

## CINÉTICA DE HIDROXILACIÓN Y OXIDACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR POLIFENOL OXIDASA DE UVA MONASTRELL (*VITIS VINIFERA*)

A. Sánchez-Ferrer\*, R. Bru\* y J. Cabanes\*

Recibido: octubre 1987

Aceptado: marzo 1988

Publicado: febrero 1989

### SUMMARY

Kinetics of hydroxylation and oxidation of phenolic compounds by Monastrell grape (*Vitis vinifera*) Polyphenol Oxidase

Monastrell grape polyphenol oxidase was purified, showing both activity towards monophenols and o-diphenols. The kinetic parameters, Km and optimal temperature, were evaluated in both activities. Cresolase activity presents a particular lag period, which may be modified by the temperature, enzyme concentration, the presence of o-diphenols and substrate concentration.

Key words: grape, polyphenol oxidase, kinetic, phenols.

### RESUMEN

La enzima polifenol oxidasa ha sido purificada a partir de uva Monastrell mostrando actividad tanto en la oxidación de monofenoles (cresolasa) como en la de o-difenoles (catecolasa). Los parámetros cinéticos, Km y temperatura óptima, han sido evaluados en ambas actividades. La actividad cresolasa presenta un período de retardo característico, que puede ser modificado por la temperatura, la concentración de enzima, la presencia de o-difenoles y la concentración de sustrato.

Palabras clave: uva, polifenol oxidasa, cinética, fenoles.

### INTRODUCCIÓN

Las reacciones de oxidación asociadas con el oscurecimiento de los tejidos dañados de frutos frescos y vegetales están catalizadas por la enzima polifenoloxidasa (EC 1.14.18.1) (PPO). Esta enzima está probablemente presente en todas las plantas (WHITAKER, 1972), pero su actividad es particularmente alta en aquellos frutos y vegetales que contienen niveles significativos de compuestos fenólicos, como es el caso de la uva, donde el enzima, usando el oxígeno molecular del aire, es capaz de catalizar la o-hidroxilación de monofenoles (como el *p*-cresol) a o-difenoles (como 4-metil catecol), actividad cresolasa, y su posterior oxidación a o-

quinonas, actividad catecolasa. Las quinonas así formadas evolucionan por polimerización espontánea originando pigmentos coloreados. Estos procesos causan un cambio radical en el color, aroma y sabor del vino, con la consiguiente pérdida de calidad, provocando importantes pérdidas económicas en la industria del vino.

Esta importancia económica ha impulsado un gran número de investigaciones sobre PPO de uva insistiendo sobre: su localización subcelular (IVANOV, 1967), el mecanismo de reacción (LERNER & MAYER, 1976), la variación de la actividad enzimática durante la maduración de la uva y la producción del vino (WISSEMANN & LEE, 1980; SAPIS et al., 1983) y la **especifi-**

\* Dep. de Bioquímica. Fac. de Biología. Universidad de Murcia. E-30001 Murcia.

idad del enzima por diferentes o-difenoles (HAREL & MAYER, 1971).

Sin embargo, la bibliografía revela que las características obtenidas para las variedades de uvas americanas e israelitas no pueden ser sistematizadas para las variedades europeas, e incluso dentro de un mismo país estas características vanan de una región a otra y de una variedad a otra.

El propósito del presente trabajo, es realizar un estudio cinético de la PPO parcialmente purificada de uva Monastrell procedente de Jumilla (Murcia), como paso previo para intentar abordar las posibles relaciones de esta actividad con los problemas de oxidación característicos que presenta el vino tinto de la zona.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### PURIFICACIÓN DEL ENZIMA

Las uvas Monastrell (*Vitis vinifera* L.) fueron recolectadas en estado de maduración y libres de hongos en Jumilla, Murcia (España), llevadas al laboratorio en hielo y congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El enzima fue extraído haciendo una modificación al método de LERNER *et al.* (1972). 200 gramos de uva descongelados en 100 ml de tampón fosfato 100 mM pH 7.3 conteniendo ascorbato sódico 10 mM, fueron homogeneizados durante 15 segundos con una trituradora de aspas, filtrados a través de 8 capas de gasa y centrifugados a  $4000 \times g$  durante 15 minutos. El precipitado fue extraído durante 6 horas con Titron X-100 al 1.5% y con polivinilpirrolidona insoluble (PVP) al 2%. Posteriormente fue centrifugado a  $15000 \times g$  durante 1 hora. El sobrenadante fue sometido a precipitación con sulfato amónico entre el 45 y el 95% de saturación a  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado fue resuspendido en agua destilada y tras diálisis fue utilizado como fuente de enzima.

