



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR-A

**Purificación y Clonación de
Sistemas Enzimáticos para la
Bioconversión de Monofenoles en
Difenoles: Polifenol Oxidasa,
Tirosinasa y Fenol Hidroxilasa**

Esteban Orenes Piñero

2006



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR-A

PURIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE
SISTEMAS ENZIMÁTICOS PARA LA
BIOCONVERSIÓN DE MONOFENOLES EN
DIFENOLES: POLIFENOL OXIDASA,
TIROSINASA Y FENOL HIDROXILASA

Memoria presentada para aspirar al grado de
Doctor por la Universidad de Murcia

Esteban Orenes Piñero

2006



U N I V E R S I D A D
D E M U R C I A

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR-A

D. José Antonio Teruel Puche, Profesor Titular de Universidad del Área de Bioquímica y Biología Molecular y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, de la Universidad de Murcia,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Purificación y clonación de sistemas enzimáticos para la bioconversión de monofenoles en difenoles: Polifenol oxidasa, tirosinasa y fenol hidroxilasa**”, ha sido realizada por **D. Esteban Orenes Piñero**, bajo la inmediata dirección y supervisión de **D. Álvaro Sánchez Ferrer** y **D. Francisco García Carmona**, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la comisión de Doctorado.

Murcia, a 19 de Septiembre de 2006

Fdo. José Antonio Teruel Puche



U N I V E R S I D A D
D E M U R C I A

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR-A

D. Álvaro Sánchez Ferrer y D. Francisco García Carmona, Catedráticos de Universidad del Área de Bioquímica y Biología Molecular en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A,

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Purificación y clonación de sistemas enzimáticos para la bioconversión de monofenoles en difenoles: Polifenol oxidasa, tirosinasa y fenol hidroxilasa**”, realizada por D. Esteban Orenes Piñero, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 19 de Septiembre de 2006

Fdo. Álvaro Sánchez Ferrer

Fdo. Francisco García Carmona



U N I V E R S I D A D D E M U R C I A

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR-A

Los trabajos de investigación recogidos en la presente Memoria han sido financiados por los siguientes proyectos:

- “Evolución dirigida de una acetil xilan esterasa con aplicación industrial” (Proyecto BIO2004-00439), financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.
- Evolución dirigida de esterasas microbianas como alternativa a la esterasa de hígado de cerdo industrial” (Proyecto 09BIO2005/01-6470, financiado por la Conserjería de Educación y Cultura (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia).

El firmante de esta Memoria ha disfrutado de una beca de investigación de la Fundación Séneca (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia).

Murcia, a 19 de Septiembre de 2006

Fdo. Esteban Orenes Piñero

Las siguientes publicaciones recogen los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral.

- Orenes-Piñero, E., García-Carmona, F., y Sánchez-Ferrer, A. (2005). A kinetic study of *p*-cresol oxidation by quince fruit polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 1196-1200.
- Orenes-Piñero, E., García-Carmona, F., y Sánchez-Ferrer, A. (2006). Latent polyphenol oxidase from quince fruit pulp (*Cydonia oblonga*): Purification, activation and some properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86**: 2172-2178.
- Orenes-Piñero, E., García-Carmona, F., y Sánchez-Ferrer, A. (2006). Kinetic characterization of cresolase activity of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**: 158-163.
- Orenes-Piñero, E., García-Carmona, F., y Sánchez-Ferrer, A. (2006). Kinetic characterization of diphenolase activity from *Streptomyces antibioticus* tyrosinase in the presence and absence of cyclodextrins. *Biotechnology Progress*, **en revisión**.
- Orenes-Piñero, E., García-Carmona, F., y Sánchez-Ferrer, A. (2006). Synthesis of hidroxytyrosol using transformed *E. coli* whole cells with phenol hydroxylase gene from a thermophilic bacterium. *Applied and Environmental microbiology*, **en revisión**.

Me gustaría agradecer a todas las personas que han contribuido a la realización de este trabajo de tesis y me han apoyado durante todo este tiempo.

En primer lugar, a los Catedráticos Álvaro Sánchez Ferrer y Francisco García Carmona por su ayuda y dedicación durante los cuatro años de trabajo.

A Álvaro, por su constante apoyo y por ayudarme a valerme "solo" en este difícil mundo de la investigación.

A Paco, por sus largas conversaciones y por poner a mi servicio esa gran cantidad de conocimiento que atesora en su cabeza.

A las Doctoras Mercedes, Juana, Manoli y Pepa por su amabilidad y por la ayuda prestada siempre que fue requerida.

A los doctores que me han impartido clases en los cursos de Doctorado y en general a todos los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A.

A mis compañeros del ala C del departamento de Bioquímica, por todos los buenos momentos que hemos pasado en estos años.

A Inma, mi amiga y compañera de laboratorio, por la complicidad con la que hemos trabajado y por hacer que yo mismo entendiera mejor las cosas al intentar explicárselas.

A Dan Lozada, mi amigo mexicano, por su insuperable paciencia para aguantar todas las bromas que le he podido gastar en estos cuatro años de tesis. VIVA MÉXICO.

A Emiliano y Serafín, por su amistad y paciencia al enseñarme todos sus conocimientos de Biología Molecular.

A Irene, por su amistad fuera y dentro del laboratorio que hizo que hasta llegara a cantar en un grupo folklórico.

A Silvia, porque siempre ha tenido una sonrisa que hiciera más ameno el tiempo que pasábamos en el laboratorio.

A Pepe, por su compañerismo y por hacer que las tardes de los jueves hiciera algo de deporte con un solo esguince como daño colateral.

A David, por ayudarme con la química orgánica con la mejor disposición siempre que me ha surgido cualquier duda.

A Fernando, por su apoyo y ayuda en todo momento.

A Consuelito, porque cuando estaba en el laboratorio nunca nos faltaba nada y siempre estaba dispuesta a ayudar.

A mi amigo Dani, por abrirme siempre las puertas de su casa, por las risas que nos hemos echado juntos y por la amistad brindada desde nuestros años de instituto.

A Pablo, por ser uno de esos amigos que siempre están cuando se les necesita y porque él sabe lo difícil que es hacer algo así.

A Miguel, el otro gran amigo del instituto, por su interés en saber siempre cómo iban mis investigaciones. A vosotros tres junto con Paco solo os tengo que decir DELTOYA RISING FORCE.

A David, mi gran amigo de la Alcayna, por su incomparable amistad y porque estar contigo siempre ha sido un placer.

A Alberto, mi cuñado, que antes que ser cuñado es mi amigo. Gracias por aguantar las bromas que al final hasta tu sobrino te ha gastado.

A Jose Antonio, Juan Antonio, Jose de los Nietos, David, Javier, Fulgencio, Jorge, Puertas y el resto de compañeros de la carrera que aún siguen siendo mis amigos.

A Jorge, Valentín, Manolo, el Chiquitín, por esas comidas que nos hemos marcado en el Lax.

A Alejandro, Chechu, Darío, Javier, Javi, Jose Manuel y Raquel de "La Terraza", Jorge, Ceci, Joaquín y Cristina y el resto de amigos de la Alcayna porque su compañía siempre ha sido muy divertida.

A mi tito Paco y a mi tita Isabel, por su apoyo y porque viven cada uno de mis logros como si fueran suyos.

A mi tito Juan y mi tita Josefina, por su constante preocupación por mi trabajo.

A mis titos Joaquín y Elena, Isidoro y Mari Carmen, Jose y Adela, María y Pepe por su interés en mis investigaciones.

A mis primos Juan Ángel, María Dolores, Paquico, Toñi, María José, Isabel, Jose Antonio, Francisco Javier, María, Aarón y Mar por estar siempre a mi lado.

A Asun, que es más una madre que una suegra, Miguel, Sonia y Sergio, Olga y Nacho, Lucía y Nachete porque ya sois parte de mi familia.

A mis abuelos Isidoro y Mercedes, por darme el mejor padre del mundo.

A mi chacha Lucía y mi chacho Juan porque mis mejores recuerdos de infancia están ligados a ellos.

A mis abuelitos Juan y Josefa, que me estarán viendo desde el cielo. Esta tesis es tan vuestra como mía. Gracias por todo el amor que me disteis mientras estuvisteis con nosotros. Os quiero.

A mi hermana Juani, por entender que mi trabajo no es solamente estar pasando gotitas de un frasco a otro. Eres la mejor hermana que se puede tener. Muchas gracias por tu apoyo. Te quiero.

A mis padres, Esteban y Juani, por haber hecho de mí alguien de provecho a pesar de que os lo he puesto muy difícil. Espero que estéis tan orgullosos de mí como yo lo estoy de vosotros. Sois los mejores padres del mundo. Os quiero muchísimo.

A Diana, mi princesita pequeña, por tu inagotable paciencia, comprensión y amor. Por compartir tantos buenos momentos y por ser el hombro en el que he podido apoyarme en los malos. ¡¡Finalmente lo hemos logrado!! Todo esto te lo dedico a ti. Te amo.

A Diana
A mis padres y a mi hermana
A mi abuelito y a mi yaya

Abreviaturas

PPO	Polifenol Oxidasa
PEG	Polietilenglicol
TX-114	Triton X-114
4-MC	4-metilcatecol
PS	Fotosistema
V_{max}	Velocidad máxima en estado estacionario
K_M	Constante de Michaelis-Menten
K_{act}	Constante de activación
K_c	Constante de complejación
K_I	Constante de inhibición
K_{si}	Constante de inhibición por sustrato
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenil-alanina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TBC	<i>Tert</i> -butilcatecol
HP-β-CDs	Hidroxiopropil-beta-ciclodextrinas
γ-CDs	Gamma-ciclodextrinas
BSA	Albúmina de suero bovino
PheA	Fenol Hidroxilasa
pET-PheA	Vector con el gen fenol hidroxilasa
pET-PheA*	Vector con el gen y su promotor propio
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
LB	Luria Bertani
TB	Terrific Broth
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
GC-MS	Cromatografía de gases con espectro de masas
NMR	Resonancia magnética nuclear
TEMED	N,N,N,N'- tetrametilendiamina

2,4-DHB	2,4- dihidroxibenzoato
PHB	<i>p</i> -hidroxibenzoato
PHBH	<i>p</i> -hidroxibenzoato hidroxilasa
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
FAD	Flavin adenina dinucleótido
FMN	Flavin mononucleótido
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

ÍNDICE GENERAL

Capítulo I. Introducción	I.1
I. Tirosinasa	I.3
2. Distribución de la PPO	I.4
2.1 <i>Tirosinasa en bacterias</i>	I.4
2.2 <i>Polifenol oxidasa en plantas</i>	I.6
3. Función biológica de PPO en plantas	I.7
3.1 <i>Transportador electrónico</i>	I.8
3.2 <i>Defensa</i>	I.9
3.3 <i>Biosíntesis de metabolitos secundarios</i>	I.10
3.4 <i>Otras funciones de la PPO</i>	I.12
4. Propiedades moleculares de la PPO	I.13
4.1 <i>Estructura primaria</i>	I.13
4.2 <i>Multiplicidad</i>	I.16
4.3 <i>Estructura secundaria de tirosinasa</i>	I.18
4.4 <i>Estructuras del centro activo</i>	I.19
4.5 <i>Estructura cristalina</i>	I.21
5. Latencia y activación de tirosinasa	I.23
5.1 <i>Activación por detergentes</i>	I.24
5.2 <i>Activación por proteasas</i>	I.25
6. Mecanismo de reacción	I.26
6.1 <i>Actividad difenolasa</i>	I.27
6.2 <i>Actividad monofenolasa</i>	I.28

II. Fenol hidroxilasa	I.31
7. Distribución de las monooxigenasas dependientes de FAD	I.32
8. Propiedades moleculares de oxigenasas dependientes de FAD	I.34
9. Mecanismo de reacción de oxigenasas dependientes de FAD	I.35
9.1 <i>Monooxigenasas formadas por un único componente</i>	I.35
9.2 <i>Monooxigenasas formadas por dos componentes</i>	I.41
9.3 <i>Fenol hidroxilasa de Geobacillus sp.</i>	I.43
9.3.1 <u><i>Estructura y actividad</i></u>	I.43
9.3.2 <u><i>Mecanismo de acción</i></u>	I.48
Capítulo II. Objetivos	II.1
Capítulo III. Materiales y Métodos	III.1
1. Fuentes enzimáticas	III.3
2. Reactivos y cepas	III.4
3. Herramientas bioinformáticas	III.5
4. Extracción y purificación de PPO de membrillo	III.6
5. Extracción y purificación de tirosinasa de <i>S. antibioticus</i>	III.7
6. Inmovilizaciones de PPO/Tirosinasa	III.7
6.1 <i>Inmovilización binaria en esferas de alginato</i>	III.7
6.2 <i>Inmovilización binaria en hidrogeles</i>	III.8
6.3 <i>Inmovilización en membrana hidrofílica</i>	III.8
7. Obtención de fenol hidroxilasa recombinante	III.9
8. Ensayos enzimáticos	III.14

8.1 <i>Medida de tirosinasa/PPO</i>	III.14
8.2 <i>Medida de fenol hidroxilasa</i>	III.15
8.2.1 <i>Método de screening</i>	III.15
8.2.2 <i>Método basado en HPLC</i>	III.16
9. Determinación de proteínas	III.17
10. Determinación de fenoles	III.18
11. Técnicas electroforéticas	III.18
11.1 <i>Tinción de geles de proteínas por Azul de Coomassie</i>	III.19
11.2 <i>Análisis de imagen</i>	III.19
Capítulo IV. A kinetic study of p-cresol oxidation by Quince fruit Polyphenol oxidase	IV.1
Capítulo V. Latent polyphenol oxidase from quince fruit pulp (<i>Cydonia oblonga</i>): Purification, activation and some properties	V.1
Capítulo VI. Kinetic characterization of cresolase activity of <i>Streptomyces antibioticus</i> tyrosinase	VI.1
Capítulo VII. Kinetic characterization of diphenolase activity from <i>Streptomyces antibioticus</i> tyrosinase in the presence and absence of cyclodextrins	VII.1
Capítulo VIII. Synthesis of hidroxytyrosol using transformed <i>E. coli</i> whole cells with phenol hydroxylase gene from a thermophilic bacterium	VIII.1
Capítulo IX. Discusión general	IX.1
1. Caracterización de polifenol oxidasa y tirosinasa	IX.3

1.1 <i>Extracción y Purificación de PPO de membrillo</i>	IX.4
1.2 <i>Purificación de tirosinasa de <u>Streptomyces antibioticus</u></i>	IX.5
2. Latencia y Activación por SDS	IX.5
3. Actividad monofenolasa	IX.7
3.1 <i>Efecto del pH</i>	IX.7
3.2 <i>Efecto de la concentración de substrato</i>	IX.8
3.3 <i>Efecto de concentraciones catálticas de o-difenoles</i>	IX.9
4. Actividad difenolasa	IX.10
4.1 <i>Efecto de los substratos</i>	IX.11
4.2 <i>Efecto de inhibidores</i>	IX.11
4.3 <i>Efecto de las ciclodextrinas</i>	IX.13
5. Fenol y tirosol como substratos monofenólicos	IX.21
6. Inmovilización de PPO y Tirosinasa en diferentes soportes	IX.22
7. Fenol Hidroxilasa de <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	IX.23
7.1 <i>Clonación de Fenol Hidroxilasa</i>	IX.24
7.2 <i>Selección de clones con mayor actividad</i>	IX.25
7.3 <i>Bioconversión de monofenoles a o-difenoles</i>	IX.28
7.4 <i>Estabilidad operacional de las células transformadas</i>	IX.29
Capítulo X. Conclusiones	X.1
Capítulo XI. Bibliografía	XI.1

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Capítulo I.

Figura 1. Reacciones catalizadas por la polifenol oxidasa	I.4
Figura 2. Papel protector de PPO en los fotosistemas	I.9
Figura 3. Esquema biosintético de las betalainas	I.11
Figura 4. Mecanismo propuesto para la síntesis de auronas	I.12
Figura 5. Comparación de las secuencias de aminoácidos de polifenol oxidasa de distintos organismos	I.14
Figura 6. Representación esquemática del centro activo de PPO	I.15
Figura 7. Estructura molecular del centro activo de PPO	I.15
Figura 8. Estructura de hemocianina de <i>Limulus sp.</i>	I.19
Figura 9. Estructura del centro activo de tirosinasa en sus distintos estados funcionales	I.20
Figura 10. Estructura de catecol oxidasa de batata (<i>Ipomoea batatas</i>)	I.22
Figura 11. Ciclo catalítico de tirosinasa en presencia de O ₂	I.27
Figura 12. Intermedio C4a-peroxiflavina y sustrato (<i>p</i> -hidroxibenzoato)	I.32
Figura 13. Reacción química catalizada por PHBH	I.35
Figura 14. Conformación de flavina en la PHBH	I.36
Figura 15. Conformaciones de la PHBH importantes para la catálisis	I.37
Figura 16. Ciclo catalítico de la PHBH	I.39
Figura 17. Estructura de la PHBH mostrando la red de puentes de hidrógeno	I.41
Figura 18. Modelo con rayos X de la PheA2 y la unión de FAD y NAD con la enzima	I.44
Figura 19. Unión del cofactor FAD con PheA2	I.46
Figura 20. Esquema del patrón de puentes de hidrógeno entre PheA2 y NAD	I.47

Capítulo III.

Figura 1. Conversión de p-cresol en 4-metil- <i>o</i> -benzoquinona	III.14
Figura 2. Reacción para la detección de fenol hidroxilasa en placas de 96 pocillos	III.16

Capítulo IV.

Figure 1. Enzymatic activities of soluble quince fruit pulp PPO. (a) Catecolase activity at 25 °C. (b-e) Cresolase activity at 25 °C.	IV.2
Figure 2. Effect of pH on cresolase activity and on its lag period.	IV.2
Figure 3. Effect of PPO concentrations on its cresolase activity and on the lag period	IV.2
Figure 4. Effect of substrate concentration on cresolase activity of quince PPO and on the lag period	IV.3
Figure 5. Influence of 4-methylcatechol on the shortening of lag period. (Inset) Evaluation of the activation constant by the Pomerantz equation	IV.3
Figure 6. Effect of catalytic amounts of 4-methylcatechol on the steady state of cresolase activity	IV.3
Scheme 1. Enzymatic-chemical-chemical mechanism proposed for cresolase activity	IV.4

Capítulo V.

Figure 1. Effect of SDS concentration on quince fruit PPO activity	V.3
Figure 2. Effect of pH on quince fruit PPO activity in the presence or absence of 0.05% SDS	V.4
Figure 3. Effect of TBC concentration on quince fruit PPO activity	V.4

Figure 4. Dixon plot for the competitive type of inhibition presented by tropolone	V.5
Figure 5. Effect of HP- β -CDs concentration on quince fruit	V.5
Table 1. Partial purification of quince PPO	V.3
Table 2. Percentage inhibition of partially purified latent quince fruit PPO by reducing agents and substrate analogues	V.4

Capítulo VI.

Figure 1. <i>S. antibioticus</i> tyrosinase. (A) Exocellular enzyme purified by a combination of PEG-8000/phosphate. (B) Exocellular tyrosinase as described in literature	VI.2
Figure 2. Enzymatic activities of soluble <i>S. antibioticus</i> tyrosinase. (a) Catecolase activity at 25 °C. (b-e) Cresolase activity at 25 °C	VI.3
Figure 3. Effect of pH on diphenolase and cresolase activity and on its cresolase lag period	VI.3
Figure 4. Effect of <i>S. antibioticus</i> tyrosinase concentration on its cresolase activity and on the lag period	VI.3
Figure 5. Effect of substrate concentrations on cresolase activity of <i>S. antibioticus</i> tyrosinase. (Inset) Effect of 4-methylcatechol concentration	VI.4
Figure 6. Influence of 4-methylcatechol on the shortening of the lag period. (Inset) Evaluation of the activation constant by the Pomerantz's equation	VI.4
Figure 7. Effect of catalytic amounts of 4-methylcatechol on the steady-state rate of monophenolase activity	VI.4
Figure 8. Enzymatic-chemical-chemical mechanism proposed for cresolase activity	VI.5

Capítulo VII

Figure 1. Effect of pH on <i>S. antibioticus</i> tyrosinase activity	VII.7
Figure 2. Effect of TBC concentration on <i>S. antibioticus</i> tyrosinase. (Inset) Effect of dopamine concentration	VII.9
Figure 3. Effect of tropolone inhibition (Dixon plot) in <i>S. antibioticus</i> tyrosinase	VII.12
Figure 4. Effect of CDs concentration on <i>S. antibioticus</i> tyrosinase. (A) OH- β -CDs. (B) γ -CDs	VII.14
Figure 5. Effect of OH- β -CDs and γ -CDs on the oxidation of dopamine by tyrosinase in the presence of hinokitiol	VII.16
Figure 6. Effect of OH- β -CDs and γ -CDs on the oxidation of dopamine by tyrosinase in the presence of hexestrol	VII.17
Table 1. Inhibition percentage of <i>S. antibioticus</i> tyrosinase using TBC as substrate	VII.10
Table 2. Kinetic constants of complexation between CDs and inhibitors after fitting the data by nonlinear regresión	VII.19

Capítulo VIII

Figure 1. HPLC determination of patterns of phenolic compounds	VIII.9
Figure 2 (A). Strategy for construction of pET-pheA; (B) pET-pheA*	VIII.13
Figure 3. SDS-PAGE 10% acrylamide resolving gel	VIII.14
Figure 4. Time-course transformation of phenol into catechol using <i>E. coli-pheA</i> at 37°C	VIII.16
Figure 5. Time-course transformation of phenol into catechol using <i>E. coli-pheA*</i> at 37°C	VIII.17
Figure 6. Time-course transformation of tyrosol into hydroxytyrosol using <i>E. coli-pheA</i> at 37°C.	VIII.18

Figure 7. Time-course transformation of tyrosol into hydroxytyrosol using <i>E. coli-pheA*</i> at 37°C.	VIII.19
Figure 8. GC-MS of purified LB growth medium	VIII.20
Figure 9. Aromatic ¹ H-NMR spectra of purified hydroxytyrosol obtained from enzymatic synthesis.	VIII.21
Figure 10. Two-dimensional NMR spectra (HMBC) confirming the position of the suitable substituents.	VIII.22
Figure 11. HPLC determination of the different phenolic compounds and ascorbic acid. (A) Phenol conversión; (B) Tyrosol conversion	VIII.24
Figure 12. Operational stability of phenol hydroxylase biocatalyst	VIII.26
Figure 13. PPO/tirosinase immobilization in different supports	VIII.27
Figure 14. Operational stability of immobilized quince PPO and <i>Streptomyces antibioticus</i> tyrosinase using tyrosol as substrate	VIII.28
Figure 15. Operational stability of immobilized quince PPO and <i>Streptomyces antibioticus</i> tyrosinase using phenol as substrate	VIII.29

Capítulo IX

Figura 1. Estructura de α -, β - y γ -ciclodextrinas	IX.14
Figura 2. Estructura tronco-cónica de una molécula de β -ciclodextrinas en modelo CPK.	IX.15
Figura 3. Dimensiones de los distintos tipos de CDs	IX.16
Figura 4. Hidroxipropil- β -ciclodextrina con substrato unido	IX.18
Figura 5. Resumen esquemático del proceso para la obtención de clones capaces de bioconvertir monofenoles en difenoles	IX.27

CAPÍTULO I

Introducción

Las enzimas han sido utilizadas a escala industrial como biocatalizadores para la obtención de productos con un alto valor añadido. Actualmente estos compuestos tienen interés para la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica entre otras. Además, las técnicas de biología molecular han permitido la obtención de enzimas en grandes cantidades modificando sus características químicas, físicas o biológicas para la obtención de catalizadores más eficientes. La producción enzimática de estos compuestos tiene la ventaja de que son más limpios que los obtenidos mediante síntesis química.

Un grupo de compuestos que tienen importancia comercial son los denominados difenoles que se obtienen a partir de la hidroxilación de monofenoles por la acción de diferentes enzimas.

Dos grupos de enzimas son los más importantes en la síntesis de difenoles. Las tirosinasas o también denominadas polifenol oxidasas y las fenol hidroxilasas. El mecanismo de acción de cada una de ellas es completamente distinto, conociéndose extensamente en el caso de la tirosinasa y siendo menos claro en el caso de fenol hidroxilasa.

I. TIROSINASA

La tirosinasa (E.C. 1.14.18.1) es una enzima que necesita el cobre para ser activa y que está distribuida a lo largo de toda la escala filogenética. Es esencial para la síntesis de melaninas entre otras muchas funciones.

Esta enzima, como podemos ver en la **Figura 1.1**, cataliza dos tipos de reacciones acopladas en las que interviene oxígeno molecular:

- 1) La hidroxilación en la posición *orto* de monofenoles para dar el correspondiente *o*-difeno (Actividad cresolasa).
- 2) La oxidación de *o*-difenoles a sus correspondientes *o*-quinonas (Actividad catecolasa).

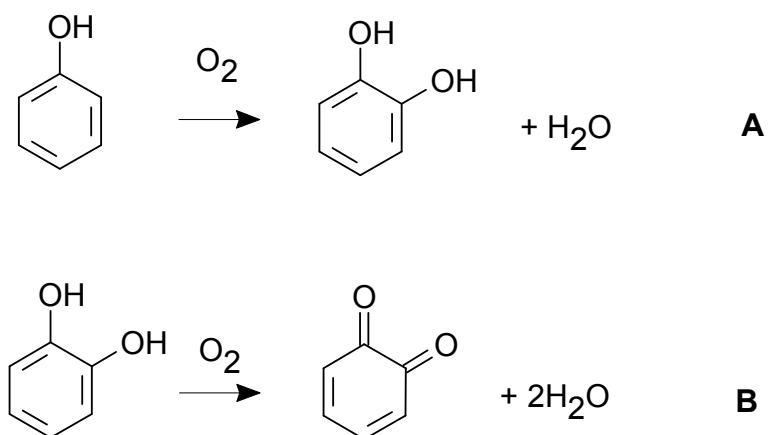


Figura 1.1. Reacciones catalizadas por polifenol oxidasa. A, actividad monofenolasa o cresolasa. B, actividad difenolasa o catecolasa.

2. Distribución de la PPO:

Polifenol oxidasa está ampliamente distribuida en la naturaleza. Se presenta en plantas, bacterias, hongos y animales (Schwimmer, 1981). Cuando se encuentra en uno de los tres últimos grupos se hace referencia a ella como tirosinasa. Otros nombres con los que se denomina a esta enzima en la bibliografía son catecol oxidasa y fenolasa.

2.1 Tirosinasa en bacterias

Las tirosinasas bacterianas más estudiadas han sido las de *Thermomicrobium roseum* (Kwang-Hoon et al., 2000) y las del género *Streptomyces* (Lerch y Ettlinger, 1972).

La tirosinasa de *Thermomicrobium roseum* está compuesta por dos subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de 43 kDa. La actividad de esta enzima es óptima a pH 9.5 y a una temperatura de 70 °C, lo que indica que es una enzima altamente termoestable.

Recientemente se ha llevado a cabo la purificación en un solo paso de una tirosinasa inducible por calor de *Bacillus thuringiensis* (Liu et al., 2004). Con sólo 14 kDa, esta tirosinasa tiene uno de los pesos moleculares más bajos de todas las tirosinasas conocidas, aunque parece ser que su forma activa es un dímero.

Los miembros del género *Streptomyces* llevan a cabo la síntesis y degradación de biopolímeros complejos como ligninas, melaninas y sustancias húmicas. Aproximadamente el 40% de las especies del género *Streptomyces* producen exopigmentos del tipo de las melaninas en medio agar con tirosina, lo que mayoritariamente, aunque no siempre, se relaciona con la presencia de actividad tirosinasa extracelular.

La estructura del gen que da lugar a la tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* (*melC2*) ha sido ampliamente estudiada. Está localizado en un gen policistrónico, denominado *melC*, en el que también se encuentra el gen *melC1* que da lugar a una proteína conservada de 30 aminoácidos que es eliminada tras la secreción (Ling-Yun et al. 1993), y que es imprescindible para la activación de la apotirosinasa. Para que esta activación se produzca es necesaria la presencia de cobre en el medio de cultivo. Similares resultados se obtuvieron en *Streptomyces glaucescens* (Hintermann et al. 1985). La proteína codificada por el gen *melC1* se encarga tanto del transporte de la tirosinasa como del proceso de transferencia del cobre que activa a la apotirosinasa (Ling-Yun et al. 1992), actuando como una chaperona (Tzung-Yuang et al., 1998). En *Streptomyces antibioticus* la tirosinasa es un monómero con un peso molecular de 30.6 kDa.

La secuencia de tirosinasa en procariotas tiene como aminoácido dominante a la alanina. En bacterias Gram positivas, también hay grandes cantidades de aminoácidos con carga tales como arginina o aspartato. Los residuos de arginina favorecen la unión a anillos aromáticos (García-Borrón y Solano, 2002). En el caso de *Streptomyces*, las proteínas que actúan como chaperonas (*MelC1*), no tienen cisteínas pero son ricas en histidinas. Parece ser que el que predominen las histidinas contribuye a la unión a metales.

La función más importante de esta enzima en bacterias es la de proteger a las células bacterianas y a las esporas frente a la luz ultravioleta mediante la síntesis de

melanina. Además, las melaninas se unen a metales pesados que de otra forma serían tóxicos para la célula, confiriendo protección contra oxidantes, calor, hidrólisis enzimática, compuestos antimicrobianos y la fagocitosis, por lo que pueden contribuir a la patogénesis microbiana.

2.2 Polifenol oxidasa en plantas

La tirosinasa es denominada polifenol oxidasa (PPO) en plantas. Dicha enzima está ampliamente distribuida en el reino vegetal, siendo detectada en algas, briofitas, pteridofitas, gimnospermas y en angiospermas (Mayer y Harel, 1979; Sherman et al., 1995). En plantas superiores, la enzima se encuentra en gran variedad de órganos y tejidos, abunda en hojas (Melo et al., 2006), tubérculos (Partinton et al., 1999), raíces de almacenamiento (Escribano et al., 2002), partes florales (Ono et al., 2006) y frutos (Fuerst et al., 2006). Su actividad va a ser distinta dependiendo de la especie, el órgano de la planta y su estado de desarrollo. En tubérculos, hojas y frutos es más abundante en los estados tempranos (Mayer y Harel, 1991). Aunque la enzima está presente en cualquier tejido y estado de desarrollo, en la mayoría de las especies estudiadas, el mRNA de tirosinasa sólo se ha encontrado en los tejidos jóvenes (Lax y Cary, 1995), lo que sugiere que la enzima tiene una vida media muy larga.

La localización intracelular de la enzima en plantas depende del tejido, la especie y el estado de desarrollo (Zawistoski et al., 1991; Marques et al., 1995), pero se ha descrito principalmente como una enzima cloroplastídica, ligada a la membrana tilacoidal (Mayer y Harel, 1991; Valero y García-Carmona, 1992; Nicolas et al., 1994). Además de las evidencias obtenidas por tinción histoquímica, en la que los productos de reacción se acumulan en la luz del tilacoide (Sherman et al., 1991), estudios de fraccionamiento y localización inmunocitoquímica han demostrado que tirosinasa se localiza en los granos tilacoidales, estrechamente asociada con el fotosistema II (Lax y Vaughn, 1991).

Además de en los cloroplastos, polifenol oxidasa se ha localizado en las mitocondrias, peroxisomas, microsomas o parcialmente asociada en la pared celular

(Mayer y Harel, 1991; Zawistoski et al., 1991; Nicolas et al., 1994). También ha sido descrita su presencia en la fracción citosólica (Mayer y Harel, 1991; Nicolas et al., 1994; Marques et al., 1995).

A pesar de la existencia de estos estudios sobre la localización de PPO, debido a la importancia de PPO en el proceso de pardeamiento de frutas y vegetales, y la influencia que este hecho supone sobre el consumo de dichos alimentos, la mayor parte de los estudios en plantas se han centrado en la purificación y caracterización de PPO de frutas y hortalizas.

