

Jaime Morante Carriel
Anna A. Obrebska
Roque Bru Martínez
Mercedes Carranza Patiño

Polifenol Oxidasa

Propiedades moleculares
y función biológica



compAs
Grupo de capacitación e investigación científica

Resumen

POLIFENOL OXIDASA. Propiedades Moleculares y Función Biológica

Las polifenol oxidasas (PPOs) son enzimas que catalizan la reacción dependiente de oxígeno, transforma o-difenoles en o-quinonas. Estas quinonas son reactivas y capaces de modificar covalentemente un amplio número de especies nucleófilas, del interior de las células, que conduce a la formación de polímeros marrones, conocido como pardeamiento enzimático. El fenómeno de pardeamiento durante el crecimiento, recogida, almacenamiento y procesado de frutos y vegetales, es un problema de primera magnitud en la industria agroalimentaria y se reconoce como una de las principales causas de pérdidas de calidad y valor comercial. Produce cambios importantes tanto en la apariencia como en las propiedades organolépticas de frutos y vegetales comestibles, además suele ir asociado al desprendimiento de olores y efectos negativos sobre el valor nutricional. Aunque las PPOs se han descrito en diversos tejidos de plantas como raíces, semillas, hojas y frutos, el control de este fenómeno requiere un conocimiento bioquímico del tipo de sustratos fenólicos presentes en cada planta, el nivel de compuestos reductores, el nivel de accesibilidad del O₂, de la naturaleza de los diferentes compuestos oxidables y de la polimerización y degradación de las o-quinonas. En este trabajo se presenta una revisión del efecto bioquímico, distribución, localización y posibles inhibidores de las PPOs en frutos y vegetales usados como alimento.



**Polifenol Oxidasa propiedades
moleculares y función biológica**

Autores:

Jaime Morante Carriel

Anna A. Obrebska

Roque Bru Martínez

Mercedes Carranza Patiño

Polifenol Oxidasa propiedades moleculares y función biológica

Autores

Jaime Morante Carriel

Anna A. Obrebska

Roque Bru Martínez

Mercedes Carranza Patiño



Primera edición: noviembre 2018

© Universidad Técnica Estatal de Quevedo 2018

© Ediciones Grupo Compás 2018

ISBN: 978-9942-33-072-7

Diseño de portada y diagramación: Grupo Compás

Este texto ha sido sometido a un proceso de evaluación por pares externos con base en la normativa del editorial.

Quedan rigurosamente prohibidas, bajo las sanciones en las leyes, la producción o almacenamiento total o parcial de la presente publicación, incluyendo el diseño de la portada, así como la transmisión de la misma por cualquiera de sus medios, tanto si es electrónico, como químico, mecánico, óptico, de grabación o bien de fotocopia, sin la autorización de los titulares del copyright.

Guayaquil-Ecuador 2018

Cita.

Morante, J; Obrebska, A; Bru, R. Carranza, M (2018) Polifenol Oxidasa propiedades moleculares y función biológica , Editorial Grupo Compás, Guayaquil Ecuador, 52 pag

Índice

Prólogo.....	2
Introducción.....	1
Propiedades moleculares de PPOs.....	8
Estructura y mecanismo catalítico	20
Inhibidores de PPOs	31
Función biológica	36
Conclusiones.....	46
Agradecimientos.....	49
Referencias bibliográficas	51

Prólogo

La polifenol oxidasa (PPO), conocida como catecol oxidasa, fenolasa, o o-difenol oxígeno oxireductasa (E.C. 1.14.18.1), cataliza la oxidación de difenoles en presencia de oxígeno molecular. Son enzimas ampliamente distribuidas en el reino vegetal, siendo detectadas en algas, briófitos, pteridófitos, gimnospermas y angiospermas. La localización de la enzima en las células de plantas depende de la especie, del tejido y del estado de madurez. Aunque se ha descrito un gran número de publicaciones sobre esta enzima por el papel que juega en la resistencia a infecciones microbiológicas o virales en las plantas, por su participación indirecta en la biosíntesis de auxinas, en la regulación del

crecimiento y en el fenómeno de pardeamiento enzimático en numerosos frutos y alimentos procesados, el conocimiento de su función biológica sigue siendo hasta la fecha un enigma sin resolver. En este trabajo se hace una revisión de las propiedades moleculares de las PPOs, su estructura, mecanismo catalítico y los genes que las codifican, poniendo especial atención en las funciones biológicas de la enzima y el papel que desempeñan en las plantas.

Dr. Nicolás Cruz Rosero
Profesor Investigador
Doctor en Ingeniería Genética Vegetal



Introducción

Las polifenol oxidasas (PPOs), son enzimas ampliamente distribuidas en la escala filogenética, encontrándose en organismos procariontas y en eucariotas. Se trata de una enzima ampliamente distribuida en el reino vegetal, siendo detectada en algas, briófitos, pteridófitos, gimnospermas y angiospermas (Tran *et al.*, 2012; Mayer y Harel, 1979). Las PPOs se han descrito en diversos tejidos de plantas como raíces (Pérez-Gilalbert *et al.*, 2001; Gandía-Herrero *et al.*, 2004), semillas (Paul y Gowda, 2000), hojas (Robinson y Dry, 1992; Sánchez-Ferrer *et al.*, 1993; Chazarra *et al.*, 1996; Mazzafera y Robinson, 2000; Chazarra *et al.*, 2001a; Shi *et al.*, 2002) y frutos (Murata *et al.*, 1992; Ding *et al.*, 1998b; Fraignier *et al.*, 1995; Serradell *et al.*,

2000; Casado *et al.*, 2005a, Sellés *et al.*, 2006; 2007).

Estudios clásicos de PPO localizan a la enzima en la fracción soluble de las células o fuertemente unida a membranas subcelulares (Mayer y Harel, 1979). A pesar de los posibles artefactos la mayoría de las PPOs vegetales se encuentran asociadas a membranas, principalmente a las membranas tilacoidales del cloroplasto (Tolbert, 1973). El tipo de unión a la membrana depende del tejido y del estado de desarrollo de la planta. Aunque las PPOs se han localizado en las membranas tilacoidales (Golbeck y Cammarata, 1981; Chazarra *et al.*, 1996), no son proteínas intrínsecas de membrana. A pesar de que en el tabaco (Hofer, 1964) se libera simplemente por fuerza iónica débil, para

la mayoría de los tejidos hacen falta tratamientos más energéticos para su solubilización: detergentes como Tritón X-100, (Harel y Mayer, 1971), Tritón X-114 (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1989), enzimas proteolíticas (Mayer, 1966) etc. Algunos tratamientos pueden alterar la estructura y la conformación de la enzima provocando el paso de su forma inactiva o latente a su forma activa (Kenten, 1958), si bien la recuperación de la enzima nativa latente es posible mediante el uso de detergentes no iónicos suaves (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1994). Esta solubilización también tiene lugar en condiciones naturales, como son la maduración de los frutos y el envejecimiento de los tejidos (Harel *et al.*, 1966; Kidron *et al.*, 1978).

