

Universidad de Granada

Facultad de Ciencias



**Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular**

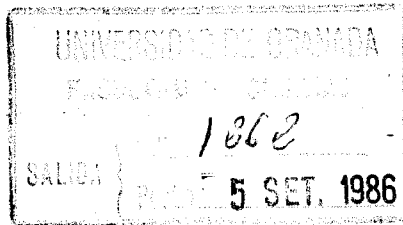
POLIFENOLOXIDASA DE EPICARPIO DE CHIRIMOYO
(Annona cherimolia Mill.): LOCALIZACION INTRACELULAR
Y FACTORES INFLUYENTES EN SU ACTIVIDAD

MARINA MARTINEZ CAYUELA

Tesis Doctoral

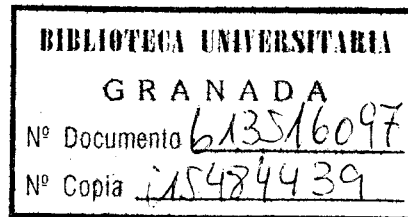
1986

R. 32.471



FACULTAD DE CIENCIAS

DETARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR



POLIFENOLOXIDASA DE EPICARPIO DE CHIRIMOYO (Annona cherimolia Mill.): LOCALIZACION INTRACELULAR Y FACTORES INFLUYENTES EN SU ACTIVIDAD.

Marina Martínez Cayuela

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1986

Tesis Doctoral dirigida por los Dres. D^a. María José Faus Dáder, Profesora Titular de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, y D. Angel Gil Hernández, Director del Departamento de Investigación de UNIASA. Fué leída el 9 de Julio de 1986 ante el Tribunal formado por los Profesores: Sánchez de Medina Contreras; Gómez-Moreno Calera; Sánchez Raya; Lupiáñez Cara y Lázaro Paniagua. Obtuvo la calificación de Apto "cum laude".

La Memoria que presentamos ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada durante los años 1982 a 1986.

Este trabajo se ha realizado gracias, en parte, a la concesión de una Beca del Plan de Formación del Personal Investigador y ha sido financiado por la Comisión de Obras Sociales de la Caja General de Ahorros y Monte de Piedad de Granada.

Mi agradecimiento a Angel Gil, Director de esta Tesis Doctoral, por la ayuda y gran dedicación que en todo momento me ha prestado.

Al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada y especialmente a M^a José Faus, Directora también de esta Tesis, por su orientación y constante interés.

A Carlos Gómez-Moreno que me introdujo en el Departamento y a Luis Sánchez de Medina y M^a Carmen Plata con quienes compartí los inicios de este trabajo.

A Juan José Lázaro y a Luis Alfonso del Río por la colaboración prestada en parte de los experimentos realizados.

Finalmente mi agradecimiento a Isabel, M^a del Mar, Antonio Luis, Felipe y Jose, por su amistad y por el estímulo que en todo momento me han prestado.

A todos, Gracias.

A Blas

ABREVIATURAS

ARN	Acido ribonucleico
CD	Dicroismo circular
DEAE-	Dietil-amino-etil-
D.O.	Densidad óptica
DOPA	Dihidroxi-fenil alanina
E	Enzima
EDTA	Acido etilendiamino-tetraacético
EPR	Resonancia de espín electrónico
FAD	Flavín adenín nucleótido
NADP ⁺	Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido
P	Proteínas
POD	Peroxidasa
PPO	Polifenoloxidasa
PVP	Polivinil-pirrolidona
PVPP	Polivinil-polipirrolidona
R	Radical
S	Sustrato
SDS	Dodecilsulfato sódico

INDICE

	<u>Pág.</u>
INTRODUCCION.....	11
1.- PARTE TEORICA.....	15
1.1.- Características botánicas y descriptivas del fru to del chirimoyo.....	16
1.2.- El proceso respiratorio en los frutos.....	18
1.2.1.- Ciclo climatérico.....	18
1.2.2.- Control del proceso respiratorio durante el almacenamiento de los frutos climatéricos...	20
1.3.- Pardeamiento enzimático.....	21
1.4.- Polifenoloxidasas.....	25
1.4.1.- Distribución y generalidades.....	25
1.4.2.- Purificación.....	27
1.4.3.- Características y propiedades.....	30
1.4.3.1.- Multiplicidad de formas.....	30
1.4.3.2.- Estructura cuaternaria y peso molecular.	31
1.4.3.3.- Composición en aminoácidos.....	33
1.4.3.4.- Estabilidad frente al pH.....	34
1.4.3.5.- Latencia.....	35
1.4.4.- Reacciones catalizadas por las polifenoloxi- dasas.....	37
1.4.4.1.- Compuestos fenólicos.....	37
1.4.4.2.- Especificidad de sustrato.....	40
1.4.4.3.- Mecanismo de acción.....	41
1.4.4.4.- Activadores e inhibidores.....	51
1.4.5.- Localización intracelular.....	58
1.4.6.- Papel fisiológico.....	62
2.- MATERIAL Y METODOS.....	66
2.1.- MATERIAL.....	67

	<u>Pág.</u>
2.1.1.- Material biológico.....	67
2.1.2.- Productos.....	67
2.1.3.- Aparatos e instrumentación.....	67
2.2.- METODOS.....	69
2.2.1.- Purificación de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo.....	69
2.2.1.1.- Obtención de polvos acetónicos.....	69
2.2.1.2.- Redisolución de polvos acetónicos.....	70
2.2.1.3.- Precipitación con sulfato amónico.....	70
2.2.1.4.- Diálisis.....	71
2.2.1.5.- Cromatografía sobre Sephadex G-200.....	71
2.2.1.5.1.- Preparación del gel.....	71
2.2.1.5.2.- Preparación de la columna.....	72
2.2.1.5.3.- Aplicación y elución de la muestra..	73
2.2.2.- Determinación del contenido proteico en los extractos con actividad polifenoloxidasas....	74
2.2.2.1.- Método de Lowry.....	74
2.2.2.2.- Absorción en el U.V. a 280 nm.....	74
2.2.3.- Determinación espectrofotométrica de la actividad polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo.....	75
2.2.3.1.- Método general.....	75
2.2.3.1.1.- Fundamento.....	75
2.2.3.1.2.- Técnica.....	75
2.2.3.1.3.- Cálculos.....	77
2.2.3.2.- Determinación de la influencia de la cantidad de enzima y del tipo de sustrato utilizado.....	77
2.2.3.3.- Determinación de la influencia de la cisteína, ácido ascórbico y mercaptoetanol	

	<u>Pág.</u>
sobre la actividad polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo.....	78
2.2.3.4.- Determinación de los efectos de la preincubación del enzima purificado con cisteína, ácido ascórbico o mercaptoetanol sobre la actividad polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo.....	79
2.2.3.5.- Determinación de la influencia del peróxido de hidrógeno sobre la actividad polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo	80
2.2.3.6.- Determinación del efecto de la preincubación del enzima con peróxido de hidrógeno sobre la actividad polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo.....	81
2.2.3.7.- Determinación de la influencia de distintos ácidos orgánicos sobre la actividad polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo.....	82
2.2.3.8.- Determinación de la influencia de algunos azúcares sobre la actividad polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo....	82
2.2.3.9.- Determinación de la influencia de catequinas sobre la actividad polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo.....	83
2.2.3.10.- Determinación de la influencia de distintos compuestos fenólicos sobre la actividad polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo.....	83
2.2.3.11.- Medida del efecto de la presencia de pequeñas cantidades de difenoles en la reacción de la polifenoloxidasa de epi-	

	<u>Pág.</u>
carpio de chirimoyo con monofenoles.....	84
2.2.4.- Localización intracelular de la polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo.....	85
2.2.4.1.- Obtención del homogenado.....	85
2.2.4.2.- Centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa.....	85
2.2.4.3.- Determinación de actividades enzimáticas y clorofila.....	86
2.2.4.3.1.- Determinación de citocromo oxidasa como marcador mitocondrial.....	86
2.2.4.3.2.- Determinación de catalasa como marcador peroxisomal.....	86
2.2.4.3.3.- Determinación de clorofila como marcador de cloroplastos.....	87
2.2.4.3.4.- Determinación de la actividad polifenoloxidasa.....	88
3.- RESULTADOS.....	89
3.1.- Purificación parcial de la polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo.....	90
3.2.- Influencia de distintos factores sobre la actividad polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo	93
3.2.1.- Influencia de la cantidad de enzima y del tipo de sustrato utilizado.....	93
3.2.2.- Influencia de la cisteína, ácido ascórbico y mercaptoetanol sobre la actividad polifenoloxidasa.....	99
3.2.3.- Efecto de la preincubación del enzima con cisteína, ácido ascórbico o mercaptoetanol sobre la actividad polifenoloxidasa.....	106
3.2.4.- Influencia de la presencia de peróxido de	

	<u>Pág.</u>
hidrógeno sobre la actividad polifenoloxida- sa.....	108
3.2.5.- Efecto de la preincubación del enzima con peróxido de hidrógeno sobre la actividad po- lifenoloxidas.....	114
3.2.6.- Influencia de distintos ácidos orgánicos so- bre la actividad polifenoloxidas.....	117
3.2.7.- Influencia de algunos azúcares sobre la ac- tividad polifenoloxidas.....	118
3.2.8.- Influencia de catequinas sobre la actividad polifenoloxidas.....	118
3.2.9.- Influencia de distintos compuestos fenólicos sobre la actividad polifenoloxidas.....	121
3.2.10.- Efecto de la presencia de pequeñas cantida- des de difenoles en la actividad de la poli- fenoloxidas frente a monofenoles.....	153
3.3.- Localización intracelular de la polifenoloxidas de epicarpio de chirimoyo.....	153
4.- DISCUSION.....	157
5.- CONCLUSIONES.....	176
6.- BIBLIOGRAFIA.....	181

INTRODUCCION

INTRODUCCION

El chirimoyo es un fruto climatérico, procedente del árbol de igual nombre, de gran importancia económica para el litoral granadino. En 1985 los ingresos totales estimados por la venta de dicho fruto ascendieron a dos mil millones de pesetas. Existen, sin embargo, serias limitaciones que impiden la obtención de una mayor cosecha y la comercialización del chirimoyo en áreas lejanas a los mercados de producción. La fructificación de las actuales variedades del fruto aclimatadas en la costa granadina sólo tiene lugar en condiciones microclimáticas bien definidas. Asimismo, el periodo de recolección que es estacional, apenas dura 5 meses, desde Octubre a Febrero. Por otra parte, una vez recolectado, el fruto madura de forma extraordinariamente rápida en condiciones ambientales e incluso a temperaturas moderadas que oscilan entre 8 y 12°C.

La maduración del chirimoyo va acompañada por un pardeamiento o ennegrecimiento exterior, más o menos acentuado según las variedades, especialmente patente cuando los frutos son almacenados a bajas temperaturas (2-6°C).

La recogida masiva del chirimoyo en periodos muy cortos de tiempo junto a la imposibilidad actual de aumentar su almacenamiento y a la pérdida de aspecto externo y calidad del fruto por pardeamiento, condicionan su depreciación e impiden su exportación. Aunque el mercado nacional es hoy capaz de absorber practicamente la totalidad de la producción, podrían incrementarse de forma significativa los beneficios si el precio del fruto pudiera elevarse a través de la venta en mercados exteriores.

El pardeamiento de los frutos está ocasionado por la aparición de pigmentos coloreados procedentes de la polime-

rización de compuestos quinónicos, los cuales se forman por oxidación de mono y dihidroxi fenil derivados. Estas reacciones están catalizadas por una serie de enzimas denominadas genéricamente polifenoloxidasas.

Las posibilidades de limitar el ennegrecimiento exterior del chirimoyo, así como de alargar el proceso de maduración, están siendo objeto de consideración en nuestro Departamento dentro de un Programa de Investigación subvencionado por la Caja General de Ahorros y Monte de Piedad de Granada.

En trabajos previos se han determinado las actividades de las polifenoloxidasas de extractos crudos de epicarpio y mesocarpio de chirimoyo, y en extractos enzimáticos parcialmente purificados a través de la obtención de polvos acetónicos y precipitados de la proteína activa con sulfato amónico.

Por otra parte, se han establecido el pH óptimo de actuación de dichas enzimas, su actividad frente a diversos sustratos y su estabilidad térmica y frente al pH. Hemos determinado, también en estudios previos, las variaciones de actividad polifenoloxidasa durante la maduración del chirimoyo, tanto en condiciones ambientales como en atmósferas controladas.

Los objetivos del presente trabajo han sido profundizar en el conocimiento de las interacciones enzima-sustrato y de las cinéticas de reacción de la polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo, así como estudiar diversos activadores e inhibidores del enzima que podrían modular naturalmente sus acciones fisiológicas. Para ello se ha procedido previamente a purificar la polifenoloxidasa a través de obtención de polvos acetónicos, precipitación con sulfato amónico y cromatografía de adsorción.

Cualquier intento de establecer una función fisio-

lógica para un enzima debe tener en cuenta su localización subcelular. Por ello, otro de los objetivos de este trabajo ha consistido en establecer qué orgánulos celulares de epicarpio de chirimoyo son los portadores del enzima polifenoloxida-
sa.

1.- PARTE TEORICA

1.1.- Características botánicas y descriptivas del fruto del chirimoyo

El chirimoyo, Annona cherimolia Mill., F. Annonaceae, O. Magnoliales (35), es un árbol originario de la zona subtropical americana que se ha aclimatado muy bien en una estrecha franja del litoral granadino-malagueño que va desde Vélez-Málaga a Motril, adentrándose por el interior hasta Vélez-Benaudalla y la comarca de Los Guájares, y muy especialmente en el Valle de Jete, Almuñecar y Salobreña.

Los frutos del chirimoyo, llamados del mismo modo que el árbol que los origina, son bayas que se forman al soldarse periféricamente los carpelos fecundados dando lugar a un agregado de frutos en eterio modificado. Estos frutos de tamaño variable, 150 a 600 g, se caracterizan por poseer una corteza (Epicarpio), de mayor a menor grosor según la variedad, cuyo color varía desde el verde oscuro al blanco-amarillento-verdoso y hasta negruzco, de acuerdo con la variedad y estado de maduración (22). La piel del epicarpio es reticulada con manchas o sombras, correspondientes a los límites de los carpelos, que se observan más o menos definidas y que a su vez pueden contener o no resaltes cóncavos. Estos factores resultan de suma importancia en el momento de la clasificación de las diversas variedades botánicas del chirimoyo (22).

El fruto del chirimoyo contiene semillas en número variable, relacionado con los carpelos en la proporción 1:10 a 1:6. Estas semillas, más o menos alargadas y aplastadas, de color negro en principio y marrones después, tienen una longitud que oscila entre 1 y 1.5 cm (22).

En cuanto a la pulpa o mesocarpio del chirimoyo, ésta es de color blanco o blanco rosado, inmediatamente después

del corte, con sabor subácido delicado ligeramente azucarado. Esta pulpa siempre es tierna, muy aromática y con un agradabilísimo sabor que se armoniza además con un elevado valor alimenticio. El contenido en glúcidos del chirimoyo es del orden del 18%, los lípidos apenas si existen, solamente los de carácter estructural, y en lo que se refiere al contenido proteico, al igual que la mayoría de los frutos carnosos, no supera el 1%. El contenido vitamínico del chirimoyo sin embargo es muy elevado (21).

El chirimoyo por su polinización cruzada ha dado origen a multitud de variedades lo que unido a la alta frecuencia de mutación ha ocasionado la aparición de numerosas subvariedades que poseen características externas muy similares a la variedad originaria; ésto dificulta pues una perfecta clasificación varietal. No obstante, en la costa granadina se pueden reconocer las variedades botánicas impressa, mammillaris o mammillata, tuberculata y umbonata. La variedad comercial "Blanca" o "Fino de Jete" corresponde a la variedad botánica impressa. Las variedades comerciales "Campa", "Campa Mejorada" y "Mantecosa" se integran en la variedad botánica mammillaris. Las variedades comerciales "Negrito" y "Cristalino" están comprendidas dentro de la variedad botánica tuberculata y por último, las variedades comerciales "Piña", "Pinchudo" y "Amargoso" se incluyen en la variedad botánica ummbonata (22).

En el presente trabajo las polifenoloxidasas de chirimoyo se aislaron de la variedad impressa.

Los frutos de la variedad impressa, de forma acorazonada y a veces algo arriñonada tienen un peso variable, entre 300 y 600 g, y se caracterizan por poseer una piel de color verdoso amarillento, o blanquecino al madurar. El epicarpio,

de grosor medio, tiene en su superficie depresiones suaves a modo de placas cóncavas que originan figuras cerradas de especial relieve. En cuanto a su mesocarpio éste es jugoso y semiácido (22).

La variedad impresa, que ocupa la casi totalidad de la superficie dedicada en España al cultivo del chirimoyo, presenta una elevada propensión a cuajar frutos pequeños y deformes, y en la actualidad se encuentra en un gran estado de degeneración debido a una retrogradación ocasionada por la alta frecuencia de mutación. Por otra parte y debido al grosor medio de su piel es también poco resistente al ataque de la mosca de la fruta (Ceratitis capitata) (130).

Los frutos de la variedad impresa tienen una maduración temprana, iniciándose su recolección a finales de Septiembre para prolongarse hasta Diciembre y aún Febrero, Marzo y Abril en las zonas más tardías y durante años de inviernos benignos.

1.2.- El proceso respiratorio en los frutos

1.2.1.- Ciclo climatérico

Las frutas al ser recolectadas quedan separadas de su fuente natural de nutrientes pero sus tejidos todavía respiran y desarrollan actividades metabólicas a expensas de los componentes que contienen.

La intensidad respiratoria de los frutos, medida como desprendimiento de CO_2 por Kg de fruta y hora, disminuye durante su desarrollo en el árbol y continua también descen-

diendo después de su recolección. Sin embargo, ocurre con algunas especies que después de alcanzarse un mínimo, se establece un aumento más o menos rápido de su intensidad respiratoria hasta alcanzar un máximo conocido como "pico climatérico"; a partir del climaterio la intensidad respiratoria disminuye de nuevo correspondiendo ya esta disminución al comienzo de la senectud del fruto.

Los frutos con un proceso respiratorio semejante al antes descrito se denominan frutos climatéricos a diferencia de los no climatéricos que carecen del citado aumento de intensidad respiratoria. Dentro de los primeros se incluyen: manzanas, peras, melocotones, albaricoques, ciruelas, plátanos, aguacates y chirimoyos, y dentro de los segundos: pepinos, uvas, fresas, cerezas, piñas, naranjas y limones (10).

El término climatérico fué establecido por Kidd y West (74), y se ha definido posteriormente como un periodo en la vida de ciertos frutos, durante el que se inician una serie de cambios bioquímicos por la producción autocatalítica del etileno, que marca el cambio del desarrollo a la senectud y que lleva consigo un aumento de la respiración conduciendo también a la maduración. Durante todo este proceso, que se da también aún permaneciendo los frutos en el árbol pero a velocidad más lenta, se producen además una serie de cambios algunos de los cuales son perceptibles por los sentidos: aroma, color, textura, dulzura, astringencia y sabor, y otros que no lo son tanto: hidrólisis de polisacáridos, síntesis de ARN y síntesis de proteínas (73).

Dos diferentes teorías han intentado interpretar esta fase climatérica: la primera aboga por que es una etapa dominada por una intensa actividad catalítica en la cual la permeabilidad de la membrana aumenta y subsecuentemente los

sustratos acceden a los enzimas existentes aumentando el metabolismo, y la segunda, que explica el climaterio como una fase de reorganización metabólica basada en un cambio en el patrón de síntesis de proteínas en la que nuevos enzimas se sintetizan para catalizar procesos de maduración (121).

1.2.2.- Control del proceso respiratorio durante el almacenamiento de los frutos climatéricos

Por la importancia económica de los frutos climatéricos resulta de gran interés aumentar su periodo de comercialización. Al ser el proceso respiratorio un fenómeno acompañante de la maduración de estos frutos que conducen a su envejecimiento o senectud, controlando dicho proceso respiratorio se puede conseguir prolongar su conservación.

Puesto que en la respiración se consume oxígeno y se produce CO_2 , un método para inhibir el proceso respiratorio es modificar adecuadamente la composición de la atmósfera de la cámara de almacenamiento; de este modo el proceso respiratorio se enlentece parcialmente y la vida del fruto se prolonga. Existe un tipo de atmósfera controlada desarrollada por Wu y col. (18) denominada "hipobárica", "a vacío parcial" o "a presión subatmosférica", en la cual se reduce la presión parcial de oxígeno en la cámara de almacenamiento; con esto la concentración de oxígeno disminuye y la difusión de etileno simultáneamente aumenta, el resultado es la prolongación de la vida del fruto.

El proceso respiratorio puede controlarse también variando la temperatura de almacenamiento puesto que en un intervalo aproximado entre 5 y $30^{\circ}C$ la intensidad respiratoria

depende de la temperatura.

Finalmente la maduración de los frutos puede ser acelerada o retardada mediante el empleo de distintos compuestos químicos como citoquininas, auxinas, giberelinas, etileno, ceras y otros.

En nuestro laboratorio durante los últimos años se han estudiado las condiciones óptimas de almacenamiento del chirimoyo. En este fruto climatérico la maduración se produce de forma extraordinariamente rápida (3 a 4 días) en condiciones normales a 20-25°C de temperatura y 80% de humedad relativa; esto limita pues sus posibilidades de comercialización. Sin embargo, Plata Pulido, ensayando métodos que pudieran alargar la vida comercial del fruto del chirimoyo, ha encontrado que el climaterio se podía alcanzar entre los 12-18 días, cuando los frutos se almacenaban a temperaturas de 8-12°C (118). Este retraso, además, se favorecía si los frutos estaban en presencia de 0.01% de sulfito sódico y/o se mantenían en atmósfera controlada con 95% de CO₂ o con vacío parcial entre 250-400 mm de mercurio. No obstante, la presencia de cantidades de sulfito iguales o superiores al 1% inhibían totalmente la maduración (118).

1.3.- Pardeamiento enzimático

Los frutos durante su almacenamiento y maduración, así como durante los procesos de elaboración de derivados industriales, pueden sufrir alteraciones en el color. Estas alteraciones del color según sean de naturaleza enzimática o no se denominan fenómenos de pardeamiento enzimático o fenómenos de pardeamiento no enzimático.

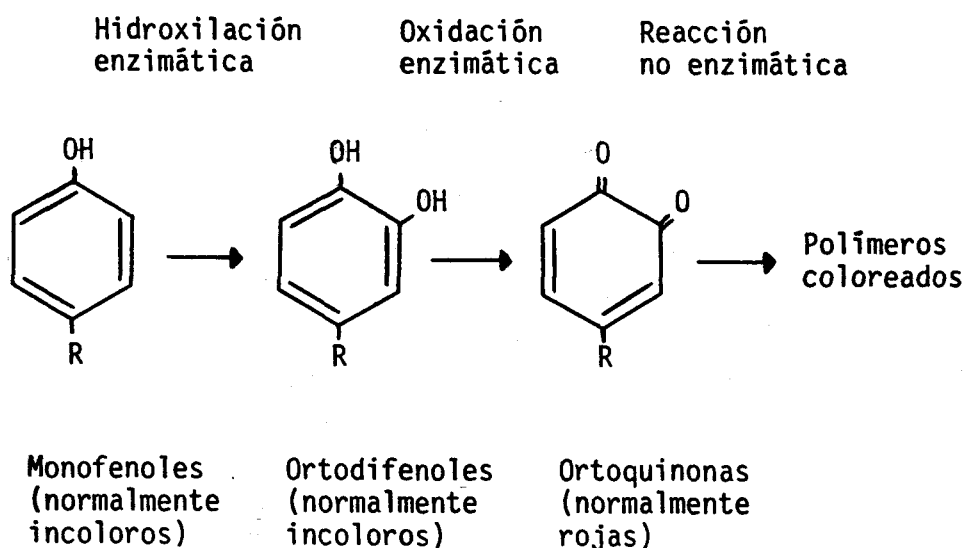
El fenómeno de pardeamiento enzimático, manifestable en vegetales ricos en compuestos fenólicos, así como en la formación de pigmentos melánicos de la piel y pelo de mamíferos y en el oscurecimiento de la cutícula de insectos, es un proceso que no tiene lugar en los alimentos de origen animal. Por el contrario, resulta sumamente problemático por el color que produce en ciertos frutos y tejidos enfermos, o que hayan sufrido tratamientos tales como pelado y triturado para preparación de jugos, congelación, deshidratación o simplemente exposición al aire (24). No obstante, la formación de estos pigmentos oscuros a veces no resulta indeseable. En los dátiles maduros, por ejemplo, se busca siempre un cierto grado de ennegrecimiento y otro tanto ocurre en la fermentación del té, secado de los granos fermentados de cacao o secado del tabaco (18).

El reconocimiento de la naturaleza enzimática de este pardeamiento en ciertos frutos se debe posiblemente a Lindet quien describió el fenómeno en 1895 (18). Sin embargo fué Onslow quien demostró que el pardeamiento enzimático de ciertos tejidos vegetales expuestos al aire se debía a la oxidación de derivados o-dihidroxifenólicos tales como catecol, ácido protocatecuico, ácido cafeico o ácido clorogénico, los cuales estaban ampliamente distribuidos en muchos frutos (109).

El pardeamiento enzimático se ha definido como un proceso catalizado por enzimas, por el cual determinados compuestos fenólicos se oxidan y posteriormente, de forma espontánea, se polimerizan dando lugar a compuestos coloreados (24). En el proceso se consideran unas etapas iniciales en las que mediante la hidroxilación de compuestos monofenólicos se obtienen los correspondientes orto-difenoles, los cuales a su vez, son oxidados, transformándose en derivados ortoquinó-

nicos generalmente de color rojo o amarillo. Las siguientes etapas del pardeamiento enzimático llevan consigo la polimerización de las ortoquinonas formadas, originándose sustancias químicas de naturaleza muy compleja (24).

Las etapas de esta transformación pueden quedar esquematizadas de la siguiente forma:



La hidroxilación de los monofenoles y la oxidación de los difenoles son dos acciones enzimáticas distintas y separables, sin embargo muchas veces un mismo enzima puede catalizar ambas reacciones (109). Los enzimas responsables de estas actividades reciben el nombre genérico de polifenoloxidasas (PPO) (87) y juegan un papel vital en los procesos bioquímicos de maduración y envejecimiento de los frutos.

La correlación entre PPO y el pardeamiento enzimático de los frutos se ha evidenciado en chirimoyos (130) así como en otros muchos frutos (24,132,170).

En 1975 Kahn demostró el paralelismo entre la velo-

cidad de pardeamiento en cultivos de aguacate y la actividad PPO (64). Más tarde, Sharon y Kahn han corroborado este hecho en el mismo tejido y asimismo han encontrado que el nivel de actividad polifenoloxidasas "per se" no determina la cantidad de etileno producido por el fruto, lo que no quiere decir, sin embargo, que el enzima no participe regulando la iniciación de la producción de etileno y consecuentemente también la maduración (141).

Sciancalepore y Longone han mostrado también que el pardeamiento oxidativo de homogenados crudos de cinco variedades de aceitunas verdes está relacionado con su actividad polifenoloxidasas (138). En yams (Dioscorea alata), frutos ampliamente distribuidos en la zona oeste africana, también se ha encontrado esta correlación (2).

Meyer y Biehl han evidenciado el incremento de actividad polifenoloxidasas durante la senescencia de hojas de espinacas (96). Esta actividad asimismo se ha observado en las hojas en periodo de senescencia de distintas especies (155). La actividad polifenoloxidasas, presente aún después de caer las hojas, es responsable de la rápida deoxigenación de los macerados acuosos de hojas. La deoxigenación dispara la formación de polifenoles por un proceso idéntico al que es responsable del pardeamiento en los frutos de vegetales (155).

También en uvas e incluso en el vino se ha demostrado que el pardeamiento está causado primariamente por la polifenoloxidasas (173). La actividad polifenoloxidasas en la uva fresca sigue un perfil semejante al de su maduración, sin embargo, durante la producción del vino el pardeamiento oxidativo tiene lugar a gran velocidad. La causa aquí es la entrada en contacto de enzimas y compuestos fenólicos provocada por

el daño causado en los frutos durante la recogida y aplastamiento de la uva (13).

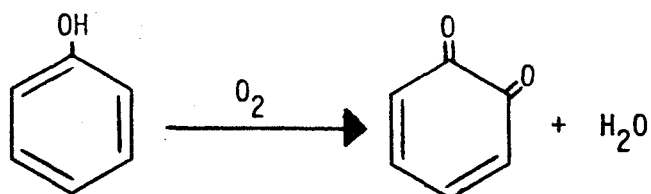
1.4.- Polifenoloxidasas

1.4.1.- Distribución y generalidades

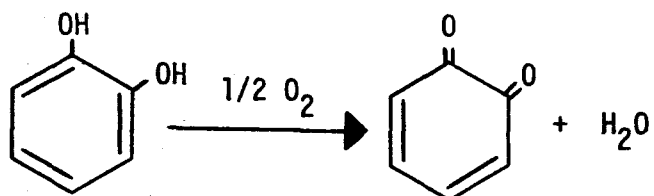
La Comisión Internacional para la nomenclatura de enzimas originariamente incluía en la categoría de polifenoloxidasas dos enzimas: laccasa ó p-difenol : oxigenooxidoreductasa (EC 1.10.3.2.) y catecol oxidasa u o-difenol oxigenooxidoreductasa (EC 1.10.3.1.). Actualmente, sin embargo, estas se incluyen juntas como monofenol monooxigenasas (EC 1.14.18.1) No obstante, el enzima catecol oxidasa, también llamado fenolasa, polifenoloxidasa, tirosinasa, catecolasa o cresolasa, es bastante distinto del enzima laccasa. En ambos casos los dos enzimas oxidan una gran cantidad de sustratos fenólicos, pero la capacidad para oxidar p-difenoles queda sólo limitada a la laccasa. Nosotros a partir de ahora al hablar de polifenol--oxidasas nos referiremos siempre al enzima catecol oxidasa u o-difenol oxigenooxidoreductasa.

La polifenoloxidasa es un enzima que cataliza dos reacciones:

A) La inserción de un hidroxilo en posición orto con respecto al grupo OH existente en un monofenol, seguida normalmente de la oxidación del difenol obtenido a la correspondiente quinona (actividad cresolasa)



y B) la oxidación con retirada de hidrógeno de o-difenoles (actividad catecolasa)



En ambas reacciones participa el oxígeno molecular (95).-

Algunos autores hablan de actividad monofenolasa y actividad dihidroxifenolasa, la primera para hidroxilar y la segunda para oxidar el difenol (68). Estas dos actividades existen en una amplia variedad de plantas, pero también muchas de ellas e incluso distintos tejidos de la misma planta sólo poseen la actividad dihidroxifenolasa, no pudiendo por tanto producirse la oxidación de monofenoles.

La polifenoloxidasas es un enzima ampliamente distribuido en el reino vegetal. Se da en Briofitas, Pteridofitas, Gimnospermas y en practicamente cualquier orden de Angiospermas. Parece también encontrarse en bacterias, hongos y líquenes (95).

En cuanto a la ubicación de la polifenoloxidasas

en la planta, ésta no parece estar restringida a una parte especial tal como los frutos, sino que su presencia se ha observado en una gran variedad de órganos y tejidos; como casos particulares se pueden citar los granos de polen, las células guardia, el látex de las plantas, etc. (7,86,125).

1.4.2.- Purificación

Las polifenoloxidasas son enzimas relativamente difícil de purificar, pero, pese a las complicaciones que aparecen durante su aislamiento, han sido parcialmente purificadas en muchos tejidos de distintas plantas (95).

Una de las complicaciones que frecuentemente aparecen en su aislamiento son las reacciones de estos enzimas con taninos los cuales producen cambios en las propiedades del enzima. Estas, sin embargo, se pueden prevenir realizando el proceso de purificación bajo nitrógeno (17,72), o bien, en presencia de agentes reductores o absorbentes de fenoles como polietilenglicol, poliamida o polivinilpirrolidona (5,14,84,131).

Otra complicación la constituye el hecho de que muchas polifenoloxidasas están unidas a membranas. La solubilización de estos enzimas, llevada a cabo después de la preparación de polvos acetónicos, o por sonicación, o por extracción con detergentes u otros agentes, modifica la estructura y propiedades de los mismos. Un fenómeno ampliamente observado es el descenso o completa pérdida de la actividad cresolasa al solubilizar algunos enzimas unidos a membranas (46,48,49).

Por último, un obstáculo adicional para la purificación del enzima lo constituyen también la extensa multiplici-

dad de éstos, y las interconversiones entre formas que continuamente ocurren durante los pasos de purificación y durante el almacenamiento de preparaciones purificadas.

Aún teniendo en cuenta todas estas complicaciones, como hemos citado anteriormente, un cierto número de polifenoloxidasas se han conseguido purificar, y muchas de ellas en alto grado, utilizando diversos métodos de purificación y solubilización del enzima junto con métodos que eliminaban las reacciones de los taninos. Así Interesse y col. en trigo, y Golbeck y col. en espinacas han logrado purificar la polifenoloxidasa hasta 1750 veces en el primer caso, y 900 en el segundo (38,59). Interesse y col. extrajeron el enzima con tampón fosfato y a continuación purificaron por precipitación con sulfato amónico, tratamiento con gel de fosfato cálcico, cromatografía de intercambio iónico y pase a través de columna de enfoque isoeléctrico (59). Golbeck y col., por su parte, después de liberar el enzima de los cloroplastos por sonicación, lo precipitaron con sulfato amónico, y sucesivamente lo purificaron a través de pases por columnas de Sephacryl S-200, DEAE Bio-Gel A, ultrafiltración con membranas Amicon (PM-30) y nuevo pase por columna de Sephadex G-150 (38).

En hojas en senescencia del álamo negro Trémolières y Bieth han conseguido, asimismo, casi una completa homogeneidad en la purificación de la polifenoloxidasa utilizando precipitación con sulfato amónico y filtración sobre Sephadex G-75 y DEAE-celulosa (155). La liberación del enzima la realizaron con Tritón X-100. Sánchez de Medina utilizando también Tritón X-100 para liberar el enzima ha purificado parcialmente la polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo por precipitaciones sucesivas con sulfato amónico (130).

La purificación conseguida con la polifenoloxidasa

de Papaver somniferum ha sido de unas 100 veces (57). Hsu y col. después de homogeneizar el tejido mediante un Potter-Elvehjem en presencia de ascorbato, precipitaron con sulfato amónico, ultrafiltraron y fraccionaron por último por columnas de carboximetilcelulosa y Sephacry S-200.

Aunque el grado de purificación de la polifenoloxidasas alcanzado en todos estos tejidos citados fué alto, también existen casos como el de la purificación de la polifenoloxidasas de banana, en los que utilizando técnicas más o menos similares a las descritas sólo se conseguía purificar unas pocas veces (102).

Junto a todos estos procedimientos de purificación muchos autores, más que realizar una purificación en sí, han estudiado las técnicas más eficientes para eliminar los compuestos fenólicos durante la extracción del enzima. Smith y col., por ejemplo, en la purificación de polifenoloxidasas de peras han demostrado que los polvos acetónicos no eliminaban suficientemente los compuestos fenólicos endógenos; lo contrario observaron con los siguientes compuestos: PVPP, Amberlita XAD-4, Bio-Rad AG 1-X8 y Bio-Rad AG 2-X8 (145). La efectividad de la polivinil polipirrolidona también se ha observado en las purificaciones de la polifenoloxidasas de hojas de té (70). La PVP asimismo confería una mayor estabilidad a la PPO de extractos crudos de chirimoyo (130). En hojas de té también se ha ensayado como absorbente de compuestos fenólicos la Poliamida, resultando que cuando las homogenizaciones del tejido se hacían en su presencia la actividad de la polifenoloxidasas era mayor (150).

1.4.3.- Características y propiedades

1.4.3.1.- Multiplicidad de formas

Las formas múltiples de las polifenoloxidasas se han empezado a observar cuando se han utilizado métodos de fraccionamiento de proteínas tales como la cromatografía de intercambio, filtración, electroforesis en gel y electroenfoque. Actualmente un número amplio de trabajos han mencionado multiplicidad de formas o "isoenzimas" de la polifenoloxidasa (36,49,62,63,152,174). Estas múltiples formas pueden constituir una heterogeneidad verdadera, o bien, simplemente, ser un artefacto producido como resultado de la liberación de las formas unidas a membranas debido a desnaturalizaciones parciales, fragmentación, proteolisis o reacciones con taninos. Los isoenzimas, distintos en su estructuras primarias, como se demuestra en muchas plantas, hongos superiores y Neurospora (152), son además en algunos casos interconvertibles (62,63); estas interconversiones debidas a fenómenos de asociación-disociación que se producen espontáneamente se pueden acelerar por factores tales como la fuerza iónica, concentración o dilución, presencia de ciertos iones, urea, sustratos fenólicos, etc. (134).

Las propiedades de estos isoenzimas son distintas, existiendo diferencias en la afinidad y especificidad por los sustratos fenólicos y el oxígeno (49,66,95,174), sensibilidad a inhibidores (26,49,174), pH óptimo (151,174), inactivación por calor (12,26,36), etc.

La existencia de estas múltiples formas y el hecho de que posean propiedades diferentes podría tener un cierto

significado fisiológico, sin embargo esto aún no ha sido demostrado.

1.4.3.2.- Estructura cuaternaria y peso molecular

Las polifenoloxidasas son proteínas oligoméricas de peso molecular variable. La existencia de estas formas poliméricas es lo que conduce a la multiplicidad de formas antes descrita (17,62,63).

Estudiar el peso molecular y la estructura cuaternaria de las polifenoloxidasas es un problema complejo en hongos y bacterias, pero aún lo es más en plantas superiores puesto que la mayoría de las estimaciones, basadas en el empleo de filtración por gel o electroforesis en gel de poliacrilamida, utilizan preparaciones parcialmente purificadas que en muchos casos muestran multiplicidad de formas como resultado del fenómeno de asociación-disociación que tiene lugar. No obstante, se han podido definir los pesos moleculares y estructuras cuaternarias de algunas polifenoloxidasas.

Por lo que se refiere a la polifenoloxidasa de champiñones se ha determinado el peso molecular de la forma predominante del enzima, resultando estar entre 116000 y 128000 daltones y siendo el peso molecular mínimo observado 26-32000 daltones. Se ha sugerido que este enzima está compuesto por cuatro idénticas subunidades, a su vez, cada una de ellas conteniendo un ión cobre (17,33,72). Este postulado además se favorecía por la observación de un equilibrio asociación-disociación entre varias formas, equilibrio que podía ser dirigido hacia la izquierda incrementando la concentración de proteínas y por la presencia de iones Ca^{++} (63), o hacia la derecha por

las altas temperaturas (50°C), altas fuerzas iónicas, pH ácido (4.4) y por la presencia de SDS ó EDTA; la urea (8M) causaba la completa disociación del tetrámero (72).

Harel y col. en manzana han observado la presencia de tres formas de la polifenoloxidasas de pesos moleculares 30-40000, 60-70000 y 120-130000 daltones que además eran interconvertibles (51). En el mismo tejido Zaprometov y col. sólo encontraron dos formas de la polifenoloxidasas, una forma dimérica con aproximadamente 70000 daltones de peso molecular y otra monomérica con 40000, diferentes no sólo por sus pesos moleculares sino también por sus Km (la forma monomérica presentaba una más alta afinidad por los monofenoles) (180). Esta distinta afinidad por los sustratos la había demostrado ya en 1974 Stafford para las formas de la polifenoloxidasas de hojas de sorgo (148); la forma de alto peso molecular (130000 daltones) presentaba actividad hidroxilante y deshidrogenante y la forma de bajo peso molecular (30000-40000 daltones) presentaba sólo actividad hidroxilante. Asimismo, existía una forma intermediaria que sólo presentaba la actividad ortofenoloxidasas (180).

Recientemente en tilacoides de cloroplastos de espinacas Golbeck y col. han encontrado también dos formas de la polifenoloxidasas que parecían ser el tetrámero y el monómero de una subunidad de peso molecular 42500 (38). La forma de mayor peso molecular era la forma más frecuente en las preparaciones frescas, mientras que en las preparaciones más purificadas la proporción de la forma de menor peso molecular se incrementaba a expensas de la primera (38). También en el estroma de cloroplastos de espinacas se ha aislado una proteína con actividad polifenoloxidasas que presentaba dos formas interconvertibles de distinto peso molecular (133).

Finalmente, en otros muchos vegetales se ha logrado demostrar también la naturaleza de agregados de monómeros de las polifenoloxidasas; además de los ya citados podemos nombrar: la caña de azúcar, el trigo, las hojas de té, la remolacha azucarera, el opio, el aguacate, los tubérculos de patata y las bananas (95).

1.4.3.3.- Composición en aminoácidos

Muchos autores han estudiado la composición en aminoácidos de las polifenoloxidasas de bacterias, hongos y de vegetales como patatas, espinacas y uvas, resultando mostrar una considerable similitud (8,9,19,75,170). Esta similitud es particularmente notable en lo que se refiere al contenido de aminoácidos básicos y a los contenidos de treonina, serina, glicina, alanina e isoleucina. Los niveles relativamente bajos de aminoácidos azufrados también se han observado en las polifenoloxidasas de distintas fuentes (9,75).

Aparte de su demostrado contenido en cobre (24) sobre los constituyentes no aminoacídicos en las estructuras de las polifenoloxidasas se han llevado a cabo un escaso número de trabajos. Balasingam y Ferdinand han observado que la mitad del peso molecular de la polifenoloxidasa de tubérculo de patata correspondía a ARN. El ARN no podía ser digerido por ribonucleasas pero su liberación por otros métodos provocaba la completa pérdida de la actividad del enzima (9). Yunusov y col. han afirmado en sus experimentos que la PPO de algodón contiene un polisacárido que incluye arabinosa, xilosa, galactosa y glucosa (179). Todos estos resultados sin embargo no son demasiado fiables y requerirían estudios adicionales.

1.4.3.4.- Estabilidad frente al pH

El pH óptimo de la mayoría de las polifenoloxidasas oscila entre 5.0 y 7.0, no obstante, la literatura revela distintos pH óptimos del enzima incluso para un mismo tejido (48). Un hecho frecuentemente repetido en las curvas de pH/actividad de las polifenoloxidasas es la presencia de dos máximos, de un máximo y un hombro prominente o bien un amplio rango de pH óptimo (46,48,49,115).

Los cambios en la forma de la curva pH/actividad de las polifenoloxidasas dependen del tipo de sustrato que esté siendo oxidado, y pueden darse también como resultado de variaciones en las condiciones de crecimiento o tratamiento de los órganos vegetales a partir de los cuales se aíslan los enzimas. Tales cambios en el pH óptimo para el desarrollo de actividad a veces van acompañados de la activación o inhibición del enzima. No es improbable que similares cambios tengan lugar "in vivo", durante el envejecimiento del tejido o por daños ocurridos por condiciones de estrés, siguiendo a esto la liberación del enzima unido a membrana hacia la fracción soluble de la célula (11).

En peras de Anjou, Smith y Montgomery han encontrado que el pH óptimo de la PPO es 5.1 (145), similar resultado han encontrado Rivas y Whitaker (122), sin embargo Halim y Montgomery han descrito que el pH óptimo de la PPO de preparados crudos de peras obtenidos en presencia de PVPP es de 7.0 (45).

Nilo Rivas ha estudiado el pH óptimo de la PPO del cambur manzano encontrando que éste se hallaba entre 6.5 y 6.6; hacia la derecha o hacia la izquierda de esos valores se producía una caída brusca en la actividad, y entre pHs 3.5

y 4.0 se observaba una inflexión en dicha actividad (106).

Wong y col. han mostrado valores de máxima actividad a pH 6.5, 6.8, 7 y 7.2 para cuatro isoenzimas de la PPO aislados de duraznos (174). Gregory y Bendall han observado el efecto del pH sobre la actividad de la polifenoloxidasas de té y han obtenido un pH óptimo variable según el sustrato utilizado: de 5.7 cuando el sustrato era pirogalol, y de 5.0 cuando se utilizó metil-catecol (41). Alberghina asimismo, ha encontrado un máximo de actividad a pH 4.3 y un punto de inflexión entre 5 y 6 en la oxidación del ácido clorogénico por la PPO de patatas (4). Otro máximo de actividad a pH 7.0 ha encontrado Palmer en la actividad polifenoloxidasas de bananas frente a dopamina (111). En chirimoyo Sánchez de Medina ha obtenido el pH óptimo de la polifenoloxidasas dentro del intervalo 6.5-7.0; el enzima además resultaba muy estable en un margen de pH que oscilaba entre 5.0 y 8.0 (130). Por último en polifenoloxidasas de tilacoides de cloroplastos de espinacas también se ha determinado su pH óptimo, encontrándose en este caso dentro del intervalo 5-7 (38).

1.4.3.5.- Latencia

Muchas polifenoloxidasas se encuentran en forma latente en las plantas. La activación del enzima se produce mediante tratamientos con detergentes, ácido o álcali, agentes desnaturalizantes, o con enzimas proteolíticos como la tripsina o tripsina más carboxipeptidasas. Un activador fisiológico podría ser el envejecimiento (124,153).

Kenter ha activado la polifenoloxidasas de Vicia faba por cortas exposiciones del enzima a pHs ácidos (3.0-3.5)

o básicos (11.5), o por incubaciones sucesivas con sulfato amónico a pH 5.0 (71). La activación del enzima aquí se achacaba a la liberación de una proteína inhibidora a la que se asumía el enzima estaba unido.

Mayer y Friend han utilizado detergentes para la activación de la polifenoloxidasas unida a membranas de cloroplastos de remolacha azucarera (94). El uso de detergentes aniónicos se interpretaba como que actuaban combinándose con los grupos catiónicos del enzima, resultando de esto la disociación del "complejo enzima-inhibidor". También en judías y champiñones se han utilizado detergentes para activar el enzima, sin embargo, en este caso la activación por detergentes o incluso por exposición a álcali, ácido o urea, se ha atribuido a un cambio conformacional más que a un proceso de disociación o agregación. Este cambio según el tejido podía ser reversible o irreversible (82,91). Sánchez de Medina en chirimoyo ha observado también que añadiendo Tritón X-100 a los extractos libres de células se producía un aumento muy elevado de la actividad PPO, lo que sugería que la polifenoloxidasas de este fruto debía estar fundamentalmente unida a partículas subcelulares más que como una fracción soluble (130).

Tolbert ha demostrado que la tripsina es asimismo un buen activador de las formas latentes de las polifenoloxidasas de cloroplastos de muchas plantas (153). El tratamiento con autolisados de tripsina liberaba patentemente la polifenoloxidasas de cloroplastos de espinacas, así pues la tripsina catalíticamente activa no era la responsable de esa activación (153).

Un caso especial de activación de forma latente de la polifenoloxidasas lo han proporcionado Golbeck y Cammarata con la polifenoloxidasas de membranas de tilacoides de cloro--

plastos de espinacas, estos autores han demostrado que los ácidos grasos producían activación del enzima (38). Los ácidos grasos, más efectivos cuanto mayor era su longitud y su grado de insaturación, rompían la estructura tilacoidal permitiendo la rápida y completa activación de la polifenoloxidasas latente por incrementar su accesibilidad al medio (38).

Finalmente y ya en 1985 Carlberg y col. han conseguido demostrar que el enzima polifenoloxidasas normalmente está en plantas como proenzima, el cual se puede volver activo por concentraciones milimolares de Ca^{++} o Mn^{++} o por tripsina en concentraciones más bajas de Ca^{++} (20).

1.4.4.- Reacciones catalizadas por las polifenoloxidasas

1.4.4.1.- Compuestos fenólicos

Las polifenoloxidasas actúan sobre numerosos sustratos naturales mono, di o polifenólicos. La actividad catalítica es dependiente de la estructura de los sustratos (Ver apartado 1.4.4.2.). Las sustancias pertenecientes a este amplio grupo de los compuestos fenólicos tienen en común el poseer un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxílicos, estas sustancias además tienden a ser solubles en agua puesto que la mayoría de ellas frecuentemente están combinadas con azúcares como glucósidos, y normalmente se localizan en las vacuolas (177).

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal pero sus niveles varían en relación con la especie, variedad, época del año, localidad, órganos

y enfermedad. En los frutos, por ejemplo, su concentración resulta particularmente alta, siendo ahí determinantes del color y sabor de estos (153). Neish ha sugerido que son productos del metabolismo de aminoácidos aromáticos, existiendo diversas rutas para su producción que conducen a una gran variedad de compuestos; estos productos secundarios pues aparentemente no juegan un papel vital en el metabolismo (153).

De entre los compuestos fenólicos naturales, de los que se conocen unas mil estructuras, los flavonoides son el grupo más grande, pero los fenoles monocíclicos, fenilpropanoides y quinonas fenólicas también existen en considerable número. Distintos grupos importantes de material polimérico de las plantas (ligninas, melaninas y taninos) se incluyen asimismo dentro de los compuestos fenólicos (24).

Los fenoles libres son compuestos relativamente raros en las plantas. Catecol, orcinol, foroglucinol y resorcinol, por ejemplo, sólo se han encontrado en algunas fuentes. Los ácidos fenólicos en cambio son más frecuentes; en las Angiospermas están el ácido p-hidroxi-benzoico, ácido protocatecuico, ácido vaníllico y ácido siríngico; el ácido gálico aparece también en muchas plantas de bosque (130, 153).

Los fenilpropanoides son compuestos fenólicos que tienen un anillo aromático al que se le une una cadena de tres carbonos. Derivan biosintéticamente del aminoácido fenilalanina y pueden contener en los carbonos 3 ó 6 uno o más residuos. Los fenilpropanoides más ampliamente distribuidos son los ácidos hidroxicinámicos y dentro de éstos los ácidos ferúlico, cafeico y p-cumárico. Todos estos ácidos están normalmente en las plantas como ésteres; el ácido clorogénico que resulta de la combinación de los ácidos cafeico y quínico es el derivado de los ácidos cinámicos más importante encontrado en fru-

tos (153).