3. Función biológica de PPO en plantas:

La función de tirosinasa en hongos y plantas sigue siendo, hasta la fecha, confusa y objeto de controversia (Sommer et al., 1994; Joy et al., 1995; Seo et al., 2003). A este hecho se atribuyen varias características propias del sistema enzimático, como pueden ser su actividad bivalente y la complejidad en su extracción y purificación (Robb, 1984; Mayer, 1987; Zhang et al. 1999; Nagai y Suzuki, 2001), además de otras características de la enzima, como:

- Su localización subcelular, apareciendo frecuentemente en varias fracciones.
- La variación observada en el nivel de enzima durante los diversos períodos del desarrollo y crecimiento de las fuentes.
- La existencia de enzima en forma latente que puede ser activada bajo determinadas condiciones, como veremos más adelante.
- La separación de la enzima y sus substratos debido a la compartimentación celular.

Todo esto hizo que se considerara a tirosinasa como “una enzima en busca de función” o una enzima “sin función establecida” (Mayer, 1987; Vaughn et al. 1988). Aún así, se han sugerido para ella funciones tan diversas y poco relacionadas como: actuación como amortiguador o atrapador de oxígeno,

participación en los mecanismos de defensa, implicación en la regulación del crecimiento e intervención en la síntesis de compuestos fenólicos; basadas casi todas ellas en su capacidad regeneradora de quinonas.

A pesar de ello, parece muy probable que las diferentes funciones deben ser atribuidas a la misma enzima pero presente en diferentes tejidos, diferentes estados de desarrollo y diferentes localizaciones dentro de la célula (Mayer y Harel, 1991; Kim et al., 2001; Wang y Constabel, 2004a). Además, la existencia de varias funciones de la misma enzima en diferentes localizaciones podría ser el fundamento de su naturaleza multigénica y de su expresión génica específica de tejidos (Sherman et al., 1995).

3.1 *Transportador electrónico*

Sherman *et al.* (1995) demuestran que PPO está presente en todo el rango de plantas desde las algas verdes hasta las angiospermas y gimnospermas. Así cabe pensar que PPO tiene una función indispensable. Una de las funciones postuladas, es la que implica a PPO en la modulación del fotosistema I (PSI), reduciendo el oxígeno molecular (Vaughn y Duke, 1984; Vaughn *et al.*, 1988; Siegbahn y Blomberg, 2004) (**Figura 1.2**). La energía de la fotosíntesis se utiliza en la reducción de los intermedios necesarios para los procesos de biosíntesis (NADP⁺, nitrito...); pero en condiciones de baja concentración de CO₂ pueden acumularse grandes cantidades de oxígeno molecular. Esta situación se resolvería, si se acopla una reacción tipo Mehler, en la cual PPO consumiría el remanente de O₂ acumulado. PPO actúa oxidando los compuestos dihidroxilados que reducen la actividad del PSI; de esta forma, se previene la acumulación de O₂ y se regenera el sustrato. Se ha demostrado que existen quinonas asociadas con el PSII y que están implicadas en el transporte de electrones. Además, este modelo requiere que las quinonas estén presentes en concentraciones catalíticas dentro del orgánulo, lo que permite adaptar el modelo a especies que poseen bajos niveles de quinonas en los tejidos. Hay determinados hechos que apoyan esta teoría, por ejemplo, en células

que generan muy poco o no generan O_2 no se ha detectado PPO (Vaughn y Duke, 1981).

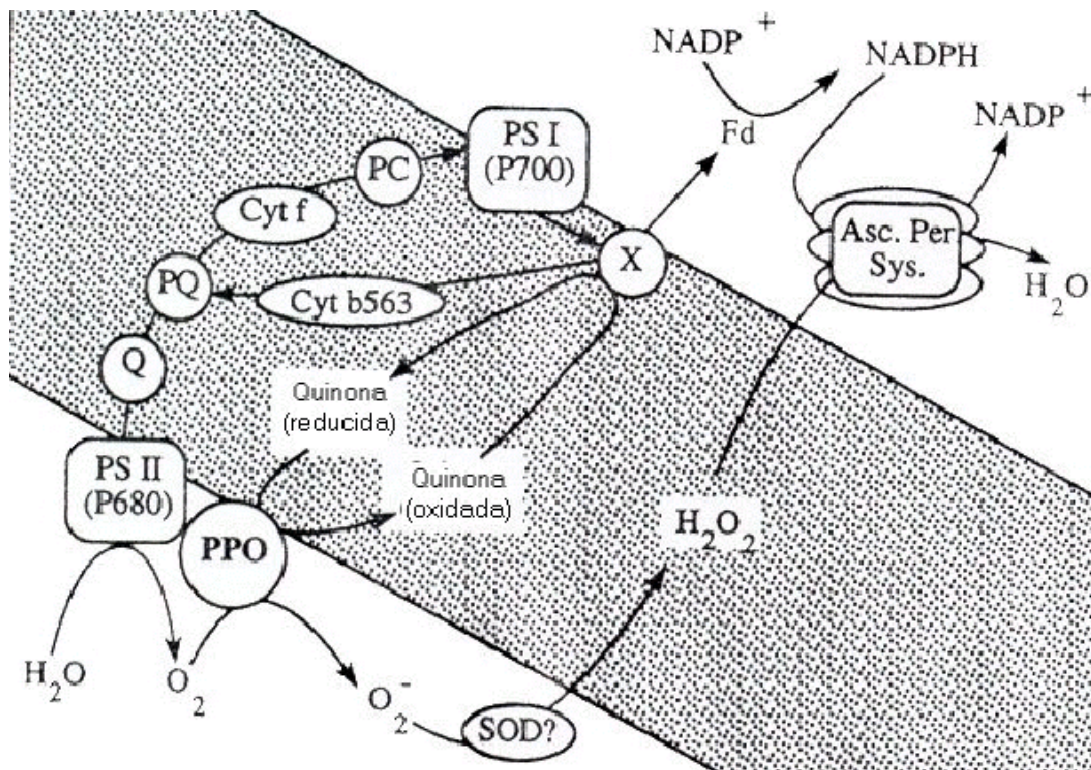


Figura 1.2. Papel protector de PPO en los fotosistemas. (Sherman et al., 1995)

3.2 Defensa

Un corte, daño o infección en un tejido provocan la mezcla de la enzima con sus substratos, hasta entonces confinados en compartimentos celulares diferentes. Ello da lugar a la formación de quinonas y a la proposición de una función defensiva, puesto que éstas pueden unirse a proteínas, inactivándolas (Wang y Constabel, 2004b). También pueden formar polímeros insolubles que constituyen una barrera para prevenir la extensión de infecciones en la planta. Además, tanto las quinonas como las melaninas tienen gran poder bacteriostático (Claus y Decker, 2006).

En cuanto a cuál es el mecanismo que provoca la inducción de tirosinasa, es difícil de determinar puesto que el incremento de actividad observado puede ser resultado de la activación de la enzima latente o deberse a la síntesis de novo (Boss

et al., 1995; Constabel et al., 1995; Thipyapong et al., 1995). Así, parece que la participación de tirosinasa en los procesos defensivos podría darse a dos niveles:

- Como un componente constitutivo de estos procesos mediante su interacción inmediata con los compuestos fenólicos tras la ruptura celular, dando lugar a una respuesta localizada.
- Como un componente inducible a través de la síntesis *de novo* de la enzima formando parte de una respuesta sistémica.

3.3 Biosíntesis de metabolitos secundarios

Además de las funciones tradicionalmente adscritas a tirosinasa, relacionadas con el mecanismo de protección frente a la luz ultravioleta en animales y fenómenos de defensa frente a patógenos en plantas, recientemente se han publicado estudios que implican a tirosinasa en otros procesos biológicos. Entre ellos se encuentra la participación de tirosinasa en la biosíntesis betalainas (Strack et al., 2003; Gandía-Herrero et al., 2005a; Gandía-Herrero et al., 2005b; Gandía-Herrero et al., 2005c; Gandía-Herrero et al., 2005d; Gandía-Herrero et al., 2005e; Gandía-Herrero et al., 2005f) (**Figura 1.3**).

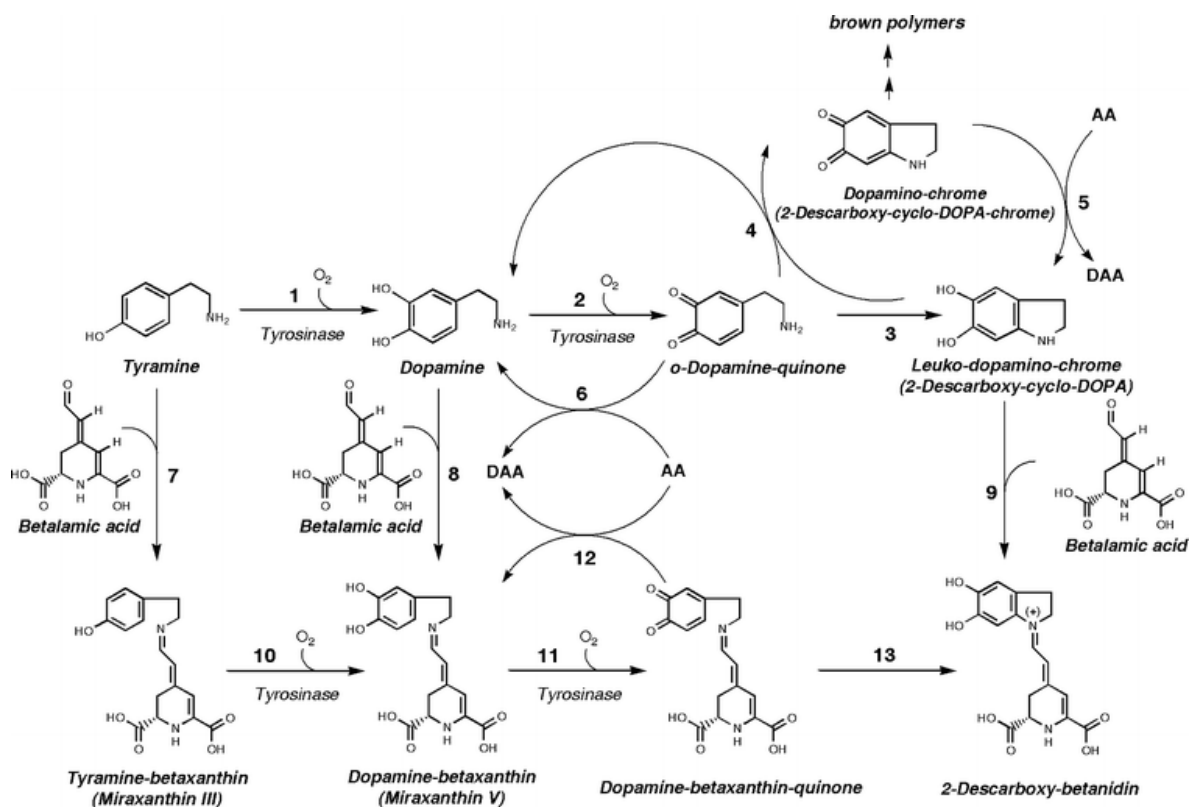


Figura 1.3 Esquema biosintético de las betalainas con los pasos principales para la formación de pigmentos derivados de dopamina. (Gandía-Herrero et al., 2005a-f).

Un papel similar ha sido también atribuido a una enzima homóloga de tirosinasa en la ruta biosintética de las auronas, la aureusidina sintasa. Esta enzima cataliza con una alta especificidad la ciclación oxidativa de chalconas para rendir auronas, una pequeña familia de pigmentos relacionada con los flavonoides (Nakayama et al., 2000 y 2001; Sato et al., 2001; Nakayama, 2002) (**Figura 1.4**).

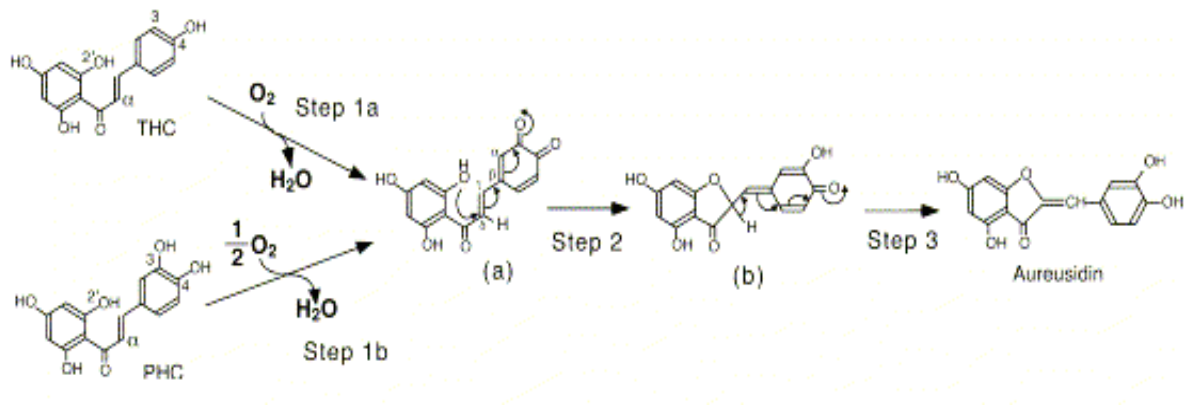


Figura 1.4 Mecanismo propuesto para la síntesis de auronas a partir de 2',4,4',6'-tetrahydroxychalcona (TCH) o 2',3,4,4',6'-pentahydroxychalcona (PCH) catalizado por la aureusidina sintasa. Las reacciones 1a y 1b están catalizadas por la PPO. (Nakayama, 2002).

3.4 Otras funciones de la PPO

Además de las anteriores, se han descrito otras funciones para la PPO como:

a) Disuasión de predadores. La interacción de los productos de oxidación de los fenoles con otros componentes celulares, hacen el tejido incomedible (Haruta et al., 2001).

b) Señalización del comienzo de la maduración del tejido. Su acción generando productos coloreados indica el momento de la recolección del fruto. Esta última función ha sido tratada extensamente por gran número de autores (Mayer y Harel, 1979, 1981; Mayer, 1987; Vaughn et al., 1988) en base a dos aspectos: la función de PPO en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que se ha observado interacción entre las quinonas formadas por la enzima y el triptófano para dar ácido indol-acético (AIA), así como cierta relación entre los niveles de enzima y la floración (Barto y Cipollini, 2005).

4. Propiedades Moleculares de la PPO

4.1 Estructura primaria

El empleo de técnicas de Biología Molecular ha hecho posible que el número de secuencias conocidas de tirosinasa haya aumentado en los últimos años en toda la escala filogenética (van Gelder et al., 1997; Haruta et al., 2001; Sánchez-Amat et al., 2001; Naraoka et al., 2003; Seo et al., 2003; Nishimura et al., 2003; Boonanuntanasarn et al., 2004; Obata et al., 2004; Sullivan et al., 2004) y que se hayan propuesto estrategias de terapia génica para el tratamiento del albinismo en mamíferos (Zhao et al., 2000).

De la comparación y análisis filogenético de las secuencias de tirosinasas aisladas de diferentes fuentes, se observa un agrupamiento en los géneros de plantas superiores, animales vertebrados, hongos y bacterias. Las homologías dentro de cada grupo son considerablemente mayores que entre ellos. Sin embargo, las secuencias responsables de la unión de cobre por tirosinasa se encuentran muy conservadas en todas las especies y son análogas a las descritas para las hemocianinas, enzimas transportadoras de oxígeno de artrópodos y moluscos (Wichers et al., 2003) (**Figura 1.5**). De estos estudios y de las cristalizaciones realizadas (Antson et al., 1993; Matoba et al., 2006) se deducen tres grandes dominios.

El *dominio central* alberga el sitio activo de la enzima. El sitio activo consiste en un par de iones cobre que se unen a tres residuos de histidina altamente conservados. Este centro bicúprico es el sitio de interacción con el oxígeno molecular y con los sustratos fenólicos (van Gelder et al., 1997) (**Figuras 1.6 y 1.7**). Las regiones que rodean al sitio de unión de cobre en tirosinasa son homólogas a la proteína hemocianina.

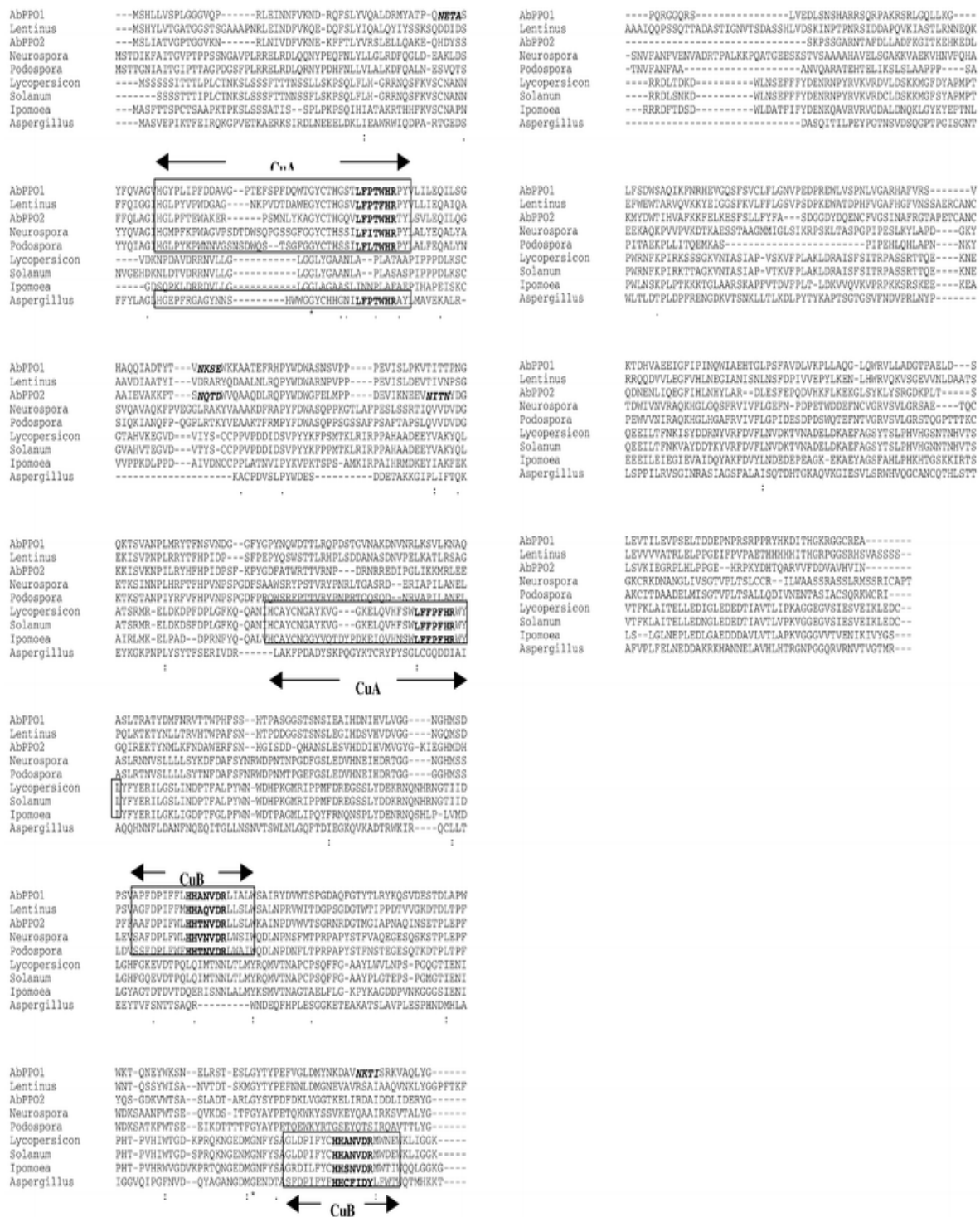


Figura 1.5 Secuencia de aminoácidos de dos cDNA de polifenol oxidasa de *Agaricus bisporus* (AbPPO1 y AbPPO2) y de *Lentinus edodes* (número de acceso AB027512), *Neurospora crassa* (J05052), *Podospora anserina* (U66807), *Aspergillus oryzae* (D37929), *Lycopersicon esculentum* (S40548), *Solanum tuberosum* (M95196) e *Ipomoea batatas* (AB038994). El alineamiento se realizó con el programa ClustalX, versión 1.81. la unión de los dominios al cobre están recuadrados. Los sitios de N-glicosilación están en negrita y cursiva. (Wichers et al., 2003).

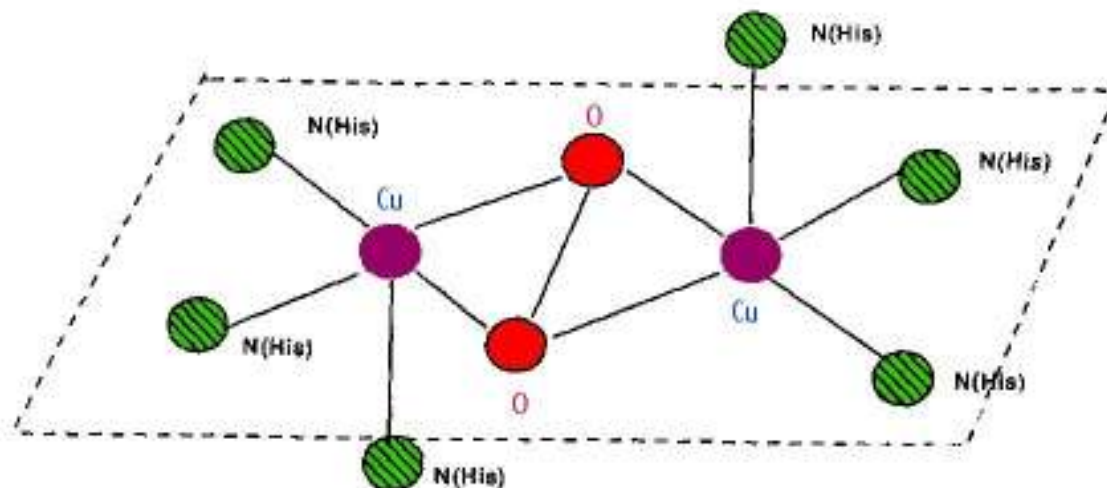


Figura 1.6 Representación esquemática del centro activo. El oxígeno se une como peróxido y cada ion cobre está unido a tres histidinas por tres átomos de Nitrógeno. Símbolos granates, átomos de Cu; símbolos rojos, oxígeno; símbolos verdes, His-N.

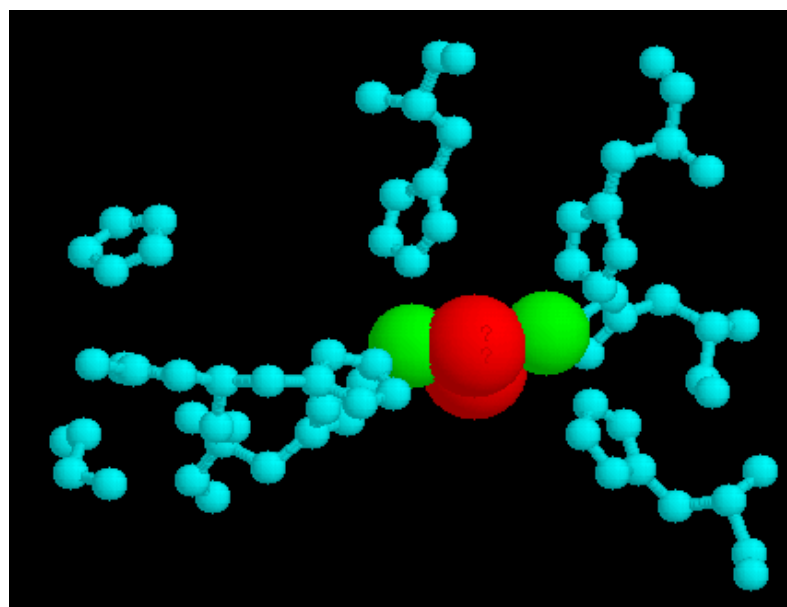


Figura 1.7 Estructura molecular del centro activo. Símbolos verdes, átomos de cobre; símbolos rojos, oxígeno; símbolos azules, Histidinas.

El *dominio N-terminal* es relevante en PPO de plantas. Estas enzimas se consideran maduras cuando una cadena de aminoácidos de aproximadamente 80-90 residuos es cortada de la porción N-terminal. Este péptido se denomina péptido de

tránsito o péptido señal (Sommer et al., 1994; Whitaker, 1995; Lax y Cary, 1995). Este hecho está en contra de la creencia de que PPO era sintetizada como una proteína madura y transportada intacta dentro del cloroplasto (Vaughn y Duke, 1984). La secuencia de genes de haba, revela una proteína madura con peso molecular de 58 kDa y un péptido señal de 10 kDa (Cary et al., 1992). De la misma forma también se han encontrado péptidos señales homólogos al de haba para PPO de tomate, patata y uva (Lanker et al., 1988; Cary et al., 1992; Robinson y Dry, 1992; Shahar et al., 1992; Hunt et al., 1993; Newman et al., 1993; Steffens et al., 1994; Sommer et al., 1994).

En insectos es conocido el hecho de que las tirosinasas no tienen péptido señal lo que indica que son citoplásmicas. Sin embargo, en humanos y ratones se ha encontrado un grupo de 18 aminoácidos en el extremo N-terminal de la proteína que actúan como péptido señal y puede estar implicado en el paso de la enzima al interior de los melanosomas (Wang y Hebert, 2006).

El *dominio transmembrana* está presente en PPO de plantas superiores, ya que está asociada a la membrana tilacoidal en tejidos no senescentes (Mayer y Harel, 1991). Este hecho se demuestra en el incremento de actividad enzimática en extractos de material vegetal en los que se emplean detergentes (Sánchez-Ferrer et al., 1990; Núñez-Delicado et al., 1996; Chazarra et al., 1996; Jiménez y García-Carmona, 1996; Escribano et al., 1997a-b, Valero y García-Carmona, 1998; Laveda et al., 2000). La mayor parte de la proteína estaría expuesta al lumen, mientras que el extremo C-terminal estaría anclado a la membrana.

En tirosinasa de mamíferos, la proteína, también se encuentra anclada a la membrana del melanosoma por una hélice localizada en el extremo C-terminal y el resto de la proteína se localiza hacia el interior del melanosoma (Jiménez-Cervantes et al., 1995).

4.2 Multiplicidad

A través de técnicas electroforéticas y cromatográficas se ha evidenciado la existencia de multitud de formas enzimáticas en los extractos de PPO. Esta multiplicidad ha sido atribuida a fenómenos de asociación-disociación de subunidades similares y/o diferentes (Chazarra et al., 2001a), la expresión de diferentes miembros de una familia de genes (Sommer et al., 1994); modificaciones postraslacionales (Gandía-Herrero et al., 2005a); y fundamentalmente a artificios ocurridos durante el aislamiento como proteólisis limitada (Robinson y Dry, 1992), polimerización con compuestos fenólicos y asociación con proteínas no enzimáticas (Mayer y Harel, 1991; Zawitowski et al., 1991). Estas formas pueden diferir en la especificidad de acción sobre los sustratos, pH óptimo, estabilidad térmica, y respuesta a agentes químicos e inhibidores, y en el caso de asociaciones, éstas pueden ser interconvertibles (en función de la fuerza iónica, pH o presencia de agentes disociantes).

En hongos, la enzima de *Agaricus bisporus* se ha descrito formada por dos tipos de cadenas polipeptídicas, una pesada (H) con un peso molecular de 43 kDa y una ligera (L) de 13,4 kDa. Estas subunidades se asocian dando lugar a un heterotetrámero de masa molecular 120 kDa, lo que corresponde a una agrupación de subunidades H₂L₂ (Strothkamp et al., 1976). En estudios más recientes, se ha clonado un gen de tirosinasa que codifica para una proteína de 64 kDa (Wiechers et al., 2003). En *Neurospora crassa*, tirosinasa está formada por una única cadena polipeptídica, con un peso molecular de 46 kDa, derivada del procesamiento de un precursor de 75 kDa (Kupper et al., 1989).

En plantas, polifenol oxidasa parece ser sintetizada como una pre-proteína de peso molecular comprendido en el rango de 68-73 kDa, que es procesada a una proteína madura de peso 58-68 kDa, que a su vez puede dar lugar a una proteína monomérica activa con un peso molecular en torno a los 40-45 kDa mediante proteólisis *in vivo* e *in vitro* (van Gelder et al., 1997). Ello explica que los primeros trabajos de purificación hasta homogeneidad aparente describieran a tirosinasa como una forma monomérica con un peso molecular en torno a los 45 kDa

(Vaughan et al., 1975; Nakamura et al., 1983; Wichers et al., 1984). En la actualidad, cuando se purifican tirosinasas hasta homogeneidad aparente, éstas se describen como monómeros (Ding et al., 1998; Bilka et al., 2003), que en algunos casos se asocian en multímeros, normalmente tetrámeros (Paul y Gowda, 2000; Chazarra et al., 2001b; Marri et al., 2003). Además, se ha descrito que pueden generar fenómenos de cooperatividad positiva (Chazarra et al., 2001b). Los datos indican que tirosinasa es sintetizada como una proteína precursora que posee una secuencia señal para su transporte hacia el interior del cloroplasto y una vez dentro de la membrana tilacoidal estas secuencias se pierden.

4.3 Estructura secundaria de Tirosinasa

La predicción de la estructura secundaria de tirosinasa se ha conseguido usando diferentes programas informáticos que, partiendo de la estructura primaria, permiten predecir la estructura secundaria por comparación con la hemocianina de *Limulus sp* (**Figura 1.8**) (van Gelder et al., 1997; Rost y Sander, 2000; Decker y Tuczek, 2000; Decker et al., 2000).

En el caso de tirosinasa humana hay una predicción clara de α -hélice para las regiones de unión al cobre; sin embargo, esto no es así para tirosinasa de hongos, donde la estructura secundaria no está bien definida, como tampoco lo está para polifenol oxidasa de plantas (van Gelder et al., 1997).

En cuanto a la región C-terminal, las previsiones apuntan a que se trata de una lámina β en tirosinasa de hongos y plantas, mientras que en la de mamíferos es una α -hélice.

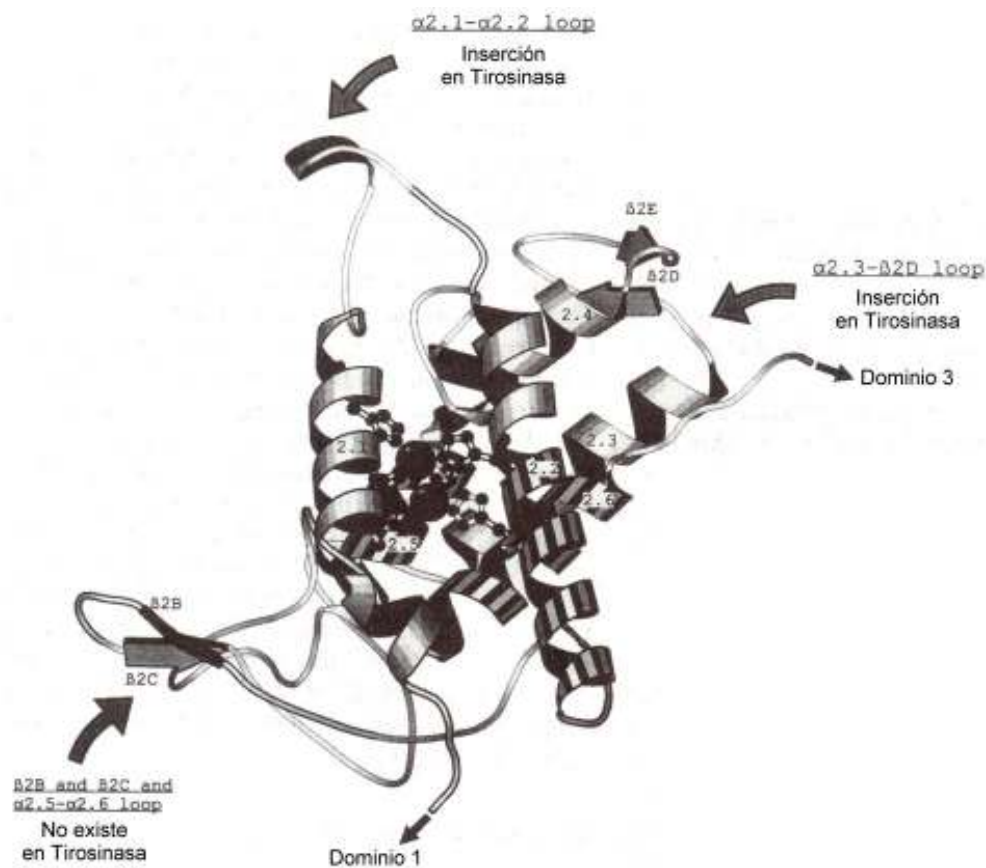


Figura 1.8. Estructura de hemocianina de *Limulus sp.* Las α -hélices que contienen las histidinas conservadas son las 2.1, 2.2, 2.5 y 2.6, donde las His se muestran como bolas y bastones. Las láminas- β que se indican son β 2B, β 2C, β 2D, β 2E. Los iones cobre se muestran como círculos negros. Las regiones de tirosinasa que se predicen similares a Hc se indican rayadas. Las regiones de Hc que parecen no existir en tirosinasa o aquellas que se insertan en la misma, se indican con una flecha. La estructura fue modelizada usando MOLSCRIPT (Van Gelder et al., 1997).

