

**EFFECTO DE LA AGRICULTURA ECOLÓGICA
EN LOS NIVELES DE PPO DE UVA
MONASTRELL CULTIVADA EN LA PROVINCIA
DE ALBACETE***

Por

Estrella Núñez Delicado**

Carmen Lucas Abellán

José Manuel López Nicolás.

* Aprobado el 4 de Julio de 2005

**Autor para correspondencia:

Dpto. de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM). Avenida de los Jerónimos s/n.30107 Guadalupe. Murcia

Teléfono: 968-278616 - Fax: 968-278620

E-mail: enunez@pdi.ucam.edu

calidad sin, o al menos reduciendo, el pardeamiento enzimático (Valero y cols. 1989).

En este trabajo, la muestra de PPO de uva Monastrell cultivada de forma ecológica y tradicional, fue parcialmente purificada usando una modificación del método descrito por Sánchez-Ferrer et al. (1989), que consiste en la separación de fases con TX-114 (más detalles en materiales y métodos). Mediante este método, la enzima fue extraída en estado latente y pudo ser activada por diferentes métodos (choque ácido, detergentes, proteasas) tal y como había sido descrito en la bibliografía (Sánchez-Ferrer y cols. 1989).

Las muestras de PPO de uva Monastrell ecológica y tradicional fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida, mostrando en ambos casos una sola banda cuando se tiñeron los geles para actividad usando L-Dopa y MBTH como sustratos en ambos casos (Fig 1). Este resultado fue similar al obtenido para PPO soluble de patata (Sánchez-Ferrer y cols. 1993) lechuga iceberg (Chazarra y cols. 1996) plátano (Sojo y cols. 1998) y champiñón (Núñez-Delicado y cols. 2003). Por otra parte, la figura 1 muestra la misma banda electroforética en ambos casos, indicando por tanto la presencia de la misma isoenzima de PPO en uvas Monastrell cultivadas de forma ecológica (Fig. 1B) o tradicional (Fig. 1A).

Cuando se estudió la actividad de PPO usando TBC como sustrato a diferentes valores de pH en ausencia de SDS, ambas enzimas: de uva, ecológica y tradicional, mostraron un óptimo a pH 4.0 (figura 2A, ●, ■). Estos datos coincidieron con el pH óptimo descrito previamente para PPO de uva cultivada por el sistema tradicional (Sánchez-Ferrer, 1989). El bajo pH óptimo fue resultado de la activación de la enzima por choque ácido. Este pH óptimo se desplazó a pH 5.0 en presencia de 3.5 mM de SDS en ambos casos (figura 2A, ○, □). Este efecto de desplazamiento de pH en presencia de SDS ya ha sido descrito anteriormente para PPO de champiñón (Núñez-Delicado y cols. 2003).

La figura 2A también muestra que la actividad de PPO de uva ecológica (Fig. 2A, ●, ○) fue el doble ($P < 0.05$) que la observada para uva tradicional (Fig. 2A, ■, □), tanto en presencia como en ausencia de SDS. El mayor grado de activación se obtuvo a pH 6.0 en ambos casos (figura 2B) con un valor de activación de 8.6 y 7 veces para uva ecológica y tradicional, respectivamente.

Para una mejor caracterización de las diferencias entre los dos tipos de cultivo, se estudió el efecto de la concentración de SDS, a pH 6.0. La figura 3 muestra que el proceso de activación fue saturable, presentando la máxima actividad a 3.5 mM de SDS para ambos tipos de uva: Monastrell ecológica y tradicional. Una vez más, la actividad de PPO en presencia de SDS fue aproximadamente dos veces mayor en uva Monastrell ecológica que tradicional ($P < 0.001$).

El grado de activación de la enzima también fue dependiente del sustrato utilizado: TBC, 4MC, CGA. Se encontró una alta dependencia entre el grado de activación y la hidrofobicidad del sustrato ($TBC > 4MC > CGA$). Los cambios en la conformación de la enzima provocados por el detergente en el proceso de activación, favorecen el acceso de los sustratos hidrófobos al centro activo de la enzima, tal y como ha sido descrito previamente en la bibliografía para PPO de hoja de patata (Sánchez-Ferrer y cols. 1993).

