

Caracterización cinética de la enzima polifenol oxidasa en seis estadios de maduración en lulo (*Solanum quitoense* Lam.) var. Castilla

Kinetic characterization of the polyphenol oxidase enzyme in six ripening stages in lulo (*Solanum quitoense* Lam.) var. Castilla

Clara M. Mejía-Doria^{1, 5*}, Duverney Gaviria-Arias^{2, 6}, Roque Bru-Martínez^{3, 6}, Lucero Rengifo-Ramos^{2, 6}, Álvaro H. Alegría-Soto^{4, 6}, Enrique Aguilar-Fernández^{2, 6}

Resumen

En Colombia, el lulo (*Solanum quitoense* Lam.), presenta un área cosechada de 4.868 hectáreas y una producción anual de 38.910 toneladas, siendo un recurso de importancia por la relevancia de este cultivo para la economía nacional. El pardeamiento enzimático es un problema que afecta los frutales por sus efectos negativos sobre las características nutricionales y organolépticas. Este proceso es catalizado por enzimas con actividad de polifenol oxidasa (PFOs; PFO: EC 1.10.3.1, 1.10.3.2 y/o 1.14.18.1) y varía dependiendo de la especie, cultivar, estadio de maduración y estadio fenológico de la planta específica. Sin embargo, las propiedades de esta enzima en el lulo no han sido adecuadamente estudiadas. Para comprender el comportamiento de esta enzima en los frutos de lulo, se evaluaron sus características fisicoquímicas y cinéticas. El estudio fue llevado a cabo en los seis estadios de maduración definidos comercialmente (0 hasta 5). Se determinaron las características óptimas de funcionamiento para la enzima con actividad PFO en términos de temperatura, pH, concentración de sustrato y cantidad de enzima, mediante ensayos espectrofotométricos ($A_{412\text{ nm}}$) utilizando catecol como sustrato. Los estudios cinéticos mostraron variabilidad en los parámetros de la constante de Michaelis-Menten (K_M ; $1,16 \pm 0,07 - 5,71 \pm 0,14$) y la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$; $30,212 \pm 1,77 - 188,679 \pm 14,26$) dependiendo del estadio de maduración. Los frutos de lulo en los estadios de maduración 3 y 4 fueron los que presentaron menor actividad de la enzima PFO, sugiriendo que estos pueden ser los estadios en los cuales deberían ser cosechados para minimizar el proceso de pardeamiento enzimático.

Palabras clave: actividad enzimática, lulo, parámetros cinéticos, pardeamiento enzimático, polifenol oxidasa, *Solanum quitoense*

Abstract

Enzymatic browning is a problem that affects fruits due to its negative effects on nutritional and organoleptic characteristics. This process is catalyzed by enzymes with polyphenol oxidase activity (PPOs; PFO: EC 1.10.3.1, 1.10.3.2 y/o 1.14.18.1) and varies depending on the species, cultivar, maturity and specific plant phenological stage. In lulo (*Solanum quitoense* Lam.), with a cultivated area in Colombia of 4868 hectares and an annual production of 38910 tons, it is an important problem because of the relevance of this crop for the national economy. However, the properties of this enzyme in lulo have not been adequately studied. In order to understand the behavior of the enzyme in lulo fruits, several physicochemical and kinetic characteristics were evaluated. The study was conducted on the six commercially defined maturation stages (0 to 5). We determined the optimum functional characteristics for PPO activity in terms of temperature, pH, substrate concentration and amount of the enzyme, through spectrophotometric assay ($A_{412\text{ nm}}$) using catechol as a substrate. Kinetic studies showed variability in the parameters K_M ($1.16 \pm 0.07 - 5.71 \pm 0.14$) and $V_{m\acute{a}x}$ ($30.212 \pm 1.77 - 188.679 \pm 14.26$), depending on the maturation stage. The lulo fruits in maturation stages 3 and 4 were those with lower PFO enzyme activity, suggesting that these may be the stage in which they can be harvested to minimize the enzymatic browning process.

Key words: *Solanum quitoense*, enzymatic browning, polyphenol oxidase, kinetic parameters, enzymatic activity, spectrophotometric assay, maturation stages

Recibido: julio 2013; aceptado: abril 2014.

¹ Centro de Biología Molecular y Biotecnología, Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira (Risaralda), Colombia.

² Docente Investigador, Centro de Biología Molecular y Biotecnología, Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira (Risaralda), Colombia.

³ Docente Investigador, Departamento de Agroquímica y Bioquímica, Universidad de Alicante. Alicante, España.

⁴ Docente Investigador. Director, Centro de Biología Molecular y Biotecnología, Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira (Risaralda), Colombia.

Correos electrónicos (*autor para correspondencia): ⁵ <cmmejia@uniquindio.edu.co>; ⁶ <cenbiotep@utp.edu.co>.

INTRODUCCIÓN

En Colombia, el cultivo de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) se encuentra ampliamente distribuido en varios departamentos: Boyacá, Cauca, Cesar, Cundinamarca, Huila, Magdalena, Nariño y Valle del Cauca. Debido a su valor nutritivo, sabor, color y posibilidades de uso en la agroindustria, el lulo es una de las frutas más apetecidas en los mercados nacionales e internacionales, con amplias perspectivas para la exportación a los mercados de Estados Unidos, Japón y la Comunidad Europea (Bermeo 2005, Lobo y Medina 2000). Sin embargo, este fruto presenta marcada tendencia al pardeamiento enzimático, proceso que ocasiona cambios en las propiedades organolépticas y pérdidas del valor nutricional (Queiroz et al. 2011). El pardeamiento enzimático es el principal causante del deterioro de características como aroma, color y sabor en la gran mayoría de frutas y verduras de importancia agrícola y económica, hecho que limita de manera significativa la posibilidad de comercialización del producto, ya sea para el consumo en fresco o para el procesamiento industrial (Queiroz et al. 2011).

Este fenómeno de pardeamiento enzimático es ocasionado por la actividad de una familia de enzimas denominadas polifenol oxidasas [PFO: EC 1.10.3.1 y EC 1.14.18.1; BRaunschweig ENzyme Database (**BRENDA**); Brenda 2011, KEEG 2011] las cuales se encuentran confinadas en los plastidios (cloroplastos) de la células vegetales y son liberadas al citoplasma una vez se ha producido daño mecánico en la estructura tisular y celular (Marshall y Yoruk 2006, Mayer 2006). Las PFO son metaloproteínas de cobre que usan oxígeno molecular para catalizar la *o*-hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles y finalmente a *o*-quinonas. Las *o*-quinonas generadas se polimerizan y reaccionan con los aminoácidos y las proteínas para formar complejos coloreados (negros-cafés) (Kumar et al. 2008, Mayer 2006, Zawistowski et al. 1991). Debido al impacto negativo de esta reacción para la industria alimenticia las enzimas con actividad de polifenol oxidasa han sido ampliamente estudiadas (Casado-Vela et al. 2005, Gawlik-Dziki et al. 2007, Marri et al. 2003, Sellés-Marchat et al. 2006, Terefe et al. 2010, Yang et al. 2001).