4.4 Estructuras del centro activo

Gracias a estudios químicos y espectroscópicos de tirosinasa se conoce que su centro activo está formado por un núcleo con dos átomos de cobre, muy similar al encontrado en la proteína hemocianina (Eickman et al., 1978). Los átomos de cobre pueden encontrarse en tres estados funcionales diferentes en equilibrio, dando

lugar a tres diferentes estructuras geométricas y electrónicas del centro activo de tirosinasa (Solomon et al., 1992) (**Figura 1.9**).

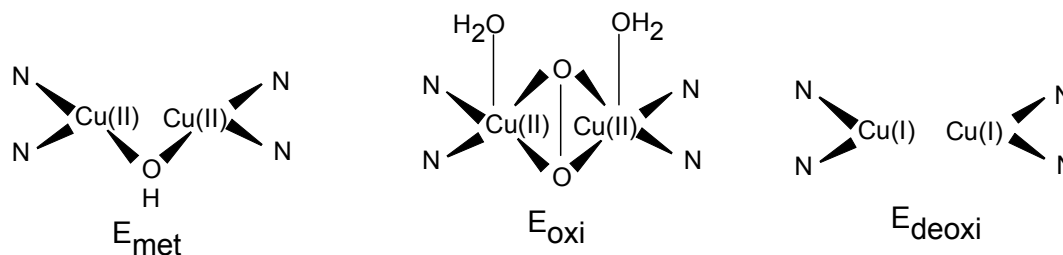


Figura 1.9 Estructura del centro activo de tirosinasa en sus distintos estados funcionales de *met*, *oxi* y *deoxi*.

La forma oxigenada (E_{oxi}) consiste en dos átomos de cobre (CuII) tetragonales, y cada uno de ellos se une fuertemente a dos histidinas en el plano ecuatorial y de forma débil a una histidina en el plano axial (Solomon y Lowery, 1993) (**Figura 1.9**). El oxígeno se une como peróxido y forma puentes de unión entre los dos átomos de cobre (Eickman et al., 1978). La cantidad de la forma E_{oxi} contenida en los extractos enzimáticos oscila entre el 2-30% según la fuente empleada (Jolley et al., 1974; Gutteridge y Robb, 1975; Lerch, 1976). *Oxi*-tirosinasa presenta un máximo de absorción a 345 nm, que desaparece en presencia de substratos monofenólicos y *o*-difenoílicos, indicando que este estado funcional es un intermedio catalítico. *Oxi*-tirosinasa se puede obtener a partir de las otras formas enzimáticas mediante la adición de peróxido de hidrógeno a la forma *met*-tirosinasa o mediante la unión reversible de una molécula de oxígeno a la forma *desoxi*-tirosinasa (Jiménez y García-Carmona, 1996b).

La forma *met*-tirosinasa (E_{met}) al igual que la forma oxigenada, contiene dos átomos de cobre (II) tetragonales enlazados mediante una unión endógena y un ligando exógeno (Himmelwright et al., 1980; Chen y Solomon, 2004) (**Figura 1.9**). La enzima obtenida después de una purificación es una mezcla de E_{met} y E_{oxi} en proporción de 85% y 15%, respectivamente (Jolley et al., 1974). *Met*-tirosinasa presenta absorción en la región visible del espectro y dicroísmo circular.

La deoxitirosinasa (E_{deoxi}), llamada así por analogía con la *deoxi*-hemocianina, tiene una estructura Cu (I)-Cu (I) (**Figura 1.9**). Aunque el sitio de unión de cobre para tirosina es mucho más accesible a los ligandos que el de hemocianina (Himmelwright et al., 1980). Sin embargo, estudios de los sitios de unión de ambas proteínas con análogos de sustrato, ponen de manifiesto las diferentes funciones fisiológicas que desempeñan estas cuproproteínas (Lerch et al., 1986). Se conoce muy poco de ella porque no presenta absorción en la región visible del espectro.

4.5 Estructura cristalina

Las dificultades inherentes a la purificación de tirosinasa y las derivadas de su multiplicidad suponen que no se hayan obtenido cristales suficientemente puros para las técnicas de difracción de rayos X. Por lo tanto, esta enzima ha eludido hasta ahora, la determinación de su estructura completa. Así, hasta hace unos años, las aproximaciones a la estructura de tirosinasa se hacían en base a los conocimientos sobre las hemocianinas de artrópodos (van Gelder et al., 1997).

Sin embargo, recientemente, se ha cristalizado y elucidado la estructura tridimensional de catecol oxidasa de batata (*Ipomoea batatas*) (Klabunde et al., 1998). Catecol oxidasa es una enzima análoga a tirosinasa, aunque carente de actividad hidroxilante (Rompel et al., 1999). En la estructura publicada (depositada bajo los códigos 1BT1-1BT3 en “Protein Data Bank”), el centro activo se encuentra en el centro de un haz de cuatro hélices (**Figura 1.10A**). En él se encuentran dos átomos de cobre, CuA y CuB, con una esfera de coordinación piramidal trigonal formada por tres ligandos de histidina (His 88, 109 y 118 para CuA e His 240, 244 y 274 para CuB) (**Figura 1.10B**). También se ha cristalizado la estructura del complejo tirosinasa-feniltiourea, cuyo átomo de azufre nucleofílico se enlaza a ambos cobres de tirosinasa, mientras que el anillo bencénico queda alojado en una cavidad hidrofóbica constituida por residuos de isoleucina, histidina y fenilalanina (I241, H244 y F261). En la proximidad del centro activo se ubica también un residuo de cisteína (C92) que se une a una de las histidinas ligantes de cobre (H109)

a través de un enlace tioéter, que restringe las posibilidades de movimiento en el centro activo.

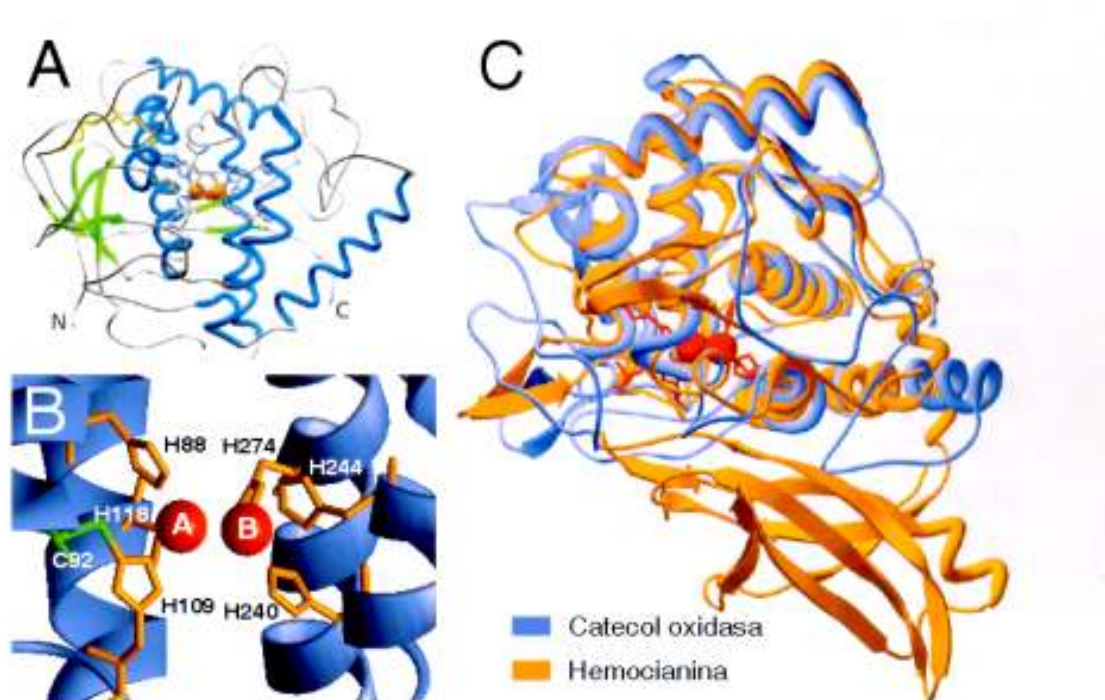


Figura 1.10 Estructura de catecol oxidasa de batata (*Ipomoea batatas*). (A) vista general (átomos de cobre, naranja; hélices α , azul; láminas β , verde; puentes disulfuro, amarillo); (B) centro activo (histidinas, naranja; cisteína, verde; cobres, rojo); (C) superposición con la estructura de la hemocianina del molusco *Octopus dofleini* (naranja). A y C han sido tomados de Gerdemann et al (2002a) y B ha sido generado a partir de la estructura PDB ID: 1BT3 con el programa WebLab Viewer (Molecular Simulations Inc.)

Un enlace análogo también ha sido descrito en la enzima tirosinasa del hongo *Neurospora crassa* entre C94 y H96 (Lerch, 1982), proponiéndose que podría desempeñar un papel en la regulación de la actividad de la enzima, y en la hemocianina del molusco *Octopus dofleini* entre C2560 y H2562 (Cuff et al., 1998), anclando a la histidina en su posición de ligando.

La región del centro activo de catecol oxidasa de *Ipomoea batatas* muestra una amplia homología estructural con los centros activos de las hemocianinas de moluscos y artrópodos (Eicken et al., 1999; Gerdemann et al., 2002a) (**Figura 1.10C**). Del análisis comparativo de sus estructuras se pueden obtener conclusiones

acerca del acceso de los sustratos fenólicos a la cavidad conteniendo los átomos de cobre. La entrada al mismo se ve bloqueada en los casos de hemocianinas, estando el de artrópodos protegido por una “región escudo” ubicada en el dominio N-terminal, donde además existe un residuo de fenilalanina cuya posición se superpone a la que ocuparía un sustrato fenólico en el centro activo. En el caso de la hemocianina de molusco, se observa también una “región escudo” protegiendo al centro activo, pero en este caso localizada en la región C-terminal e introduciendo en la cavidad un residuo de leucina, que bloquea la entrada de sustratos fenólicos menos eficientemente, dejando la posibilidad de una actividad catecolasa limitada. Obviamente, el acceso de sustratos fenólicos a la cavidad del centro activo no presenta barreras en el caso de la catecol oxidasa de batata, pero se ha propuesto que en la forma latente, no madura, existe esta misma zona protectora en el dominio C-terminal (Gerdemann et al., 2002b). Este análisis estructural abre la posibilidad de poder generar hemocianinas con actividad catalítica si se promueve un cambio conformacional que abra suficientemente el acceso al centro activo potencial. Ello estaría en consonancia con experimentos en los que se observa actividad catecolasa en hemocianinas en presencia del detergente SDS (Decker et al., 2001; Jaenicke y Decker, 2004).

El conocimiento sobre el centro activo de catecol oxidasa y tirosinasa se ve apoyado por la síntesis y estudio de modelos estructurales desarrollados con complejos inorgánicos (Than et al., 1999; Gentshev et al., 2000).

5. Latencia y Activación de Tirosinasa

Uno de los aspectos más peculiares de la bioquímica de tirosinasa es la existencia de actividad enzimática latente, es decir, una porción o toda la enzima se encuentra en una forma inactiva susceptible de ser activada por uno o varios tratamientos. La presencia de esta forma latente se ha descrito en tirosinasas de diferente origen; en anfibios (Wittenberg y Triplet, 1985a y 1985b), insectos (Wang y Constabel, 2004b), crustáceos (Pless et al., 2003), hongos (Pérez-Gilabert et al., 2004) y especialmente en plantas donde se ha encontrado latente en aguacate

(Kahn, 1977), espinaca (Goldbeck y Cammarata, 1981; Sánchez-Ferrer et al., 1989a), uva (Sánchez-Ferrer et al., 1988, 1989b, Núñez-Delicado et al., 2005), hoja de patata (Sánchez-Ferrer et al., 1993), haba (Jiménez y García-Carmona, 1996a), plátano (Sojo et al., 1999), lechuga (Chazarra et al., 1996), hoja de remolacha (Escribano et al., 1997b), melocotón (Laveda et al., 2000), y caqui (Núñez-Delicado et al., 2003).

Existen una gran variedad de sustancias o tratamientos que pueden provocar dicha activación (van Gelder et al., 1997). Así, la activación *in vitro* de tirosinasa se ha conseguido con una gran variedad de tratamientos o agentes que incluyen choque ácido (Valero y García-Carmona, 1992; Fujita et al., 1995) y básico (Kenten, 1957), urea (Swain et al., 1966; Lerner et al., 1972), cationes divalentes (Jiménez y García-Carmona, 1993; Söderhäll, 1995), poliaminas (Jiménez-Atiénzar et al., 1991), ácidos grasos (Sugumaran y Nellaiappan, 1991), detergentes aniónicos como el SDS (Moore y Flurkey, 1990; Jiménez y García-Carmona, 1996; Núñez-Delicado et al., 1996; Chazarra et al., 1996; Jiménez y García-Carmona, 1996; Escribano et al., 1997a y b, Laveda et al., 2000) y proteasas (Goldbeck y Cammarata, 1981; King y Flurkey, 1987; Laveda et al., 2001; Gandía-Herrero et al., 2005g; Núñez-Delicado et al., 2005).

Los estudios sobre la latencia de PPO se ven limitados porque los tratamientos utilizados para purificar la enzima de plantas son tan drásticos que, al mismo tiempo que la solubilizan, provocan su activación (Mayer, 1987; Sánchez-Ferrer et al., 1995).

5.1 Activación por detergentes

La activación de tirosinasa por detergentes aniónicos fue descrita por primera vez por Kenten (1958), quien describió que la concentración de detergente necesaria para la activación de la enzima era menor cuanto más larga era la cadena del alquil sulfato utilizado. Posteriormente, se demostró que el proceso de activación era reversible y que la incubación prolongada con SDS provocaba una disminución de la actividad y se concluyó que la actividad implicaba una reorganización de la

estructura terciaria de la enzima, haciendo el centro activo más accesible a los sustratos (Robb et al., 1964; Swain et al., 1966), lo cual fue confirmado por estudios posteriores (Wittenberg y Tripplet, 1985b; Moore y Flurkey, 1990).

El uso de SDS como detergente aniónico modelo en la activación de tirosinasa está extendido y es de un interés particular puesto que muy pocas enzimas son activadas por su presencia, siendo la mayoría inactivadas. De este modo, concentraciones que desnaturalizarían a otras enzimas, provocan la activación de tirosinasa (Moore y Flurkey, 1990). La reversibilidad limitada del cambio conformacional de la enzima ha sido inequívocamente demostrada usando ciclodextrinas que, retirando el SDS del entorno de la enzima, devolvían a ésta a su estado inicial no activado (Laveda et al., 2000).

Se ha sugerido que a nivel fisiológico, el papel activador desarrollado por los detergentes corresponde a los lípidos (van Gelder et al., 1997), y la activación de tirosinasa por SDS se ha demostrado que ocurre in vivo en secciones de *Terfezia claveryi* (Pérez-Gilabert et al., 2004).

5.2 Activación por proteasas

La existencia de proteínas que se sintetizan como precursores inactivos y que se activan por la ruptura selectiva de enlaces peptídicos constituye un mecanismo regulador de procesos tan diversos como son la producción de hormonas, la coagulación sanguínea, la activación del complemento, la fertilización, la metamorfosis y la digestión.

En tirosinasa, la activación in vitro por la acción de enzimas hidrolíticos se ha descrito con frecuencia, siendo tripsina la enzima más efectiva en la activación de tirosinasa de plantas (Savagaon y Sreenivasan, 1978; Goldbeck y Cammarata, 1981; Peñafiel et al., 1982; Söderhäll et al., 1985; King y Flurkey, 1987; Sánchez-Ferrer et al., 1989; Laveda et al., 2001; Gandía-Herrero et al., 2005g). La actividad de una tirosinasa aislada de la tinta del calamar también aumentó por el efecto de la tripsina (Naraoka et al., 2003).

En *Aspergillus oryzae*, se han aislado dos proteasas, y en *Agaricus bisporus*, se ha aislado una serín-proteasa que juega un importante papel en la senescencia (Burton et al., 1993a y b), por lo que podría estar implicada en la regulación de tirosinasa. La tirosinasa de hongo parece ser sensible a la activación con preparaciones que contienen toalasina, que es un lipopéptido bacteriano. La activación se atribuye a cambios conformacionales de la enzima, solubilización de la misma o eliminación de un inhibidor de ésta.

Por otro lado, la resistencia al tratamiento con proteasas puede ser considerada una medida de maduración de la enzima puesto que el plegamiento de las proteínas supone un estado conformacional estable que ayuda a evitar su digestión inespecífica (Francis et al., 2003)

6. Mecanismo de reacción

Tirosinasas obtenidas a partir de diversas fuentes biológicas poseen similares características estructurales y funcionales (Robb, 1984). Esto ha favorecido la obtención de importantes avances en el conocimiento de la estructura del centro activo de la enzima, y en la comprensión de su mecanismo de reacción (Decker y Tuczek, 2000). Tirosinasa está clasificada como una proteína acoplada a cobre binuclear (cobre tipo 3) (Eickman et al., 1978; Himmelwright et al., 1980; Solomon et al., 1992; Solomon y Lowery, 1993). En el centro activo, como ya se ha comentado anteriormente, los átomos de cobre pueden encontrarse en diferentes estados funcionales que se conocen con los nombres de “*met*”, “*oxi*” y “*desoxi*” tirosinasa (Jolley et al., 1974; Lerch, 1983) y dan lugar a tres estructuras geométricas y electrónicas diferentes del centro activo (Solomon et al., 1992) (**Figura 1.11**).

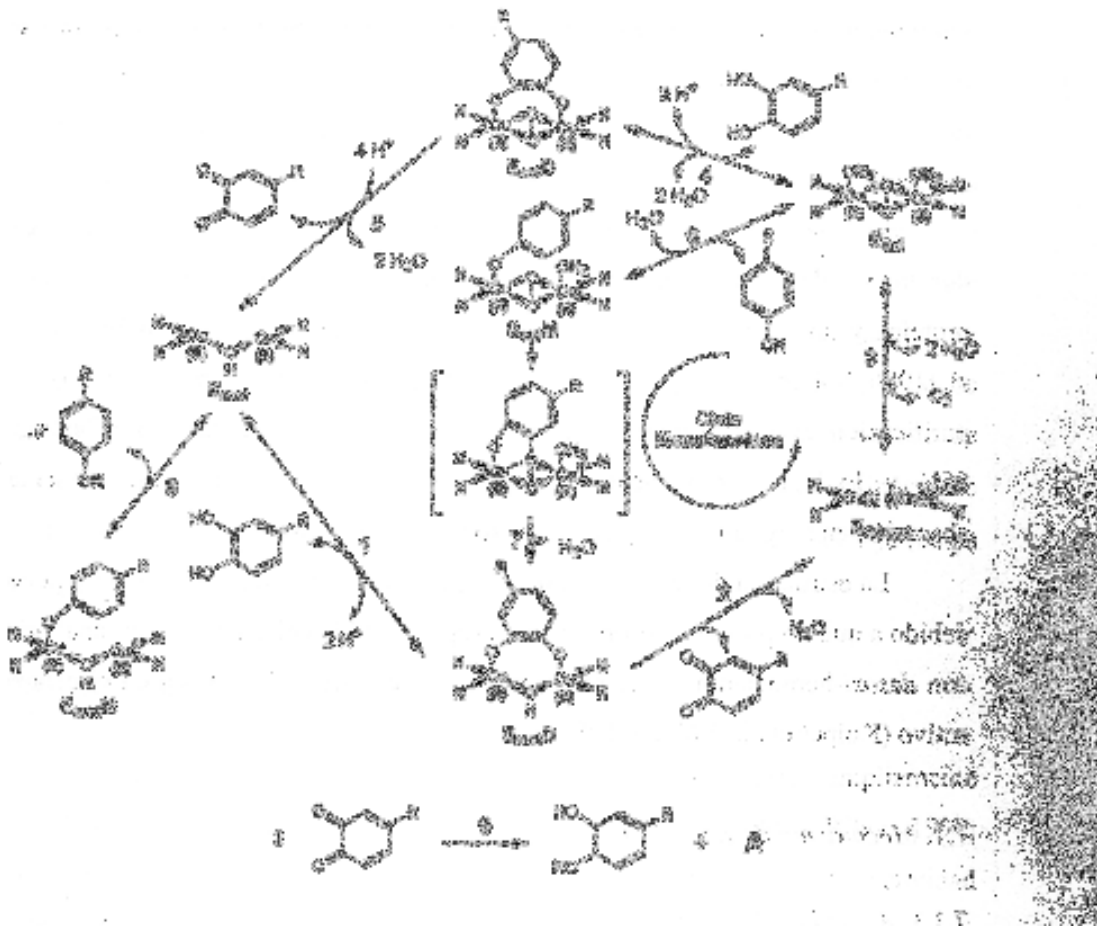


Figura 1.11 Ciclo catalítico de la oxidación de sustratos monofenólicos y difenólicos por tirosinasa en presencia de O_2 (Cabanés et al., 1987; Sánchez-Ferrer et al. 1995). A, aducto oxidado (aminocromo); M, monofenol; D, difenol.

6.1 Actividad Difenolasa

La actividad difenolasa consiste en la oxidación de dos *o*-difenoles a dos *o*-quinonas, mediante la reducción concomitante de una molécula de oxígeno formándose dos moléculas de agua. El ciclo catalítico para la oxidación de un sustrato *o*-difenólico a *o*-quinona en presencia de oxígeno molecular se muestra en la **Figura 1.11**. Empezando por la forma *met*-tirosinasa, la unión de un *o*-difenol rinde el intermedio E_{met} -difenol a partir del cual se origina una *o*-quinona y se

reduce el Cu^{2+} del centro activo (etapas 1 y 2). No se forman intermedios semiquinónicos durante el ciclo catalítico de la enzima (Mason, 1965), la oxidación de *o*-difenoil tiene lugar en un proceso en el que están implicados dos electrones. En la etapa siguiente (etapa 3), la *desoxi*-tirosinasa reacciona irreversiblemente con oxígeno molecular formándose *oxi*-tirosinasa. La reacción de esta forma enzimática con una segunda molécula de *o*-difenoil (etapas 4 y 5) implica la reducción de peróxido de hidrógeno endógeno a agua para formar una quinona y regenerar *met*-tirosinasa cerrándose el ciclo catalítico.

A partir de las *o*-quinonas generadas enzimáticamente se produce la adición de un nucleófilo, intramolecular en el caso de DOPA o dopamina, o exomolecular en el caso de otros difenoles (Valero et al., 2003a). Esto genera un difenoil que experimenta oxidación con una molécula adicional de *o*-quinona, la cual se reduce al difenoil original, obteniéndose así el aminocromo o aducto oxidado correspondiente (etapa 9). Este modelo explica la existencia de un período de retardo en la actividad difenolasa cuando se sigue la acumulación de aminocromo a $\text{pH} < 6$, a causa de la ralentización de las reacciones químicas de reciclaje (etapa 9).

6.2 Actividad Monofenolasa

El mecanismo cinético de la actividad monofenolasa ha sido ampliamente estudiado (Mason, 1955; Cabanes et al., 1987; Naish-Byfield y Riley, 1992; Rodríguez-López et al., 1992) y entre las características de esta actividad destacan (Sánchez-Ferrer et al., 1995):

- La expresión conjunta de las actividades monofenolasa y difenolasa, actuando la segunda sobre la primera.
- La existencia de las mismas etapas no enzimáticas que las encontradas en la actividad difenolasa desde la *o*-quinona hasta aminocromo.
- La presencia de un período de retardo en la expresión de la velocidad máxima de hidroxilación, observable tanto si se sigue el consumo del sustrato (O_2) como si se mide la acumulación de producto. La duración de

este período de retardo puede variar con el pH, concentración de enzima, y de monofenol (García-Carmona et al., 1979; García-Cánovas et al., 1981; Rodríguez-López et al., 1992; Valero y García-Carmona, 1992; Valero et al., 2003b). La presencia de cantidades catalíticas de *o*-difenoil o de iones metálicos de transición puede eliminarlo por completo (Pomerantz y Warner, 1967; Palumbo et al., 1985; Ros et al., 1993).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar la existencia de dicho período (Duckworth y Coleman, 1970; Hearing y Eckel, 1976; Triphati et al., 1992). Los estudios realizados en este departamento condujeron a la elaboración de un mecanismo denominado por sus autores como “enzimático-enzimático-químico”, que predice las características más singulares descritas para actividad monofenolasa, como son la existencia de un período de retardo, inhibición por substrato y la contribución de los *o*-difenoles al proceso catalítico, y además permite ajustar satisfactoriamente los datos experimentales obtenidos para dicha actividad (García-Carmona et al., 1982; Cabanes et al., 1987).

Según este modelo, el monofenol se une inicialmente en posición axial a uno de los átomos de cobre que componen el centro activo de oxitirosinasa (E_{oxi}) (Wilcox et al., 1985). (**Figura 1.11**, etapa 6). Posteriormente, tiene lugar la hidroxilación del monofenol por la unión de peróxido, rindiendo una molécula de agua y el complejo $E_{\text{met}}D$ (etapa 7). Este complejo puede rendir, bien difenol libre cumpliendo el equilibrio $E_{\text{met}} + D \leftrightarrow E_{\text{met}}D + 2H^+$, como primer paso en el ciclo de la actividad difenolasa de la enzima (etapa 1) o bien, puede continuar la oxidación del intermedio difenolato que tiene unido a su centro activo, hasta dar lugar a una quinona libre (etapa 2) y la enzima queda en forma reducida (E_{deoxi}). La forma E_{oxi} se regenera por la unión de oxígeno molecular a la forma E_{deoxi} . Si solo hay difenol presente en el medio, este se une a la forma E_{oxi} dando lugar al complejo $E_{\text{oxi}}D$ (etapa 4), el cual oxida al difenol produciendo quinona libre y la enzima pasa a estar en forma E_{met} (etapa 5). Esta forma, puede unir a su vez, otra molécula de difenol hasta rendir una molécula de quinona y la enzima en forma reducida (E_{deoxi}) (etapas 1 y 2).

De este esquema cabe resaltar, que la entrada de monofenol a la forma E_{met} (etapa 8) supone una vía muerta en el ciclo catalítico de la enzima, siendo ésta la etapa responsable de la aparición del característico período de retardo de la actividad monofenolasa, que se manifiesta antes de alcanzar la enzima el estado estacionario (Sánchez-Ferrer et al., 1995). La enzima puede volver a entrar lentamente al ciclo catalítico (etapas 1-3) mediante el *o*-difenoel obtenido por reciclaje en las etapas químicas (etapa 9). El incremento en el nivel de *o*-difenoel produce una mayor transformación de monofenol a *o*-quinona, eliminándose el período de retardo cuando se produce el nivel de *o*-difenoel necesario para mantener el estado estacionario.

II. Fenol Hidroxilasa

Fenol hidroxilasa (EC 1.14.13.7) es una monooxigenasa dependiente de FAD. Las monooxigenasas del grupo de las flavoproteínas se encargan de gran variedad de procesos biológicos entre los que destacan la detoxificación de fármacos, la biodegradación de compuestos aromáticos del medio ambiente, biosíntesis de antibióticos y sideróforos, entre otras (Ballou et al., 2005). Esta reacción utiliza NAD(P)H y oxígeno molecular como cosubstratos e inserta un átomo de oxígeno dentro del sustrato.

El conjunto de reacciones catalizadas por las monooxigenasas dependientes de FAD implican tres procesos químicos generales: (A) reducción de la flavina por el NAD(P)H, (B) reacción de la flavina reducida con O₂ para dar lugar a C4a-flavina (hidro)peróxido, que es el agente oxidante (**Figura 1.12**), y (C) unión, orientación y activación del sustrato para su hidroxilación por el C4a-hidroperóxido. Cada uno de estos tres procesos muestra requerimientos únicos, por lo que no resulta sorprendente que sea necesario más de un sitio catalítico.

Se ha descrito la existencia de dos estrategias generales para conseguir que el sistema funcione de manera óptima. La primera está constituida por monooxigenasas dependientes de flavina formadas por un único componente, cuyo modelo es la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa (PHBH) (Gatti et al., 1994; Moran et al., 1996; Palfey et al., 1997 y 1999; Brender et al., 2005). En ella se ha demostrado que el anillo isoaloxacino de la flavina se mueve varios Ångströms, provocando reestructuraciones en la proteína durante la catálisis. La segunda estrategia usa dos componentes para separar los sitios activos. Así, utiliza una proteína como reductasa para catalizar la reducción de la flavina y otra como oxigenasa, que utiliza a la flavina reducida como sustrato para reaccionar con el oxígeno e hidroxilar al sustrato orgánico. Estos sistemas formados por dos componentes deben ser capaces de transferir la flavina reducida desde el componente reductasa hasta el componente oxigenasa, y estabilizar al intermedio C4a-peroxiflavina hasta que un sustrato se una para ser hidroxilado, sin la producción de H₂O₂; todo ello

acompañado de la oxidación de la flavina. Por todo esto, la dinámica de la proteína es muy importante para el éxito en la catálisis. Se conoce poco acerca de estos sistemas de dos componentes ya que no se parecen ni en la estructura ni en la secuencia a los de un solo componente.

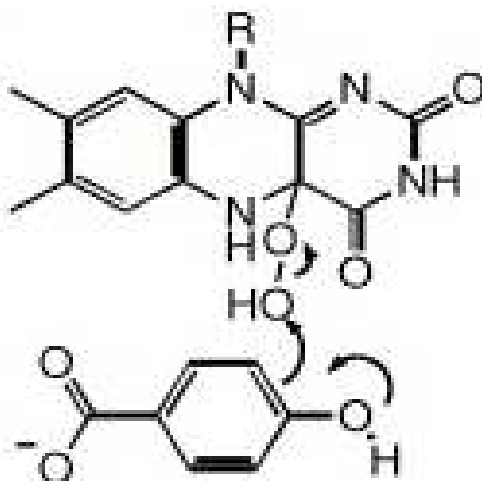


Figura 1.12 Intermedio C4a-peroxiflavina y sustrato (*p*-hidroxibenzoato) en el centro activo de *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa (Ortiz-Maldonado et al., 2001).