Finalmente, también se estudió la activación proteolítica de la enzima en presencia de 0.5 mg/mL de tripsina (Fig. 4). El proceso de activación fue dependiente del tiempo, presentando la máxima activación tras 20 minutos de incubación. En el caso de uva ecológica, la enzima latente se activó 29 veces, prácticamente el doble que el grado de activación alcanzado por PPO de uva tradicional (17 veces). La actividad de PPO activada por tripsina de uva ecológica y tradicional fue independiente del pH entre 3.0 y 7.5 (Fig.5A). El máximo grado de activación proteolítica de ambas PPOs latentes fue encontrado a pH básico (Fig. 5B). En ambos tipos de uva Monastrell, ecológica y tradicional, el grado de activación obtenido usando tripsina como agente activador fue más alto (2 o 3 veces) que con choque ácido y SDS.

En resumen, este estudio revela que PPO de uva Monastrell ecológica y tradicional se extrae en estado latente y puede ser activada por diferentes métodos como pueden ser: choque ácido, SDS y tripsina, siendo el último método de activación el más efectivo (29 vs 17 veces para uva ecológica y tradicional, respectivamente). La alta actividad de PPO presentada en uva Monastrell ecológica comparada, con uva tradicional, podría ser el resultado de los cambios en el metabolismo fenólico de plantas en ausencia de pesticidas sintéticos y fertilizantes minerales fácilmente solubles, especialmente cobre y azufre. Este aumento de la actividad de PPO puede contribuir a crear resistencias a enfermedades en cultivos ecológicos, por rápida oxidación de fenoles a quinonas que inhiben la poligalacturonasa de patógenos (Ohazurike y Arinze 1996).

Como conclusión, los resultados presentados en este artículo sugieren que PPO puede ser considerada como un marcador endógeno específico para la diferenciación de uva Monastrell ecológica y tradicional, tal y como ha sido descrito previamente en melocotón y pera ecológica (Carbonaro y cols. 2001). Estos datos indican que los vinos obtenidos a partir de uva ecológica pueden estar más oxidados que los obtenidos a partir de uva tradicional por la mayor actividad de PPO observada en uvas ecológicas.

3. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente subvencionado por la Consejería de Economía e Industria e Innovación de la Región de Murcia (4I01SIU002) y la Universidad Católica San Antonio de Murcia (PMAF111-1-C-03). Queremos agradecer especialmente a la Cooperativa Santiago Apóstol de Montealegre del Castillo por suministrarnos amablemente las muestras de uva.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Angleton, E.A. Flurkey, W.H. (1984). Activation and alteration of plant and fungal polyphenol oxidase isoenzymes in sodium dodecyl sulphate electrophoresis. *Phytochemistry*, 23: 2723-2725.
- Becharrell, B., MacFie, J.H. (1991). Consumer attitudes to organic foods. *British Food J*, 93: 25-30.
- Bordier, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem*, 256: 1604-1607.
- Bourn, D., Prescott J. (2002). A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Crit Rev Food Sci Nut*, 42: 1-34.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilising the principle of protein-dyes binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Carbonaro, M., Mattera, M. (2001). Polyphenoloxidase activity and polyphenol levels in organically and conventionally grown peach (*Prunus persica* L., cv. Regina bianca) and pear (*Pyrus communis* L., cv. Williams). *Food Chem*, 72: 419-424.
- Chazarra, S., Cabanes, J., Escribano, J., García-Carmona, F. (1996). Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J Agric Food Chem*, 44: 984-988.
- Daniel, O., Meier, M.S., Schlatter, J., Frischknecht, P. (1999). Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environ Health Perspectives*, 107: 109-114.
- Golbeck, J.H., Cammarata, K. (1981). Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol*, 67: 977-984.
- International Federation of Organic Agricultural Movements, Basic Standards for Organic Production and Processing. *IFOAM General Assembly*. Argentina, November 1998. IFOAM, Germany.