También incluidos en los fenilpropanoides están las hidroxycumarinas de las cuales la más extendida es la cumarina, común en el césped y forrajes donde desprende un suave olor, y la hidroxycumarina. Los fenilpropanos importantes por su contribución al gusto y fragancia de las plantas se incluyen asimismo en este grupo de compuestos (153).

Los flavonoides, con estructuras derivadas de la flavona, están generalmente en las plantas unidos a azúcares como glicósidos. Flavanos, antocianinas, flavonoles, flavonas y flavonoides menores pertenecen a este grupo. Entre los flavanos que no se encuentran normalmente como glicósidos, los más comunes son la (+)catequina y (-)epicatequina (130). Entre las antocianinas, responsables del color de los pétalos, hojas y frutas en plantas superiores, la magenta es también la antocianina más común. Los flavonoles, distribuidos en las plantas como copigmentos de antocianinas, al igual que éstas, se encuentran como glicósidos de los que la rutina es el representante más importante. Las flavonas más conocidas son la apigenina y luteolina. Por último, y debido a su limitada distribución, un pequeño número de compuestos fenólicos se incluyen en los llamados flavonoides menores, en este grupo están las chalconas y como ejemplo la aureusirina, las flavononas y como ejemplo la naringina y las isoflavonas y como ejemplo la rotenona (153).

Finalmente las quinonas, pigmentos ampliamente distribuidos, al igual que ligninas y melaninas también pueden considerarse como integrantes del ya descrito grupo de los compuestos fenólicos (24).

1.4.4.2.- Especificidad de sustrato

La mayoría de los compuestos fenólicos citados anteriormente son sustratos de las polifenoloxidasas.

Las polifenoloxidasas de hongos y plantas superiores son enzimas que pueden actuar sobre un amplio rango de mono, di y polifenoles, siendo, sin embargo, sus afinidades por ellos relativamente bajas. Las Kms de las polifenoloxidasas por tanto, son elevadas, sus valores están alrededor de 1mM (47,122,153,174). No obstante, diversos autores han encontrado mayores afinidades (0.01-0.1mM) por los sustratos fenólicos en polifenoloxidasas de distintas fuentes como tubérculo de patata (4,115), algodón (179) y banana (110), hallándose además una excepcionalmente alta afinidad (1 μ M) para el caso de la polifenoloxidasa de Papaver somniferum (7).

La afinidad de las polifenoloxidasas para el oxígeno también es bastante baja (0.1-0.5mM), varía para las distintas formas del enzima de un mismo tejido y depende del tipo de sustrato que se oxide (4, 122).

La afinidad de la polifenoloxidasa por el sustrato depende de la estructura de este sustrato, los meta-difenoles, por ejemplo, son pobres sustratos de estos enzimas mientras que los orto-difenoles lo son buenos. Mayer ha demostrado también, en polifenoloxidasa de lechuga, que la actividad del enzima se incrementa cuando en los sustratos fenólicos aumenta el poder de retirar electrones de los sustituyentes en posición para (93). Estas observaciones se han descrito también en manzana (46) y en cerezas (79). En polifenoloxidasa de champiñón Duckworth y col. han observado, corroborando lo anterior, que cuando aumenta la capacidad de los sustituyentes en posición para de retirar electrones la Km disminuye y en este orden

H>SCN>COCH₃>CHO>CN>NO₂ (33). Las sustituciones en posición adyacente a los grupos -OH existentes, por el contrario, normalmente no provocan este mismo fenómeno (93).

Aunque las polifenoloxidasas oxidan una amplia gama de sustratos, los enzimas individuales tienden a oxidar un sustrato particular o un cierto tipo de compuesto fenólico que en algunos casos además, coincide con ser el más abundante en ese tejido particular. La dopamina, por ejemplo, es el principal sustrato fenólico de la polifenoloxidasa de plátano (42) y el ácido clorogénico y los flavanos: (+)catequina y (-)epicatequina, los principales de manzanas (140), peras (15) y aguacates (67). Los sustratos más rápidamente oxidados por la PPO de chirimoyo son la pirocatequina, dioxifenilalanina, dopamina, (+)catequina, (-)epicatequina y pirogalol (130). El quinol y pirogalol, que no son sustratos de muchas PPO pueden oxidarse sin embargo, el primero, por la polifenoloxidasa de patata (1), y el segundo, por la de remolacha azucarera (52). La polifenoloxidasa de hojas de té los oxida a ambos (41). Las antocianinas, flavonoles, flavonolglucósidos, flavonas, isoflavonas y C-glucósidos por último también se oxidan por un cierto número de polifenoloxidasas (130).

1.4.4.3.- Mecanismo de acción

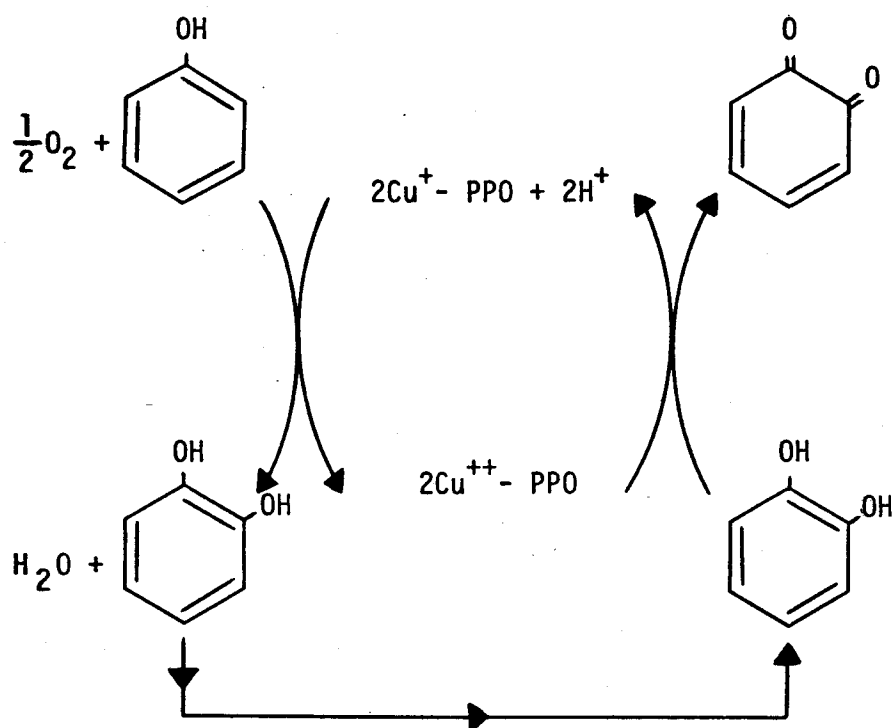
Durante bastante tiempo muchos autores han mantenido la idea de que solamente la reacción hidroxilante catalizada por las polifenoloxidasas y no la deshidrogenante era una reacción enzimática. Esto lo han propuesto Onslow y Robinson, y Keilin y Mann y ha sido rigurosamente defendido por Kertesz

y Zito (72,95). Sin embargo hay claras evidencias contra estas teorías y un gran número de argumentos lo atestiguan.

La hidroxilación de monofenoles y la oxidación de difenoles son dos acciones enzimáticas distintas y separables (24) y parece ser que un mismo enzima puede a menudo catalizar ambas reacciones. La existencia de diferentes proporciones actividad hidroxilante/actividad oxidante en diversos enzimas se ha atribuido a la existencia de isoenzimas y al hecho de que la presencia de Cu^+ y Cu^{++} de estos varía de unos a otros.

Las polifenoloxidasas son metaloenzimas que contienen un 0.2% de cobre (24) que puede encontrarse en forma de ión cuproso o cúprico, y aunque la implicación del cobre en las reacciones de la polifenoloxidasa no se discute y está bien establecida, el estado en que normalmente se encuentra éste en el enzima aún no ha sido satisfactoriamente descrito. En cuanto al número de iones cobre necesarios para que el enzima sea activo los trabajos realizados también son contradictorios; unos autores han demostrado que subunidades del enzima con peso molecular de 33000 daltones y sólo un ión cuproso eran capaces de oxidar los sustratos fenólicos (44) y otros autores, en cambio, han observado que se requieren dos iones de cobre para que tal oxidación se produzca (27,81). Cheftel ha propuesto una hipótesis en la que el metaloenzima poseería dos átomos de cobre en estado de ión cúprico (24). Estos iones aceptarían un par de electrones procedentes del difenol que pasaría a la forma ortoquinona con lo que el enzima se encontraría en estado reducido, y posteriormente el oxígeno molecular aceptaría los electrones aportados por la polifenoloxidasa la cual recuperaría su estado primitivo oxidado originándose simultáneamente una molécula de agua. La hidroxilación de un

monofenol se supondría catalizada por la polifenoloxidasas que en presencia de oxígeno y protones pasaría de la forma reducida a la oxidada con formación concomitante de agua. Esta hipótesis explicaría la fase "lag" inicial en la reacción de hidroxilación de monofenoles y el hecho de que los difenoles la acorten o hasta la anulen. En el esquema 1 queda representado el mecanismo de acción de las polifenoloxidasas según Cheftel (24).



Esquema 1.- Mecanismo de acción de la PPO según Cheftel (24).

En 1985 estudios recientísimos basados en técnicas de dicroísmo celular (CD) y de resonancia de espín electrónico (EPR) han aclarado bastante más el papel del cobre en el mecanismo de acción de las polifenoloxidasas (172). Según Wilcox y col. el enzima contiene un centro activo en el que se sitúan dos átomos de cobre, denominado complejo binuclear, implicado en la catálisis de hidroxilación de monofenoles a o-difenoles (actividad cresolasa) y en la oxidación de estos o-difenoles a o-quinonas (actividad catecolasa). Estos autores han preparado este complejo binuclear en varias formas, y el estudio sistemático de estos derivados es lo que ha aportado nuevos datos en la geometría y estructura electrónica del centro activo de las polifenoloxidasas. Una forma es la oxigenada que contiene dos iones cobre (II) unidos por un grupo endógeno que los acopla y unidos también por una molécula exógena de oxígeno como peróxido. Otra forma es la oxidada que contiene asimismo dos iones cobre (II) unidos por un puente endógeno que los acopla pero sin el grupo exógeno. Y por último, otra forma es la reducida que contiene dos iones de cobre en un estado de oxidación de valencia mezclada Cu (I) y Cu (II). Con estas formas del enzima junto con los efectos sobre ellas de los sustratos e inhibidores se ha sugerido el siguiente modelo estructural para el mecanismo de la ortohidroxilación de monofenoles y oxidación de los difenoles resultantes (172).

En la reacción de hidroxilación el enzima en forma reducida originariamente pasaría a forma oxigenada por el oxígeno molecular; inmediatamente el sustrato fenólico se coordinaría en una posición axial con uno de los iones de cobre del enzima y a continuación, el reajuste electrónico conduciría a la formación de una estructura bipiramidal trigonal intermedia, que introduciría un fenómeno de polarización en el

punte -O-O- y activaría la reacción. Todo ello conduciría a la ortohidroxilación por ese puente peróxido, pérdida concomitante de agua y coordinación del correspondiente difenol. Subsiguientemente la oxidación del difenol a quinona produciría un complejo binuclear reducido el cual liberaría la quinona (Figura 1) (172).

Para la reacción de oxidación de sustratos difenólicos a o-quinonas los estudios cinéticos parecen indicar que los requerimientos geométricos y electrónicos serían menores que en la oxidación de monofenoles. El difenol coordinaría tanto con la forma reducida, como con la oxidada y con la oxigenada del complejo binuclear y sería oxidado (Figura 2).

Esta teoría como se discutirá más tarde también explica el distinto tipo de reacción que dan mono y difenoles (172).

Una cuestión discutida en cuanto a la reacción de hidroxilación, es si el intermediario o-difenol que se forma durante esa reacción se libera del enzima o si la reacción produce directamente o-quinona. Algunos autores afirman que el difenol no aparece en forma libre; otros sin embargo opinan lo contrario (32,72). Esta cuestión se relaciona con el problema aún sin resolver de si existen sitios separados de unión al enzima para mono y difenoles (32,44,80).

Los últimos trabajos parecen evidenciar más la existencia de un único sitio. Recientemente Detmer y Massey con técnicas de espectrofotometría ultra-rápida, han estudiado el mecanismo de acción de las fenol hidroxilasas que contenían flavinas aromáticas como coenzimas (29). Las técnicas demostraron que el mecanismo de estos enzimas era del tipo ping-pong Bi-Uni-Uni-Bi también llamado de sustitución concertada (Esquema 2). Este mecanismo sería el siguiente: la fenol hidroxilasa

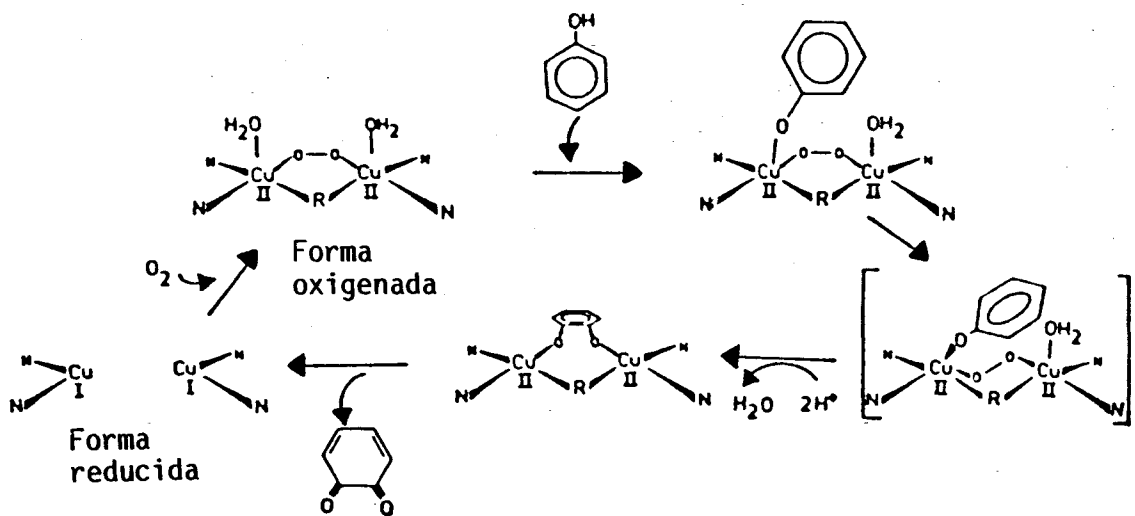


Figura 1.- Mecanismo estructural propuesto para la hidroxilación oxidativa de sustratos monofenólicos a o-quinonas por polifenoloxidasas (172).

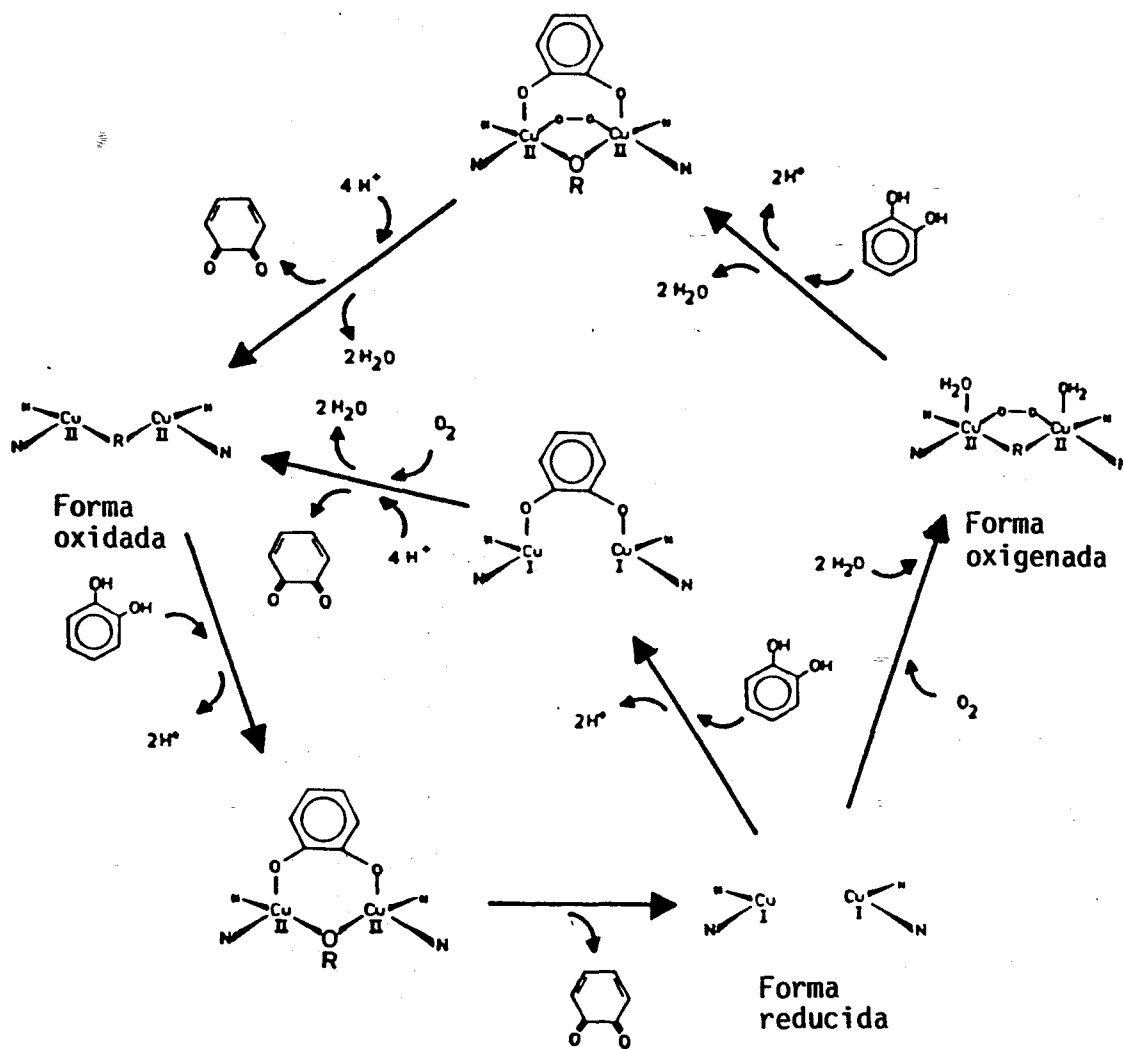
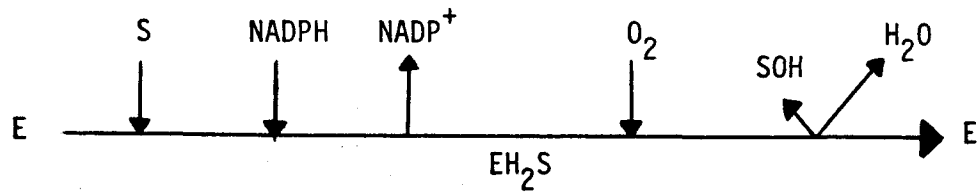


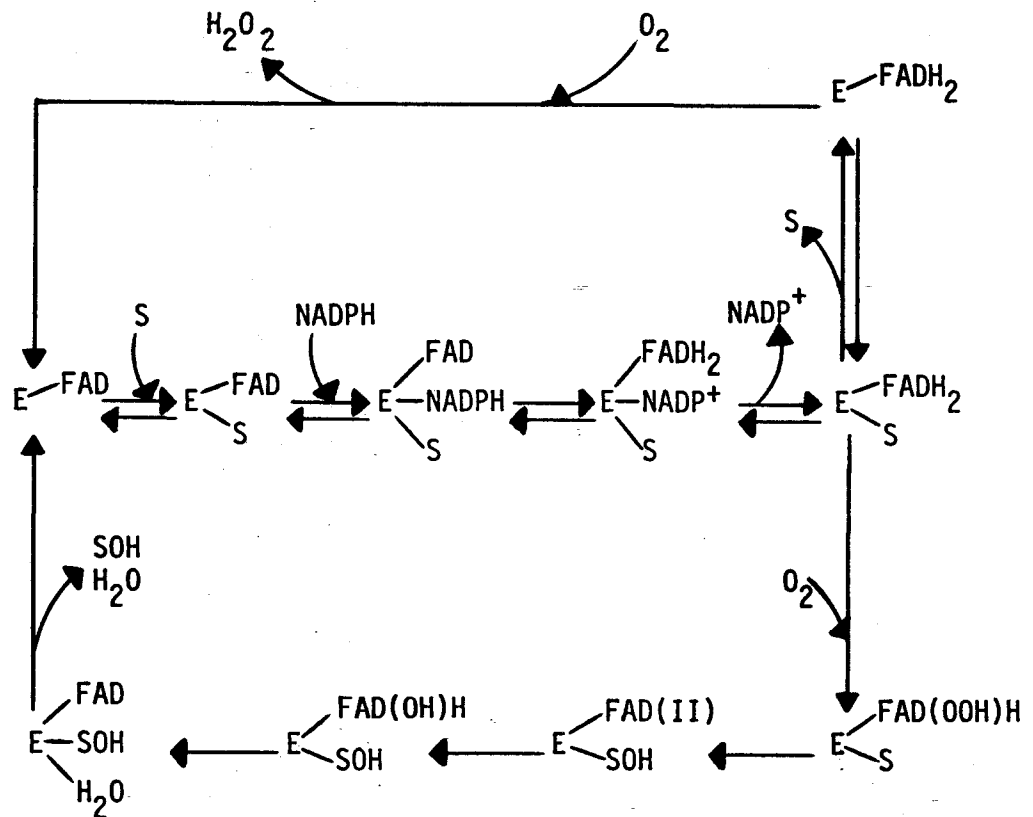
Figura 2.- Ciclo catalítico para la oxidación de sustratos difénolicos a o-quinonas mediado por polifenoloxidasasa en presencia de oxígeno (172).

oxidada se uniría primero al sustrato fenólico y después al NADPH. La presencia del sustrato facilita la reducción del enzima por el NADPH lo que hace deducir que, cuando el sustrato se une, ocurre un cambio conformacional del enzima; se formaría así un compuesto ternario Enzima-sustrato-NADPH y, a continuación, los electrones se transferirían a la flavina, disociándose el piridín-nucleótido oxidado. Puesto que la relación de producto formado a NADPH es menor de uno, el mecanismo de reacción a partir de aquí debería bifurcarse en dos rutas productiva y no productiva. En la ruta no productiva el sustrato se disociaría del complejo enzima reducido-sustrato, y ese enzima reducido reaccionaría entonces con el oxígeno dando lugar al enzima oxidado y a agua oxigenada. En la ruta productiva el complejo enzima reducido-sustrato reaccionaría irreversiblemente con el oxígeno y se formarían tres intermediarios, que bajo ciertas condiciones no son evidenciables. Finalmente la liberación del producto y del enzima oxidado completaría el ciclo que se detalla en el esquema 3 (29).

Estos autores han estudiado la naturaleza de estos intermediarios y han llegado a la conclusión de que el intermediario I, cuya velocidad de formación es directamente dependiente de la concentración de oxígeno, podría ser un flavín C(4a)-hidroperóxido. Cuando el oxígeno se transfiere al sustrato ese intermediario I pasa a II cuya estructura aún se desconoce, y por último el intermediario II pasaría a III que se correspondería con un flavín C(4a)-hidróxido; después el enzima oxidado se liberaría. La naturaleza del intermediario II sería importante conocerla para saber si el enzima aumenta la reactividad química del oxígeno a nivel del intermediario I, de forma que el oxígeno se pueda insertar en el anillo aromático del compuesto fenólico; de otro modo el intermediario I no sería



Esquema 2.- Mecanismo de sustitución concertada propuesto por Detmer y Massey (29) para la hidroxilación de monofenoles por fenol hidroxilasas.



Esquema 3.- Mecanismo expandido propuesto por Detmer y Massey (29) para la hidroxilación de monofenoles por fenol hidroxilasas.

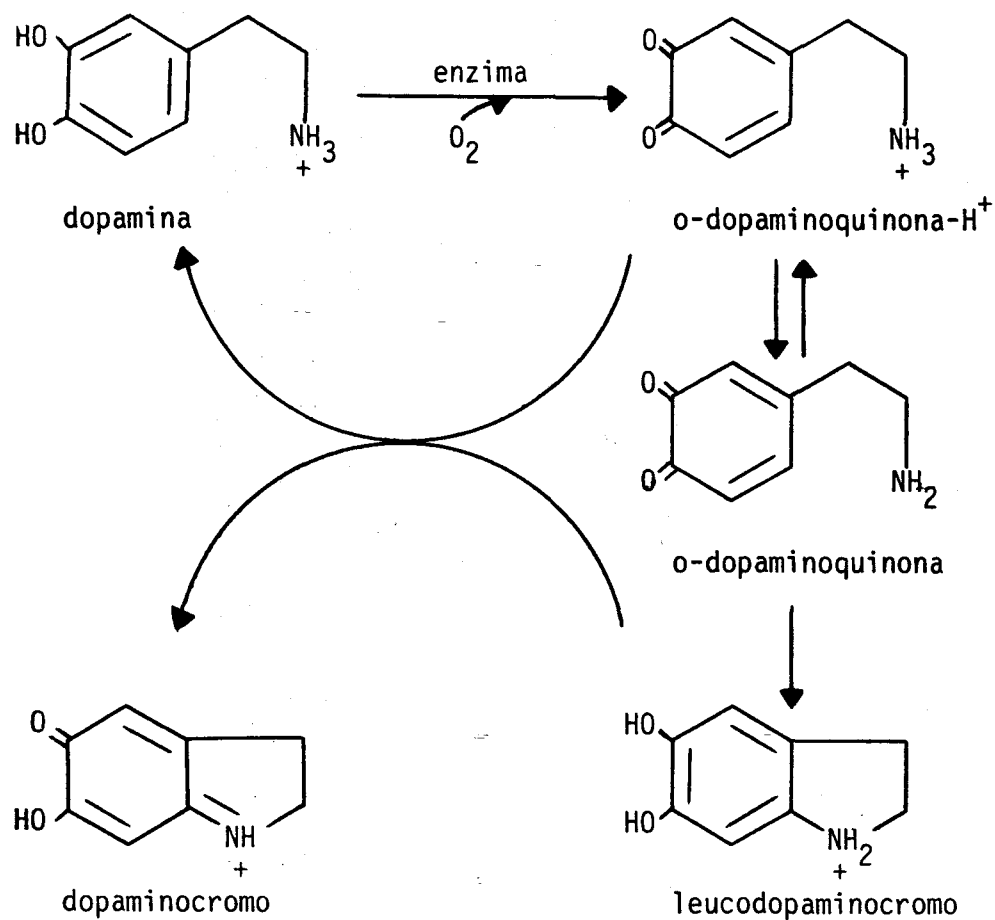
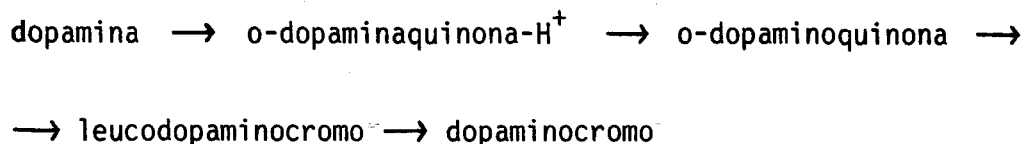


Figura 3.- Mecanismo propuesto para la oxidación de dopamina a dopaminocromo catalizada por la polifenoloxidasas de champiñón (61).

lo suficientemente electrofílico como para transferirlo (29).

La conversión del intermediario I a II y del II a III se ha demostrado que está catalizada por ácidos (30), mientras que la conversión del intermediario III al enzima oxidado lo es por bases. Esto sugiere que la última reacción depende de la liberación del protón N (5) de la flavina.

Otros autores finalmente han estudiado también los intermediarios de la reacción de la polifenoloxidasas pero en su actividad deshidrogenante (61). Jimenez y col. han observado los pasos que tienen lugar en la oxidación de la dopamina en tejidos de champiñón. El mecanismo de acción del enzima se caracteriza por varias reacciones químicas acopladas siendo los pasos de transformación los siguientes:



En la figura 3 se detalla más ampliamente este mecanismo propuesto (61).

1.4.4.4.- Activadores e inhibidores

Hay dos tipos principales de inhibidores de las polifenoloxidasas: los que interaccionan con el cobre del enzima y los compuestos que afectan al sitio de unión del sustrato fenólico. Con algunos inhibidores del primer tipo es posible encontrar inhibición competitiva con el oxígeno e inhibición no competitiva con el sustrato fenólico; lo inverso ocurre

con los inhibidores del segundo tipo.

Inhibidores del primer tipo pueden ser el 2,3-naftalendiol, la cianida, dietilditiocarbamato, salicilaldoxina, tiourea y feniltiourea (39,57,101,136). Otros compuestos que acomplejan iones metálicos, aunque menos específicos del cobre, también inhiben el enzima en algunos casos: así están la azida sódica, EDTA, la 8-OH-quinoleina y la o-fenantrolina (25,101,174). Otros inhibidores descritos han sido 3,4-diclorofenilserina, borato, CNK, SO₂ y ClNa (167).

El CO₂ también se muestra como inhibidor de las polifenoloxidasas. Chaves y Tomás han estudiado el efecto del CO₂ sobre la polifenoloxidasa de manzanas "Red Delicious" observando que la actividad del enzima disminuía con el aumento de concentración de CO₂ (23). Con un 30% de CO₂ la inhibición del enzima, que era de tipo competitivo y reversible, llegaba a ser del 70% a 20°C.

Muchos autores han demostrado la inhibición por haluros en polifenoloxidasas de distintas fuentes (11,37,123,174). Esta inhibición es dependiente del pH y puede ser causada por la formación de un complejo entre el haluro y el cobre del enzima (12).

La PVP es una sustancia que absorbe fenoles y que se utiliza para proteger los enzimas de las plantas de la inactivación por compuestos fenólicos o por sus productos de oxidación (84). Esta sustancia es también un inhibidor de las polifenoloxidasas (39). El modo en que la PVP actúa, sin embargo, no está claro. Algunos autores han sugerido que la PVP inhibe el enzima por unirse con el complejo enzima-sustrato, probablemente por la mitad sustrato del complejo, y otros, en cambio, opinan que esta inhibición puede incluso ocurrir en ausencia de sustrato (48,95). No obstante, lo que sí se conoce con cer-

teza es que la N-vinil-2-pirrolidona, monómero de la PVP, que también inhibe la polifenoloxidasas, contiene estructuras similares a las uniones peptídicas y que la inhibición por este camino podría relacionarse con la que producen en las polifenoloxidasas distintos polipéptidos aislados de fuentes naturales que suelen reaccionar con el cobre (95).

En cuanto a la inhibición de las polifenoloxidasas por compuestos -SH y otros agentes reductores, distintos trabajos documentan este punto (41,58,120). Aparte del efecto de sustancias tales como el bisulfito, tiosulfato, GSH y cisteína (4,57,120), hay datos de la inhibición por concentraciones relativamente bajas de tiocompuestos como el mercaptobenzotiazol sódico y el mercaptoetanol (57,112). En estos casos también se asume que los compuestos reaccionan con el cobre del enzima, sin embargo, hay que tener en cuenta que los agentes reductores pueden afectar la reacción de la polifenoloxidasas por distintos caminos.

Recientemente Golan-Goldhirsh y Whitaker han hecho un estudio comparativo de distintos agentes reductores sobre la actividad polifenoloxidasas de champiñón (37). El ditioneitol, bisulfito sódico, glutatión y ácido ascórbico, en este orden, producían una fase "lag" inicial en la reacción del enzima que era mayor a mayores concentraciones. Asimismo estos compuestos, una vez transcurrida la fase "lag", hacían disminuir la velocidad de reacción, también proporcionalmente a las concentraciones. Para conocer si el efecto de estas sustancias se debía a que actuaban sobre los productos de la reacción o sobre el propio enzima, los autores incubaron ésta con ditioneitol, bisulfito sódico, glutatión y ácido ascórbico separadamente en ausencia de sustrato; de este modo los cuatro compuestos causaron también pérdida de actividad (37).

Como inhibidores de los sustratos fenólicos pueden servir compuestos que son lentamente oxidados como el 4-nitrocatecol (172), p-nitrofenol (123) y 4-clorofenol (123), o compuestos que son parecidos estructuralmente al sustrato pero que no son oxidables como el ácido benzoico, ácido OH-benzoico y otros ácidos carboxílicos (117,122).

Pifferi y col. han estudiado el efecto de los ácidos carboxílicos sobre la oxidación del 4-metil-catecol por una o-difenoloxidasas extraída de cerezas (117). Los ácidos benzoico, con inhibición no competitiva, cinámico con competitiva, y m- y p-cumárico con parcialmente competitiva eran potentes inhibidores mientras que sus correspondientes ésteres no lo eran tanto. Los ácidos ferúlico, sinápico, quínico, tri-OH-benzoico y otros ácidos mono o dicarboxílicos como el acético, oxálico, malónico, succínico, crotónico, mucónico y maleico, sin embargo, daban lugar a una inhibición menor. Estos autores han demostrado también que los derivados fenólicos con sustituyentes dadores de electrones producen una menor inhibición que los que poseen grupos atrayentes de electrones, los cuales incluso producen una mayor inhibición que el propio ácido benzoico. Los sustituyentes en orto con respecto a los meta o para también hacen disminuir el grado de inhibición. En cambio, sustituyentes en meta y para a la vez, hacen disminuir el efecto inhibitorio (117). Todo ello indica que el anillo bencénico juega un papel importante en el mecanismo de inhibición. Por otra parte, los dobles enlaces conjugados entre sí y con el grupo carboxílico, contrariamente a lo que ocurre con sus correspondientes cadenas alifáticas o con compuestos heterocíclicos, también incrementan la fuerza inhibitoria (117).

Las conclusiones sacadas por Pifferi y col. en

o-difenoloxidasas de cereza (117) han sido igualmente mostradas por Sabater-García en o-difenoloxidasas de albaricoque (146).

En cloroplastos de hojas de espinacas Sato también ha ensayado el efecto de distintos ácidos carboxílicos sobre la actividad fenolasa. En este caso, el ácido oxálico inhibía el enzima siendo poco significativa la inhibición producida por los ácidos malónico, succínico, fumárico, málico, glicólico, glioxílico, pirúvico y glicérico (135).

Kahn ha estudiado el efecto inhibitorio de los ácidos p-cumárico, protocatecuico y transcinámico sobre la reacción de pardeamiento del 4-metil-catecol por la polifenoloxidasas de aguacate (65). Como en casos anteriores, los tres compuestos inhibían la reacción en mayor proporción al aumentar la cantidad de inhibidor. Los ácidos p-cumárico y protocatecuico también se han mostrado como inhibidores, el primero de la reacción de la polifenoloxidasas de manzana y el segundo en la reacción de la polifenoloxidasas de haba (123,140).

Las catequinas también se han manifestado como inhibidores de las polifenoloxidasas. Esto se ha observado en vástagos verdes de té donde se ha comprobado que el galato de epicatequina y el galato de epigalocatequina inhiben la actividad de estas enzimas (126).

Los polifenoles condensados inhiben las polifenoloxidasas por la capacidad que poseen para acomplejarse con los polipéptidos y las proteínas. Tales compuestos se unen a los polipéptidos por puentes de hidrógeno formados entre los OH fenólicos y los grupos carbonilos de las uniones peptídicas (43). Los puentes de hidrógeno son débiles, pero puesto que el número total de ellos entre polifenol y cadena peptídica es alto, la fuerza de unión se hace apreciable dando lugar a complejos relativamente estables.

Algunos autores han ensayado también el foroglucinol, orcinol y resorcinol como posibles inhibidores de la reacción de las polifenoloxidasas (65,77,95,120). En la reacción de oxidación del ácido clorogénico por la polifenoloxidasa de aguacates Lula, el resorcinol se mostraba como un inhibidor competitivo (77), con el foroglucinol ocurría igual pero con la polifenoloxidasa de melocotones y patata (120). Sin embargo, en otros casos estos mismos compuestos se comportan como activadores. Kahn en polifenoloxidasa de aguacates Lerman y Fuerte ha observado que tanto orcinol como foroglucinol y resorcinol actúan como activadores de la reacción a pesar de que sus efectos son distintos (65). Orcinol y resorcinol incrementaban las absorbancias de la reacción, proporcionalmente a sus concentraciones, hasta alcanzar una determinada concentración a partir de la cual dichas absorbancias no continuaban aumentando; el foroglucinol incrementaba también esas absorbancias pero sólo a concentración alrededor de 3.3mM, su efecto sinérgico desaparecía completamente a concentración 13.2mM, y a concentración 26.4mM este compuesto incluso reducía la oxidación (65). El efecto sinérgico de estos tres compuestos se ha atribuido por muchos autores a una reacción no enzimática de esos fenoles con los productos de reacción de las polifenoloxidasas (65).

Distintos investigadores han encontrado otros activadores de las polifenoloxidasas, activadores que en algunas ocasiones podían haberse considerado como inhibidores, así ha ocurrido con el ácido ferúlico y gálico en la polifenoloxidasa de hojas senescentes del álamo negro (155), o con el ascorbato que acortaba la fase "lag" de la actividad monofenolasa de muchas polifenoloxidasas (25). Finalmente como activadores también se pueden citar todos aquellos agentes químicos o com-

puestos que inducen la actividad de la polifenoloxidasas en su estado latente, estos activadores por estar descritos en el apartado 1.4.3.5. no los trataremos aquí.

Kahn ha estudiado el efecto del agua oxigenada sobre la polifenoloxidasas de aguacate (69). Se conoce que varios radicales oxígeno se forman en los tejidos de las plantas bajo condiciones aeróbicas y que estos radicales inestables se transforman fácilmente en H_2O_2 ; la concentración de H_2O_2 se incrementa durante la maduración al igual que la actividad polifenoloxidasas. Kahn ha observado que el agua oxigenada a concentraciones entre 3.6mM y 364mM acorta la fase "lag" de actividad de la polifenoloxidasas frente a tiramina. A concentración 8mM la fase "lag" desaparece. En cuanto a la cinética de formación de dopacromo, una vez superada la fase "lag", bajas concentraciones de H_2O_2 incrementan la velocidad de reacción mientras que altas no la modifican. Sin embargo, la formación de dopacromo en presencia de elevadas concentraciones de H_2O_2 sólo dura un cierto tiempo. Parecía que el H_2O_2 tenía un efecto de blanqueamiento eventual sobre la melanina y el dopacromo que habían sido formados anteriormente en la reacción (69).

Utilizando DOPA como sustrato, bajas concentraciones de H_2O_2 (2-13.2mM) incrementaban la velocidad de conversión de DOPA a dopacromo, sin embargo, concentraciones intermedias y altas (66-1000mM) hacían disminuir esa velocidad de reacción y la cantidad final de producto formado. Las melaninas eran también atacadas por el H_2O_2 (69).

Kahn por último en estos experimentos con objeto de comprobar el efecto del agua oxigenada sobre el enzima en sí, incubó éste en ausencia de sustrato con distintas concentraciones de H_2O_2 resultando que la polifenoloxidasas se inacti-

vaba ya a concentraciones comprendidas entre 1.7mM y 17mM, esta inactivación también era más rápida en el caso de la reacción de la tirosina que en el de la oxidación de DOPA (69).

1.4.5.- Localización intracelular

Excluyendo unos pocos casos de hongos donde se ha demostrado excretarse al medio (78), la polifenoloxidasas es un enzima intracelular. Sólo podría considerarse "extracelular" cuando se localiza en la fracción de la pared celular de las plantas (28,111).

La polifenoloxidasas en hongos parece ser soluble, lo mismo que ocurre con algunas bacterias estudiadas. Sin embargo, en plantas, el enzima ha sido localizado tanto en la fracción soluble como en la particulada (70,92,153). Estas diferentes localizaciones del enzima dependen mucho del tipo de homogenización utilizado para la liberación de la polifenoloxidasas, puesto que existen muchos tejidos ricos en compuestos fenólicos los cuales pueden causar a veces la unión a membranas de enzimas que inicialmente son solubles. Craft por ejemplo ha observado que en tubérculo de patata la polifenoloxidasas, originariamente soluble, durante la disrupción y fraccionamiento se une a membranas (95).

Sanderson por su parte también ha comprobado que la polifenoloxidasas de hojas de té permanece soluble siempre que el aislamiento se lleva a cabo en presencia de poliamida que es un absorbente de fenoles endógenos (131). Muchos autores pues, debido a esto, han llegado a concluir que la mayoría de las localizaciones particuladas mostradas en algunos trabajos son sólo artefactos. De cualquier modo, y a pesar de los posi-

bles artefactos, existe una gran evidencia de muchas polifenoloxidasas unidas a membranas.

Puede ocurrir también como otros investigadores han demostrado, que los enzimas, normalmente en forma particulada, puedan pasar bajo ciertas condiciones a la forma soluble. Esto se ha visto por ejemplo en cultivos de manzana después de una exposición a condiciones de estrés tales como deficiencia de nutrientes o de sustancias de crecimiento. La solubilización de PPO también se da bajo condiciones naturales como la maduración o el envejecimiento (11,50).

En cuanto a la localización particulada, un gran número de plantas y de tejidos de plantas han sido estudiados dando como resultado que las polifenoloxidasas están localizadas en una gran variedad de orgánulos celulares como mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, microsomas, microcuerpos, etc. (55,56,70,107,127,137,150,154).

Ruis ha localizado la polifenoloxidasa de tubérculo de patata empleando centrifugación diferencial y centrifugación en gradiente de sacarosa (127). El autor después de fraccionar y medir los distintos enzimas marcadores observaba que la PPO aparecía asociada con la fracción peroxisomal del precipitado de 3200xg, y a la vez con los microsomas del precipitado de 100000xg (127).

En hojas de té Takeo ha demostrado que la polifenoloxidasa estaba asociada con partículas tan pequeñas como mitocondrias y no con cloroplastos (150). El tejido homogeneizado con tampón, isoascorbato y poliamida, se filtraba y seguidamente se sometía a centrifugación diferencial. El 50% de la actividad PPO permanecía en el precipitado de 15000xg y el 25% en el sobrenadante; sin embargo, cuando se incluía poliamida en el medio de homogenización un 63% de la actividad per-

manecía en el precipitado de 1400xg y un 4% en el sobrenadante. Así pues, la mayor proporción de actividad enzimática se detectaba en la fracción de las pequeñas partículas. Los polifenoles presentes en los extractos coagulaban con el enzima cuando no existía poliamida en el medio. Comparando además la relación actividad/concentración de clorofila, esta proporción resultaba mayor en la fracción de 15000xg que en la de 1400xg, lo que indicaba que el enzima estaría en partículas más pequeñas que los cloroplastos, los cuales a 1400xg ya deberían haber sedimentado. Si la mayor cantidad de enzima hubiese estado en los cloroplastos habría habido, como mucho, igual proporción en las dos fracciones suponiendo que gran parte de estos orgánulos estuviesen rotos (150).

Estos resultados, sin embargo, están en contradicción con los obtenidos por Kato y col. para el mismo tejido (70). Los autores han investigado la localización de la polifenoloxidasas en hojas de té utilizando Polyclar AT como absorbente de polifenoles. El material se homogeneizaba en un medio que contenía Polyclar AT, sacarosa, tampón, EDTA e isoascorbato, después de filtrar se centrifugaba diferencialmente y a continuación en gradiente de sacarosa; finalmente se fraccionaba y se medían marcadores enzimáticos y PPO. Se obtenían dos fracciones de la polifenoloxidasas: una fracción pesada que se correspondía con los marcadores de peroxisomas y no de mitocondrias y cloroplastos, y una fracción ligera que parecía ser una porción fragmentada de la primera (70).

Sharon y Kahn han intentado localizar también la polifenoloxidasas de frutos de aguacate (142). Utilizando un medio óptimo de homogenización, centrifugación diferencial y centrifugación en gradiente de sacarosa, la polifenoloxidasas resultó encontrarse en los peroxisomas (142).

Por último, con medios citoquímicos se ha conseguido localizar también la polifenoloxidasa de espinacas (54). Henry y col. después de homogeneizar el tejido, centrifugar diferencialmente y centrifugar en gradiente discontinuo de sacarosa, obtenían una serie de fracciones a cada una de las cuales se les hacía un análisis ultraestructural para la localización de la polifenoloxidasa. El enzima estaba presente en las fracciones que contenían las lamelas de los grana de los cloroplastos (54).

No obstante, pese a los resultados anteriores, Vaughn y Duke recientemente han sugerido que la localización de la polifenoloxidasa sólo es plastidial, y que el resto de las localizaciones atribuidas sólo son artefactos debidos a que erróneamente se puede identificar la POD como PPO, debidos también a la solubilización del enzima durante el aislamiento del orgánulo, o debidos por último a la presencia de plastidios en otras fracciones de orgánulos (165).

Tres líneas de experimentos han aprobado la hipótesis de Vaughn y Duke: estudios de fraccionamiento, estudios histoquímicos y estudios sobre la modificación química de los plastidios.

Los estudios de fraccionamiento celular (centrifugación diferencial o en gradiente) mostraban que los precipitados enriquecidos en clorofila u otros marcadores plastídicos estaban también enriquecidos en PPO (6,54,55,114). Así, los casos donde la polifenoloxidasa se decía estar asociada con otra fracción organular no tendrían ningún valor significativo puesto que ocurría que, o bien no se habían tomado precauciones para excluir el papel de la oxidación peroxidativa de los fenoles, o bien es que el tejido utilizado estaba ya senescente. Además si sólo se usaba la clorofila como marcador plastídico,

podía darse que leucoplastos y plastidios epidérmicos que contenían polifenoloxidasas pero poca o ninguna clorofila podían erróneamente ser clasificados como otros orgánulos, resultando pues una falsa localización (108,166).

Los estudios histoquímicos también han proporcionado una clara evidencia de la polifenoloxidasas como enzima plastídico. Gracias a ellos este enzima ha sido encontrado en una gran variedad de plastidios: plastidios de raíces, amiloplastos de tubérculo de patata, plastidios de hipocotilo, plastidios epidérmicos, plastidios de cultivos de zanahoria, plastidios apicales, etioplastos, cromoplastos y por último cloroplastos de una gran diversidad de especies (36,53,91,95,103,108,113,163,164,166). En ninguno de estos estudios citoquímicos donde se tomaron los controles apropiados la polifenoloxidasas demostró estar asociada con otro orgánulo.

Por último, modificando los plastidios, y no afectando en absoluto al resto de los orgánulos, se ha comprobado también que la actividad polifenoloxidasas desaparece. La tentoxina es un tetrapéptido cíclico que actúa específicamente sobre los cloroplastos produciendo en ellos clorosis (163,164), pues bien la actividad polifenoloxidasas está completamente ausente en todos aquellos plastidios de plantas crecidas en solución de tentoxina, en este caso si la polifenoloxidasas hubiese estado localizada en sitio diferente del plastidio esa pérdida total de actividad no se debería haber presentado (163,164).

1.4.6.- Papel fisiológico

Mientras que en hongos y bacterias la función de las polifenoloxidasas no ha sido bien establecida, en las plan-

tas se les han atribuido diversas funciones. Basado en la capacidad de las polifenoloxidasas para convertir monofenoles en o-difenoles "in vitro", muchos autores han sugerido que estas enzimas podían tener un papel en la síntesis "in vivo" de difenoles (95). Existen distintos argumentos en contra de esta función biosintética. En algunos tejidos se ha observado que la completa pérdida de actividad polifenoloxidasas no afectaba en absoluto al metabolismo de los compuestos fenólicos (163, 164). Por otra parte, tampoco se conoce aún si los o-difenoles en la reacción de hidroxilación de monofenoles se liberan como tales. Por último si se acepta que la polifenoloxidasas está exclusivamente localizada en cloroplastos, sería imposible también que la polifenoloxidasas estuviera implicada en el metabolismo de los compuestos fenólicos debido a la distinta compartimentación de éstos y el enzima, que impediría entraran en contacto (165).

Un segundo papel atribuido a las polifenoloxidasas es su implicación en la cadena metabólica respiratoria actuando de forma similar a las citocromo oxidasas (95).

También se ha pensado que las polifenoloxidasas podían afectar la regulación del crecimiento de la planta. Gordon y Paleg han demostrado que las quinonas son capaces de interactuar con el triptófano para formar finalmente ácido indolacético, por el contrario otros autores lo que han observado es que estas polifenoloxidasas podían catalizar la destrucción de auxinas (39). En ambos casos, sin embargo, el hecho de que estas enzimas pudieran estar envueltos en determinar las concentraciones de auxinas es algo todavía dudoso (143).

En las reacciones que proporcionan a las semillas sus cubiertas impermeables al agua parecen también estar comprometidas las polifenoloxidasas. Existen así gran número de semi-

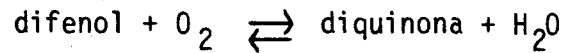
llas con cubiertas permeables al agua que a la vez son carentes de polifenoloxidasas; en semillas con polifenoloxidasas parcialmente inhibidas ocurre una pérdida de permeabilidad (88,89, 90).

Después de que los tejidos se dañan estos se oscurecen. Este pardeamiento como ya hemos visto se debe a la acción catalítica de las polifenoloxidasas y se da como consecuencia de que los sustratos se hacen más accesibles al enzima, y como consecuencia, también, de que el enzima latente se activa. La cuestión que se plantea es el tipo de beneficios que esta reacción de oscurecimiento puede conferir al tejido. Posiblemente puede promover la curación de las heridas o simplemente reducir la infección o velocidad de infección. Sin embargo, es difícil entender como un mecanismo tan complicado como el de las polifenoloxidasas pueda estar actuando para producir lo que parece ser sólo una ayuda limitada (95).