Las concentraciones de proteínas fueron medidas siguiendo el método de LOWRY *et al.* (1951) después de precipitar los fenoles con PVP.

### ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Tanto la actividad cresolasa sobre *p*-cresol como la catecolasa sobre 4-metil catecol han sido medidas espectrofotométricamente por la aparición de la 4-metil-*o*-benzoquinona a  $400 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 1350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), a sus respectivos pHs óptimos de 7.0 y de 5.0.

Una unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que produce  $1 \mu\text{mol}$  de 4-metil-*o*-benzoquinona por minuto, usando 4-metil catecol 30 mM en tampón acetato 10 mM pH 5.0 a  $30^{\circ}\text{C}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La PPO de uva Monastrell fue purificada 126 veces siguiendo una modificación del método

de LERNER *et al.* (1972) y obteniendo una recuperación del 70%.

La PPO parcialmente purificada presenta tanto actividad catecolasa (fig. 1, a) como cresolasa (fig. 1, b), con pHs óptimos de 5.0 y 7.0, respectivamente. Esta última actividad se caracteriza por un período de retardo (L) en la aparición de la actividad enzimática. Este período de retardo se define como la intersección con el eje de abscisas de la prolongación de la zona lineal de la curva de acumulación de producto. La velocidad de estado estacionario es evaluada por estimación de la pendiente de dicha zona lineal.

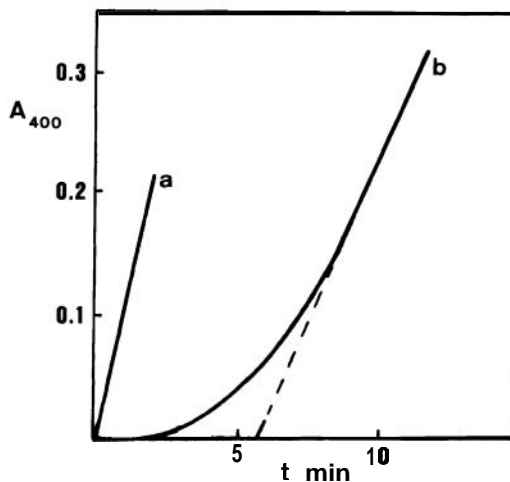


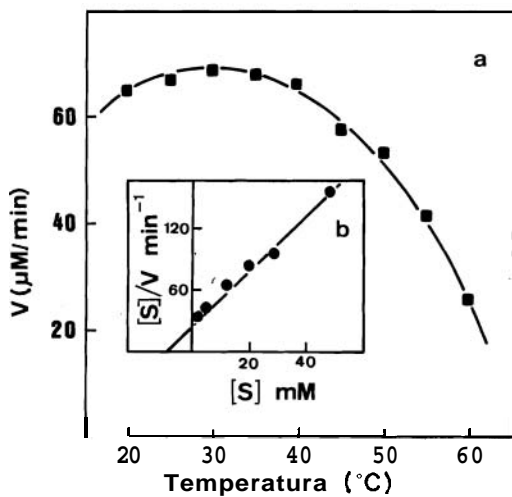
FIGURA 1. Actividades enzimáticas de PPO de uva Monastrell. (a) Actividad catecolasa. El medio de reacción a  $30^{\circ}\text{C}$  contiene, en un volumen final de 2.5 ml: 0.75  $\mu\text{g/ml}$  de PPO y 4-metil catecol 30 mM en tampón acetato 10 mM pH 5.0. (b) Actividad cresolasa. El medio de reacción a  $30^{\circ}\text{C}$  contiene en un volumen final de 1 ml: 0.5 mM *p*-cresol en tampón fosfato 10 mM pH 7.0 y 480  $\mu\text{g/ml}$  de PPO parcialmente purificada.