Estudios realizados por Sommer *et al.* (1994) con cloroplastos aislados, demuestran que el proceso de translocación por transporte al cloroplasto de los polipéptidos de PPO de tomate (67 kDa) resultantes de la traducción en el citosol se lleva a cabo en dos pasos. Un primer paso implica la translocación por transporte hacia el estroma, produciéndose la eliminación del péptido de tránsito N-terminal y proporcionando un intermediario de 62 kDa y posteriormente un segundo paso de translocación por transporte a los tilacoides por un proceso dependiente de ATP, que genera una proteína madura de 59 kDa. En este tránsito el péptido señal se elimina por una peptidasa cloroplastídica (Koussevitzky *et al.*, 1998). Así mismo, Koussevitzky *et al.* (2004) han demostrado que el pretratamiento con metil

jasmonato (MeJA) de plantas de tomate incrementa considerablemente la eficiencia de la translocación por transporte de la polifenol oxidasa precursora (pPPO) del plástido al tilacoide. Estos autores muestran un incremento en el nivel de la polifenol oxidasa madura (mPPO) en la fracción del tilacoide después de las 8-16 h de tratamiento. Además este aumento en el nivel de mPPO parece ser específico al tratamiento con MeJA para plantas de tomate, debido a que otros tratamientos que incrementan la expresión de genes de PPO como daños mecánicos o exposición de las plantas a etileno durante 48 h (Thipyapong y Steffens, 1997), no muestran ningún efecto en la translocación por transporte del pPPO hacia el tilacoide. Esta eficiencia observada en el transporte de pPPO para

las plantas de tomate, se ha descrito para otras plantas de la misma familia como el tabaco, mientras que el tratamiento con MeJA de plantas leguminosas como el guisante, no afectó al transporte de los dos precursores de PPO (Koussevitzky *et al.*, 2004). La translocación de PPO está fuertemente inhibida por la presencia de pequeñas concentraciones de Cu^{2+} , lo que sugiere que la proteína ha de transportarse en su forma desplegada y además, indica que el dominio de unión a cobre tiene una fuerte afección por este metal (Sommer *et al.*, 1994). A pesar de esta fuerte unión del sitio activo por el cobre, los procesos de homogenización y extracción de tejidos para realizar los estudios de actividad de PPO en vegetales pueden provocar la pérdida de este metal de su lugar correspondiente en la enzima, provocando la pérdida de

actividad que a veces se puede recuperar mediante incubación con sales de cobre (Mari *et al.*, 1998; Casado *et al.*, 2005a). Nielsen *et al.* (1996) descubrieron que no hay péptido de tránsito N-terminal en tirosinasas de hongos, lo cual es coherente con la ausencia de compartimentos plastídicos en estos organismos. Así pues, las tirosinasas de hongos se encuentran localizadas en el citosol (Wickers *et al.*, 1995).

Aunque en varias investigaciones se ha descrito el posible papel de las polifenol oxidasas en plantas, la bibliografía sugiere su participación en la defensa de las plantas frente a patógenos y herbívoros. Aun así, las funciones biológicas de esta enzima siguen siendo hasta la fecha un enigma sin resolver. En este trabajo se hace una revisión amplia

de las propiedades moleculares de las PPOs, de su estructura y mecanismo catalítico, poniendo especial cuidado en su posible función biológica.

Propiedades moleculares de PPOs

En las plantas existe una gran cantidad y diversidad estructural de compuestos fenólicos pertenecientes a diversas familias como ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, ligninas y flavonoides (Lee y Whitaker, 1995; Tomás-Barberán y Espín, 2001). Estos compuestos desempeñan funciones importantes en las plantas, siendo las más relevantes las de protección frente a radiación ultravioleta y frente a condiciones de estrés biótico gracias a las propiedades antimicrobianas de los propios compuestos fenólicos y mediante el sellado de heridas por

lignificación (Hermann, 1976; Ke y Salveit, 1988; Macheix et al., 1991).

La composición de fenoles en los tejidos vegetales varía considerablemente según la especie de que se trate, grado de madurez de los frutos y manejo post-cosecha de los mismos (Tomás-Barberán y Espín, 2001). Además, para una misma especie el contenido de fenoles es dependiente de la variedad (Ding et al., 1998b; Ding et al., 2001). En algunos frutos los niveles de fenoles aumentan a lo largo del desarrollo, alcanzándose los niveles más altos durante la recolección (Casado et al., 2003), mientras que para diferentes variedades el contenido de fenoles decrece hasta alcanzar el mínimo en el momento del cambio de color del fruto (envero) y después aumenta progresivamente alcanzando el máximo

en la recolección. Sin embargo, las fluctuaciones en los niveles de fenoles suelen ser pequeños durante la maduración independientemente de algunas variedades (Ding et al., 1998b; Ding et al., 2001)

En la degradación oxidativa de estos compuestos fenólicos, participan dos enzimas que son muy relevantes en términos de calidad de frutos y vegetales, por la formación de melaninas que oscurecen los frutos. Estas enzimas son la polifenol oxidasa (PPO) y la peroxidasa (POD). A pesar de que las PODs están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, su papel en el pardeamiento enzimático de frutos y vegetales esta todavía bajo discusión, debido a que el nivel de H_2O_2 interno en las plantas limita la actividad peroxidasa.

Se ha propuesto que la PPO puede actuar como promotor de la POD puesto que en las reacciones de oxidación de compuestos fenólicos se genera H_2O_2 (Richard-Forget y Gaillard, 1997; Subramanian et al., 1999). El estado antioxidante de diferentes frutos y vegetales puede decrecer por la oxidación directa de estos en presencia de PPO y POD (Jiménez et al., 1998; Jiménez y GarcíaCarmona, 1999). Sin embargo, la principal enzima responsable del pardeamiento enzimático es la PPO, aunque no debe ser excluido un posible efecto sinérgico entre PPO y POD (Tomás-Barberán y Espín, 2001).

La prevención y control del pardeamiento enzimático, requiere un conocimiento bioquímico del tipo de sustratos fenólicos presentes en cada planta, del nivel de

compuestos reductores, el nivel de accesibilidad del O₂, la naturaleza de los diferentes compuestos oxidables y la polimerización y degradación de las o-quinonas. Además, es necesario conocer el nivel de PPO y los sustratos disponibles a lo largo de los diferentes estados de desarrollo de la planta y sobre todo, es importante distinguir entre el pardeamiento enzimático y el no enzimático (figura 1) (Lee y Whitaker, 1995).

El pardeamiento no enzimático consiste en la condensación de un grupo aldehído o cetona de un azúcar con un grupo amino libre para formar una base de Schiff, la cual se reorganiza para formar una cetamina estable (producto de Amadori) y finalmente se degradan a productos reactivos que contienen grupos

carbonilo. Estos grupos pueden reaccionar con grupos amino dando lugar a polímeros oscuros. Esta reacción que tiene lugar al calentar mezclas de aminoácidos y carbohidratos (Walker y Mckersie, 1993) se ha descrito en uva (Cheynier y Ricardo da Silva, 1991) y manzana (Oleszek et al., 1989; Richard-Forget et al., 1992a).

Entre las diferentes técnicas para controlar el pardeamiento y mantener la calidad de frutos y vegetales, una de las más usadas es la aplicación de inhibidores químicos, los cuales consiguen inactivar los mecanismos no deseados. La actividad de esta clase de inhibidores implica una interacción directa con la enzima o reaccionan preferiblemente con el producto que conduce por reacción

no enzimática a la formación de pigmentos oscuros

Las PPOs vegetales se describen generalmente como metaloenzimas que contienen dos átomos de cobre en el sitio activo (Mayer y Harel, 1979). El estado de oxidación del cobre en el centro activo de la polifenol oxidasa ha sido motivo de controversia desde el firme establecimiento de este metal como cofactor de la enzima.

La eliminación del péptido de tránsito N-terminal, responsable del paso del cloroplasto al tilacoide, reduciría la masa molecular de las PPOs entre 5 y 10 kDa quedando una proteína madura de unos 60 kDa (Robinson y Dry, 1992; Dry y Robinson, 1994; Cary *et al.*, 1992; Newman *et al.*, 1993; Thygesen *et al.*, 1995; Shahar *et al.*, 1992; Hunt *et al.*, 1993; Anderson y

Morris, 2003). El sitio de corte por una proteasa específica para eliminar el tránsito N-terminal se ha identificado como alanina-alanina o alanina-serina en todas las PPO de plantas examinadas hasta ahora (Lee y Whitaker, 1995). El análisis de la secuencia madura indica que la proteína comprende un dominio largo de aproximadamente 40 kDa con dos regiones de cobre altamente conservadas, las cuales son requeridas para la actividad de la enzima (Newman *et al.*, 1993; Hunt *et al.*, 1993; Van Gelder *et al.*, 1997), y un dominio C-terminal de aproximadamente 16 kDa que no tiene una función asignada claramente, aunque podría tener un papel en la activación de la enzima (Ratjhen y Robinson, 1992) (figura 1).