Muchos autores han asignado a las polifenoloxidasas el papel de dar resistencia a las plantas frente a las enfermedades. En efecto, la actividad polifenoloxidasa realmente incrementa después de una infección por virus, bacterias u hongos. Kosuge ha demostrado que las quinonas son tóxicas para gran cantidad de enzimas extracelulares producidos por organismos patógenos (95). Así pues, la planta, tras la infección, reaccionaría produciendo tales quinonas (128). No obstante se sabe que a menudo la polifenoloxidasa es inactivada por sus propios productos. Además los organismos patógenos pueden producir por sí mismos enzimas que destoxifican los compuestos producidos por el hospedador para protegerse (95,128).

Debido a la localización plastídica de la polifenoloxidasa en gran número de ocasiones si no en todas, se ha propuesto que estos enzimas podían estar envueltos en alguna

ruta de la fotosíntesis (165). Mayer y Harel han hipotetizado que la polifenoloxidasas podría proveer un tampón de oxígeno del modo siguiente:



En esta reacción el ascorbato y el NADPH se utilizarían para regenerar el difenol a la vez de para evitar la acumulación de quinonas.

La implicación de las polifenoloxidasas en el PSII no está muy clara. Ninguna proteína con cobre está envuelta en la escisión del H_2O . Además muchas células sin actividad polifenoloxidasas exhiben actividad en el PSII. Lieberei y Biehl tampoco han encontrado la polifenoloxidasas asociada a PSI, por tanto se puede resumir que el papel de la polifenoloxidasas en la fotosíntesis tiene lugar en procesos distintos de los que ocurren en los pigmentos de los centros de reacción (83, 165).

2.- MATERIAL Y METODOS

2.1.- MATERIAL

2.1.1.- Material biológico

Como material biológico se utilizaron chirimoyos (Annona cherimolia Mill.) de la variedad impresa, denominada comercialmente "Fino de Jete" o "Blanca", de tamaño uniforme y cuyo peso estaba comprendido entre 200 y 500 g.

Los frutos se adquirieron en establecimientos del ramo de la alimentación, y su grado de madurez se estableció por el color y la medida de la textura (116).

2.1.2.- Productos

Los reactivos ensayados como sustratos inhibidores o activadores del enzima polifenoloxidasa procedieron de las firmas: ANALAR y BDH (Inglaterra), FLUKA (Suiza), DOESDER (España) y SIGMA (USA). El Sephadex G-200 se suministró por Pharmacia Fine Chemicals (Suecia). El anhídrido carbónico N2S se sirvió por OXIMESA (S.A.) (España). Y el resto de los productos, en tanto no se indique lo contrario, procedieron siempre de PANREAC y PROBUS (España) y MERCK (Alemania).

2.1.3.- Aparatos e instrumentación

Las pesadas se realizaron en una balanza Sartorius (Alemania) (p. máx. 160 g; error \pm 1 mg) y en una balanza Mettler H 20 T (Suiza) (p. máx. 160 g; error \pm 0.01 mg).

La producción de hielo seco (anhidrido carbónico en estado sólido) se hizo con un formador de pastillas convencional acoplado a una botella de anhidrido carbónico comprimido.

Para la agitación de tubos se emplearon vibradores Heidolph y agitadores magnéticos P/Selecta (Alemania).

Las medidas de pH se llevaron a cabo en un pHmetro Radiometer PHM 84 (pH \pm 0.001) (Dinamarca).

Las homogenizaciones se realizaron en una disgregadora tipo Sorvall-Omnimixer (USA), con vasos de acero inoxidable de 400 ml de capacidad máxima.

Las centrifugaciones se efectuaron en una centrífuga Beckman J-21 (Suiza), con un rotor tipo JA-14.

Las diálisis se hicieron con tubos especiales tipo Wisking Dialysis Tubing 8/32 y 20/32 (Inglaterra).

Las lecturas colorimétricas para la determinación de proteínas se realizaron en un fotocolorímetro Bausch y Lomb, modelo Spectronic 20 (Bélgica), con tubos de vidrio de 1 cm de diámetro suministrados por la misma firma. Las medidas espectrofotométricas se efectuaron en un espectrofotómetro Pye Unicam (Inglaterra) con registrador gráfico incorporado y compartimento de cubetas termostatzado. Las cubetas utilizadas eran de cuarzo para las medidas en la región del U.V. y de poliestireno desechable para las medidas en la región del visible.

Los tiempos de reacción en las determinaciones enzimáticas se midieron con un cronómetro "Smiths" de "English Clock Systems" (Inglaterra).

Para manipulaciones de reactivos que requerían medir pequeños volúmenes se utilizaron micropipetas "Gold Brand" (Alemania) de enrasado automático por estrangulamiento.

Para el fraccionamiento con Sephadex G-200 se

empleó una columna de vidrio QUICKFIT (Inglaterra) (3.8 x 100 cm) equipada en uno de sus extremos con un émbolo provisto de una placa de teflón. Cada extremo de la columna llevaba acoplado, a su vez, un tubo de teflón que canalizaba la entrada y salida del eluyente. La salida del eluyente se reguló mediante una bomba peristáltica DESAGA (Alemania), y la recogida de las distintas fracciones mediante un colector LKB, Ultrorac (Suecia).

2.2.- METODOS

2.2.1.- Purificación de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo

2.2.1.1.- Obtención de polvos acetónicos

El epicarpio de chirimoyo, lavado y finamente troceado, se introdujo en el recipiente del disgregador, mantenido en baño de hielo, junto con un volumen diez veces superior a su peso de acetona enfriada a -20°C por adiciones sucesivas de hielo seco.

El material se trituró durante 5 minutos a velocidad alta (posic. 8), y el homogenado resultante se filtró, con la ayuda de vacío, por un embudo Büchner provisto de una o dos capas de papel de filtro. El residuo se lavó con un volumen de acetona fría (-20°C) igual al empleado en la trituración. Por último se realizó un nuevo lavado, esta vez con éter etílico también a -20°C y también en un volumen diez veces

superior al peso inicial de epicarpio.

Los polvos acetónicos así preparados se guardaron en ambiente anhidro a 4°C.

2.2.1.2.- Redisolución de polvos acetónicos

Los polvos acetónicos se dispusieron en el recipiente del disgregador, mantenido en baño de hielo, junto con diez veces su peso en tampón fosfato sódico 0.1M pH 6.5 al 0.1% en cisteína y al 0.1% en ácido ascórbico. La mezcla se trituró durante 5 minutos a velocidad media (posic. 6) y a continuación se centrifugó a 10000xg 15 minutos y a 4°C. Se anotó el volumen del sobrenadante y del mismo se reservaron unos ml para la determinación de la actividad PPO y de proteínas.

2.2.1.3.- Precipitación con sulfato amónico

La técnica seguida fué la propuesta por Green y Hughes (40).

El extracto procedente de la redisolución de los polvos acetónicos se dispuso en un recipiente mantenido en cámara fría (2-4°C) y en constante agitación. Sobre él se adicionó lentamente sulfato amónico, previamente pulverizado, en cantidad suficiente para conseguir el 40% de saturación (226 g/l). Añadida la totalidad de la sal, la disolución se continuó agitando 5 minutos más y posteriormente se la dejó reposar durante media hora. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 12000xg, 20 minutos y a 4°C.

Se anotó el volumen del sobrenadante que resultó y se apartó una alícuota para las determinaciones de actividad enzimática y de proteínas; con el resto del volumen se prosiguió la precipitación. Para ello, se volvió a agregar sulfato amónico, esta vez hasta alcanzar un 75% de saturación (212 g/l), se agitó de nuevo 5 minutos, se dejó reposar media hora y se centrifugó otra vez a 12000xg durante 20 minutos y a 4°C. El precipitado resultante que contenía la mayor parte de la actividad polifenoloxidasas, se resuspendió en 9-15 ml de tampón fosfato sódico 0.05M pH 6.5. Con esta fracción, tras separar la correspondiente alícuota para la determinación de actividad polifenoloxidasas y de proteínas, se continuó la purificación.

2.2.1.4.- Diálisis

Con objeto de eliminar los restos de sulfato amónico, cisteína y ácido ascórbico, el extracto obtenido y las distintas alícuotas separadas en cada paso de purificación se sometieron a diálisis. Para ello se introdujeron cada una de las muestras en tubos de diálisis Wisking 8/32 o 20/32, previamente humedecidos, y se sumergieron en un vaso de precipitado que contenía tres litros de tampón fosfato sódico 25mM pH 6.5. El proceso duró 24 horas y se desarrolló a 4°C.

2.2.1.5.- Cromatografía sobre Sephadex G-200

2.2.1.5.1.- Preparación del gel

El Sephadex se suministra en forma de polvo seco, y antes de empaquetarlo en la columna se debe hinchar en la solución usada como eluyente, en nuestro caso tampón fosfato sódico 0.05M pH 6.5. Para ello, a la cantidad adecuada de polvo seco (1 g de Sephadex G-200 suministra un volumen de lecho de 30-40 ml) se le agregó un exceso de tampón y se mantuvo a temperatura ambiente durante tres días. Este proceso de hinchamiento se podía acelerar calentando 5 horas en baño maría.

Durante la preparación podían quedar atrapadas burbujas de aire en la matriz del gel, dando esto lugar a empaquetamiento y flujos desiguales. El problema se solucionaba conectando al matraz que albergaba el gel a una bomba de vacío el tiempo necesario para la desgasificación total.

2.2.1.5.2.- Preparación de la columna

Se empleó una columna de vidrio QUICKFIT (3.8x x100 cm) equipada en el terminal superior con un tapón de goma y en el inferior con un émbolo provisto de una placa porosa. Los dos terminales llevaban conectados sendos tubos de teflón que canalizaban, respectivamente, la entrada y salida del eluyente.

Fijado el émbolo inferior de la columna, se dispuso ésta en posición vertical y su salida se conectó con una bomba peristáltica que reguló el flujo de salida. Se adicionó entonces por el extremo superior un pequeño volumen de tampón, previamente desgasificado, procurando no dejar atrapada burbuja alguna de aire. A continuación se comenzó a añadir la suspensión de Sephadex G-200, hasta que la capacidad total de la columna quedó casi completada. El gel se dejó reposar durante

un par de días, al cabo de los cuales se observó el nivel alcanzado, si éste había descendido se completaba nuevamente con la suspensión y se volvía a esperar; la operación se repitió cuantas veces fué necesario hasta alcanzar el volumen de lecho requerido.

Establecido ya el nivel, la columna se conectó por su extremo superior a un reservorio de tampón fosfato sódico 0.05M pH 6.5 desgasificado, y seguidamente se procedió a su estabilización. La estabilización se realizó haciendo pasar 1000 ml del tampón anterior a un flujo de 0.4 ml/min. Al final la columna quedó perfectamente preparada para recibir la muestra.

2.2.1.5.3.- Aplicación y elución de la muestra

Antes de inyectar la muestra se destapó la columna y se dejó salir el líquido situado sobre la superficie del Sephadex, entonces, y con sumo cuidado de no remover el lecho, se colocó la muestra. Cuando ésta hubo penetrado casi totalmente en el interior del gel, se añadieron unos ml del tampón del reservorio, se adaptó nuevamente éste y comenzó la elución. El flujo utilizado en la elución fué el mismo mantenido durante todo el proceso de estabilización.

Las distintas fracciones que se eluyeron de la columna fueron recogidas utilizando un colector de fracciones automático (LKB, Ultrorac) acoplado a un detector de absorción U.V. a 280 nm y a un registrador que marcaba las absorbancias y los cambios de fracción. El sistema empleado para la colección de fracciones fué el de volumen fijo por contaje del número de gotas; así, en estas condiciones, se recogieron siempre

sesenta fracciones de 10 ml cada una de ellas.

A la totalidad de las fracciones recogidas de este modo se les midió su actividad polifenoloxidasas y su D.O. a 280 nm. Los tubos que resultaron de mayor actividad y menor contenido proteico se reunieron en un nuevo extracto; éste fué el enzima parcialmente purificado con el que se realizaron todas las determinaciones enzimáticas siguientes, destinadas a probar posibles factores influyentes en la reacción de la polifenoloxidasas.

La preparación de la columna, así como la aplicación y elución de la muestra se realizaron siempre en cámara refrigerada (0-4°C).

2.2.2.- Determinación del contenido proteico en los extractos con actividad polifenoloxidasas

2.2.2.1.- Método de Lowry

La determinación cuantitativa del contenido proteico de los extractos con actividad polifenoloxidasas se llevó a cabo por el método de Lowry y col. basado en la combinación de las reacciones de Biuret y Folin, la primera característica del enlace peptídico y la segunda característica del grupo fenólico de los restos de tirosina y triptófano (85).

2.2.2.2.- Absorción en el U.V. a 280 nm

Se empleó este procedimiento con criterio cuantita-

tivo relativo determinando la absorción, a 280 nm, de cada una de las fracciones eluidas de la columna frente a un blanco constituido por el tampón de elución.

2.2.3.- Determinación espectrofotométrica de la actividad polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo

2.2.3.1.- Método general

2.2.3.1.1.- Fundamento

Para la determinación de la actividad enzimática se utilizó el método descrito por Kahn basado en el aumento de coloración debido a la oxidación de determinados compuestos fenólicos, catalizada por la polifenoloxidasas, y posterior polimerización de los sustratos oxidados (64).

2.2.3.1.2.- Técnica

Las medidas espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Pye Unicam U.V./VIS a temperatura controlada (25-28°C), y a longitud de onda de acuerdo al tipo de sustrato utilizado y por consiguiente al producto de reacción formado:

<u>Sustrato</u>	<u>Longitud de onda</u>
DOPA	480 nm
catecol	410 nm
p-cresol	410 nm
tirosina	480 nm
tiramina	465 nm

Las medidas se realizaron con cubetas de poliestireno desechables de 1 cm de grosor y con 4.5 ml de capacidad, en las que se adicionaban los distintos reactivos que componían la reacción. El orden y la cantidad en que se agregaban cada uno de estos reactivos se detalla a continuación:

	<u>Blanco</u>	<u>Problema</u>
Tampón fosfato sódico 50mM pH 6.5	2 ml	1.995 ml
Solución 30mM de catecol	1 ml	1.000 ml
Extracto enzimático purificado	--	0.005 ml
Volumen final en la cubeta	3 ml	3.000 ml

La reacción se iniciaba con la adición del enzima; a partir de ese momento, durante 3 ó 4 minutos y con intervalos de 15-30 segundos se anotaban los valores de D.O.

El tipo y concentración de sustrato, así como la cantidad de enzima ensayada se modificó siempre en función de la reacción a medir.

2.2.3.1.3.- Cálculos

La actividad enzimática se expresó en unidades de actividad específica ($\Delta D.O./\text{min}/\text{mg prot.}$).

$$\text{Actividad específica} = \frac{\Delta D.O./\text{min} \times Fd}{P \times d \times V}$$

siendo:

$\Delta D.O./\text{min}$ = incremento de la D.O. por minuto.

Fd = factor de dilución del extracto.

P = mg de proteína por ml de extracto

d = diámetro de la cubeta (1 cm).

V = volumen de muestra del extracto enzimático.

La actividad enzimática se expresó en unidades de $\Delta D.O./\text{min}/\text{mg}$ de proteína y no en $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína puesto que existía más de un producto de reacción y sus coeficientes de extinción molar eran desconocidos. La oxidación de los compuestos fenólicos y su polimerización están mal definidas siendo esta última variable en función del tiempo.

2.2.3.2.- Determinación de la influencia de la cantidad de enzima y del tipo de sustrato utilizado

Como sustratos, todos en concentración 5mM, se probaron cinco distintos: dos de ellos difenólicos, catecol

y DOPA, y tres monofenólicos, tirosina, p-cresol y tiramina. Cada uno de estos sustratos, a su vez, se ensayó frente a concentraciones variables de proteínas que oscilaron entre 0.13 y 4.30 μ g/ml para los sustratos difenólicos, y entre 3.33 y 33.33 μ g/ml para los monofenólicos.

Las determinaciones de actividad enzimática frente a los diversos sustratos se realizaron siempre siguiendo el apartado 2.2.3.1. aunque hubieron de introducirse algunas variantes como los tiempos de medida de las reacciones que pasaron a ser de 12 minutos, en las reacciones con sustratos difenólicos, o hasta 600 minutos con sustratos monofenólicos, o como los intervalos de medida de reacción que, para el caso de reacciones de larga duración, se ampliaron a dos minutos y medio.

2.2.3.3.- Determinación de la influencia de la cisteína, ácido ascórbico y mercaptoetanol sobre la actividad polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo

Para determinar la influencia de la cisteína, ácido ascórbico y mercaptoetanol en el desarrollo de la reacción se efectuaron medidas espectrofotométricas de la polifenoloxidasas frente a un sustrato difenólico, catecol, y otro monofenólico, tiramina, ambos en concentración 5mM, incluyendo en la cubeta de reacción cada una de estas sustancias.

Las concentraciones de cisteína y mercaptoetanol en cubeta fueron 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M para el sustrato monofenólico y 0.1mM, 0.2mM, 0.5mM y 1mM para el difenólico respectivamente. En el caso del mercaptoetanol la concentración 1mM frente al sustrato difenólico se substituyó por la concen-

tración 0.3mM. Con el ácido ascórbico las concentraciones oscilaron tanto frente al sustrato monofenólico como frente al difenólico entre 0.1mM y 1mM. Cada una de estas concentraciones se conseguían adicionando en la cubeta de reacción, previo a la adición del enzima, volúmenes adecuados de las soluciones madre 6mM y 0.6mM de cada uno de los compuestos a ensayar preparadas en tampón fosfato sódico 50mM pH 6.5. La reacción se inició con la adición del enzima (1µg/ml u 11.66µg/ml de proteína según sustrato). Se tomaron lecturas de D.O. cada 30 segundos, durante 7 minutos para el caso del catecol, y cada dos minutos y medio, durante 20-30 minutos, para la tiramina.

El resto del protocolo se llevó a cabo según el apartado 2.2.3.1.

2.2.3.4.- Determinación de los efectos de la preincubación del enzima purificado con cisteína, ácido ascórbico o mercaptoetanol sobre la actividad polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo

Se ha estudiado el posible efecto de la incubación del enzima con distintas concentraciones de cisteína, ácido ascórbico y mercaptoetanol. Para ello se prepararon inicialmente y en tampón fosfato sódico 50mM pH 6.5, tres soluciones madre de cisteína, ácido ascórbico y mercaptoetanol de concentración 2mM.

Para las mezclas de incubación, volúmenes variables de cada una de esas disoluciones, completados hasta 2 ml con el citado tampón fosfato, se mezclaron con otros 2 ml de extracto enzimático purificado de manera que las concentraciones finales de cisteína, ácido ascórbico y mercaptoetanol ensayadas

resultaron 1mM, 0.5mM y 0.2mM. De este modo preparadas las mezclas de incubación, éstas, junto con un tubo control que sólo contenía tampón fosfato y enzima, se incubaron a 4°C, en oscuridad durante uno, dos y siete días. Transcurrido cada intervalo de tiempo, de cada uno de esos tubos se tomaron muestras parciales que inmediatamente se sometieron a una diálisis de 15 horas en cámara fría, con tampón fosfato sódico 25mM pH 6.5.

Por último, se midieron las actividades enzimáticas frente a catecol y tiramina, 5mM, siguiendo el protocolo usual, pero teniendo en cuenta ahora que el volumen de extracto enzimático a añadir en la cubeta de reacción debía ser el doble del normalmente utilizado (el enzima se hallaba diluido a la mitad).

2.2.3.5.- Determinación de la influencia del peróxido de hidrógeno sobre la actividad polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo

Para determinar el posible efecto del H_2O_2 sobre la actividad enzimática de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo se ensayaron distintas concentraciones de H_2O_2 : 0.5mM, 1mM, 3mM, 8mM, 12mM, 20mM, 40mM, 80mM, 160mM y 320mM, frente a tres diferentes sustratos, catecol, DOPA y tiramina, todos en concentración 5mM. Estas concentraciones de H_2O_2 se conseguían adicionando a la cubeta de reacción, previo a la adición del enzima, volúmenes adecuados de H_2O_2 al 30% ó al 0.3%.

En lo referente al tiempo de medida de la reacción, duración de los intervalos, etc, se procedió siempre como en

el apartado 2.2.3.1.

2.2.3.6.- Determinación del efecto de la preincubación del enzima con peróxido de hidrógeno sobre la actividad polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo

Se ha estudiado el efecto de la preincubación de la polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo con H_2O_2 sobre su actividad enzimática. La incubación se llevó a cabo a distintas concentraciones de H_2O_2 y durante distintos periodos de tiempo.

Las concentraciones de H_2O_2 fueron: 4.375mM, 35.2mM 176mM y 352mM. Cada una de ellas se conseguía mezclando 2.5 ml del extracto enzimático purificado con 2.5 ml de una dilución adecuada de H_2O_2 preparada con tampón fosfato sódico 50mM pH 6.5 a partir de un H_2O_2 al 30%; para la concentración 4.375 mM se utilizó la dilución 1/12.5, para 35.2mM la 1/25, para 176mM la 1/125 y para 352mM la 1/1000. Junto a esto se preparó también un tubo control mezclando 2.5 ml del tampón utilizado en las diversas diluciones y 2.5 ml del extracto enzimático.

Con objeto de determinar también la influencia del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática, los tubos mezcla se incubaron a su vez, en oscuridad a 4°C, durante 10, 30, 60 y 120 minutos, contando como tiempo 0 el momento de la adición del enzima. Al final de cada periodo de tiempo de cada uno de los tubos se extrajeron alícuotas de 1 ml, que inmediatamente se sometieron a diálisis. Estas se realizaron en cámara fría con tampón fosfato sódico 25mM pH 6.5 durante quince horas.

Las actividades polifenoloxidasa de las distintas

fracciones conseguidas se midieron frente a tiramina 5mM y frente a catecol 5mM de modo similar a como se hizo en las preincubaciones con cisteína, ácido ascórbico y mercaptoetanol (Apartado 2.2.3.4.).

2.2.3.7.- Determinación de la influencia de distintos ácidos orgánicos sobre la actividad polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo

Han sido probados en concentración 1mM en cubeta los siguientes ácidos orgánicos: acético, malónico, succínico, fumárico, maleico, glutárico y glucurónico.

Las determinaciones enzimáticas de cada uno de estos ácidos frente a tiramina 5mM y catecol 5mM se realizaron siguiendo el protocolo habitual pero adicionando previamente al enzima 0.5 ml de las distintas soluciones 6mM preparadas de cada ácido.

2.2.3.8.- Determinación de la influencia de algunos azúcares sobre la actividad polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo

Utilizando como sustratos tiramina 5mM y catecol 5mM, se probaron como azúcares a concentración 1mM y 0.1mM: D(+)glucosa, D(-)fructosa y sacarosa.

Las concentraciones de los azúcares se conseguían adicionando a la cubeta de reacción, antes de añadir el enzima, 1 ml y 0.1 ml respectivamente de una solución 3mM de cada azúcar. En cuanto al resto, se siguió el mismo procedimiento que en casos anteriores.

2.2.3.9.- Determinación de la influencia de catequinas sobre la actividad polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo

Se ha estudiado la influencia de la presencia de (+)-catequina y (-)-epicatequina en el sistema de reacción de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo.

Las concentraciones de catequinas ensayadas frente a catecol 5mM y tiramina 5mM fueron: 0.5 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M y 100 μ M. Estas concentraciones se conseguían adicionando a la cubeta de reacción, antes del enzima, 0.01 ml, 0.05 ml, 0.1 ml, 0.5 ml y 1 ml respectivamente de las soluciones iniciales de catequinas 0.3mM.

En lo referente al protocolo seguido se procedió de la forma habitual.

En el caso de que alguna de las concentraciones de catequina resultase activadora de la reacción, ésta hubo de ensayarse sola sin enzima ni sustrato para comprobar si existía autooxidación, sola con el enzima para determinar si era sustrato de la polifenoloxidasas y sola con el sustrato para conocer si se daba reacción química entre ambos.

2.2.3.10.- Determinación de la influencia de distintos compuestos fenólicos sobre la actividad polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo

Los distintos compuestos fenólicos ensayados en concentraciones 1mM y 0.1mM fueron: ácido clorogénico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido benzoico, ácido 3-OH-benzoico, ácido tri-OH-benzoico, ácido vanílico, ácido isovanílico, ácido ferúlico, ácido protocatecuico, ácido salicílico, ácido

siríngico, ácido ftálico, ácido quínico, ácido shikímico, ácido cinámico, fenol, foroglucinol, pirogalol, resorcinol y orcinol.

En cuanto al método seguido éste fué el mismo que el utilizado en el apartado 2.2.3.8.

Al igual que en el caso de las catequinas cuando alguno de los compuestos fenólicos resultó activador de la reacción enzimática, dicho compuesto con objeto de ver su actuación real hubo asimismo de ensayarse solo sin el enzima ni el sustrato, solo con el enzima y solo con el sustrato, pero siempre manteniendo las condiciones utilizadas en las medidas con la cubeta completa.

2.2.3.11.- Medida del efecto de la presencia de pequeñas cantidades de difenoles en la reacción de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo con monofenoles

Se ha estudiado la influencia de la presencia de pequeñas cantidades de difenoles sobre la actividad de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo frente a monofenoles. Como monofenoles y en concentración 5mM se probó la tiramina y como difenoles y en concentraciones 0.5 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M y 100 μ M, m-catecol, catecol, DOPA y dopamina.

En lo que respecta a la preparación de las cubetas así como el protocolo a seguir nos remitimos al apartado 2.2.3.9.

2.2.4.- Localización intracelular de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo

2.2.4.1.- Obtención del homogenado

El epicarpio de chirimoyo, lavado y troceado en porciones de un milímetro cuadrado de superficie, se introdujo en el vaso del disgregador, previamente enfriado, junto con dos volúmenes del medio de homogenización que contenía: tampón HEPES-KOH 0.1M pH 7.2, ClK 1mM, Cl₂Mn 1mM, Cl₂Mg 1mM, EDTA 1mM, cisteína al 0.1%, BSA al 0.1%, Ficoll 400 al 0.1% y sacarosa al 25% (peso/peso). El material se trituro durante 5 segundos (5 x 1 sg) a velocidad alta (posic. 10) y se filtró a continuación por ocho capas de gasa.

2.2.4.2.- Centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa

El homogenado obtenido como se ha descrito anteriormente en cantidad de 8 ml se depositó sobre un gradiente de sacarosa previamente preparado en tampón HEPES-KOH 0.1M pH 7.2 que tenía la siguiente composición: 3 ml de sacarosa al 60%, 1 ml de sacarosa de cada una de las siguientes concentraciones: 58%, 56%, 54%, 52%, 50%, 48%, 46% y 44%, 4 ml de sacarosa al 42%, 1 ml de sacarosa de cada una de las siguientes concentraciones: 40%, 38%, 36%, 34%, 32%, 30%, 28%, 26% y 2 ml de sacarosa al 24%. Dispuestos los tubos con el gradiente y con la muestra se centrifugaron, primeramente a 1000xg durante 5 minutos a 4°C, y después, y sin parar la centrifuga a 5000xg durante 10 minutos más. Transcurrido este tiempo el

rotor se dejó desacelerar sin freno y alcanzadas las 1600xg éste se conectó.

El fraccionamiento se realizó con la ayuda de una bomba peristáltica que bombeaba líquido desde el fondo del tubo a un flujo de 2 ml/min. En estas condiciones se recogieron 16 fracciones de aproximadamente 1.8 ml, a cada una de las cuales se les midió actividad polifenoloxidasas, catalasa, citocromo oxidasa y contenido en clorofila.

2.2.4.3.- Determinación de actividades enzimáticas y clorofila

2.2.4.3.1.- Determinación de citocromo oxidasa como marcador mitocondrial

La actividad citocromo oxidasa se ensayó espectrofotométricamente por el método de Sottocasa y col., siguiendo la velocidad de oxidación del citocromo c reducido (147). Para ello en la cubeta de reacción se pipetearon: 0.4 ml de citocromo c 90 μ M reducido con NaBH₄, 0.4 ml de tampón fosfato potásico 0.1M pH 7.2 y 0.2 ml de muestra. Añadida la muestra se seguía el curso de la reacción a 550 nm y a 25°C.

La actividad citocromo oxidasa se expresó como $\Delta D.0./min/ml$ de extracto.

2.2.4.3.2.- Determinación de catalasa como marcador peroxisomal

La actividad catalásica se llevó a cabo por el método de Aebi siguiendo la velocidad de descomposición del

H₂O₂ a lo largo del tiempo (3). Para esto en cubetas de cuarzo de 3 ml de capacidad se pipetearon 2.8 ml de H₂O₂ 30mM en tampón fosfato sódico 50mM pH 6.5 y 0.2 ml de muestra. Añadida la muestra se anotaron valores de D.O. siguiéndose el curso de la reacción a 25°C y a 240 nm de longitud de onda.

La actividad catalásica finalmente se expresó como Δ D.O./min/ml de extracto.

2.2.4.3.3.- Determinación de clorofila como marcador de cloroplastos

La cantidad de clorofila presente en las distintas fracciones se determinó por el método de Arnon (6). Cinco ml de acetona al 80% se añadieron a 0.5 ml de cada una de las fracciones, la mezcla se agitó brevemente, se filtró y a continuación al filtrado obtenido se le midió su densidad óptica a 652 nm.

El contenido en clorofila se expresó en μ g de clorofila/ml de extracto

$$\mu\text{g de clorofila/ml de extracto} = 27.8 \times A_{652} \times V \times Fd$$

siendo:

A_{652} = Densidad óptica a 652 nm.

V = volumen de muestra más acetona al 80%.

Fd = factor de dilución.

2.2.4.3.4.- Determinación de la actividad polifenoloxidasas

La determinación de la actividad polifenoloxidasas de todas las fracciones se realizó siguiendo el apartado 2.2.3.1., expresándose en este caso la actividad como $\Delta D.0./\text{min/ml}$ de extracto.

3.- RESULTADOS

3.1.- Purificación parcial de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo

Se han efectuado ocho purificaciones parciales de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo, según el apartado 2.2.1., que han proporcionado la cantidad de extracto enzimático necesario para llevar a cabo las distintas determinaciones de actividad del enzima en presencia de diversos activadores e inhibidores. El grado de purificación conseguido al final de cada una de estas purificaciones ha sido por término medio de unas diez veces, y en cuanto al rendimiento, éste ha oscilado entre el 30 y el 50%. La tabla 1 muestra los valores correspondientes a una de las purificaciones realizadas.

Aunque la obtención de polvos acetónicos de epicarpio de chirimoyo en sí representa ya un paso de purificación, nosotros no lo hemos considerado como tal y la actividad polifenoloxidasas en los polvos acetónicos redisueltos es la que hemos tomado como equivalente a grado de purificación 1.

Como se observa en la tabla 1 en cada etapa de purificación, paralelamente a una disminución del rendimiento, se consigue un aumento de la pureza del enzima. El mayor grado de purificación tiene lugar con el pase por Sephadex G-200 del precipitado obtenido con sulfato amónico al 40-75% en cuya obtención se observa un pequeño descenso del rendimiento.

En la figura 4 se muestra el perfil de la curva de concentración de proteínas y de actividad polifenoloxidasas obtenidas después del pase por Sephadex G-200 en la purificación correspondiente a la tabla 1.

Tabla 1.- Purificación parcial de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo

	<u>Volumen</u>	<u>mg prot./ml</u>	<u>mg prot. totales</u>	<u>*U/ml</u>	<u>*U totales</u>	<u>*U/mg prot.</u>	<u>Grado de purificación</u>	<u>Rendimiento</u>
Redisolución de polvos acetónicos	192 ml	2.480	476.2	492	94464	198	1.00	100%
Sobrenadante de la precipitación con SO ₄ (NH ₄) ₂ al 40%	206 ml	1.493	308.5	336	69216	225	1.14	73%
Precipitado con SO ₄ (NH ₄) ₂ 40-75%	8 ml	13.600	110.2	5160	41796	379	1.91	44%
Reunión de fracciones activas de la filtración por Sephadex G-200	80 ml	0.252	20.2	474	37920	1880	9.50	40%

*U = unidades de actividad enzimática definidas como incremento de densidad óptica igual a 0.1 medido a 410 nm frente a catecol como sustrato.

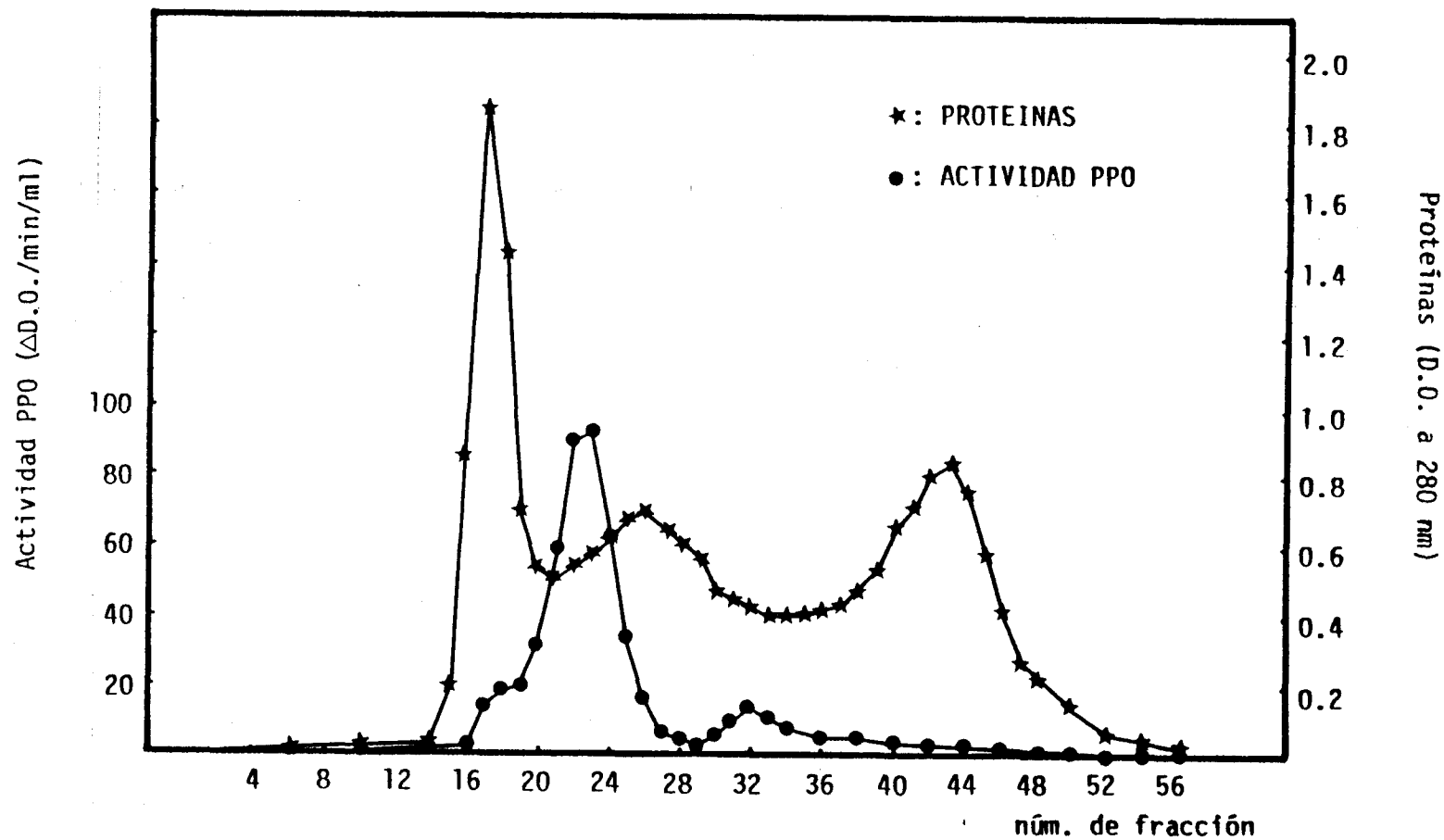


Figura 4.- Cromatografía sobre Sephadex G-200 del precipitado de PPO de epicarpio de chirimoyo obtenido con sulfato amónico 40-75%.

3.2.- Influencia de distintos factores sobre la actividad polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo

3.2.1.- Influencia de la cantidad de enzima y del tipo de sustrato utilizado

Las polifenoloxidasas tienen capacidad para hidroxilar monofenoles y oxidar difenoles. Estas dos actividades enzimáticas, que presentan además distintas cinéticas de reacción, pueden ser desempeñadas por un mismo enzima, existiendo, sin embargo, casos en los que sólo una de las dos funciona (24,69,95).

Con objeto de comprobar la actividad hidroxilante y deshidrogenante así como las cinéticas de ambas actividades de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo, el enzima se ha ensayado frente a cinco diferentes sustratos, dos de ellos difenólicos y tres monofenólicos, siguiendo el protocolo detallado en el apartado 2.2.3.2.

Como se observa en las gráficas 5 a 9, las reacciones de la polifenoloxidasas frente a monofenoles son bien distintas de las reacciones frente a difenoles. En las primeras aparece una fase de retardo inicial que no está presente en las reacciones con los difenoles, esta fase de retardo se acorta al aumentar la concentración de proteína en el medio. Por otra parte, las reacciones con los sustratos monofenólicos también tienen una mayor duración que las correspondientes a los difenólicos. Finalmente, hay que señalar que las velocidades de reacción que presentan las reacciones de hidroxilación son inferiores a las de oxidación, incluso utilizándose concentraciones de proteína diez veces superiores.

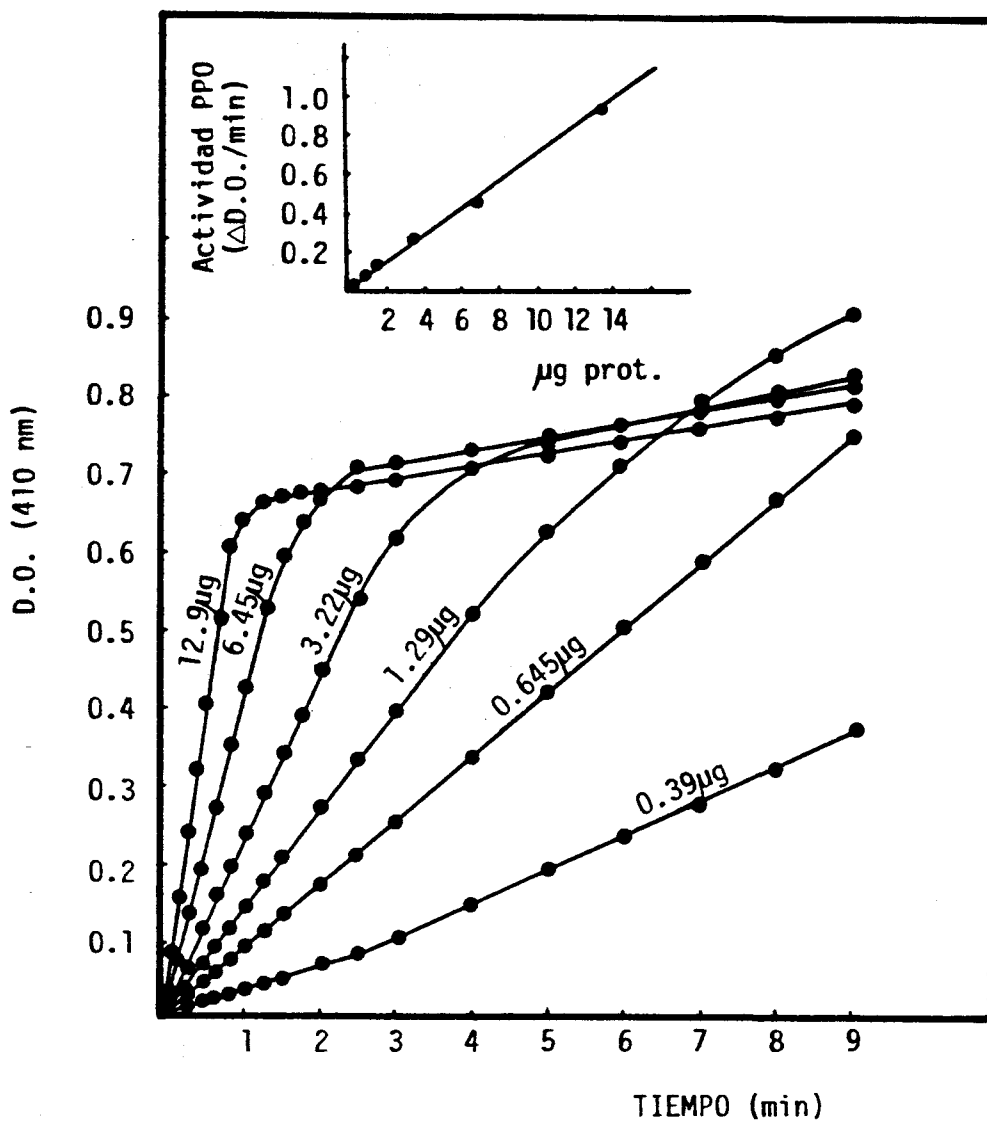


Figura 5.- Influencia de la cantidad de PPO de epicarpio de chirimoyo sobre su actividad frente a catecol. La concentración de sustrato utilizada fué 5mM.

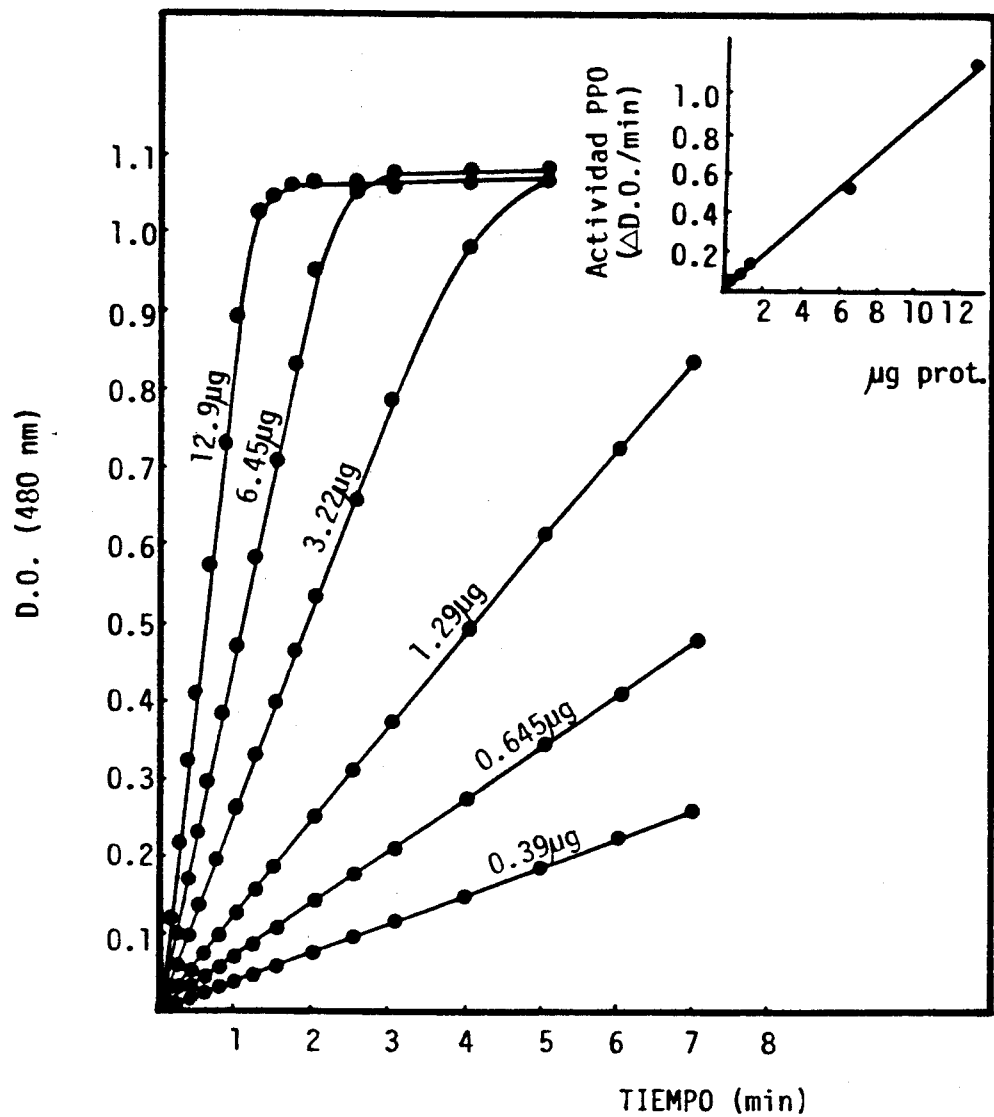


Figura 6.- Influencia de la cantidad de PPO de epicarpio de chirimoyo sobre su actividad frente a dihidroxi-fenilalalina. La concentración de sustrato utilizada fué 5mM.

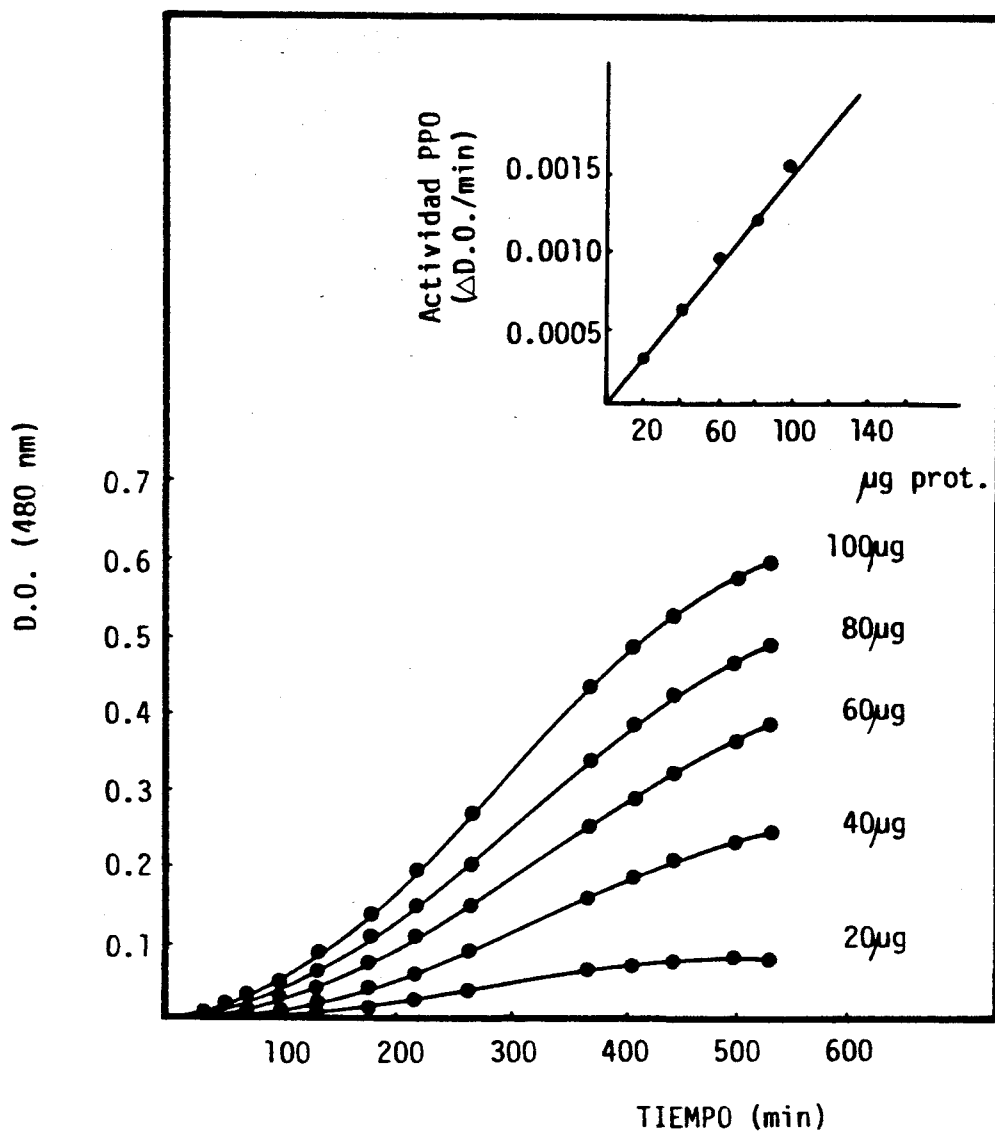


Figura 7.- Influencia de la cantidad de PPO de epicarpio de chirimoyo sobre su actividad frente a tirosina. La concentración de sustrato utilizada fué 5mM.