Varios trabajos para la caracterización de la actividad enzimática de polifenol oxidasa en vegetales han sido llevados a cabo en mango (Guerrero-Beltran et al. 2004), marula (Mdluli 2005), mamey (Palma-Orozco et al. 2011) y palmitos (Shimizu et al. 2011). Sin embargo, sobre el fruto de lulo no hay información relacionada con el aislamiento, purificación y caracterización cinética de la

actividad polifenol oxidasa en los diferentes estadios de su maduración. En este estudio se presentan los resultados de la evaluación de los parámetros cinéticos y de la actividad enzimática de la enzima polifenol oxidasa del lulo variedad Castilla en seis estadios de maduración definidos comercialmente, lo que posibilitaría su mejor manejo y mayor aprovechamiento por la agroindustria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. El estudio se realizó con frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) de la variedad Castilla, recolectados de diferentes árboles en las horas de la mañana en cultivos localizados en la finca el Porvenir, vereda La Pola, situada en el municipio de Circasia (Quindío), Colombia. Los frutos se seleccionaron de modo que no presentaran golpes, magulladuras, ni ataques por insectos o cualquier otro organismo. Los árboles incluidos en la muestra se seleccionaron con un plano de la plantación, escogiendo el más cercano, correspondiente a una pareja de números aleatorios. De esta manera, la muestra se pudo asimilar a una muestra aleatoria simple. De cada árbol se cosecharon 5 frutos de lulo en forma aleatoria por cada estadio de maduración de acuerdo con la escala de color de la Norma Técnica Colombiana 5093 (ICONTEC 2002). Se trabajó con 30 frutos y al no encontrar investigaciones previas para estimar la varianza, no se realizó el cálculo del tamaño de la muestra. Una vez cosechados los frutos se agruparon conforme al grado de maduración, se lavaron y desinfectaron de acuerdo con los requerimientos mínimos del *Codex Alimentarius* para frutas y hortalizas frescas (Código de prácticas de higiene de frutas y hortalizas frescas 2003) y se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis.

Extracción y purificación parcial del extracto crudo de la enzima. Se obtuvo el extracto crudo (EC) de los frutos seleccionados y se realizó la purificación parcial de la enzima utilizando la metodología descrita por Aquino-Bolaños (2004). Se tomaron 4 g de pulpa y pericarpio de cada uno de los seis estadios de maduración y se sumergieron inmediatamente en solución fría de tampón (*buffer*) de fosfato de sodio 0,1 M de pH 6,5. Para la extracción de la enzima se utilizó una fracción de la solución tampón (2/3 del volumen) y en ella se disolvieron 0,4 g de polivinil pirrolidona 40-100G (**PVP**) y 100 µl de Tritón X-100. Esta solución fue posteriormente mezclada con la pulpa y homogenizada durante 6 min en licuadora. El homogenizado fue filtrado con ayuda de una bomba de vacío Buchi 500 a través de gasa. El filtrado se centrifugó

a 14.000 r/m a 4 °C y el sobrenadante fue almacenado a 4 °C hasta la determinación de la actividad de la enzima. Las medidas siempre se efectuaron con extractos frescos, ya que la actividad puede verse afectada durante el almacenamiento en frío o el congelado del extracto (Price y Stevens 2001). El extracto enzimático permaneció en un baño con hielo para evitar la desnaturalización de la enzima y reducir la actividad de las proteasas durante la extracción (Lowe y Thomas 1996).

Determinación de la concentración de la proteína.

La concentración de la proteína en los seis estadios de maduración se determinó empleando el método del ácido bicinonínico (BCA) (Smith et al. 1985), utilizando la fracción V de la albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Se realizó una curva de calibración, con concentraciones de albúmina desde 0 a 1 mg/ml. Se tomaron 10 µl del extracto enzimático y 100 µl de agua destilada y se adicionaron 2 ml del reactivo de trabajo (sulfato cúprico 4% y solución estándar de ácido bicinonínico, mezclando 2 x 100 volúmenes, respectivamente). Se agitó la mezcla vigorosamente y después de incubar a 60 °C por 10 min, se leyó en el espectrofotómetro a 562 nm. El blanco se leyó con 100 µl de agua destilada y 2 ml del reactivo de trabajo. Cada determinación se realizó por triplicado empleando tres frutos por cada estadio de maduración.

Selección de las condiciones adecuadas para la medida de la actividad enzimática de la PFO.

Se estudiaron diversas condiciones experimentales para la medida de actividad de la enzima PFO, utilizando como sustrato el catecol. El efecto del pH en la actividad de la enzima se determinó empleando soluciones tampones de concentración 0,1 M: acetato de sodio (pH 4,0-5,0), fosfatos de sodio (pH 6,0-7,0) y tris-HCl (pH 8,0-10,0) a 20 °C. La temperatura óptima se determinó evaluando las siguientes temperaturas 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 °C. La concentración de sustrato: catecol (preparado en solución tampón de fosfato de sodio a pH 6,5) se determinó evaluando los siguientes valores: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 y 50 mM y, volumen de extracto enzimático parcialmente purificado: 10, 15, 20 y 25 µl. Todos los valores evaluados fueron tomados utilizando registros previos de Ardila e Higuera (2005), Caicedo e Higuera (2007) y Kumar et al. (2008).

La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente (Shimadzu-UV1601) cada 10 s por 15 min a 412 nm y 20 °C. La actividad enzimática fue expresada como ΔA_{412} nm/min x mg de proteína con un coeficiente de extinción molar de $1.260 \text{ M}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$. Los parámetros de actividad enzimática fueron

determinados mediante un diseño experimental escalonado en el cual mientras una variable era evaluada las demás permanecieron constantes (Caicedo e Higuera 2007).

Análisis estadístico. El estudio de la significancia de los diferentes efectos y de sus posibles interacciones se realizó mediante análisis de la varianza simple (ANOVA) usando el método LSD (*least significant differences*) como método de comparaciones múltiples, con nivel de significancia (α) de 0,05, en el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV (Versión 15.2.06).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento de las condiciones óptimas para la actividad enzimática.