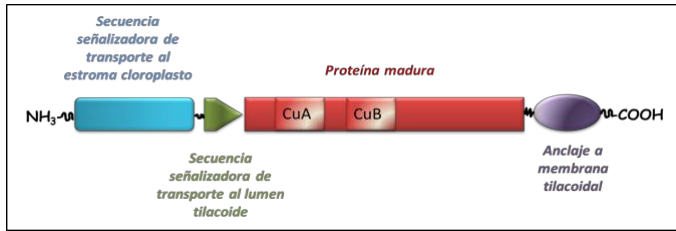


Figura 1. Esquema de los dominios funcionales de las PPOs en plantas. Por Jaime Morante Carriel

De los siete parálogos de PPO descritos en tomate, dos de ellos mostraron en la secuencia polipeptídica deducida una extensión del extremo C-terminal de carácter hidrofóbico que se supone que puede servir para interactuar con la membrana tilacoidal (Newman *et al.* 1993).

Haruta *et al.* (1999) compararon las secuencias de aminoácidos de PPO de diferentes vegetales (pera, melocotón, níspero, manzana, judía, patata, haba y

tomate), mediante el alineamiento de 204 aminoácidos que comprenden el centro activo de la enzima con los dos átomos de Cu. Estos autores muestran una gran similitud en la secuencia de aminoácidos para especies de la misma familia (manzana, pera, níspero y melocotón), con valores comprendidos entre 82.8 y 97.5%, mientras que el grado de similitud es menor, entre un 55.1 y 68.6% entre especies de diferente familia. Esta gran similitud, observada para las diferentes Rosáceas se ha descrito en plantas Solanáceas como el tomate (Newman *et al.*, 1993), patata (Hunt *et al.*, 1993) y tabaco (Goldman *et al.*, 1998). Asimismo, se ha mostrado la antigenicidad común de PPO de diferentes familias como guisantes, lechuga, espinaca y tabaco (Lanker *et al.*, 1988) usando anticuerpos específicos de PPO de haba. Por el

contrario, Haruta *et al.* (1999) utilizaron un anticuerpo específico de PPO de manzana que reaccionó con PPOs de la misma familia como níspero y pera, pero no mostró antigenicidad con especies de diferente familia como el caqui.

La determinación del peso molecular y la estructura cuaternaria de la enzima PPO en plantas superiores ha resultado problemática debido a la existencia de múltiples bandas electroforéticas que se interpretaron como fenómenos de asociación-disociación ó transformación de unas formas enzimáticas en otras durante la maduración (Harel *et al.*, 1973), pero que en realidad se debían a artefactos durante los procesos de extracción (Mayer y Harel, 1979). Por ello, el rango de pesos moleculares encontrados para las

PPOs de diferentes tejidos vegetales era bastante amplio, oscilando entre 10000-130000 Dalton.

El control de la oxidación de fenoles y la proteólisis durante la extracción rinde un polipéptido de 60 kDa, descrito por primera vez para haba (Robinson y Dry, 1992) y posteriormente para níspero en forma activa (Ding *et al.*, 1998b) y latente (Sellés *et al.* 2006). Aunque la proteína es monomérica, algunos autores presentan evidencias de estructuras conformadas por la unión de varias subunidades formando multímeros. En champiñón, la PPO forma asociaciones de diferentes tamaños (diméricas hasta octaméricas) con pesos moleculares de hasta 128 kDa (Lee y Whitaker, 1995). En lechuga (Chazarra *et al.*, 2001a) y judía (Kanade *et*

al., 2006) se han descrito formas tetraméricas.

Estructura y mecanismo catalítico

La única estructura de PPO determinada hasta la fecha es la de tubérculo de batata a partir de cristales por difracción de Rayos X (Klabunde *et al.*, 1998). Esto ha supuesto un gran avance en la comprensión de la estructura y mecanismo de las polifenol oxidasas. La proteína purificada empleada para la determinación estructural carecía de la extensión C-terminal, por tanto no existe ninguna estructura resuelta de la proteína madura completa. Como se muestra en la figura 2, la PPO de batata es un monómero de 39 kDa, que presenta forma elipsoidal, con dimensiones 55×45×45 Å.

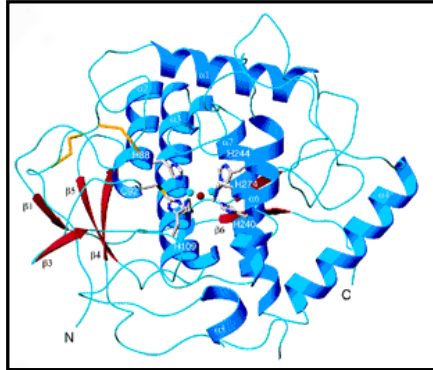


Figura 2. Representación estructural de PPO de batata (*Ipomoea batata*) según Klabunde *et al.* (1998).

En la figura 3, cada uno de los átomos de cobre del centro catalítico (CuA y CuB) se encuentra complejoado mediante tres residuos de histidina. CuA se encuentra coordinado a los residuos de histidina 88, 109 y 118, mientras que CuB se encuentra unido a los residuos de histidina en las posiciones 240, 244 y 274.

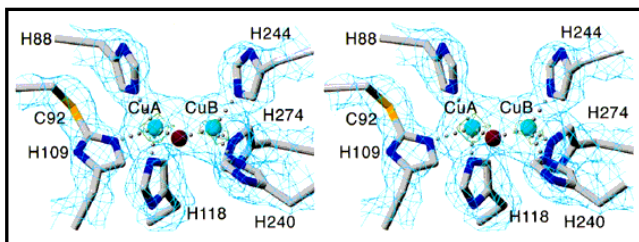
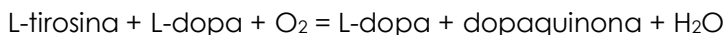


Figura 3. Estereografía de un detalle del centro activo de PPO de batata.

Para comprender el mecanismo de reacción complejo de esta enzima hay que tener en cuenta la estructura de su centro activo (figuras 2 y 3) con dos átomos de cobre (Klabunde *et al.*, 1998), la existencia de dos actividades catalíticas y la posterior evolución química de los compuestos formados.

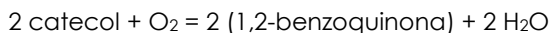
Las PPOs vegetales suelen presentar una doble actividad, monofenolasa (monofenol monooxigenasa) y difenolasa (catecol oxidasa):

Monofenol monooxigenasa / EC 1.14.18.1:



La actividad monofenol monooxigenasa o cresolasa consiste en la hidroxilación en la posición orto de monofenoles y oxidación del o-difenol intermedio hasta la o-quinona.

Catecol oxidasa / EC 1.10.3.1:



La actividad catecol oxidasa o catecolasa consiste en la oxidación de dos moléculas de un o-difenol a dos moléculas de o-quinona, y una reducción de oxígeno molecular, formándose dos moléculas de agua.

A pesar de que Kablunde *et al.* (1998) han propuesto un mecanismo algo diferente para la PPO de batata basado en datos de tipo bioquímico,

espectroscópico y estructural para esta enzima, nosotros mantenemos el modelo de Lee y Whitaker (1995) debido a que es un modelo general, capaz de explicar ambas actividades, catecolasa y cresolasa de la PPO de muchos vegetales y frutos. Este modelo es capaz de explicar la existencia de las tres formas enzimáticas (“met”, “oxi” y “desoxi”) y las particularidades de cada una de las dos actividades de la enzima (Figura 4).

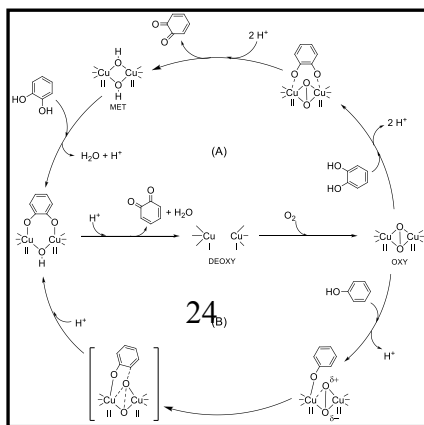


Figura 4. Mecanismo propuesto para la oxidación enzimática de o-difenoles (A) y monofenoles (B), mediante la participación de la enzima PPO. Adaptado de Lee y Whitaker (1995).