- Ivanov, T. (1967). Sur l'oxydation du mout de raisin I. Activité de la polyphénolase du raisin des cépages "Muscat Rouge", "Dimiat", Riesling" et "Aligote". *Ann Technol Agric*, 16: 35-39.
- Kenten, R.H. (1957). Latent phenolase in extracts of broad bean (*Vicia faba* L.) 1. Activation by acid and alkali. *Biochem J*, 67: 300-307.
- Kidron, M., Harel, E., Mayer, A.M. (1978). Catechol oxidase activity in grapes and wine. *Am J Enol Vitic*, 29: 30-35.
- Laveda, F., Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A. (2000). Reversible sodium dodecyl sulphate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch Biochem Biophys*, 379: 1-6.
- Laveda, F., Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A. (2003). Proteolytic activation of latent paraguay peach PPO. Characterization of monophenolase activity. *J Agric Food Chem*, 49: 1003-1008.
- Lea, A.G., Beech, F.W. (1978). The phenolic of ciders: effect of cultures conditions. *J Sci Food Agric*, 29: 493-496.
- Lerner, H.R., Mayer, A.M. (1976). Reaction mechanism of grape catechol oxidase. A kinetic study. *Phytochemistry*, 15: 57-60.
- Martinez, V.M., Whitaker, J.R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci Technol*, 6: 195-200.
- Mayer, A.M. (1987). Polyphenol oxidases in plants-Recent progress. *Phytochemistry*, 26: 11-20.
- Mayer, A.M., Harel, E. (1979). Review: Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, 18: 193-225.
- Moore, B.M., Flurkey, W.H. (1990). Sodium dodecyl sulphate activation of a plant polyphenol oxidase. *J Biol Chem*, 265: 4982-4988.
- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J., Aubert, S. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit Rev Food Sci Nut*, 34: 109-157.
- Núñez-Delicado, E., Bru, R., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F. (1996). Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase. *J Chromatog B*, 680: 105-112.
- Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A. (2003). Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem*, 51: 2058-2063.
- Ohazurike, N.C., Arinze, A.E. (1996). Changes in polyphenol oxidase and peroxidase levels in cococyan tubers of different postharvest ages infected by *Sclerotium rolfsii* sacc. *Nahrung*, 40: 25-27.
- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R., Cabanes, J., García-Carmona, F. (1988). Characterization of catecholase and cresolase activities of Monastrell grape polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 27: 319-321.

- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R., Valero, E., García-Carmona, F. (1989)a. Changes in pH-dependent grape polyphenol oxidase activity during maturation. *J Agric Food Chem*, 37: 1242-1245.
- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R., García-Carmona, F. (1989)b. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol*, 91: 1481-1487.
- Sánchez-Ferrer, A., Laveda, F., García-Carmona, F. (1993)a. Partial purification of soluble potato polyphenol oxidase by partitioning in an aqueous two-phase system. *J Agric Food Chem*, 41: 1583-1586.
- Sánchez-Ferrer, A., Laveda, F., García-Carmona, F. (1993)b. Substrate-dependent activation of latent potato leaf polyphenol oxidase by anionic surfactants. *J Agric Food Chem*, 41: 1583-1586.
- Sánchez-Ferrer, A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F., García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 1247: 1-11.
- Sapis, J.C., Macheix, J.J., Cordonnier, R.E. (1983). The browning capacity of grapes. 1. Changes in polyphenol oxidase activities during development and maturation of the fruit. *J Agric Food Chem*, 31: 342-345.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenols with phosphomolibdic-phostungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 14: 144-158.
- Sojo, M.M., Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A. (1998). Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 8000 for removal of polyphenols. *J Agric Food Chem*, 46: 4924-4930.
- Swain, I., Mapson, L.W., Robb, D.A. (1966). Activation of *Vicia faba* tyrosinase as effected by denaturing agents. *Phytochemistry*, 5: 469-482.
- Valero, E., Sánchez-Ferrer, A., Varón, R., García-Carmona, F. (1989). Evolution of grape polyphenol oxidase activity and phenolic content during maturation and vinification. *Vitis*, 28: 58-95.
- Valero, E., Varón, R., García-Carmona, F. (1988). *Characterization of polyphenol oxidase from Airen grapes*. *J Food Sci*, 53: 1482-1485.
- Werck-Reichert, D., Benveniste, I., Teutsch, H., Gabriac, B. (1991). Glycerol allows low-temperature phase separation of membrane proteins solubilized in Triton X-114; application to the purification of plant cytochromes P₄₅₀ and b₅. *Anal Biochem*, 197: 125-131.

5. TABLAS Y FIGURAS

	4- <i>tert</i> -Butylcatechol ^a	4-Methylcatechol ^b	Chlorogenic acid ^c
PPO de uva Monastrell ecológica	8.6	5.5	3
PPO de uva Monastrell convencional	7	3.6	1.5

^aMedido en el medio de reacción estándar, en ausencia o presencia de SDS 3.5 mM.