Enzymatic activities of Monastrell grape PPO. (a) Catecholase activity. The reaction mixture at  $30^{\circ}\text{C}$  included, in a total volume of 2.5 ml: 0.75  $\mu\text{g/ml}$  of PPO and 30 mM 4-methyl catechol in 10 mM acetate buffer at pH 5.0. (b) Cresolase activity. The reaction medium at  $30^{\circ}\text{C}$  contained in a final volume of 1 ml: (b) 0.5 mM *p*-cresol in 10 mM phosphate buffer pH 7.0 and 480  $\mu\text{g/ml}$  of partially purified PPO.

### OXIDACIÓN DE DIFENOLES

El efecto de la temperatura sobre la expresión de la actividad catecolasa de PPO se muestra en la figura 2, a. La temperatura óptima del enzima para esta actividad se encontró en el rango entre  $25$  y  $40^{\circ}\text{C}$  con un ligero descenso a mayores temperaturas. Esta resistencia a altas temperaturas es una característica de

PPO de uva Monastrell, ya que en general el resto de las PPOs de uva estudiadas tienen su rango de temperatura entre 25 y 30° C (NAKAMURA *et al.*, 1983; CASH *et al.*, 1976).



**FIGURA 2.** (a) Efecto de la temperatura sobre la actividad catecolasa de PPO de uva Monastrell. El medio de reacción a diferentes temperaturas contiene en un volumen total de 2.5 ml: 5 µg/ml de PPO parcialmente purificada y 4-metil catecol 30 mM en tampón acetato 10 mM pH 5.0. (b) Representación de Hanes. El medio de reacción a 30° C contiene: 5 µg/ml de PPO parcialmente purificada y 4-metil catecol entre 2-50 mM en tampón acetato 10 mM pH 5.0.

(a) Effect of temperature on the catecholase activity of Monastrell grape PPO. The reaction mixture at different temperatures included in a total volume of 2.5 ml: 5 µg/ml of partially purified PPO and 30 mM 4-methyl catechol in a 10 mM acetate buffer, at pH 5.0 (b) Hanes plot. The reaction mixture at 30° C included: 5 µg/ml of PPO partially purified PPO and 4-methyl catechol in a range between 2-50 mM in a 10 mM acetate buffer, at pH 5.0.

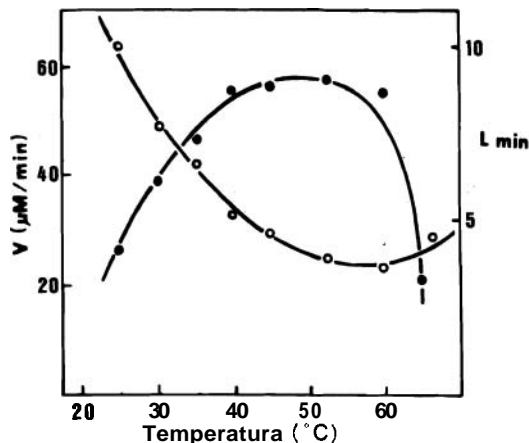
La Km aparente para 4-metil catecol fue evaluada mediante la representación de Hanes, obteniendo un valor de 9 mM (fig. 2, b). Dicha Km es un valor intermedio entre los valores descritos para otras PPOs de uva (3 mM - 24 mM) (LERNER & MAYER, 1976; HAREL & MAYER, 1971) y muy alta cuando se compara con los valores obtenidos con enzimas de champiñón y bacterias.

**HIDROXILACIÓN DE MONOFENOLES**

En la figura 3 se muestra la dependencia de la actividad cresolasa con la temperatura observando una curva ligeramente sesgada hacia un rango de temperatura óptima entre 40-60° C. En la misma figura se muestra el efecto de la

temperatura sobre el período de retardo característico de la actividad cresolasa, apareciendo un marcado descenso en el período de retardo al aumentar la temperatura.

Cuando se comparan la figura 2, a y la figura 3 se puede destacar el hecho de que cada una de las dos actividades tiene una temperatura óptima distinta a pesar de estar situadas ambas en un mismo centro activo.