La determinación de la actividad enzimática se realizó con el extracto parcialmente purificado obtenido de lulos verdes (*estadio 0*) y maduros (*estadio 5*), cosechados de árboles de seis meses de edad, empleando como sustrato catecol (Chuncua et al. 2001, Mohammadi y Kamesi 2002, Queiroz et al. 2011). La evaluación de la actividad de la enzima PFO se realizó mediante una gráfica de absorbancia en función del tiempo y se tomó la parte lineal de la curva (dato no mostrado).

El pH es un factor determinante para la actividad de las enzimas. Este factor altera el estado ionización de la cadena lateral de los aminoácidos o la ionización del sustrato (Voet y Voet 1990). En el perfil de pH en la figura 1 A y B se muestra que la máxima actividad se presentó entre valores de pH de 6,5 y 7,0 con decrecimiento significativo a pH de 8,0. En general, se informan dos tipos de PFOs en plantas superiores dependiendo de su pH óptimo. El primer tipo son las PFOs ácidas, con pH óptimo entre 4 y 5 (Arslan et al. 2004, Casado-Vela 2004, Fujita y Tono 1988, Gawlik-Dziki et al. 2007, Murata et al. 1997, Sánchez-Ferrer et al. 1989, Sellés-Marchat et al. 2006), y un segundo grupo son las básicas con pH óptimo entre 7 y 8 (Caicedo e Higuera 2007, Chuncua et al. 2001, Queiroz 2011, Roquesa e Higuera 2007, Ziyan y Pekiardime 2003). De acuerdo con estos resultados y la clasificación se puede decir que la PFO identificada en lulo variedad Castilla pertenece al segundo grupo.

En general, la actividad de la enzima fue muy baja por debajo de 5 °C y se incrementó a medida que aumentó y se acercó a los 45 °C. La mayoría de las enzimas muestran una temperatura óptima entre los 30 y 40 °C. Sin embargo, se han observado diferencias en la temperatura para la actividad óptima de la enzima PFO, por ejemplo en la pera

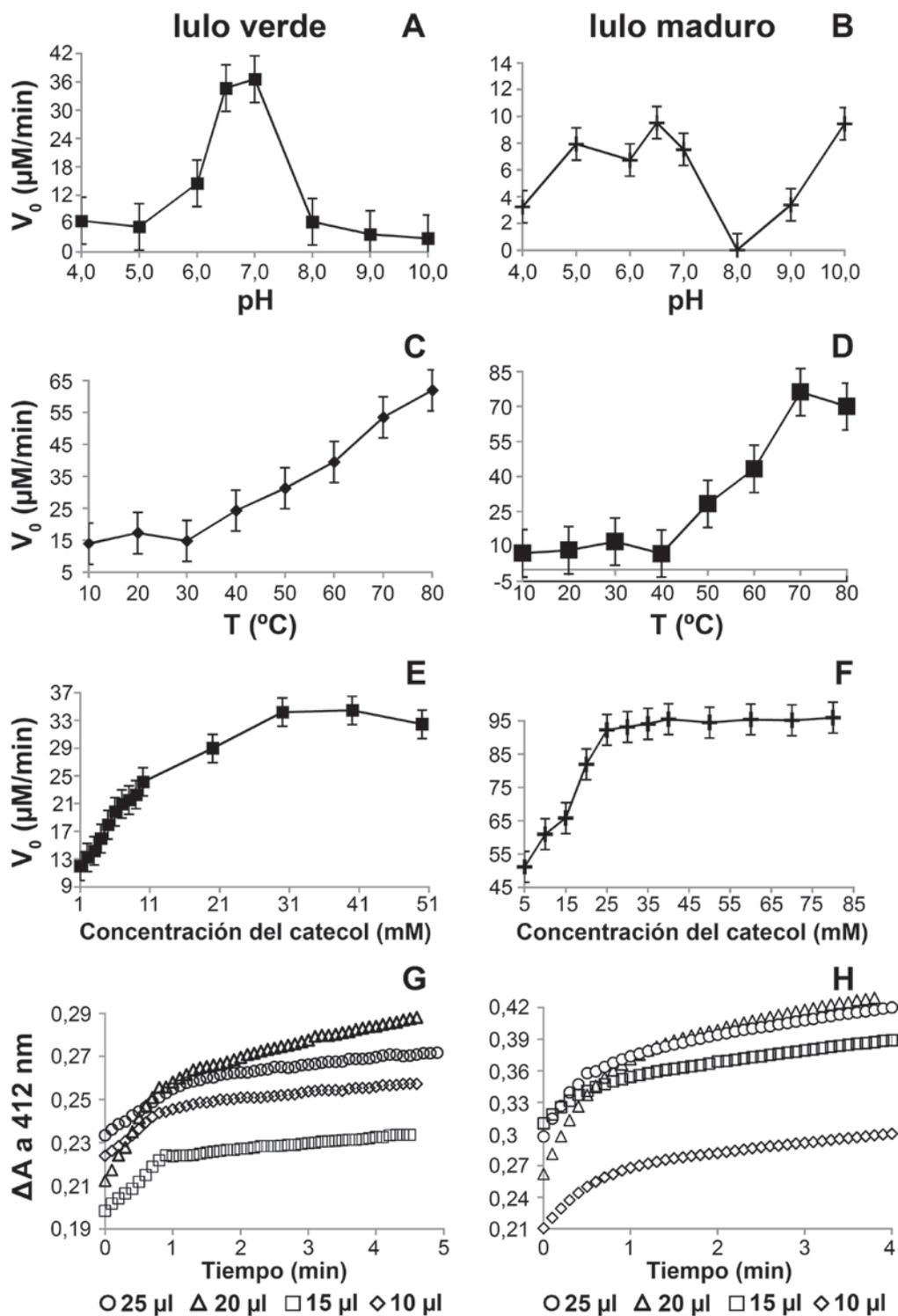


Figura 1. Establecimiento de los parámetros para la determinación de la actividad de la enzima (PFO) obtenida de los frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) variedad Castilla, en función de la concentración de sustrato (catecol). A. y B. pH; C y D. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) de reacción; E y F. Concentración del catecol; G y H. Volumen del extracto crudo (EC) empleando dos estadios de maduración, verde y maduro

“Bartlett” se encuentra por debajo de los 20 °C (Siddiq y Cash 2000) y por encima de los 45 °C para las frutas de baya (Wlazly y Targonski 2000). En la figura 1 C y D se muestra que el perfil de temperaturas fue bastante amplio, la actividad se mantiene prácticamente constante entre 10 y 40 °C, se presentó pico máximo de actividad entre los 70 y 80 °C. Sin embargo, se observó que al incubar el catecol, sin la adición de la enzima, entre 40 y 80 °C se generó oxidación del mismo, lo cual interfirió en las mediciones. Se estableció, entonces que la temperatura donde se obtuvo mayor estabilidad del sustrato y mayor actividad de la enzima PFO fue entre los 20 y 30 °C (figura 1 C y D). Estos resultados coinciden con los obtenidos para la PFO de alcachofa (Aydemir 2004), la PFO de la corteza de lulo (Caicedo e Higuera 2007), la PFO de banano (Chang et al. 2000), la PFO de ciruela (Sánchez-Ferrer et al. 1989a), la PFO de níspero (Dincer et al. 2002) y la PFO de papa (Zang y Huang 2002).