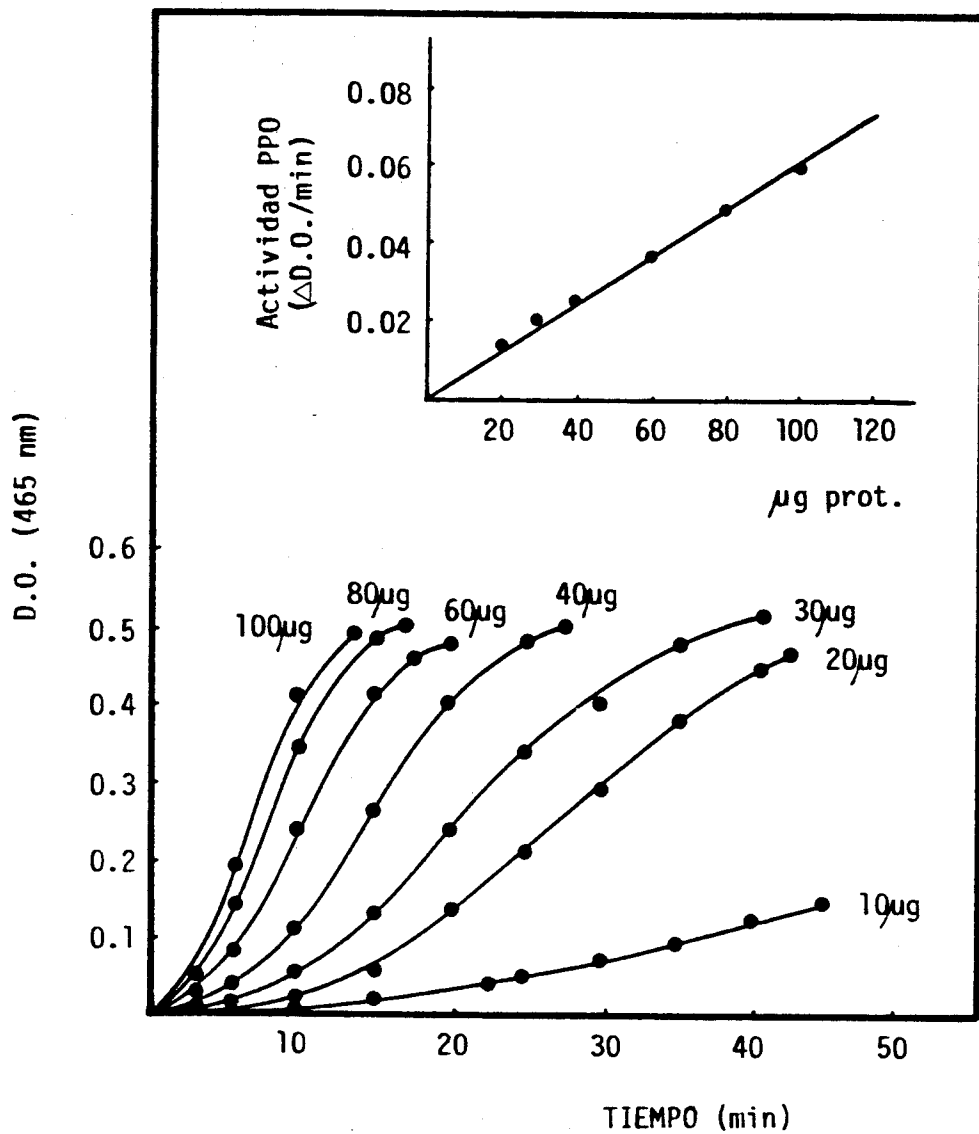


Figura 8.- Influencia de la cantidad de PPO de epicarpio de chirimoyo sobre su actividad frente a tiramina. La concentración de sustrato utilizada fué 5mM.

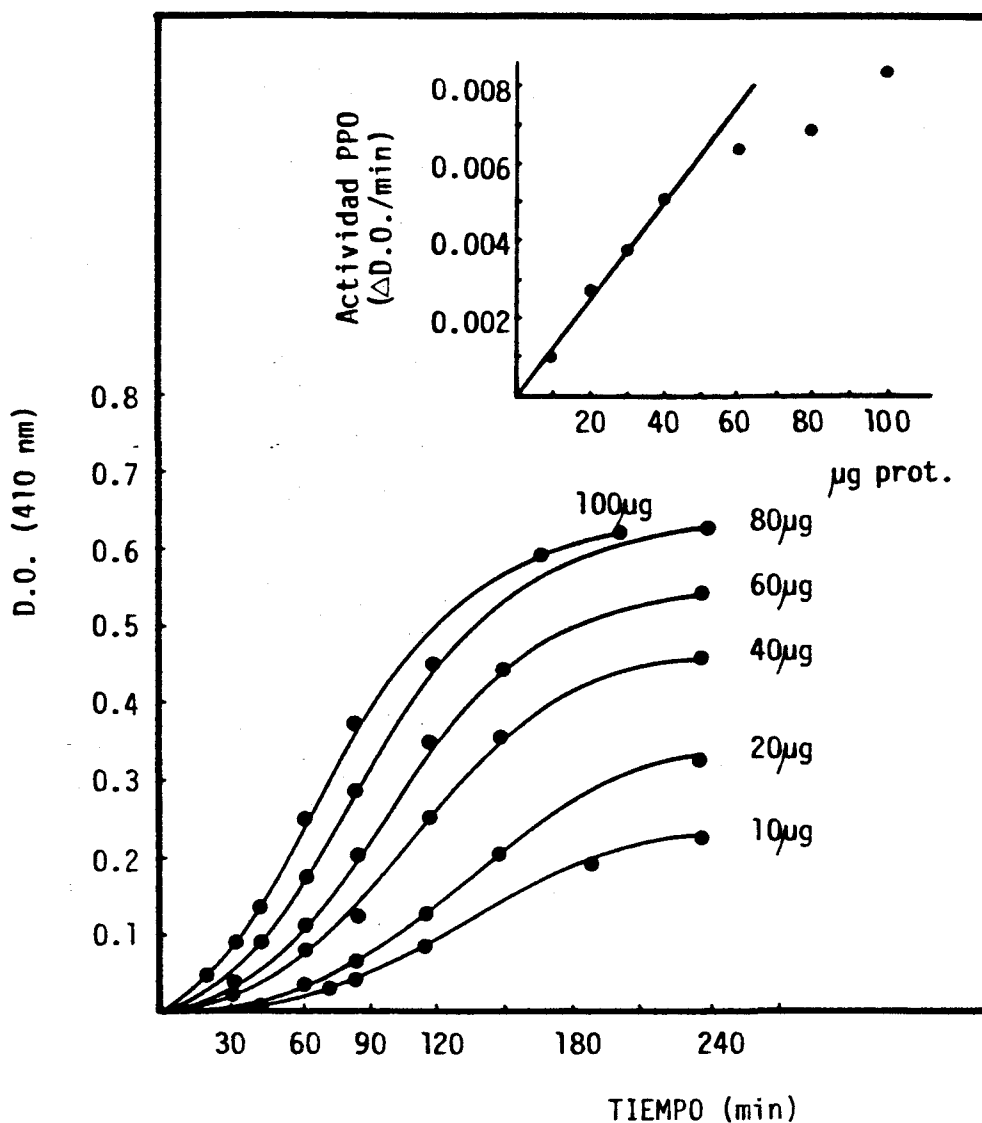


Figura 9.- Influencia de la cantidad de PPO de epicarpio de chirimoyo sobre su actividad frente a p-cresol. La concentración de sustrato utilizada fué 5mM.

3.2.2.- Influencia de la cisteína, ácido ascórbico y mercaptoetanol sobre la actividad polifenoloxidasas

Diversos autores han incluido en los medios para purificación de polifenoloxidasas ácido ascórbico, cisteína y mercaptoetanol como agentes protectores del enzima (130,142). Para determinar la influencia que estos compuestos podían ejercer sobre la reacción de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo, se han realizado medidas espectrofotométricas de la actividad polifenoloxidasas frente a catecol y tiramina, según el apartado 2.2.3.3., incluyendo en la cubeta de reacción ácido ascórbico, cisteína o mercaptoetanol.

Por lo que se refiere a la reacción del enzima frente al sustrato difenólico, la presencia de cisteína o ácido ascórbico a concentraciones 0.1 ó 0.2mM hacía disminuir, proporcionalmente a sus concentraciones, las cantidades de producto final formado mientras que las correspondientes velocidades de reacción permanecían inalteradas (figuras 10 y 11). Cuando las concentraciones de cisteína o ácido ascórbico eran superiores a 0.2mM, junto a la disminución en la cantidad de producto formado se producía también el descenso en las velocidades de reacción (figuras 10 y 11). El mercaptoetanol en el sistema de reacción presentaba igual comportamiento que la cisteína o el ácido ascórbico, la única diferencia estribaba en que a bajas concentraciones las velocidades de reacción de la polifenoloxidasas, con mercaptoetanol en el medio, se veían ligeramente incrementadas (figura 12).

En cuanto a la actividad de la polifenoloxidasas frente a tiramina, la cisteína y el mercaptoetanol no modifican la velocidad de la reacción pero disminuyen la cantidad de producto formado e incrementan la fase de retardo proporcionalmen-

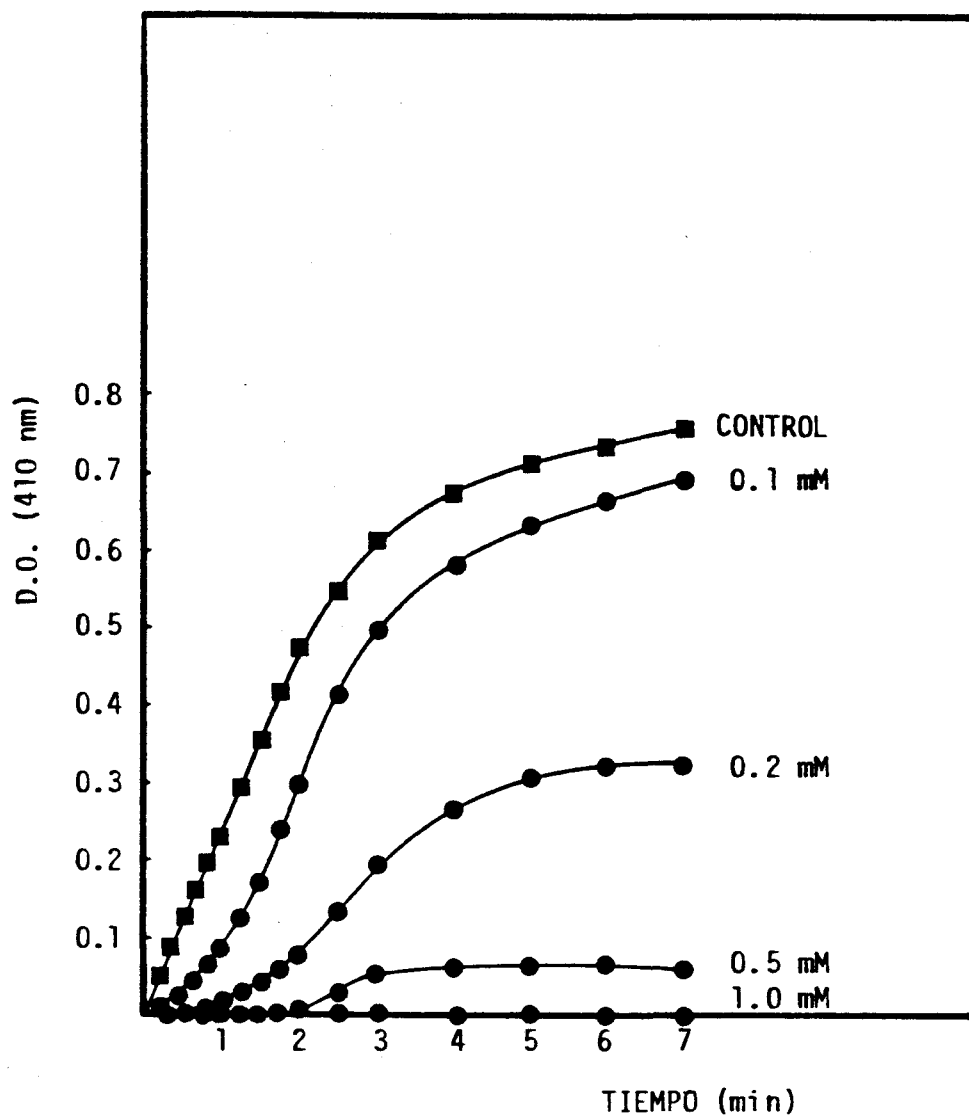


Figura 10.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de cisteína (0.1 - 1.0 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

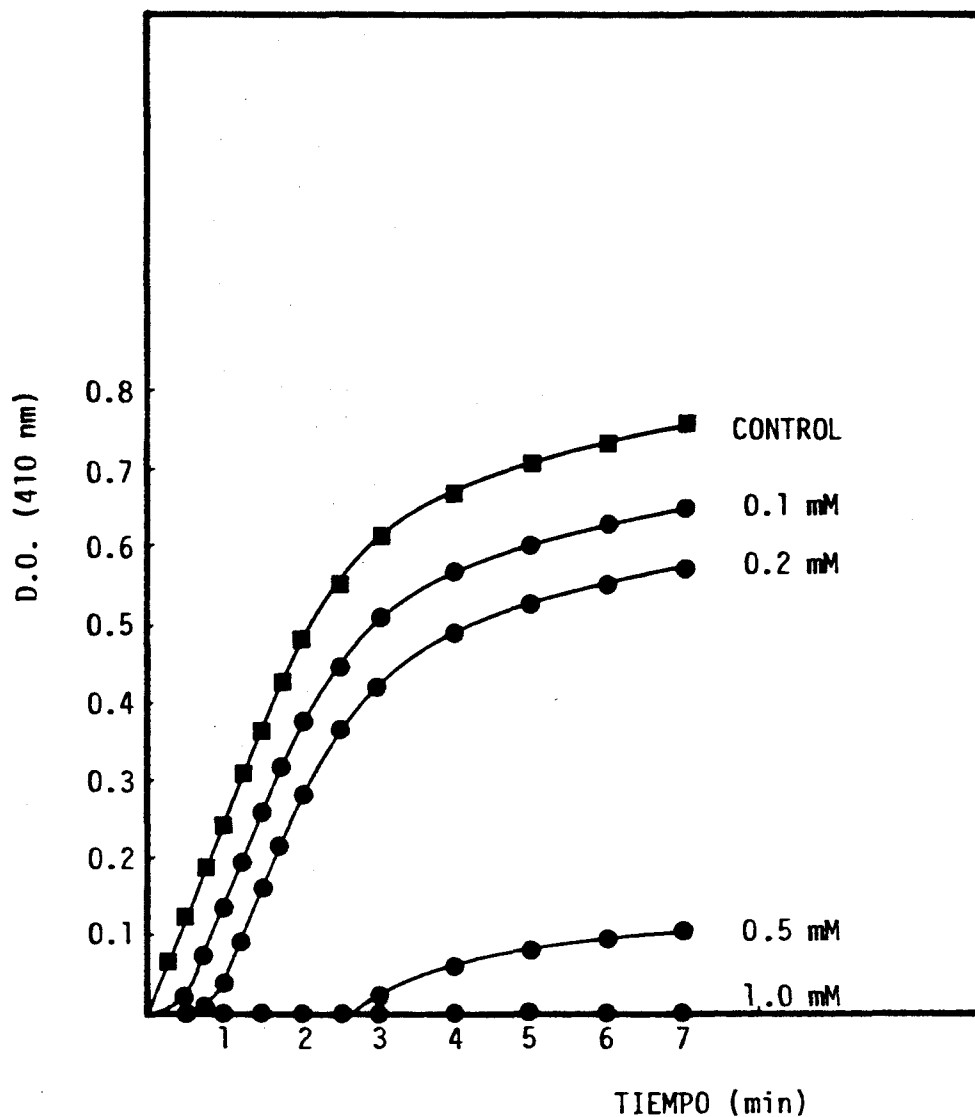


Figura 11.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido ascórbico (0.1 - 1.0 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

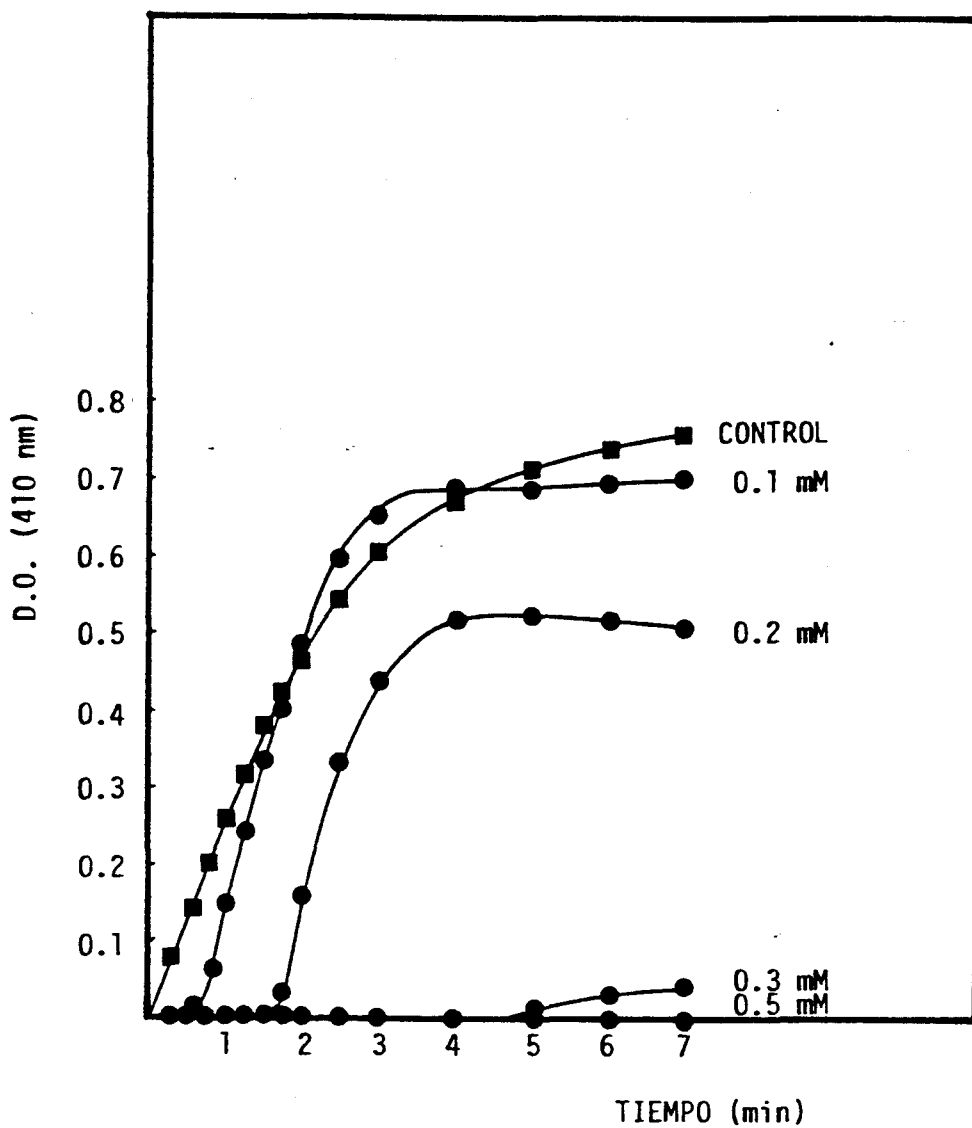


Figura 12.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de mercaptoetanol (0.1 - 0.5 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

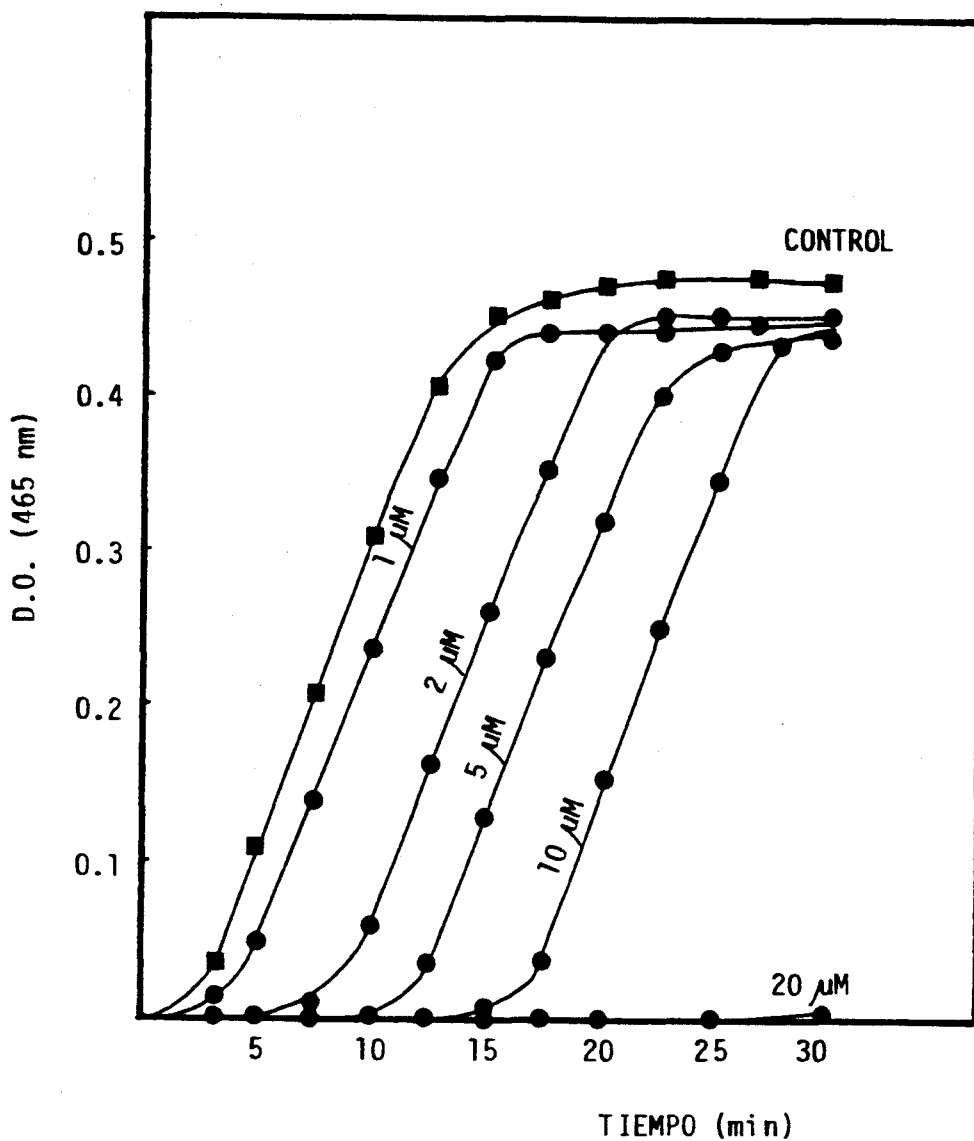


Figura 13.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de cisteína (1 - 20 μM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

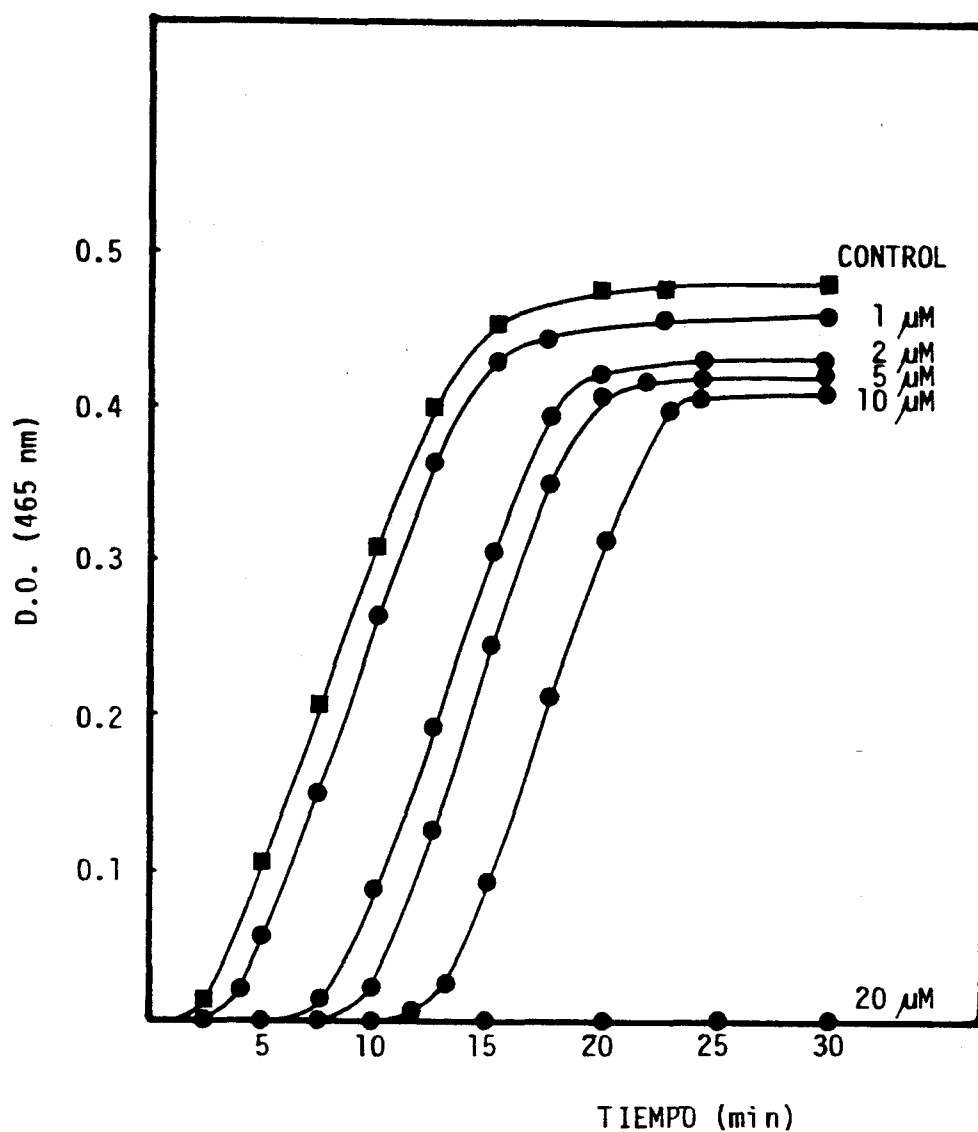


Figura 14.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de mercaptoetanol (1 - 20 μM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

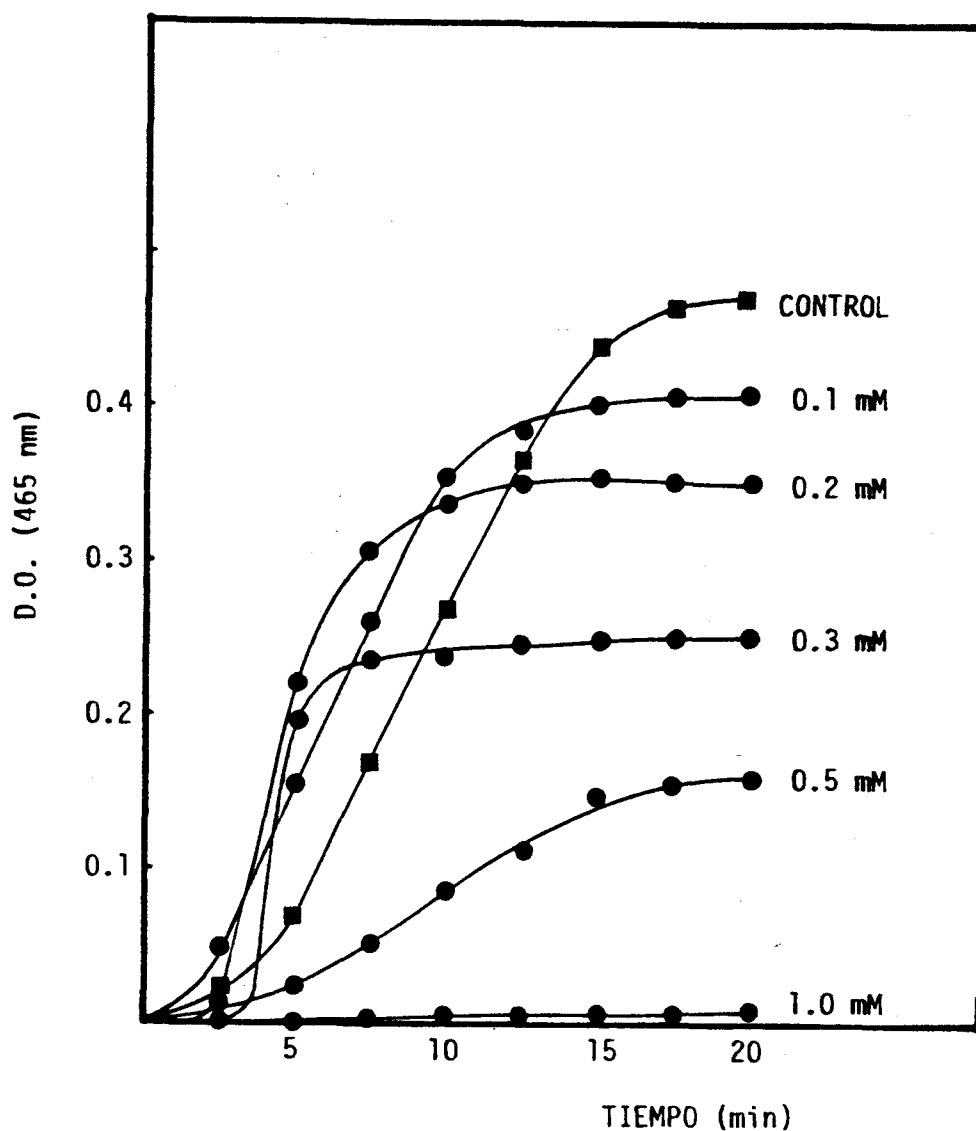


Figura 15.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido ascórbico (0.1 - 1.0 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

te a sus concentraciones (figuras 13 y 14). Cuando el ácido ascórbico está presente a concentraciones entre 0.1 y 0.2mM las velocidades de reacción se ven incrementadas (figura 15), sin embargo, cuando estas concentraciones son superiores dichas velocidades disminuyen sensiblemente y de forma proporcional a la concentración de ácido ascórbico utilizada. El ácido ascórbico también a concentraciones entre 0.1 y 0.2mM acorta la fase de retardo de la hidroxilación de la tiramina.

3.2.3.- Efecto de la preincubación del enzima con cisteína, ácido ascórbico o mercaptoetanol sobre la actividad polifenoloxidasa

Como hemos citado anteriormente, cisteína, ascórbico y mercaptoetanol se han utilizado en numerosas ocasiones como agentes protectores de las polifenoloxidasas, sin embargo, existen trabajos que han demostrado los efectos inhibidores de estos tres compuestos por inactivar el enzima (24,37,95).

Con la finalidad de estudiar los efectos protectores o inactivadores de cisteína, ácido ascórbico y mercaptoetanol sobre la polifenoloxidasa de epicarpio de chirimoyo, se incubó el enzima durante uno, dos y siete días con diferentes concentraciones de cada una de estas sustancias siguiendo el apartado 2.2.3.4. Al final de cada periodo de tiempo y después de dializar los extractos enzimáticos que contenían cisteína, ascórbico y mercaptoetanol, se determinaron las actividades enzimáticas correspondientes observándose que sólo al cabo de siete días los extractos enzimáticos comenzaban a perder actividad.

En la tabla 2 se muestran los porcentajes de acti-

Tabla 2.- Porcentajes de actividad residual de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo después de siete días de incubación con cisteína, ácido ascórbico y mercaptoetanol

	<u>% de actividad PPO</u>		
	<u>Sustrato utilizado</u>		
	<u>catecol</u>	<u>tiramina</u>	
Extracto control	12%	7%	
Extracto incubado con cisteína	0.5mM	62%	43%
	0.2mM	48%	37%
Extracto incubado con ácido ascórbico	0.5mM	8%	0%
	0.2mM	5%	0%
Extracto incubado con mercaptoetanol	0.5mM	34%	18%
	0.2mM	29%	9%

vidad residual polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo al cabo de siete días de incubación con los citados compuestos. Mercaptoetanol y cisteína ejercían un alto efecto protector sobre la estabilidad del enzima. Por el contrario, la incubación del enzima con ácido ascórbico no dió lugar a ningún efecto estabilizador; el ácido ascórbico se comportaba más bien como un inactivador. En cualquier caso, la pérdida de actividad monofenolasa fué siempre significativamente superior a la pérdida de actividad ortodifenoloxidasas.

3.2.4.- Influencia de la presencia de peróxido de hidrógeno sobre la actividad polifenoloxidasas

En los tejidos continuamente se está formando agua oxigenada como consecuencia de los radicales oxígeno que se producen. Sin embargo, este agua oxigenada ha de mantenerse a bajas concentraciones en la célula porque a altas concentraciones resulta tóxica (69).

Se conoce también que los niveles intracelulares de agua oxigenada aumentan durante la maduración de los frutos, al igual que la actividad polifenoloxidasas (130). Con objeto de establecer el efecto que el agua oxigenada podría ejercer sobre la actividad polifenoloxidasas, se han determinado las actividades enzimáticas, según lo descrito en el apartado 2.2.3.5., frente a catecol, DOPA y tiramina, incluyendo en el sistema de reacción diversas concentraciones de aquel compuesto.

En la oxidación del catecol catalizada por la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo, el agua oxigenada hace disminuir la velocidad de reacción de forma directamente pro-

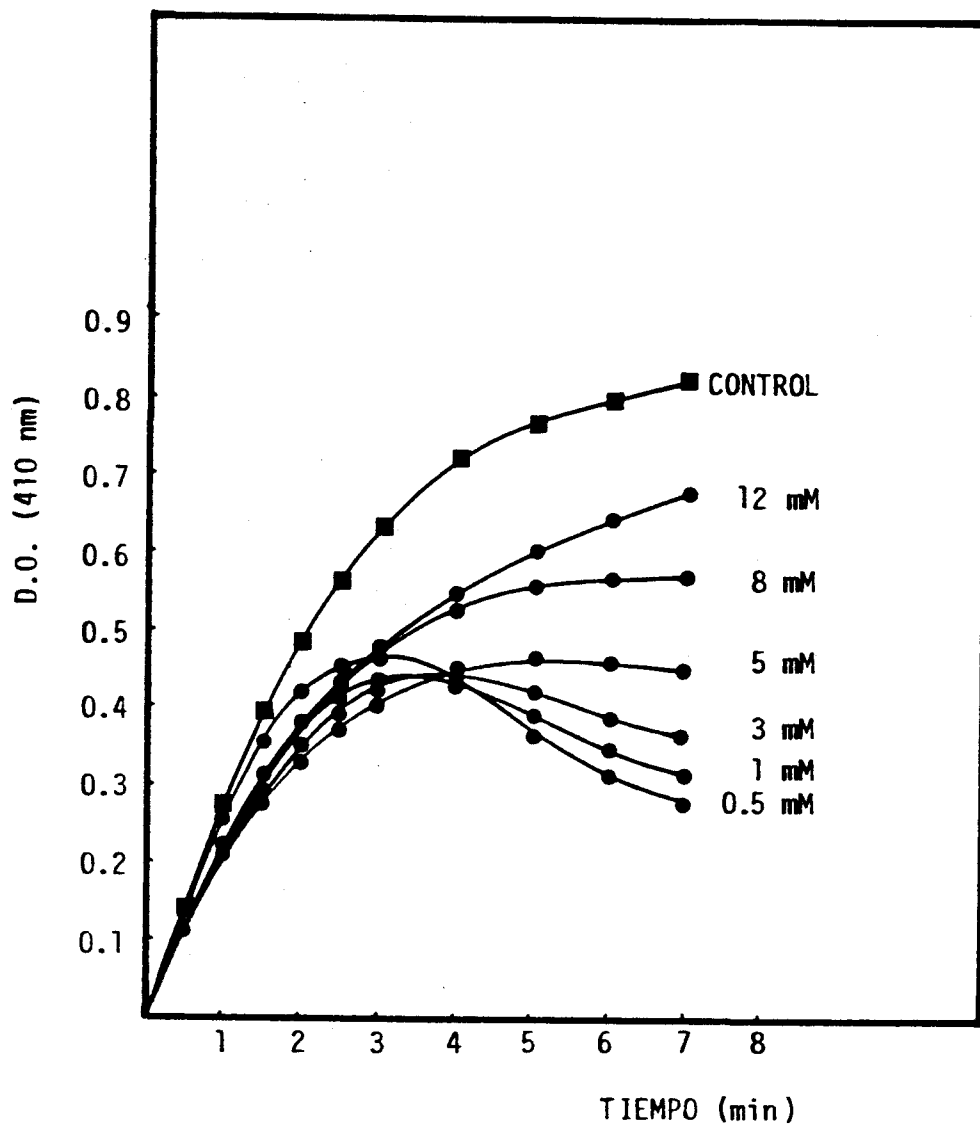


Figura 16.- Influencia de la presencia de agua oxigenada en el sistema de reacción de la PPO de epicarpio de chirimoyo. Las concentraciones de agua oxigenada oscilaron entre 0.5 mM y 12 mM. Como sustrato se utilizó catecol 5 mM.

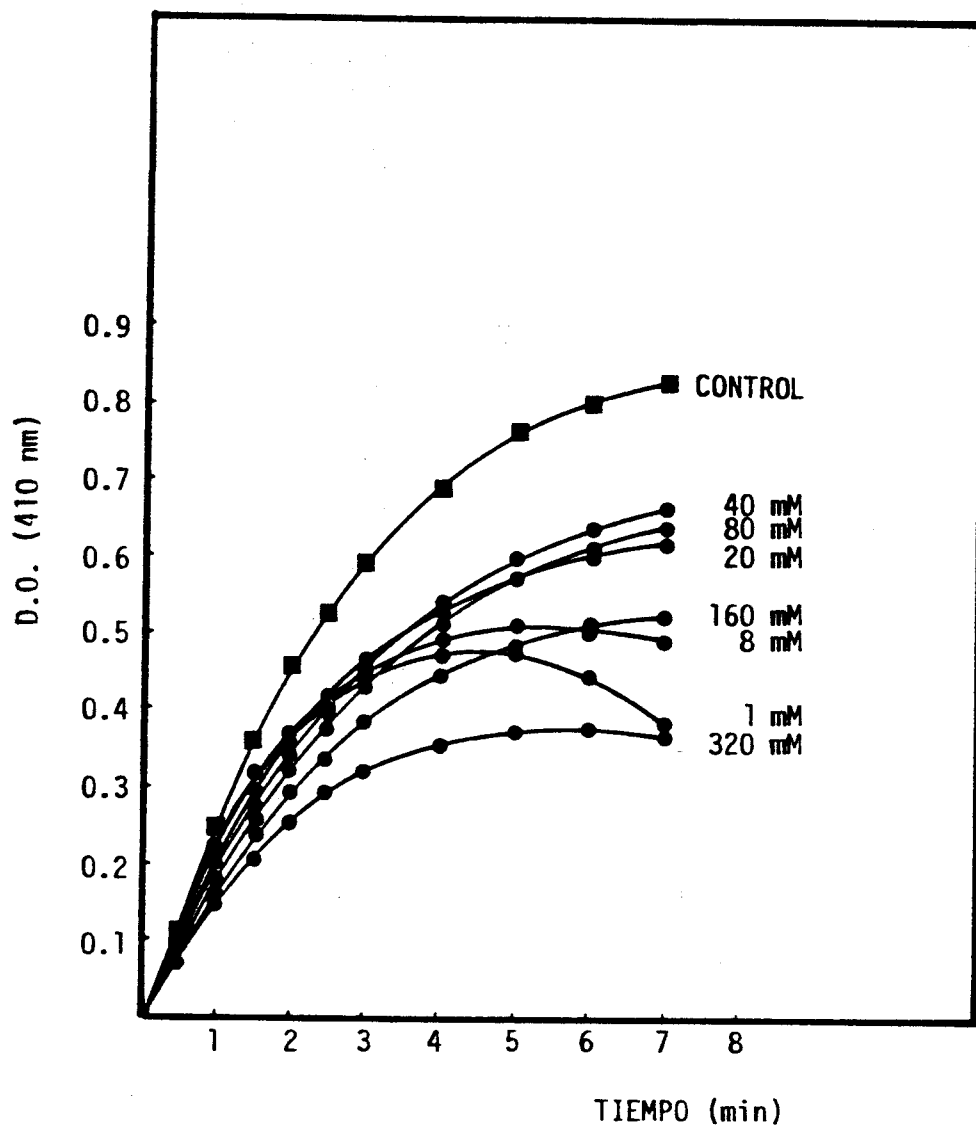


Figura 17.- Influencia de la presencia de agua oxigenada en el sistema de reacción de la PPO de epicarpio de chirimoyo. Las concentraciones de agua oxigenada oscilaron entre 1 mM y 320 mM. Como sustrato se utilizó catecol 5 mM.

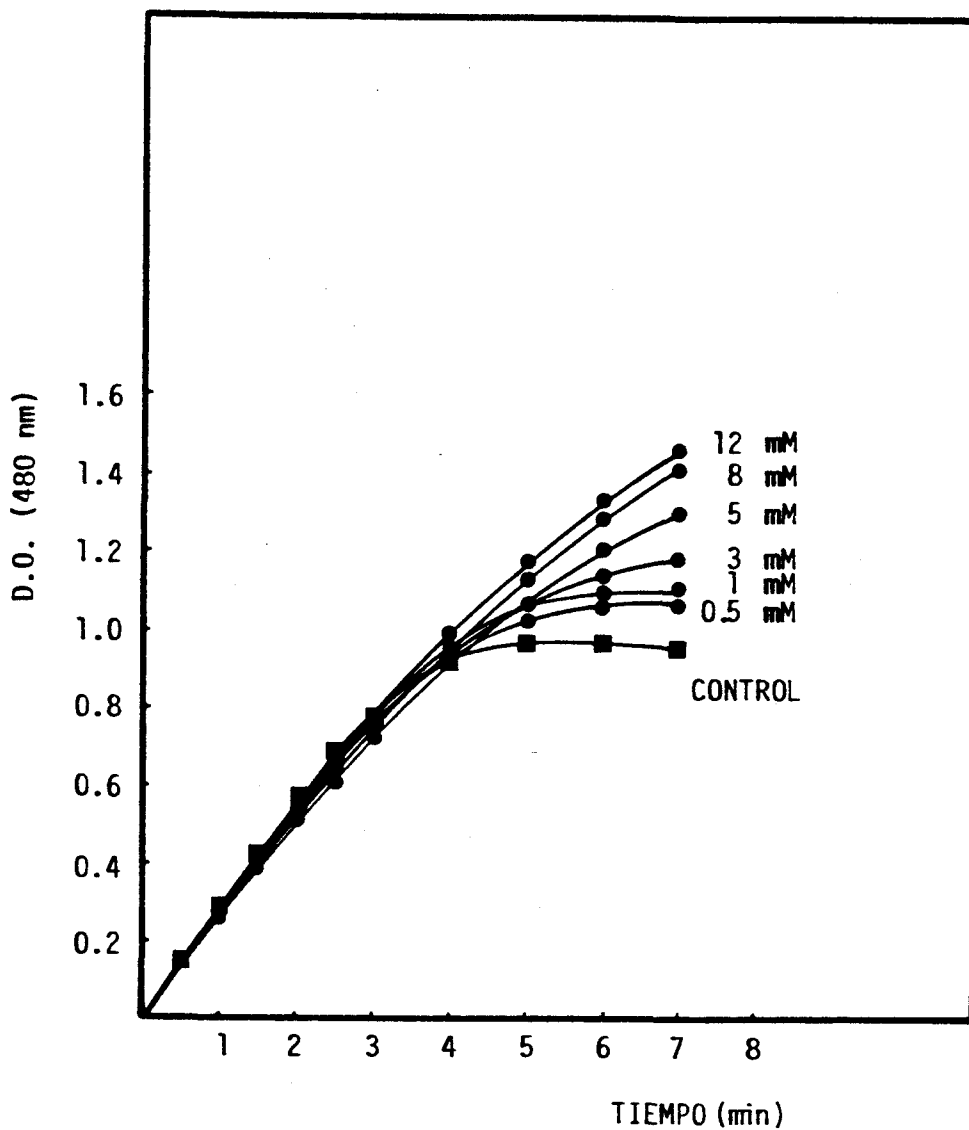


Figura 18.- Influencia de la presencia de agua oxigenada en el sistema de reacción de la PPO de epicarpio de chirimoyo. Las concentraciones de agua oxigenada oscilaron entre 0.5 mM y 12 mM. Como sustrato se utilizó dihidroxifenilalanina 5 mM.

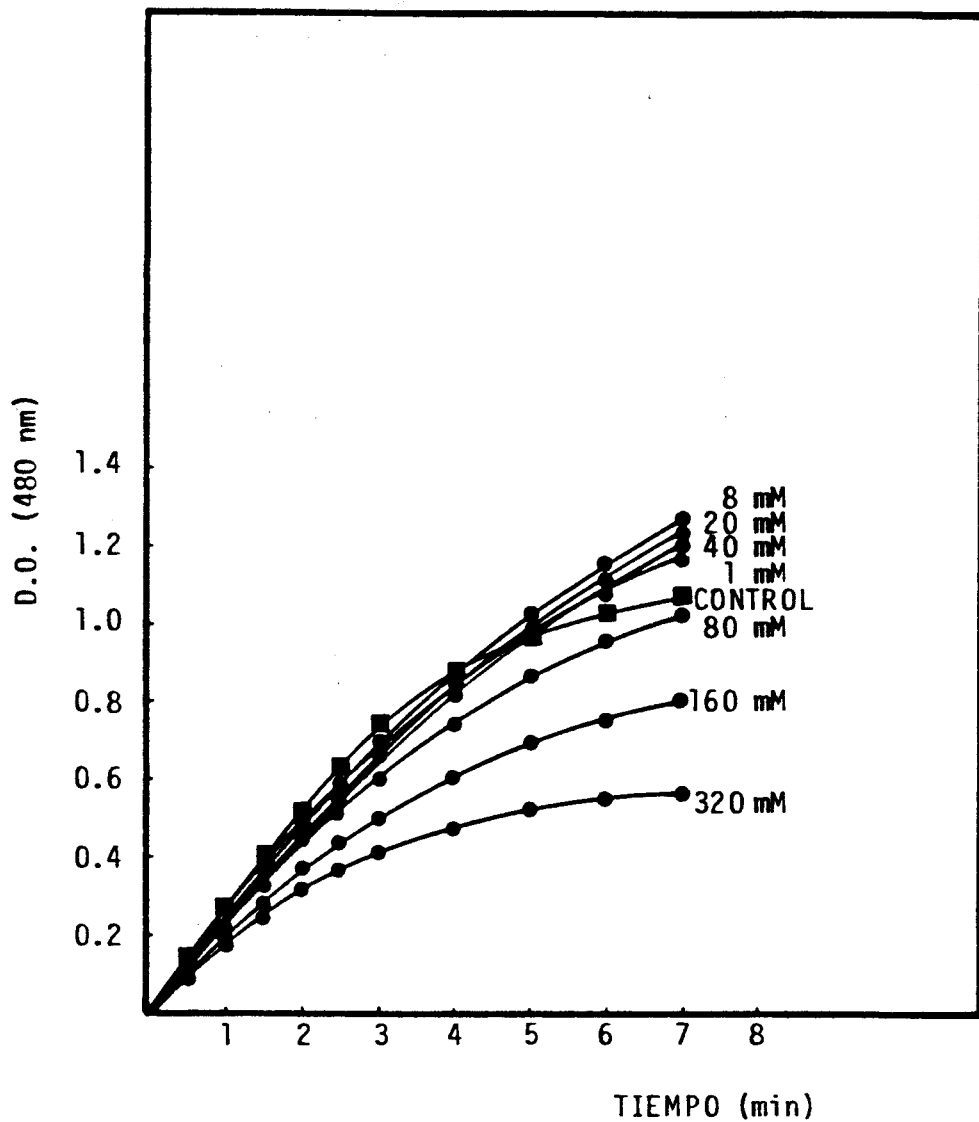


Figura 19.- Influencia de la presencia de agua oxigenada en el sistema de reacción de la PPO de epicarpio de chirimoyo. Las concentraciones de agua oxigenada oscilaron entre 1 mM y 320 mM. Como sustrato se utilizó dihidroxifenilalanina 5 mM.

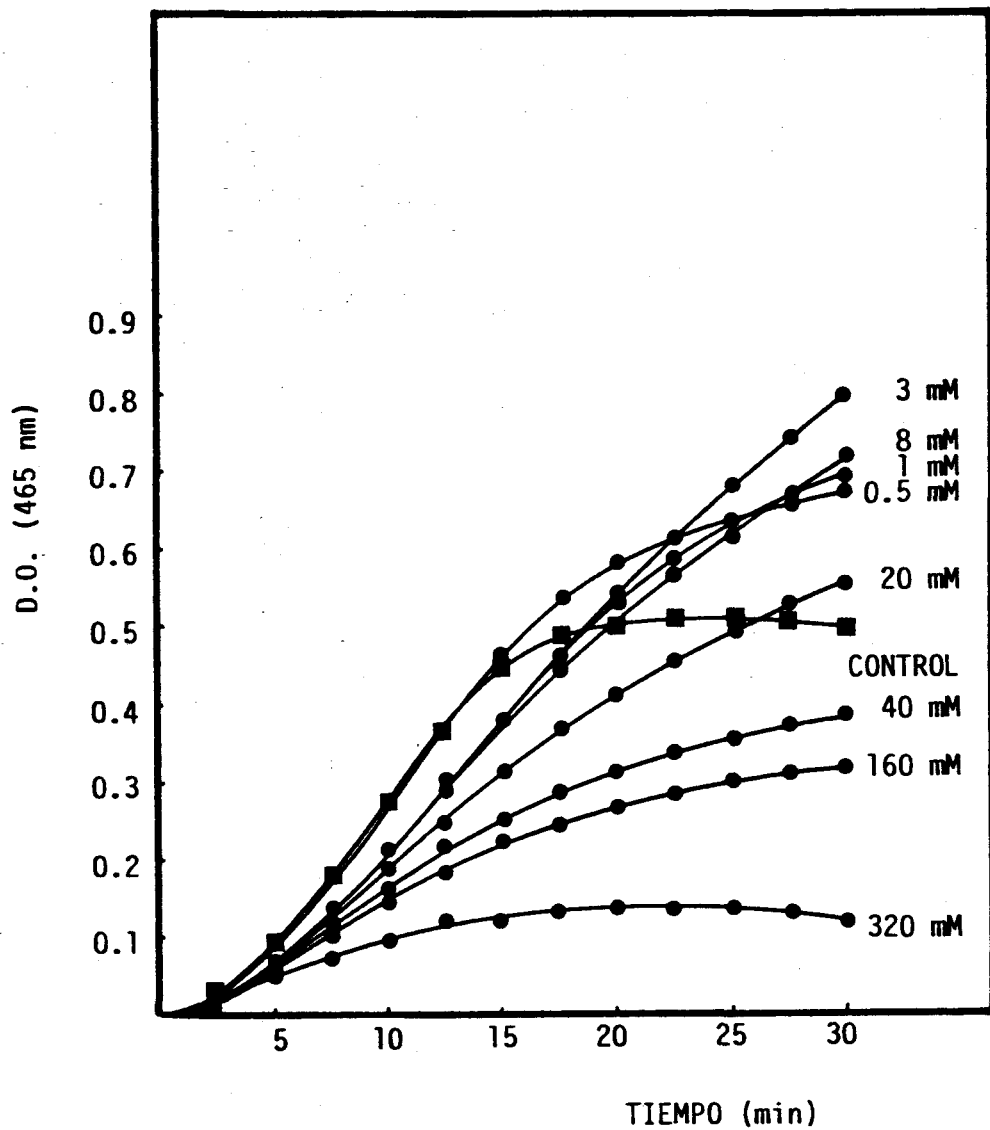


Figura 20.- Influencia de la presencia de agua oxigenada en el sistema de reacción de la PPO de epicarpio de chirimoyo. Las concentraciones de agua oxigenada oscilaron entre 0.5 mM y 320 mM. Como sustrato se utilizó tiramina 5 mM.

porcional a su concentración (figuras 16 y 17). La cantidad final de producto formado es muy pequeña cuando la concentración de agua oxigenada también lo es (0.5mM). Entre concentraciones de 0.5mM y 40mM de este compuesto la cantidad final de producto oxidado va aumentando progresivamente, sin embargo, a concentraciones superiores los niveles de sustrato oxidado comienzan de nuevo a disminuir de forma progresiva.