**FIGURA 3.** Efecto de la temperatura sobre la actividad cresolasa de PPO de uva Monastrell (● --- ○). El medio de reacción a diferentes temperaturas incluyen un volumen final de 1 ml: 480 µg/ml de PPO parcialmente purificada y p-cresol 0.5 mM en tampón fosfato 10 mM pH 7.0. Influencia de la temperatura sobre el período de retardo de la actividad cresolada (○ --- ○) bajo las mismas condiciones.

Effect of temperature on the creiolase activity of Monastrell grape PPO (● --- ●). The reaction medium at different temperatures included, in a total volume of 1 ml: 480 µg/ml of partially purified PPO and 0.5 mM p-cresol in a 10 mM phosphate buffer, at pH 7.0. Influence of temperature on the lag period of creiolase activity (○ --- ○) under the same conditions.

El período de retardo se vio afectado por la concentración de enzima, así al aumentar dicha concentración en un rango de 120 - 1200 µg/ml, el período de retardo disminuía desde 18 hasta 3 minutos (fig. 4).

Como se ha indicado antes, tanto el aumento de la temperatura como el aumento en la concentración de enzima son capaces de disminuir el período de retardo, lo cual sugiere que el período de retardo es consecuencia de la actividad cresolasa expresada en el medio de reacción más que de la concentración de enzima presente en él. Para examinar esta posibilidad los resultados obtenidos en la figura 3 (excepto los dos valores de alta temperatura, donde hay termoinactivación) fueron redibujados en función de la actividad cresolasa expresada (fig. 4), observando una similitud con la gráfica obte-

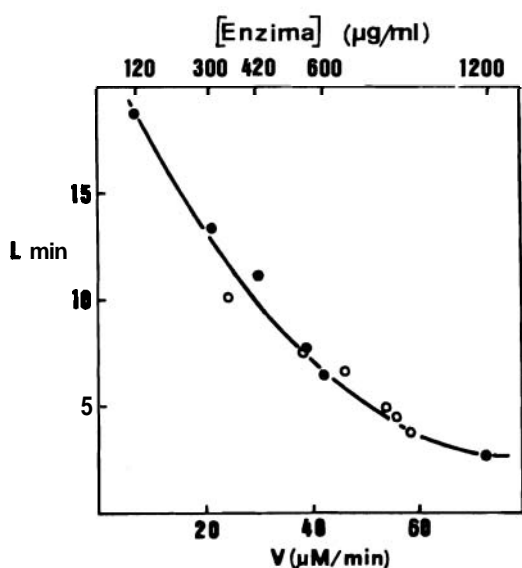


FIGURA 4. Dependencia del período de retardo con la concentración del enzima. El medio de reacción a 30° C incluye en un volumen final de 1 ml: enzima en un rango entre 120-1200 µg/ml de PPO parcialmente purificada y *p*-cresol 0.5 mM en tampón fosfato 10 mM pH 7.0 (● --- ●). La dependencia del periodo de retardo de la actividad cresolasa expresado en función de la temperatura es mostrado por (○ --- ○). Las condiciones son las mismas que en la figura 3.

Dependence of lag period with enzyme concentration. The reaction-mixture at 30° C included in a final volume of 1 ml: enzyme in a range between 120-1200 µg/ml of partially purified PPO and 0.5 mM *p*-cresol in 10 mM phosphate buffer, at pH 7.0 (● --- ●). The dependence of the lag period with cresolase activity expressed in the reaction medium as function of temperature is shown by (○ --- ○). The conditions are the same as fig. 3.

nida al aumentar la concentración de enzima, por tanto el período de retardo debe ser correlacionado con el aumento en la actividad enzimática: tanto si ésta se expresa por un incremento en la concentración de enzima como si se debe a la activación del enzima al incrementar la temperatura.