Las tres formas enzimáticas participan en el ciclo catecolasa (A): la forma “desoxi” une oxígeno, mientras que las formas “met” y “oxi” unen sendas moléculas de o-difenol. En este ciclo un o-difenol reduce al Cu (II) de la forma “met” al Cu (I), en este paso están implicados dos electrones. A continuación la forma “desoxi” reacciona con oxígeno molecular, formándose la forma “oxi”. Cada uno de los dos átomos de Cu (II) de la forma “oxi” se unen a un átomo de oxígeno de los grupos hidroxilo del o-

difenol dando lugar al complejo O₂-difenol-PPO. En el último paso, el o-difenol es oxidado a o-benzoquinona y la enzima es reducida a la forma "met". Para completar el ciclo, otra molécula de o-difenol se une a la forma "met" y se produce la oxidación del o-difenol a o-quinona y la correspondiente reducción de la forma "met" a la forma "desoxi" PPO.

En el ciclo cresolasa (B) sólo participan las formas "desoxi" y "oxi", debido a esto, para introducir toda la enzima en el ciclo cresolasa son necesarias cantidades catalíticas de difenol que lleva la forma "met" hasta "desoxi" (Lerch y Ettlinger, 1972). En este ciclo, la forma "oxi" reacciona con un sustrato monofenólico para formar un complejo ternario, que se reorganiza

dando lugar a un intermedio de reacción. Este intermedio es de naturaleza muy reactiva y conduce a la hidroxilación del sustrato, formándose o-difenol unido a la enzima.

La salida del producto implica la transferencia de 1 e⁻ a cada Cu²⁺, pasando estos a Cu¹⁺ y formándose o-quinona, agua y la forma “desoxi”. La regeneración de la forma “oxi” tiene lugar por la entrada de una nueva molécula de O₂. Esta secuencia de reacciones coincide con la primera mitad del ciclo de la actividad catecolasa, acentuando el íntimo acoplamiento de las actividades cresolasa y catecolasa. El nivel de o-difenol requerido como catalizador se alcanza mediante reacciones químicas lentas de reciclamiento de o-difenol a partir de formas quinónicas (figura 5)

(Cabanes *et al.*, 1987). Por este motivo, la actividad cresolasa presenta periodos de retardo en la acumulación de producto.

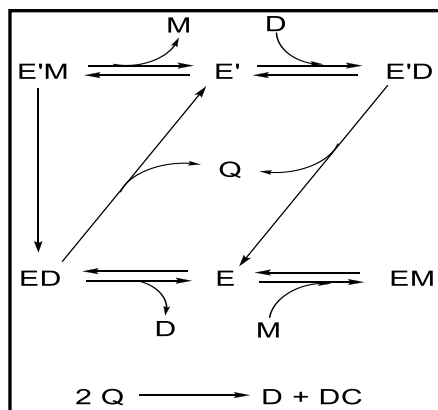


Figura 5. Mecanismo general que explica la ruta entre monofenoles y halocromos que incluye una etapa de reciclamiento del o-difenol a partir de las formas quinónicas (Cabanes y col., 1987). E = met-tirosinasa, E' = oxi-tirosinasa, M = monofenol, D = o-difenol, Q = o-quinona y DC= halocromo.

Como se ha comentado anteriormente, la oxidación de dos moléculas de o-difenol en presencia de la actividad catecolasa conlleva a la obtención de dos moléculas de o-quinona. Estas moléculas de color amarillento son muy reactivas e inestables y pueden reaccionar con nucleófilos como grupos tiol y amino de proteínas mediante un mecanismo no enzimático (García-Carmona *et al.*, 1982; Valero *et al.*, 1988).

Además, las o-benzoquinonas pueden reaccionar covalentemente con otros compuestos fenólicos mediante una reacción de adición para formar compuestos poliméricos de colores intensos que varían entre amarillo, rojo, azul, verde o negro (Wong y Staton, 1989) y que son responsables del aspecto final

de un tejido vegetal afectado de pardeamiento enzimático (figura 6).

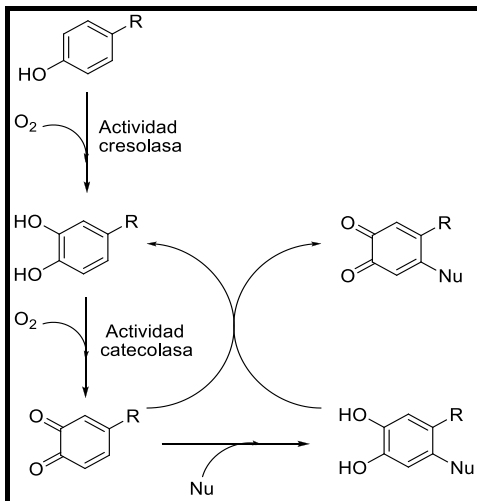


Figura 6. Reacciones de evolución de las o-quinonas producidas por tirosinasa o polifenol oxidasa. R = cadena lateral, Nu = grupo nucleofílico extra o intramolecular: -OH, -SH ó -NH₂.

Inhibidores de PPOs

Entre los diversos tipos de inhibidores de PPOs se destacan cuatro grupos: sulfitos, agentes antioxidantes o reductores, acidulantes y compuestos quelantes. Los sulfitos son los compuestos más efectivos en prevenir el pardeamiento enzimático (Sapers, 1993).

Aunque el mecanismo de actuación de los sulfitos para prevenir el pardeamiento no está claro, pueden provocar una inhibición directa de la enzima, como se ha observado en la inhibición de PPO de fresa por metabisulfito de sodio (Wesche-Ebeling y Montgomery, 1983), pueden interaccionar con los intermedios evitando que estos participen en la formación de pigmentos (Sayavedra-Soto y Montgomery, 1986) o pueden actuar como agentes reductores

convirtiendo a las quinonas en difenoles (Valero et al., 1988). A pesar de su efectividad en la prevención de la calidad de frutos y vegetales, estos compuestos están sujetos a restricciones debido a que provocan efectos adversos en la salud en personas sensibles. Entre los antioxidantes, se han empleado compuestos fenólicos sintéticos como butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA), ampliamente empleados en alimentación para proteger el sabor y color de los alimentos y algunos compuestos fenólicos naturales como tocoferol, derivados del ácido cinámico y flavonoides como la quercetina y el kaemferol (Ashie et al., 1996).

Una de las mejores alternativas al uso de los sulfitos es el ácido ascórbico (Wang et al., 2013), este compuesto es

altamente efectivo en la inhibición del pardeamiento por su habilidad de reducir las quinonas producidas por la PPO a los fenoles antes de que la reacción de formación de pigmentos tenga lugar. Sin embargo, el ácido ascórbico es muy reactivo y se oxida rápidamente a ácido dehidroascórbico (DHAA), pudiendo reaccionar con otros compuestos que conllevan a cambios en la calidad de los frutos. A veces se utiliza en combinación con acidulantes, siendo el más utilizado el ácido cítrico debido a su presencia natural en tejidos.

Otros inhibidores son los compuestos sulfhidrilos como mercaptoetanol, ditiotreitól y tiourea por su habilidad como agentes reductores, sin embargo, las concentraciones necesarias para prevenir

el deterioro del fruto no son permitidas en alimentación.

La cisteína se ha mostrado como un inhibidor fuerte de PPO en banana y manzana, siendo incluso más efectivo que el metabisulfito (Ashie et al., 1996; Richard-Forget et al., 1992b; Valero et al., 1988), sin embargo, la concentración necesaria para alcanzar altos niveles de inhibición tiene efectos negativos en el sabor de los frutos.

Además se han empleado agentes quelantes como ácidos policarboxílicos, polifosfatos y ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) para inactivar a la PPO.

A pesar de que muchos de estos compuestos son bastante efectivos en el control del pardeamiento enzimático, a

menudo su uso en alimentación está limitado por producir efectos adversos en la salud, debido a un coste efectivo o porque su acción es sólo temporal como el ácido ascórbico. Por este motivo, cada vez se recurre más a la utilización de productos naturales como las ciclodextrinas, que tienen la capacidad de incluir una amplia variedad de moléculas orgánicas e inorgánicas, incluyendo a los polifenoles (Cai et al., 1990; Bru et al., 1995), dentro de su cavidad hidrofóbica, aunque el coste es elevado.