Por lo que se refiere a la oxidación de DOPA catalizada por la polifenoloxidasas (figuras 18 y 19), las velocidades de reacción se afectaron de igual modo a como lo hacían en la oxidación del catecol. A concentraciones inferiores a 80mM de agua oxigenada las cantidades de producto final formado fueron siempre más elevadas que en la reacción control, hecho que en ningún caso ocurrió en la oxidación del catecol catalizada por la polifenoloxidasas.

La figura 20 muestra la actividad polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo frente a tiramina en presencia de agua oxigenada. Los efectos causados por la presencia de agua oxigenada en la reacción fueron similares a los anteriormente señalados en los que se utilizaba DOPA como sustrato.

3.2.5.- Efecto de la preincubación del enzima con peróxido de hidrógeno sobre la actividad polifenoloxidasas

Para determinar la influencia del agua oxigenada sobre la estabilidad de la polifenoloxidasas, más que sobre su propia actividad catalítica, se incubó el enzima con distintas concentraciones de agua oxigenada durante 10, 30, 60 y 120 minutos según el apartado 2.2.3.6. Al cabo de estos periodos de tiempo y después de dializar los extractos enzimáticos

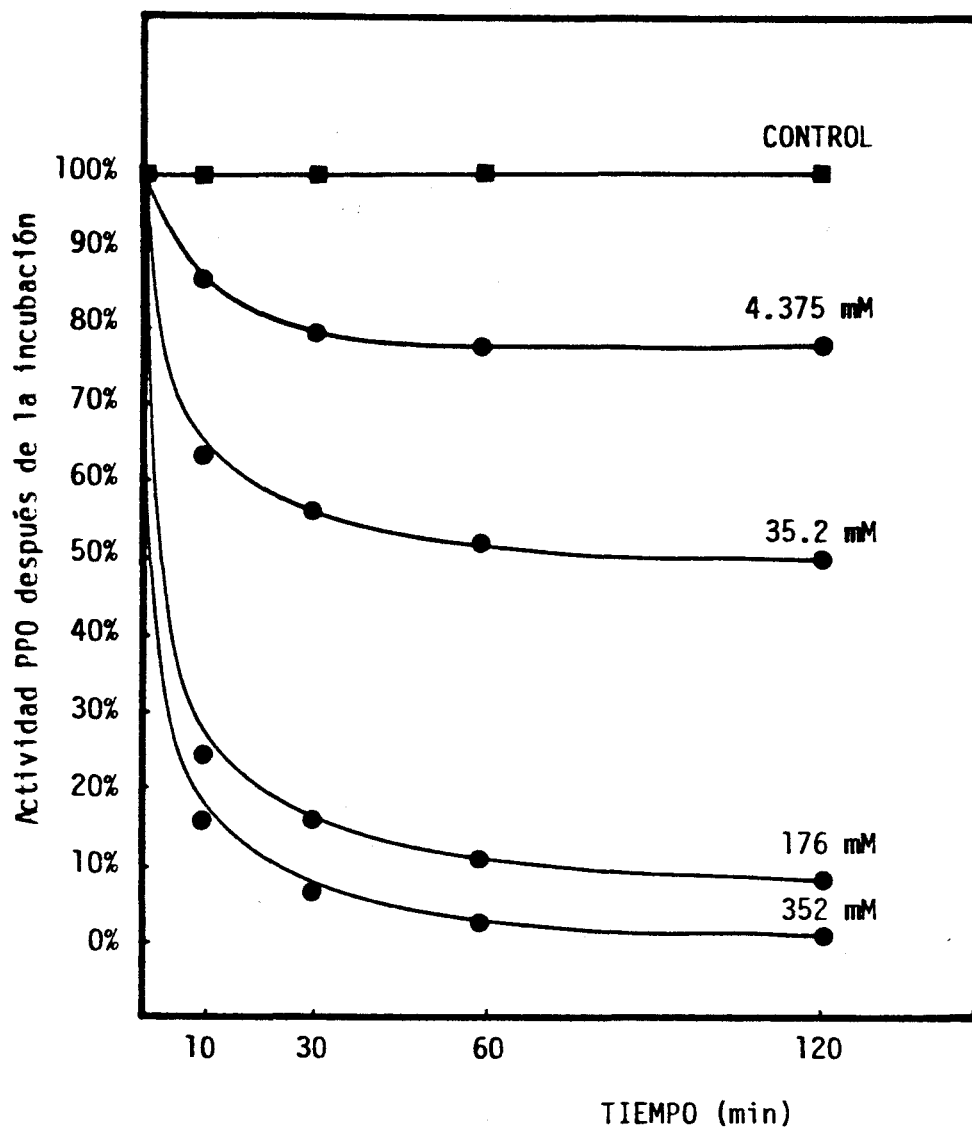


Figura 21.- Influencia de la preincubación con agua oxigenada de la PPO de epicarpio de chirimoyo sobre su actividad frente a catecol. Las concentraciones de agua oxigenada oscilaron entre 4.375 mM y 352 mM. La concentración de sustrato fué en todos los casos 5 mM.

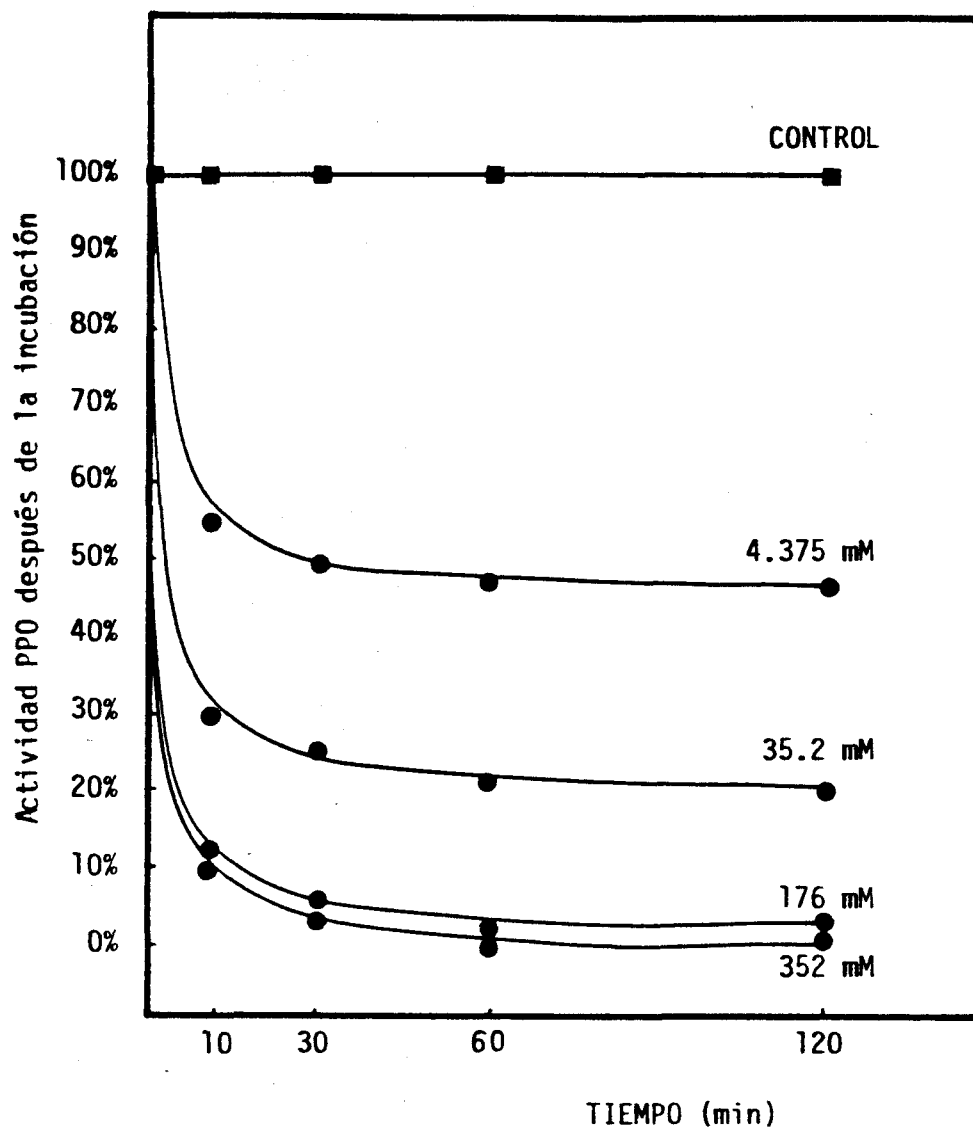


Figura 22.- Influencia de la preincubación con agua oxigenada de la PPO de epicarpio de chirimoyo sobre su actividad frente a tiramina. Las concentraciones de agua oxigenada oscilaron entre 4.375 mM y 352 mM. La concentración de sustrato fué en todos los casos 5 mM.

cos, se determinaron las actividades enzimáticas frente a catecol y tiramina.

En la figura 21 se muestra el porcentaje de actividad polifenoloxidasas frente a catecol que permanecía después de los diferentes tiempos de incubación. Se observa que al aumentar la concentración de agua oxigenada la inactivación del enzima se hace mayor, llegando incluso a perder su total actividad a una concentración 352mM. En cuanto al tiempo de incubación, prácticamente a los 10 minutos el enzima pierde la mayor parte de la actividad; a los 60 minutos la pérdida de actividad es la total.

La figura 22 muestra los resultados correspondientes a las actividades enzimáticas, frente a tiramina, de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo incubada con agua oxigenada. La pérdida de actividad monofenolasa producida por el agua oxigenada era mucho mayor que la pérdida de actividad ortodifenoloxidasas para una misma concentración de agua oxigenada.

3.2.6.- Influencia de distintos ácidos orgánicos sobre la actividad polifenoloxidasas

Resulta bien conocido que en la mayor parte de los frutos las concentraciones de ácidos orgánicos disminuyen durante el transcurso de su maduración (156). Con objeto de establecer si existe alguna relación entre este hecho y el incremento de actividad de la polifenoloxidasas durante la maduración del chirimoyo (130), se ha determinado la influencia de la presencia de diversos ácidos orgánicos (acético, oxálico, malónico, maleico, fumárico, succínico, glutárico y glucuróni-

co) sobre la actividad polifenoloxidasas. Todos los ácidos se han ensayado a concentración 1mM siguiendo el apartado 2.2.3.7.

Ninguno de los citados ácidos orgánicos modificaba la velocidad de reacción ni la cantidad final de producto formado, ensayada la actividad polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo frente a tiramina y catecol.

3.2.7.- Influencia de algunos azúcares sobre la actividad polifenoloxidasas

Los azúcares aumentan su concentración durante la maduración de los frutos (171) siguiendo por tanto un patrón semejante al de la polifenoloxidasas (130).

Para determinar si la presencia de azúcares influía en la actividad de la polifenoloxidasas se han ensayado tres azúcares simples, habituales en los frutos, sacarosa, D(+)glucosa y D(-)fructosa, cada uno de ellos en concentraciones 0.1 y 1mM. El protocolo seguido se ha descrito en el apartado 2.2.3.8.

Los azúcares sacarosa, D(+)glucosa y D(-)fructosa no modificaban la actividad de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo frente a catecol o tiramina a ninguna de las concentraciones ensayadas.

3.2.8.- Influencia de catequinas sobre la actividad polifenoloxidasas

Las catequinas son derivados fenólicos que se encuentran en gran cantidad en los frutos maduros interfiriendo

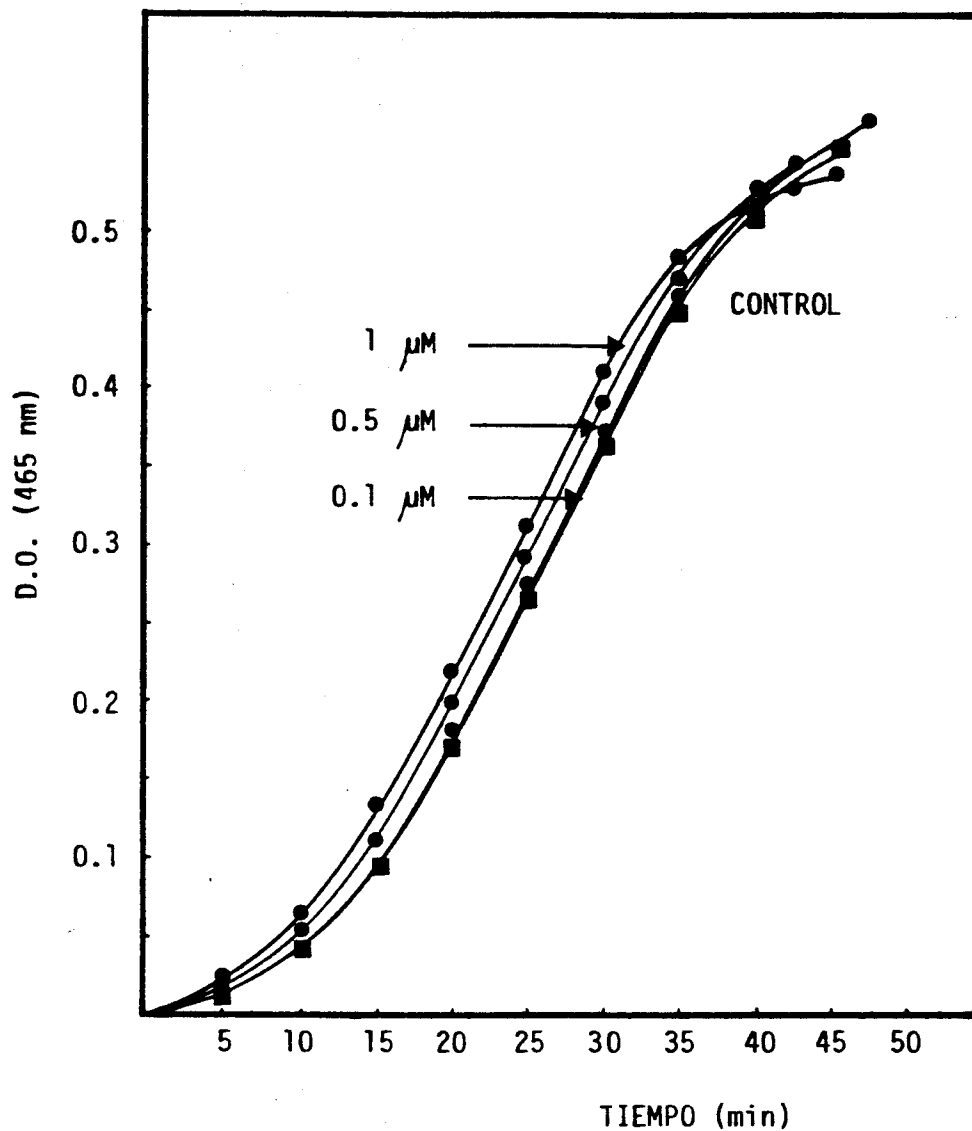


Figura 23.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de (+)catequina (0.1 - 1 μM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

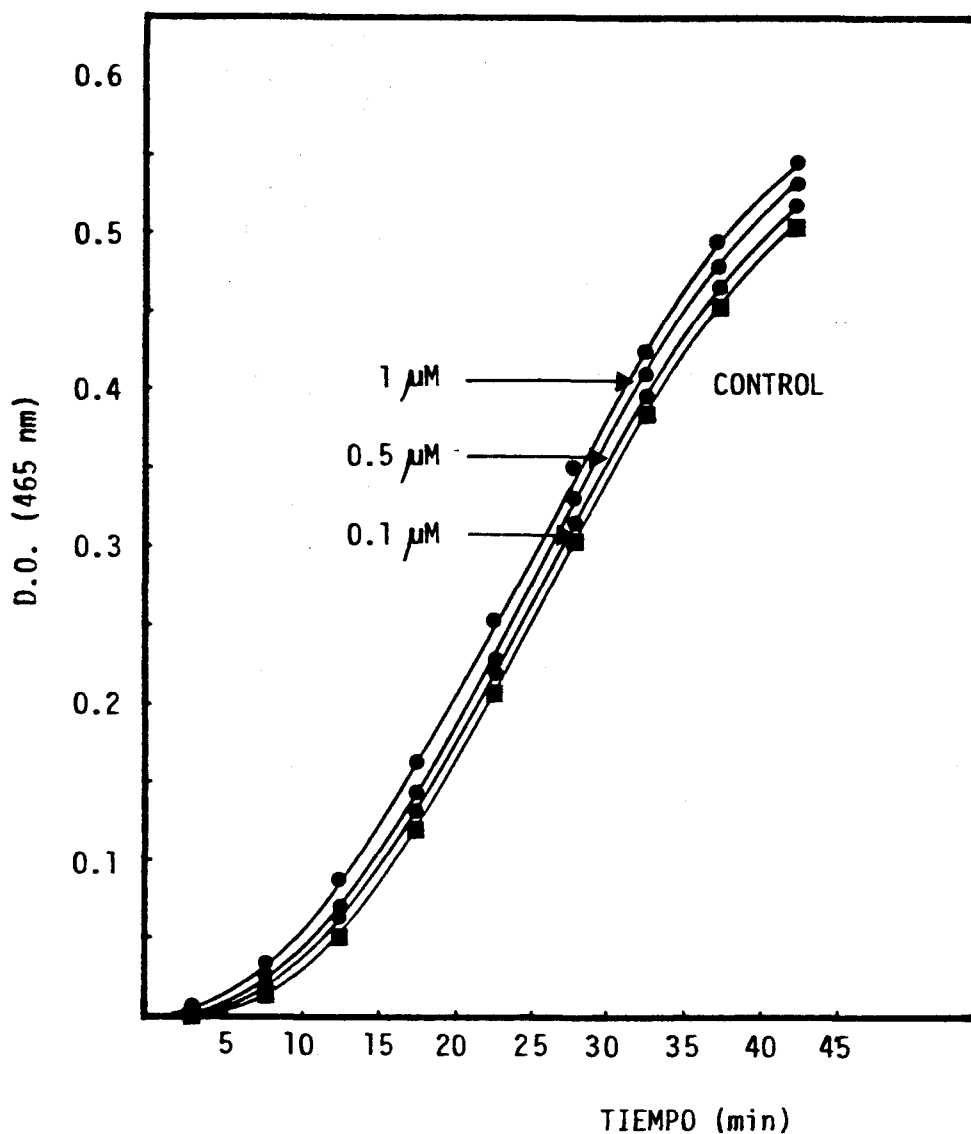


Figura 24.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de (-)epicatequina (0.1 - 1 μM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

con los sustratos habituales de las polifenoloxidasas (95,157). Debido a esto se han determinado los posibles efectos que podrían ejercer las catequinas sobre la actividad polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo.

Se han ensayado según el apartado 2.2.3.9. (+)catequina y (-)epicatequina ambas en concentración 0.5, 1 y 5 μ M. A concentraciones superiores las catequinas son oxidadas directamente por el enzima.

(+)catequina y (-)epicatequina no ejercen efecto alguno sobre la actividad polifenoloxidasas frente a catecol. Frente a tiramina las dos catequinas, aunque no modifican la velocidad de reacción, acortan levemente las fases de retardo proporcionalmente a sus concentraciones (figuras 23 y 24).

3.2.9.- Influencia de distintos compuestos fenólicos sobre la actividad polifenoloxidasas

Debido a la similitud de estructuras de muchos compuestos fenólicos, que no son sustratos de la polifenoloxidasas de chirimoyo, y a la interferencia que estos podrían ejercer sobre dicha reacción (2,95), se han estudiado los efectos de algunos de estos compuestos fenólicos sobre la actividad de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo frente a catecol y frente a tiramina.

Se han ensayado a concentraciones 0.1 y 1mM siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.3.10. los siguientes compuestos fenólicos: fenol, foroglucinol, pirogalol, resorcinol, orcinol, ácido benzoico, ácido 3-OH-benzoico, ácido tri-OH-benzoico, ácido clorogénico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido vaníllico, ácido isovaníllico, ácido ferú-

lico, ácido protocatecuico, ácido salicílico, ácido siríngico, ácido ftálico, ácido cinámico, ácido quínico y ácido skímico.

Los ácidos quínico, skímico y ftálico así como fenol y resorcinol no modificaban apenas la actividad de la polifenoloxidasas ni frente a catecol ni frente a tiramina, solamente el resorcinol a concentración 1mM hacía disminuir la cantidad final de producto formado en la oxidación de catecol (figura 25).

Foroglucinol, ácido benzoico, ácido 3-OH-benzoico, ácido isovanílicico, ácido cinámico, ácido p-cumárico y ácido salicílico (figuras 26 a 39) inhibían las reacciones de hidroxilación y deshidrogenación catalizadas por la PPO proporcionalmente a sus concentraciones. En la oxidación del catecol hacían disminuir la velocidad de reacción y en la hidroxilación de la tiramina, además de hacer disminuir la velocidad de reacción, incrementaban la duración de las fases de retardo. Esta inhibición era mucho menos patente con los ácidos 3-OH-benzoico y salicílico los cuales a concentración 0.1mM ejercían un efecto casi inapreciable (figuras 30,31,38 y 39).

El ácido ferúlico (figuras 40 y 41) hacía aumentar la velocidad de las reacciones de oxidación de catecol y tiramina catalizadas por la polifenoloxidasas.

Los ácidos protocatecuico y siríngico se comportaban como activadores de la reacción de hidroxilación de tiramina catalizada por la polifenoloxidasas, reduciendo asimismo la fase de retardo; en cambio, frente a catecol, el ácido siríngico inhibía la reacción de oxidación mientras que el ácido protocatecuico no mostraba efecto alguno (figuras 42 a 44).

Orcinol y ácido cafeico activaban la reacción de la oxidación del catecol por la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo (figuras 45 y 46).

Por último, el ácido tri-OH-benzoico (ácido gálico) y el pirogalol, compuestos de estructura semejante ejercían un efecto especial sobre la actividad PPO. Ambos compuestos hacían disminuir la velocidad de la reacción de oxidación del catecol por la polifenoloxidasas, pero producían una mayor inhibición de la actividad enzimática a concentraciones bajas de inhibidor (0.1mM) (figuras 47 y 49). En la reacción de hidroxilación de la tiramina ambos compuestos hacían aumentar la velocidad de reacción del enzima y acortaban su fase de retardo (figuras 48 y 50).

En las reacciones de oxidación de catecol y tiramina catalizadas por la PPO de chirimoyo, cuando estaban presentes en el sistema de reacción ácido tri-OH-benzoico o pirogalol en distintas concentraciones, se comprobó a través de los espectros de absorción en el visible y U.V. que los productos originados, utilizando concentraciones iguales a 0.1mM de estos compuestos, eran distintos de los que aparecían cuando se utilizaban concentraciones superiores (1mM).

Junto a los efectos de los citados compuestos fenólicos sobre la actividad de la polifenoloxidasas se han determinado también las constantes de inhibición o activación de los mismos. En la tabla 3 se muestran algunas de las constantes encontradas.

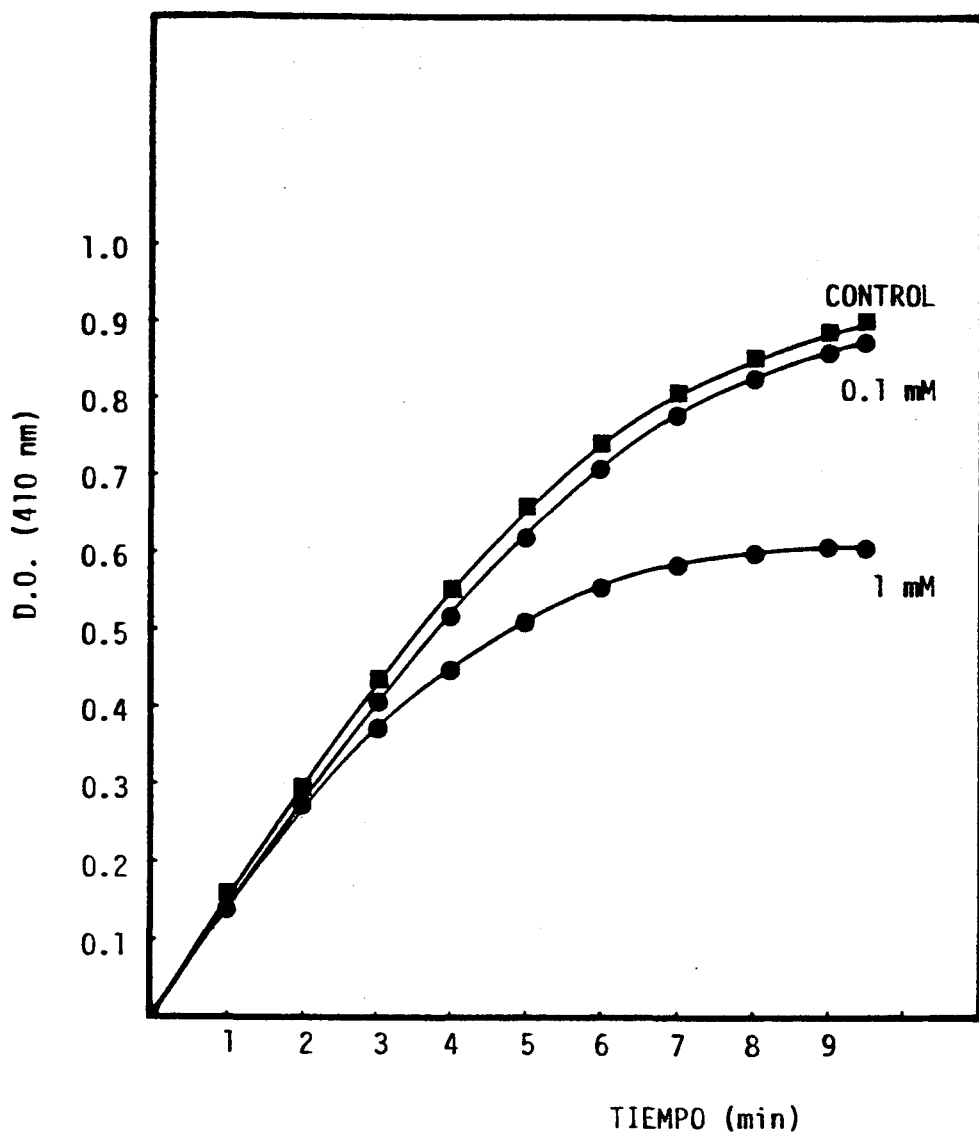


Figura 25.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de resorcinol (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

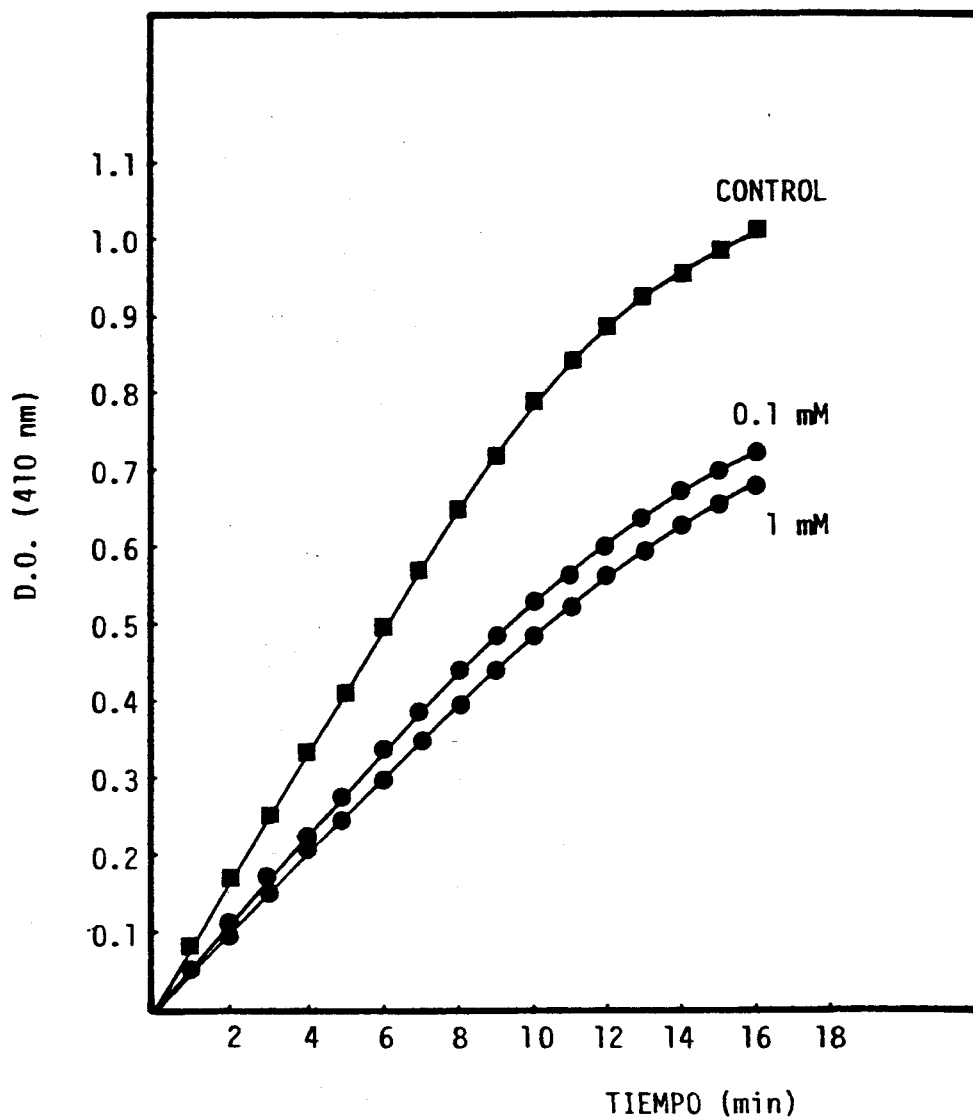


Figura 26.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de foroglucinol (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

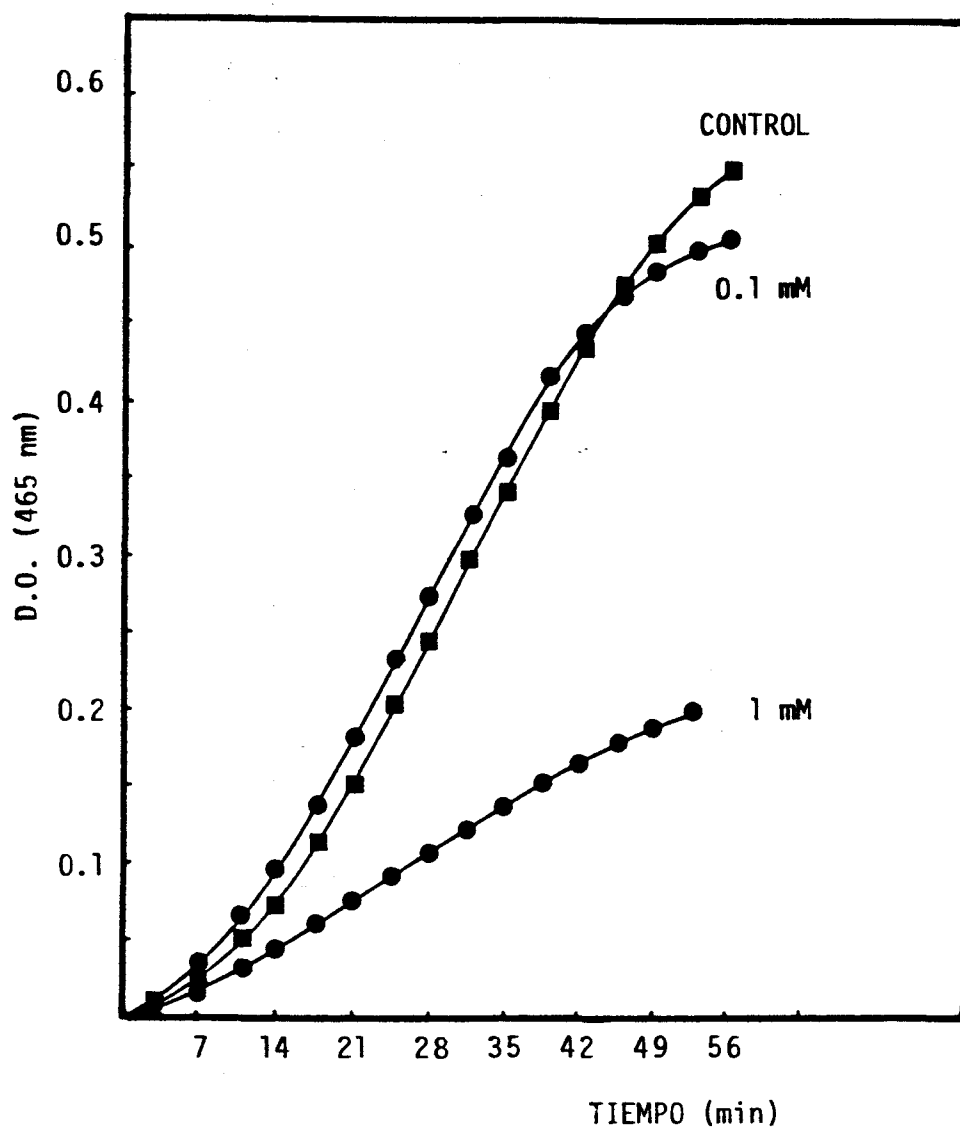


Figura 27.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de foroglucinol (0.1 mM y 1mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5mM como sustrato.

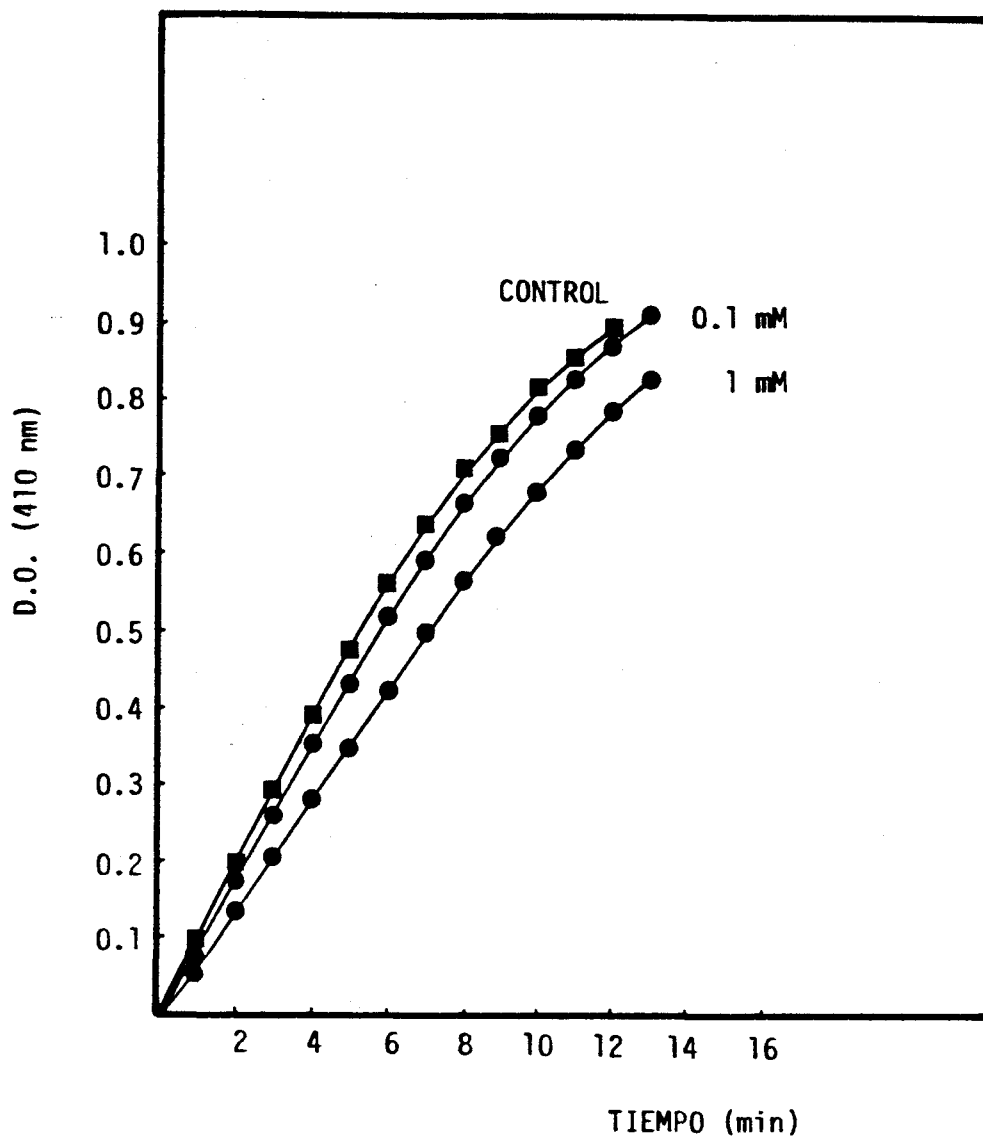


Figura 28.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido benzoico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

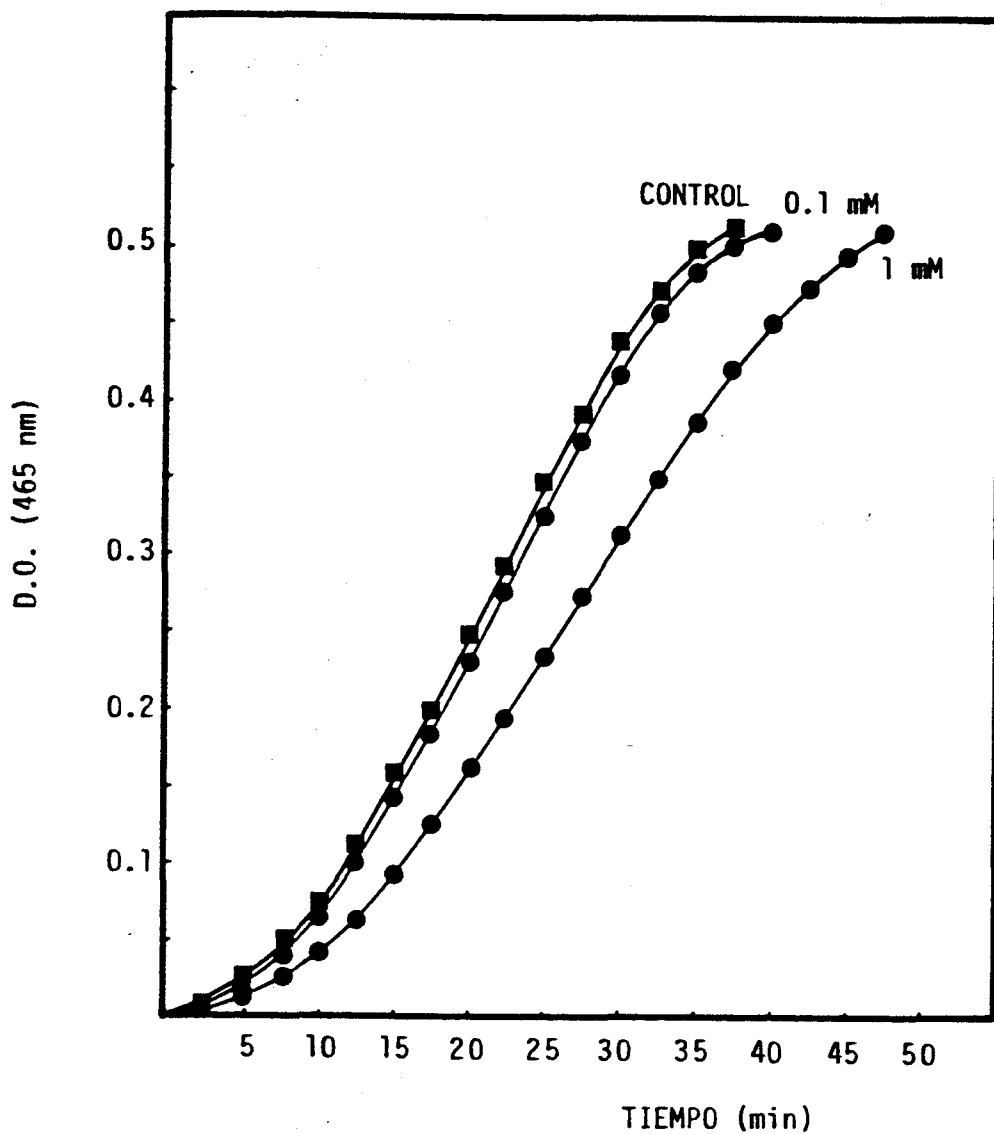


Figura 29.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido benzoico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

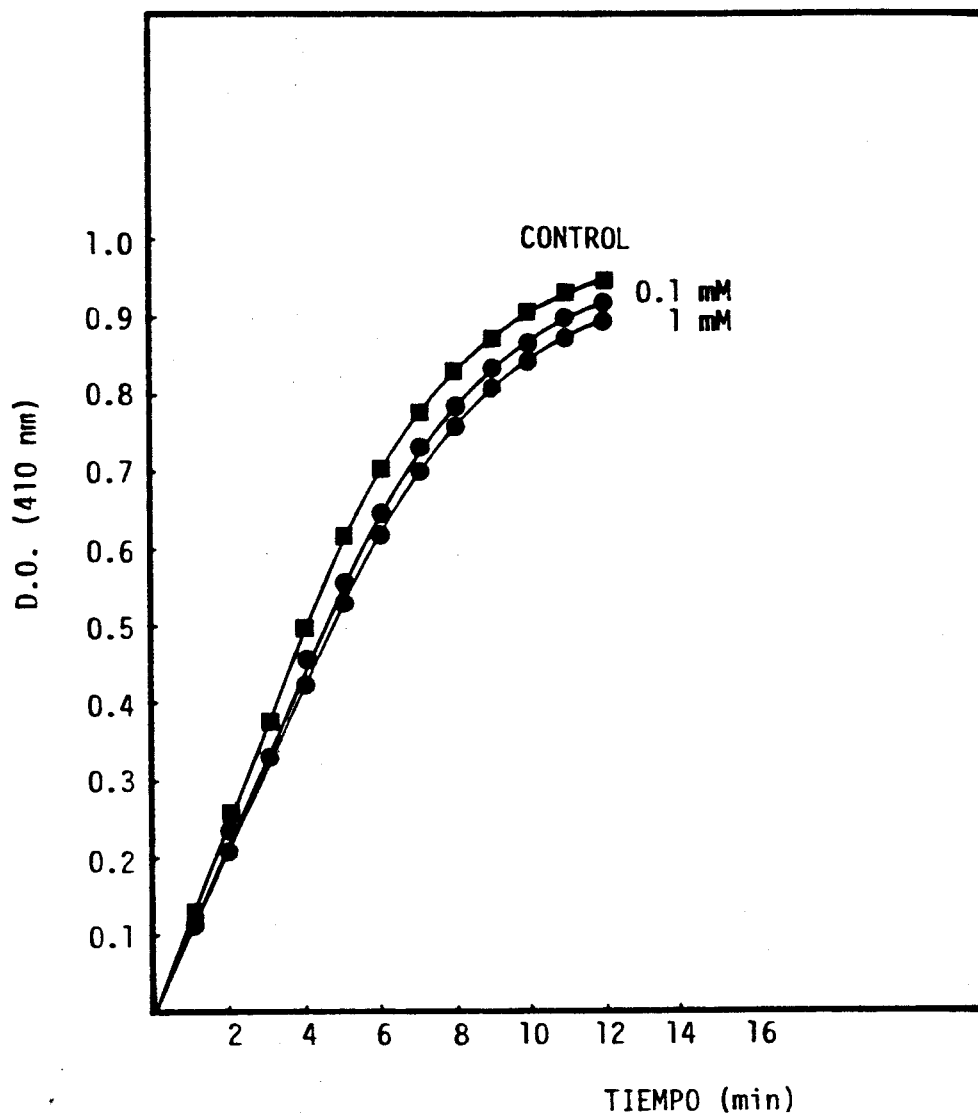


Figura 30.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de 3-OH-benzoico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

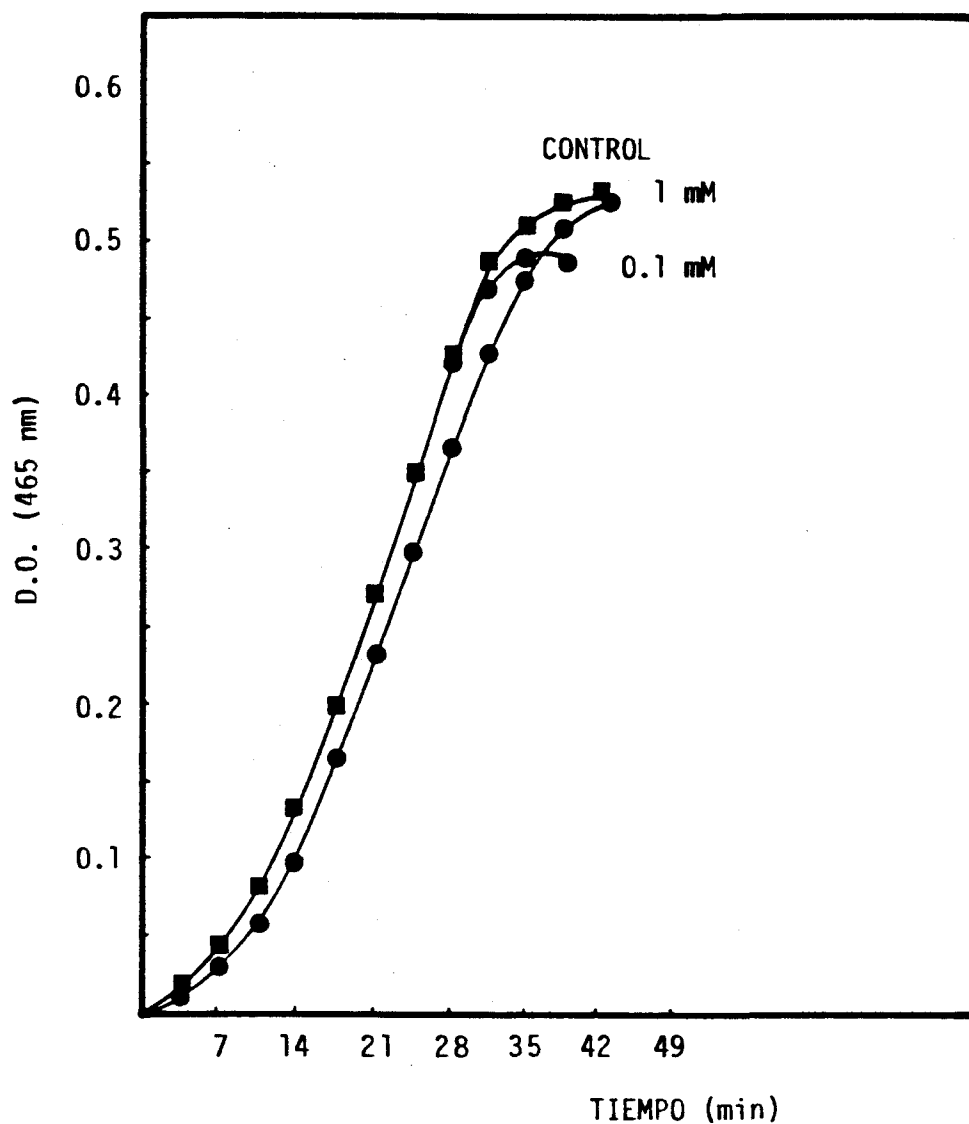


Figura 31.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de 3-OH-benzoico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