Es un hecho bien documentado que el período de retardo de la actividad cresolasa puede ser acortado o eliminado por la adición de agentes reductores y o-difenoles; actuando estos últimos como co-sustratos (GARCÍA CARMONA et al., 1979; DUCKWORTH & COLEMAN, 1970). Esto ha sido interpretado en la bibliografía asumiendo un centro de activación para los o-difenoles (POMERANTZ & WARNER, 1967), estableciendo la siguiente ecuación empírica para relacionar el período de retardo

con la concentración de o-difenoles en el medio de reacción:

$$\frac{1}{L} = \frac{1}{l} + \frac{1}{I} \frac{[\text{o-difenol}]}{K_{act}} \quad (1)$$

Donde *L*, *l* y *K<sub>act</sub>* representan, respectivamente, el período de retardo en presencia y ausencia de o-difenol y la constante de activación para el o-difenol. La *K<sub>act</sub>* puede interpretarse como la constante de afinidad del o-difenol por el centro de activación. La figura 5, a representa el efecto de la concentración de 4-metil catecol sobre el período de retardo. El cálculo de la *K<sub>act</sub>* se obtiene de la representación de la figura 5, b; evaluándose en 1.6 µM. Dicha *K<sub>act</sub>* es relativamente alta cuando se compara con otras PPOs (LERCH & ETTLINGER, 1972) y muy pequeña cuando se compara con la *K<sub>m</sub>* aparente para el 4-metil catecol.

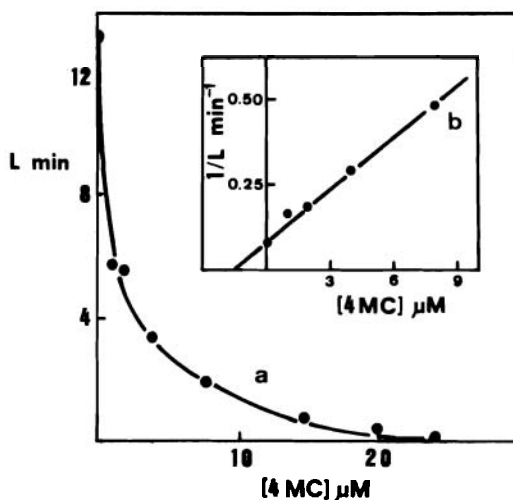


FIGURA 5. Influencia del 4-metil catecol sobre el periodo de retardo. El medio de reacción a 30° C incluye en un volumen final de 1 ml: 480 µg/ml de PPO parcialmente purificada, *p*-cresol 0.5 mM y 4-metil catecol (0-24 µM) en tampón fosfato 10 mM pH 7.0. La gráfica insertada muestra los mismos resultados utilizando la ecuación (1) para calcular la *K<sub>act</sub>*.

Influence of 4-methyl catechol on the lag period. The reaction medium at 30° C contained in a final volume of 1 ml: 480 µg/ml of partially purified PPO, 0.5 mM *p*-cresol and 4-methyl catechol (0-24 µM) in 10 mM phosphate buffer, at pH 7.0. Inset graph shows the same results plotted according to equation (1) for calculating the *K<sub>act</sub>*.

Cuando se estudió el efecto de la concentración de *p*-cresol sobre la actividad cresolasa en un rango entre 0.25-2 mM, se observó que el

período de retardo aumentaba al aumentar la concentración de sustrato (fig. 6, a).

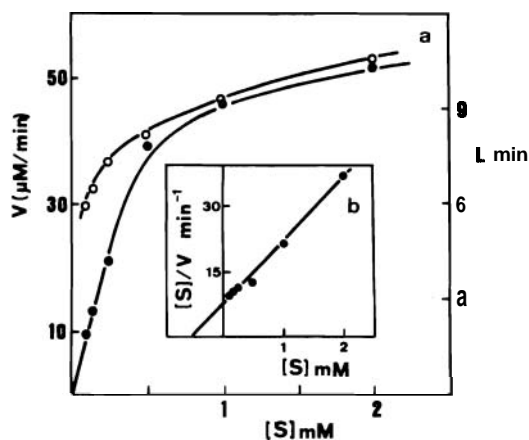


FIGURA 6. (a) Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad cresolasa de PPO. El medio de reacción a 30° C contiene, en un volumen total de 1 ml: 480 µg/ml de PPO parcialmente purificada y *p*-cresol en un rango entre 0-2 mM en tampón fosfato 10 mM pH 7.0 (● --- ●). La influencia de la concentración de sustrato sobre el período de retardo bajo las mismas condiciones (○ --- ○). (b) La gráfica insertada muestra la representación de Hanes para evaluar la Km aparente sobre el *p*-cresol.

