis* L. Obseck, cv. Valencia), la cual tiene un máximo de actividad a pH 7,5 y 45 °C, con actividad adecuada en intervalos más amplios de estos dos factores (Trebitsht et al., 1993).

El valor de pH para obtener la máxima actividad de Chlase-banano bocadillo hace suponer que el sitio activo de la enzima se encuentra protegido por un apretado empaque molecular neutro. Teniendo en cuenta que durante el uso de inhibidores de etileno (Pardo, 2002), choques con CO₂ (Suárez y Ariza, 1996) y choques térmicos (Serrato, 1999), solos o combinados con refrigeración por debajo de 12 °C se ha encontrado una acumulación de ácidos orgánicos, con la consecuente disminución del pH, respecto de los frutos de banano bocadillo no tratados, podría entenderse el hecho de que tras el uso de este tipo de tratamientos se haya evidenciado en la corteza del banano bocadillo falla en la desaparición del color verde, por cuanto la actividad de Chlase mostró una alta sensibilidad al pH.

A su vez, el que la Chlase de banano bocadillo tenga alta sensibilidad a la temperatura hace suponer que en la manipulación postcosecha de esta fruta cuando se expone a temperaturas bajas produciría inhibición enzimática, y si se considera a la Chlase, esta inhibición evitaría la degradación de la Chl, impidiendo el cambio de color de la corteza, de verde a amarillo; si bien, aquí se debe tener presente que las temperaturas bajas (inferiores a la temperatura crítica) no sólo inhiben la actividad enzimática sino que pueden generar una serie de eventos como son el cambio en la fluidez de los lípidos que hacen parte de la membrana celular, inhibición o activación de los procesos de transcripción de algunas proteínas, desbalance osmótico y en general, desacople en las rutas metabólicas que conducen finalmente a la muerte celular (Wang, 1990). De otro lado, se reporta que la exposición de brócoli durante cortos tiempos a 50 °C antes del almacenamiento a 15 °C reduce la degradación de la clorofila y por tanto alarga el tiempo de vida en anaquel, debido a la inhibición parcial de la actividad de Chlase (Funamoto et al., 2002). Lo anterior permite argumentar que se debe garantizar un manejo de la temperatura en el cual la actividad de Chlase sea inhibida parcialmente, de tal ma-

nera que se requiera de un mayor tiempo para lograr la degradación total de la Chl, sin incurrir en un desacople del sistema bioquímico celular, consiguiendo por lo tanto prolongar el tiempo de vida útil del fruto.

Durante la maduración de naranjas Valencia se encontró que la actividad de Chlase está en relación directa con la concentración de etileno y con la degradación de Chl, sugiriéndose que el etileno induce un incremento en la transcripción de Chlase y por lo tanto disminuye los niveles de Chl (Jacob-Wilk et al., 1999). Por otra parte, al almacenar banano Cavendish a 20 y 30 °C se encontró una coincidencia entre los picos de intensidad respiratoria y la actividad de Chlase, sin embargo no hubo una relación clara entre la actividad de esta enzima y la degradación de Chl (Thomas y Janave, 1992). En el presente trabajo, se evidencia una relación directa entre la desaparición del color verde, interpretada como degradación de Chl y la actividad de Chlase, razón por la cual esta enzima debe estar participando activamente en la degradación de este pigmento; además, se encontró una coincidencia entre el máximo de actividad de Chlase y el de la producción de etileno, por lo que si el etileno activa la transcripción de la Chlase con el consecuente incremento en su actividad, se explicaría la falla en la pérdida de la clorofila en la corteza del banano bocadillo tras el uso de inhibidores de etileno y del choque con CO₂, pues para este último se sabe que el CO₂ puede actuar como inhibidor competitivo del etileno.