La variación en la actividad de la PFO en función de la concentración de sustrato (catecol), presentó un comportamiento similar al planteado por el modelo de la constante de Michaelis-Menten (K_M) (Michaelis y Menten 1913). El aumento en los valores de absorbancia se generó a una concentración de sustrato entre 1 y 10 mM. A mayores concentraciones la curva se hizo asintótica. La determinación de la concentración óptima del sustrato (catecol) se muestra en la figura 1 E y F, donde se observó que la velocidad de oxidación del catecol aumentó a medida que se incrementó la concentración del sustrato entre 4-10 mM hasta que la enzima se saturó y alcanzó su velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$). Las concentraciones en las que se presentó mayor actividad de la enzima se determinó para el estadio 0 (verde) de 10 mM y para el estadio 5 (maduro) de 20 mM.

Se observó que el volumen del extracto enzimático, es un parámetro determinante en la actividad de la enzima PFO de lulo. Resultados más estables se presentaron al trabajar con volumen de 20 μ l en los estadios de maduración evaluados, como se observa en la figura 1 G y H.

Teniendo en cuenta estos resultados, se pudo establecer que los parámetros óptimos para la medida de actividad de la PFO, extraída a partir de la pulpa y el pericarpio de lulo para los estadios 0 y 5 fueron: pH 6,5, concentración de sustrato (catecol): 10 y 20 mM, temperatura entre: 20 y 30 °C y 20 μ l como volumen de extracto enzimático.

Determinación de la actividad enzimática de la enzima PFO de lulo. En la figura 2, se muestra que los estadios que presentaron mayor actividad enzimática fueron los estadios 1, 2 y 5, mientras que los estadios 0, 3 y 4 presentaron baja actividad. Estos resultados presentaron diferencias con lo encontrado en la literatura, donde la actividad enzimática de la PFO es mayor en frutos jóvenes y durante los primeros estadios de su desarrollo (Vámos-Vigyázó 1981). Sin embargo, diversas frutas y verduras maduras también presentan niveles altos de actividad PFO, ya que la enzima se encuentra encapsulada cuando el fruto alcanza su madurez fisiológica. Se asume, que la enzima se libera progresivamente a lo largo de la maduración hasta liberarse totalmente durante los procesos naturales de senescencia (estadio 5), por lo cual se supone que la actividad de la enzima PFO es directamente proporcional al estadio de maduración y al contenido de compuestos fenólicos presentes (Cantos et al. 2002, Carranza 2009, Macheix et al. 1990, Whitaker 1972). Las diferencias en los resultados de esta investigación comparados con los indicados en la literatura, pueden ser atribuidas a variaciones en el protocolo de extracción, a las condiciones de medida de la actividad enzimática (Zawitowski et al. 1991), al tipo de fruto y al estadio de maduración del mismo (Ueda et al. 2000), o a la presencia de variantes de la enzima que van apareciendo a medida que el fruto comienza su proceso de maduración (Marri et al. 2003).

Al realizar el ajuste al modelo lineal, según el tratamiento de Lineweaver-Burk (Lineweaver y Burk 1934) (figura 3), se estimó la constante de Michaelis-Menten (K_M) y la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) para cada uno de los estadios de maduración (figuras 3 y 4, tabla 1). Se compararon los parámetros cinéticos con PFOs registradas para otras fuentes vegetales obteniendo valores de $V_{m\acute{a}x}$ que variaron desde baja transformación del sustrato hasta alto recambio (Dogan y Dogan 2004, Dogan et al. 2006, Gawlik-Dziki et al. 2007, Guo et al. 2009, Kumar et al. 2008, Rocha y Morais 2001, Roy et al. 2002, Ümit 2007, Ziyen y Peekyardimci 2003). La variación de los resultados de esta investigación con respecto a los expuestos en la literatura, pudieron deberse a la diversidad de sustratos fenólicos naturales encontrados en las plantas y a la afinidad que la enzima PFO tiene por ellos (Roquesa e Higuera 2007). Las medidas cinéticas evaluadas están condicionadas al tipo de sustrato utilizado (catecol) y podrían variar si se utiliza otro sustrato como por ejemplo tirosina o L-DOPA.