7. Distribución de las monooxigenasas dependientes de FAD

Un importante grupo dentro de las monooxigenasas son las flavoproteínas, que usan el NAD(P)H y el oxígeno molecular como co-sustratos. Las monooxigenasas dependientes de FAD formadas por un único componente, como la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa, juegan un papel importante en la detoxificación de suelos al ser capaces de hidroxilar una gran variedad de compuestos aromáticos y alifáticos. Una de las primeras estudiadas fue la salicilato hidroxilasa, descubierta por Katagiri y Yamamoto (1965). Otras monooxigenasas dependientes de FAD relacionadas con esta enzima presentes en microsomas de células del hígado catalizan la oxigenación de una gran variedad de compuestos, que contienen heteroátomos nucleofílicos de nitrógeno, azufre, fósforo y selenio entre otros, incluyendo muchos fármacos, en coordinación con los citocromos P450 (Cashman, 2004). Además, estas enzimas regulan la biosíntesis de auxinas en plantas (Zhao et

al., 2001). Otras monoxigenasas dependientes de FAD son la monooxigenasa del escualeno humana que es una enzima implicada en la regulación de la biosíntesis del colesterol (Laden et al., 2000), UbiB, que es una oxigenasa relacionada con la biosíntesis de la ubiquinona (Poon et al., 2000), y la ornitina-N5-oxigenasa, que se encarga de la biosíntesis de sideróforos en microorganismos (Ambrosi et al. 2000).

Recientemente, se han descrito un gran número de monoxigenasas dependientes de flavina de dos componentes. Este sistema enzimático utiliza una flavina reductasa para obtener una flavina reducida que o difunde o es transportada hasta el componente monoxigenasa. Estas oxigenasas de dos componentes realizan funciones biológicas como las descritas para las de un solo componente.

Pseudomonas ssp. es capaz de metabolizar el fenol y otros derivados metilados por una fenol hidroxilasa que está codificada en un plásmido. Esta fenol hidroxilasa está formada por seis polipéptidos y todos ellos son necesarios para que este microorganismo sea capaz de utilizar el fenol como fuente de carbono (Nordlung et al., 1990).

Fenol hidroxilasa de *Acinetobacter radioresistens* es otro ejemplo de una monoxigenasa dependiente de FAD que está formada por varios componentes. Esta enzima está compuesta por un componente oxigenasa, otro reductasa y una fracción reguladora. El componente reductasa contiene un FAD y un cluster hierro-azufre, cuya función es la transferencia de electrones desde el NADH al centro con dos hierros de la oxigenasa (Griva et al. 2003; Divari et al. 2003).

En el caso de *Geobacillus thermoglucosidasius*, un microorganismo termófilo que es capaz de crecer a 65 °C, esta enzima está compuesta por dos subunidades, denominadas PheA1 y PheA2. La subunidad grande (PheA1) tiene actividad oxigenasa y la subunidad pequeña actividad flavin reductasa. Ambas proteínas son necesarias para la actividad fenol hidroxilasa (Duffner et al., 2000).

8. Propiedades moleculares de oxigenasas dependientes de FAD

La reacción catalizada por las monooxigenasas dependientes de flavina se lleva a cabo, como ya se ha comentado anteriormente, a partir de tres procesos químicos generales:

- Reducción de la flavina por el NAD(P)H
- Reacción de la flavina reducida con el oxígeno molecular para formar el intermedio C4a-hidroperoxiflavina.
- Unión, orientación y activación del sustrato para su hidroxilación por el peróxido.

El mecanismo para transferir la flavina reducida de la reductasa a la oxigenasa no se comprende perfectamente, aunque investigaciones recientes sugieren que la mayoría de las flavinas reducidas difunden al componente oxigenasa rápidamente antes de reaccionar con el oxígeno; de esta forma, los compuestos hidroxilados aparecen sin producción de peróxido de hidrógeno (Galán et al., 2000; Otto et al., 2004; Valton et al., 2006).

La reducción de la flavina es un punto crítico en la regulación de la catálisis de monooxigenasas de un solo componente, llevándose a cabo únicamente en presencia de sustrato. Así, para la mayoría de estas enzimas, la reducción es muy poco efectiva en ausencia de sustrato. Este control previene el derroche de NAD(P)H que provocaría la aparición de peróxido de hidrógeno. Por el contrario, las monooxigenasas de dos componentes o las de mamíferos no llevan a cabo esta regulación (Beatty y Ballou, 1981; Jones y Ballou, 1986; Sheng et al., 2001). En este caso, el NAD(P)H reduce estas enzimas a la misma velocidad en presencia o ausencia de sustratos, pero el NAD(P) permanece unido fuertemente. El cofactor flavina reducido unido a la enzima reacciona posteriormente con el oxígeno para formar el intermedio C4a-peroxiflavina que es muy estable en ausencia de sustrato. Cuando el sustrato está presente, la reacción con el intermedio ocurre muy rápidamente rindiendo el producto hidroxilado (Palfey et al., 1995; Palfey et al., 1998). De esta forma, las etapas que producen el peróxido de hidrógeno y la

flavina oxidada se evitan por un mecanismo completamente distinto al de las monooxigenasas de un solo componente.

9. Mecanismo de reacción de oxigenasas dependientes de FAD

9.1 Monooxigenasas formadas por un único componente

La *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa (PHBH) es una enzima extensamente estudiada y es el paradigma de las hidroxilasas aromáticas de un único componente. Esta enzima cataliza la reacción mostrada en la **Figura 1.13**.

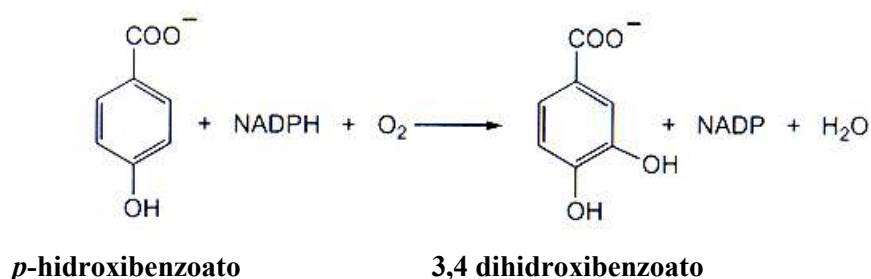


Figura 1.13. Reacción química catalizada por la PHBH (Gatti et al., 1994).

El estudio de la estructura mediante difracción de rayos X y los análisis cinéticos de las formas silvestre y mutantes de la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa han revelado tres conformaciones que son importantes en la catálisis (**Figura 1.14**): isoaloxacina en conformación *in*, *out* y *open*. La conformación *in* (o también llamada *closed*) aísla la flavina del sustrato y previene la oxidación de la flavina hidroperóxido a peróxido de hidrógeno y a flavina oxidada. La conformación *out* permite el acceso de la isoaloxacina al NADPH para la reducción por transferencia de hidruro al N5 de la flavina (Gatti et al., 1994). La estructura *open* permite la salida y entrada de los sustratos y productos. Las **Figuras 1.14 y 1.15** muestran las diferentes conformaciones que se producen durante la catálisis.

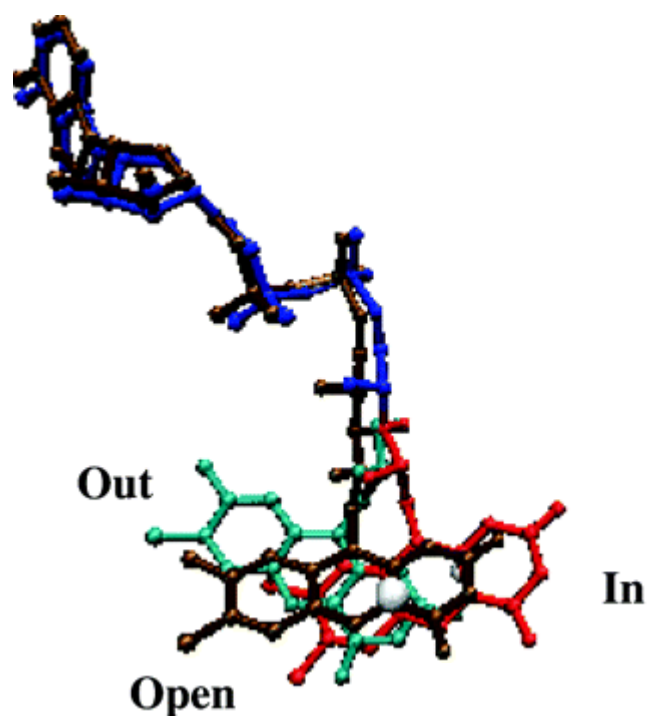
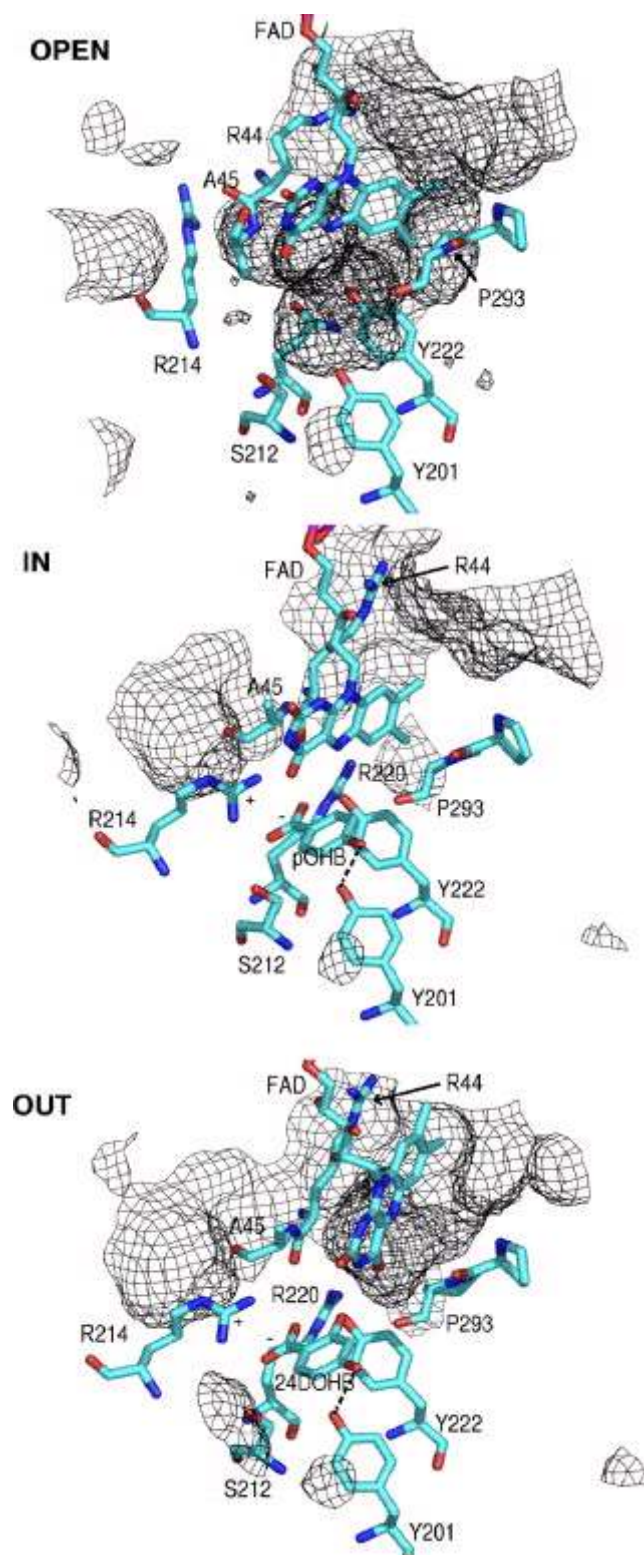


Figura 1.14 Conformación de flavina en la PHBH. Conformación *in* en azul; conformación *open* en verde y conformación *out* en rojo. (Brender et al., 2005).



*Figura 1.15. Conformaciones de la PHBH importantes para la catálisis. Arriba, conformación open, sin ligando unido; medio, conformación in, con *p*-hidroxibenzoato unido; abajo, conformación out, con el inhibidor competitivo 2,4-dihidroxibenzoato unido. La superficie mostrada como una malla oscura representa la porción del sitio activo de la enzima que es accesible al solvente (Ballou et al., 2005).*

El proceso catalítico comienza en el estado E (**Figura 1.16**), un equilibrio dinámico entre las conformaciones open e in. La conformación open, permite la unión del p-hidroxibezoato (PHB) para formar el complejo ES (k_1), y la unión del sustrato desplaza el equilibrio a la posición closed. Estos pasos suceden tan rápidamente en condiciones fisiológicas que no pueden ser medidos usando métodos discontinuos. El balance termodinámico de este equilibrio es crítico para la catálisis. Así, la variante Ala45Gly no une al sustrato rápidamente ya que el volumen más pequeño del residuo de la glicina estabiliza fuertemente la conformación in inhibiendo el paso a la conformación open, necesaria para la unión inicial del sustrato. Sin embargo, la variante Ala45Val, favorece a la estructura open porque el espacio adicional ocupado por la cadena lateral de la valina impide el paso a conformación in. Esta variante permite una unión muy rápida al sustrato, aunque esta unión es más débil ya que la conformación in, que es necesaria para acomodar perfectamente el complejo proteína-sustrato, está desfavorecida. De esta forma, podría decirse que la unión al sustrato es como mínimo, un proceso de dos pasos, con una unión inicial seguida de un reordenamiento en la conformación in.

La presencia de sustrato aumenta en 10^5 veces la velocidad de reducción de la flavina por el NADPH. Cuando el sustrato aparece, la unión del NADPH (k_2) provoca la transición al estado out, produciéndose la reducción (k_3) (Entsch et al., 2005). Este fenómeno constituye un método para evitar la producción de especies de oxígeno muy reactivas en ausencia de sustrato.

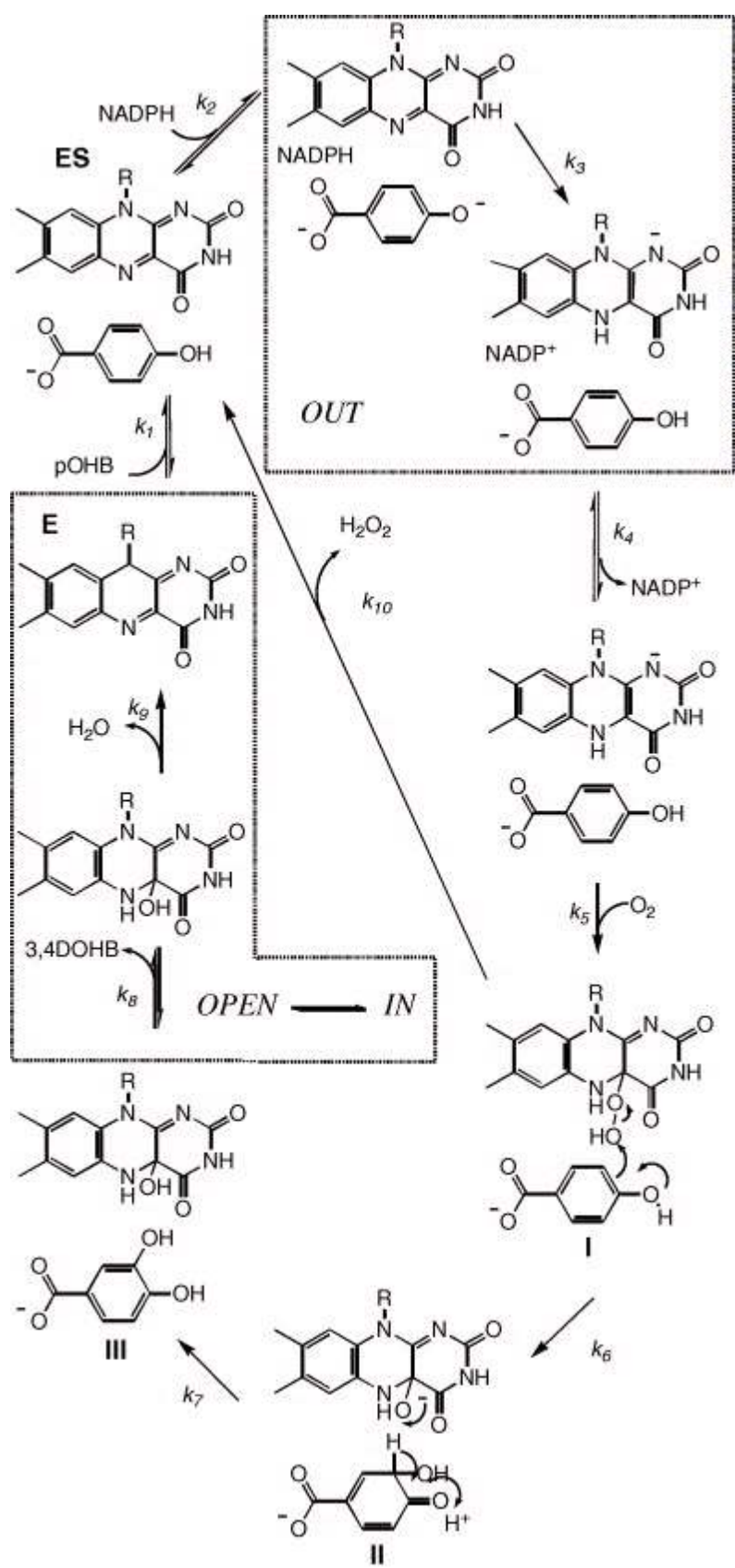


Figura 1.16 Ciclo catalítico de la p-hidroxibenzoato hidroxilasa (Entsch et al., 2005).

El uso de estudios espectrales y cinéticos de la variante His72Asn muestran que hay una red de protones que controlan el rápido movimiento de la isoaloxacina de la conformación in a la out permitiendo su reducción (Frederick y Palfey, 2005; Palfey et al., 2002). Esta red de protones, ilustrada en la **Figura 1.15**, permite la desprotonación rápida del grupo fenólico del sustrato; de esta forma, el fenolato resultante interacciona con la proteína (**Figura 1.17**) para iniciar un cambio conformacional que mueve a la isoaloxacina a la posición out. La mutación de cualquiera de estos residuos que forman la red de protones impide la catálisis.

Tras la reducción y pérdida del producto NADP (k_4), la isoaloxacina aniónica vuelve de nuevo a la posición in, en la que puede reaccionar eficientemente con el oxígeno molecular (k_5) para formar el C4a-hidroperoxi-FAD (I). Este movimiento de vuelta a la posición in es provocado por la presencia de un campo electrostático positivo que atrae al anión FADH (Moran et al., 1997). Este reordenamiento conformacional es el paso crítico para una catálisis óptima. La conformación in secuestra la flavina del medio de reacción y la posiciona óptimamente para llevar a cabo la hidroxilación del sustrato.

La isoaloxacina aniónica reducida reacciona con el oxígeno molecular (k_5) para formar, en un principio, C4a-flavin peróxido, pero este peróxido tiene una pKa alta y rápidamente coge un protón del sustrato fenólico, dando lugar al C4a-hidroperóxido que es más electrofílico y a un sustrato fenólico más nucleofílico (k_6). Así, se obtiene la forma dienona del producto y el alcóxido C4a-flavina (Ortiz-Maldonado et al., 1999). La formación del fenolato que activa al sustrato mediante ataque electrofílico es catalizada por la misma red de protones que se usa para la reducción de la flavina (Ortiz-Maldonado et al., 2004).

La rearomatización de la dienona (k_7) da lugar a la aparición del producto 3,4-dihidroxibenzoato, y la C4a-hidroxi flavina. En este punto, el producto es ionizado como el fenolato, lo que probablemente favorece el cambio a la conformación *open*, de manera que el producto puede disociarse.

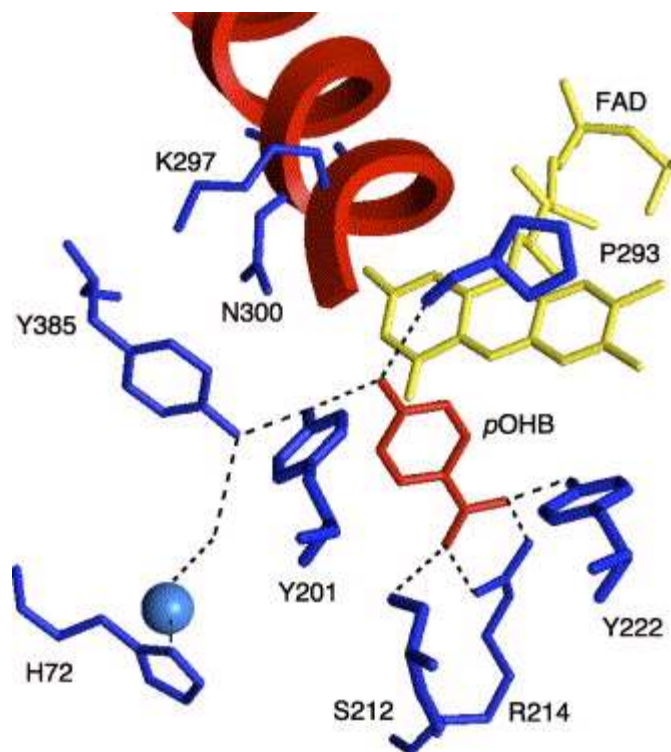


Figura 1.17 Estructura de la PHBH en la posición in mostrando la red de puentes de hidrógeno (Ballou et al., 2005).

En resumen, se podría decir que no resulta sorprendente que el proceso de catálisis en reacciones tan complejas como éstas, requiera cambios conformacionales tan significativos tanto en la proteína como en la flavina junto a intercambios de protones. Aunque la termodinámica de la reacción completa de hidroxilación es favorable, es necesario que los cambios conformacionales se produzcan de forma ordenada para que la reacción progrese. Con este ejemplo se puede observar claramente que una vez iniciado el proceso, los pasos siguientes se producen siguiendo un “efecto dominó”.

9.2 Monooxigenasas formadas por dos componentes

Como ya se ha comentado con anterioridad, estos dos componentes tienen dos funciones diferentes: una primera oxigenasa, y una segunda reductasa.

Las hidroxilasas formadas por varios componentes usan el mismo esquema cinético básico que el discutido anteriormente (**Figura 1.16**). El FADH₂ se une a la oxigenasa y reacciona con el oxígeno formando una flavina-C4a-hidroperóxido, que posteriormente hidroxila al sustrato rindiendo el producto y la flavina-C4a-hidróxido. El agua se elimina de la flavina-hidróxido para completar la catálisis. Al contrario de lo que sucede en las flavoproteín monooxigenasas de un sólo componente, tras la disociación del producto, el FAD debe ser liberado de la oxigenasa, pasar a la fracción reductasa y ser reducido para comenzar el ciclo catalítico. Aunque el proceso químico es parecido, la regulación de la reacción completa es muy diferente a la discutida anteriormente (**Figura 1.16**).

En general, podría decirse que la regulación de la catálisis se produce por los niveles de oxigenasa presentes en la célula. La concentración de oxigenasa es mayor que la cantidad de flavina disponible en la célula (Louie et al., 2003). Por lo tanto, la mayor parte de la flavina presente se encuentra unida a la oxigenasa, ya sea como C4a-flavin hidroperóxido o como flavina oxidada. El secuestro de la flavina impide que la reductasa produzca rápidamente flavinas reducidas en forma de aniones libres que podrían reaccionar con el oxígeno molecular generando especies de oxígeno altamente reactivas.

Los experimentos in vitro, normalmente se realizan usando exceso de flavina libre para asegurarse de que hay suficiente flavina para un funcionamiento óptimo de la reductasa. Bajo estas condiciones, se da lugar a la formación de grandes cantidades de peróxido de hidrógeno. In vivo, al no haber apenas flavina libre en la célula, el acoplamiento de la hidroxilación es mucho mejor. Se ha demostrado que la reacción completa es más eficiente cuando la concentración de flavina es más baja que la del componente oxigenasa.

Un ejemplo de monooxigenasa dependiente de FAD formada por dos componentes es la fenol hidroxilasa.

9.3 Fenol hidroxilasa de *Geobacillus sp.*

9.3.1 Estructura y Actividad

Esta enzima es un ejemplo de una flavoproteína hidroxilasa formada por un componente oxigenasa y otro reductasa. La proteína con actividad reductasa está unida muy fuertemente a una molécula de FAD, que actúa como cofactor. De esta manera, es una flavoproteína que reduce al FAD. Recientemente, se ha demostrado que la conversión de fenol a catecol llevada a cabo por este microorganismo termofílico está catalizada por dos proteínas codificadas por los genes pheA1 y pheA2 (Duffner et al., 2000).

El componente oxigenasa, llamado PheA1, es más grande, tiene una masa molecular de 57 kDa y muestra una importante identidad de secuencia con los componentes oxigenasa de la 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa de *Escherichia coli W* (Galán et al., 2000) y 2,4,6-triclorofenol 4-monooxigenasa de *Pseudomonas pickettii* (Takizawa et al., 1995).

El componente reductasa, llamado PheA2, tiene una masa molecular de 17.8 kDa y muestra identidad en la secuencia con numerosas flavin reductasas. Datos bioquímicos recientes muestran que PheA2 cataliza la reducción dependiente de NADH de las flavinas libres de acuerdo con un modelo catalítico ping-pong bisubstrato-biproducción (Kirchner et al., 2003). Las flavinas reducidas así sintetizadas, reaccionan con PheA1, que cataliza la o-hidroxilación de los compuestos fenólicos.

Hasta el momento, no hay datos sobre la estructura de la subunidad grande en las monooxigenasas dependientes de flavina formadas por dos componentes. Sin embargo, un estudio ha permitido conocer la estructura tridimensional de la flavin reductasa PheA2 procedente de *Geobacillus thermoglucosidasius* (van den Heuvel et al., 2004). Basándose en los datos cristalográficos, la espectrometría de masas con electrospray y los estudios de unión con fluorescencia, se puede concluir que la flavin reductasa PheA2 contiene una flavina como cofactor y un sitio de unión adicional para el NADH y la flavina sustrato, que se alternan durante la catálisis.

La estructura secundaria de la flavin reductasa consiste en once láminas- β y tres α -hélices. El núcleo de la PheA2 está formado por 6 láminas- β antiparalelas en forma de barril, con una α -hélice en un extremo que contacta con el ribitol fosfato de la molécula de FAD (**Figura 1.18**). Estas láminas antiparalelas son una permutación circular del dominio de unión a la flavina de la superfamilia de la ferredoxina reductasa (Murzin, 1998; Karplus et al., 1991).

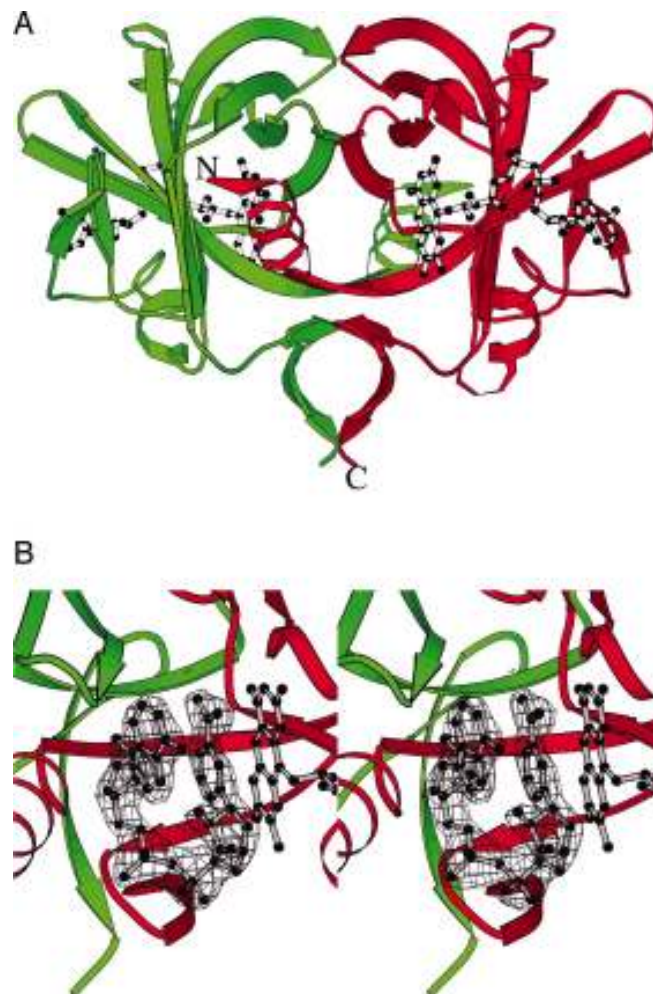


Figura 1.18 Modelo con rayos X de la PheA2 y la unión del FAD y NAD con la enzima. (A) Representación del dímero de la PheA2 en vista perpendicular. Los dos monómeros están en verde y rojo. El cofactor FAD está representado mediante bolas y bastones. (B) Representación de la forma de unión del NAD y del FAD reducido a la PheA2. A la izquierda el NAD y a la derecha el FAD (van der Heuvel et al., 2004).

La molécula de FAD en el componente PheA2 está unida en un amplio surco de la proteína al anillo isoaloxacino posicionado en la interfase del dímero (**Figura 1.18**). La cara si del anillo isoaloxacino del FAD está enterrada y en contacto con la lámina β_2 ; al contrario, la cara re está completamente expuesta al medio (**Figura 1.19**). La parte 2,4-pirimidinadiona del anillo isoaloxacino forma una extensa red de puentes de hidrógeno con la cadena principal de los residuos Asn-34, Ala-35, Ser-49 y Gly-51 y una molécula de agua (**Figura 1.19B**). Más aún, el átomo de nitrógeno de la Asn-34 está unido mediante puente de hidrógeno al N₅ del FAD. La porción dimetilbenceno del anillo isoaloxacino está situada en un bolsillo hidrofóbico formado por Ala-33, Ala-83 y Phe-143. La fracción pirofosfato del FAD está unida por puentes de hidrógeno a la cadena principal de los residuos Thr-32, Lys-55 y Met-56 y dos moléculas de agua. La adenina y la ribosa del FAD también forman puentes de hidrógeno con Val-28 y Asn-81. Teniendo en cuenta todas estas interacciones se puede decir que la molécula de FAD está estabilizada por once puentes de hidrógeno con la proteína y cuatro puentes de hidrógeno potenciales con dos moléculas de agua, y que la cara re del anillo isoaloxacino está expuesto al medio de reacción (Vadas et al., 1999). Sólo uno de los puentes de hidrógeno que interacciona con la proteína se encuentra en la cadena lateral (Asn-81); el resto de los puentes de hidrógeno se producen con la cadena principal de los átomos (Filisetti et al., 2003).

El modo de unión observado entre el FAD y PheA2 sugiere que la estructura dimérica de esta proteína es esencial para la unión de la flavina. De hecho, el sitio del FAD está yuxtapuesto a la interfase del dímero. Además, al contrario que otras reductasas de este grupo, la unión con el FAD es fuerte (Chiu et al., 2001).