^bMedido en el medio de reacción estándar, pero usando como sustrato 4-metilcatecol 2.5 mM, en ausencia o presencia de SDS 3.5 mM.

^cMedido en el medio de reacción estándar, pero usando como sustrato ácido clorogénico 2.5 mM, en ausencia o presencia de SDS 3.5 mM.

TABLA 1 (Núñez Delicado y cols, 2005): Grado de activación por SDS de PPO de uva Monastrell ecológica y tradicional, usando diferentes sustratos.



FIGURA 1 (Núñez Delicado y cols, 2005): Electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) de (A) PPO de uva Monastrell tradicional y (B) PPO de uva Monastrell ecológica, teñidos por actividad sobre 5mM de L-Dopa y 2mM de MBTH en tampón acetato (pH 4.0).

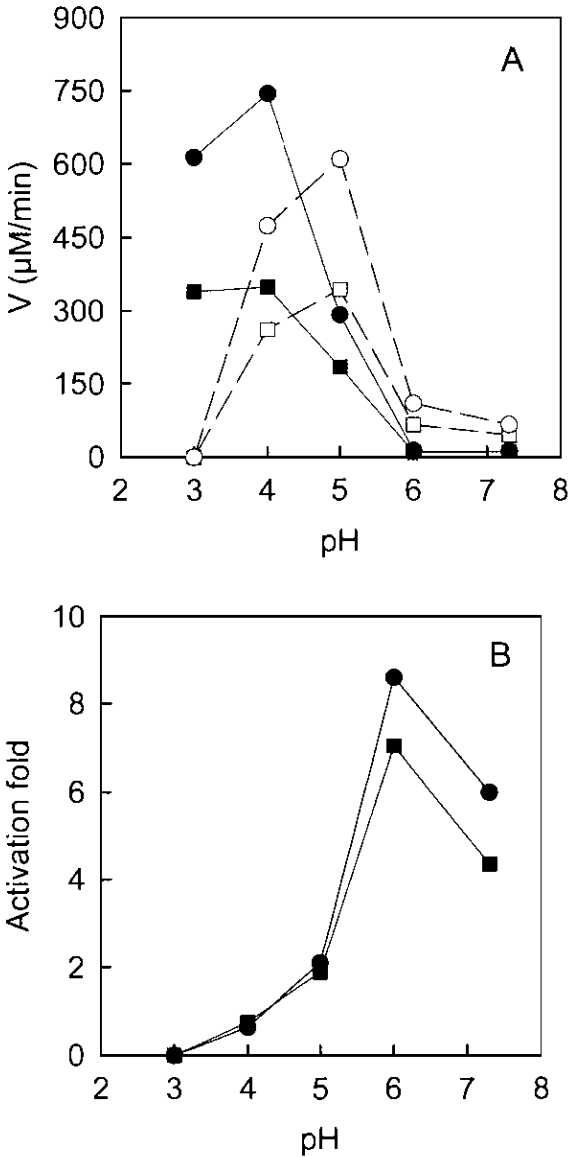


FIGURA 2 (Núñez Delicado y cols. 2005): Efecto del pH en la actividad de PPO de uva Monastrell en tampón acetato 10 mM (pH 3.0-5.0) o tampón fosfato 10 mM (pH 6.0-7.5). El medio de reacción a 25 °C contenía 2.5 mM de TBC y 25 mg/mL de PPO parcialmente purificada. PPO de uva Monastrell ecológica en ausencia (●) o presencia (○) de 3.5 mM de SDS. PPO de uva Monastrell tradicional en ausencia (■) o presencia (□) de 3.5 de SDS. (B) grado de activación por SDS en uva Monastrell ecológica (●) y tradicional (■).