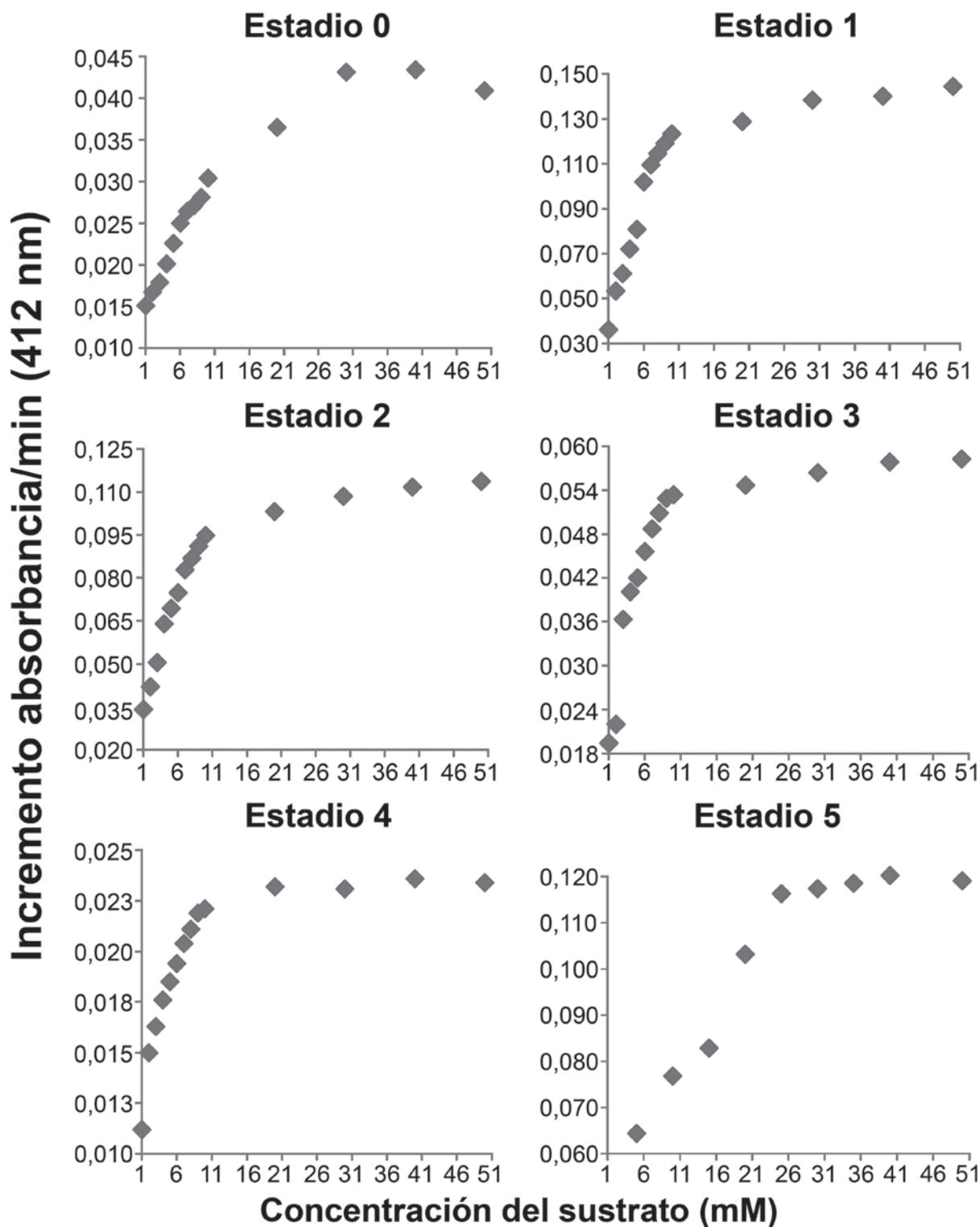


Figura 2. Cinética micaliana de los seis estados de maduración (0-5) del frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) variedad Castilla, empleando como sustrato catecol y 20 µl del extracto crudo (EC)

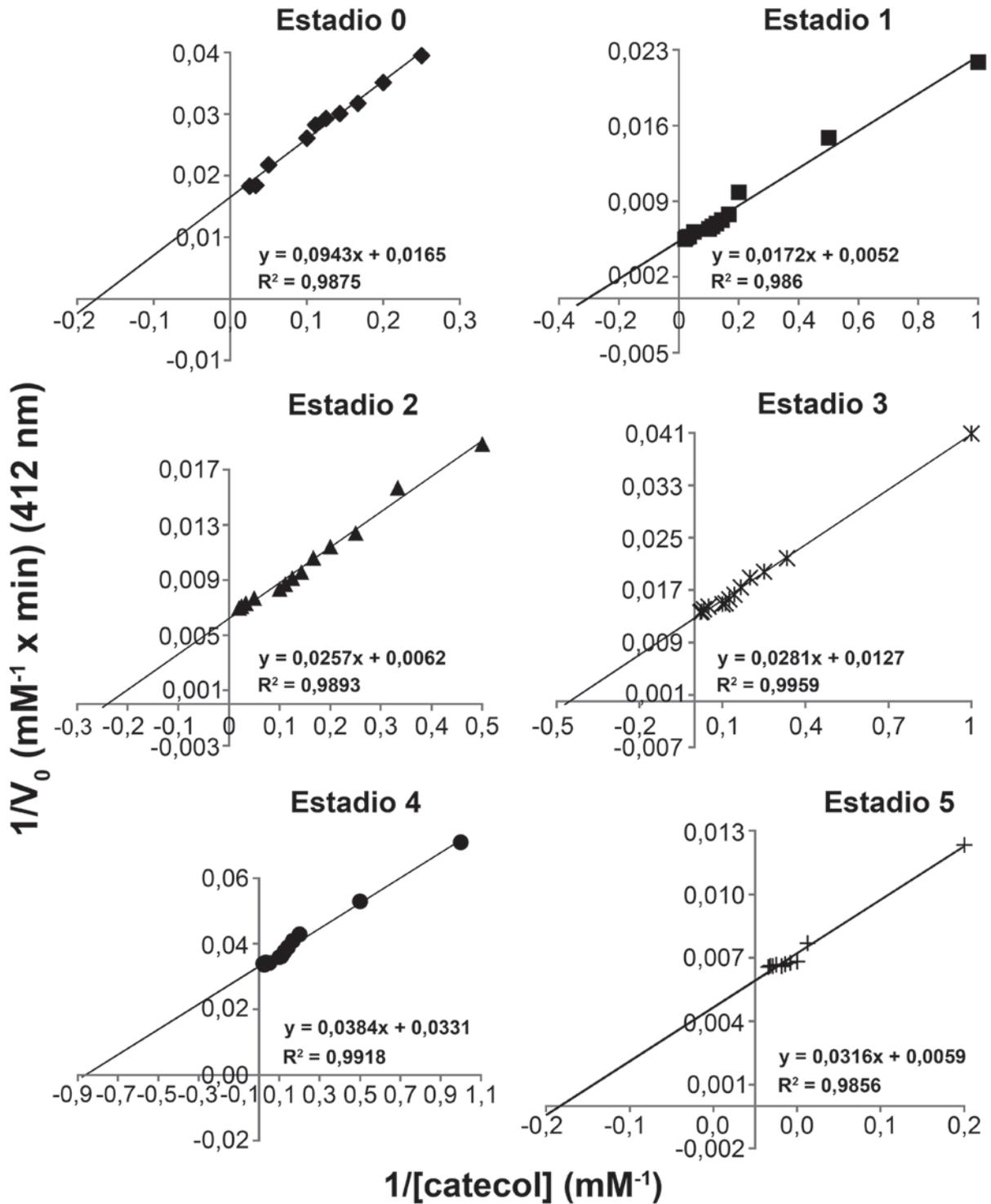


Figura 3. Determinación de los parámetros cinéticos: la constante de Michaelis-Menten (K_M) y la velocidad máxima (V_{max}) en los seis estadios de maduración de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) variedad Castilla mediante la gráfica $1/V$ vs. $1/[S]$ por el método de Lineweaver-Burk (1934)

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la enzima (PFO) del extracto crudo (EC) obtenido a partir de los seis estadios de maduración de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) variedad Castilla, se empleó catecol como sustrato: constante de Michaelis-Menten (K_M), velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y pendiente ($V_{m\acute{a}x}/K_M$). La tabla muestra los valores de la media (\bar{x}), la desviación estándar (σ) y el coeficiente de variación (CV) para cada parámetro