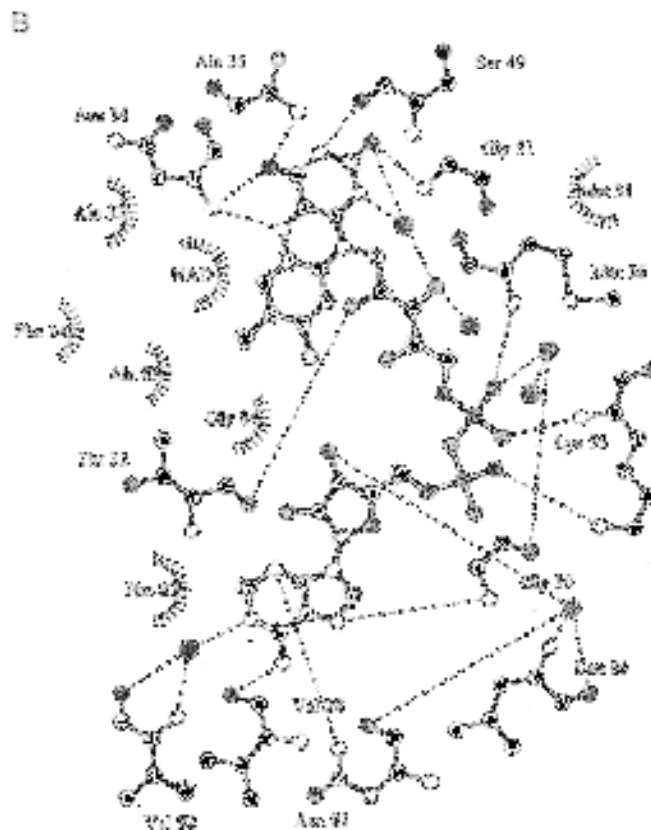
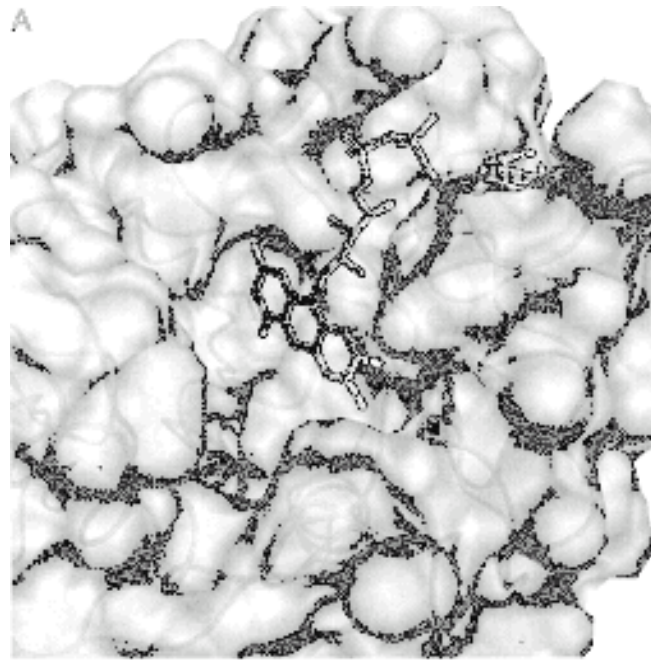


Figura 1.19 Unión del cofactor FAD con PheA2. (A) El sitio de unión del FAD a PheA2 se encuentra de manera que la cara *re* del anillo isoaloxacino está expuesto al solvente. (B) Esquema de los puentes de hidrógeno entre FAD y PheA2. Los puentes de hidrógeno potenciales entre el FAD y la proteína, y entre el FAD y el agua, se muestran con líneas discontinuas (van der Heuvel et al., 2004).

Diferentes estudios cinéticos han mostrado que la afinidad de esta enzima es 50 veces mayor al NAD frente al NADP como coenzima en la transferencia del grupo hidrido (Duffner et al., 2000). El NAD está unido a la proteína en un amplio surco y adopta una conformación plegada muy compacta con el anillo nicotinamida asentado sobre la adenina de forma casi paralela a la cara re del anillo isoaloxacino del FAD. La distancia entre ambas permite la transferencia del grupo hidrido entre el NADH y el FAD (Bell et al., 1997).

El NAD forma unos pocos puentes de hidrógeno con las moléculas de agua presentes en el surco (Smith y Tanner, 2000) (**Figura 1.20**). Este bajo número de interacciones entre la proteína y el NAD, concuerda perfectamente con la baja afinidad que se observa en los estudios cinéticos (Kirchner et al., 2003).

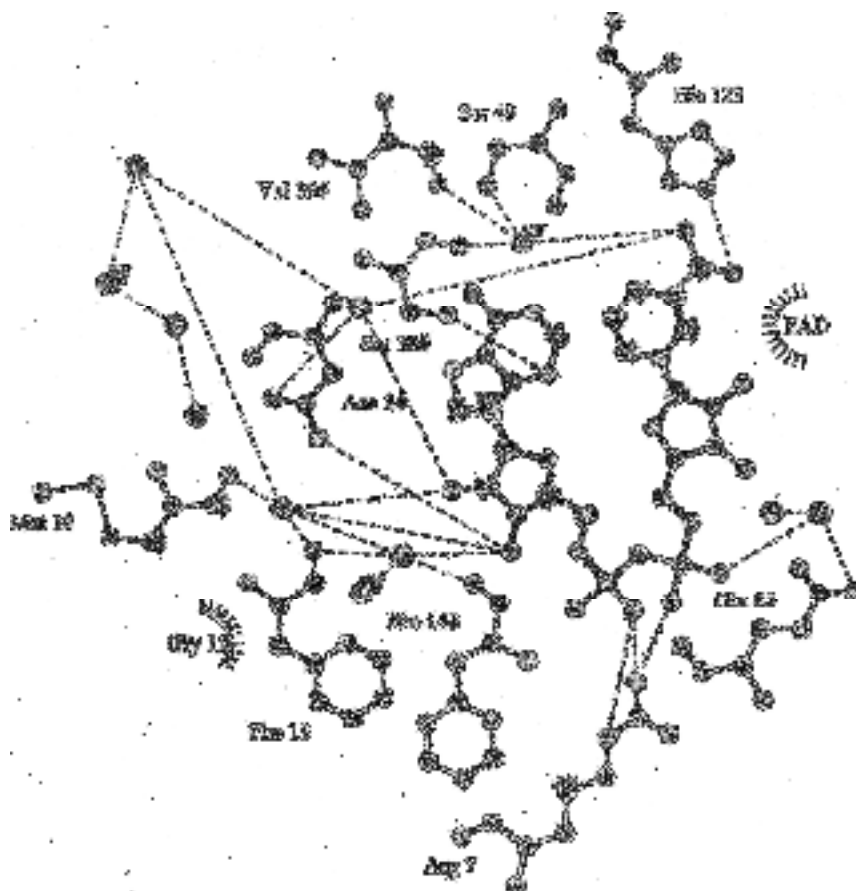


Figura 1.20 Esquema del patrón de puentes de hidrógeno entre PheA2 y NAD. Los puentes de hidrógeno potenciales entre el NAD y la proteína están indicados con línea discontinua (van der Heuvel et al., 2004).

3.3.2 Mecanismo de acción

Para que la actividad enzimática, es decir, la hidroxilación de compuestos fenólicos se produzca, es necesaria la actuación de los dos componentes de la enzima. El pequeño componente PheA2, abastece de FAD reducido a la subunidad grande (PheA1). La hidroxilación de los compuestos fenólicos por parte de la subunidad grande depende únicamente de FADH₂. Sin embargo, la subunidad pequeña puede reducir casi con la misma eficiencia catalítica FMN y riboflavina. Todos los datos cinéticos apuntan a que el mecanismo para la reducción del FAD en el componente reductasa de la fenol hidroxilasa es una cinética ping-pong bisustrato-biproducto (Kirchner et al., 2003).

Una consecuencia fundamental de este mecanismo de acción es que el NAD producto se libera antes de que la flavina sustrato se una a la subunidad PheA2. De acuerdo con el mecanismo de acción propuesto, el NAD oxidado se liberaría y la flavina sustrato entraría en la enzima. El modelo cristalográfico de la PheA2 existente hasta el momento revela claramente que la unión del FAD sustrato al cofactor FAD complejado a PheA2 sólo es posible en el hueco del sitio activo para la unión del NADH. Esto es posible porque el anillo isoaloxacino de la flavina sustrato puede adoptar una conformación plegada catalíticamente activa contra la cara re del anillo isoaloxacino del FAD cofactor sin movimientos forzados ni impedimentos estéricos. Por analogía con la conformación plegada del NAD, la flavina sustrato debería adoptar un plegamiento similar al encontrado en el FAD unido a la DNA fotoliasa. Esto crearía un microambiente protegido del solvente para una transferencia electrónica óptima (Park et al., 1995; Tamada et al., 1997).

Teniendo en cuenta los datos cristalográficos y de la espectrometría de masas, parece claro que PheA2 contiene un cofactor FAD y un sitio de unión dual para el NADH y la flavina sustrato, y que estas dos moléculas alternan durante la catálisis. Posiblemente, la afinidad de la unión al FAD sustrato dependa del estado redox del cofactor FAD unido a la enzima.

A pesar de estos conocimientos sobre fenol hidroxilasa, esta enzima nunca ha sido utilizada para la síntesis de compuestos difenólicos de interés comercial,

como pueden ser los antioxidantes naturales, quizás por el requerimiento de moléculas tan caras y lábiles como el FAD⁺ y NAD⁺. Por esta razón, una parte importante de la presente tesis doctoral se centra en la purificación y caracterización de sistemas enzimáticos con potencial aplicación para la síntesis de esos compuestos difenólicos.

A modo de resumen de esta introducción podemos decir que, a pesar de la existencia de distintos enzimas (polifenol oxidasa/tirosinasa y fenol hidroxilasa) con capacidad *o*-hidroxilante de fenoles y de su amplio conocimiento cinético y estructural, no se han descrito procesos biocatalíticos eficientes para la obtención de *o*-difenoles. Su estudio será, por tanto, objeto de esta memoria de tesis doctoral.

CAPÍTULO II

Objetivos

La presente Tesis Doctoral plantea como objetivo general:

- La purificación y caracterización de sistemas enzimáticos capaces de realizar la bioconversión de monofenoles en sus correspondientes *o*-difenoles.

Para la consecución de este objetivo general se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Purificación de polifenol oxidasa de membrillo (*Cydonia oblonga*) para obtener un extracto enzimático estable y claro.
- Caracterización cinética de polifenol oxidasa de membrillo obtenida a partir de su purificación tanto en la actividad monofenolasa como en la difenolasa.
- Purificación de tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* mediante un método que permita eliminar fácilmente la gran cantidad de pigmentos oscuros del caldo de cultivo.
- Caracterización cinética de tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* tanto en su actividad monofenolasa como en la difenolasa.
- Inmovilización de polifenol oxidasa procedente de membrillo y de Tirosinasa de *S. antibioticus* en diferentes soportes para la bioconversión de los monofenoles en difenoles.
- Clonación y expresión de la fenol hidroxilasa de *Geobacillus thermoglucosidasius* en *E. coli*.

- Comparación de la eficiencia y estabilidad operacional de los distintos enzimas purificados y clonados sobre substratos monofenólicos para la obtención del correspondiente *o*-difenol.

CAPÍTULO III
Materiales y Métodos

1. Fuentes enzimáticas

Las diferentes enzimas empleadas en esta tesis fueron obtenidas de:

a) Membrillo (*Cydonia oblonga*), de la variedad Gigante de Vranja, cultivado en Don Benito (Solvefruit S.L., Badajoz, España) en el caso de polifenol oxidasa (PPO). Las frutas fueron compradas en un supermercado local. Los membrillos fueron pelados, para su estudio, justo antes de su homogeneización y su piel fue desechada.

b) *Streptomyces antibioticus* ATCC 14888 (American Type Culture Collection, EEUU) como fuente de tirosinasa. El microorganismo se cultivó en el medio MMY agar durante 24 horas a 30 °C. Este medio está compuesto por:

Extracto de malta	1%
Extracto de levadura	0.4%
Maltosa	0.4%
Agar	1.5%

Tras el aislamiento de una colonia y con el fin producir tirosinasa, el microorganismo se incubó en medio GYM, cuya composición es:

Extracto de levadura	10 g/L
Extracto de malta	10 g/L
Glucosa	5 g/L
Cloruro cálcico	1 g/L
Sulfato férrico	1 g/L
Sulfato de zinc	1 g/L
Sulfato de cobre	0.5 g/L
Sulfato de manganeso	3 g/L
Potasio dihidrógeno fosfato	6.8 g/L
pH	7.2

La glucosa debe autoclavarse separada de las sales, para evitar su caramelización.

c) *Geobacillus thermoglucosidasius* DSM 2542 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania) como fuente de fenol hidroxilasa. El microorganismo se cultivó durante 18 horas a 65 °C en un baño termostático (Unitronik 320, Selecta, Barcelona, España) con agitación continua en el medio “HF” compuesto por:

Almidón soluble	1 g/L
Peptona	5 g/L
Extracto de carne	3 g/L
Extracto de levadura	3g/L
Potasio dihidrógeno fosfato	3 g/L
pH	7.0

Todos los cultivos bacterianos, fueron almacenados a -80°C en un ultracongelador (UltraLow MDFU3086, Sanyo Electric, Japón) en forma de glicerol stock (40% glicerol), excepto las placas de 96 pocillos que se guardaron en glicerol al 30%.

2. Reactivos y cepas

Los sustratos de tirosinasa/PPO (p-cresol, dopamina, *tert*-butilcatecol, 4-metilcatecol), los inhibidores (ácido cinámico, L-mimosina, tropolona, ácido ascórbico, metabisulfito); los sustratos de la fenol hidroxilasa (fenol, tirosol), inhibidores de proteasas, isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG), ampicilina, kanamicina, marcadores de peso molecular, albúmina de suero bovino y ácido gálico para la realización de rectas patrón, bromuro de etidio se compraron a Sigma (Sigma España, Madrid). Las sales y los tampones inorgánicos, así como el glicerol, Triton X-114 y PEG-8000 se adquirieron de Fluka (Sigma España, Madrid). Los reactivos para la electroforesis y determinación de proteínas fueron

obtenidos de Bio-Rad (Bio-Rad España, Valencia). Los disolventes orgánicos para el HPLC se compraron a Análisis Vinicos (Tomelloso, España). El agua usada se purificó a través de un sistema Milli-Q de Millipore (Madrid, España). Los medios de cultivo fueron adquiridos a Conda Laboratorios (Madrid, España).

Las enzimas de restricción, fosfatasa alcalina y T4 DNA ligasa se adquirieron de Fermentas (Need, Valencia, España). Las enzimas DNA polimerasa y los olidodesoxirribonucleótidos específicamente diseñados para fenol hidroxilasa de *G. thermoglucosidasius* se compraron a Roche (Roche España, Barcelona). Los vectores de clonación y de expresión fueron adquiridos de Stratagene (Cultek SL, Madrid, España) y Novagen (BioNova Científica S.L., Madrid, España), respectivamente. Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* usadas para clonar (DH5 α) y expresar (Rosetta) las enzimas recombinantes, fueron adquiridas de Invitrogen (Invitrogen S.A., Barcelona, España) y Novagen (BioNova Científica S.L., Madrid, España), respectivamente.

Los kits de Biología Molecular empleados para la extracción del genómico, la purificación de los fragmentos amplificados por PCR, extracción de geles de agarosa, minipreps, maxipreps, etc., fueron comprados a Qiagen (Izasa, Barcelona, España).

3. Herramientas bioinformáticas

Las secuencias de nucleótidos de los genes fueron obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La síntesis de los oligodesoxirribonucleótidos se realizó con la ayuda del programa Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). El estudio de la secuencia del gen, así como la realización de la carta de restricción, se llevó a cabo gracias a la página web de Infobiogen (<http://www.infobiogen.fr/>). El análisis de homología de las secuencias se realizó usando el programa ClustalW (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>).

Para la obtención de los parámetros cinéticos de las tirosinasas de *Streptomyces* y membrillo, así como las constantes de unión de las ciclodextrinas a los sustratos y a los inhibidores se utilizó el programa SigmaPlot para Windows (v 8.0, SPSS Inc., Chicago, EEUU).

4. Extracción y purificación de PPO de Membrillo

Los membrillos fueron lavados y pelados a mano. Una muestra de 100 gramos fue homogenizada en 100 mL de tampón fosfato sódico 100 mM pH 7.3 al 4% (p/v) de Triton X-114. El homogenizado se filtró a través de cuatro capas de gasa, y el filtrado fue sometido a una partición de fases inducida por temperatura. La mezcla se mantuvo a 4 °C durante 10 minutos, y posteriormente fue calentada hasta 37 °C durante 15 minutos. De este modo, la solución se volvió turbia de forma espontánea, debido a la formación, agregación y precipitación de gran cantidad de micelas del detergente que contenían las proteínas hidrofóbicas y los compuestos fenólicos. Esta solución turbia, se centrifugó a 10000g durante 15 minutos a 25 °C. Después de que el precipitado y la fracción rica en detergente fueran descartados, el sobrenadante pobre en detergente y de color oscuro (extracto enzimático crudo) se sometió a una nueva partición de fases inducida por la temperatura para eliminar los fenoles restantes. Para ello, se añadió de nuevo Triton X-114 hasta una concentración del 6% (p/v), y la mezcla se mantuvo en agitación a 37 °C durante 15 minutos. Tras la centrifugación de la muestra a 10000g durante 10 minutos a 25 °C, el sobrenadante con 6% (p/v) de Triton X-114, que aún permanecía oscuro y que contenía la PPO soluble de membrillo, fue sometido a un nuevo sistema de partición de fases basado en PEG-8000 (5% p/p) en tampón fosfato potásico pH 7.0. Después de que la solución fuera agitada durante 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó nuevamente a 10000g durante 10 min a 25 °C. La fase superior oscura rica en PEG-8000 fue descartada, y la fase clara rica en fosfato que contenía la polifenol oxidasa de membrillo fue sometida al 30% de saturación de sulfato amónico con agitación continua a 4 °C. Tras una hora, se centrifugó la solución a 60000g durante 30 minutos a 4 °C, y se descartó el precipitado. Al sobrenadante, se

le añadió sulfato amónico hasta el 75% de saturación, se agitó y centrifugó en las mismas condiciones que el paso anterior. El sobrenadante de esta última centrifugación se eliminó, y el precipitado se resuspendió en el mínimo volumen de agua posible.

5. Extracción y purificación de Tirosinasa de *S. antibioticus*

Streptomyces antibioticus se creció en 1 L de medio GYM dentro de matraces de 2.5 L (Tunair Flaks, Sigma) con agitación continua a 150 rpm durante 18 horas a 30 °C. Tras las 18 horas, el cultivo se centrifugó a 10000g. El medio que contenía la tirosinasa extracelular, se sometió a una partición de fases mediante un sistema acuoso basado en PEG-8000 (5% p/p) en tampón fosfato potásico pH 7.0. Después de que la solución se agitara 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 10000g durante 10 minutos a 25 °C. La fase oscura rica en PEG (20% del volumen total) se descartó y la fase clara rica en fosfato que contenía la tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* se llevó al 60% de saturación con sulfato amónico, bajo agitación continua a 4 °C. Tras una hora, la solución se centrifugó a 60000g durante 30 minutos a 4 °C. El precipitado que contenía la actividad tirosinasa fue recogido y disuelto en el mínimo volumen de agua posible.

6. Inmovilizaciones de PPO/Tirosinasa

6.1 Inmovilización binaria en esferas de alginato

La inmovilización binaria de la tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* y de la polifenol oxidasa de membrillo (*Cydonia oblonga*) en esferas de alginato se llevó a cabo según el siguiente procedimiento. La solución enzimática obtenida a partir de los precipitados de sulfato amónico resuspendido en el mínimo volumen de agua se añadió a una solución de alginato sódico (95 mL 1% p/v). Esta mezcla se trasvasó gota a gota a una solución de cloruro de calcio 0.27 M. Como resultado de este procedimiento, la enzima quedó atrapada en las esferas de Ca²⁺-alginato. Las

esferas con la enzima inmovilizada se lavaron dos veces con agua destilada y se guardaron en una solución 0.027 M de cloruro de calcio a 4 °C durante 24 horas. Después de este período, se produjo la modificación de la superficie de las esferas con epícloridrina. Esta modificación se realiza para que la enzima pueda unirse no sólo al interior de las esferas de alginato, sino también a su superficie y se llevó a cabo como se explica a continuación: 50 g de esferas de alginato se añaden a 50 mL de solución de epícloridrina, y se dejan agitando a temperatura ambiente durante 12 horas. Tras este período de tiempo, se descarta esta solución y las esferas se ponen en contacto con nueva solución enzimática en agitación continua durante otras 12 horas. Así, la enzima se une covalentemente a la superficie de las esferas.

6.2 Inmovilización binaria en hidrogeles

En este proceso, la enzima se inmoviliza en el interior de hidrogeles de poli(acrilamida-co-ácido acrílico), seguida de la inmovilización de más enzima a través de los grupos amino que son activados por la epícloridrina. En 20 mL de agua destilada se añaden 2.85 g de acrilamida, 2 mL de ácido acrílico, 0.15 g de bisacrilamida, 10 mg de persulfato amónico, la solución enzimática y el TEMED (1 mL). La mezcla se agita y se vierte a una placa Petri donde solidifica. Una vez solidificada, se corta en cubos de igual tamaño y se dejan en agua destilada a 4 °C durante 1 hora. Tras realizar dos lavados de los cubos de hidrogel, se realiza la modificación de la superficie de los cubos mediante epícloridrina como en la inmovilización de esferas de alginato.

6.3 Inmovilización en membrana hidrofílica

La inmovilización se realizó en una membrana de nitrocelulosa que se dejó una noche en agua destilada. Cada membrana se sumerge en 10 mL de la solución enzimática y se deja 1 hora a 4 °C. Seguidamente, se le añade solución de glutaraldehído hasta una concentración final del 1% y se mantiene 30 min para la

fijación de la enzima al soporte. Pasado este tiempo, las membranas se lavan con tampón fosfato 50 mM pH 7.0 y se guardan para su posterior utilización.

7. Obtención de Fenol Hidroxilasa recombinante

La extracción del DNA genómico para la amplificación del gen de la fenol hidroxilasa de *Geobacillus thermoglucosidasius* se realizó mediante el kit DNeasy de Qiagen (Izasa, Barcelona, España).

La enzima recombinante se obtuvo mediante amplificación de los genes por PCR (Minicycler MJ Research, EEUU) usando 2 parejas de primers diferentes. La primera pareja de primers se utilizó para clonar los genes con el promotor del sistema pET, inducible por isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG):

OL96 (CGGATCCATGAAAGATATGATGAATGGC).

OL97 (CCTTAAGTTAGCTCGACGTCTCCACTTT).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

- 1) 95 °C 2 min
- 2) 95 °C 30 seg
- 3) 52 °C 30 seg
- 4) 72 °C 2 min 20 seg
- 5) Repetición de los pasos 2-4 (5 veces más).
- 6) 95 °C 30 seg
- 7) 55 °C 30 seg
- 8) 72 °C 2 min 20 seg
- 9) Repetición de los pasos 6-8 (2 veces más).
- 10) 95 °C 30 seg
- 11) 58 °C 30 seg
- 12) 72 °C 2 min 20 seg
- 13) Repetición de los pasos 10-12 (2 veces más).
- 14) 95 °C 30 seg

- 15) 61 °C 30 seg
- 16) 72 °C 2 min 30 seg
- 17) Repetición de los pasos 14-16 (17 veces más).
- 18) 72 °C 10 min.

Con la segunda pareja de primers se obtuvo un fragmento mayor, que además de los genes anteriores, tenía 340 pb adicionales aguas arriba del gen *pheA1*, que corresponden al promotor propio del gen de fenol hidroxilasa:

OL126 (CCGGATCCCTGCGCGGGGCGGATGTGATT).

OL127 (CCGGATCCTTAGCTCGACGTCTCCACTTTTTTCG).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

- 1) 95 °C 2 min
- 2) 95 °C 30 seg
- 3) 57 °C 30 seg
- 4) 72 °C 2 min 40 seg
- 5) Repetición de los pasos 2-4 (5 veces más).
- 6) 95 °C 30 seg
- 7) 60 °C 30 seg
- 8) 72 °C 2 min 40 seg
- 9) Repetición de los pasos 6-8 (2 veces más).
- 10) 95 °C 30 seg
- 11) 63 °C 30 seg
- 12) 72 °C 2 min 50 seg
- 13) Repetición de los pasos 10-12 (2 veces más).
- 14) 95 °C 30 seg
- 15) 66 °C 30 seg
- 16) 72 °C 2 min 30 seg
- 17) Repetición de los pasos 14-16 (2 veces más).

- 18) 95 °C 30 seg
- 19) 69 °C 30 seg
- 20) 72 °C 3 min
- 21) Repetición de los pasos 18-20 (14 veces más).
- 22) 72 °C 10 min.

Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector de clonación pBSK⁺ y los plásmidos resultantes se usaron para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Mediante el uso de kits comerciales se obtuvo suficiente DNA plasmídico para realizar análisis de restricción enzimática y secuenciar el gen en un equipo ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, EEUU).

Este gen se subclonó en el vector pET28a⁺. La clonación se realizó con el promotor del sistema pET, y con el promotor propio del gen fenol hidroxilasa de *G. thermoglucosidasius*, para evitar el uso de IPTG, que es tóxico para la célula y muy caro para su uso comercial. Estos constructos se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* Rosetta. Las células transformadas se sembraron en placas con medio Luria-Bertani (LB) agar con kanamicina (50 μ g/mL). El medio LB tiene la siguiente composición:

Cloruro sódico	10 g/L
Triptona (digerido pancreático de caseína)	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
pH	7.0

Los clones positivos se picaron y transfirieron a placas de 96 pocillos para llevar a cabo los experimentos de crecimiento a 37 °C durante 12 horas en 200 μ L de caldo LB con kanamicina (50 μ g/mL), rellenas con un dispensador de placas (μ Fill, Biotek, EEUU). La placa madre de cada experimento se replicó mediante un replicador de placas de 96 pocillos (V & P Scientific, EEUU) y se realizó un glicerol stock (30%) que se guardó a -80 °C. La placa réplica se dejó incubando

toda la noche a 37 °C y los clones se indujeron con IPTG 1 mM durante toda la noche a 30 °C, para la sobreproducción intracelular de la enzima recombinante.

Las células de *E. coli* Rosetta inducidas, se recolectaron por centrifugación a 1700g durante 20 minutos en una centrífuga de microplacas Sigma 2-16 K (Sigma, Alemania) y se resuspendieron en medio LB kanamicina nuevo con 5 mM de monofenol. Tras nueve horas, las células transformadas se volvieron a centrifugar a 1700g durante 20 minutos, y los sobrenadantes de cada pocillo (conteniendo los difenoles) se transfirieron a una nueva microplaca con una pipeta multicanal para la medida de actividad.

Los mejores clones obtenidos (los que presentaron una mayor actividad) se seleccionaron y subcultivaron de la placa madre a matraces de 250 mL, para llevar a cabo los experimentos de crecimiento a 37 °C en 50 mL de caldo LB con kanamicina. Tras el crecimiento de los microorganismos, se indujeron con IPTG 1 mM toda la noche a 30 °C, para la sobreproducción de enzima recombinante.

La producción de fenol hidroxilasa de *G. thermoglucosidasius* a mayor escala se realizó en matraces de 2.5 L (Tunair Flaks, Sigma). El crecimiento, a partir de la placa madre, y tras varios subcultivos, se llevó a cabo durante 12 horas a 37 °C en 1 L de medio Terrific Broth (TB) con kanamicina (50 µg/mL), con una agitación de 150 rpm en un agitador orbital (Certomat, MO Braun Biotech, Alemania). La composición de este último medio es:

Extracto de levadura	24 g/L
Triptona	12 g/L
Fosfato dipotásico	12.5 g/L
Fosfato monopotásico	2.3 g/L
Glicerol	4 mL/L

La inducción de fenol hidroxilasa se realizó con 1 mM de IPTG a 30 °C durante toda la noche. Las células se recolectaron por centrifugación a 6000g durante 20 minutos (Optima LE-80k Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Fullerton, EEUU) y el pellet celular se lavó dos veces en tampón fosfato 50 mM pH 6.4. Tras

este lavado, las células se resuspendieron en el mismo tampón con inhibidor de proteasas libre de EDTA (Roche España, Barcelona) para evitar la degradación de la enzima. Las células se rompieron con perlas de vidrio, usando un disruptor celular tipo BeadBeater, (Hamilton, Washington, EEUU). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 10000g durante 20 minutos y el sobrenadante se sometió a ultrafiltración tangencial.

El método de ultrafiltración tangencial ha sido utilizado en la purificación de los extractos enzimáticos para eliminar las moléculas de bajo peso, siendo además útil para reducir el volumen de muestra. En un equipo QuixStand Benchtop System (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) usando una membrana de separación con un límite de 100 kDa (UFP-100-C-4MA, GE Healthcare, Uppsala, Suecia), se han concentrado los extractos obtenidos del crecimiento en los matraces de 2.5 litros hasta reducirlos a un cuarto de su volumen inicial (250 mL, aproximadamente).

Estos extractos concentrados, al ser *G. thermoglucosidasius* una bacteria termofílica, se purificaron por termoprecipitación. Esta precipitación se realizó para eliminar las proteínas procedentes de *E. coli* en las muestras que iban a ser cargadas posteriormente en los geles de electroforesis, así, los extractos libres de células se calentaron en un bloque térmico a 65 °C (Selecta, Barcelona, España) durante 30 minutos y se centrifugaron a 10000g durante 20 minutos a 20 °C (Optima LE-80k Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Fullerton, EEUU).

8. Ensayos Enzimáticos

8.1 Medida de Tirosinasa/PPO

Las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa de membrillo y de *S. antibioticus* fueron determinadas espectrofotométricamente a 400 nm para los substratos *p*-cresol y el 4-metilcatecol, respectivamente. La conversión del *p*-cresol en su quinona (4-metil-*o*-benzoquinona, $\epsilon_{400} = 1433 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), que produce color amarillo a 400 nm es una combinación de ambas actividades (monofenolasa y

difenolasa) y fue seguido a 25 °C usando un espectrofotómetro Uvikon 940 (Kontron Instruments, Zurich, Suiza) conectado a un baño termostático (**Figura 2.1**).

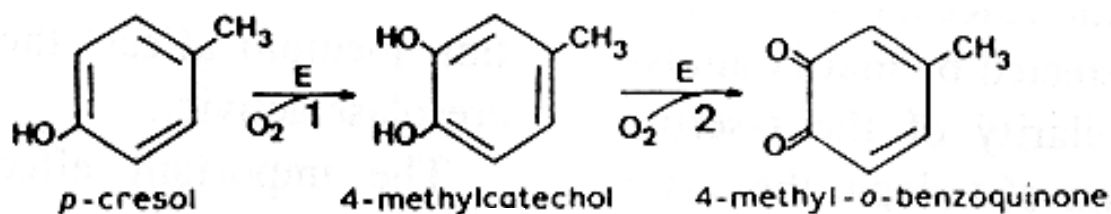


Figura III.1 Conversión de *p*-cresol en 4-metil-*o*-benzoquinona. 1, actividad cresolasa; 2, actividad catecolasa.

El estado estacionario en la actividad monofenolasa se calculó a partir de la porción lineal de la curva de acumulación del producto después del período de retardo. La reacción estandar para la actividad monofenolasa de la tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* incluía, en un volumen total de 1 mL, 36 µg/mL de tirosinasa soluble y 2.5 mM de *p*-cresol en tampón fosfato sódico 50 mM pH 6.5.

La actividad difenolasa no presenta este período de retardo característico de la actividad cresolasa. El medio de reacción estandar contenía, en un volumen de 1 mL, 4 µg/mL de tirosinasa, 10 mM de 4-metilcatecol en tampón fosfato sódico 50 mM pH 6.5. Una unidad enzimática para ambas actividades se considera como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de 4-metil-*o*-benzoquinona/minuto.

La oxidación del *tert*-butilcatecol y la dopamina se realizó a sus respectivos máximos de absorbancia que son, 400 nm para el *tert*-butil-*o*-quinona ($\epsilon_{400} = 1150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y 475 nm para el dopaminocromo ($\epsilon_{475} = 3300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El medio de reacción estandar a 25 °C contenía, en un volumen total de 1 mL, 4 µg/mL de tirosinasa, 2.5 mM de TBC o dopamina en tampón fosfato sódico pH 6.5. Una unidad de enzima para ambas actividades se define como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de *tert*-butil-*o*-quinona/minuto o 1 µmol de dopaminocromo/minuto, respectivamente.

El análisis de los datos cinéticos se llevó a cabo mediante regresión no lineal, usando el programa SigmaPlot para Windows (v 8.0, SPSS Inc., Chicago, EEUU).