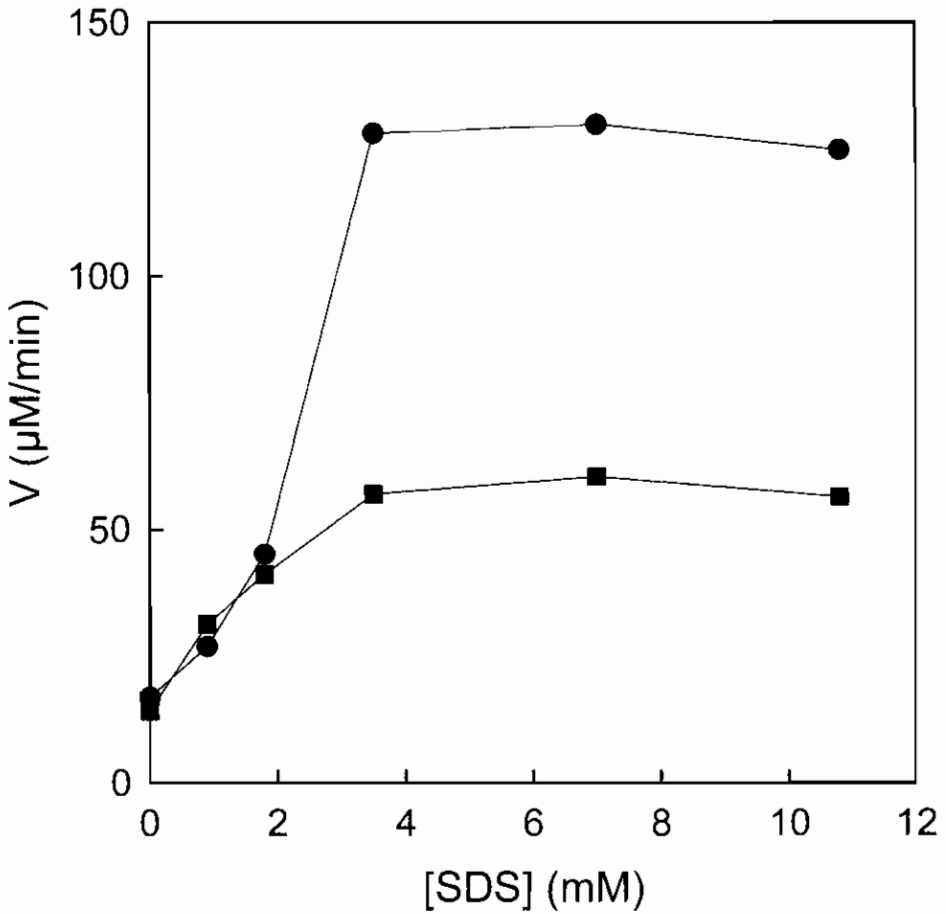


FIGURA 3 (Núñez Delicado y cols. 2005): Efecto de la concentración de SDS en PPO de uva Monastrell. El medio de reacción a 25 °C contenía en tampón fosfato 10 mM pH 6.0, TBC 2.5 mM, concentraciones crecientes de SDS (0-10 mM) y 25 mg/mL de PPO parcialmente purificada de uva ecológica (●) o tradicional (■).