Variables	Color 0		
	x	σ	CV (%)
K_M (mM)	5,71	0,15	2,61
$V_{m\acute{a}x}$ (mM/min)	60,61	0,91	1,49
$V_{m\acute{a}x}$ específica (mM x mg/min)	268,08	0,47	0,17
$K_M/V_{m\acute{a}x}$ (pendiente)	0,09	0,001	1,33
Color 1			
K_M (mM)	3,26	0,60	18,44
$V_{m\acute{a}x}$ (mM/min)	188,68	14,26	7,56
$V_{m\acute{a}x}$ específica (mMxmg/min)	661,24	10,11	1,53
$K_M/V_{m\acute{a}x}$ (Pendiente)	0,01	0,004	23,15
Color 2			
K_M (mM)	4,15	0,11	2,56
$V_{m\acute{a}x}$ (mM/min)	161,29	5,74	3,56
$V_{m\acute{a}x}$ específica (mMxmg/min)	609,94	1,02	0,16
$K_M/V_{m\acute{a}x}$ (pendiente)	0,02	0,001	6,18
Color 3			
K_M (mM)	2,21	0,34	15,20
$V_{m\acute{a}x}$ (mM/min)	78,74	2,96	3,76
$V_{m\acute{a}x}$ específica (mMxmg/min)	327,38	3,00	0,91
$K_M/V_{m\acute{a}x}$ (pendiente)	0,03	0,003	12,02
Color 4			
K_M (mM)	1,16	0,15	13,05
$V_{m\acute{a}x}$ (mM/min)	30,21	1,77	5,86
$V_{m\acute{a}x}$ específica (mMxmg/min)	117,29	15,75	13,43
$K_M/V_{m\acute{a}x}$ (pendiente)	0,04	0,004	11,55
Color 5			
K_M (mM)	5,35	0,19	2,62
$V_{m\acute{a}x}$ (mM/min)	30,21	1,77	5,86
$V_{m\acute{a}x}$ específica (mMxmg/min)	665,21	21,50	3,23
$K_M/V_{m\acute{a}x}$ (pendiente)	0,18	0,01	7,44

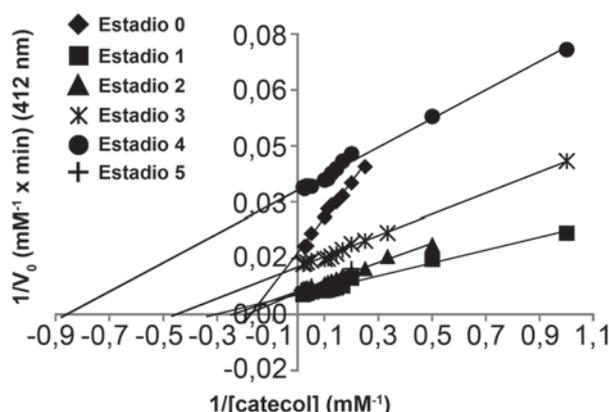


Figura 4. Comparación de los parámetros cinéticos de la constante de Michaelis-Menten (K_M) y la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) en seis estados de maduración de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) variedad Castilla

Al comparar los parámetros cinéticos calculados, K_M y $V_{m\acute{a}x}$ (figuras 3 y 4, tabla 2), se observaron diferencias significativas entre los seis estadios de maduración ($p = 0,0000$). Se obtuvo que el estadio que presentó menor afinidad por el sustrato catecol fue el 0 con valor de K_M de 5,71 mM, y el estadio que presentó mayor afinidad por el catecol fue el 4, con valor de K_M de 1,16 mM. De acuerdo con Zawistowski et al. (1991), la afinidad de la enzima PFO por los sustratos fenólicos es relativamente baja y el valor de la K_M es alto, usualmente alrededor de 1 mM. Los valores de K_M de esta investigación fueron consistentes con los valores obtenidos por Dogan y Dogan (2004), Dogan et al. (2006), Gawlik-Dziki et al. (2007), Guo et al. (2009), Kumar et al. (2008), Rocha y Morais (2001), Roy et al. (2002), Ümit (2007) y Ziyen y Peekyardimci (2003). En los estadios 1 y 5 se presentó mayor eficiencia de la enzima PFO en la transformación del catecol, mientras que los estadios 3 y 4 mostraron baja actividad. Debido a estos resultados, se sugiere a los cultivadores de lulo realizar la cosecha entre los estadios de maduración 3 y 4, lo que permitirá obtener frutos de calidad y capaces de ser conservados por un tiempo prolongado, aumentando la vida comercial de los mismos y mayor aprovechamiento de los mismos por parte de los agroindustriales a nivel nacional e internacional.

La mayoría de compuestos naturales como los flavonoles poseen un anillo hidroxilado similar al catecol, lo cual lo convierte en un modelo importante para ser usado como sustrato en estudios de oxidación enzimática (Marshall et al. 2000). En plantas el sustrato más extendido para la evaluación de la actividad de la enzima PFO es el ácido

Tabla 2. Análisis estadístico para la variación de cada parámetro cinético de la enzima (PFO), evaluado entre y dentro de cada estadio de maduración de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) variedad Castilla para un nivel de significancia de 0,05 (Σ^{2S} = suma de cuadrados; G I = grados de libertad; C m = cuadrado medio; K_M = constante de Michaelis-Menten; $V_{m\acute{a}x}$ = velocidad máxima; $K_M/V_{m\acute{a}x}$ = pendiente; $V_{m\acute{a}x}$ específica = velocidad máxima específica)

Parámetros	Fuentes			
	Entre grupos			
	Σ^{2S}	G I	C m	
K_M (mM)	47,3116	5	9,46231	
$V_{m\acute{a}x}$ (mM/min)	68827,0	5	13765,4	
$V_{m\acute{a}x}$ específica (mM x mg/min)	549821	5	109964	
$K_M/V_{m\acute{a}x}$ (Pendiente)	0,0580428	5	0,0116086	
	Intra grupos			
	K_M (mM)	1,13773	12	0,0948111
	$V_{m\acute{a}x}$ (mM/min)	504,242	12	42,0202
	$V_{m\acute{a}x}$ específica (mMxmg/min)	823,095	6	137,183
	$K_M/V_{m\acute{a}x}$ (Pendiente)	0,000451864	12	0,0000376553
	Total (Corr.)			
	K_M (mM)	48,4493	17	
	$V_{m\acute{a}x}$ (mM/min)	69331,3	17	
	$V_{m\acute{a}x}$ específica (mMxmg/min)	550644	11	
	$K_M/V_{m\acute{a}x}$ (Pendiente)	0,0584947	17	
	Razón-F		Valor-P	
	K_M (mM)	99,80	0,0000	
	$V_{m\acute{a}x}$ (mM/min)	327,59	0,0000	
	$V_{m\acute{a}x}$ específica (mM x mg/min)	801,59	0,0000	
	$K_M/V_{m\acute{a}x}$ (Pendiente)	308,28	0,0000	

clorogénico, en el grupo fenólico está unido a un residuo de azúcar. Este sustrato se encuentra naturalmente en manzanas, peras, melocotones, ciruelas, uvas, aguacates y papas. En algunos vegetales se encuentran además L-DOPA, dopamina, *p*-cresol, ácido caféico y otros fenoles (Lee y Whitaker 1995, Marshall et al. 2000, Martínez y

Whitaker 1995, Queiroz et al. 2011). La composición polifenólica varía de acuerdo con la especie, el cultivar, el grado de maduración y las condiciones ambientales, de desarrollo y almacenamiento. En esta investigación se utilizó como sustrato catecol, debido a que es el estándar más empleado para la evaluación de la actividad enzimática de la enzima PFO de vegetales y frutas.