En conclusión, la caracterización cinética de la Chlase arrojó un pH óptimo de 7,0, temperatura óptima de 40 °C, K_M 0,034 µM Chl-a y V_{MAX} 364 µM Chl-a hidrolizada/min/mg proteína. Los resultados indican que la Chlase es altamente dependiente del pH y de la temperatura para manifestar su actividad y que participa activamente en la degradación de la Chl; además, su máxima actividad está en relación directa con la producción de etileno, por lo que éste puede participar en su transcripción. Los resultados obtenidos sugieren que para

lograr una adecuada degradación de la Chl en la corteza del banano bocadillo, el empleo de técnicas que pretendan prolongar el tiempo de vida útil durante el almacenamiento de estos frutos debe garantizar un manejo adecuado de la temperatura, pH, niveles de CO₂ y etileno.

REFERENCIAS

- AOAC.** 1990. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Washington D. C., E. U. A.
- Bustos C, Coy D.** 1995. Estudio preliminar de las bajas temperaturas en el almacenamiento del banano bocadillo (*Musa paradisiaca* L.). Trabajo de Grado. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Díaz R, Porras G.** 1998. Determinación de la temperatura crítica de almacenamiento del banano bocadillo (*Musa paradisiaca* L.). Trabajo de Grado. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Dixon M, Webb EC.** 1964. *Enzymes*. Academia Press. Nueva York, E. U. A.
- Funamoto Y, Yamauchi N, Shigenaga T, Sigyo M.** 2002. Effects of heat treatment on chlorophyll degrading enzymes in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 24:163-170.
- Guevara JC, Yahia EM, Brito de la FE, Biserka SP.** 2003. Effects of elevated concentrations of CO₂ in modified atmosphere packaging on the quality of prickly pear cactus stems (*Opuntia* spp.). *Postharvest Biology and Technology*, 29:167-176.
- Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI.** 2002. Chlorophyll disappearance and chlorophyllase activity during ripening of *Capsicum annuum* L. fruits. *Journal of Science and Food Agricultural*, 82:1564-1570.
- Iriyama K, Ogura N, Takamiya A.** 1974. A simple method for extraction and partial purification of chlorophyll from plant material, using dioxane. *Journal of Biochemistry*, 76:901-904.
- Jacob-Wilk D, Holland D, Goldschmidt EE, Riov J, Eyal Y.** 1999. Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the Chlase1 gene from ethylene-treated citrus fruit and its regulation during development. *The Plant Journal*, 20:653-661.
- Klein AO, Vishniac W.** 1961. Activity and partial purification of chlorophyllase in aqueous system. *Journal of Biology and Chemistry*, 236:2544-2549.
- Monreal M, De Ancos B, Cano MP.** 1999. Influence of critical storage temperatures on degradative pathways of pigments in green beans (*Phaseolus vulgaris* cvs. Perona and Boby). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:19-24.
- Pardo Y.** 2002. Efecto de dos inhibidores comerciales de etileno sobre la maduración de banano bocadillo (*Musa accuminata*) almacenado a diferentes temperaturas. Trabajo de Grado. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Rubio ME.** 1999. Estudio del cambio de actividad de polifenoloxidasas, PFO, durante el proceso de maduración del lulo (*Solanum quitoense* L.). Trabajo de Grado Magister en Ciencias-Química, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Salisbury BF, Ross CW.** 1994. *Fisiología vegetal*. Grupo Editorial Iberoamericano. México D. F., México.
- Suárez C, Ariza S.** 1996. Influencia de los choques de CO₂ sobre los daños por frío en el banano bocadillo (*Musa accuminata*). Trabajo de Grado. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Serrato J.** 1999. Estudio de la conservación de banano bocadillo mediante la aplicación combinada de choques térmicos y refrigeración. Trabajo de Grado. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Thomas P, Janave MT.** 1992. Effect of temperature on chlorophyllase activity, chlorophyll degradation and carotenoids of Cavendish banana during ripening. *International Journal of Food Science and Technology*, 27:57-63.
- Trebitsht T, Goldschmidt EE, Riov J.** 1993. Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in citrus fruit peel. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90:9441-9445.
- Wang YC.** 1990. *Chilling injury of horticultural crops*. CRC Press, Inc. Florida, E. U. A.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo económico y en infraestructura recibido para la ejecución de este trabajo.