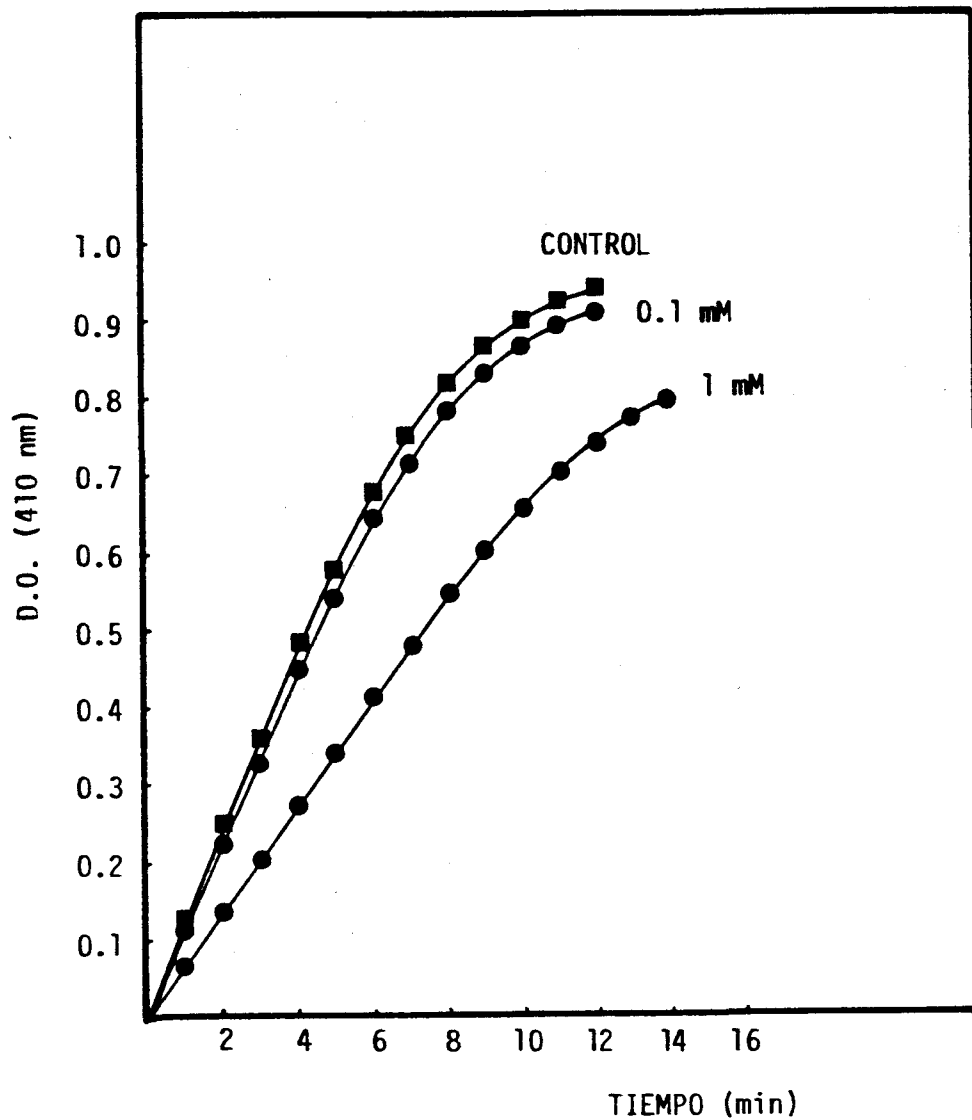


Figura 32.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido isovanillico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epiphyllum de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

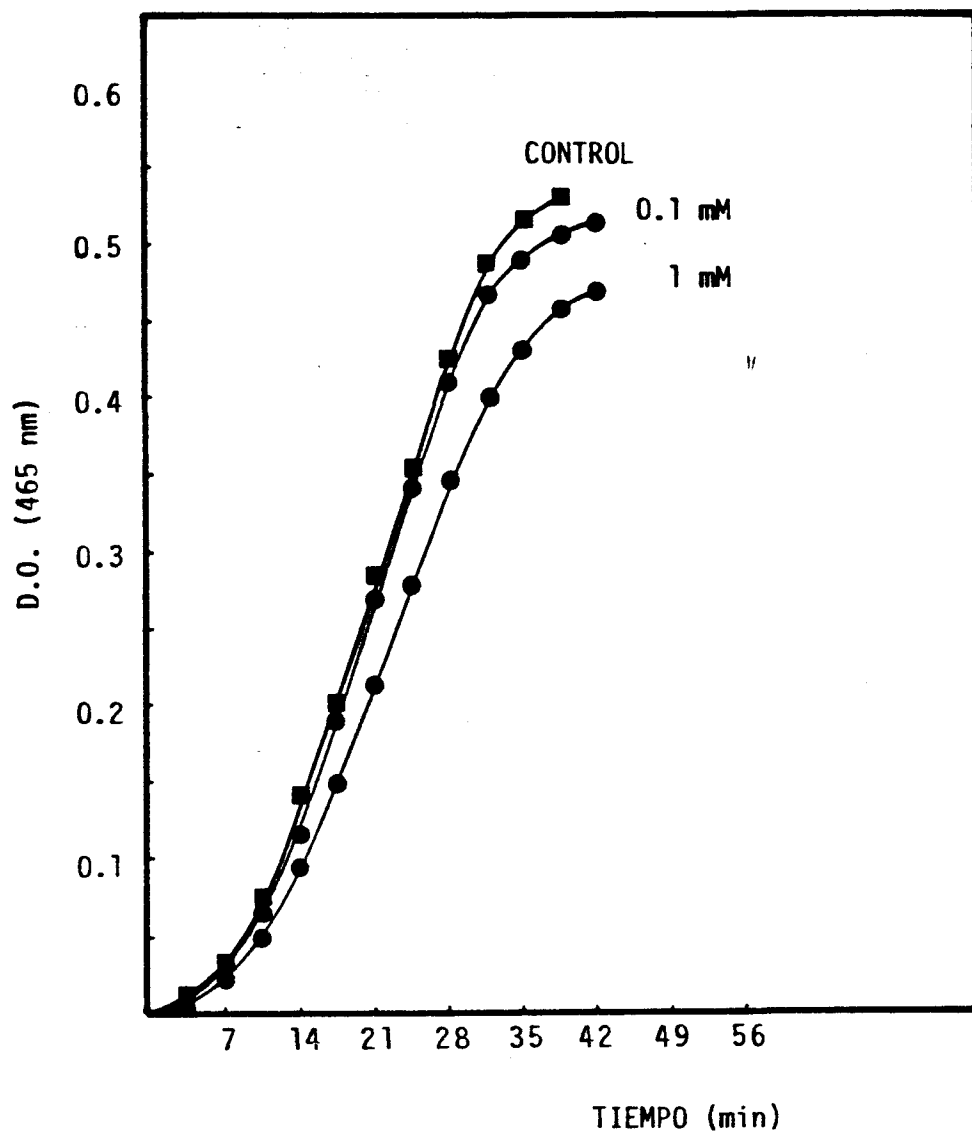


Figura 33.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido isovanílico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

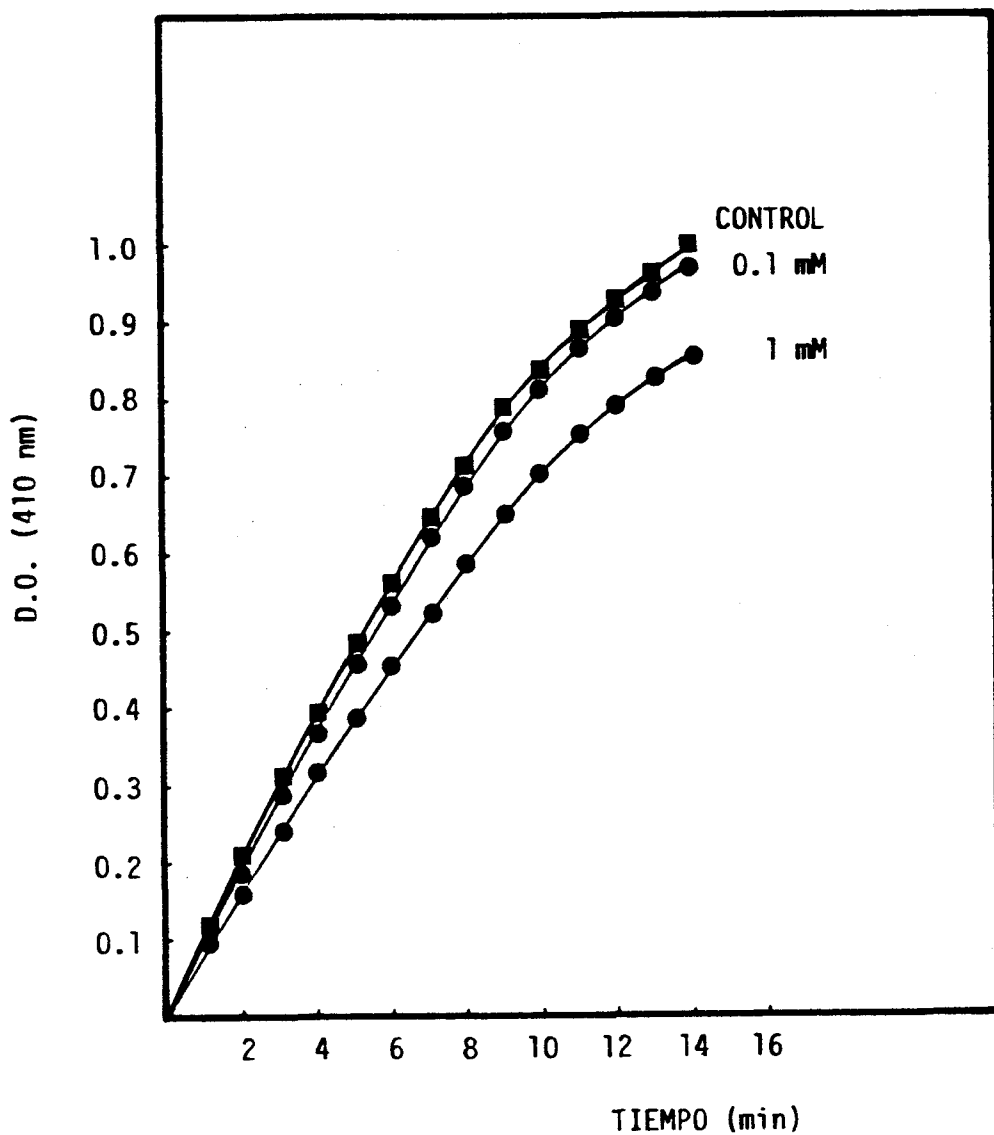


Figura 34.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido cinámico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

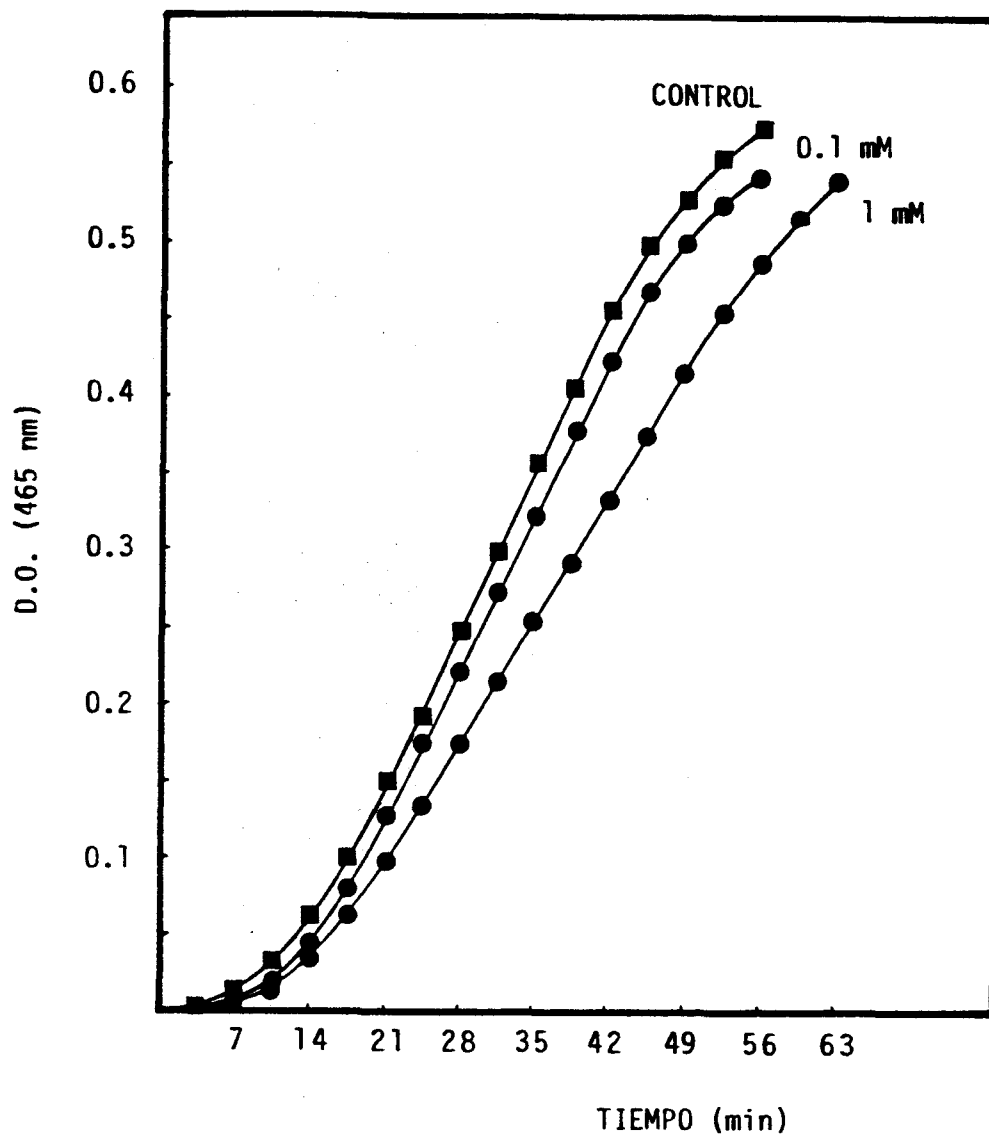


Figura 35.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido cinámico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

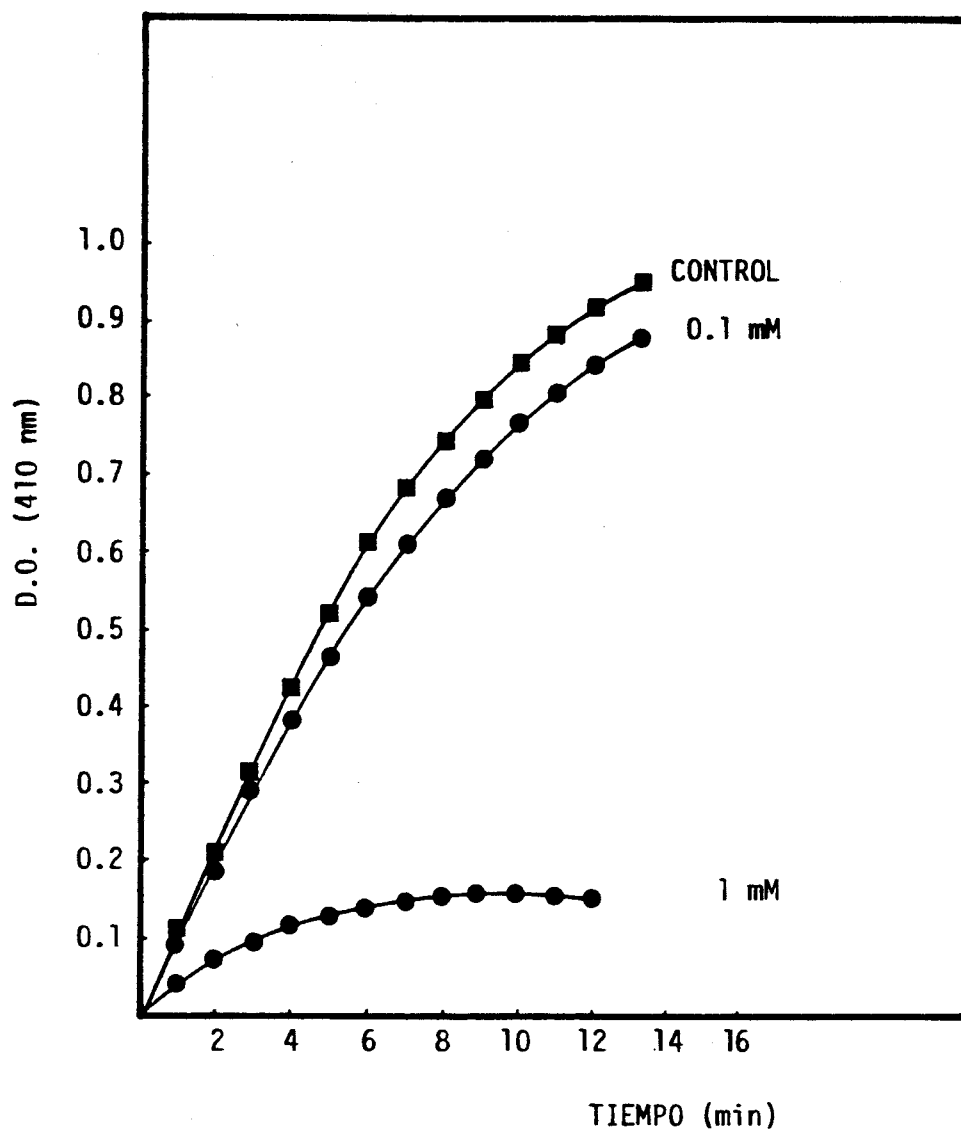


Figura 36.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido p-cumárico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

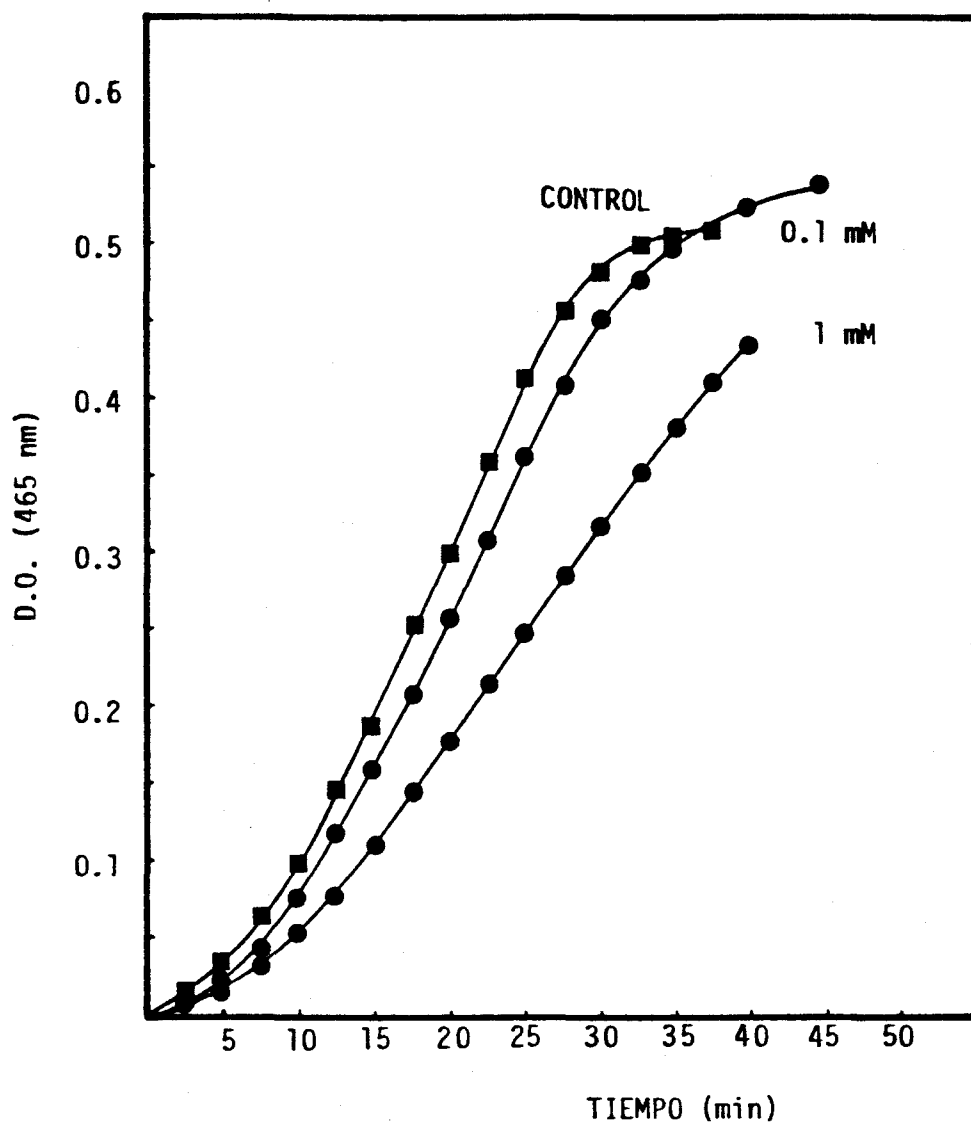


Figura 37.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido p-cumárico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

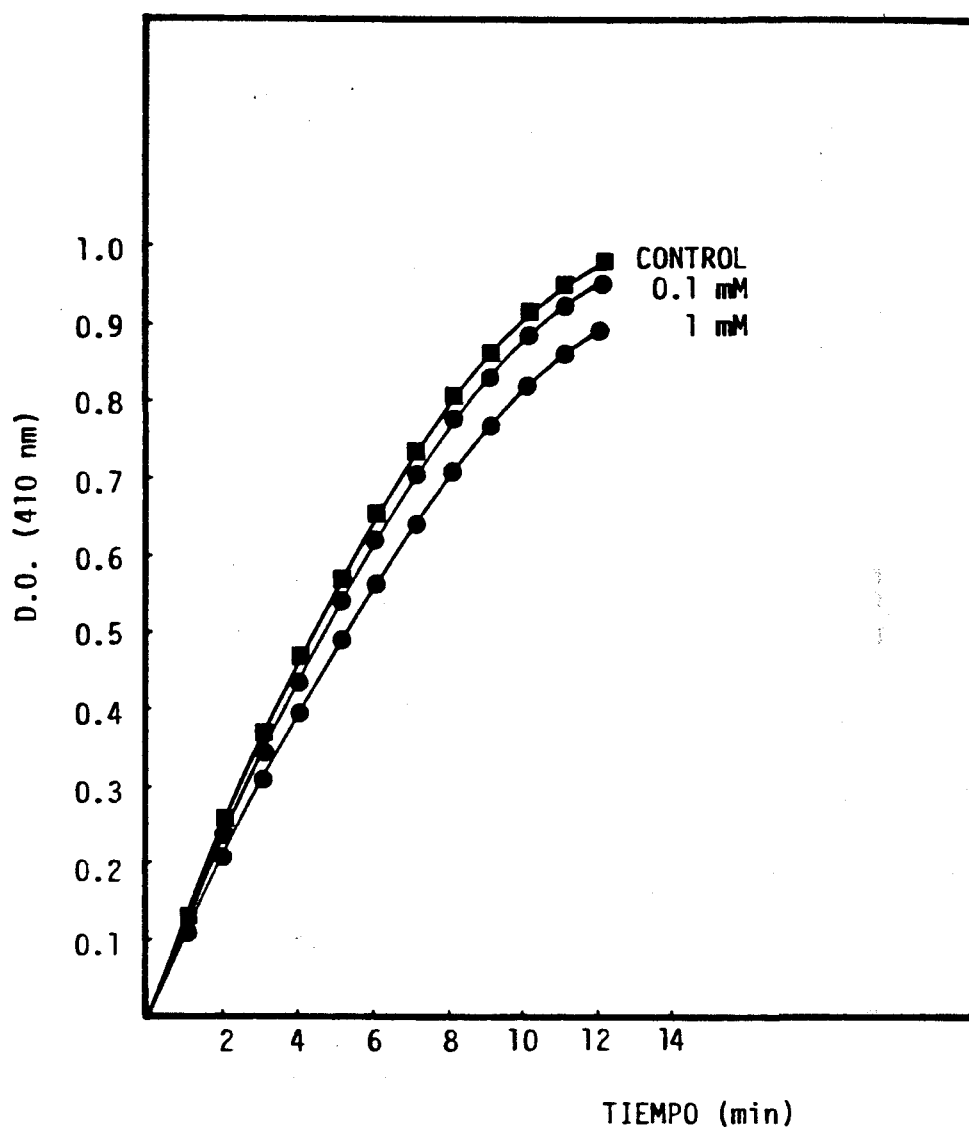


Figura 38.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido salicílico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

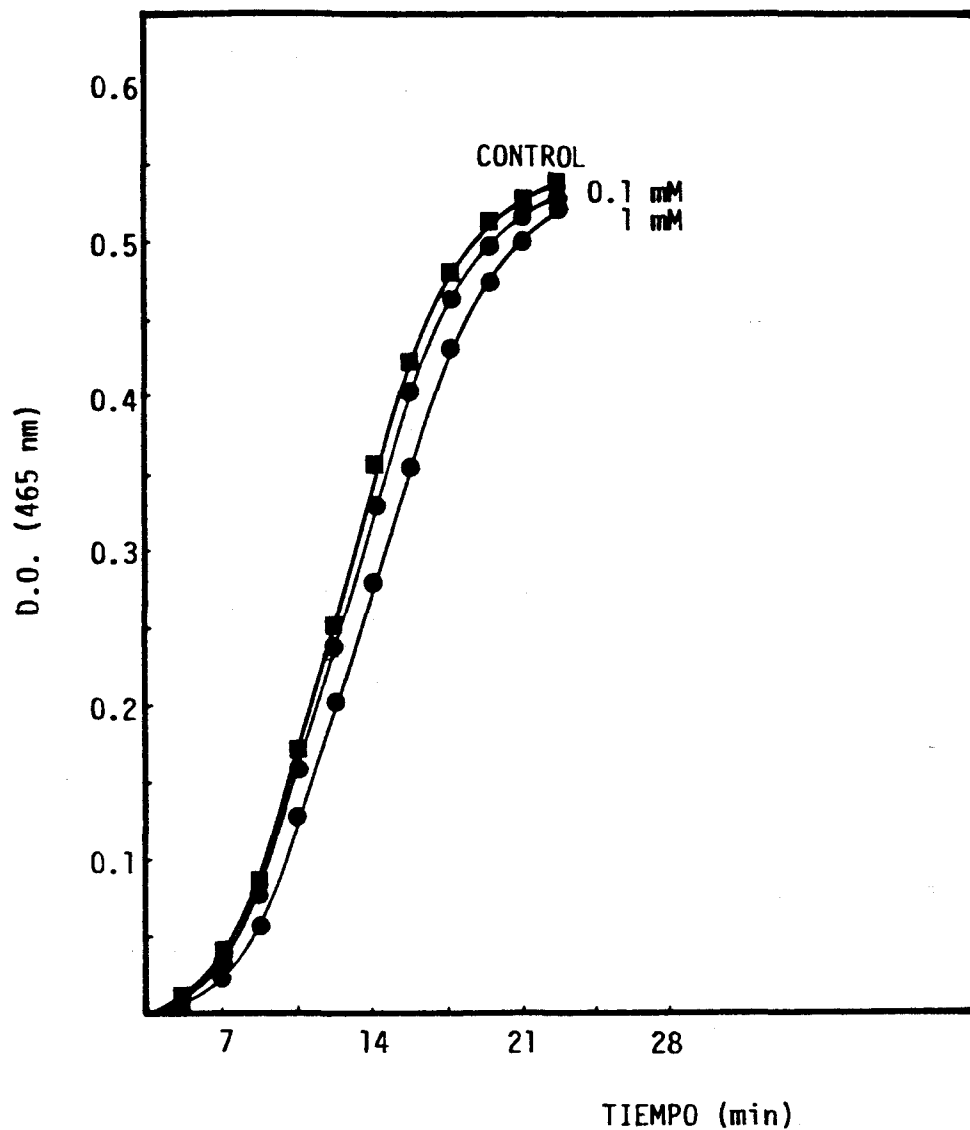


Figura 39.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido salicílico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

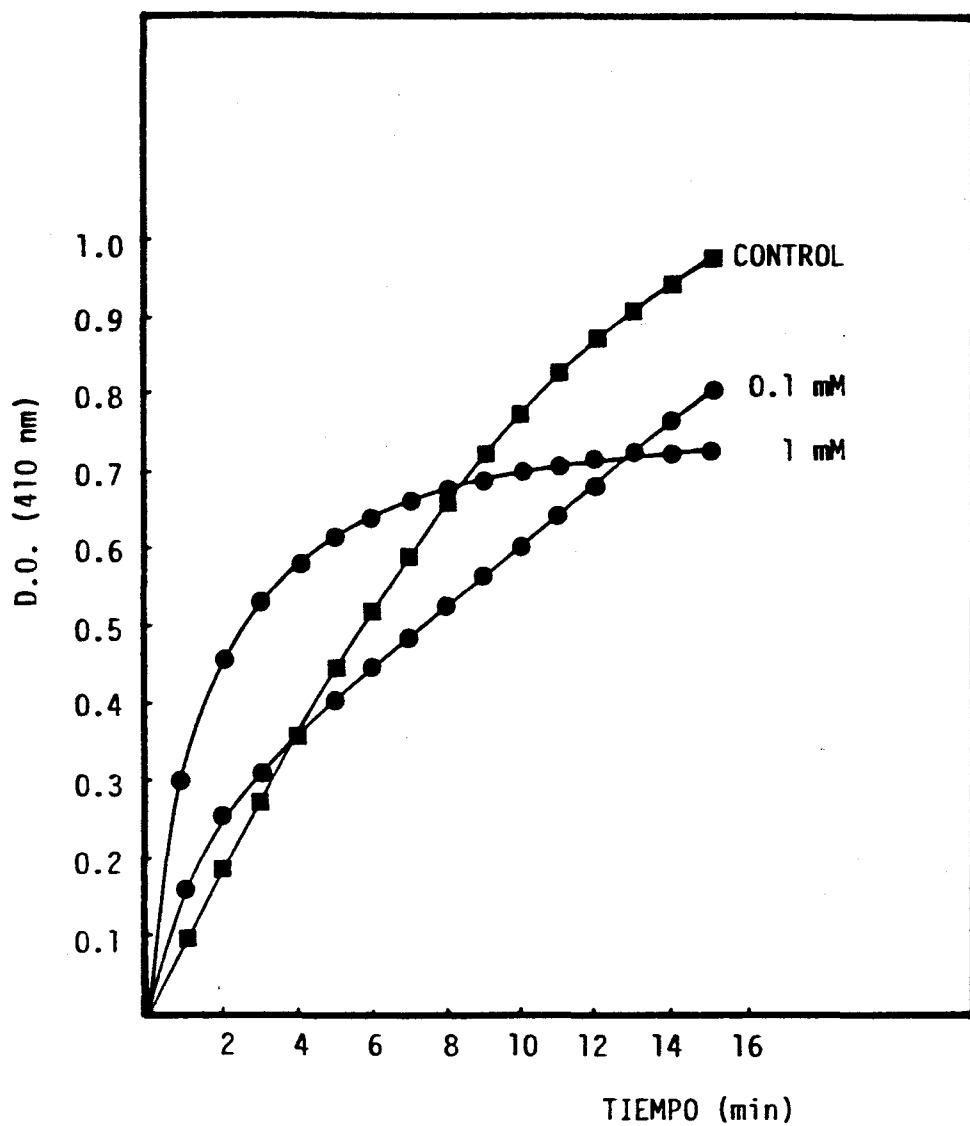


Figura 40.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido ferúlico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

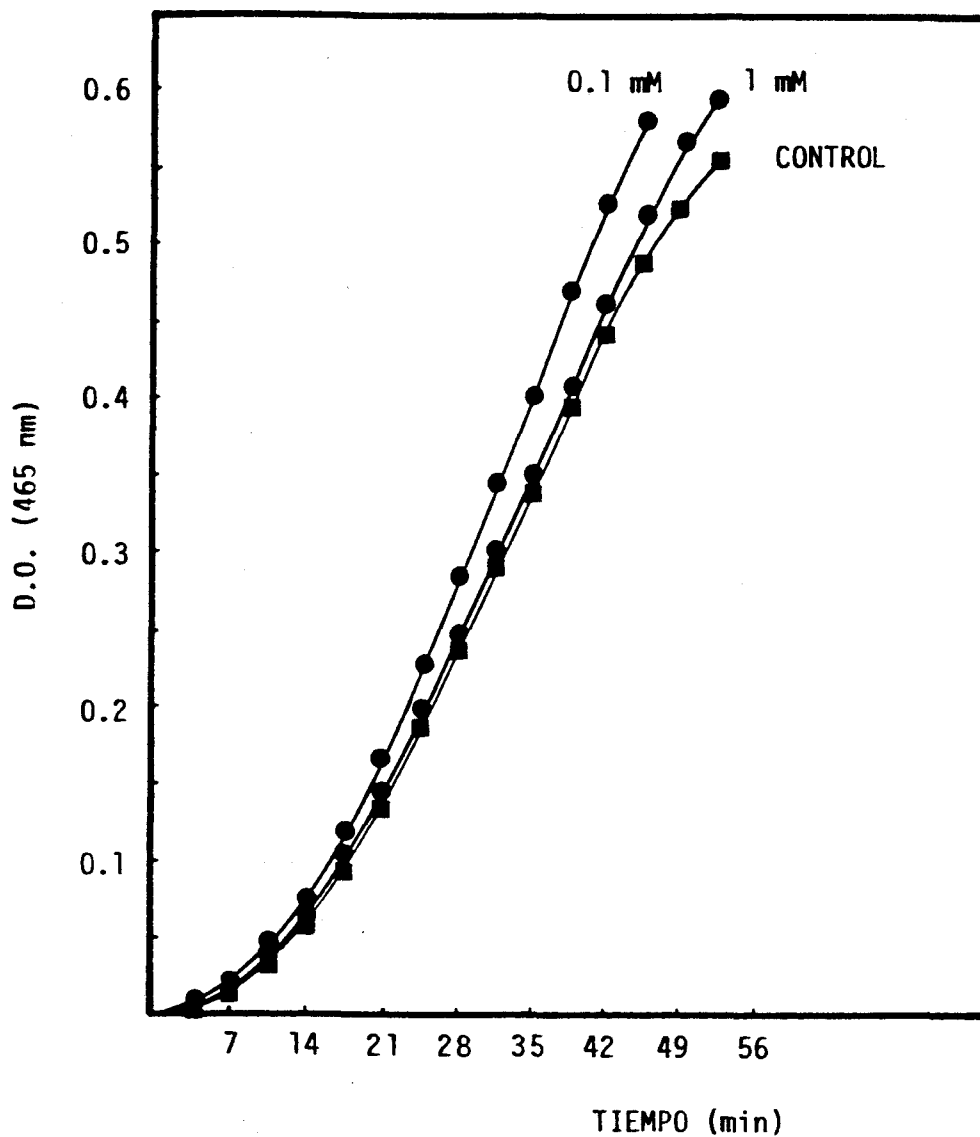


Figura 41.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido ferúlico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determino utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

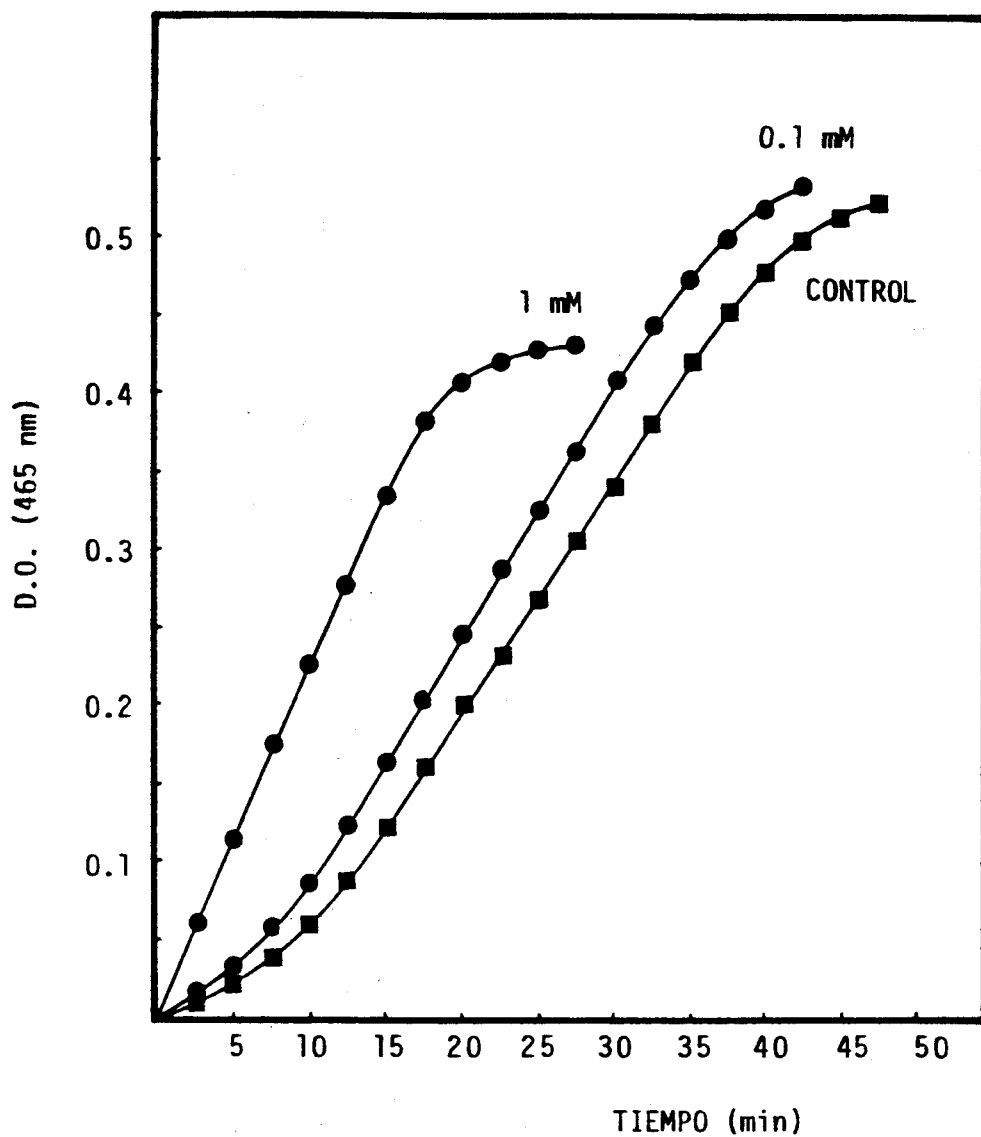


Figura 42.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido protocatecuico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

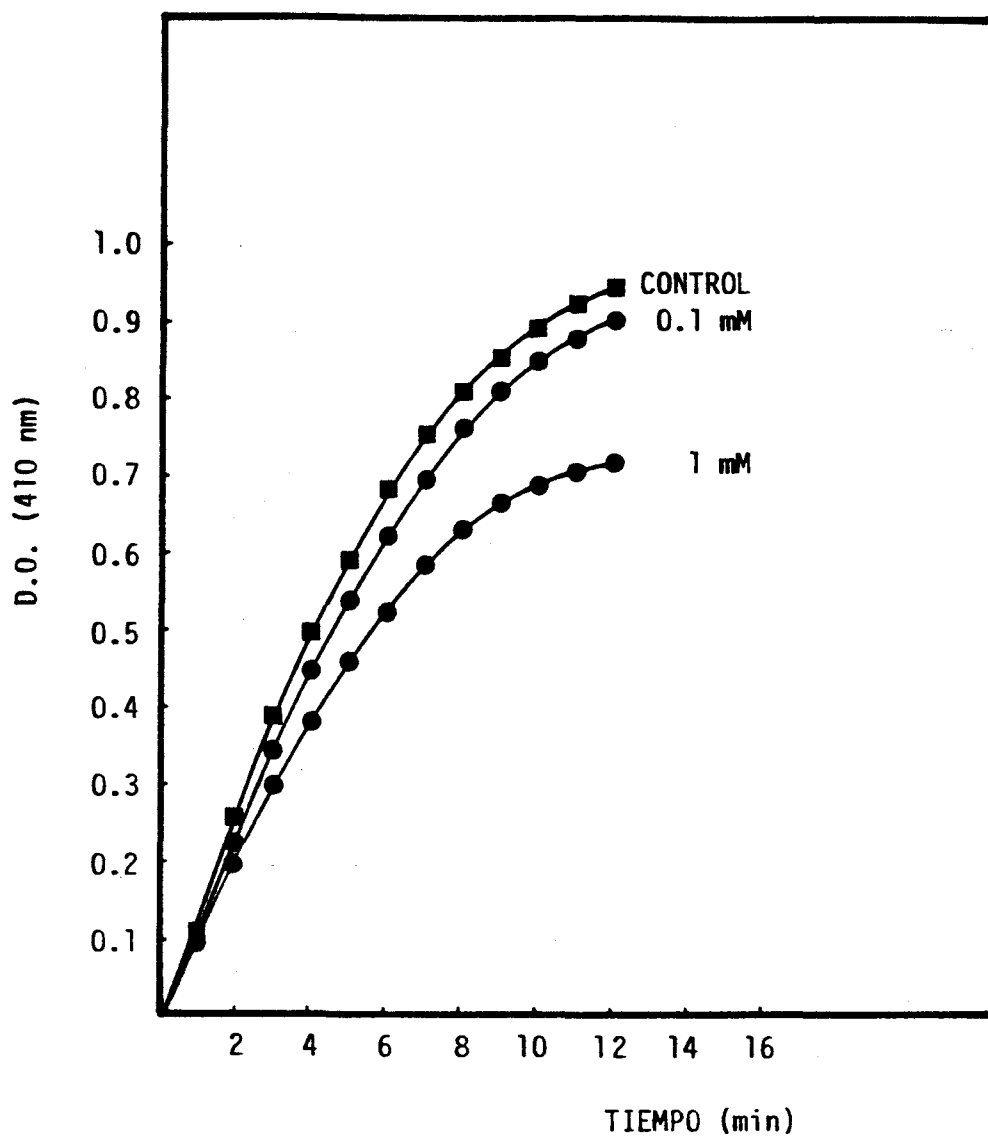


Figura 43.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido siríngico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol-5 mM como sustrato.

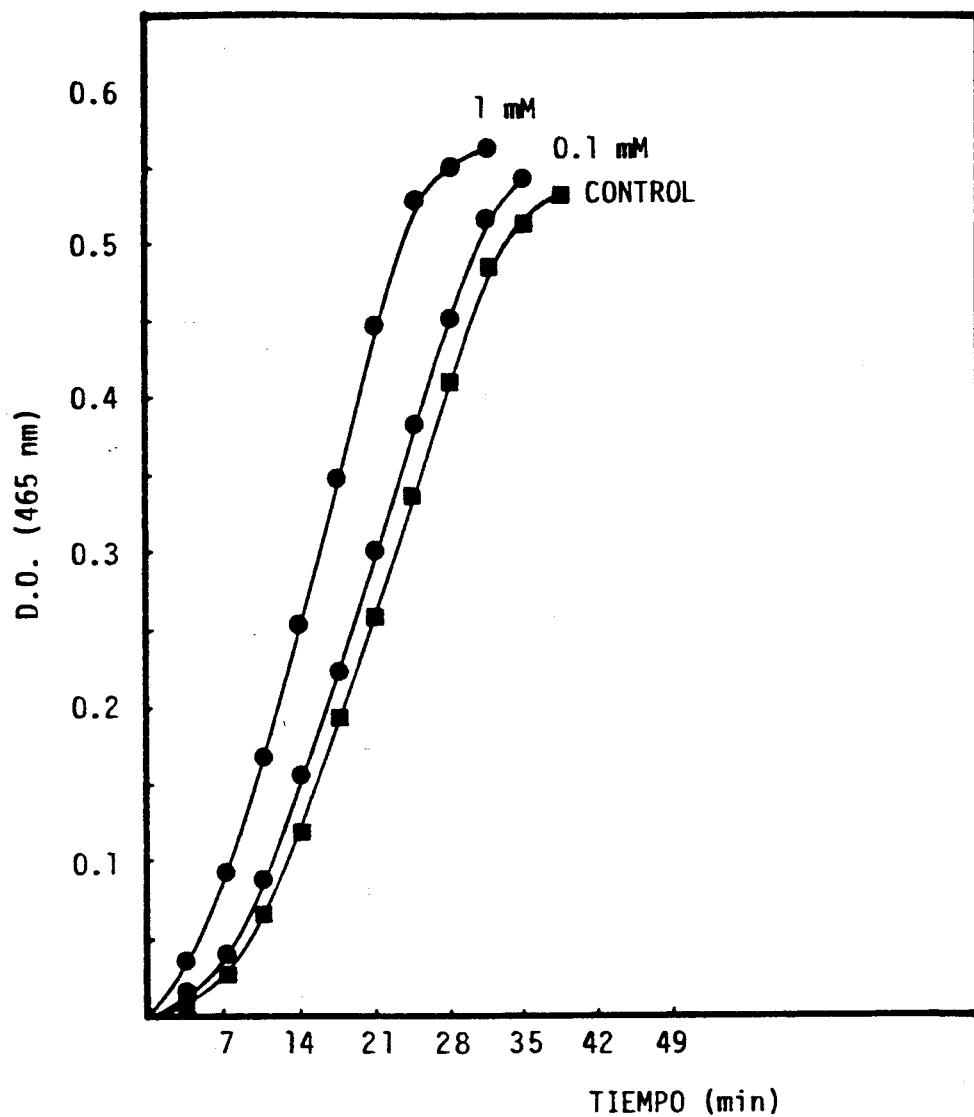


Figura 44.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido siríngico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

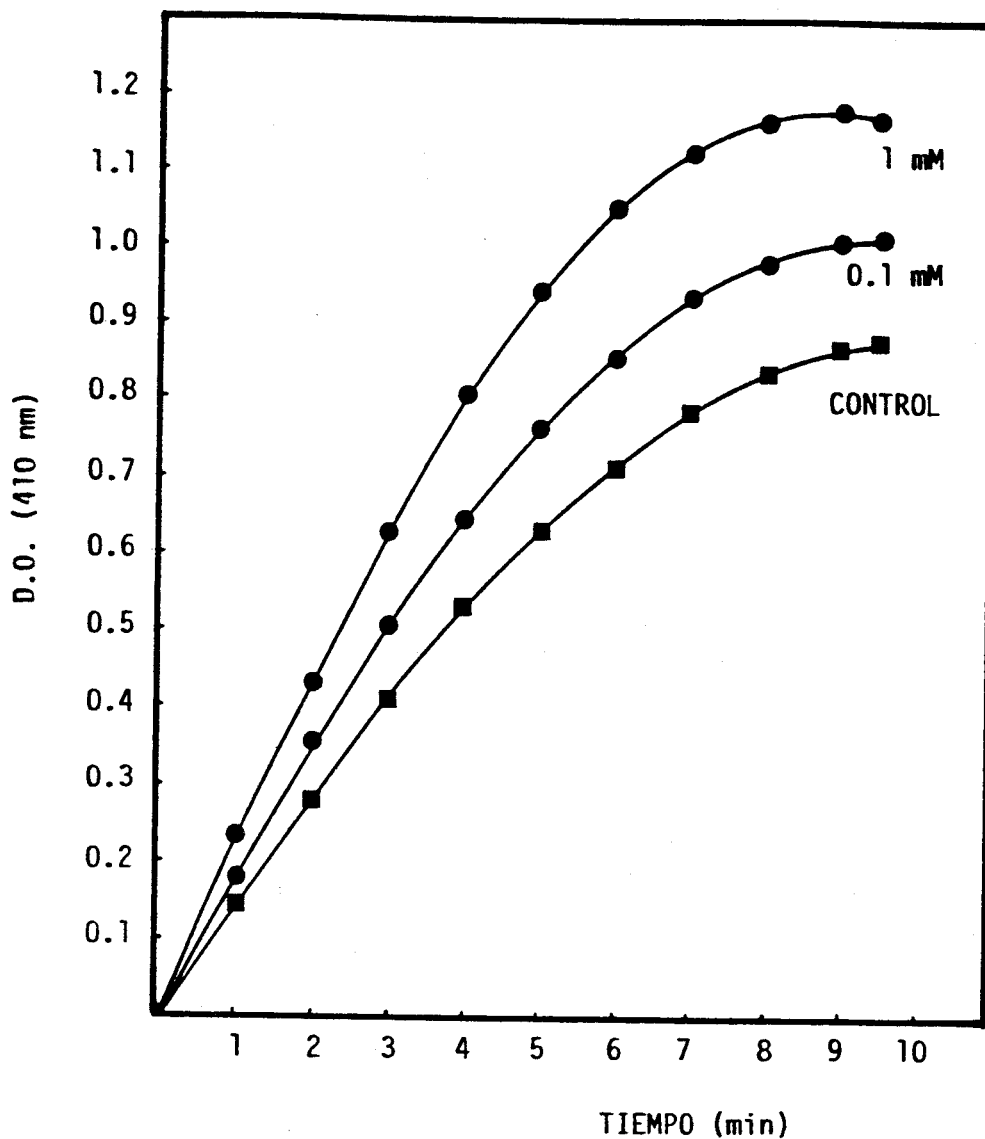


Figura 45.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de orcinol (0.1 mM y 1 mM) sobre al actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