Las variaciones en la actividad polifenoloxidasas encontrada entre los seis estadios de maduración evaluados, se pudo deber posiblemente a la expresión de isoenzimas que se presentan durante el desarrollo de los frutos y tubérculos. Tal es el caso de la papa, perteneciente a la familia de las solanáceas al igual que el lulo, donde se encontró que la expresión de los genes de la enzima PFO y la actividad enzimática de la proteína se mantiene más allá del desarrollo temprano y a lo largo del desarrollo y crecimiento del tubérculo (Thyngensen et al. 1995).

CONCLUSIONES

Se determinaron las condiciones óptimas de actividad de la enzima polifenol oxidasa de lulo variedad Castilla: pH = 6,5, temperatura = 20-30 °C, concentración del sustrato (catecol) = 4-10 mM y volumen del extracto enzimático = 20 μ l. Estas condiciones fueron apropiadas para la determinación de la actividad de la enzima PFO en los seis estadios de maduración evaluados. Los estudios mostraron variabilidad significativa en los parámetros cinéticos de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ dependientes del estadio de maduración analizado. Se identificó que la mayor actividad enzimática se presentó en los estadios 1 y 5, correspondientes al fruto verde oscuro con tonalidades verde claro y al fruto anaranjado. Se recomienda por lo tanto llevar a cabo la cosecha de frutos de lulo variedad Castilla entre los estadios de maduración 3 y 4, debido a que la enzima PFO presenta menor actividad lo que facilitaría su manejo, almacenamiento y posterior procesamiento por la industria alimentaria, permitiendo mejor aprovechamiento del mismo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero por parte de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Tecnológica de Pereira. Al grupo de investigación de CENBIOTEP, al programa de Química y al Laboratorio Diseño de Nuevos Productos de la Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías de la Universidad del Quindío.

REFERENCIAS

- Aquino-Bolaños EN, Mercado-Silva E. 2004. Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content in the browning of cut jicama. *Postharvest Biology and Technology*, 33 (3): 275-283.
- Ardila H, Higuera BL. 2005. Inducción diferencial de polifenoloxidasas y β -1,3-glucanasa en clavel (*Dianthus caryophyllus*) durante la infección por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2. *Acta Biológica Colombiana*, 10 (2): 61-74.
- Arslan O, Erzenin M, Sinan S, Ozensoy O. 2004. Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chemistry*, 88 (3): 479-484.
- Aydemir T. 2004. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chemistry*, 87 (1): 59-67.
- Bermeo A. 2005. Caracterización de la variabilidad morfológica y algunos atributos químicos de los frutos en una colección de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) y especies relacionadas de la sección Lasiocarpa [Tesis de grado]. [Medellín (Colombia)]: Universidad Nacional de Colombia. p. 28.
- BRENDA (BRAunschweig ENzyme Database) [Internet]. 2011. Institut fuer Biochemie und Bioinformatik, Technische Universität Braunschweig. Fecha de acceso: 30 de agosto de 2011. Disponible en: <<http://www.brenda-enzyme.info/index.php4>>.
- Caicedo O, Higuera B. 2007. Inducción de polifenoloxidasas en frutos de lulo (*Solanum quitoense*) como respuesta a la infección con *Colletotrichum acutatum*. *Acta Biológica Colombiana*, 12 (1): 41-54.
- Cantos E, Espín J, Tomás-Barberán F. 2002. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50 (20): 5691-5696.
- Carranza J. 2009. Influencia del procesado en el valor nutritivo y funcional de la uva blanca [Tesis de doctorado]. [Valencia (España)]: Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos. p. 187.
- Casado-Vela J. 2004. Aproximación cinética, molecular y proteómica al estudio de la podredumbre apical en frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.). Implicación de polifenol oxidase (PPO) y enzimas antioxidantes [Tesis de doctorado]. [Alicante (España)]: Universidad de Alicante. Departamento de Agroquímica y Bioquímica. Facultad de Ciencias. p. 231.
- Casado-Vela J, Sellés-Marchatt S, Bru R. 2005. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* cv. Muchamiel). *Journal of Food Biochemistry*, 29 (4): 381-401.
- Código de prácticas de higiene de frutas y hortalizas frescas (CAC/RCP-53). [Internet]. 2003. Codex Alimentarius. Fecha de acceso: 02 de marzo de 2011. Disponible en: <<http://www.codexalimentarius.org/normas-oficiales/es/>>.
- Chang CP, Fujita S, Kohno K, Ashrafuzzaman M, Nakamura N, Hayashi N. 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (7): 2732-2735.
- Chuncua S, Ya D, Bingle X, Xiaolong X, Yongshu X, Qingliang L. 2001. The purification and spectral properties of polyphenol oxidase from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19 (4): 381-381.
- Dincer B, Colak A, Aydin N, Kadiogly A, Guners S. 2002. Characterization of polyphenol oxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae). *Food Chemistry*, 77 (1): 1-7.
- Dogan S, Dogan M. 2004. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*). *Food Chemistry*, 88 (1): 69-77.
- Dogan S, Turan P, Dogan M. 2006. Some kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymra spicata* L. var. *spicata*. *Process Biochemistry*, 41 (12): 2379-2385.
- Fujita S, Tono T. 1988. Purification and some properties of polyphenoloxidase in eggplant (*Solanum melongena*). *Journal of Science Food and Agriculture*, 46 (1): 115-123.
- Gawlik-Dziki U, Szymanowska U, Baraniak B. 2007. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. *Food Chemistry*, 105 (3): 1047-1053.
- Guo L, Ma Y, Shi J, Xue S. 2009. The purification and characteristic of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 117 (1): 143-151.
- Guerrero-Beltran JA, Swanson BG, Barbosa-Canovas GV. 2004. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. *LWT-Food Science and Technology*, 38 (6): 625-630.
- ICONTEC. 2002. Norma Técnica Colombiana, NTC 5093. Frutas frescas. Lulo de Castilla. Especificaciones. Bogotá D. C. (Colombia): Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). Disponible en: <<http://tienda.icontec.org/brief/NTC5093.pdf>>.
- KEEG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [Internet]. 2011. Kanehisa Laboratories. Fecha de acceso: 30 de agosto de 2011. Disponible en: <<http://www.genome.jp/kegg/>>.
- Kumar V, Mohan T, Murugan K. 2008. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). *Food Chemistry*, 110 (2): 328-333.
- Lee C, Whitaker J, editores. 1995. Enzymatic browning and its prevention. Washington, D. C. (E. U. A.): American Chemical Society (ACS). p. 338.
- Lineweaver H, Burk D. 1934. The determination of enzyme dissociation constant. *Journal of American Chemical Society*, 56: 658-666.
- Lobo M, Medina C. 2000. Lulo (*Solanum quitoense* Lam.). En: *Funep. Caracterização de Frutas Nativas da America Latina. Jaboticabal (Brasil): Série Frutas Nativas*, 9. p. 41-43.
- Lowe CR, Thomas JA. 1996. Purification and analysis of enzyme preparations. En: Engel PC, editor. *Enzymology*. San Diego (E. U. A.): Academic Press. p. 9-33.
- Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. 1990. The main phenolics of fruits. En: Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J, editores. *Fruit phenolics*. Boca Raton (FL, E. U. A.): CRC Press Inc. p. 1-15.