8.2 *Medida de Fenol Hidroxilasa*

8.2.1 *Método de Screening*

La actividad fenol hidroxilasa se determina usualmente mediante el consumo de fenol (Kirchner et al., 2003). Dicha reacción contiene, en 6 mL, 0.1 mM de fenol, 0.5 mM de NADH, 10 μ M de FAD, 1.0 nM de PheA2, y 200 nM de PheA1 en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.0. Cada minuto se recoge una muestra de 1 mL, y tras 10 minutos, la reacción se detiene mediante la adición de 12 μ L de 2% de 4-aminoantipirina, 40 μ L de hidróxido amónico 2N, y 40 μ L de potasio ferrocianuro al 2%, ajustando cada volumen a 2 mL. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 510 nm y se compara con el estándar de fenol.

Este método de medida descrito en la bibliografía es complejo y tedioso de realizar cuando se tienen gran cantidad de muestras que procesar, por eso, en esta tesis se diseñó un nuevo método colorimétrico basado en la adición de periodato sódico que oxida al difenol generado por la enzima a la correspondiente quinona de color amarillo (Figura 2.2). Este sencillo método permite la rápida búsqueda y selección de clones que sobreexpresan fenol hidroxilasa en placas de 96 pocillos. Para ello, las células de *E. coli* Rosetta inducidas con IPTG y conteniendo 5 mM de monofenol se recolectaron por centrifugación a 1700g durante 20 minutos en una centrífuga de microplacas. El sobrenadante de cada pocillo, que contiene el *o*-difenol producido por las células, se transfirió a una nueva microplaca. A este sobrenadante, se le añade el periodato sódico que oxida al *o*-difenol generado por la enzima intracelular, dando lugar a un color amarillo en los clones positivos. El medio de reacción contenía 180 μ L de sobrenadante de medio de cultivo con 20 μ L de periodato sódico 100 mM. Las actividades se midieron a 400 nm en un lector de microplacas Synergy HT (Biotek, USA) en modo cinético a 37 °C.

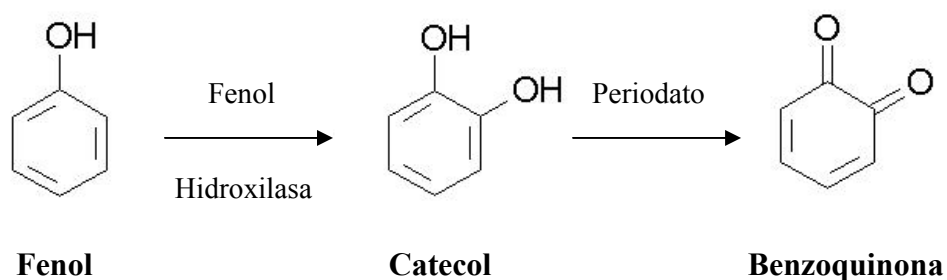


Figura III.2 Reacción para la detección de fenol hidroxilasa en placas de 96 pocillos usando el método del periodato sódico descrito en esta tesis.

8.2.2 Método basado en HPLC

El análisis de los compuestos difenólicos generados por fenol hidroxilasa se realizó mediante HPLC, aplicando cromatografía en fase reversa, en un equipo Agilent ChemStation 1100 Series (Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemania), usando una columna Kromasil C-8 (150 x 4.6 mm) con partículas de 5 μm de tamaño, suministrada por Análisis Vinicos (Tomelloso, España). La elución de los compuestos se realizó mediante la aplicación de un flujo constante de 1 mL/minuto de dos disolventes a 30 °C. Uno de los disolventes (60%) era sulfato de tetrabutilamonio en tampón dihidrógeno fosfato potásico ajustado a pH 6.5 con amoníaco 3 M, y el otro era metanol puro (40%) (grado HPLC de Análisis Vinicos, Tomelloso, Madrid).

El HPLC permitió seguir las biotransformaciones de fenol a catecol y de tirosol a hidroxitirosol a 280 nm de las colonias que habían mostrado mayor actividad en la medida a punto final utilizando el periodato sódico en las placas de 96 pocillos. Las células inducidas según el apartado 3.6 se recolectaron por centrifugación a 4000g durante 20 minutos. El pellet celular se lavó dos veces con tampón fosfato 50 mM pH 7.0 y se cultivó en 50 mL de medio LB kanamicina fresco con 5 mM de fenol o tirosol y 10 mM de ácido ascórbico, para evitar la oxidación del difenol a *o*-quinona. Cada hora se tomaba una fracción del cultivo (120 μL), se centrifugaba en una microcentrífuga de mesa (Micro Centaur; MSE-

Sanyo, Reino Unido) y el sobrenadante se analizaba mediante HPLC (Agilent ChemStation, 1100 Series, HP, Waldbronn, Alemania) a 280 nm, con la fase móvil descrita anteriormente. Para esta medida se cogían 100 μL de medio extracelular y se mezclaban con 900 μL de fase móvil. El volumen de inyección en el HPLC cada una de las muestras fue de 20 μL .

Los tiempos de retención obtenidos para el fenol, catecol, tirosol e hidroxitirosol fueron de 10.7 min, 5.7 min, 4.3 min y 3.0 min, respectivamente.

9. Determinación de Proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad España, Valencia) basado en el método de Bradford (1976). Para la elaboración de rectas de calibrado se utilizó albúmina de suero bovino Protein Standard, 200 mg BSA/ml (Sigma España, Madrid).

10. Determinación de fenoles

La cantidad total de compuestos fenólicos presentes en las muestras de membrillo fueron determinados en 80% de fenol con el reactivo de Folin-Denis (Sigma, España, Madrid) utilizando el siguiente protocolo:

En un volumen total de 25 mL, se añadió, 3.75 mL de carbonato sódico al 20% (p/v), 1.25 mL del reactivo de Folin y 250 μL de la muestra a determinar. Se dejó incubando 2 horas a temperatura ambiente y después se hizo una medida de absorbancia a 765 nm. Del mismo modo, se preparó un blanco en el que se sustituyó la muestra por 250 μL por etanol al 80%. Para la elaboración de la recta de calibrado se utilizó ácido gálico desde 5-50 mg/100mL.

11. Técnicas electroforéticas

Las electroforesis bajo condiciones desnaturizantes se hicieron siguiendo el método de Laemmli (1970). El gel separador utilizado tenía un espesor de 1.5 mm y estaba constituido por acrilamida al 10% (p/v) [10% T (monómero total), 0.89% C (bisacrilamida)] en tampón Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8 conteniendo SDS 0.1% (p/v), persulfato amónico 0.05% (p/v) y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) 0.07% (v/v), éste último para iniciar la reacción de polimerización. Las muestras fueron aplicadas a un gel concentrador que estaba formado por acrilamida al 4% (p/v) (4%T, 0.36% C) en tampón Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8, conteniendo SDS al 0.1% (p/v), persulfato amónico 0.05% (p/v) y TEMED 0.07% (v/v).

Las muestras (15 μ L) se mezclaron con tampón de carga 4x (5 μ L) desnaturizante, compuesto por glicerol 15% (v/v), SDS 3% (p/v), azul de bromofenol 0.015% y β -mercaptoetanol 7.5% (v/v) en tampón Tris-HCl 94 mM, pH 6.8. Las muestras se calentaron 5 minutos a 100°C, antes de ser cargadas en el gel concentrador.

El tampón de recorrido estaba formado por Tris 25 mM, glicina 0.192 M (pH 8.3) y SDS 0.1% (p/v). Las muestras fueron corridas en un equipo Mini Protean II de Bio-Rad (Hercules, EEUU) a una diferencia de potencial de 200 V durante 40 minutos usando una fuente de electroforesis Power Pac 300 de Bio-Rad (Hercules, EEUU).

11.1 Tinción de geles de Proteínas por Azul de Coomassie

Después de la electroforesis, los geles fueron introducidos en solución de tinción de Coomassie durante 1 hora, en agitación y a temperatura ambiente. La disolución estaba constituida por 0.1 (p/v) de azul brillante de Coomassie R-250 (Sigma, St. Louis, EEUU), 40% de metanol y 10% de ácido acético. Tras la tinción, los geles fueron desteñidos en solución de desteñido formada por 30% de metanol 10% de ácido acético, revelando las bandas de proteína.

11.2 Análisis de Imagen

La cuantificación del porcentaje de proteína recombinante expresada frente a la cantidad total de proteínas se determinó mediante el análisis de la imagen obtenida de los geles de electroforesis en el equipo Image Quant TL (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Con este mismo análisis de imagen se pudo determinar el peso molecular de la proteína.

CAPÍTULO IV

“A kinetic study of p-cresol oxidation by quince fruit polyphenol oxidase”

A Kinetic Study of *p*-Cresol Oxidation by Quince Fruit Polyphenol Oxidase

ESTEBAN ORENES-PIÑERO, FRANCISCO GARCÍA-CARMONA, AND
ALVARO SÁNCHEZ-FERRER*

Department of Biochemistry and Molecular Biology-A, Faculty of Biology, University of Murcia,
Campus Espinardo, E-30071 MURCIA, Spain

The monophenolase activity of quince pulp polyphenol oxidase was characterized by extracting samples using a combination of a two-phase partition step in Triton X-114, followed by a PEG 8000/phosphate partition step, and a final ammonium sulfate fractionation between 30 and 75%. The purification method avoids the loss of cresolase activity described in another quince pulp polyphenol oxidase. The activity was characterized by a lag period, whose duration depended on the substrate concentration, the pH, and the presence of catalytic amounts of *o*-diphenol. By increasing the concentration of *o*-diphenols, it was possible to evaluate the enzyme activation constant, K_{act} , which showed a value of 4.5 μ M for 4-methylcatechol. A general kinetic mechanism for this enzyme is used to explain the loss of activity that normally occurs during quince pulp polyphenol oxidase purification.

KEYWORDS: Quince; polyphenol oxidase; monophenolase; lag period

INTRODUCTION

In common with many fruits and vegetables, quince fruit contains polyphenol oxidase (PPO; EC 1.14.18.1, monophenol dihydroxy-*L*-phenylalanine:oxygen oxidoreductase), which catalyzes two different reactions, each using molecular oxygen: the hydroxylation of monophenols to *o*-diphenols (monophenolase activity) and the oxidation of the *o*-diphenols to *o*-quinones (diphenolase activity) (for a review, see ref 1). The quinones thus formed are highly reactive substances, which normally react further with other quinones, amino acids, or proteins to produce the colored compounds that are responsible for losses in nutrient qualities (2). This is also a severe problem in the isolation of plant enzymes. The successful prevention of these reactions in the pulp, where most of the PPO occurs (3), involves a detailed study of the enzyme's biochemical properties before a technological process can be developed (4).

PPO was seen to be the enzyme responsible for the browning of quince fruit, in which it acted by oxidizing the naturally occurring phenolic substances, as described by Yagar and Sagiroglu (5), although no activity was detected toward monophenols. The lability of monophenolase activity during the purification of several plant and fruit PPOs is well-known (3, 6), resulting from the changes in the structure of the protein during purification (7) due to covalent binding with polyphenol pigments. The use of drastic methods (acetone powders) or ammonium sulfate fractionation which harms the enzyme has

been associated with this loss in monophenolase activity, whereas gentle methods based on nonionic detergents preserve it (1).

The present paper shows that the joint use of Triton X-114 and PEG 8000/phosphate preserves the monophenolase activity of quince fruit pulp PPO, permitting it to be kinetically characterized for the first time.

MATERIALS AND METHODS

Quince fruits (*Cydonia oblonga* var. Gigante de Vranja) grown in Don Benito (SOLVEFRUIT S. L., Badajoz, Spain) were obtained from a local supermarket. Biochemicals were purchased from Fluka (Madrid, Spain) and used without further purification.

Enzyme Purification. Latent quince fruit PPO was extracted and partially purified in a sequential two-phase system based on Triton X-114 and PEG-8000/phosphate. A total of 100 g of fresh quinces was homogenized with 100 mL of 4% (w/v) Triton X-114 in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.3). The homogenate was subjected to phase partitioning at 37 °C for 15 min. The turbid solution obtained was centrifuged at 10000g for 15 min at 25 °C. The dark detergent-poor supernatant (crude enzyme extract) was subjected to additional phase partitioning to remove the remaining phenols. For this, new Triton X-114 was added to a final concentration of 6% (w/v), and the mixture was held at 37 °C for 15 min. After centrifugation of the sample at 25 °C at 10000g, the supernatant of 6% (w/v) Triton X-114, which contained the soluble quince PPO, was subjected to a partition system based on PEG-8000 (5% w/w)/potassium phosphate buffer (pH 7.0). After 15 min at room temperature, the sample was centrifuged at 10000g for 10 min at 25 °C. The bottom clear phosphate-rich phase containing the quince PPO was brought to 30–75% saturation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The final solution was centrifuged at 60000g for 30 min at 4 °C. The precipitate obtained with 75% ammonium sulfate was collected and dissolved in a minimum volume of water.

* To whom correspondence should be addressed: Prof. Alvaro Sánchez-Ferrer, Department of Biochemistry and Molecular Biology-A, Faculty of Biology, University of Murcia, Campus Espinardo, E-30071 MURCIA, Spain. Fax: +34968364770. E-mail: alvaro@um.es.

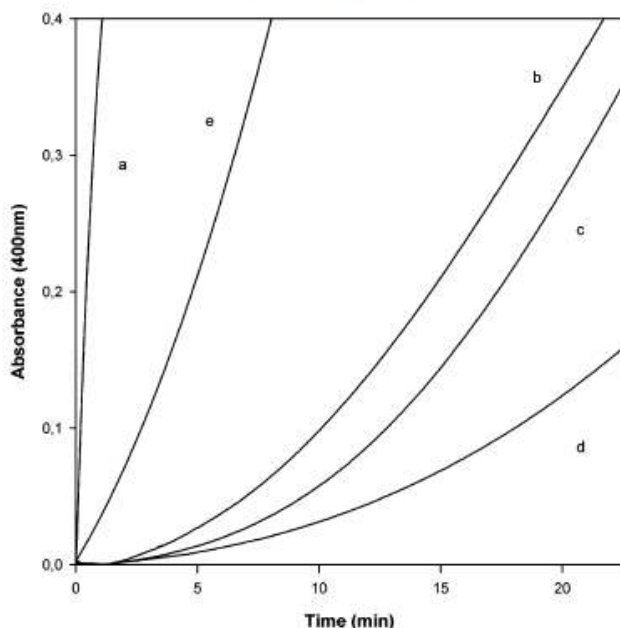


Figure 1. Enzymatic activities of soluble quince fruit pulp PPO. (a) Catecholase activity at 25 °C. The reaction medium included 0.5 µg/mL PPO and 2.5 mM 4-methylcatechol in 50 mM phosphate buffer pH 7.0. (b–e) Cresolase activity at 25 °C. The reaction medium contained (b) 16 µg/mL PPO and 2.5 mM *p*-cresol in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0. (c–d) The same reaction medium as (b) except for (c) different substrate concentration (5 mM *p*-cresol), (d) different pH (pH 5), and (e) the addition of *o*-diphenols to the reaction medium (4-methylcatechol 15 µM).

Enzyme Activity. Monophenolase and diphenolase activities were determined spectrophotometrically at 400 nm with *p*-cresol and 4-methylcatechol, respectively (2). The steady-state rate in monophenolase activity was calculated from the linear zone of the product accumulation curve after the lag period. The standard reaction mixture included, in a total volume of 1 mL, 16 µg/mL soluble quince PPO and 2.5 mM *p*-cresol in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme that produced 1 µmol of 4-methyl-*o*-quinone per minute ($\epsilon_{400} = 1433 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

RESULTS

The enzyme obtained from quince fruit pulp by using a combination of two different aqueous two-phase systems in Triton X-114 and PEG-8000/phosphate was a real polyphenol oxidase because it shows both diphenolase (Figure 1a) and monophenolase activities (Figure 1b–e). The latter is characterized by a lag period, defined as the intercept on the abscissa obtained by extrapolation of the linear part of the product accumulation curve. This lag period has been reported for other PPOs from various sources when monophenolase activity was measured (8–11). The lag period and the steady-state rate (defined as the slope of the linear part of the accumulation product curve) were affected by substrate concentration, the pH, and the presence of catalytic concentrations of *o*-diphenols (Figure 1b–e).

Effect of pH. Monophenolase activity toward *p*-cresol increased as the pH increased from pH 3.5, although no clearly defined maximum was reached (Figure 2). At pH values above 7.5, it was difficult to follow the formation of 4-methyl-*o*-benzoquinone spectrophotometrically because of its great instability.

The pH affected not only enzyme activity but also the lag period, and a decrease in the latter was observed when the pH

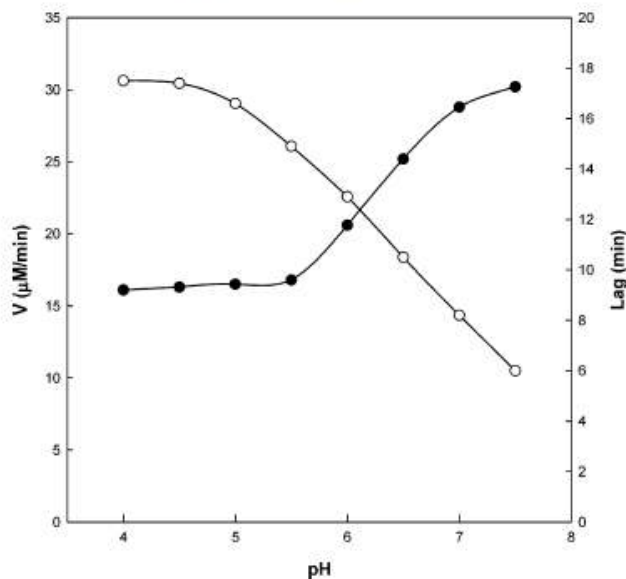


Figure 2. Effect of pH on cresolase activity (●) and on its lag period (○). The reaction medium at 25 °C included 16 µg/mL partially purified quince PPO and 2.5 mM *p*-cresol in 50 mM sodium acetate (pH 3.5–5.5), and sodium phosphate (pH 5.5–7.5).

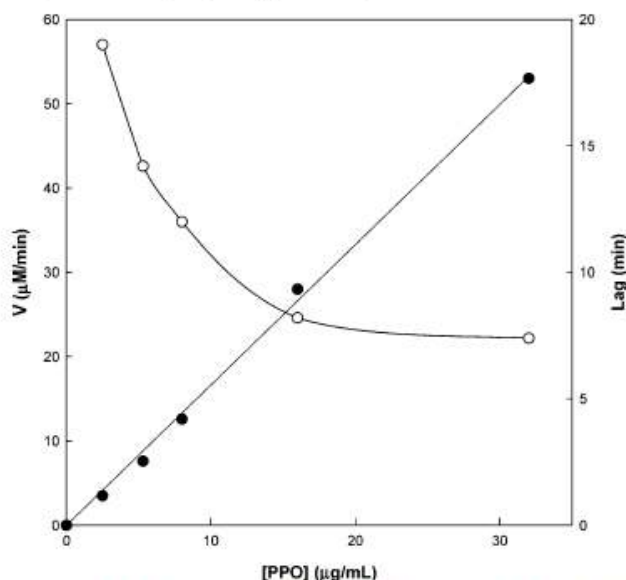


Figure 3. Effect of PPO concentrations on its cresolase activity (●) and on the lag period (○). The reaction medium at 25 °C included 2.5 mM *p*-cresol in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7 and different PPO concentrations (0–32 µg/mL).

was increased (Figure 2). These results are similar to those described for other plants PPO (9, 11, 12) but differ from the flat pH profile obtained for apple (13) and banana (14).

Effect of Enzyme Concentration. The monophenolase activity of latent PPO was affected by enzyme concentration in the reaction medium, its steady-state rate increasing linearly (Figure 3) and the lag period decreasing hyperbolically (Figure 3), a behavior that has been widely described in other PPOs (12, 15–17).

Effect of Substrate Concentration. An increase in *p*-cresol concentration from 0 to 7.5 mM (Figure 4) produced an increase in the lag period of quince PPO, similar to that described for other plant PPOs (9, 11). However, the explanation of the

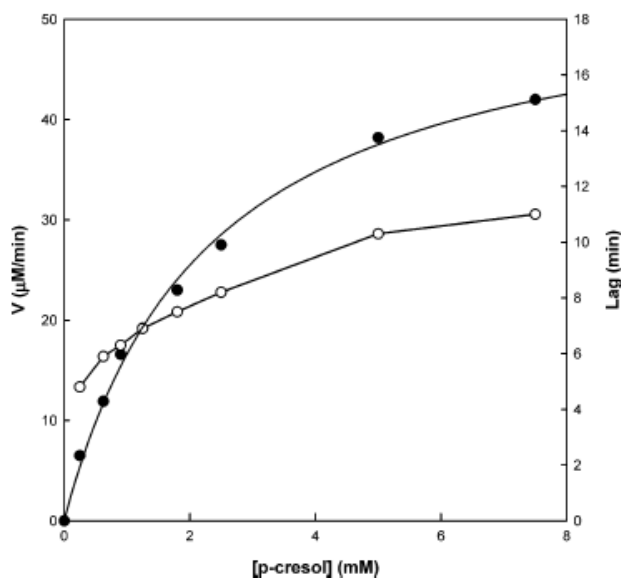


Figure 4. Effect of substrate concentration on cresolase activity of quince PPO (●) and on the lag period (○). The reaction medium at 25 °C included 16 μg/mL of partially purified PPO in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 with different *p*-cresol concentrations.

increase in the lag period profile is complex because the shape of the curve depends on the enzyme source used.

The kinetic constants, V_m and K_M , were evaluated from the data of Figure 4 by a nonlinear regression to the Michaelis–Menten equation using the data obtained at pH 7.0. The values obtained were 54.7 μM/min and 2.2 mM, respectively. This K_M value for *p*-cresol cannot be compared with the only work on quince fruit PPO (5) because no activity was detected toward *p*-cresol due to the drastic purification method used, but it is higher than that obtained with banana (14), potato (18), and peach (19). Moreover, this K_M value is higher than the one obtained in this enzyme for 4-methylcatechol (1.2 mM) (data not shown).

Effect of *o*-Diphenols. The effect of *o*-diphenols on the cresolase activity of partially purified quince fruit pulp PPO was studied according to the protocol of Pomerantz and Warner (20), assuming that the *o*-diphenol was bound to the “activation center” by a simple isotherm and that the lag period was proportional to the nonactive enzyme concentration at zero time, using the empirical formula (20):

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

where l , L , and K_{act} represent the lag period in the presence of *o*-diphenol, the lag period in the absence of *o*-diphenol, and the diphenol activation constant, respectively.

Figure 5 shows the decrease in the lag period as *o*-diphenol concentration was increased up to 30 μM, at which stage the lag was abolished. To check that the *o*-diphenol added was used as cosubstrate and not as substrate, the steady-state rate was plotted against *o*-diphenol concentration (Figure 6), and no changes were observed up to 30 μM. Above this concentration the rate increased proportionally, indicating that the *o*-diphenol was being used as a substrate for the catecholase activity.

The activation constant K_{act} was calculated from the reciprocal of the lag period in the presence of diphenol (Figure 5, inset). The value obtained was 4.5 μM, higher than the K_{act} found for

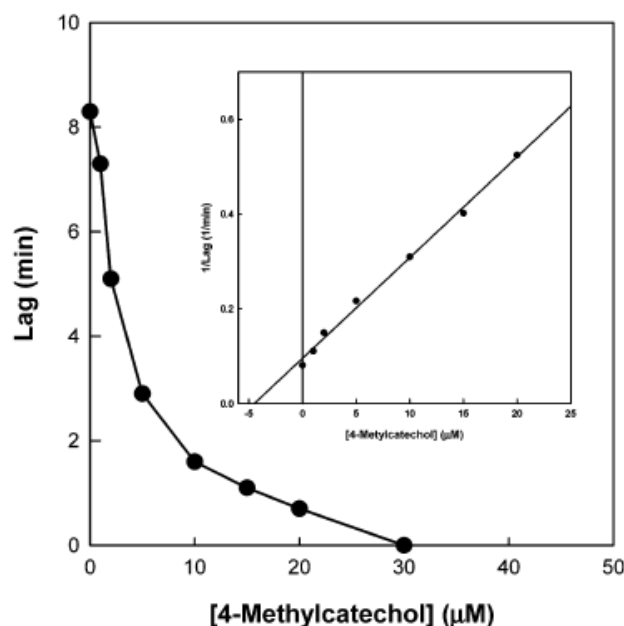


Figure 5. Influence of 4-methylcatechol on the shortening of lag period. In the standard reaction medium, the concentration of 4-methylcatechol ranged from 0 to 50 μM. (Inset) Evaluation of the activation constant, K_{act} , by the Pomerantz equation (22).

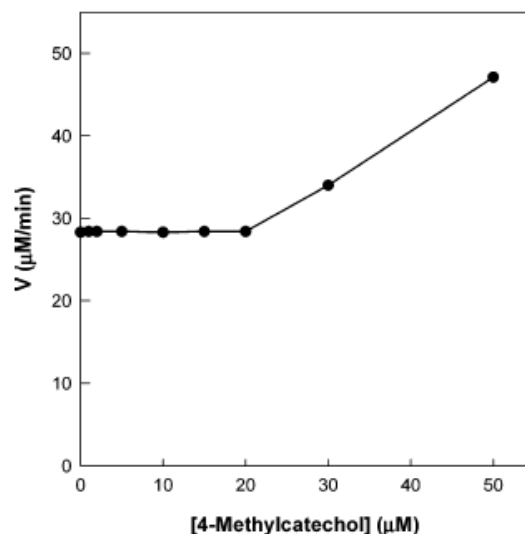
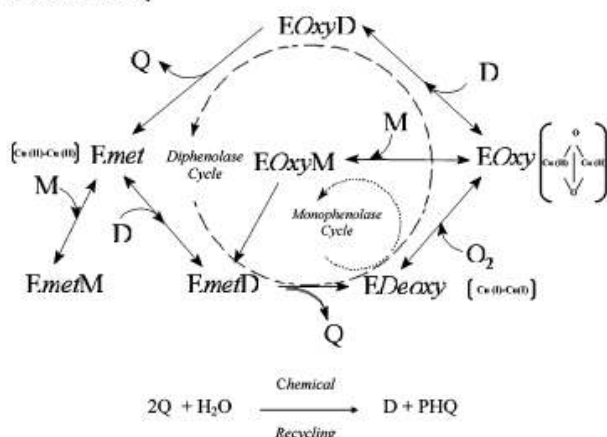


Figure 6. Effect of catalytic amounts of 4-methylcatechol on the steady state of cresolase activity. The conditions are the same as in Figure 5.

other plant PPOs (9, 21, 22) but the same value as that described in potato tuber (18).

DISCUSSION

To understand the results of this paper and how monophenolase activity works, it is necessary to describe the kinetic mechanism of the enzyme proposed by Cabanes et al. (12). This model takes into account the occurrence of three forms of the enzyme (E_{met} , E_{oxy} , and E_{deoxy}) and the chemical redox recycling of the *o*-quinones formed by the enzyme (Scheme 1). When a diphenol is present in the medium, this substrate binds to both to E_{oxy} and E_{met} to give $E_{oxy}D$ and $E_{met}D$ intermediates, which, in turn, give rise to two quinones. In our case, as a result of 4-methyl-*o*-benzoquinones instability, it undergoes water addition, generating the corresponding trihydroxy. The latter

Scheme 1. Enzymatic-Chemical-Chemical Mechanism Proposed for Cresolase Activity^a

^a M, *p*-cresol; D, 4-methylcatechol; Q, 4-methyl-*o*-benzoquinone; PHQ, 2-hydroxy-*p*-benzoquinone. E_{oxy} (oxotyrosinase consist of two tetragonal Cu (II) atoms); E_{met} (met-tyrosinase contains two tetragonal copper (II) ions antiferromagnetically coupled); E_{deoxy} (deoxytyrosinase has a bicuprous structure [Cu (I)-Cu (I)]).

compound gives rise to a redox reaction with another 4-methyl-*o*-benzoquinone, rendering the corresponding 2-hydroxy-*p*-benzoquinone and one *o*-diphenol (4-methylcatechol) (23). This cycle shows no lag period when 4-methyl-*o*-benzoquinone accumulation is followed (Figure 1a).

During the monophenolase cycle, the binding of monophenol to the E_{oxy} form renders E_{met}D, which gives a quinone. During binding of the monophenol to the E_{met}, a portion of the enzyme is scavenged from the catalytic turnover as a dead-end complex (E_{met}M). Exit from this nonactive E_{met}-monophenol form is possible only by upsetting the equilibrium with the *o*-diphenol obtained by recycling the quinones in the chemical reaction. The time needed to produce the catalytic level of diphenol for the steady-state rate to be maintained is the lag period shown by this activity (Figure 1b–e), which may last from minutes (Figure 1b) to hours, depending on a variety of factors:

(a) *pH*. The appearance and disappearance of the lag period in the monophenolase activity at different pH values may be due to a combination of both changes in the affinity of the E_{met} form for the monophenol and the speed of the recycling chemical reactions, which are faster at neutral pH values. This combination of factors normally gives different profiles, from bell-shaped to no clearly defined maximum (Figure 2).

(b) *Amount of E_{oxy} Form in the Enzymatic Extract*. This amount ranges from 2 to 30% depending on the source (8). Because the E_{oxy} present in the medium increased when the PPO concentration increased and because the steady state of *o*-diphenol activity was reached more quickly, the lag period diminished (Figure 3).

(c) *Monophenol Concentration*. Increasing amounts of monophenol in the reaction medium involves more enzyme in the dead-end complex, E_{met}T, and more time to reach the steady state (Figure 4). Note that it is critical to use a low level of monophenol when trying to detect monophenolase activity, because the lag period greatly increases when monophenol concentration is high (Figure 4).

(d) *Presence of *o*-Diphenols*. The addition of catalytic amounts of *o*-diphenol to the reaction medium diminished the lag period until it was abolished (Figure 5), indicating that the level of *o*-diphenol in the steady-state had been reached. If this

level is exceeded, the excess *o*-diphenol is used by the diphenolase catalytic cycle, and activity increases (Figure 6).

(e) *Purification Method Used*. Because both monophenolase and diphenolase cycles overlap, a true PPO must show both activities; the loss of monophenolase activity during purification reported in the bibliography must be due to a dramatic loss of enzymatic activity produced by acetone powder, reducing agents, or insoluble resins, which affect the monophenolase rather than the diphenolase activity (9). Thus, mild purification methods based on Triton X-114 (24, 25), or a combination of Triton X-114 and PEG-8000/phosphate as described in this paper seem to be suitable methods for obtaining a PPO showing both activities.

(f) *Chemical Characteristics of the Monophenol Used to Test Monophenolase Activity*. As described above, a crucial step in the catalytic cycle is the chemical recycling of quinones. Thus, if a monophenol, such as *p*-cresol, which quinone redox recycle, is used, monophenolase activity can be detected (Figure 1b–e). In contrast, if the monophenol gives a water-stable *o*-quinone, such as *tert*-butylphenol, no monophenolase activity can be detected unless H₂O₂ is used to obtain the E_{oxy} form during the reaction (23).

In conclusion, although the basis for determining monophenolase activity in plant PPO was described at the end of the 1980s in studies of the kinetic mechanism (12), and despite its experimental determination in plants (9) and the development of mild purification methods based on TX-114 (23, 24), only a few plant PPO monophenolase activities have been kinetically characterized. This paper describes how the use of an additional phase partitioning step in PEG 8000/phosphate might help in preserving quince monophenolase activity, because the only study on quince PPO (5) found no activity toward *p*-cresol.

ACKNOWLEDGMENT

E.O.P. is a holder of predoctoral research grant from Fundación Séneca Región de Murcia, Spain.

ABBREVIATIONS USED

PPO, polyphenol oxidase; PEG-8000, poly(ethylene glycol); TX-114, Triton X-114.