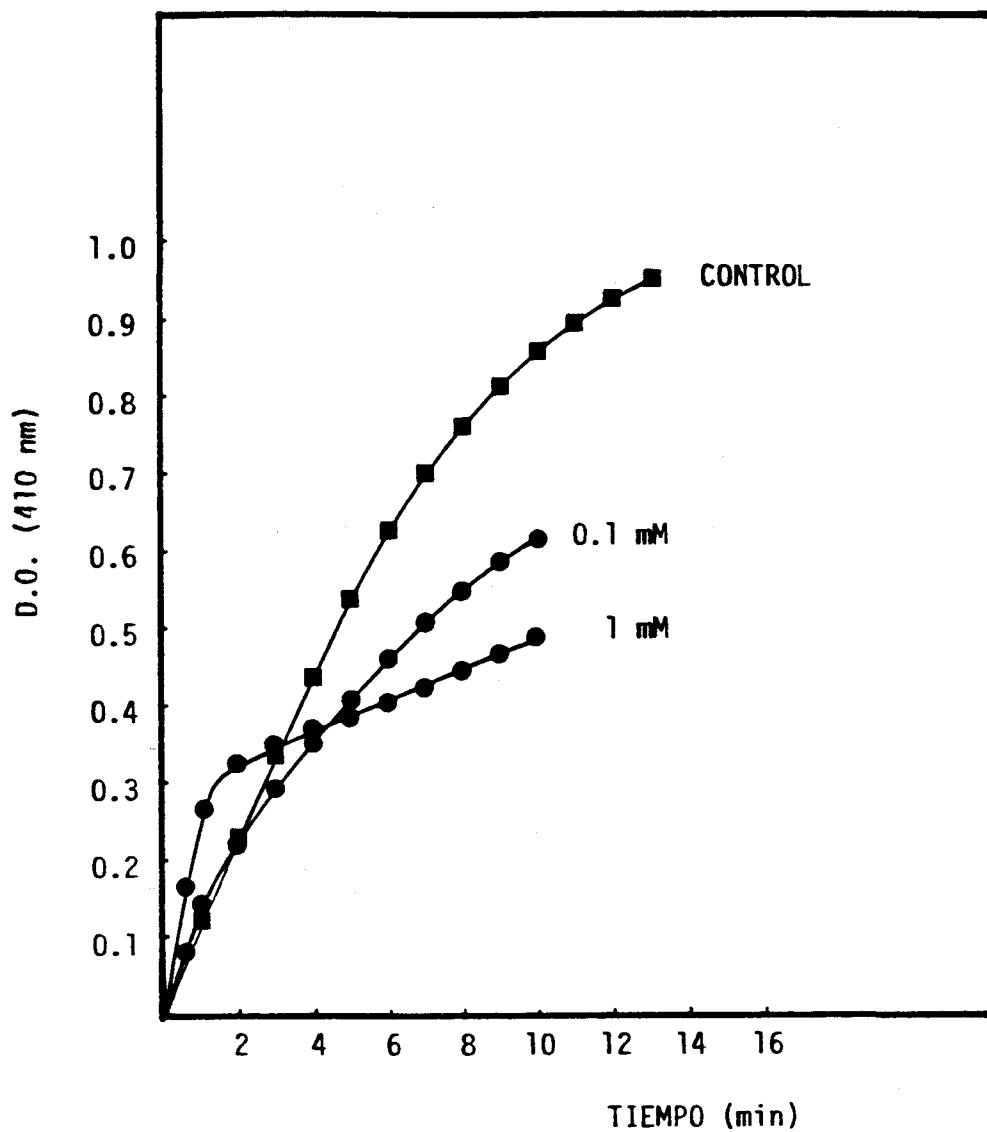


Figura 46.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido cafeico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

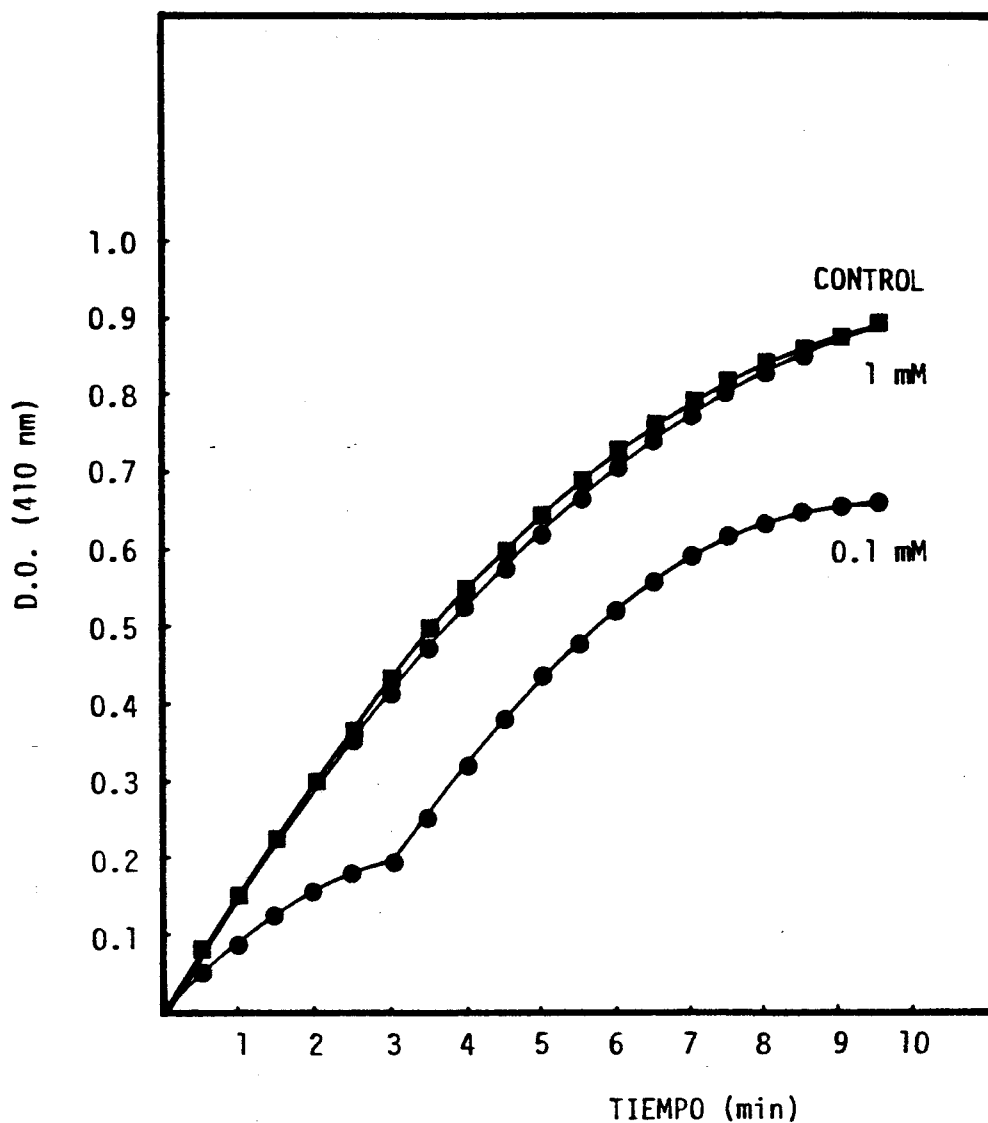


Figura 47.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido tri-OH-benzoico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

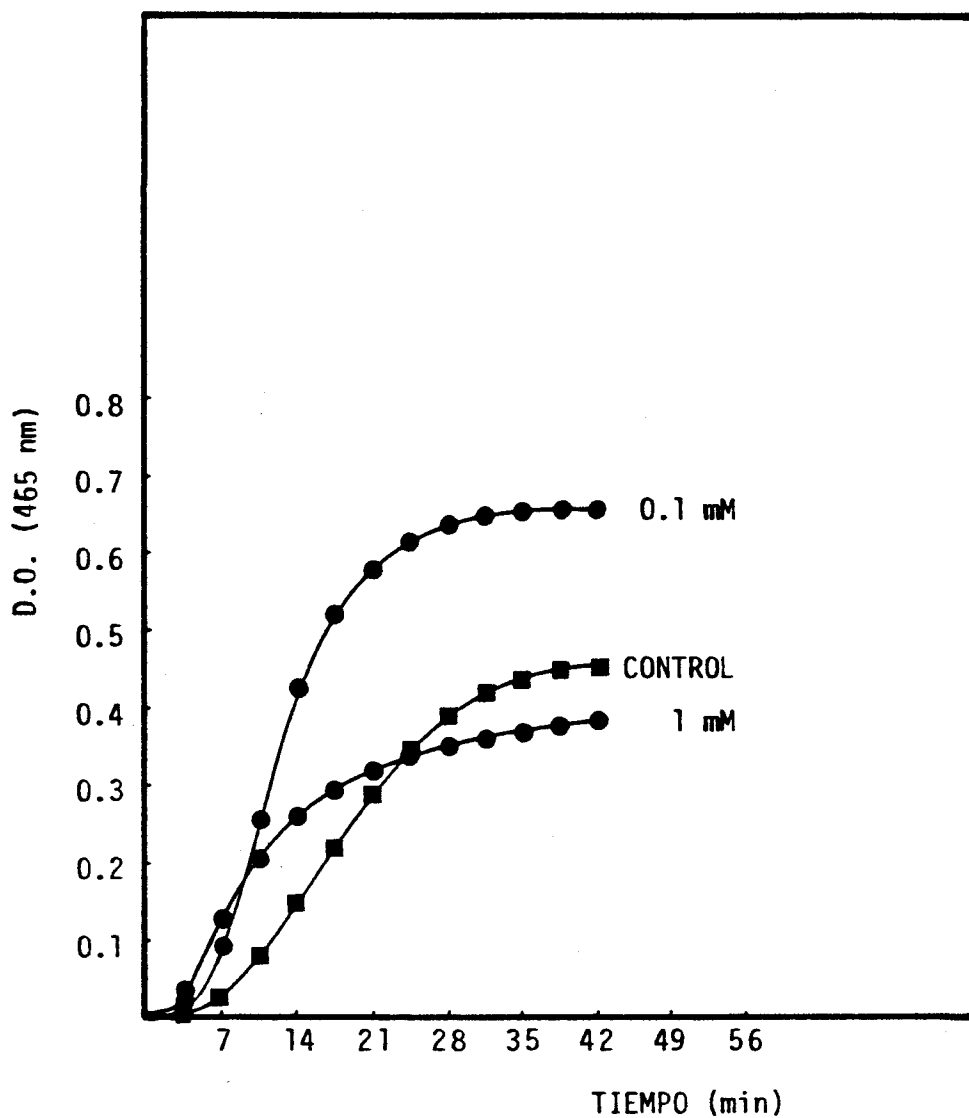


Figura 48.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de ácido tri-OH-benzoico (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

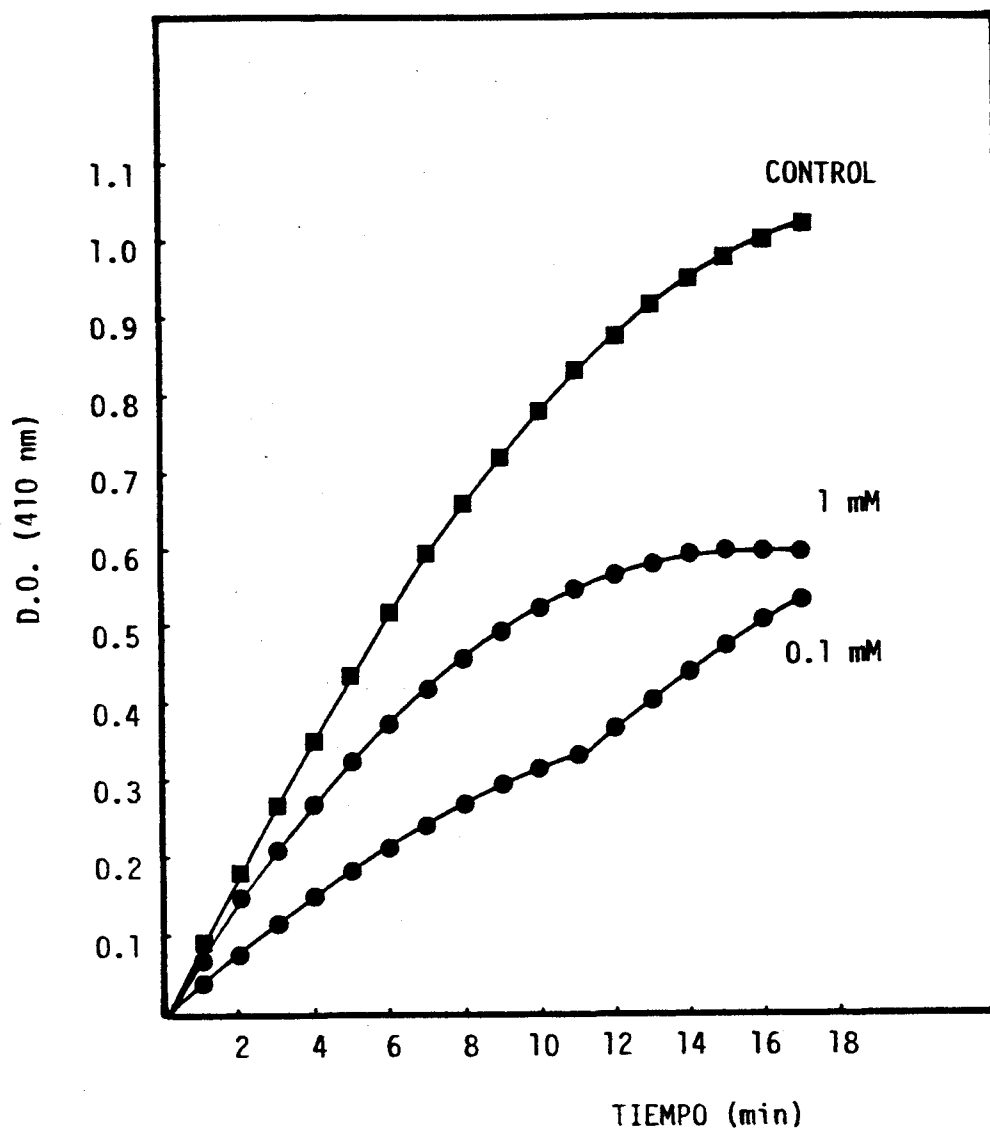


Figura 49.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de pirogalol (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando catecol 5 mM como sustrato.

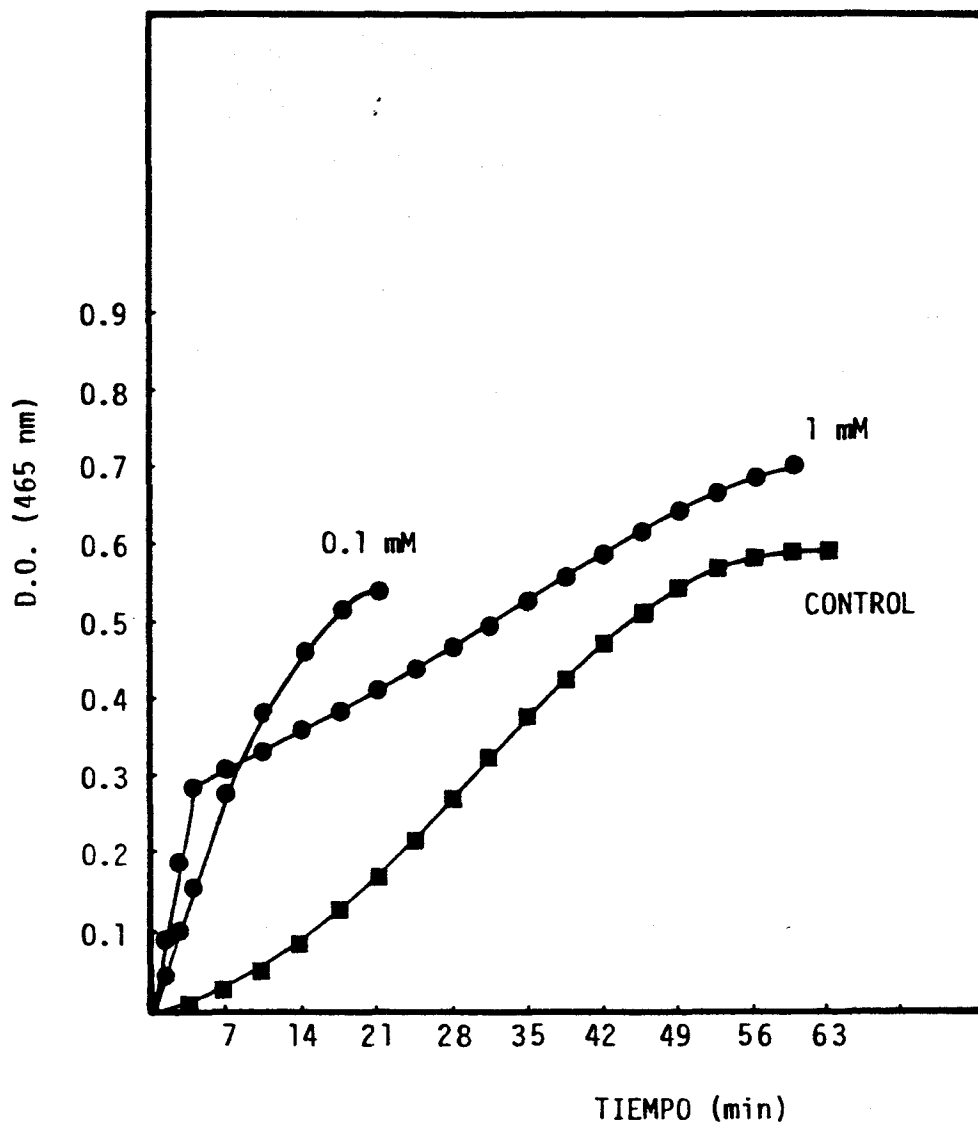


Figura 50.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de pirogalol (0.1 mM y 1 mM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5 mM como sustrato.

Tabla 3.- Constantes de inhibición y activación y velocidades máximas de distintos compuestos fenólicos ensayados en la reacción de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo frente a catecol y tiramina

<u>Activador o inhibidor</u>	<u>SUSTRATO CATECOL</u>					
	Km (M)(x10 ⁻³)			Vm _{max} ($\frac{\Delta D.O.}{P}/min$)		
	0mM	0.1mM	1mM	0mM	0.1mM	1mM
Acido ferúlico	6.66	6.66	6.66	37.0	83.3	166.6
Acido cafeico	20.00	20.00	20.00	100.0	166.6	333.3
Orcinol	16.70	16.70	16.70	90.9	111.1	153.8

<u>Activador o inhibidor</u>	<u>SUSTRATO TIRAMINA</u>					
	Km (M)(x10 ⁻³)			Vm _{max} ($\frac{\Delta D.O.}{P}/min$)		
	0mM	0.1mM	1mM	0mM	0.1mM	1mM
Acido benzoico	4.3	4.5	7.1	0.6	0.6	0.6
Acido siríngico	4.8	4.3	2.8	1.3	1.3	1.3
Acido protocatecuico	2.6	2.6	2.6	0.4	0.4	0.7

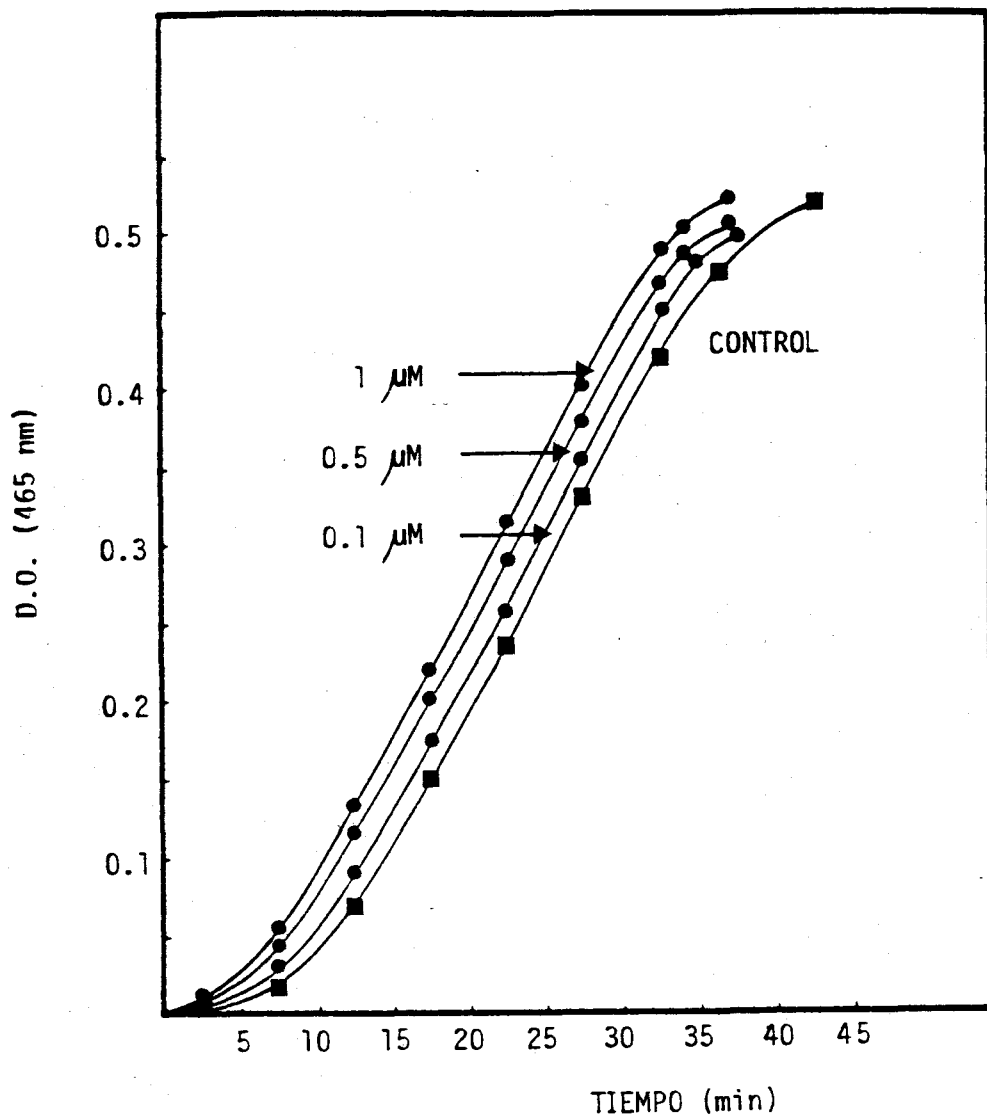


Figura 52.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de dopamina (0.1-1 μM) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5mM como sustrato.

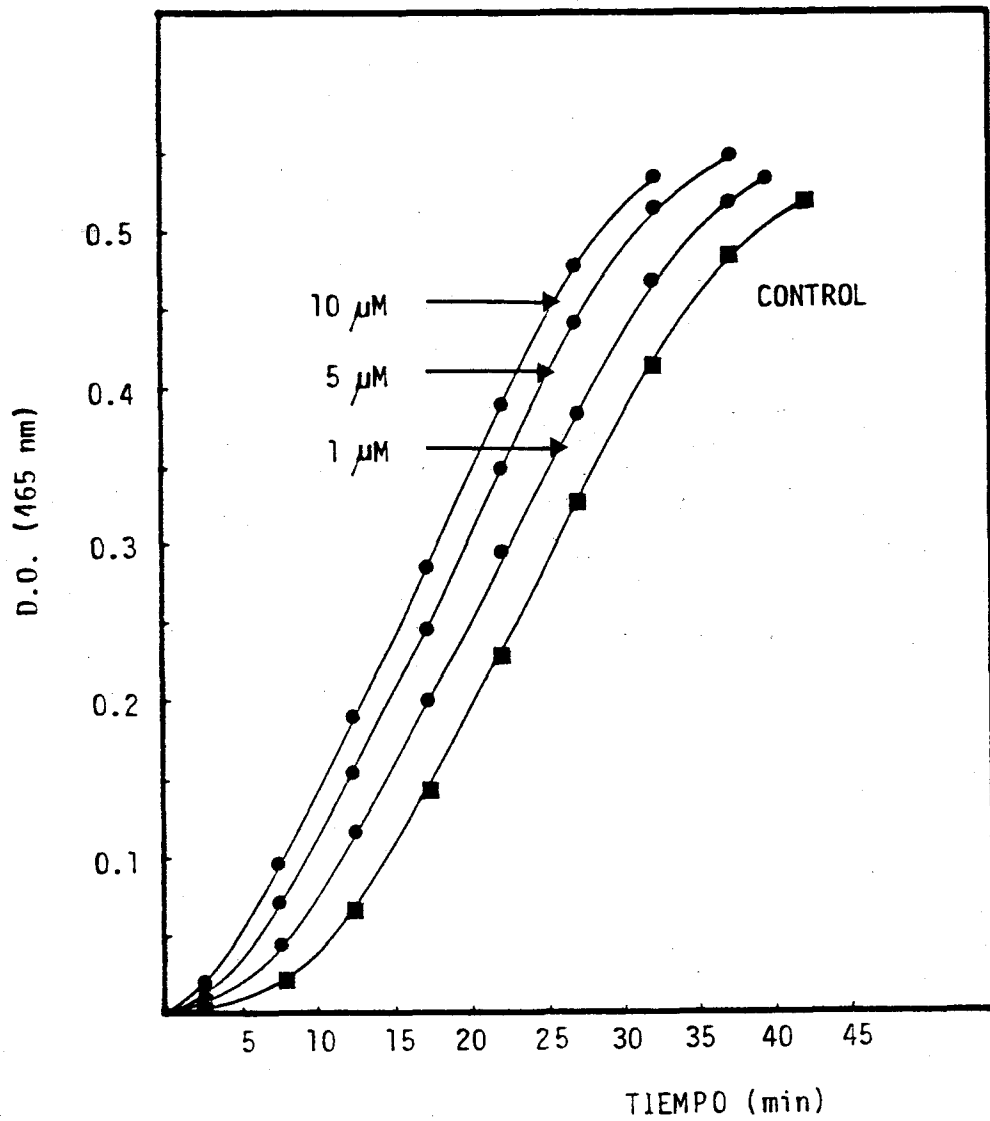


Figura 51.- Influencia de la presencia en el sistema de reacción de diferentes concentraciones de catecol (1-10 μ M) sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo. La actividad enzimática se determinó utilizando tiramina 5mM como sustrato.

3.2.10.- Efecto de la presencia de pequeñas cantidades de difenoles en la actividad de la polifenoloxidasas frente a monofenoles

Como se ha descrito en el apartado 3.2.1. las reacciones de la polifenoloxidasas frente a monofenoles presentan siempre una fase de retardo, hecho que no ocurría en las reacciones frente a difenoles. Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este apartado ha sido determinar la influencia que pequeñas cantidades de difenoles podían ejercer en la reacción de la polifenoloxidasas frente a monofenoles.

La actividad monofenoloxidasas se ha ensayado frente a tiramina en presencia de los difenoles: catecol y 4-metilcatecol en concentraciones 1, 5 y 10 μ M, y DOPA y dopamina en concentraciones 0.1, 0.5 y 1 μ M.

En las figuras 51 y 52 se muestran los resultados obtenidos para la actividad de la polifenoloxidasas frente a tiramina utilizando como difenoles catecol y dopamina.

Los resultados obtenidos empleando DOPA y 4-metilcatecol fueron similares. En cualquier caso, los difenoles reducían las fases de retardo sin modificar las correspondientes velocidades de reacción.

3.3.- Localización intracelular de la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo

Con objeto de completar el estudio sobre la polifenoloxidasas de epicarpio de chirimoyo se ha estudiado su localización preferencial dentro de la célula.

Inicialmente se realizaron una serie de experimen-

tos previos, utilizando diversas técnicas (16,31,56,60,97,98, 99,119,149,154), encaminados a conseguir óptimos métodos de homogenización y fraccionamiento. Como métodos de homogenización de entre cuatro probados en los que se utilizaron respectivamente equipos Potter, Polytron, Waring Blender y Omni-Mixer, resultó más eficaz el empleo del Omni-Mixer utilizado en las condiciones descritas en el apartado 2.2.4.1. de métodos. El resto de los métodos resultaron o demasiado suaves como para romper el tejido del epicarpio de chirimoyo o tan drásticos que destruían los orgánulos celulares, especialmente plastidios y mitocondrias.

En cuanto al método de fraccionamiento, junto al empleo de gradientes de sacarosa de distinta concentración se ensayaron también gradientes de Percoll. Estos últimos no resultaron útiles en el fraccionamiento, puesto que al poseer nuestros extractos una baja actividad enzimática, cuando las diferentes fracciones obtenidas se lavaban para eliminar el Percoll disminuía aún más en ellas la actividad llegando en ocasiones hasta hacerse inaparente.

En la figura 53 se muestran los resultados obtenidos en uno de los fraccionamientos celulares realizados. La polifenoloxidasasa sigue siempre un perfil de actividad paralelo al contenido en clorofila; los dos máximos de actividad polifenoloxidasasa se relacionan con las dos bandas de cloroplastos correspondientes a cloroplastos rotos y a cloroplastos enteros. Se podría pues hablar de una localización preferencial cloroplastídica de la PPO.

Con respecto a la actividad citocromo oxidasa, aún sin conseguirse una perfecta separación de mitocondrias y cloroplastos enteros, se puede observar en la figura 53 que dicha actividad se sitúa en una zona con inapreciable activi-

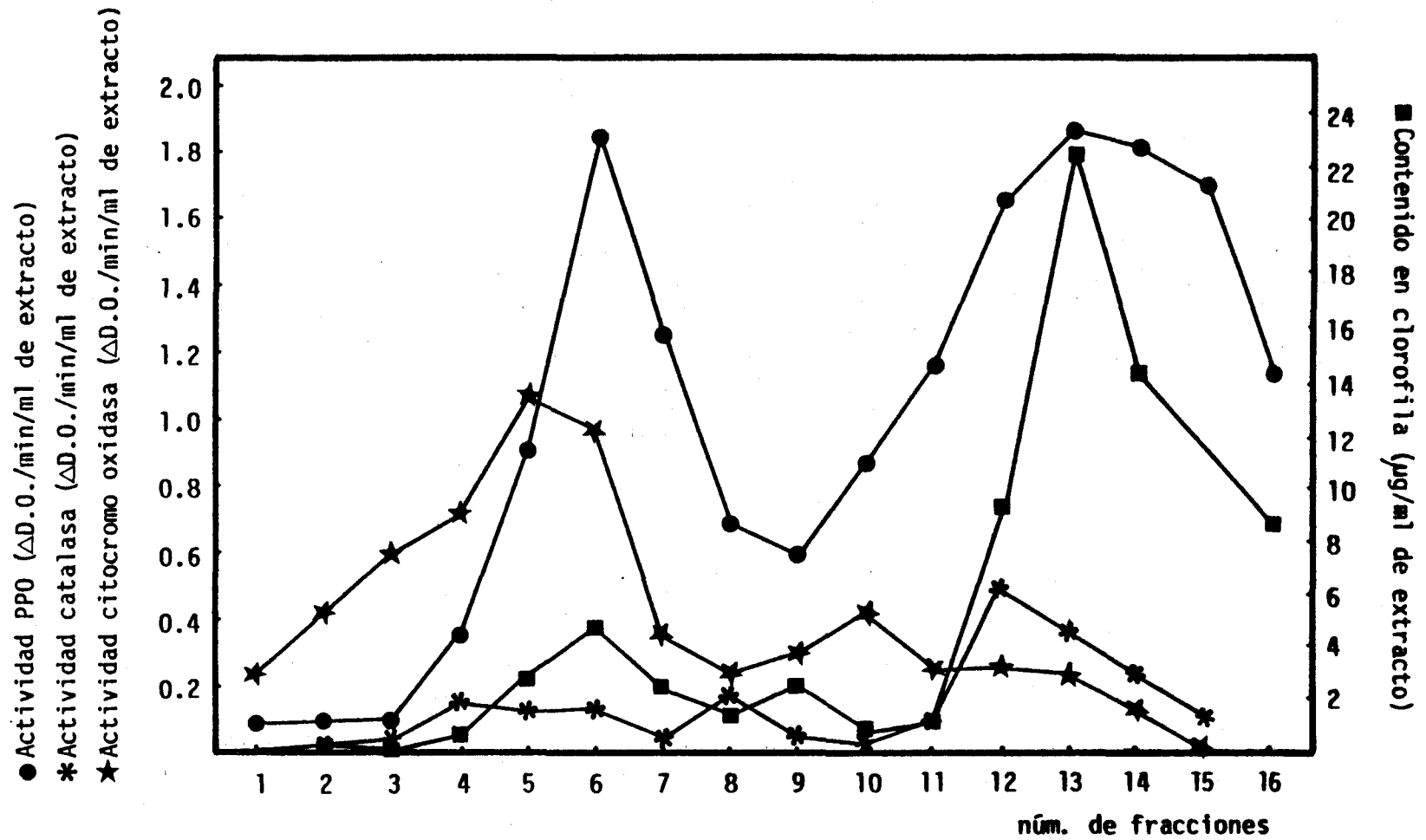


Figura 53.- Distribución de la polifenoloxidasas y de marcadores en un gradiente de sacarosa 24-60% de homogenado de epicarpio de chirimoyo.

dad PPO.

En cuanto a la catalasa hay que señalar que su perfil de actividad aparece solapado al de la PPO correspondiente a la banda de plastidios rotos, de los cuales fué imposible separar los peroxisomas.

Se puede por tanto resumir que la PPO de epicarpio de chirimoyo parece estar localizada en los cloroplastos con los que la curva de actividad PPO muestra un perfil paralelo. El enzima podría estar localizado también a nivel de los peroxisomas y es bastante improbable su localización a nivel mitocondrial.

4.- DISCUSSION

Las polifenoloxidasas son enzimas ampliamente distribuidas en el reino vegetal que catalizan la hidroxilación de monofenoles y la oxidación de o-difenoles hasta o-quinonas, siendo las responsables de la aparición de los fenómenos de pardeamiento en los frutos climatéricos durante las fases de maduración y senectud. Asimismo, las polifenoloxidasas están implicadas en las reacciones de pardeamiento que ocurren en frutos y hortalizas como consecuencia de daños mecánicos o almacenamiento después de su recolección (24).

Estudios previos realizados en nuestro Departamento han demostrado la presencia de polifenoloxidasas tanto en epicarpio como en mesocarpio de chirimoyo (130) estando la actividad de estas enzimas correlacionada con el grado de maduración del fruto (118). Extractos crudos y parcialmente purificados de PPO de chirimoyo catalizaban la conversión de varios difenoles tales como pirocatequina (catecol), dopamina, L-DOPA, 4-metilpirocatequina, (+)catequina y (-)epicatequina pero eran incapaces de oxidar otros sustratos fenólicos como los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico, clorogénico, trihidroxibenzoico (ácido gálico), y resorcinol al menos después de 15 minutos de iniciadas las reacciones por adición del enzima. Dichos extractos aparentemente no presentaban actividad monofenolhidroxilasa (130).

En el presente trabajo hemos determinado las actividades monofenolhidroxilasa y o-difenol oxidasa de extractos enzimáticos de PPO de epicarpio de chirimoyo parcialmente purificados. El método utilizado en este caso para la purificación parcial de la PPO ha consistido en la trituración del tejido en tampón fosfato de elevada concentración, obtención de polvos acetónicos, precipitación con sulfato amónico de los polvos acetónicos redissueltos y pase a través de una columna de cromatografía.

tografía de adsorción conteniendo Sephadex G-200. La utilización de un tampón de elevada concentración permite mantener el medio al pH óptimo de estabilidad de la PPO, aún cuando la ruptura celular libera de las vacuolas celulares una gran cantidad de ácidos orgánicos y de compuestos fenólicos.

La asociación de las PPO a las membranas en muchos tejidos vegetales, a menudo, complica su aislamiento ya que la solubilización, alcanzada usualmente después de la extracción con detergentes o preparación de polvos acetónicos, conduce a modificaciones de la estructura del enzima y de sus propiedades. Así, un fenómeno ampliamente observado es el descenso o pérdida completa de la actividad monofenolhidroxilasa después de la solubilización de la enzima ligada a una membrana (48,49). En nuestro caso, sin embargo, la actividad monofenolhidroxilasa fué detectable, hecho que no ocurrió cuando se utilizaron extractos crudos de PPO o parcialmente purificados por precipitación con sulfato amónico obtenidos por trituración de epicarpio o mesocarpio de chirimoyo en presencia de Tritón X-100 (130).

La obtención de polvos acetónicos a partir de extractos crudos ha supuesto un primer paso en la purificación de la PPO de epicarpio de chirimoyo, ya que la actividad específica del enzima en aquellos resultó ser del orden de 5-7 veces mayor que en los extractos crudos. La purificación parcial del enzima se ha continuado realizando una precipitación con sulfato amónico. En la fracción del precipitado comprendido entre 40-75% de saturación de sulfato amónico se encuentra la mayor parte de la actividad PPO, aproximadamente 45% de la actividad inicial, referida a la de los polvos acetónicos redisueltos. El factor de purificación con respecto a la actividad PPO de estos últimos es aproximadamente de 2.

La precipitación con sulfato amónico de una gran

parte de las proteínas inactivas ha permitido separar la PPO de una peroxidasa presente en el epicarpio del fruto. Esta última enzima precipita con 90% de saturación de sulfato amónico. Las peroxidasas catalizan, en presencia de niveles muy pequeños de peróxido de hidrógeno, la formación de quinonas a partir de compuestos fenólicos, interfiriendo en la determinación de actividad PPO por vía espectrofotométrica (165).

El pase a través de Sephadex G-200 de las fracciones activas de PPO redisueltas, dializadas y obtenidas por precipitación con sulfato amónico hace aumentar el grado de purificación del enzima del orden de 10 veces con respecto a la actividad de la PPO de los polvos acetónicos sin apenas sufrir pérdida en el rendimiento. Esta es la razón por la que la PPO de epicarpio de chirimoyo parcialmente purificada de esta forma, ha sido utilizada rutinariamente para determinar las cinéticas de reacción del enzima frente a diversos sustratos, activadores e inhibidores. Además, mediante la cromatografía por filtración de gel se obtiene el enzima con peso molecular homogéneo.

Investigaciones en curso realizadas en nuestro Departamento han establecido que la PPO de epicarpio de chirimoyo es una enzima de peso molecular aproximado de 160000, constituida por cuatro subunidades de peso molecular aproximado de 40000 y que presenta multiplicidad isoenzimática (129).

Los procedimientos habitualmente utilizados para la purificación de las PPO incluyen eliminación de las proteínas inactivas por precipitación con sulfato amónico, sulfato de protamina o acetato cálcico y fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico a través de DEAE-celulosa o hidroxapatito, y filtración por gel; también se han utilizado técnicas de electroenfoque y cromatografía de afinidad que han tenido tan sólo un éxito limitado a causa de cambios de afinidad de los ligandos

fenólicos por el enzima y a la oxidación de éstos durante las operaciones de preparación de la columna (95,165).

La determinación de la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo se ha llevado a cabo monitorizando espectrofotométricamente entre 410 y 480 nm la proporción de formación inicial de quinonas y sus polímeros a partir de diversos compuestos fenólicos. Este ensayo únicamente permite medir actividades relativas ya que sólo es lineal durante un periodo de tiempo corto debido a que las sustancias fenólicas oxidadas participan en numerosas reacciones secundarias entre ellas mismas y con las proteínas, incluida la PPO a la que terminan por inactivar.

Se ha descrito que pueden ocurrir diferentes reacciones de carácter no enzimático entre ortoquinonas y grupos amino y tiólicos presentes en las proteínas. En estudios llevados a cabo con compuestos fenólicos marcados y tirosinasa de champiñón, Wood e Ingraham han obtenido evidencias de que la inactivación de la PPO es el resultado de la reacción de un grupo nucleofílico y de una ortoquinona en la vecindad del centro activo del enzima (175).

Para comprender las implicaciones fisiológicas de un enzima es necesario poder distinguir en el ensayo utilizado la actividad de la enzima medida de la del resto de las enzimas presentes en el medio. Desgraciadamente, en numerosos estudios relacionados con las PPO no se han separado las actividades de dichas enzimas de las causadas por las peroxidasas (165).

Otro método utilizado usualmente para la determinación de actividad PPO es la medida de la captación de O_2 mediante polarografía en presencia de un sustrato fenólico (38). Aunque este ensayo es lineal, generalmente, durante un periodo más largo que en el método espectrofotométrico, sin embargo, es aún corto debido a la inactivación de la PPO por los compues-

tos quinónicos formados. Por otra parte, este ensayo no es específico para extractos crudos y la proporción de oxígeno consumido a sustrato oxidado cambia con el tiempo de reacción y depende, en una gran medida, del tipo de tampón utilizado y de la concentración de sustrato (95). Un problema común a todos los ensayos de PPO es la baja afinidad del enzima por el O_2 (38,95) por lo que para determinar $V_{m\acute{a}x}$ verdaderas se necesita utilizar soluciones de sustrato bien aireadas.

La PPO de epicarpio de chirimoyo presenta dos actividades catalíticas distintas, es capaz de hidroxilar monofenoles tales como tirosina, tiramina y p-cresol hasta sus correspondientes difenoles y, asimismo, oxida o-dihidroxifenoles como catecol y DOPA hasta o-quinona y dopacromo. La actividad monofenolhidroxilasa es sensiblemente inferior a la actividad ortodifenoloxidasas, por lo que la primera reacción es la limitante en el proceso de oxidación de monofenoles por la PPO de epicarpio de chirimoyo.

La hidroxilación de los tres monofenoles ensayados por la PPO de epicarpio de chirimoyo se caracterizó por tres fases consecutivas: a) una fase de retardo de la oxidación o periodo "lag", b) una fase de hidroxilación relativamente constante y c) una fase de cese de la reacción. El periodo de retardo se puede demostrar utilizando pequeñas cantidades de enzima. La longitud de dicho periodo es inversamente proporcional a la concentración de enzima para cualquiera de los sustratos ensayados. La actividad en la fase de hidroxilación constante es directamente proporcional a la concentración de proteína utilizada en la reacción, al menos hasta $100\mu g$ de proteína. Esto se debe probablemente a una mayor concentración de reductores endógenos presentes a mayor concentración de proteína.

La fase de retardo fué menor para la hidroxilación

de la tiramina que para las de p-cresol y tirosina. Por el contrario, las velocidades de reacción fueron significativamente más elevadas para tiramina y p-cresol que para tirosina.

En la oxidación de difenoles catalizada por la PPO de epicarpio de chirimoyo se evidenció una fase de oxidación constante y una fase de inactivación del enzima pero no fué demostrable fase de retardo alguna. Este hecho es conocido que ocurre con PPO de muy diferentes orígenes (68,95,165).

La fase de retardo en la hidroxilación de los monofenoles puede ser acortada por la adición de agentes reductores que actúan como cosustratos (68). Nuestros datos muestran que varios ortodifenoles tales como catecol, 4-metil-catecol, DOPA dopamina, (+)catequina y (-)epicatequina, que son sustratos de la PPO de chirimoyo, cuando se adicionan en pequeñas concentraciones a los monofenoles provocan que la fase de retardo de la hidroxilación se acorte sin modificación en la velocidad de reacción de la fase de hidroxilación constante. Otros ortodifenoles que no son oxidados por la PPO de epicarpio de chirimoyo, tales como ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido protocatecuico, también hacen acortar la fase de retardo en la oxidación de la tiramina.

EL ácido ascórbico, a concentraciones de 0.1-0.2mM acorta la fase de retardo en la hidroxilación de la tiramina por PPO de epicarpio de chirimoyo aumentando la velocidad de la reacción.

Teóricamente la hidroxilación de un monofenol por la PPO requiere la presencia de una cierta cantidad de un agente reductor. Los o-difenoles generados durante la hidroxilación aparentemente son los causantes de que la reacción de hidroxilación sea autocatalítica. Así, la velocidad de hidroxilación de la tiramina en ausencia de un agente reductor es prácticamen-

te similar a la alcanzada con la adición de un dador electrónico de tipo difenólico. La efectividad del ascorbato como cofactor en la hidroxilación de la tiramina por la PPO de epicarpio de chirimoyo es muy probable que se deba en parte a su capacidad de actuar como un agente reductor pero también a su capacidad de reducir el dopaminocromo hasta dopamina de forma no enzimática, incrementando así el "pool" de compuesto difenólico en la reacción mezcla. La reducción de los compuestos quinónicos se ve corroborada por el hecho de que a concentraciones superiores a 0.3mM el ácido ascórbico inhibe la formación de color en la oxidación no sólo de la tiramina sino también del catecol.

Neumann y col. (104) han mostrado que el periodo de retardo de la tirosinasa de patata era eliminado por la presencia de ácido ascórbico $3\mu\text{M}$ mientras que se mantenía en presencia de ascórbico 3mM, sin embargo, Kahn y Pomerantz (68) han establecido que DOPA y ascorbato se comportan de forma similar acortando la fase de retardo en la hidroxilación de monofenoles por la PPO de aguacate a concentraciones de 0.2mM. Esta última enzima tendría, por consiguiente, un comportamiento similar al encontrado por nosotros para la PPO de epicarpio de chirimoyo.

Vaughan y Butt (159) han demostrado con la PPO de hojas de espinaca que el periodo de retardo de la hidroxilación del ácido p-cumárico puede ser acortado con NADH, dimetiltetrahydropterina, ácido protocatecuico, catecol, 4-metil-catecol y DOPA. Asimismo, el periodo de retardo en la hidroxilación de p-cresol y ácido p-cumárico por PPO de champiñón puede ser eliminado por la presencia de los correspondientes dihidroxifenoles, 4-metil-catecol y ácido cafeico, respectivamente (68).

La presencia de compuestos tiólicos de carácter reductor (cisteína y mercaptoetanol) en la cubeta de reacción hacían aumentar la fase de retardo en la hidroxilación de la

tiramina por la PPO de epicarpio de chirimoyo sin modificar la velocidad de reacción en la fase de hidroxilación constante. Cisteína y mercaptoetanol no parecen ser cosustratos adecuados en la hidroxilación de monofenoles por la PPO de chirimoyo. El aumento de la fase de retardo debe atribuirse a la reducción de los compuestos fenólicos formados en la reacción oxidativa de los o-difenoles por lo que se impide la formación de compuestos coloreados. Esta interpretación resulta lógica si se tiene en cuenta que cisteína y mercaptoetanol, en concentraciones 0.1-1mM, inhiben directamente la formación de ortoquinona a partir de catecol por la PPO de epicarpio de chirimoyo. La reacción directa entre compuestos quinónicos y tiólicos podría ser también causante, en parte, del aumento de la fase de retardo en la hidroxilación de monofenoles e inhibición de la formación de color en la oxidación de los difenoles.

Goldhirsh y Whitaker (37) han descrito que las quinonas y los compuestos tiólicos reaccionan dando lugar a compuestos de adición no coloreados. Estos autores han mostrado, asimismo, que ácido ascórbico, bisulfito sódico, glutation reducido y ditiotreitól aumentan el periodo de retraso en la oxidación de catecol por la PPO de champiñón. La efectividad de estos agentes reductores para inhibir el comienzo de la aparición de color a 390nm fué en este orden: ditiotreitól, bisulfito sódico, glutation y ascorbato.

En el caso de la PPO de epicarpio de chirimoyo la mayor efectividad para inhibir la aparición de compuestos coloreados en la oxidación del catecol se obtuvo con mercaptoetanol, seguido de cisteína y ácido ascórbico.

La monofenolasa de epicarpio de chirimoyo es probablemente inactivada en una gran proporción por los productos formados en la reacción. Esta hipótesis está soportada por el

hecho de que el ascorbato, incluso a elevadas concentraciones, no puede eliminar la inhibición del enzima, probablemente por que este compuesto reacciona sólo con las quinonas libres y no tiene efecto sobre el complejo proteína-quinona formado durante el transcurso de la reacción (175). Así la PPO en presencia de un sustrato y de exceso de un agente reductor puede catalizar la oxidación de compuestos fenólicos sin formación de color hasta que es completa e irreversiblemente inactivada.

Los efectos del ácido ascórbico y de otros agentes reductores sobre las PPO son actualmente muy controvertidos. Dichos efectos están siendo estudiados porque tales compuestos se utilizan en el procesado de alimentos y por sus posibles efectos en la limitación del pardeamiento enzimático de los frutos (37,68,175).

Se ha descrito que la incubación de la PPO de champiñón con ácido ascórbico o con ditiotreitól o glutatión, en ausencia de sustrato, causa la pérdida total de la actividad enzimática en un tiempo de 3-4 horas, sugiriéndose que al menos parte de la inactivación puede deberse a la reducción de una o más puentes disulfuro necesarios para mantener su actividad (68). Otros autores, sin embargo, sugieren que el ácido ascórbico no tiene ningún efecto sobre la actividad de la PPO (158).

Cisteína y mercaptoetanol, muy especialmente el primero, ejercen un gran efecto estabilizador sobre la PPO de epicarpio de chirimoyo. Por el contrario, la incubación del enzima en presencia de ácido ascórbico conduce a su inactivación.

La actividad monofenolasa residual del enzima incubado en presencia de cisteína durante 7 días fué del 40%, frente a tan sólo 7% de actividad residual en el control. Por otra parte, la actividad ortodifenol oxidasa residual de la PPO fué del 62%, en presencia de cisteína, frente a 12% en el control.

Estos resultados parecen indicar que para que ambas actividades se mantengan, la PPO de epicarpio de chirimoyo necesita mantener uno o más de sus grupos tiólicos en forma reducida y que tales grupos deben ser constituyentes esenciales de los centros activos del enzima.

Trabajos previos realizados en nuestro Departamento han mostrado una elevada correlación entre potencial de pardeamiento y actividad específica y total de la PPO de epicarpio de chirimoyo (118). Sin embargo, los cambios en el potencial de pardeamiento de este fruto durante el almacenamiento en diversas condiciones atmosféricas y a bajas temperaturas no sólo se correlacionan con la actividad PPO sino también con la actividad específica de catalasa (118).

Bajo condiciones aeróbicas los tejidos vivos forman radicales libres de oxígeno, los cuales son inestables y fácilmente convertidos hasta peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (69). El H_2O_2 es continuamente producido por enzimas tales como ascórbico oxidasa, glucosa oxidasa, uricasa, β -hidroxiácido oxidasa, flavoprotein oxidasas, por autooxidación del ácido ascórbico y metales de transición, por dismutación del anión superóxido (O_2^-), espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa, o por interacción del anión superóxido con ascorbato, compuestos tiólicos y compuestos fenólicos (69). Elevadas concentraciones de H_2O_2 son tóxicas para las células por lo que éstas han desarrollado mecanismos para protegerse contra su potencial toxicidad. Así el H_2O_2 puede ser descompuesto enzimáticamente por la acción de la catalasa, peroxidasa o glutatión peroxidasa, por interacción con iones metálicos (Fe^{++} , Cu^+), o por interacción con el ión superóxido (168).

La catalasa es un enzima que descompone el H_2O_2 y que al parecer tiene dos misiones en las plantas: disponer

del exceso de H_2O_2 producido durante el metabolismo oxidativo y utilizar el H_2O_2 en la oxidación de alcoholes, compuestos fenólicos y otros dadores electrónicos (69). Así el H_2O_2 es un factor adicional que puede contribuir al pardeamiento de los tejidos vegetales.

El H_2O_2 , a concentraciones relativamente bajas, se ha establecido que acorta el periodo de retardo en la hidroxilación de monofenoles por la tirosinasa de champiñón, tirosinasa de Neurospora, PPO de espinaca y PPO de aguacate (69,161).