- Marri C, Frazzoli A, Hochkoeppler A, Poggi V. 2003. Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry*, 63 (7): 745-752.
- Marshall M, Kim J, Wei C. 2000. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods [Internet]. 2011. FAO. Fecha de acceso: 30 de agosto de 2011. Disponible en: <http://minnie.uab.es/~veteri/21254/Enzymatic%20Browning.htm>.
- Martínez M, Whitaker J. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 6 (6): 195-200.
- Mayer AM. 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry*, 67 (21): 2318-2331.
- Mdluli K. 2005. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *cafra*). *Food Chemistry*, 92: 311-323.
- Michaelis L, Menten M. 1913. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49: 333-369.
- Mohammadi M, Kamesi H. 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, 162 (4): 491-498.
- Murata M, Tsurutani M, Hagiwara S, Homma S. 1997. Subcellular location of polyphenol oxidase in apples. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61 (1): 1495-1499.
- Palma-Orozco G, Ortiz-Moreno A, Dorantes-Alvarez L, Sampedro JG, Najera H. 2011. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*). *Phytochemistry*, 72 (1): 82-88.
- Price NC, Stevens L. 2001. Techniques for enzyme extraction. En: Eisenthal R, Danson MJ, editores. *Enzyme assays: a practical approach*. Oxford (E. U. A.): Oxford University Press. p. 209-224.
- Queiroz C, Ribeiro da Silva A, Mendes-Lopes M, Fialho E, Valente-Mesquita V. 2011. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. *Food Chemistry*, 125 (1): 128-132.
- Rocha A, Morais A. 2001. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from "Jonagored" apple. *Food Control*, 12 (3): 85-90.
- Roquesa V, Higuera B. 2007. Aislamiento y caracterización de una polifenoloxidasas relacionada con la tolerancia del clavel (*Dianthus caryophyllus*) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2. *Acta Biológica Colombiana*, 12 (2): 81-94.
- Roy I, Sharma S, Gupta MN. 2002. Separation of an isoenzyme of polyphenol oxidase from *Duranta plumieri* by expanded bed chromatography. *Protein Expression and Purification*, 24 (2): 181-187.
- Sánchez-Ferrer A, Bru R, García-Carmona F. 1989. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiology*, 91 (4): 1481-1487.
- Sellés-Marchat S, Casado-Vela J, Bru R. 2006. Isolation of a latent polyphenol oxidase from loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.): Kinetic characterization and comparison with the active form. *Archives Biochemistry Biophysics*, 446 (2): 175-185.
- Shimizu MM, Melo GA, dos Santos AB, Bottcher A, Cesarino I, Araújo P, Silva-Moura JCM, Mazzafera P. 2011. Enzyme characterization, isolation and cDNA cloning of polyphenol oxidase in the hearts of palm of three commercially important species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49 (9): 970-977.
- Siddiq M, Cash J. 2000. Physico-chemical properties of polyphenol oxidase from D'Anjo and Bartlett pears (*Pyrus communis* L.). *Journal and Food Process Preservation*, 24 (5): 353-354.
- Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B, Klenk D. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150 (1): 76-85.
- Terefe N, Yang Y, Knoerzer K, Buckow R, Versteeg C. 2010. High pressure and thermal inactivation of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11 (1): 52-60.
- Thyngesen P, Dry I, Robienson S. 1995. Polyphenol Oxidase in Potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiology*, 109 (2): 525-531.
- Ueda M, Sasaki K, Inaba K, Shimabayashi Y. 2000. Variation of total polyphenol and polyphenol oxidase activity during maturation of mango fruit (*Mangifera indica* L. 'Irwin') cultured in a plastic house. *Food Science and Technology Research*, 6 (1): 59-61.
- Ümit M. 2007. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*, 100 (3): 909-913.
- Vámos-Vigyázó L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15 (1): 49-127.
- Voet D, Voet J. 1990. Mechanism of enzyme action. En: Harris D, Fitzgerald P, editores. *Biochemistry*. New York (E. U. A.): Wiley. p. 457-492.
- Whitaker J. 1972. *Principles of enzymology for the food science*. 2.^a edición. Nueva York (E. U. A.): Marcel Dekker Inc. p. 628.
- Wlazly A, Targonski A. 2000. Polyphenol oxidase and beta-glucosidase in selected berry fruit. *Journal of Zywnosc*, 7: 122-132.
- Yang C, Fujita S, Kohno K, Kusabayashi A, Ashrafuzzaman M, Hayashi N. 2001. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (3): 1446-1449.
- Zang H, Huang J. 2002. Study on enzymatic characteristics of polyphenol oxidase in potato. *Food Science and Technology (India)*, 23 (1): 39-41.
- Zawistowski J, Biliaderis CG, Eskin NAM. 1991. Polyphenol oxidase. En: Robinson DS, Eskin NAM, editores. *Oxidative enzymes in foods*. Londres (Reino Unido): Elsevier Science Publishers. p. 217-273.
- Ziyen E, Pekyardimci S. 2003. Characterization of polyphenol oxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turkish Journal of Chemistry*, 27: 217-225.