LITERATURE CITED

- (1) Sánchez-Ferrer, A.; Rodríguez-López, J. N.; García-Cánovas, F.; García-Carmona, F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1995, 1247, 1–11.
- (2) Sánchez-Ferrer, A.; Laveda, F.; García-Carmona, F. Partial purification of soluble potato polyphenol oxidase by partitioning in an aqueous two-phase system. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 1583–1586.
- (3) Mayer, A. M.; Harel, E. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry* 1979, 18, 193–215.
- (4) Cano, P.; Marin, M. A.; Fúster, C. Effects of some thermal treatments on polyphenol oxidase and peroxidase activity in banana (*Musa cavendishii*, var. Enana). *J. Sci. Food Agric.* 1990, 51, 223–231.
- (5) Yagar, H.; Sagiroglu, A. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *Turk. J. Chem.* 2002, 26, 97–103.
- (6) Matheis, G. Polyphenol oxidase and enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*) I. Properties of potato polyphenol oxidase. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 1987, 11, 5–12.
- (7) Walter, W. M.; Purcell, A. E. Effect of substrate levels and polyphenol oxidase activity on darkening in sweet potato cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 1980, 28, 941–944.

- (8) Lerch, K. In *Metal Ions in Biological System*; Siegel, H., Ed.; Dekker: New York, 1981.
- (9) Sánchez-Ferrer, A.; Bru, R.; Cabanes, J.; García-Carmona, F. Characterization of cresolase and catecholase activities of Monastrell grape polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 1988, 27, 319–321.
- (10) Nuñez-Delicado, E.; Bru, R.; Sánchez-Ferrer, A.; García-Carmona, F. Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase. *J. Chromatogr. B* 1996, 680, 105–112.
- (11) Nuñez-Delicado, E.; Sojo, M. M.; García-Carmona, F.; Sánchez-Ferrer, A. Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2058–2063.
- (12) Cabanes, J.; García-Cánovas, F.; Lozano, J. A.; García-Carmona, F. A kinetic study of the melanization pathway between L-tyrosine and dopachrome. *Biochim. Biophys. Acta* 1987, 923, 187–195.
- (13) Espín, J. C.; Morales, M.; Varón, R.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Anal. Biochem.* 1995, 231, 237–246.
- (14) Sojo, M. M.; Nuñez-Delicado, E.; García-Carmona, F.; Sánchez-Ferrer, A. Monophenolase activity of latent banana pulp polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 4931–4936.
- (15) Ros, J. R.; Rodríguez-López, J. N.; Varón, R.; García-Cánovas, F. Kinetic study of the oxidation of 4-*tert*-butylphenol by tyrosinase. *J. Biochem.* 1994, 222, 449–452.
- (16) Espín, J. C.; Morales, M.; Varón, R.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from *Verdoncella* apple. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 2807–2812.
- (17) Espín, J. C.; Morales, M.; Varón, R.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from *Haas* avocado. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 1091–1096.
- (18) Sánchez-Ferrer, A.; Laveda, F.; García-Carmona, F. Cresolase activity of potato tuber partially purified in a two-phase partition system. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 1225–1228.
- (19) Laveda, F.; Nuñez-Delicado, E.; García-Carmona, F.; Sánchez-Ferrer, A. Proteolytic activation of latent paraguay peach PPO. Characterization of monophenolase activity. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1003–1008.
- (20) Pomerantz, S. H.; Warner, M. C. 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine as tyrosinase cofactor. *J. Biol. Chem.* 1967, 242, 5308–5314.
- (21) Duckworth, H. W.; Coleman, J. E. Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 1970, 245, 1613–1625.
- (22) Lerch, K.; Ettlinger, L. Purification and characterization of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *Eur. J. Biochem.* 1972, 31, 427–437.
- (23) Jiménez, M.; García-Carmona, F. Hydrogen peroxide-dependent 4-*tert*-butylphenol hydroxylation by tyrosinase- a new catalytic activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1996, 1297, 33–39.
- (24) Sánchez-Ferrer, A.; Pérez-Gilbert, M.; Nuñez-Delicado, E.; Bru, R.; García-Carmona, F. Triton X-114 phase partitioning in plant protein purification. *J. Chromatogr.* 1994, 668, 75–83.
- (25) Sánchez-Ferrer, A.; Bru, R.; García-Carmona, F. Phase separation of biomolecules in polyoxyethylene glycol nonionic detergents. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1994, 29, 275–313.

Received for review February 19, 2004. Revised manuscript received August 28, 2004. Accepted November 4, 2004. This work was partially supported by MCYT (BMC2001-0499), MEC (BIO2004-00439), Fundación Séneca AR 13-02647/FS/02 and Fundación Séneca PI-29/00842/FS/01.

JF040080G

CAPÍTULO V

“Latent polyphenol oxidase from quince fruit pulp (*Cydonia oblonga*): Purification, activation and some properties”

Latent polyphenol oxidase from quince fruit pulp (*Cydonia oblonga*): purification, activation and some properties

Esteban Orenes-Piñero, Francisco García-Carmona and Alvaro Sánchez-Ferrer*

Department of Biochemistry and Molecular Biology-A, Faculty of Biology, University of Murcia, Campus Espinardo, E-30071 Murcia, Spain

Abstract: Quince fruit polyphenol oxidase (PPO) was partially purified using a combination of phase partitioning in Triton X-114 and PEG 8000/phosphate with a final ammonium sulfate fractionation between 30% and 75%, to avoid the deep browning of the enzyme due to the high amount of oxidizing substances present in the quince pulp. The clean and stable enzyme was partially purified in a latent form and could be optimally activated by the presence of 0.5 g dm^{-3} sodium dodecyl sulfate (SDS) with an optimum pH of 5.0. In the absence of SDS, the enzyme showed maximum activity at acid pH. The apparent kinetic parameters of the latent enzyme were determined at pH 5.0, the V_m value being 15 times higher in the presence of SDS than in its absence, whereas the K_M was the same in both cases, with a value of 1.2 mmol L^{-1} . The effect of several inhibitors was studied, tropolone being the most active with a K_i value of $4.7 \mu\text{mol L}^{-1}$. In addition, the effect of cyclodextrins was studied, and the complexation constant (K_c) between 4-*tert*-butylcatechol and cyclodextrins was calculated using an enzymatic method. The value obtained for K_c was $15\,310 \text{ mol L}^{-1}$.

© 2006 Society of Chemical Industry

Keywords: quince; polyphenol oxidase; PEG-8000; purification method; diphenolase activity; TBC; latent enzyme; SDS; tropolone; cyclodextrins

INTRODUCTION

Polyphenol oxidase (PPO; monophenol dihydroxyphenyl-alanine:oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1) is a bifunctional copper-containing enzyme that uses molecular oxygen to catalyse the *o*-hydroxylation of monophenols to *o*-diphenols (monophenolase or cresolase activity) and their subsequent oxidation to *o*-quinones (diphenolase or catecholase activity).^{1,2} The *o*-quinones thus generated polymerize to form coloured compounds, which are responsible for losses in nutrient quality.¹

PPO is an oxidase widely distributed in the plant kingdom and has been detected in most fruits and vegetables.¹ The presence of this enzyme has a large impact in the food industry because it is the main enzyme involved in the undesirable browning of fruits and vegetables during processing and storage. PPO has been partially purified from many fruits, including grape,³ apple,⁴ guava,⁵ peach,⁶ banana,⁷ pear,⁸ kiwi,⁹ strawberry,¹⁰ plum,¹¹ cherry¹² and pineapple.¹³ In the latter fruits, the level of PPO usually increases during maturation.¹

Quince is the fruit of a deciduous tree of the Rosaceae family, *Cydonia oblonga* Miller. When ripe, quince fruits impart an agreeable, long-lasting and powerful flavour. Because of its high level of phenolic compounds^{14,15} and its astringency, it is usually

consumed cooked or processed as jam or jelly in Mediterranean countries, before it becomes dark. The browning of this fruit is due to the presence of PPO in the pulp, which produces an instant browning of the homogenate, modifying the enzyme characteristics, as described in the only known study on quince fruit PPO,¹⁶ in which paper the enzyme was purified by ammonium sulfate fractionation, giving rise to a dark, non-latent enzyme.

The objective of this work is to develop a method to achieve a partially purified quince PPO in latent state without the characteristic browning of this enzyme and to kinetically characterize the diphenolase activity of quince PPO, including the effects of several inhibitors.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Ripe quince fruits (*Cydonia oblonga* var. Gigante de Vranja), grown in Don Benito (Solvefrut SL, Badajoz, Spain), were obtained from a local supermarket.

Reagents

Biochemicals, including Triton X-114, were purchased from Fluka (Madrid, Spain) and used without further purifications. Inhibitors (cinnamic acid, L-mimosine, tropolone, ascorbic acid, L-cysteine and

* Correspondence to: Alvaro Sánchez-Ferrer, Department of Biochemistry and Molecular Biology-A, Faculty of Biology, University of Murcia, Campus Espinardo, E-30071 Murcia, Spain

E-mail: alvaro@um.es

Contract/grant sponsor: MEC-FEDER; contract/grant number: BIO2004-00439

Contract/grant sponsor: Fundación Séneca; contract/grant number: 00608/PV04

(Received 9 August 2004; revised version received 27 September 2005; accepted 23 May 2006)

Published online 24 August 2006; DOI: 10.1002/jsfa.2593

© 2006 Society of Chemical Industry, *J Sci Food Agric* 0022-5142/2006/\$30.00

metabisulfite) were from Sigma (Madrid, Spain). 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrins (HP- β -CDs) were kindly supplied by Amaizo, American Maize Products Co., Hammond, IN, USA.

Enzyme purification

Fresh quince fruits were washed and hand-peeled. A 100 g sample was homogenized with 100 mL of 40 g dm⁻³ Triton X-114 in 100 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer (pH 7.3) for 1 min. The homogenate was filtered through glass wool and the filtrate was subjected to temperature-induced phase partitioning. The mixture was kept at 4 °C for 10 min and then warmed to 37 °C for 15 min. At this time, the solution became spontaneously turbid due to the formation, aggregation and precipitation of large mixed micelles of detergent, which contained hydrophobic proteins and phenolic compounds. This turbid solution was centrifuged at 10 000 \times *g* for 15 min at 25 °C. After the pellet and detergent-rich phase had been discarded, the dark detergent-poor supernatant (crude enzyme extract) was subjected to additional temperature-induced phase partitioning to remove the remaining phenols. For this, fresh Triton X-114 was added to obtain a final concentration of 60 g dm⁻³ and the mixture held at 37 °C for 15 min. After centrifugation at 25 °C at 10 000 \times *g*, the still dark detergent-poor supernatant of 60 g dm⁻³ Triton X-114, which contained the soluble quince PPO, was subjected to a different aqueous two-phase partition system based on PEG-8000 (50 g dm⁻³)/potassium phosphate buffer (pH 7.0). After the solution had been stirred for 15 min at room temperature, it was centrifuged at 10 000 \times *g* for 10 min at 25 °C. The upper dark PEG-rich phase was discarded, and the clear phosphate-rich phase containing the quince PPO was brought to 300 g dm⁻³ saturation with (NH₄)₂SO₄ under continuous stirring at 4 °C. After 1 h, the solution was centrifuged at 60 000 \times *g* for 30 min at 4 °C and the pellet was discarded. (NH₄)₂SO₄ was added to the clear supernatant to give 750 g dm⁻³ saturation and stirred for 1 h at 4 °C. Then, the solution was centrifuged again at 60 000 \times *g* for 30 min at 4 °C. The precipitate obtained with 750 g dm⁻³ ammonium sulfate was collected and dissolved in a minimum volume of water.

Enzyme activity

Diphenolase activity was determined spectrophotometrically with 4-*tert*-butylcatechol (TBC) at 400 nm.¹⁷ The conversion of TBC to its quinone (*tert*-butyl-*o*-quinone), which produces a yellow colour at 400 nm ($\epsilon_{400} = 1150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), was followed at 25 °C using an Uvikon 940 spectrophotometer (Kontron Instruments, Madrid, Spain).

The standard reaction medium at 25 °C contained 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of partially purified PPO, 10 mmol L⁻¹ sodium acetate buffer (pH 5), and 2.5 mmol L⁻¹ TBC in a final volume of 1 mL. One unit of enzyme was

defined as the amount of enzyme that produced 1 μmol of *tert*-butyl-*o*-quinone per minute.

In the SDS standard assays, samples contained the above mixture with 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of partially purified quince fruit PPO and 0.5 g dm⁻³ SDS detergent in a final volume of 1 mL. To determine the effect of the inhibitors, PPO activity was measured in the steady state in standard reaction media in the presence or absence of the stated concentration of inhibitors.

Monophenolase activity was determined spectrophotometrically at 400 nm with *p*-cresol. The steady-state rate was calculated from the linear zone of the product accumulation curve after the lag period. The conversion of *p*-cresol to its quinone was followed at 25 °C at 400 nm using an Uvikon 940 spectrophotometer (Kontron Instruments).

The standard reaction mixture included, in a total volume of 1 mL, 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ soluble quince PPO and 2.5 mmol L⁻¹ *p*-cresol in 50 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer pH 7. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme that produced 1 μmol of 4-methyl-*o*-quinone per minute ($\epsilon_{400} = 1433 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Determination of proteins and phenols

The protein content was determined according to Bradford's dye binding method, using bovine serum albumin (BSA) as a standard.¹⁸ Total phenolic compounds were determined in 800 mL dm⁻³ ethanol using the Folin-Denis method.¹⁹

RESULTS AND DISCUSSION

Enzyme purification

Latent quince pulp PPO was partially purified by using consecutive phase partitioning in Triton X-114 and PEG-8000/phosphate, with a final ammonium sulfate fractionation step due to the presence of large amounts of rapidly oxidized substances observed in the quince pulp extract after homogenization, which would turn the homogenate dark very quickly. To control the evolution of such oxidizing substances, it was necessary to include a substantial quantity of Triton X-114 (4% w/v) in the extraction buffer followed by a first phase partition, as is customary in plant PPO purification.^{3,20,21}

To take full advantage of Triton X-114 in the removal of phenols and hydrophobic proteins,¹⁷ another 6% (w/v) of Triton X-114 was added to the first supernatant at 4 °C and the solution phase-partitioned by increasing the temperature to 37 °C and holding for 15 min. This two-phase step involved a slight loss of PPO activity (27%) and a 37% reduction in the level of phenols (Table 1). However, despite this decrease in phenolic compounds, it was not enough to stop the browning of the enzyme solution. Because of this, it was necessary to introduce a different aqueous two-phase system containing PEG-8000/phosphate salt. After centrifugation, the upper PEG-rich phase containing the oxidized substances was discarded,

Table 1. Partial purification of quince PPO

	Vol. (mL)	Total protein (mg)	Total activity ^a (units)		Specific activity ^c (mg protein)	Purif. (fold)	Recovery ^c (%)	Activation	Phenolic compounds (mg mL ⁻¹)
			-SDS	+SDS ^b					
Crude extract	105	43.10	1069.1	5240.5	121.6	1.0	100.00	4.90	10.1
Supernatant 4% Triton X-114	77	8.50	714.7	3787.0	445.5	3.7	72.26	5.30	8.5
Salt phase	112	5.80	63.4	2953.1	509.2	4.2	56.35	46.60	5.1
30–75% (NH ₄) ₂ SO ₄	29	1.20	169.8	2374.0	1978.3	16.3	45.30	14.00	1.9

^a Assayed with TBC as substrate.

^b Assayed with 0.05 SDS.

^c Refers to SDS-activated form.

and the PPO remained in the clear phosphate-rich phase. This salt phase, when subjected to 30–75% ammonium sulfate fractionation, rendered an enzyme solution, with a 16-fold purification and 47% recovery (Table 1). The degree of purification was 3.8 times higher than that described when only ammonium sulfate fractionation was used to obtain quince PPO.¹⁶

This purified enzyme showed monophenolase activity with the characteristic lag period. Under the standard conditions (see Materials and Methods), the lag period was 8 min and the ready state rate was 27.4 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$.

In addition, the enzyme was present in a latent state even after the ammonium sulfate step, and could be activated 14-fold by SDS (Table 1), unlike spinach²² and broad bean²³ PPOs, both of which were activated by ammonium sulfate. It is important to underline the additional stabilizing effect of the phosphate-rich phase since the degree of activation of latent enzyme was 46-fold. This effect of phosphate ions has previously been described in banana PPO.²⁴ Moreover, the method reduced the phenol content to only 5% of the original. This removal of substances oxidized by PPO was sufficient to avoid any browning of the enzyme solution even after months of storage at -20°C .

Effect of SDS

Latent enzyme assayed towards *tert*-butylcatechol was activated by increasing SDS concentrations from 0.0 to 0.25% (Fig. 1), with a clearly defined maximum at 0.05%. This activation of the latent enzyme by SDS is a common feature of other latent PPOs,^{3,6,25} which has been attributed to conformational changes in the protein.²⁶

Effect of pH

Figure 2 shows the pH profile for the oxidation of TBC by partially purified PPO in the absence and presence of SDS. In the absence of SDS (Fig. 2, solid circles) the activity increased at acidic pH. This low pH optimum is a result of the PPO activity being induced by acid shock.^{3,27,28} However, the presence of SDS (Fig. 2, open circles) eliminated the acidic pH optimum and a new maximum appeared at pH 5.0, very similar to the pH 5.5 previously described for other PPOs in fruits and plants.^{19,29} Thus, activation

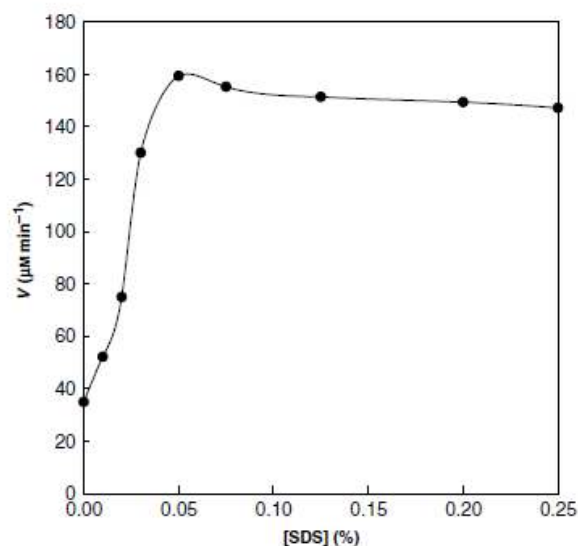


Figure 1. Effect of SDS concentration on quince fruit PPO activity. The reaction medium at 25 °C contained 10 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer, pH 7.0, 2.5 mmol L⁻¹ TBC, 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PPO, and increasing concentrations of SDS (0–0.25%).

with SDS depended on the surfactant concentration (Fig. 1) and pH (Fig. 2).²³

Effect of substrate concentration

The apparent kinetic parameters (V_{max} and K_{M}) were calculated by nonlinear regression to the Michaelis–Menten equation using the data obtained at pH 5.0 in the presence and absence of SDS. Figure 3 shows the variations in initial velocity versus substrate concentration in these conditions. The value obtained for each of the maximum velocities showed that the activation increased 15-fold with SDS ($V_{\text{m}} = 751 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1} \mu\text{g}$ of protein in the presence of SDS and $V_{\text{m}} = 49 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1} \mu\text{g}$ of protein in its absence) (Fig. 3). This increase in V_{max} without changes in the K_{M} (1.2 mmol L⁻¹) agrees with previously described behaviour with and without SDS in latent potato leaf PPO²⁹ ($K_{\text{M}} = 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$), latent broad bean PPO²³ ($K_{\text{M}} = 2.8 \text{ mmol L}^{-1}$) and latent persimmon fruit PPO³⁰ ($K_{\text{M}} = 0.68 \text{ mmol L}^{-1}$).

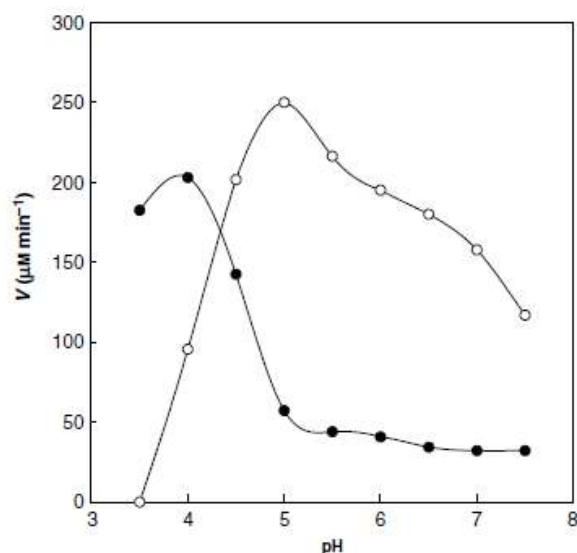


Figure 2. Effect of pH on quince fruit PPO activity in 10 mmol L^{-1} sodium acetate (pH 3.5–5.5) and 10 mmol L^{-1} sodium phosphate (pH 6.0–7.5) in the presence (○) or absence (●) of 0.05% SDS. The reaction medium at 25°C contained 2.5 mmol L^{-1} TBC and $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PPO.

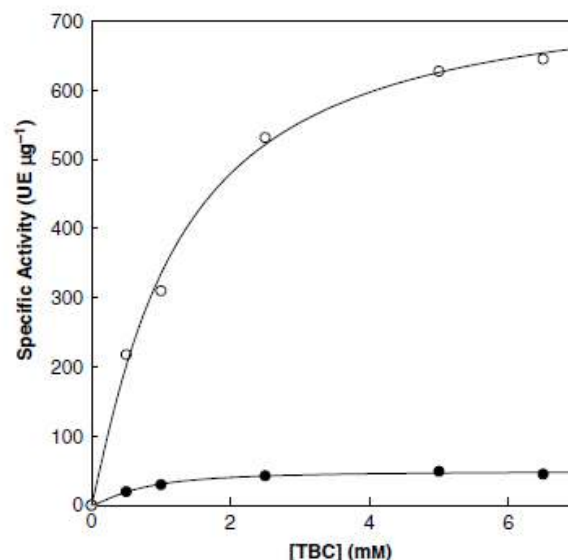


Figure 3. Effect of TBC concentration on quince fruit PPO activity. The reaction medium contained (●) $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ PPO or (○) $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PPO and 0.05% SDS, both containing TBC concentrations ranging from 0 to 6.5 mmol L^{-1} in sodium acetate buffer (pH 5.0).

Effects of inhibitors

To further characterize the partially purified enzyme, a detailed study of its inhibition was carried out. Table 2 shows the effect of various inhibitors on the diphenolase activity of latent quince fruit PPO in the presence and absence of 0.05% SDS, using TBC as substrate. All of the inhibitors, reducing agents and substrate analogues used in this study inhibited PPO activity, the extent of the inhibition being dependent on the concentration of the compound used and the presence or absence of SDS. Among the reducing agents (Table 2), L-cysteine and ascorbic acid appeared to be the most effective inhibitors both in the presence and absence of SDS (Table 2). The inhibition produced by thiol compounds may be due to an addition reaction taking place with the quinones to form stable colourless products³¹ and/or a binding to the active centre of the enzyme, as in the case of metabisulfite.³² Ascorbate acts as an antioxidant rather than as an enzyme inhibitor because it reduces the initial quinone formed by the enzyme to the original

diphenol before it undergoes the secondary reactions that lead to browning.³³ Ascorbic acid has also been reported to cause irreversible inhibition.³⁴

With regard to substrate analogues (Table 2), tropolone was the most effective inhibitor, because it completely inhibited the enzyme at 1 mmol L^{-1} in the presence and absence of SDS. On the other hand, inhibitions by L-mimosine and cinnamic acid (Table 2) were more effective in the presence of SDS. Because of this, the kinetic analysis of the inhibition was made with tropolone. The inhibition was determined by Lineweaver–Burk plots of $1/v$ versus $1/s$ (data not shown) at three inhibitor concentrations and confirmed by a Dixon plot of $1/v$ versus inhibitor concentration. Straight lines were obtained with (Fig. 4A) and without SDS (Fig. 4B). This inhibitor showed competitive inhibition, and the inhibition constant, K_i , which showed a value of $4.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ with or without SDS, was deduced from the interception points. This value is nearly 10

Table 2. Percentage inhibition of partially purified latent quince fruit PPO by reducing agents and substrate analogues

	–SDS				+SDS			
	$1 \mu\text{mol L}^{-1}$	$10 \mu\text{mol L}^{-1}$	$100 \mu\text{mol L}^{-1}$	1 mmol L^{-1}	$1 \mu\text{mol L}^{-1}$	$10 \mu\text{mol L}^{-1}$	$100 \mu\text{mol L}^{-1}$	1 mmol L^{-1}
Reducing agents								
Ascorbic acid	0	0	10	100	1	1	12	100
L-Cysteine	8	8	41	100	2	7	44	100
Metabisulfite	0	8	80	97	1	3	21	81
Substrate analogues								
Tropolone	6	55	87	100	30	78	96	100
L-Mimosine	0	0	0	1	0	3.5	3.5	19
Cinnamic acid	0	0	8	44	0	0	8	72

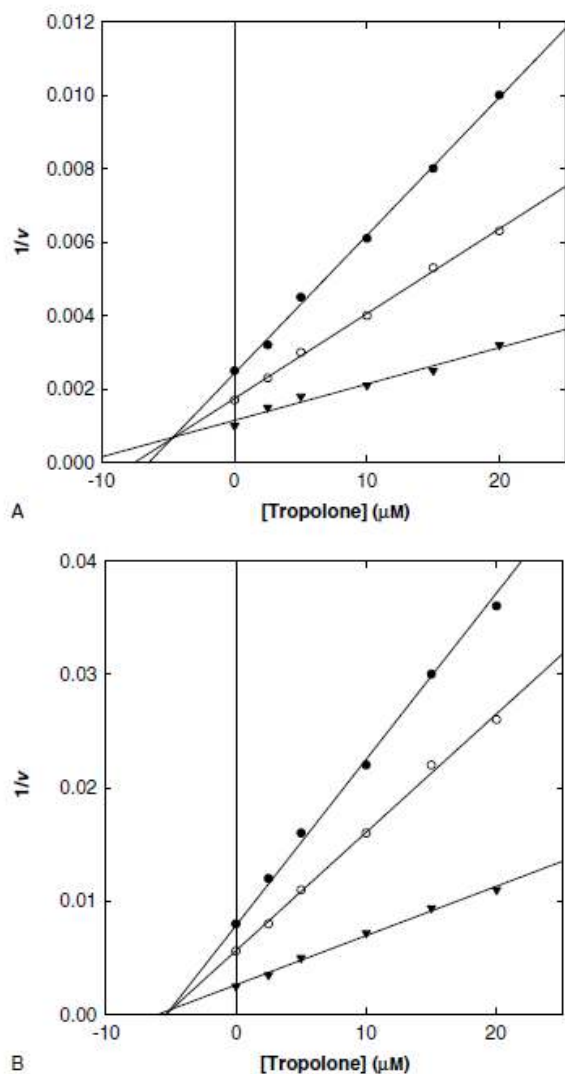


Figure 4. Dixon plot ($1/v$ versus I) for the competitive type of inhibition presented by tropolone. (A) The reaction medium contained $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ PPO, tropolone (0 – $20 \mu\text{mol L}^{-1}$), and three different concentrations of TBC ($0.625 \text{ mmol L}^{-1}$ (\blacktriangledown), 1 mmol L^{-1} (\circ) and 2.5 mmol L^{-1} (\bullet)); (B) The reaction medium contained $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PPO, 0.05% SDS, tropolone (0 – $20 \mu\text{mol L}^{-1}$) and the same TBC concentration as (A).

times higher than that observed for tropolone on latent persimmon PPO.³⁰

Effect of cyclodextrins

To complete our study of the inhibition of quince fruit PPO, the effect of substrate sequestrants such as cyclodextrins was studied. Cyclodextrins (CDs) are a group of naturally occurring cyclic oligosaccharides derived from starch with six, seven or eight glucose residues linked by (1 → 4) glycosidic bonds in a cylinder-shaped structure and denominated α -, β - and γ -cyclodextrins, respectively. The central cavity of these molecules is hydrophobic, whereas the rims of the surrounding walls are hydrophilic. This hydrophobic cavity forms inclusion complexes with a wide range of organic guest molecules, including

(poly)phenols.³⁵ Recently, it has been suggested that cyclodextrins may moderate the enzymatic browning of different fruits and vegetables,^{36–38} because they form inclusion complexes with the substrates of PPO, thereby preventing their oxidation to quinones and subsequent polymerization to brown pigments. This effect has also been observed during the oxidation of phenols by lipoxygenase,³⁹ in which CDs act as secondary antioxidants in synergism with ascorbic acid.

When cyclodextrin concentration was increased from 0.0 to 10.0 mmol L^{-1} , a clear decrease in quince fruit PPO was observed at three different TBC concentrations (Fig. 5). These data indicate that TBC was entering the hydrophobic cavity to form inclusion complexes, diminishing the free TBC concentration available for the enzyme.

Using the mathematical equation for the free substrate concentration in the presence of CDs:³⁹

$$[\text{TBC}]_f = \left(-([\text{CD}]_t K_c - [\text{TBC}]_t K_c + 1) + \sqrt{([\text{CD}]_t K_c - [\text{TBC}]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [\text{TBC}]_t} \right) / 2K_c \quad (1)$$

the complete Michaelis–Menten equation can be expressed as

$$v = \frac{V_m \left[\frac{(-([\text{CD}]_t K_c - [\text{TBC}]_t K_c + 1) + \sqrt{([\text{CD}]_t K_c - [\text{TBC}]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [\text{TBC}]_t})}{4K_c [\text{TBC}]_t} \right]}{K_M + \left[\frac{(-([\text{CD}]_t K_c - [\text{TBC}]_t K_c + 1) + \sqrt{([\text{CD}]_t K_c - [\text{TBC}]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [\text{TBC}]_t})}{4K_c [\text{TBC}]_t} \right]} \quad (2)$$

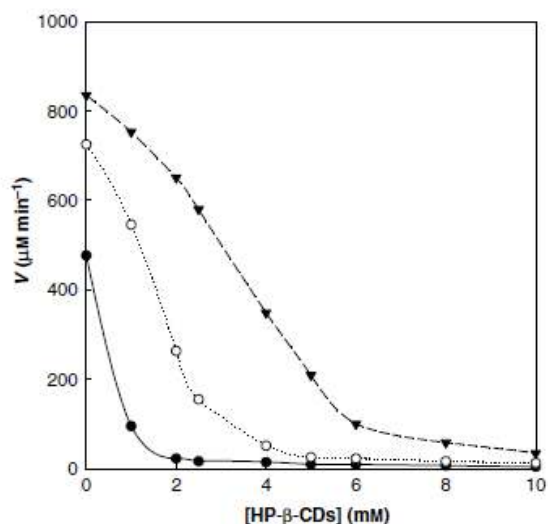


Figure 5. Effect of HP- β -CDs concentration on quince fruit. The reaction medium at 25°C contained 10 mmol L^{-1} sodium acetate buffer pH 5.0, $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ PPO, increasing concentrations of HP- β -CDs (0 – 10 mmol L^{-1}), and (\blacktriangledown) 5 mmol L^{-1} TBC, (\circ) 2.5 mmol L^{-1} TBC and (\bullet) 1 mmol L^{-1} TBC.

Equation (2) shows a nonlinear relationship between v and $[CD]_t$, as is depicted in Fig. 5. Fitting the data of this figure to Eqn (2) by nonlinear regression, a value of $15\ 310\ \text{mol}^{-1}\ \text{L}$ for the K_c between TBC and HP- β -CDs was obtained. This value is similar to that described for the oxidation of TBC by lipoxygenase in the presence of cyclodextrins.⁴⁰

CONCLUSION

This paper describes a simple purification method for obtaining latent quince fruit PPO without the usual browning that is observed when ammonium sulfate fractionation is used. This method also allows a higher degree of purification and renders a transparent colour and stable enzyme, which permits the kinetic characterization of a fruit that is of importance in Mediterranean countries. In addition, some inhibitors used in this study could be of commercial interest in the storage of fresh quince fruit and the production of quince jelly.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by MEC and FEDER (BIO2004-00439) and Fundación Séneca (00608/PI/04). EOP is a holder of predoctoral research grant from Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.