Se han utilizado productos de la reacción de Maillard, sintetizados a partir de azúcares (pentosa, hexosa, o disacárido) y compuestos tiol como inhibidores del pardeamiento enzimático en frutos (manzana) y vegetales

(champiñón y berenjena) crudos y procesados (Billaud et al., 2005).

Función biológica

La función de la polifenol oxidasa en numerosos vegetales es todavía un enigma sin solucionar (Lee y Whitaker, 1995). A pesar de que las funciones biológicas no se conocen todavía en detalle, la bibliografía sugiere como función más aceptada la participación de estas enzimas en la defensa de las plantas frente a patógenos y herbívoros. Estos datos se basan en los siguientes hechos (Dongfeng *et al.*, 2004): (1) la costra de la melanina acumulada debido a la formación de o-quinonas puede prevenir la infección por el patógeno. Es decir, una lesión, corte o infección en un tejido vegetal produce la mezcla de la

enzima con sus substratos fenólicos, dando lugar a la formación de o-quinonas. Estas pueden unirse a proteínas inactivándolas o pueden polimerizar dando lugar a melaninas, que oscurecen o pardean la zona afectada haciéndola poco accesible para patógenos e invasiones bióticas; (2) la unión de las o-quinonas y proteínas pueden reducir el valor nutritivo de los aminoácidos nucleofílicos e inducir una defensa antinutritiva; (3) las o-quinonas pueden reprimir la propagación bacteriana y (4) un incremento en la cantidad de PPO se ha observado como una interacción incompatible huésped-patógeno.

Thipyapong *et al.* (2004) mostraron que la expresión de un RNA antisentido de PPO en tomate incrementaba dramáticamente la susceptibilidad a

Pseudomonas syringae expresando el gen avirulencia *avrPto*. Estos autores mostraron como hipótesis que al pH fisiológico, las quinonas nucleofílicas son más propensas a sufrir desproporciones reversas con fenoles para formar dos radicales semiquinona equivalentes (Guyot *et al.*, 1995; Guyot *et al.*, 1996). Estas semiquinonas pueden interactuar con O₂ para generar O₂⁻. Algunos autores han descrito que la PPO participa en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como productos secundarios de la oxidación de compuestos fenólicos en extractos de plantas (Richard-Foret y Gaillard, 1997; Subramanian *et al.*, 1999). Estos autores muestran que la oxidación de PPO de pera en presencia de catequina (Subramanian *et al.*, 1999) o la oxidación de PPO de té negro en presencia de

epicatequina (Richard-Foret y Gauillard, 1997) generan cantidades micromolares de H₂O₂. El papel del H₂O₂ es importante en los alrededores del tejido afectado por el patógeno ya que proporciona una toxicidad anti-microbiana, sirve como sustrato para el entrecruzamiento oxidativo de las paredes celulares, como inductor de genes protectores y como desencadenante de la muerte celular que da lugar a lesiones restringidas delimitadas por tejidos sanos (Grant y Laoke, 2000; García-Olmedo *et al.*, 2001).

Por otra parte, la sobreexpresión de PPO en plantas transgénicas de tomate, produjo una mayor velocidad de la oxidación de los sustratos fenólicos, además de mostrar una mayor resistencia frente a *Pseudomonas syringae* (Li y Steffens, 2002) respecto de las plantas

control; las líneas transgénicas mostraban síntomas menos severos, con lesiones 15 veces inferiores, y una fuerte inhibición (alrededor de 100 veces) del crecimiento bacteriano en las hojas infectadas. Aunque el mecanismo que provoca una mejora en la resistencia frente a determinados microorganismos no está todavía claro, los efectos biológicos de la PPO se basan en la naturaleza reactiva de las o-quinonas producidas. Otro ejemplo es la sobreexpresión y los altos niveles de PPO en hojas transgénicas de álamo, los cuales incrementan la resistencia frente a la oruga del álamo (*Malacosoma disstrica*) (Wang y Constabel, 2004), insecto que merma el crecimiento y causa mortalidad del álamo. Además recientemente, se ha mostrado la inducción de PPO en clavel (*Dianthus caryophyllus*) a las 12 y 24 horas

de la infección por *Fusarium oxysporum*, indicando que la PPO puede desempeñar un papel en la defensa de la planta, en fenómenos metabólicos probablemente relacionados con la lignificación y síntesis de compuestos fenólicos (Ardila e Higuera, 2005).

Se han descrito familias multigénicas de PPO que codifican diferentes polipéptidos en tomate (Newman *et al.*, 1993), patata (Thygesen *et al.*, 1995), banana (Gooding *et al.*, 2001) y álamo (Wang y Constabel, 2004), aunque no todas las PPOs pertenecen a familias multigénicas, pues en uva se ha hallado un gen único para PPO (Dry y Robinson, 1994). La expresión de parálogos de PPO está sometida a una estricta regulación espacio-temporal y por situaciones de estrés en un gran número de especies

(Thipyapong *et al.*, 1997; Thipyapong y Steffens, 1997; Wang y Constabel, 2004; Gooding *et al.*, 2001; Thygesen *et al.*, 1995; Boss *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2001), pero también se ha observado la expresión simultánea de dos o más genes en el mismo tejido para el mismo estado de desarrollo (Kim *et al.*, 2001; Thipyapong *et al.*, 1997). Aunque las secuencias que codifican las PPOs de tomate están altamente conservadas, las regiones 5' y 3' no traducidas de algunas PPOs son altamente divergentes, lo cual sugiere la existencia de diferentes mecanismos de regulación o la existencia de funciones biológicas muy diferentes (Newman *et al.*, 1993).

Determinados tejidos pueden experimentar aumentos localizados de PPO como consecuencia de ataques de

insectos y herbivoría, que provocan aumentos en los niveles de hormonas como el metil-jasmonato y hormonas peptídicas como la sistemina que actúan sobre los mecanismos de regulación de la expresión de PPO aumentando su concentración en los tejidos afectados (Constabel *et al.*, 2002; Czapski y Saniewski, 1988). También se ha demostrado que en tomate, la expresión de la isoenzima F de PPO es la más inducida cuantitativamente como respuesta a daños físicos y mecánicos (Thipyapong y Steffens, 1997). En otras especies vegetales como manzana (Boss *et al.*, 1995) y patata (Thipyapong *et al.*, 1995) se ha mostrado que la PPO puede ser inducida significativamente como respuesta a daños mecánicos. Boss *et al.* (1995) mostraron la acumulación de mRNA en frutos de manzana después de

producir daños en el tejido y Stewart *et al.* (2001) han demostrado que la PPO es inducida en hojas y frutos de piña después del daño. Sin embargo, no se observa incrementos significativos de PPO en piel o frutos de plátano después de las 72 horas de dañar el fruto. Este resultado sugiere que la respuesta de defensa, demostrada por un incremento de PPO en otras especies (Boss *et al.*, 1995; Stewart *et al.*, 2001) no está presente en frutos de plátano (Gooding *et al.*, 2001). Además se ha demostrado que algunas especies vegetales presentan una intensa actividad PPO en tricomas, con una función de defensa frente a insectos, (Kowalski *et al.*, 1990; Kowalski *et al.*, 1992).

La participación de las PPOs en la biosíntesis de productos de bajo peso molecular se ha probado en dos rutas

diferentes de la biosíntesis de pigmentos de plantas. Se ha encontrado en la flor de seda (*Portulaca grandiflora*) y remolacha roja (*Beta vulgaris*) (Steiner et al., 1999) una tirosinasa implicada en la biosíntesis de betalainas, que son pigmentos naturales nitrogenados, solubles en agua y se acumulan en flores y frutos (Steglich y Strack, 1990). Una PPO específica de chalcona (flavonoide minoritario) participa en la biosíntesis de aurona (pigmentos de color oro) y su participación se ha demostrado en flores de diente de dragón (*Antirrhinum majus*) (Strack y Schliemann, 2001).