(a) Effect of substrate concentration on cresolase activity of PPO. The reaction mixture at 30° C included, in a total volume of 1 ml: 480 µg/ml of partially purified PPO and *p*-cresol in a range between 0-2 mM in 10 mM phosphate buffer, at pH 7.0 (● --- ●). The influence of substrate concentration on the lag period under the same conditions (○ --- ○). (b) The inset graph shows the Hanes plot for evaluating the apparent Km for *p*-cresol.

La Km aparente para *p*-cresol fue evaluada mediante la representación de Hanes (fig. 6, b), obteniendo un valor de 0.5 mM. Este resultado no puede ser comparado con la bibliografía, debido a que la Km para la actividad cresolasa de otras PPOs de uva no ha sido descrita, ya que en general se ha negado la existencia de actividad cresolasa en PPO de uva (NAKAMURA *et al.*, 1983). Esta falta de actividad cresolasa ha sido explicada por la pérdida de dicha actividad durante la extracción y purificación del enzima, aunque los resultados de este trabajo parecen indicar que más que una pérdida real de la actividad, lo que puede ocurrir es un enmascaramiento de la actividad por la pérdida de fenoles durante los pasos de purificación, lo que provoca un aumento importante en los períodos de retardo.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por

una ayuda de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (Proyecto PA85-0271). A. Sánchez Ferrer es becario del Plan de Formación del Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia. R. Bru es becario de la Comunidad Autónoma de Murcia (Biotecnología). Agradecemos a M. J. Sánchez Contreras su colaboración técnica. Agradecemos a bodegas Umbría la donación de las muestras utilizadas en este estudio.

#### BIBLIOGRAFÍA

- CASH, J. N.; SISTRUNK, W. A. & STUTTE, C. A. 1976. Characteristics of Concord grape polyphenoloxidase involved in juice color loss. *J. Food Sci.* 41: 1.398-1.402.
- DUCKWORTH, H. W. & COLEMAN, J. E. 1970. Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, 245: 1.613-1.625.
- GARCÍA-CARMONA, F.; PEDRENO, E.; GALINDO, J. D. & GARCÍA-CÁNOVAS, F. 1979. A new spectrophotometric method for the determination of cresolase activity of epidermis tyrosinase. *Anal. Biochem.*, 95: 433-435.
- IVANOV, T. 1967. Sur l'oxydation du moût de raisin 1. Activité de lapolyphénoloxydase du raisin des cépages «Muscat Rouge», «Dimiat», «Riesling» et «Aligote». *Ann. Technol. Agric.*, 16: 35-39.
- HAREL, E. & MAYER, A. M. 1971. Partial purification and properties of catechol oxidases in grapes. *Phytochemistry*, 10: 17-22.
- LERCH, K. & ETTLINGER, L. 1972. Purification and characterization of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *Eur. J. Biochem.*, 31: 427-437.
- LERNER, H. R.; MAYER, A. M. & HAREL, E. 1972. Evidence for conformational changes in grape catechol oxidase. *Phytochemistry*, 11: 2.415-2.421.
- LERNER, H. R. & MAYER, A. M. 1976. Reaction mechanism of grape catechol oxidase: A Kinetic study. *Phytochemistry*, 15: 57-60.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- NAKAMURA, K.; AMANO, Y. & KAGAMI, M. 1983. Purification and some properties of a polyphenol oxidase from Kosu grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 34: 122-127.
- POMERANTZ, S. H. & WARNER, M. C. 1967. 3, 4-Dihydroxy-L-phenylalanine as the tyrosinase co-factor. *J. Biol. Chem.*, 242: 5.308-5.314.
- SAPIS, J. C.; MACHEIX, J. J. & CORDONNIER, R. E. 1983. The browning capacity of grapes. I. Changes in polyphenol oxidase activities during development and maturation of the fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 31: 342-345.
- WHITAKER, J. R. 1972. *Principles of enzymology for the food sciences*. Marcel Dekker. Inc. New York.
- WISSEMANN, K. W. & LEE, C. Y. 1980. Polyphenoloxidase activity during grape maturation and wine production. *Am. J. Enol. Vitic.*, 31: 206-211.