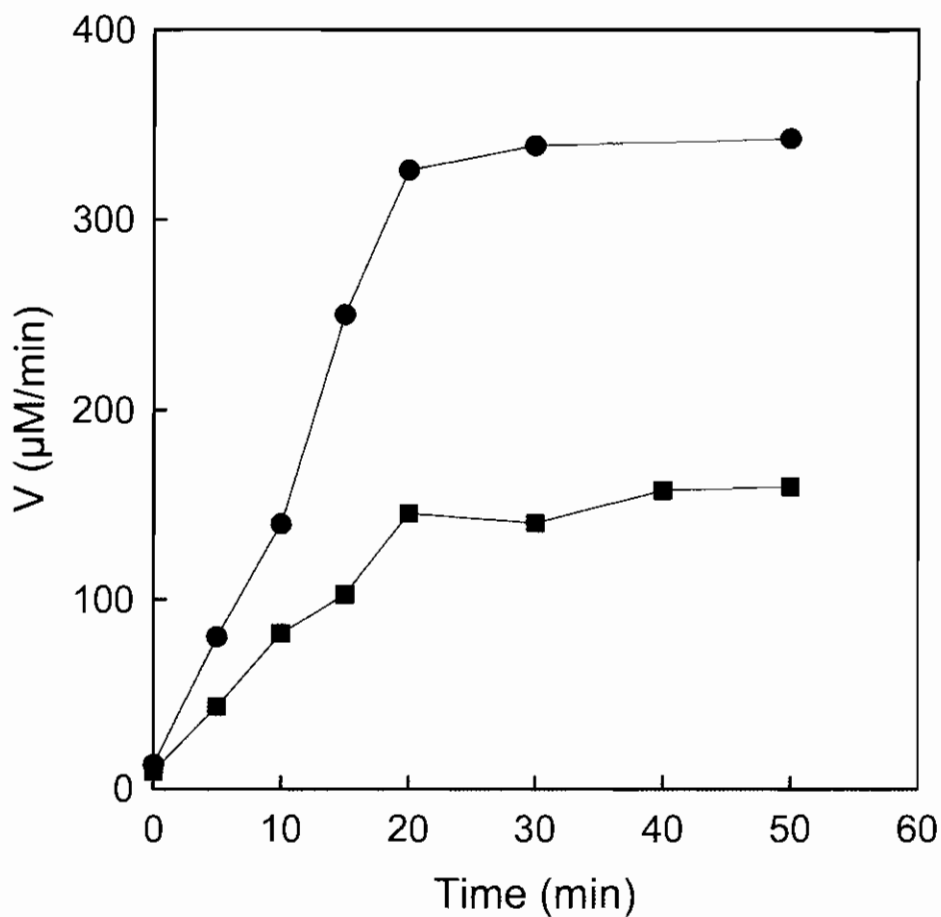


FIGURA 4 (Núñez Delicado y cols. 2005): Efecto de la incubación de PPO de uva Monastrell con tripsina durante un tiempo determinado. El medio de reacción a 25 °C contenía en tampón fosfato 10 mM pH 6.0, TBC 2.5 mM y 25 mg/mL de PPO uva Monastrell ecológica incubada con tripsina 0.5 mg/mL durante diferentes tiempos (●) ó 25 mg/mL de PPO de uva Monastrell tradicional incubada con tripsina 0.5 mg/mL durante diferentes tiempos (■).

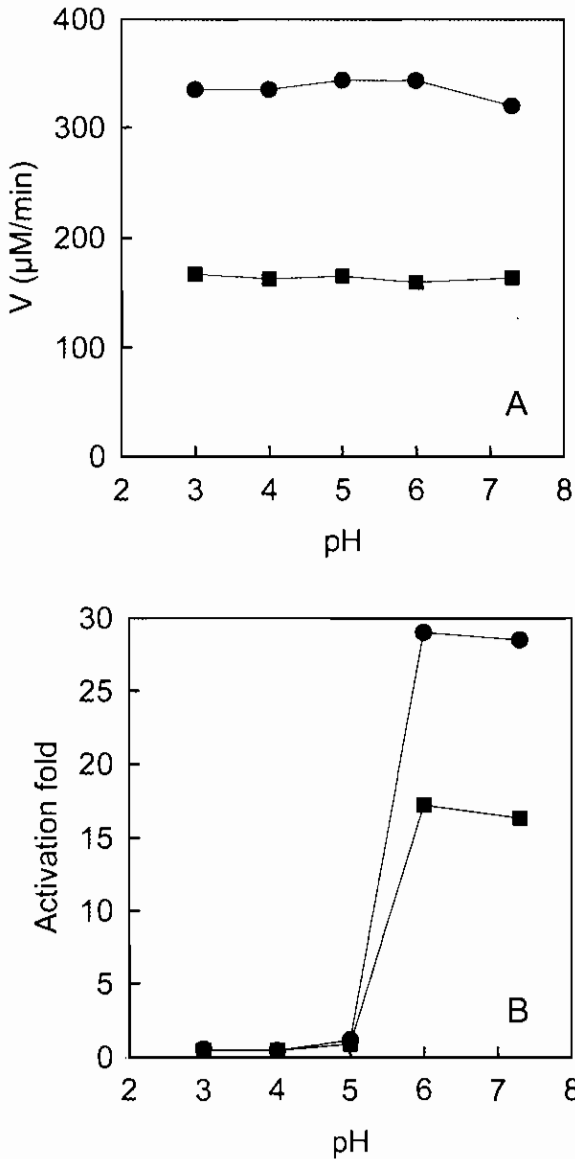


FIGURA 5 (Núñez Delicado y cols. 2005): Efecto del pH sobre la actividad de PPO de uva Monastrell activada con tripsina, en tampón acetato 10 mM (pH 3.0-5.0) o tampón fosfato 10 mM (pH 6.0-7.5). El medio de reacción a 25 °C contenía 2.5 mM de TBC y 25 mg/mL de: PPO de uva ecológica activada con tripsina (●) o PPO de uva tradicional activada con tripsina (■). (B) grado de activación por tripsina en PPO de uva Monastrell ecológica (●) y tradicional (■) a diferentes pHs.