Existen otras muchas hipótesis alrededor del posible papel fisiológico de las PPOs en plantas. Algunas funciones son; participación en la síntesis de componentes de la pared celular y

ligninas, papel en el ciclo de los fenilpropanoides (Vaughn y Duke, 1984), reacción de Mehler (reducción del O_2 a O_2^- en los cloroplastos), participación en el transporte de electrones y regulación del oxígeno (Vaughn *et al.*, 1988) y reguladora de la síntesis de hormonas vegetales como el ácido indolacético.

Conclusiones

La presencia de PPO se ha podido determinar y caracterizar empleando hojas y frutos de numerosas especies vegetales como fuente enzimática, según esta caracterización, los niveles de PPO varían dependiendo de la especie, cultivar, estadio de maduración y estadio

fenológico. En tejidos vegetales intactos las PPOs y sus sustratos fenólicos permanecen en compartimentos separados (cloroplastos y vacuolas), por lo que no tiene lugar ninguna reacción.

La desorganización de la integridad de las células sucede como consecuencia de daños mecánicos o de forma natural durante procesos de senescencia, provocando una ruptura celular y una puesta en contacto de PPO y fenoles dando lugar a reacciones de pardeamiento enzimático observadas en frutos maduros, tejidos dañados, procesados y en tejidos afectados por fisiopatías. El conocimiento de las PPOs en frutos y vegetales, es un paso fundamental en la investigación, puesto que permitirá mejorar la calidad y apariencia de los frutos y vegetales frescos

y procesados, reduciendo las pérdidas económicas que supone su efecto en la industria agroalimentaria.

La función de la enzima en la mayoría de los casos aún no se conoce de forma inequívoca o definitiva. Aunque la biología molecular se ha utilizado cada vez más para estudiarla, este enfoque no ha facilitado una clara respuesta, en especial en lo que respecta a los mecanismos relacionados con su función. Las razones de la latencia de la enzima y de como esta se convierte *in vivo* en la forma activa, todavía no están claras, tampoco sabemos lo que regula la conversión de la forma latente a la forma activa.

La interacción entre la enzima y sus sustratos y de cómo interactúan en

determinadas circunstancias es todavía un misterio que requiere mayor estudio. El papel de las PPOs en plantas relacionados con fenómenos de resistencia contra diferentes patógenos y herbívoros requiere más investigaciones detalladas, utilizando técnicas de biología molecular, bioquímica clásica y fisiología del desarrollo.

A pesar de la importancia de la PPO en las reacciones de pardeamiento y procesamiento de alimentos, se ha registrado un progreso limitado en este sentido, y tal vez sea necesario un nuevo enfoque.

Agradecimientos

Los autores agradecen por su contribución y apoyo al Grupo de

Investigación Proteómica y Genómica Funcional de Plantas de la Universidad de Alicante, España. Al Grupo de Biotecnología y Biología Molecular – DICYT de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador y a la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (Senescyt), Gobierno de Ecuador.



Referencias bibliográficas

Anderson, J.A. and Morris, C.F. 2003.

Purification and analysis of wheat grain polyphenol oxidase (PPO) protein. *Cereal Chem.* 80:135-143.

Ardila, H. and Higuera, B.L. 2005.

Polyphenol oxidase and beta-1-3-glucanase differential induction in

carnation (*Dianthus caryophyllus*)
infected by *Fusarium oxysporum* f. sp.
Dianthi race 2. Acta Biol. Colomb.
10:61-74.

Ashie, I.N.A., Simpson, B.K. and Smith, J.P.
1996. Critical Reviews in Food and
Science Nutrition 36(1-2): 1-30

**Billaud, C., Maraschin, C.Y., Chow, N.,
Chériot, S., Peyrat-Maillard, M.N. and
Nicolas, J. 2005.** Maillard reaction
products as natural antibrowning
agents in fruit and vegetable
technology. Molecular Nutrition and
Food Research 49(7): 656-662.

**Boss, P.K., Gardner, R.C., Janssen, B.J. and
Ross, G.S. 1995.** An apple polyphenol
oxidase cDNA is up-regulated in

wounded tissues. *Plant Mol. Biol.* 27:429-433.

Bru, R., Sánchez-Ferrer, A., Pérez- Gilabert, M., LópezNicolás, J. and García-Carmona, F. 1995. Plant protein purification using cloud point extraction (CPE). In: *Surfactants in solution*, Chattopadhyay, A. and Mittal, K. (Eds). Marcel Dekker, Inc. New York, 367-377. New York.

Cabanes, J., García-Canovas, F. and García-Carmona, F. 1987. Chemical an enzymatic oxidation of 4-methylcatechol in the presence and the absence of L-serine. Spectrophotometric determination of intermediates. *Biochim. Biophys. Acta.* 912:190-197.

Cai, Y., Caffney, H.G., Lilley, T.H., Magnolato, D., Martin, R., Spencer, C.M. and Haslam, E. 1990. Polyphenol interactions. Part 4. Model studies with caffeine and cyclodextrins. Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction, 2:2197-2209

Cary, J.W., Lax, A.R. and Flurkey, W.H. 1992. Cloning and characterisation of cDNAs coding for *Vicia faba* polyphenol oxidase. Plant Mol. Biol. 20:245-253.

Casado-Vela, J., Sellés, S., Gómez-Lucas, I. and Bru, R. 2003. Evolution of phenolics and polyphenol oxidase isoenzymes in relation to physical-chemical parameters during loquat (*Eriobotrya japonica* cv. Algerie) fruit development and ripening. Options

Mediterranees, Serie A: Seminaires
Mediterranees, 58:161-164

Casado-Vela, J., Sellés, S., and Bru, R.

2005a. Proteomic approach to blossom-end rot in tomato fruits (*Lycopersicon esculenrum* M.). *Proteomics* 5:2488-2496.

Chazarra, S., Cabanes, J., Escribano, J.

and García-Carmona, F. 1996. Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg Lettuce (*Latuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 44:984-988.

Chazarra, S., García-Carmona, F. and

Cabanes, J. 2001a. Evidence for a tetrameric form of iceberg lettuce (*Latuca sativa*) Polyphenol oxidase:

purification and characterization. J. Agric. Food Chem. 49: 4870-4875.

Cheyrier, V. and Ricardo da Silva, J.M.

1991. Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing trans-caffeoyltartaric acid and polyphenol oxidase. Journal of Agricultural and Food Chemistry 39:1047-1049.

Constabel, C., Bergey, D. and Ryan, C.

2002. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. 92:407-411.

Czapski, J. and Saniewski, M. 1988. The effect of methyl jasmonate on

polyphenol oxidase and peroxidase activities in tomato fruit. Bull. Pol. Acad. Sci. Biol. 36:127-132.

Ding, C.K., Chachin, K., Ueda, Y. and Imahori, Y. 1998b. Purification and properties of polyphenol oxidase from Loquat fruit. J. Agric. Food Chem. 46:4144-4149.

Ding, C.K., Chachin, K., Ueda, Y., Imahori, Y. and Wang, C.Y. 2001. Metabolism of phenolic compounds during loquat fruit development. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(6): 2883-2888.

Dongfeng, L., Feng, Y. and Jiang, D. 2004. Characterization of polyphenol oxidase from plants. Prog. Nat. Sci. 14:553-561.

Dry, I.B. and Robinson, S.P. 1994. Molecular cloning and characterisation of grape berry polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 26:495-502.

Fraignier, N., Marqués, L., Fleuriet, A. and Macheix, J.J. 1995. Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of *Prunus*. *J. Agric. Food Chem.* 43:2375-2380.

Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. and Escribano, J. 2004. Purification and characterization of a latent polyphenol oxidase from beet root (*Beta vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 52:606-615.

García-Carmona, F., García-Canovas, F., Iborra, J.L. and Lozano, J.A. 1982. Kinetic study of the pathway of melanization between L-dopa and dopachrome. *Biochim. Biophys. Acta* 717:124-131.

García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J.M., López-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M. and Poza-Carrión, C. 2001. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Lett.* 498:219-222.

Golbeck, J.H. and Cammarata, K.V. 1981. Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67:977-984.