El H_2O_2 no acorta la fase de retardo en la hidroxilación de la tiramina por PPO de epicarpio de chirimoyo, sin embargo, a bajas concentraciones (0.5-3mM) provoca una mayor formación de dopaminocromo. A concentraciones más elevadas (40-320mM) se produce un efecto de blanqueamiento de las melaninas previamente formadas durante el transcurso de la reacción. De forma similar, concentraciones relativamente bajas de H_2O_2 (0.5-40mM) provocan una mayor formación de dopacromo a partir de DOPA por PPO de chirimoyo, produciéndose un efecto de blanqueamiento del dopacromo y melaninas formadas a mayores concentraciones. Sin embargo, la formación de o-quinona y sus compuestos poliméricos en presencia de H_2O_2 a partir de catecol, cualesquiera que sea su concentración, está inhibida. El H_2O_2 a bajas concentraciones inhibiría la polimerización de o-quinona (incolora) hasta melaninas. Este efecto no sería aparente en la oxidación de DOPA y tiramina porque tanto el dopacromo como el dopaminocromo son compuestos coloreados.

Los mecanismos por los cuales el H_2O_2 acorta el periodo de retardo en la hidroxilación de monofenoles por tirosinasa o por los cuales aumenta la cantidad de producto oxidado a partir de monofenoles o dihidroxifenoles por PPO no son bien conocidos. Se ha sugerido que el H_2O_2 a bajas concentraciones

podría reducir las o-quinonas hasta o-dihidroxifenoles (159), o bien podría dar lugar a la formación de oxitirosinasa. Esta forma enzimática de la PPO ha sido postulada recientemente como una forma activa intermedia en la hidroxilación de monofenoles (172).

El descenso de los niveles de dopacromo, dopaminocromo y o-quinona en la oxidación de DOPA, tiramina y catecol por PPO de chirimoyo, en presencia de elevadas concentraciones de H_2O_2 , puede ser explicado por el hecho conocido de que las melaninas son atacadas por el H_2O_2 en exceso dando lugar a una solución, inicialmente de color pardo-claro y posteriormente amarillo-pálido, con componentes de estructura desconocida (69).

Los datos obtenidos en este trabajo revelan que la PPO de epicarpio de chirimoyo se inactiva por el H_2O_2 tanto a elevadas (350mM) como a relativamente bajas concentraciones (4mM). La actividad monofenolasa se pierde más rápidamente que la actividad ortodifenoloxidasas. Así, a los 10 minutos de incubación de la PPO en presencia de 4mM H_2O_2 se pierde el 50% de la actividad monofenol hidroxilasa y tan sólo el 15% de la actividad o-difenol oxidasas.

La inactivación de un enzima por el H_2O_2 se atribuye habitualmente a modificación de los aminoácidos aromáticos presentes en el centro activo (139,144). En el caso de la propil-4-hidroxilasa, la inactivación por H_2O_2 , se ha atribuido a la disociación de la forma activa del enzima en dos dímeros (105).

En nuestro caso esta última hipótesis no sería descartable si se tiene en cuenta que la extracción de la PPO con empleo de detergentes, que provoca su disociación, da lugar a la pérdida sensible de actividad monofenol hidroxilasa (130). No obstante, la pérdida de actividad por H_2O_2 podría deberse

a la oxidación de los radicales -SH que anteriormente consideramos como esenciales para el mantenimiento de la actividad de la PPO de epicarpio de chirimoyo.

En definitiva, las bajas concentraciones (0.1-0.2mM) de H_2O_2 en las células vegetales (169), reguladas por varias reacciones enzimáticas y no enzimáticas, podrían tener un efecto importante sobre la oxidación de compuestos fenólicos catalizada por PPO en el epicarpio de chirimoyo y por tanto contribuir indirectamente a su potencial de pardeamiento durante la maduración del fruto.

Las PPO de varias fuentes son inhibidas por un número considerable de sustancias (65,117,146). Los ácidos carboxílicos han sido los inhibidores estudiados más ampliamente, si bien, se han investigado otras sustancias tales como azúcares, quelantes de iones metálicos y compuestos fenólicos.

En este trabajo se han determinado los efectos de algunos ácidos orgánicos alifáticos y aromáticos, de varios azúcares y de diversos compuestos fenólicos, que no actúan como sustratos, sobre la actividad de la PPO de epicarpio de chirimoyo con objeto de postular requerimientos estructurales para los inhibidores.

Habitualmente se han investigado los efectos de diversos inhibidores sobre la oxidación de dihidroxifenoles por PPO (65,117,146). En nuestro caso, sin embargo, se han considerado los efectos de las diversas sustancias estudiadas tanto sobre la oxidación de o-dihidroxifenoles como sobre la hidroxilación de monofenoles por PPO de chirimoyo.

Los ácidos alifáticos mono o dicarboxílicos y los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa, a concentración 1mM, no ejercen ningún efecto inhibitor sobre la PPO de epicarpio de chirimoyo. Pifferi y col. (117) han encontrado que los ácidos

acético, maleico, fumárico, succínico y sobre todo oxálico y malónico inhiben ligeramente la PPO de la cereza, estando su efectividad directamente relacionada con el pK_a e inversamente con la longitud de la cadena carbonada. Probablemente el efecto inhibitorio observado por Pifferi se debe a la elevada concentración a que fueron ensayadas dichas sustancias (5mM). Otra posibilidad es que el pH del medio era 4.2 mientras que en nuestro caso era de 6.5 y se ha descrito que las formas no ionizadas son las responsables de la inhibición (144).

Los ácidos ciclohexanocarboxílicos (skímico, quínico y ftálico) no inhibieron las actividades monofenol hidroxilasa u o-difenol oxidasa de la PPO de chirimoyo, sin embargo, el ácido benzoico y algunos de sus derivados (ácido salicílico, ácido isovaníllico, ácido cinámico y ácido p-cumárico) se comportaron como potentes inhibidores de ambas actividades.

Por consiguiente, parece que el único requerimiento estructural para que una sustancia se comporte como inhibidora de la PPO es la asociación de un grupo carboxilo a un núcleo bencénico. Los mayores efectos inhibitorios del ácido cinámico y p-cumárico (p-hidroxi cinámico) probablemente se deben a la presencia de un doble enlace conjugado con el carboxilo y con el núcleo bencénico.

La sustitución de uno o más hidrógenos por hidroxilos u otros grupos funcionales en el núcleo bencénico parece jugar un papel importante sobre las propiedades inhibitorias de los ácidos aromáticos para la PPO de epicarpio de chirimoyo. La menor fuerza inhibitoria de los ácidos 3-OH-benzoico y salicílico con respecto al ácido benzoico y la pérdida de efecto inhibitorio en el ácido vaníllico, parece indicar que en estos compuestos se produce una interferencia estérica en la interacción entre el núcleo bencénico y el enzima por efecto de los

sustituyentes hidroxilo o metoxilo. Por el contrario, cuando en el anillo bencénico tiene lugar la sustitución de dos hidrógenos por dos hidroxilos en posiciones para y meta, con respecto al grupo carboxilo, los nuevos compuestos se comportan como potentes activadores de la reacción de hidroxilación de monofenoles y de la oxidación de difenoles. El efecto activador se mantiene si el hidroxilo en posición meta es sustituido por un grupo metoxilo. En cualquier caso, la presencia de un doble enlace conjugado en la cadena alifática que contiene el grupo carboxilo hace aumentar el poder activador del ácido ortodifenólico. Así, el ácido ferúlico es un potente activador de las dos actividades separables de la PPO, el cafeico de la oxidación de o-difenoles y el protocatecuico de la reacción de hidroxilación de monofenoles.

El orcinol y los ácidos ferúlico, cafeico y protocatecuico se comportan como activadores no competitivos, los tres primeros en la reacción de oxidación del catecol y el último en la hidroxilación de la tiramina. Por el contrario, el ácido benzoico se comporta como inhibidor competitivo en la reacción de hidroxilación de la tiramina.

Pifferi y col. han señalado que diversos compuestos fenólicos actúan como activadores o inhibidores de la polifenoloxidasas de cereza por mecanismos tanto de tipo competitivo como no competitivo, sugiriendo que los centros de catálisis e inhibición están separados, pero cercanos, en la molécula del enzima (117).

Los dihidroxifenoles y trihidroxifenoles presentan comportamientos diferentes frente a las actividades monofenolhidroxilasa y ortodifenoloxidasas de PPO de chirimoyo. Mientras que el resorcinol no afecta a ninguna de las dos actividades a concentraciones entre 0.1 y 1mM, el foroglucinol inhibe am-

bas actividades de la PPO. El orcinol es activador de la oxidación del catecol.

El pirogalol y ácido gálico presentan un comportamiento especial tanto en la reacción de la hidroxilación de la tiramina como en la oxidación del catecol. En la reacción de hidroxilación de la tiramina el pirogalol actúa como dador de electrones tanto a concentración 0.1mM como a 1mM mientras que el ácido gálico tiene un comportamiento similar al ácido ascórbico actuando como dador electrónico y a la vez como agente reductor del dopaminocromo, lo que explicaría que la cantidad de producto formado sea menor a concentración 1mM de activador que a 0.1mM. En la reacción de oxidación del catecol ambos compuestos inhiben la velocidad de la reacción inversamente a su concentración, a concentración 0.1mM, además, entre 3 y 11 minutos después de comenzar la oxidación del compuesto difenólico aparece un punto de inflexión en la curva de actividad aumentando la velocidad significativamente. Los espectros de absorción realizados en la reacción de la PPO de chirimoyo frente a tiramina y catecol incluyendo pirogalol o ácido gálico en distintas concentraciones indican que por encima de una determinada concentración (0.1mM) los compuestos que se originan son distintos de los que se forman cuando las concentraciones utilizadas de estos compuestos son superiores (1mM); en el primer caso predominaría la formación de un compuesto de adición entre quinona y sustrato y en el segundo, exclusivamente la quinona; la explicación de este hecho podría estar en la estequiometría de la reacción.

El estudio de la acción de diversos activadores e inhibidores sobre la actividad PPO de epicarpio de chirimoyo se ha completado con la determinación de la localización a nivel subcelular de dicha enzima.

Sánchez de Medina (130) ha sugerido que gran parte de la PPO de chirimoyo debía estar ligada a las membranas de orgánulos celulares ya que la adición de Tritón X-100 al medio de extracción de estas enzimas conducía a un aumento significativo de su actividad específica.

El empleo de un medio protector para la PPO de chirimoyo y la utilización de una técnica por la que se obtiene una gran parte de los orgánulos celulares intactos, tal y como se ha descrito en el apartado 2.2.4 de la sección de Material y Métodos, ha permitido concluir que esta enzima está fundamentalmente localizada en los cloroplastos aunque no puede descartarse su presencia en los peroxisomas.

Estudios de fraccionamiento celular, histoquímicos y de modificaciones químicas y genéticas de los plastidios sugieren que la PPO es una enzima que está presente únicamente en estos orgánulos (6,54,112,162,165). No obstante, la PPO aparentemente existe también libre en el citoplasma de tejidos en degeneración o durante el periodo de senectud tales como los frutos en maduración (165). Sharon y Kahn (142) han establecido que en aguacate la mayor parte de la PPO está asociada a peroxisomas, sin embargo, esto podría deberse a la solubilización del enzima durante el aislamiento de los orgánulos, fragmentación de los plastidios rotos en otras fracciones de orgánulos o a la actividad peroxidasa, identificada como actividad PPO.

Si la PPO de epicarpio de chirimoyo está presente en los cloroplastos cabría preguntarse cual es su misión fisiológica. Se podría asumir por el hecho de que las PPO hidroxilan los monofenoles "in vitro", que estas enzimas están implicadas en la síntesis "in vivo" de o-difenoles. Sin embargo, si la PPO está localizada exclusivamente en los plastidios de los

tejidos sanos, no sería posible este papel fisiológico ya que la mayor parte de los compuestos fenólicos de las plantas superiores se localizan en las vacuolas celulares. Actualmente hay evidencias de que las PPO no son activas como fenol oxidasas ya que su actividad está limitada por un efecto de latencia o ausencia de sustratos (38,133). La única función clara que puede tener la PPO en el metabolismo de los compuestos fenólicos es en aquellos casos en donde el contenido de plastidios y vacuolas se mezclan, esto es, durante los procesos de senectud de los frutos y durante los procesos de daño mecánico o por efectos climatológicos. La producción de quinonas por interacción de las PPO y compuestos fenólicos representaría una protección para los tejidos del ataque de microorganismos (95,165).

Por otra parte, la PPO en el chirimoyo podría estar implicada en el proceso fotosintético. Vaughn y Duke han sugerido recientemente que las PPO podrían intervenir en la regulación de la fotofosforilación pseudocíclica (producción de ATP con O_2 como aceptor electrónico terminal) a través del control de la reacción de Mehler. La PPO, por tanto, tendría una acción detoxificante similar a la superóxido dismutasa durante el proceso fotosintético (165).

5.- CONCLUSIONES

1ª.- La purificación parcial de la PPO de epicarpio de chirimoyo obtenida a través de la formación de polvos acetónicos, precipitación con sulfato amónico entre 40-75% de saturación de los polvos acetónicos redisueltos, y pase de este último precipitado, redisuelto y dializado, a través de Sephadex G-200, permite la desmotración de dos actividades separables en el enzima: una de hidroxilación de compuestos monofenólicos hasta ortodifenoles y otra de oxidación de ortodifenoles hasta los compuestos quinónicos correspondientes.

2ª.- La PPO de chirimoyo hidroxila tiramina, tirosina y p-cresol a una velocidad muy inferior a la oxidación de DOPA y catecol por lo que la actividad de hidroxilación es la limitante en el proceso de oxidación de monofenoles.

3ª.- En la reacción de hidroxilación de monofenoles por la PPO de epicarpio de chirimoyo se distinguen tres fases: una etapa de retardo, una fase de hidroxilación constante y otra de cese de la reacción. La duración de la fase de retardo, que es menor en la oxidación de la tiramina que en la de p-cresol y tirosina, es inversamente proporcional a la concentración de enzima.

En la reacción de oxidación de o-difenoles se distinguen las fases de oxidación constante y de cese de la reacción.

Las velocidades de reacción tanto de hidroxilación como de oxidación constante son directamente proporcionales a la concentración de enzima entre 0-100 μ g de ésta en las condiciones ensayadas.

4ª.- Pequeñas cantidades de o-dihidroxifenoles, sustratos habituales del enzima, tales como catecol, DOPA, dopamina, 4-metil-catecol, (+)catequina y (-)epicatequina, de otros difenoles no oxidables por la PPO de chirimoyo, tales como ácido protocatecuico y ácido siríngico, así como concentraciones entre 0.1 y 0.2mM de ascorbato, acortan sensiblemente el periodo de retardo en la hidroxilación de monofenoles, actuando todos ellos como dadores electrónicos. El ascorbato además reduce simultáneamente las quinonas formadas contribuyendo al aumento de concentración de o-difenol en la reacción de hidroxilación de monofenoles.

Los compuestos tiólicos, cisteína y mercaptoetanol, alargan la fase de retardo de los monofenoles por reducción de los compuestos quinónicos formados.

Ascorbato, cisteína y mercaptoetanol inhiben la formación de o-quinona y melaninas a partir de o-difenoles por PPO de epicarpio de chirimoyo.

5ª.- La incubación del enzima parcialmente purificado en presencia de cisteína o mercaptoetanol ejerce un gran efecto estabilizador de las dos actividades separables de la PPO, mientras que la incubación en presencia de ascórbico conduce a su inactivación. Se sugiere, por tanto, que el enzima necesita para su actividad monofenolhidroxilasa y para su actividad o-difenoloxidasas mantener en los centros activos uno o más grupos -SH en su forma reducida.

6^a.- La presencia de H_2O_2 en pequeñas concentraciones en el sistema de reacción de la PPO de epicarpio de chirimoyo hace aumentar las cantidades de producto final tanto en la hidroxilación de tiramina como en la oxidación de DOPA pero disminuye la cantidad final de o-quinona producida a partir de cateciol. A concentraciones entre 40-320mM el H_2O_2 se comporta como un agente "blanqueante" destruyendo las melaninas formadas por reacción con ellas. Por otra parte, concentraciones entre 4-350mM de H_2O_2 inactivan la PPO de epicarpio de chirimoyo; la actividad monofenoloxidasas se pierde antes que la actividad o-difenoloxidasas.

El H_2O_2 de los tejidos del epicarpio del chirimoyo puede contribuir a los fenómenos de pardeamiento del fruto por regulación tanto de la actividad del enzima como por la cantidad de compuestos quinónicos formados a partir de mono y dihidroxifenoles.

7^a.- Los ácidos orgánicos de carácter alifático, los ácidos ciclohexanocarboxílicos (skímico, quínico y ftálico) y los azúcares no tienen ningún efecto activador o inhibidor sobre la PPO de epicarpio de chirimoyo. Sin embargo, el ácido benzoico y su derivado el isovanílico, así como el ácido cinámico y el p-cumárico son potentes inhibidores de las dos actividades del enzima.

La presencia de un núcleo bencénico y un grupo carboxilo son los determinantes estructurales del inhibidor, el cual aumenta su potencia si posee un doble enlace conjugado entre el anillo bencénico y el grupo carboxilo.

La sustitución de uno o más hidrógenos del núcleo bencénico por otros grupos funcionales da lugar a una menor fuerza inhibidora probablemente por interferencia estérica con el centro activo del enzima.

La presencia de dos OH en posiciones para y meta con respecto al grupo carboxilo es el carácter estructural determinante de los activadores del enzima quienes aumentan su potencia por la presencia de un doble enlace conjugado entre el núcleo bencénico y el grupo carboxilo.

8ª.- El orcinol y los ácidos ferúlico, cafeico y protocatecuico se comportan como activadores no competitivos de la PPO de epicarpio de chirimoyo los tres primeros en la oxidación del catecol y el último en la hidroxilación de la tiramina. El ácido siríngico actúa como activador competitivo en la reacción de hidroxilación de la tiramina. El ácido benzoico es un inhibidor competitivo de la reacción de hidroxilación de la tiramina.

9ª.- La PPO de epicarpio de chirimoyo está localizada preferencialmente a nivel subcelular en los cloroplastos, aunque no se excluye la posibilidad de que parte de ella pudiese estar ligada a los peroxisomas. Todo ello sugiere que la PPO podría tener un papel en la fotosíntesis o en los procesos de senectud durante la maduración del fruto dando lugar a la formación de compuestos quinónicos los cuales protegen a los tejidos del ataque de otros organismos.

6.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABUK HARAMA DA, WOLLHOUSE HW. Preparation and properties of o-diphenol: oxygen oxidoreductase from potato tubers. *New Phytol* 1966; 65:477-87.
- 2.- ADAMSON I, ABIGOR R. Transformation associated with catecholase in Dioscorea alata during storage. *Phytochemistry* 1980; 19:1593-5.
- 3.- AEBI H. Catalase. En: Bergmeyer HV, ed. *Methods in Enzymatic Analysis*. Vol 2. New York and London, Verlag Chemic Weinheim, Academic Press, 1974: 673-84.
- 4.- ALBERGHINA FAM. Chlorogenic acid oxidase from potato tuber slices: Partial purification and properties. *Phytochemistry* 1964; 3:65-70.
- 5.- ANDERSON JW. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry* 1968; 7:1973-88.
- 6.- ARNON JF. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in Beta vulgaris. *Plant Physiol* 1949; 24:1-15.
- 7.- ASHGAR SS, SIDIQI M. Phenolase of Papaver somniferum. I. Isolation of the enzyme and its substrate specificity. *Enzymologia* 1970; 39:289-306.
- 8.- ASHIDA M. Purification and characterization of pre-phenol oxidase from hemolymph of the silkworm Bombix mori. *Arch Biochem Biophys* 1971; 749-62.
- 9.- BALASINGAM K, FERDINAND W. Purification and properties of

of a ribonucleoenzyme, o-diphenol oxidase, from potatoes. Biochem J 1970; 118:15-23.

- 10.- BARCELO J, NICOLAS G, SABATER B, SANCHEZ R. Formación y maduración de los frutos. En: Fisiología Vegetal. Madrid, Pirámide, 1980: 686-713.
- 11.- BEN-SHALOM N, KAHN V, HAREL E, MAYER AM. Olive catechol oxidase changes during fruit development. J Sci Food Agric 1977; 28:545-550.
- 12.- BEN-SHALOM N, KAHN V, HAREL E, MAYER AM. Catechol oxidase from green olives: properties and partial purification. Phytochemistry 1977; 16:1153-8.
- 13.- BENDALL DS, GREGORY RPF. Purification of phenol oxidases. En: Prindham JB, ed. Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds. New York, Pergamon Press, 1963: 7-24.
- 14.- BENJAMIN ND, MONTGOMERY MW. Polyphenol oxidase of Royal Ann Cherries. Purification and characterization. J Food Sci 1974; 38:799-806.
- 15.- BIZEN T, HARA S, OHBA T, MURAKAMI H. Metabolism of aromatic compounds of Aspergillus. III. Formation of protocatechuic acid from dopa. J Ferm Technol 1972; 50:710-5.
- 16.- BONNER WD Jr. A general method for the preparation of plant mitochondria. En: Estabrook RW, Pullman ME, eds. Methods in Enzymology. Vol 10. New York and London, Academic Press, 1967: 126-135.

- 17.- BOUCHILLOUX S, MCMAHILL P, MASON HS. The multiple forms of mushroom tyrosinase. Purification and molecular properties of the enzymes. J Biol Chem 1963; 238:1699-707.
- 18.- BRAVERMAN JBS. Introduction to the Biochemistry of Foods. Amsterdam, London, New York, Elsevier Publ. 1963.
- 19.- BURNETT JB. Tyrosinases of mouse melanoma. Isolation and molecular properties. J Biol Chem 1971; 246:3079-91.
- 20.- CARLBERG I, SODERHALL K, ERIKSSON T. Phenoloxidase activity in Daucus carota is restricted to embryogenic cultures. FEBS 1985; 187:295-8.
- 21.- CERVANTES GOMEZ E. Diez temas sobre plantas tropicales. Publicaciones de capacitación agraria. Ministerio de Agricultura, 1969.
- 22.- CERVANTES GOMEZ E. Publicaciones de capacitación agraria. Serie técnica. Ministerio de Agricultura, 1978.
- 23.- CHAVES AR, TOMAS JO. Efectos del dióxido de carbono sobre la actividad de la polifenoloxidasas de manzanas Red Delicious. ATA 1976; 16:1
- 24.- CHEFTEL VC, CHEFTEL H. Introduction a la Biochimie et a la Technologie des aliments. Vol 1: Technique et Documentation. Paris, Entreprise Moderne d'Edition, 1976:353-63.
- 25.- CLAYTON RA. Properties of tobacco polyphenoloxidase. Arch Biochem Biophys 1959; 404-8.

- 26.- CONSTANTINIDES SM, BEDFORD CL. Multiple forms of phenoloxidase. J Food Sci 1967; 32:446
- 27.- DEINUM J, LERCH K, REINHAMMAR B. An EPR study of Neurospora tyrosinase. FEBS Letters 1976; 69:161-4.
- 28.- DELON R. Localization of polyphenoloxidase and peroxidase activity in root cells of tomato plants after infection with Pyrenochaeta lycopersici. Phytopatol Z 1974; 80:199-208.
- 29.- DETMER K, MASSEY V. Effect of monovalent anions on the mechanism of phenol hydroxylase. J Biol Chem 1984; 259:11265-72.
- 30.- DETMER K, MASSEY V. Effect of substrate and pH on the oxidative half-reaction of phenol hydroxylase. J Biol Chem 1985; 260:5998-6005.
- 31.- DOUCE R, CHRISTENSEN EL, BONNER WD. Preparation of intact plant mitochondria. Biochim Biophys Acta 1972; 275:148-60.
- 32.- DRESSLER H, DAWSON CR. Nature and mode of action of the copper protein tyrosinase. I. Exchange experiments with radioactive copper and the resting enzyme. II. Exchange experiments with radioactive copper and the functioning enzyme. Biochim Biophys Acta 1960; 45:508-24.
- 33.- DUCKWORT HW, COLEMAN JE. Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. J Biol Chem 1970; 245:1611-3.
- 34.- DUKE SO, VAUGHN KC. Lack of involvement of polyphenol oxidase in ortho-hydroxylation of phenolic compounds in mung bean

seedlings. *Physiol Plant* 1982; 54:381-5.

- 35.- FARRE JM, HERMOSO JM, GONZALEZ PAIS MA. Anales de investigaciones agrarias. Serie Producción vegetal Vol 6. Ministerio de Agricultura 1976: 4
- 36.- FLING M, HOROWITZ NH, HEINEMAN SF. The isolation and properties of crystalline tyrosinase from Neurospora. *J Biol Chem* 1963; 238:2045-53.
- 37.- GOLAN-GOLDHIRS HA, WHITAKER JR. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 1984; 32:1003-9.
- 38.- GOLBECK JH, CAMMARATA KV. Spinach tylakoid polyphenol oxidase. *Plant Physiol* 1981; 67:977-84.
- 39.- GORDON SA, PALEG LG. Formation of auxin from tryptophan through the action of polyphenols. *Plant Physiol* 1961; 36: 838
- 40.- GREEN AA, HUGHES WL. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. En: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in Enzymology*. Vol 1. New York and London, Academic Press, 1955: 67
- 41.- GREGORY RPF, BENDALL DS. The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (Camellia sinensis L.) *Biochem J* 1966; 101:569
- 42.- GRIFFITHS LA. Detection and identification of the polyphenol

oxidase substrate of the banana. Nature 1959; 184:58

- 43.- GUSTAVSON HK. Interaction of vegetable tannins with polyamides as proof of the dominant function of the peptide bond of collagen for its binding of tannins. J Polym Sci 1954; 12:317-24.
- 44.- GUTIERRIDGE S, ROBB DA. Catecholase activity in Neurospora tyrosinase. Eur J Biochem 1975; 54:107-16.
- 45.- HALIM DH, MONTGOMERY MW. Polyphenol oxidase of d'Anjou pears (Pyrus communis L.). J Food Sci 1978; 43:603-5.
- 46.- HAREL E, MAYER AM. Partial purification and properties of catechol oxidases in grapes. Phytochemistry 1971; 10:17-22.
- 47.- HAREL E, MAYER AM, LEHMAN E. Multiple forms of Vitis vinifera catechol oxidase. Phytochemistry 1973; 12:2649-54.
- 48.- HAREL E, MAYER AM, SHAIN Y. Catechol oxidase from apples; their properties, subcellular location and inhibition. Physiol Plant 1964; 17:921-30.
- 49.- HAREL E, MAYER AM, SHAIN Y. Purification and multiplicity of catechol oxidase from apple chloroplasts. Phytochemistry 1965; 4:783-90.
- 50.- HAREL E, MAYER AM, SHAIN Y. Catechol oxidases, endogenous substrates, and browning in developing apples. J Sci Food Agric 1966; 17:389-92.

- 51.- HAREL E, MAYER AM, SHAIN Y. Interconversion of sub-units of catechol oxidase from apple chloroplasts. *Phytochemistry* 1968; 7:199-204.
- 52.- HEIMER Y, MAYER AM. Distribution, development and nature of catechol oxidase in sugar beet. *Israel J Botany* 1966; 15:1-11.
- 53.- HENRY EW. The ultrastructural localization of polyphenol oxidase in chloroplasts of Brassica napus cv. Zephyr Z *Pflanzenphysiol* 1976; 78:446-52.
- 54.- HENRY EW, DE POORE HJ, O'CONNOR MN, DEMORROW JM. Sorbitol disrupted spinach (Spinacia oleracea L.) chloroplasts: cytochemical localization of polyphenol oxidase in discontinuous sucrose density gradient fractions. *J Microscop Cytol* 1981; 13:365-71.
- 55.- HENRY EW, DE POORE HJ, O'CONNOR MN. An ultracentrifugation chloroplast membrane preparatory method for the fine structural localization of polyphenol oxidase. *Micron* 1982; 13:453-4.
- 56.- HOBSON GE, LANCE C, YOUNG RE, BIALE JB. Isolation of active subcellular particles from avocado fruit at various stages of ripeness. *Nature* 1966; 209:1242-3.
- 57.- HSU AF, KALAN EB, BILLS DD. Partial purification and characterization of the soluble polyphenol oxidases from suspension cultures of Papaver somniferum. *Plan Sci Letters* 1984; 34:315-22.

- 58.- IMBERTY A, GOLDBERG R. Specific time course of peroxidase oxidation in the presence of SH-containing inhibitors. Comparison with the inhibition of polyphenoloxidase activities. *Plant and Cell Physiol* 1984; 25:1384-94.
- 59.- INTERESSE FS, RUGGIERO P, D'AVELLA G, LAMPARELLI F. Characterization of wheat o-diphenolase isoenzyme. *Phytochemistry* 1983; 22:1885-9.
- 60.- JACKSON C, DENCH JE, HALL DO, MOORE AL. Separation of mitochondria from contaminating subcellular structures utilizing silica gel gradient centrifugation. *Plant Physiol* 1979; 64: 150-3.
- 61.- JIMENEZ M, GARCIA CARMONA F, GARCIA CANOVAS F, IBORRA JL, LOZANO JA, MARTINEZ F. Chemical intermediates in dopamine oxidation by tyrosinase, and kinetic studies of the process. *Arch Biochem Biophys* 1984; 235:438-48.
- 62.- JOLLEY RL, MASON HS. Multiple forms of mushroom tyrosinase. *J Biol Chem* 1965; 240:1489-91.
- 63.- JOLLEY RL, ROBB DA Jr, MASON HS. Multiple forms of mushroom tyrosinase. Association-dissociation phenomena. *J Biol Chem* 1969; 244:1593-9.
- 64.- KAHN V. Polyphenol oxidase activity and browning of three avocado varieties. *J Sci Food Agric* 1975; 26:1319
- 65.- KAHN V. Effect of some phenolic compounds on the oxidation of 4-methyl catechol catalyzed by avocado polyphenoloxidase.

J Food Sci 1976; 41:1011-2.

- 66.- KAHN V. Polyphenol oxidase isoenzymes in avocado. *Phytochemistry* 1976; 15:267
- 67.- KAHN V. Some biochemical properties of polyphenoloxidase from two avocado varieties differing in their browning rates. *J Food Sci* 1977; 42:38-43.
- 68.- KAHN V, POMERANTZ SH. Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 1980; 19:379-85.
- 69.- KAHN V. Multiple effects of hydrogen peroxide on the activity of avocado polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 1983; 22: 2155-9.
- 70.- KATO C, URITANI I, SAIJO R, TAKEO T. Cellular localization of particulate-bound polyphenol oxidase in tea leaves. *Plant Cell Physiol* 1976; 17:1045-52.
- 71.- KENTEN RH. Latent phenolase in extracts of broad bean (Vicia faba) leaves. II. Activation by anionic wetting agents. *Biochem J* 1958; 68:244-51.
- 72.- KERTESZ D, ZITO R. Mushroom polyphenol oxidase. I. Purification and general properties. *Biochim Biophys Acta* 1965; 96:447-60.
- 73.- KIDD F, WEST C. Food Invest Board Techn Paper n° 2, 1925
- 74.- KIDD F, WEST C. Respiratory activity and duration of life

of apples gathered at different stages of development and subsequently maintained at a constant temperature. *Pl Physiol Lancaster* 1945; 20:467-504.

- 75.- KIDRON M, HAREL E, MAYER AM. Copper content and amino acid composition of catechol oxidase from Clairette grapes. *Phytochemistry* 1977; 16:1050-1.
- 76.- KIM KH, TCHEN TT. Putrescine- α -ketoglutarate transaminase in Escherichia coli. *Biochim Biophys Acta* 1962; 59:569
- 77.- KNAPP FW. Some characteristics of eggplant and avocado polyphenol oxidase. *J Food Sci* 1965; 30:930-5.
- 78.- KOCHER HP, ETTLINGER L. Extracellular tyrosinase in Streptomyces glaucescens. *Pathol Microbiol* 1975; 42:248-9.
- 79.- LANZARINI G, PIFFERI PG, ZAMORANI A. Specificity of an o-diphenol oxidase from Prunus avium fruits. *Phytochemistry* 1972; 11:89-99.
- 80.- LERCH K, ETTLINGER L. Purification and characterization of a tyrosinase from Streptomyces glaucescens. *Eur J Biochem* 1972; 31:427-37.
- 81.- LERCH K. Neurospora tyrosinase: molecular weight, copper content and spectral properties. *FEBS Letters* 1976; 69:157-60.
- 82.- LERNER HR, MAYER AM, HAREL E. Evidence for conformational changes in grape catechol oxidase. *Phytochemistry* 1972; 11:

2415-21.

- 83.- LIEBERI R, BIEHL B. Friesetzung und Aktivierung von Polyphenoloxidasen aus Thylakoid Membranes der Spinat-Chloroplasten. Ber Dtsch Bot 1976; 89:663-76.
- 84.- LOOMIS WD, BATAILLE A. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochemistry 1966; 5:423-38.
- 85.- LOWRY OH, ROSENROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265-75.
- 86.- MAERCKER V. The transpiration of guard cells of higher plants. Protoplasma 1965; 60:61-78.
- 87.- MALMASTROM BG, ANDREASSON EE, REINHAINER B. Copper containing oxidases and sulphoxide dismutase. En: Boyer PD, ed. The enzymes. Vol 12. New York and London, Academic Press, 1975: 507-79.
- 88.- MARBACH I, MAYER AM. Permeability of seed coat to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics. Plant Physiol 1974; 54:817-20.
- 89.- MARBACH I, MAYER AM. Changes in catechol oxidase and permeability to water in seed coats of Pisum elatius during seed development and maturation. Plant Physiol 1975; 56:93-6.
- 90.- MARBACH I, MAYER AM. Formation of catechol oxidase in seed coats of Pisum elatius during seed maturation. J Exp Botany

1978; 29:69-75.

- 91.- MARTYN RD, SAMUELSON DA, FREEMAN TE. Ultrastructural localization of polyphenoloxidase activity in leaves of healthy and diseased waterhyacinth. *Phytopathology* 1979; 69:1278-87.
- 92.- MAYER AM. Nature and location of phenolase in germinating lettuce. *Physiol Plant* 1961; 14:322-31.
- 93.- MAYER AM. Inhibition and substrate specificity of lettuce phenolase. *Phytochemistry* 1962; 1:237-9.
- 94.- MAYER AM, FRIEND J. Properties and solubility of phenolase in isolated chloroplasts *Nature* 1960; 185:465.
- 95.- MAYER AM, HAREL E. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 1979; 18:193-215.
- 96.- MEYER HU, BIEHL B. Activation of latent phenolase during spinach leaf senescence. *Phytochemistry* 1981; 20:955-9.
- 97.- MIFLIN BJ, BEEVERS H. Isolation of intact plastids from a range of plant tissues. *Plant Physiol* 1974; 53:870-4.
- 98.- MILLS WR, JOY KW. A rapid method for isolation of purified, physiologically active chloroplast, used to study the intracellular distribution of amino acids in pea leaves. *Planta* 1980; 148:75-83.
- 99.- MORGENTHALER JJ, PRICE CA. Photosynthetic activity of spi-

nach chloroplasts after isopycnic centrifugation in gradients of silice. Plant Physiol 1974; 54:532-4.

- 100.- MOTODA S. Studies on microbial polyphenol oxidase. V. Purification and some properties of polyphenol oxidase from Alternaria tenuis. J Ferment Technol 1979; 57:71-8.
- 101.- MOTODA S. Properties of polyphenol oxidase from Alternaria tenuis. J Ferment Technol 1979; 57:79-85.
- 102.- MOWLAH G, TAKANO K, KAMOI I, OBAR T. Characterization of banana polyphenoloxidase (PPO) fractions with respect to electrophoretic and gel filtration behavior. Lebensm-Wiss u Technol 1982; 15:207-10.
- 103.- MUELLER WC, BECKMAN CH. Ultrastructural localization of polyphenol oxidase and peroxidase in roots and hypocotyls of cotton seedlings. Can J Bot 1978; 56:1579-87.
- 104.- NEUMANN J, LEGRAND G, LEHONGRE G; LAVOLLAY J. Ortho-hydroxylation of phenol by potato tyrosinase in the presence of ascorbic acid. C.R. Acad Sci 1963; 256:309-11.
- 105.- NIETFELD JJ, VAN DER KRAAN I, KEMP A. Dissociation and reassociation of prolyl 4-hydroxylase subunits after cross-linking of monomers. Biochim Biophys Acta 1981; 661:21-7.
- 106.- NILO RIVAS S. Purificación parcial y caracterización cinética de la polifenol oxidasa del cambur manzano. Rev Fac Agrar (Maracay) 1978; 9:39-49.

- 107.- NYE TG, HAMPTON RE. Biochemical effect of tobacco etch virus infection on tobacco leaf tissue. II. Polyphenoloxidase activity in subcellular fractions. *Phytochemistry* 1966; 5:1187-9.
- 108.- OLAH AF, MUELLER WC. Ultrastructural localization of oxidative and peroxidative activities in carrot suspension cell culture. *Protoplasma* 1981; 106:231-48.
- 109.- ONSLOW MW. Oxidizing enzymes. III. The oxidizing enzymes of some common fruits. *Biochem J* 1920; 14:541-5.
- 110.- PALMER JK. Changes in the nitrogenous constituents of burley tobacco during curing and ageing. *Plant Physiol* 1963; 51:234-7.
- 111.- PALMER JK. Banana polyphenoloxidase; preparation and properties. *Plant Physiol* 1963; 38:508-11.
- 112.- PALMER JK, ROBERTS JB. Inhibition of banana polyphenoloxidase by 2-mercaptobenzothiazole. *Science* 1967; 157:200-1.
- 113.- PARISH RW. The intracellular localization of phenoloxidase, peroxidase and phosphatase in leaves of spinach beet (Beta vulgaris L.). *Eur J Biochem* 1972; 31:446-55.
- 114.- PARISH RW. The intracellular localization of phenol oxidases and peroxidase in stems of spinach beet (Beta vulgaris L.). *Z. Pflanzenphysiol* 1972; 66:126-86.
- 115.- PATIL SS, ZUCKER M. Potato phenolase, purification and

- properties. J Biol Chem 1965; 240:3938-43.
- 116.- PERIAGO JL, TORRES MN, FAUS MJ, LAZARO JJ, GIL A. Changes in the texture of chirimoyo fruits and variation in its free amino acids content. J Agric Food Chem (en prensa).
- 117.- PIFFERI PG, BALDASSARI L, CULTRERA R. Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from Prunus avium fruits. J Sci Food Agric 1974; 24:263-70.
- 118.- PLATA MC. Evolución de las actividades polifenol oxidasa, peroxidasa, catalasa y fosfatasa ácida durante la maduración del chirimoyo (Annona cherimolia Mill.) en atmósfera controlada. Memoria de Licenciatura. Departamento de Bioquímica. Universidad de Granada, 1983.
- 119.- QUAIL PH. Plant cell fractionation. Ann Rev Plant Physiol 1979; 30:425-84.
- 120.- REYES P, LUH BS. Characteristics of browning enzymes in Fay Elberta Freestone peaches. Food Technol 1960; 14:570-3.
- 121.- RHODES MJC. The climateric and ripening of fruits. En: The biochemistry of fruits and their products 1970; 521.
- 122.- RIVAS NJ, WHITAKER JR. Purification and some properties of two polyphenol oxidases from Bartlett pears. Plant Physiol 1973; 52:501-5.
- 123.- ROBB DA, SWAIN T, MAPSON LW. Substrates and inhibitors of the activated tyrosinase of broad bean (Vicia faba L.).

Phytochemistry 1966; 5:665-75.

- 124.- ROBB DA, MAPSON LW, SWAIN T. Activation of the latent tyrosinase of broad bean. *Nature* 19 ; 201:503-4.
- 125.- ROBERTS MF. Enzymic studies with Papaver somniferum. II. Oxidation of tyrosinase by Papaver somniferum latex. *Phytochemistry* 1974; 13:119-23.
- 126.- ROBERTSON A. Effect of catechin concentration on the formation of black tea polyphenols during "in vitro" oxidation. *Phytochemistry* 1983; 22:897-903.
- 127.- RUIS H. Particulate and soluble forms of o-diphenol oxidase from potato tubers. *Phytochemistry* 1972; 11:53-8.
- 128.- SALOME M, PAIS S, BARROSO J. Localization of polyphenoloxidase during establishment of Ophrys lutea endomycorrhizas. *New Phytol* 1983; 95:219-22.
- 129.- SANCHEZ DE MEDINA L, GIL A, LAZARO JJ, FAUS MJ. Propiedades de las polifenoloxidasas de epicarpio y mesocarpio de Annona cherimolia. Primer Congreso Hispano-Portugués de Bioquímica 1980.
- 130.- SANCHEZ DE MEDINA L. Purificación parcial y propiedades de las polifenoloxidasas de epicarpio y mesocarpio de chirimoyo (Annona cherimolia Mill.). Memoria de Licenciatura. Departamento de Bioquímica. Universidad de Granada 1981.
- 131.- SANDERSON GW. Extraction of soluble catechol oxidase from tea shoot tips. *Biochim Biophys Acta* 1964; 92:622-4.

- 132.- SAPIS JC, MACHEIX JJ, CORDONNIER RE. The browning capacity of grapes. 1. Changes in polyphenol oxidase activities during development and maturation of the fruit. *Agric Food Chem* 1983; 31:342-5.
- 133.- SATO M, HASEGAWA M. The latency of spinach chloroplast phenolase. *Phytochemistry* 1976; 15:61-5.
- 134.- SATO M. Association by 2,3-dihydroxybenzaldehyde of monomeric phenolase in spinach chloroplasts. *Phytochemistry* 1976; 15:1665-7.
- 135.- SATO M. Detection in spinach leaves of inhibitor (oxalates) and activator acting on chloroplast phenolase. *Plant Sci Letters* 1979; 16:355-60.
- 136.- SCHMIDT VH, SENGEWALD H. Investigations on the effect of tyrosinase inhibitory substances of phenoloxidase (EC 1.14.18.1.). *Acta Histochem* 1983; 73:113-20.
- 137.- SCHNARRENBERGER C, OESER A, TOLBERT NE. Isolation of plastids from sunflower cotyledons during germination. *Plant Physiol* 1972; 50:55-9.
- 138.- SCIANCALEPORE V, LONGONE V. Polyphenol oxidase activity and browning in green olives. *J Agric Food Chem* 1984; 32:320-1.
- 139.- SCOTLAND T, LJONES T. Direct spectrophotometric detection of ascorbate free radical formed by dopamine β -monooxygenase and by ascorbate oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1980; 630:30-5.

- 140.- SHANNON CT, PRATT DE. Apple polyphenol oxidase activity in relation to various phenolic compounds. *J Food Sci* 1967; 32:479-82.
- 141.- SHARON O, KAHN V. Browning potential, PPO, catalase and acid phosphatase activities during ripening of non-chilled and chilled avocado. *J Sci Food Agric* 1979; 30:634-8.
- 142.- SHARON O, KAHN V. The intracellular location of particulate bound polyphenol oxidase in avocado mesocarp. *Physiol Plant* 1979; 45:227-34.
- 143.- SHINSHI H, NOGUCHI MN. Peroxidase from tobacco cell suspension cultures. I. Relations between peroxidase, IAA oxidase and polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 1975; 14:1255-8.
- 144.- SINET P, GARBER P. Inactivation of the human copper-zinc superoxide dismutase during exposure to the superoxide radical and hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 1981; 212:411-6.
- 145.- SMITH DH, MONTGOMERY MW. Improved methods for the extraction of polyphenol oxidase from d'Anjou pears. *Phytochemistry* 1985; 24:901-4.
- 146.- SOLER MARTINEZ A, SABATER GARCIA F, LOZANO JA. Effect of pH, time and temperature on phenolase from apricots. *Rev Agroquim Tecnol Alimentos* 1965; 5:353-8.
- 147.- SOTTOCASA GL. Biochemical properties of inner and outer mitochondrial membranes of liver. *Biochem J* 1967; 105: 1P-2P.

- 148.- STAFFORD HA. The metabolism of aromatic compounds. *Ann Rev Plant Physiol* 1974; 25:459-86.
- 149.- TAKABE T, NISHIMURA M, AKAZAWA T. Isolation of intact chloroplasts from spinach leaf by centrifugation in gradients of the modified silica "Percoll". *Agric Biol Chem* 1979; 43:2137-42.
- 150.- TAKEO T. Tea leaf polyphenoloxidase. IV. The localization of polyphenoloxidase in tea leaf cell. *Agric Biol Chem* 1966; 30:931-4.
- 151.- TAKEO T, URITANI I. Leaf polyphenoloxidase. II. Purification and properties of the solubilized polyphenoloxidase in tea leaves. *Agric Biol Chem* 1965; 30:155-63.
- 152.- TANEJA SR, SACHAR RC. Stimulation of polyphenol oxidase (monophenolase) activity in wheat endosperm by gibberellic acid, cycloheximide and actinomycin. *Planta* 1974; 116:133-42.
- 153.- TOLBERT NE. Activation of polyphenoloxidase of chloroplasts *Plant Physiol* 1973; 51:234-44.
- 154.- TOLBERT NE. Isolation of subcellular organelles of metabolism on isopycnic sucrose gradients. En: Fleischer S, Packer L, eds. *Methods in Enzymology*. Vol 31. New York and London, Academic Press, 1974; 734-46.
- 155.- TREMOLIERES M, BIETH JG. Isolation and characterization of the polyphenoloxidase from senescent leaves of black poplar. *Phytochemistry* 1984; 23:501-5.

- 156.- ULRICH R. Organic acids. En: Hulme AC, ed. Biochemistry of Fruits and their Products. New York and London, Academic Press, 1971; 89-118.
- 157.- VAN BUREN J. Fruit Phenolics. En: Hulme AC, ed. Biochemistry of Fruits and their Products. New York and London, Academic Press, 1971; 273
- 158.- VAROQUAUX P, SARRIS J. Spectrophotometric determination of o-diphenoloxidase kinetics in Paris mushrooms (Agaricus bisporus). Lebensm-Wiss Technol 1979; 12:165-8.
- 159.- VAUGHAN PFT, BUTT VS. Action of o-dihydric phenols in the hydroxylation of p-coumaric acid by a phenolase from leaves of spinach beet (Beta vulgaris). Biochem J 1970; 119:89-94.
- 160.- VAUGHAN PFT, EASON R, PATON JY, RITCHIE G. Molecular weight and amino acid composition of purified spinach beet phenolase. Phytochemistry 1975; 14:2383-6.
- 161.- VAUGHAN PFT, McINTYRE R. Kinetic studies on the hydroxylation of p-coumaric acid to caffeic acid by spinach beet phenolase. Biochem J 1975; 149:447-61.
- 162.- VAUGHN KC, DUKE SO. Tissue localization of polyphenoloxidase in Sorghum. Protoplasma 1981; 108:319-27.
- 163.- VAUGHN KC, DUKE SO. Tentoxin-induced loss of plastidic polyphenol oxidase. Physiol Plant 1981; 53:421-8.
- 164.- VAUGHN KC, DUKE SO. Tentoxin effects on Sorghum: the role

- of polyphenol oxidase. Protoplasma 1982; 110:48-53.
- 165.- VAUGHN KC, DUKE SO. Function of polyphenol oxidase in higher plants. Physiol Plant 1984; 60:106-12.
- 166.- VAUGHN KC, MILLER PD, WILSON KG. Ultrastructural localization of polyphenoloxidase in Aegopodium podagraria. Cytobios 1981; 31:27-36.
- 167.- VOLKMANN CM, BEERSTEDER E, Jr. Phenylserine studies. V. The inhibition of copper enzymes by 3,4-dichlorophenylserine. J Biol Chem 1956; 223:1021-5.
- 168.- WALLING C, PARTCH RE, WEIL T. Kinetics of the decomposition of hydrogen peroxide catalyzed by ferric ethylenediaminetetraacetate complex. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72: 140-2.
- 169.- WARM E, LATIES GG. Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. Phytochemistry 1982; 21:827-31.
- 170.- WEAVER C, CHARLEY R. Enzymatic browning of ripening bananas J Food Sci 1974; 39:1200-2.
- 171.- WHITING GC. Sugars. En: Hulme AC, ed. Biochemistry of Fruits and their Products. New York and London, Academic Press, 1971; 1-31.
- 172.- WILCOX DE, PORRAS AG, HWANG YT, LERCH K, WINKLER ME, SALOMON EI. Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. J Ann Chem Soc 1985;

107:4015-27.

- 173.- WISSEMANN KW, LEE CY. Polyphenoloxidase activity during grape maturation and wine production. *Ann J Enol Vitic* 1980; 31:206-11.
- 174.- WONG TC, LUH BS, WHITAKER JR. Isolation and characterization of polyphenol oxidase isozymes of Clingstone peach. *Plant Physiol* 1971; 48:19-23.
- 175.- WOOD BJB, INGRAHAM LL. Labeled tyrosinase from labeled substrate. *Nature* 1965; 205:291-2.
- 176.- YAMAGUCHI M, HWANG PM, CAMPBELL JD. Latents o-diphenol oxidase in mushrooms (Agaricus bisporus). *Can J Biochem* 1970; 48:198-202.
- 177.- YAMAKI S. Isolation of vacuoles and compartmentation of sugars, organic acids, phenolic compounds and amino acids. *Plant Cell Physiol* 1984; 25:151-66.
- 178.- YUNUSOV TS, YULDASHEV P. Phenol oxidase of cotton. *Khim Prir Soedin* 1975; 11:409-12.
- 179.- YUNUSOV TS, YULDASHEV P. Amino acid composition and terminal amino acids of phenol oxidase of cotton. *Khim Prir Soedin* 1975; 11: 112-6.
- 180.- ZAPROMETOV MN, SAMORODOVA-BIANKI GB, STREL'TSINA SA. Molecular forms of apple phenoloxidase. *Biochem Biophys Pflanzen* 1979; 174:363-72.



Biblioteca Universitaria de Granada



01053018