Goldman, J., Seurink, M., Marins, G.H., Goldman, C. and Mariani, A. 1998. A tobacco flower-specific gene encodes a polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 36:479-485.

Gooding, S.P., Bird, C. and Robinson, P.S. 2001. Molecular cloning and characterisation of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta* 213:748-757.

Grant, J.J. and Loake, G.J. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* 124:21-29.

Guyot, S., Cheynier, V., Souquet, J.M. and Moutounet, M. 1995. Influence of pH on the enzymatic oxidation of (+)-

catechin in model systems. J. Agric. Food Chem. 43:2458-2462.

Guyot, S., Vercauteren, J. and Cheynier, V. 1996. Structural determination of colourless and yellow dimmers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenol oxidase. Phytochemistry 42:1279-1288.

Harel, E. and Mayer, A.M. 1971. Partial purification and properties of catechol oxiases in grapes. Phytochemistry 10:17-22.

Harel, E., Mayer, A.M. and Lehman, E. 1973. Multiple forms of Vitis vinifera catechol oxidase. Phytochemistry 12:2649-2654.

Harel, E., Mayer, A.M. and Shain, Y. 1966.

Catechol oxidases, endogenous substrates and browning in developing apples. *J. Sci. Food Agric.* 17:389-392.

Haruta, M., Murata, M., Kadokura, H. and

Homma, S. 1999. Immunological and molecular comparison of polyphenol oxidase in *Rosaceae* fruit trees. *Phytochemistry* 50:1021-1025.

Hermann, K. 1976. Flavonols and flavones

in food plants: a review. *Journal of Food Science and Technology* 11(5): 433-448.

Hofer, A. 1964. Intracellular localization of

phenolases in tobacco leaves. *Planta* 62:137-159.

Hunt, M.D., Eannetta, N.T., Haifeng, Y., Newman, S.M. and Steffens, J.C. 1993. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 21:59-68.

Kanade, S., Paul, B., Rao, A.G. and Gowda, L.R. 2006. The conformational state of polyphenol oxidase from field bean (*Dolichos lablab*) upon sodium dodecyl sulfate and acid-pH activation. *Biochem. J.* 395:551-562.

Ke, D. and Salveit, E. 1988. Plant hormone interaction and phenolic metabolism in the regulation of russet spotting in iceberg lettuce. *Plant Physiology* 88(4): 1136-1140.

Kenten, R.H. 1958. Latent phenolase in extracts of broad bean (*Vicia faba* L.)

leaves. Activation by anionic weyying agents. *Biochem. J.* 68:244-251.

Kidron, M., Harel, E. and Mayer, A.M. 1978.

Catechol oxidase activity in grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 29:30-35.

Kim, J.Y., Seo, Y.S., Kim, J.E., Sung, S.K.,

Song, K.J., An, G. and Kim, W.T. 2001.

Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the *Fuji* apple. *Plant Science* 161:1145-1152.

Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C.

and Krebs, B. 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struc. Biol.* 5:1084-1090.

Koussevitzky, S., Ne'eman, E., Sommer, A., Steffens, J. and Harel, E. 1998. Purification and properties of a novel chloroplast stromal peptidase. *J. Biol. Chem.* 273:27064-27069.

Koussevitzky, S., Ne'eman, E. and Harel, E. 2004. Import of polyphenol oxidase by chloroplasts is enhanced by methyl jasmonate. *Planta* 219:412-419.

Kowalski, S., Banberg, J., Tingey, W. and Steffens, J. 1990. Insect resistance in the wild potato *Solanum berthaultii*: Inheritance of granular trichome polyphenol oxidase. *J. Hered.* 81:475-478.

Kowalski, S.P., Eannetta, N.T., Hirzal, A.T. and Steffens, J.C. 1992. Purification

and characterisation of polyphenol oxidase from glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. Plant Physiol. 100:677-684.

Lanker, T., Flurkey, W.H. and Huges J.P. 1988. Cross-reactivity of polyclonal and monoclonal antibodies to polyphenoloxidase in higher plants. Phytochemistry 27:3731-3734.

Lee, C.Y. and Whitaker, J. 1995. Enzymatic browning and its prevention, ACS Symposium Series 600, Washington, D.C; American Chemical society Ed.

Lerch, K. and Ettinger, L. 1972. Purification and characterization of a tyrosinase from *Streptomyces glaucenses*. Eur. J. Biochem. 31:427-437.

Li, L. and Steffens, J. 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215:239-247.

Macheix, J.J., Sapis, J.C. and Fleuriet, A. 1991. Phenolic compounds and polyphenol oxidase in relation to browning in grapes and wines. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 30(4): 441-486

Mari, S., Marquès, L., Breton, F., Karamanos, Y. and Macheix, J.J. 1998. Unfolding and refolding of active apple polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 49:1213-1217.

Mayer, A.M. 1966. Catechol oxidase; enzymic liberation from sugar beet

chloroplasts. *Phytochemistry* 5:1297-1301.

Mayer, A. M. and Harel, E. 1979.
Polyphenol oxidases in plants.
Phytochemistry 18:193-215.

Mazzafera, P. and Robinson, S.P. 2000.
Characterization of polyphenol
oxidase in coffee. *Phytochemistry*
55:285-296.

**Murata, M., Kurokami, C. and Homma, S.
1992.** Purification and some
properties of chlorogenic acid
oxidase from apple (*Malus pumila*).
Biosci. Biotech. Biochem. 56:1705-
1710.

**Newman, S.M., Eannetta, N.T., Yu, H.,
Prince, J.P., de Vincente, M.C.,
Anksley, S.D. and Steffens, J.C. 1993.**

Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Mol. Biol.* 21:1035-1051.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Von Heijne, G. and Brunak, S. 1996. Defining a similarity threshold for a functional protein sequence pattern: The signal peptide cleavage site. *Proteins-Structure, Function and Genetics* 24:165-177.

Oleszek, W., Chang, Y.L., Jaworski, A.W. and Price, K.R. 1989. Apple phenolics and their contribution to enzymatic browning reactions. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 58(2): 273-283

Paul, B. and Gowda, L.R. 2000. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of Field bean

(*Dolichos lablab*). J. Agric. Food Chem. 48:3839-3846.

Perez-Gilalbert, M., Morte, A., Honrubia, M. and García-Carmona, F. 2001. Partial purification, characterization, and histochemical localization of fully latent desert truffle (*Terfezia Claveryi Chatin*) polyphenol oxidase. J. Agric. Food Chem. 49:1922-1927.

Rathjen, A.H. and Robinson, S.P. 1992. Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated Grapevine mutant. Plant Physiol. 99:1619-1625.

Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M. and Nicolas, J.J. 1992a. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. Kinetic studies. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40: 2108-2113.

Richard-Forget, F.C. and Gaillard, F. 1997.

Oxidation of chlorogenic acid, catechins and 4-methylcatechol in model solutions by combination of pear (*Pyrus communis* cv. williams) polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. J. Agric. Food Chem. 45:2472-2476.

Robinson, S.P. and Dry, I.B. 1992.

Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60-kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage. Plant Physiol. 99:317-323.

Sánchez-Ferrer, A., Bru, R. and García-

Carmona, F. 1989. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenol oxidase using

temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol.* 91:1481-1487.

Sánchez-Ferrer, A., Bru, R. and García-Carmona, F. 1994. Phase separation of biomolecules in polyoxyethylene glycol nonionic detergents. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 29:275-313.

Sánchez-Ferrer, A., Laveda, F. and García-Carmona, F. 1993. Substrate-Dependent activation of latent potato leaf polyphenol oxidase by anionic surfactants. *J. Agric. Food Chem.* 41:1583-1586.

Sapers, G.M. 1993. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Thecnology* 47: 75-84

Sayavedra-Soto, T. and Montgomery, M.

1986. Inhibition of polyphenol oxidase by sulfite. *Journal of Food Science* 51: 1531-1536

Sellés-Marchart S, Casado-Vela J, Bru-

Martínez R. 2007. Effect of detergents, trypsin and unsaturated fatty acids on latent loquat fruit polyphenol oxidase: basis for the enzyme's activity regulation. *Arch Biochem Biophys.* 15;464(2):295-305.

Sellés-Marchart S, Casado-Vela J, Bru-

Martínez R. 2006. Isolation of a latent polyphenol oxidase from loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.): kinetic characterization and comparison with the active form. *Arch Biochem Biophys.* 15;446(2):175-85.

Serradell, M.A., Rozenfeld, P.A., Martínez, G.A., Civello, P.M., Chaves, A.R. and Añon, M.C. 2000. Polyphenol oxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria ananassa*, Duch., cv Selva): characterisation and partial purification. *J. Sci. Food Agric.* 80:1421-1427.

Shahar, T., Henning, N., Guttinger, T., Hareven, D. and Lifschitz, E. 1992. The tomato 66.3-kDa polyphenol oxidase gene: molecular identification and developmental expression. *Plant Cell.* 4:135-147.

Shi, C., Dai, Y., Xu, X., Xie, Y. and Liu, Q. 2002. The purification of polyphenol oxidase from tobacco. *Protein expression and purification* 24:51-55.

Sommer, A., Ne'eman, E., Steffens, J., Mayer, A.M. and Harel, E. 1994. Import, targeting and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* 105:1301-1311.

Steglich, W. and Strack, D. 1990. In the alkaloids., *Chemistry and Pharmacology.* Ed: Brossi, A. Academic Press, London.

Steiner, U., Schliemann, W., Böhm, H. and Strack, D. 1999. Tyrosinase involved in betalain synthesis of higher plants. *Planta* 208:114-124.

Stewart, R.J., Sawyer, B.J.B., Bucheli, C.S. and Robinson, S.P. 2001. Polyphenol oxidase is induced by chilling and

wounding in pineapple. Australian J. Plant Physiol. 28:181-191.

Strack, D. and Schliemann, W. 2001. Bifunctional polyphenol oxidases: Novel functions in plant pigment biosynthesis. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 40: 3791-3794.

Subramanian, N., Venkatesh, P. Ganguli, S. and Sinkar, V.P. 1999. Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. J. Agric. Food Chem. 47:2571-2578.

Thipyapong, P., Hus, A. and Steffens, J. 1995. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. Phytochemistry 40:673-676.

Thipyapong, P., Joel, D.M and Steffens, J.C.

1997. Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. *Plant Physiol.* 113:707-718.

Thipyapong, P. and Steffens, J. 1997.

Tomato polyphenol oxidase. Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signal. *Plant Physiol.* 115:409-418.

Thipyapong, P., Hunt, M.D. and Steffens, J.

2004. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta* 220:105-117.

Thygesen, P.W., Dry, I.B. and Robinson, S.P.

1995. Polyphenol oxidase in potato. *Plant Physiol.* 109:525-531.

Tolbert, N. 1973. Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. *Plant Physiol.* 51:234-244.

Tran T Lan, Taylor S John and Constabel C

Peter. 2012. The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genomics* 13:395.

Tomás-Barberán, F.A. and Espín, J.C. 2001.

Phenolic compounds and related enzymes of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81(9): 853-876

Valero, E., Escribano, J. and García-Carmona, F. 1988. Reactions of 4-methyl-o-benzoquinone generated chemically or enzymically, in the presence of L-proline. *Phytochemistry* 27:2055-2061.

Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H. and Wichers, H.J. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 45:1309-1323.

Vaughn, K.C., Lax, A.R and Duke, S.O. 1988. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiol Plant.* 72:659-665.

Vaughn, K.R. and Duke, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in

higher plants. *Physiol Plant.* 60:106-112.

Walker, M. and McKersie, B. 1993. Role of the ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. *Journal of Plant Physiology* 141(2): 234-239.

Wang, J. and Constabel, C.P. 2004. Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta* 220:87-96.

Wang, C., Jing-fang, Z., Zhang, Y., and Cheng, B. 2013. Characterization and Inhibitors of Polyphenol Oxidase from Chinese Toon. *Food Biotechnology* 27(3): 165-178

Wesche-Ebeling, P. and Montgomery, M.W. 1983. Extraction and partial characterization of strawberry polyphenol oxidase. IFT Meet., Abstr. 43rd Annu 295.

Wickers, H.J., Van de Bosch, T., Gerritsen, Y.A.M., Oyevaar, J.I., Ebbelaar, M.C.E. Recourt, K. and Kerrigan, R.W. 1995. Mushroom Science. XIV 720.

Wong, M. and Stanton, D.W. 1989. Nonenzymic browning in Kiwi fruit juice concentrate systems during storage. J. Food Sci. 54:669-673.

JAIME MORANTE CARRIEL es Doctor en Biología Experimental y Aplicada por la Universidad de Alicante, España. Es Máster en Biología por la Universidad Internacional de Andalucía, España. Es Ingeniero Forestal por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo-UTEQ, Ecuador. Actualmente es Profesor Titular Principal de la Facultad de Ciencias Ambientales e Investigador del Departamento de Biotecnología de la UTEQ. Imparte las asignaturas de Biología, Bioquímica y Biología Molecular en la Carrera de Ingeniería Forestal y Ambiental. Sus labores de investigación las realiza en el Laboratorio de Biología Molecular de la UTEQ. Ha publicado diferentes artículos científicos en revistas científicas de importancia internacional. Cuenta con un Posdoctorado en Genómica Funcional de Plantas en España. Ha participado en más de 40 congresos, encuentros científicos, simposios y seminarios de carácter internacional y nacional en las áreas de Biotecnología, Biología Molecular y Genómica de Plantas.

ANNA AGNIESZKA OBREBSKA es Doctora en Biología Experimental y Aplicada por la Universidad de Alicante-UA, España. Es Máster en Biotecnología por la UA, España. Es Bióloga por Nicolaus Copernicus University, Polonia. Ha sido investigadora contratada por la Estación Experimental Tropical Pichilingue del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias-INIAP, Ecuador. Sus labores de investigación las realiza en colaboración con el Laboratorio de Biología Molecular de la UTEQ. Ha publicado diferentes artículos científicos en revistas científicas indexadas. Ha participado en más de 10 congresos, encuentros científicos, simposios y seminarios de carácter internacional en las áreas de Biotecnología, Microbiología y Genética Molecular.

ROQUE BRU MARTINEZ es Doctora en Biología por la Universidad de Murcia-UM, España. Es licenciado en Biología por la UM, España. Es Catedrático de la Universidad de Alicante-UA, España. Es Director del Departamento de Agroquímica y Bioquímica de la UA y responsable del Grupo de Investigación Proteómica y Genómica Funcional de Plantas de la UA. Imparte las asignaturas de Biología, Genómica, Proteómica en grado y posgrado. Cuenta con dos Posdoctorados, uno en Biopolímeros en el Instituto Politécnico Federal de Zurich, Suiza y en Genómica de Plantas en la Universidad de Murcia, España. Ha dirigido y codirigido alrededor de 30 Tesis de tesis de Máster y 20 de Doctorado. Ha formado a becarios de diferentes partes del mundo. Ha publicado cerca de 200 artículos científicos en revistas científicas de reconocido prestigio internacional. Ha participado en más de 100 congresos, encuentros científicos, simposios y seminarios en las áreas de Biotecnología, Proteómica, Genómica Transcriptómica, Metabolómica y otras.

MERCEDES CARRANZA PATIÑO es Máster en Biotecnología por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo-UTEQ, Ecuador. Es Ingeniera Forestal por la UTEQ, Ecuador. Es Profesora Titular Agregado y Decana de la Facultad de Ciencias Ambientales. Realiza investigación en el Departamento de Biotecnología de la UTEQ. Imparte las asignaturas de Biología y Biotecnología en la Carrera de Ingeniería Forestal y Ambiental. Sus labores de investigación las realiza en el Laboratorio de Biología Molecular de la UTEQ. Ha publicado diferentes artículos científicos en revistas científicas de importancia internacional. Ha participado en más de 30 congresos, encuentros científicos, simposios y seminarios de carácter internacional y nacional en Biotecnología y Biología Molecular de Plantas. Actualmente realiza un Doctorado en Biología en la Universidad de Cali, Sede Palmira, Colombia.