REFERENCES

- Mayer AM, Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 26:11–20 (1987).
- Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-López JN, García-Cánovas F and García-Carmona F, Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1247:1–11 (1995).
- Sánchez-Ferrer A, Bru R and García-Carmona F, Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenol oxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol* 91:1481–1487 (1989).
- Oktay M, Küfrevioğlu I, Kocacaliskan I and Sakiroglu H, Polyphenoloxidase from Amasya apple. *J Food Sci* 60:494–496 (1995).
- Augustin MA, Chazali HM and Hahim H, Polyphenol oxidase from guava (*Psidium guava* L.). *J Sci Food Agric* 36:1259–1265 (1985).
- Laveda F, Núñez-Delicado E, García-Carmona F and Sánchez-Ferrer A, Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *J Agric Food Chem* 379:1–6 (2000).
- Sojo MM, Núñez-Delicado E, García-Carmona F and Sánchez-Ferrer A, 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 (1998).
- Siddiq M, Cash JN, Sinha NK and Akhter P, Characterisation and inhibition of polyphenol oxidase from pears (*Pyrus communis* L. cv. Bosc and red). *J Food Biochem* 17:327–337 (1994).
- Park EY and Luch BS, Polyphenol oxidase of kiwifruit. *J Food Sci* 50:678–681 (1985).
- Ebeling PW and Montgomery MW, Strawberry polyphenol oxidase. Purification and characterization. *J Food Sci* 55:1315–1318 (1990).
- Siddiq M, Sinha NK and Cash JN, Characterization of polyphenol oxidase from Stanley plums. *J Food Sci* 57:1177–1181 (1992).
- Pifferi PG and Cultera R, Enzymatic degradation of anthocyanins: the role of sweet cherry polyphenol oxidase. *J Food Sci* 39:786–791 (1974).
- Das JR, Bhat SG and Gowda LR, Purification and characterization of polyphenol oxidase from the kew cultivar of Indian pineapple fruit. *J Agric Food Chem* 44:984–988 (1996).
- Silva BM, Andrade PB, Mendes GC, Valentao P, Seabra RM and Ferreira MA, Analysis of phenolic compounds in the evaluation of commercial quince jam authenticity. *J Agric Food Chem* 48:2853–2857 (2000).
- Silva BM, Andrade PB, Mendes GC, Seabra RM and Ferreira MA, Study of the organic acids composition of Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit and jam. *J Agric Food Chem* 50:2313–2317 (2002).
- Yagar H and Sagiroglu A, Partial purification and characterization of *Cydonia oblonga* polyphenol oxidase of quince. *Turk J Chem* 26:97–103 (2002).
- Sánchez-Ferrer A, Laveda F and García-Carmona F, Partial purification of soluble potato polyphenol oxidase by partitioning in an aqueous two-phase system. *J Agric Food Chem* 41:1583–1586 (1993).
- Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254 (1976).
- Kidron M, Harel M and Mayer AM, Catechol oxidase activity in grapes and wine. *Am J Enol Vitic* 219:30–35 (1978).
- Onsa GH, Saari NB, Selamat J and Bakar J, Latent polyphenol oxidases from sago log (*Metroxylon sagu*): partial purification, activation and some properties. *J Agric Food Chem* 48:5041–5045 (2000).
- Beena P and Gowda LR, Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*). *J Agric Food Chem* 48:3839–3846 (2000).
- Sánchez-Ferrer A, Villalba J and García-Carmona F, Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 28:1321–1325 (1989).
- Jiménez M and García-Carmona F, The effect of sodium dodecylsulphate on polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 42:1503–1509 (1996).
- Galeazzi MAM and Sgarbieri VC, Substrate specificity and inhibition of polyphenol oxidase from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii* L.). *J Agric Food Chem* 43:1826–1831 (1981).
- Chazarra S, Cabanes J, Escribano J and García-Carmona F, Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J Agric Food Chem* 44:984–988 (1996).
- Moore BM and Flurkey WH, Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. *J Biol Chem* 265:4982–4988 (1990).
- Kenten RH, Latent phenolase in extracts of broad bean (*Vicia faba* L.). 1. Activation by acid and alkali. *Biochem J* 67:300–307 (1957).
- Kenten RH, Latent phenolase in extracts of broad bean (*Vicia faba* L.) leaves. 2. Activation by anionic wetting agents. *Biochem J* 68:244–251 (1958).
- Sánchez-Ferrer A, Laveda F and García-Carmona F, Substrate dependent activation of latent leaf polyphenol oxidase by anionic surfactants. *J Agric Food Chem* 41:1219–1223 (1993).
- Núñez-Delicado E, Sojo MM, García-Carmona F and Sánchez-Ferrer A, Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 51:2058–2063 (2003).
- Ikediobi CO and Obasuyi HN, Purification and some properties of diphenolase from white yam tubers. *Phytochemistry* 21:2815–2820 (1982).
- Valero E, Varón R and García-Carmona F, Kinetic study of effect of metabisulfite on polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 40:904–908 (1992).
- Whitaker JR, *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Dekker, New York (1972).

- 34 Golan-Goldhirsh A and Whitaker JR, Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 32:1003–1009 (1984).
- 35 Cai Y, Gaffney SH, Lilley TH, Magnolato D, Martin R, Spencer CM, *et al.*, Polyphenol interactions. Part 4. Model studies with caffeine and cyclodextrins. *J. Chem Soc Perkin Trans 2* 2197–2209 (1990).
- 36 Hicks KB, Sapers GM and Seib PA, Process for preserving raw fruit and vegetable juices using cyclodextrins and compositions thereof. US Patent 4 975 293 (1990).
- 37 Fayad N, Marchal L, Billaud C and Nicolas J, Comparison of β -cyclodextrin effect on polyphenol oxidation catalysed by purified polyphenol oxidase from different sources. *J Agric Food Chem* 45:2442–2446 (1997).
- 38 Sojo MM, Núñez-Delicado E, García-Carmona F and Sánchez-Ferrer A, Cyclodextrins as activator and inhibitor of banana pulp polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 47:518–523 (1999).
- 39 Núñez-Delicado E, Sánchez-Ferrer A and García-Carmona F, Cyclodextrins as secondary antioxidants: synergism with ascorbic acid. *J Agric Food Chem* 45:2830–2835 (1997).
- 40 Núñez-Delicado E, Sojo MM, Sánchez-Ferrer A and García-Carmona F, Hydroperoxidase activity of lipoxygenase in the presence of cyclodextrins. *Arch Biochem Biophys* 367:274–280 (1999).

CAPÍTULO VI

“Kinetic characterization of cresolase activity of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase”

Kinetic characterization of cresolase activity of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase

Esteban Orenes-Piñero, Francisco García-Carmona, Alvaro Sánchez-Ferrer*

Department of Biochemistry and Molecular Biology-A, Faculty of Biology, University of Murcia, Campus Espinardo, E-30071 Murcia, Spain

Abstract

Streptomyces antibioticus tyrosinase was purified using PEG-8000/phosphate phase partitioning and ammonium sulfate fractionation between 0 and 60%, rendering a clear and stable enzyme compared with the black one that is usually obtained when only ammonium sulphate fractionation is used, and with a 93% of recovery. This enzyme shows both monophenolase (also termed cresolase) and diphenolase (catecholase) activities, confirming that it is a real tyrosinase. The monophenolase activity was characterized by a lag period, whose duration depends on the substrate concentration, the pH, and the presence of catalytic amounts of *o*-diphenol. The enzyme showed substrate inhibition for *p*-cresol, with a K_M of 0.97 mM and a K_{si} of 23 mM. By increasing the concentration of *o*-diphenols, it was possible to evaluate the enzyme activation constant, K_{act} , which showed a value of 0.2 μ M. The diphenolase activity was kinetically characterized with 4-methylcatechol, showed an optimal pH at 6.5 and a K_M of 1.3 mM.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Streptomyces antibioticus*; Tyrosinase; PEG-8000; Monophenolase activity; Diphenolase activity; Lag period; *p*-Cresol; 4-Methylcatechol

1. Introduction

Tyrosinase (monophenol, dihydroxy-L-phenylalanine:oxygen oxidoreductase E.C. 1.14.18.1) is a copper-containing monooxygenase that is responsible for the biosynthesis of melanins and other polyphenolic compounds [1]. It catalyzes two types of reactions in the presence of molecular oxygen: the *o*-hydroxylation of monophenols to its corresponding *o*-diphenol, which is referred to as monophenolase activity, and the oxidation of diphenols to its correspondent *o*-quinones, designated as catecholase activity. It is widely distributed in nature, and has been purified from hamster melanoma, mouse melanoma, mouse skin, human skin, potato tuber, mushroom, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Vibrio tyrosinaticus* and *Streptomyces glaucescens* [2], but not from *Streptomyces antibioticus* due to the black pigments existing in the fermentation broth, which covalently modify the enzyme, rendering a black and unstable enzyme after ammonium sulphate fractionation.

In *Streptomyces*, the production of melanin is widespread among different species [3]. The structural gene (*melC2*) of *S. antibioticus* tyrosinase has been studied extensively, and is located in a polycistronic operon (*MelC*). A similar structural gene was observed in *S. glaucescens* [4]. Tyrosinase gene

(*melC2*) is produced by an upstream gene, *melC1*, which specifies a conserved protein with a 30 amino acid signal sequence that is removed after secretion [5]. The latter protein is involved both in tyrosinase transport and in the copper-transfer process that activates apotyrosinase [5], acting as a copper chaperone [6].

Despite the above-mentioned studies of its genetics and molecular biology, there are no detailed kinetic studies on the diphenolase and monophenolase activities of this enzyme, unlike in the case of *S. glaucescens* [2]. The aim of this paper was to develop a purification procedure which would allow carrying out a detailed kinetic study of the parameters that affect monophenolase and diphenolase activity in *S. antibioticus* tyrosinase, as a necessary step before its use in the *o*-hydroxylation of valuable monophenols.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Biochemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (Madrid, Spain) and used without further purification.

2.2. Enzyme purification

S. antibioticus was grown on GYM medium [7,8]. After 18 h, the cultures were centrifuged at $10,000 \times g$. The medium, containing the exocellular tyrosinase, was subjected to an aqueous two-phase system based on PEG-8000 (5%

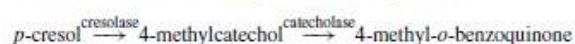
* Corresponding author. Fax: +34 968364147.

E-mail address: alvaro@um.es (A. Sánchez-Ferrer).

(w/w)/potassium phosphate buffer (pH 7.0) [9]. After the solution had been stirred for 15 min at room temperature, it was centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 25°C . The upper black PEG-rich phase (20% of total volume) was discarded, and the clean phosphate rich phase containing the *S. antibioticus* tyrosinase was brought to 60% saturation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ under continuous stirring at 4°C . After 1 hour, the solution was centrifuged at $60,000 \times g$ for 30 min at 4°C . The pellet, containing the tyrosinase activity, was collected and dissolved in a minimum volume of water.

2.3. Spectrophotometric measurement of enzymatic activity

Monophenolase and diphenolase activities were determined spectrophotometrically at 400 nm towards *p*-cresol and 4-methylcatechol, respectively. The conversion of *p*-cresol to its quinone (4-methyl-*o*-benzoquinone, $\epsilon_{400} = 1433 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), which produces a yellow color at 400 nm is a combination of both activities (monophenolase and diphenolase)



It was followed at 25°C using a Uvikon 940 spectrophotometer.

The steady-state rate of monophenolase activity was calculated from the linear zone of the product accumulation curve after the lag period. The standard reaction mixture for monophenolase activity included, in a total volume of 1 mL, $36 \mu\text{g/mL}$ soluble tyrosinase and 2.5 mM *p*-cresol in 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.5.

The diphenolase activity does not present any lag period and it was followed by the increase in absorbance at 400 nm (4-methyl-*o*-benzoquinone). The standard reaction medium for diphenolase activity at 25°C contained, in a total volume of 1 mL, $4 \mu\text{g/mL}$ tyrosinase, 10 mM 4-methylcatechol in 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.5. One unit of enzyme for both activities was taken as the amount that produced $1 \mu\text{mol}$ of 4-methyl-*o*-benzoquinone/min.

3. Results

3.1. Purification of tyrosinase

The exocellular *S. antibioticus* tyrosinase was partially purified using PEG-8000/phosphate phase partitioning and ammonium sulphate fractionation because of the large amount of polymerized black pigments produced in the broth during fermentation, which produces a black enzyme solution when the purification method described in the bibliography is used [2].

Thus, after centrifugation of the cells, the supernatant was subjected to PEG-8000/phosphate two-phase system. The upper black PEG-rich phase containing the polymerized phenols was discarded, and the PPO remained in the clear phosphate-rich phase. The latter phase, when subjected to ammonium sulphate fractionation (0–60%), rendered a clear enzyme (Fig. 1(A)), compared with the obtained only by ammonium sulphate fractionation without the PEG-8000/phosphate step (Fig. 1(B)). The degree of purification (1.8-fold) and the recovery (93%) were similar than that described by Lerch and Ettlinger [2] for *S. glaucescens* up to the ammonium sulphate step (1.7-fold and 82%, respectively). But this method reduced the phenol and melanin content without the need for several chromatographic steps as described by Lerch and Ettlinger [2]. In addition, the enzyme remained stable and clear, even after several months at -20°C , representing the first time that a phase partitioning in PEG-8000/phosphate has been used on a microbial tyrosinase.

The enzyme obtained from *S. antibioticus* is a real tyrosinase because it showed both diphenolase (Fig. 2(a)) and monopheno-



Fig. 1. *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. (A) The exocellular enzyme was purified by a combination of PEG-8000/phosphate aqueous two-phase system plus ammonium sulphate fractionation (0–60%). (B) The exocellular tyrosinase was only purified using ammonium sulphate fractionation (0–60%) as described in literature for *Streptomyces glaucescens* [2].

lase activities (Fig. 2(b)–(e)), when a phenolic pair *p*-cresol/4-methylcatechol was used. The cresolase activity is characterized by a lag period, defined as the intercept on the abscissa obtained by extrapolation of the linear part of the product accumulation curve. This lag period has been reported for other polyphenol oxidases (PPOs) from several sources when monophenolase activity was measured [2,10–13]. The lag period and the steady-state rate (defined as the slope of the linear part of the accumulation product curve) were affected by substrate concentration, the pH, and the presence of catalytic concentrations of *o*-diphenols (Fig. 2(b)–(e)).

3.2. Effect of pH

Monophenolase activity towards *p*-cresol increased as the pH increased from pH 3.5 without showing a defined maximum (Fig. 3, filled circles). At pH values above 7.5, it was difficult to follow the formation of 4-methyl-*o*-benzoquinone spectrophotometrically because of its great instability. pH not only affected

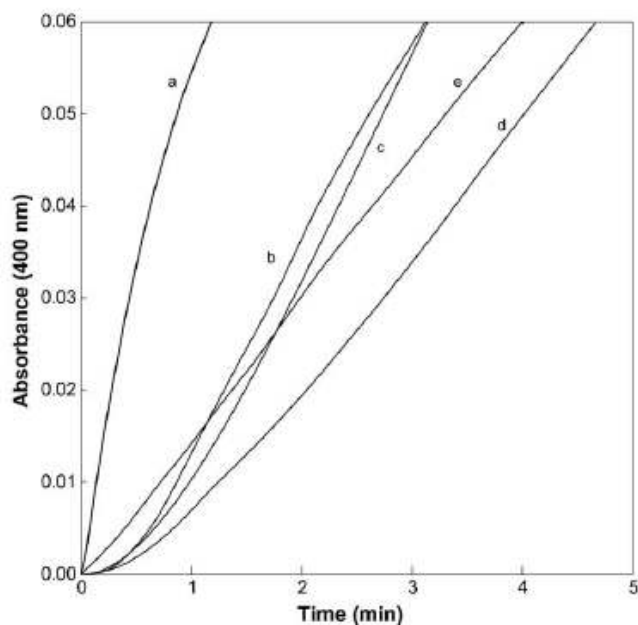


Fig. 2. Enzymatic activities of soluble *S. antibioticus* tyrosinase. (a) Catecholase activity at 25 °C. The reaction medium contained 4 µg/mL partially purified tyrosinase and 2.5 mM 4-methylcatechol in 50 mM phosphate buffer pH 6.5. (b)–(e) Cresolase activity at 25 °C. The reaction medium contained (b) 36 µg/mL PPO and 2.5 mM *p*-cresol in 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.5. (c and d) The same reaction medium as (b) except for (c) different substrate concentration (5 mM *p*-cresol), (d) different pH (pH 5.5), and (e) the addition of *o*-diphenol (1 µM 4-methylcatechol).

enzyme activity but also the lag period, and a decrease in the latter was observed when pH was increased (Fig. 3, open circles). These results are similar to those described for other plants PPOs [13–15].

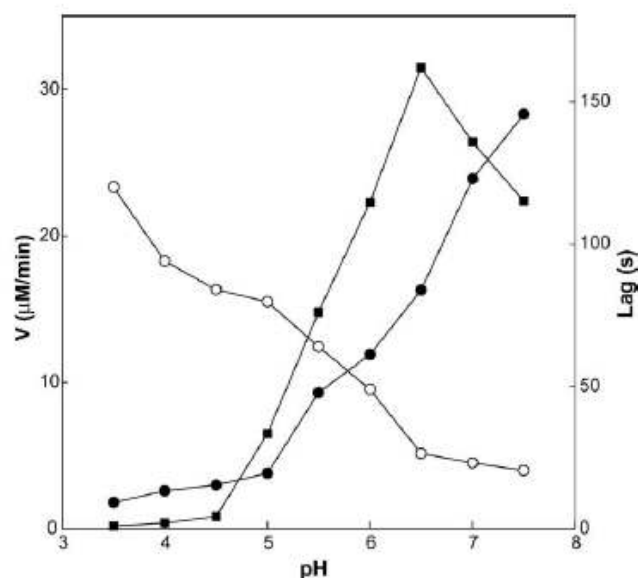


Fig. 3. Effect of pH on cresolase activity (●), and on its cresolase lag period (○). The reaction medium at 25 °C contained 36 µg/mL partially purified tyrosinase and 2.5 mM *p*-cresol. For catecholase activity (■) the reaction medium at the same temperature contained 4 µg/mL partially purified tyrosinase, 10 mM 4-methylcatechol in 50 mM sodium acetate (pH 3.5–5.5) and sodium phosphate (pH 5.5–7.5).

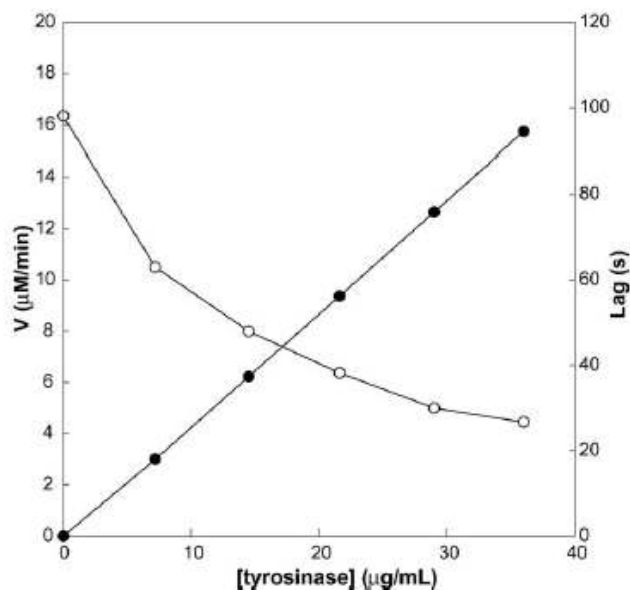


Fig. 4. Effect of *S. antibioticus* tyrosinase concentration on its cresolase activity (●) and on the lag period (○). The reaction medium at 25 °C contained 2.5 mM *p*-cresol in 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.5 and different tyrosinase concentrations (0–40 µg/mL).

Fig. 3 (filled squares) also shows the pH profile for the oxidation of 4-methylcatechol (4-MC) by tyrosinase. This oxidation was practically inexistent at acidic pH but showed a clear maximum at pH 6.5. The optimum pH agrees with that described for *S. antibioticus* activity towards L-DOPA [16,17], but contrasts with the higher activity shown by some plant polyphenol oxidases (PPOs) at acidic pH. This low pH optimum in plant PPOs is a result of the activation of the latent form of the enzyme by acid shock [18–21].

3.3. Effect of enzyme concentration

The monophenolase activity of tyrosinase was affected by enzyme concentration in the reaction medium, its steady-state rate increased linearly (Fig. 4, filled circles) and the lag period decreased hyperbolically (Fig. 4, open circles), a behaviour that has been also described in plant polyphenol oxidases [11–13,22–24]. Similar linear increase was observed for diphenolase activity (data not shown).

3.4. Effect of substrate concentration

When the *p*-cresol concentration was increased from 0 to 7.5 mM (Fig. 5), an increase in monophenolase activity was observed up to 5 mM, while higher concentrations led to substrate inhibition, never before described in Gram positive bacterial tyrosinases. The apparent V_{max} , K_M and K_{si} were calculated by non-linear regression adjustment of the data of Fig. 5 to Eq. (1):

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S] + ([S]^2/K_{si})} \quad (1)$$

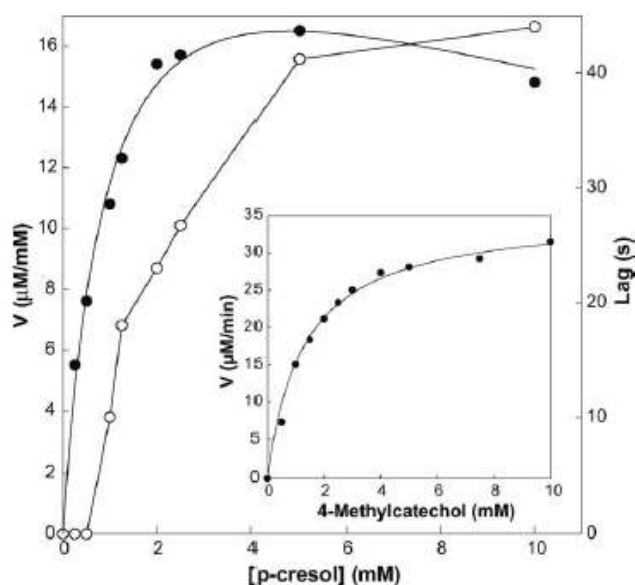


Fig. 5. Effect of substrate concentrations on cresolase activity of *S. antibioticus* tyrosinase. The reaction medium at 25 °C contained 36 μg/mL of partially purified tyrosinase in 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.5 with different *p*-cresol concentrations (0–10 mM). Inset, effect of 4-methylcatechol concentration. The reaction medium contained 4 μg/mL of partially purified tyrosinase, 4-methylcatechol concentration ranging from 0 to 10 mM in 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.5.

the values of 236 μM/min, 0.97 mM and 23 mM being found, respectively.

In addition, this increase in *p*-cresol concentration led to an increase in the lag period (Fig. 5, open circles), as seen in plant polyphenol oxidases [15,25].

The apparent kinetic parameters (V_{max} and K_M) for 4-methylcatechol were calculated by non-linear regression using the Michaelis–Menten equation for the activity data obtained when the 4-MC concentration was varied from 0 to 10 mM at pH 6.5 (Fig. 5, inset). The values obtained were 35.3 μM/min and 1.3 mM, respectively. The K_M obtained was similar than the obtained for this substrate in *S. glaucescens* tyrosinase (1.9 mM) [1].

3.5. Effect of *o*-diphenols over the lag period

It is well known that the cresolase activity lag period can be shortened or eliminated by the addition of reducing agents or *o*-diphenols, which act as cosubstrates [26,27]. The effect of the latter compounds on the cresolase activity of partially purified tyrosinase was studied according to Pomerantz and Warner [26], assuming that the *o*-diphenol bound to the activation center by a simple isotherm and that the lag period was proportional to the non-active enzyme concentration at zero time, using the empirical formula [26] (Eq. (2))

$$\frac{1}{l} = \frac{1}{L} + \frac{1}{L} \frac{[o\text{-diphenol}]}{K_{act}} \quad (2)$$

where l , L , and K_{act} represent the lag period in the presence of *o*-diphenol, the lag period in the absence of *o*-diphenol, and the diphenol activation constant, respectively. Pomerantz and

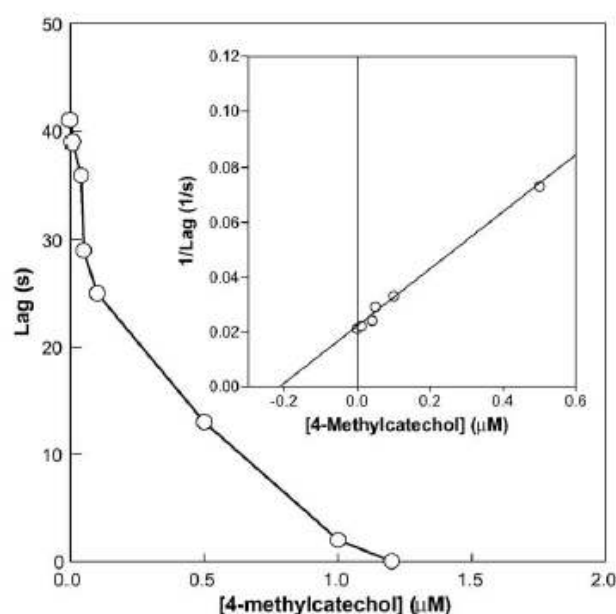


Fig. 6. Influence of 4-methylcatechol on the shortening of the lag period. In the standard reaction medium, the concentration of 4-methylcatechol was modified from 0 to 2 μM. Inset, evaluation of the activation constant, K_{act} , by the Pomerantz's equation (see text for details).

Warner [26] interpreted the K_{act} as the *o*-diphenol affinity constant for the activation center. Fig. 6 shows the decrease in the lag period as *o*-diphenol concentration was increased up to 1.2 μM, at which stage the lag was abolished. The activation constant K_{act} was calculated from the reciprocal of the lag period in the presence of diphenol (Fig. 6, inset). The value obtained was 0.2 μM. To check that the *o*-diphenol added was being used as cosubstrate and not as substrate, the steady-state rate was plotted against *o*-diphenol concentration (Fig. 7); no changes were observed up to

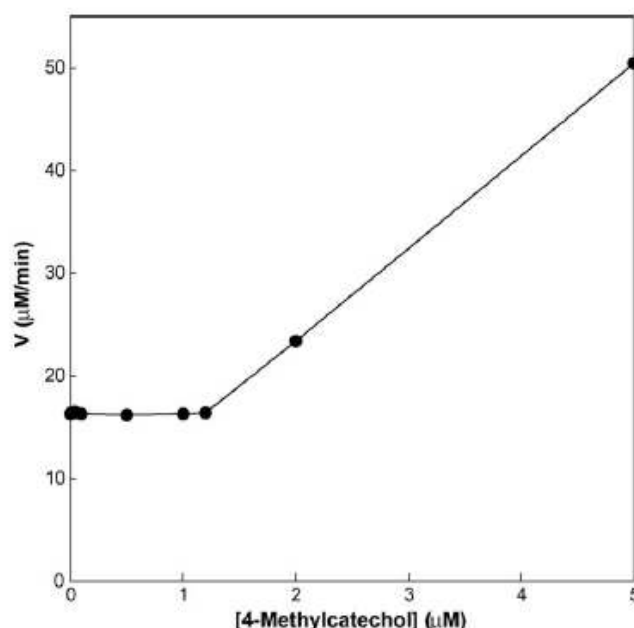


Fig. 7. Effect of catalytic amounts of 4-methylcatechol on the steady-state rate of monophenolase activity. The reaction medium was the same as in Fig. 6.

1.2 μM . Above this concentration the rate increased proportionally, indicating that the *o*-diphenol was being used as substrate for the diphenolase activity.

4. Discussion

S. antibioticus tyrosinase shows a characteristic lag period like other plant polyphenol oxidases (PPOs). As observed in this study, this lag period depends on the pH, the enzyme concentration, the substrate concentration and the presence of catalytic amounts of *o*-diphenols (Fig. 2(b)–(e)). It is of relevance that the enzyme oxidizes *p*-cresol following the general scheme proposed for plant and mushroom tyrosinase [27] (Fig. 8), however, no detailed study on monophenolase activity of Gram positive bacteria has been carried out.

The mechanism starts with the binding of oxygen to give rise to the E_{Oxy} form (Fig. 8). This reversibly binds one molecule of monophenol, rendering a molecule of water and the complex $E_{\text{met}}D$. This complex can either render free diphenol as the first step of diphenolase activity or be involved in a multistep transformation to the E_{deoxy} form, rendering one quinone and bicuprous enzyme (E_{deoxy}). The binding of molecular oxygen to the E_{deoxy} form regenerates E_{Oxy} . If there is only diphenol in the medium, this binds to the E_{Oxy} form to give rise to $E_{\text{Oxy}}D$, which is transformed into E_{met} and free *o*-quinone. This enzyme form can bind another diphenol to render another quinone and the E_{deoxy} enzymatic form. The binding of E_{met} to monophenol scavenges a portion of tyrosinase from the catalytic turnover as a dead-end complex in the steady-state of monophenolase activity [24]. Exit from this non-active E_{met} -monophenol form is possible only by upsetting the equilibrium with the *o*-diphenol obtained by recycling the quinones in the chemical reaction. The time needed to produce the catalytic level of diphenol for the steady-state rate to be maintained is the lag period shown by this activity (Fig. 2(b)–(f)), which may last from minutes to hours (Fig. 2(b)), depending on a variety of factors:

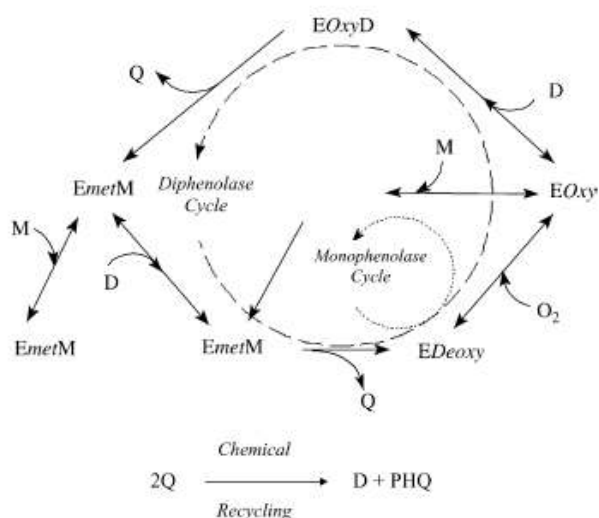


Fig. 8. Enzymatic–chemical–chemical mechanism proposed for cresolase activity. (M) *p*-Cresol; (D) 4-methylcatechol; (Q) 4-methyl-*o*-benzoquinone; (PHQ) 2-hydroxy-*p*-benzoquinone.

- pH*. The appearance and disappearance of the lag period in the monophenolase activity at different pH values may be due to a combination of both changes in the affinity of the E_{met} form for the monophenol and the speed of the recycling chemical reactions, which are faster at neutral pH values. This combination of factors normally gives different profiles [16,17,25], from bell-shaped to a not clearly defined maximum, as in Fig. 3.
- Amount of E_{Oxy} form in the enzymatic extract*. This amount ranges from 2 to 30% depending on the source [17]. Because the E_{Oxy} present in the medium increased when tyrosinase concentration increased and because the steady state of *o*-diphenol activity was reached more quickly, the lag period diminished (Fig. 4).
- Monophenol concentration*. Increasing amounts of monophenol in the reaction medium involves a more enzyme in the dead-end complex, $E_{\text{met}}M$, and more time to reach the steady state (Fig. 5). Note that it is critical to use a low level of monophenol when trying to detect monophenolase activity, because the lag period greatly increases when monophenol concentration is high (Fig. 5).
- Presence of *o*-diphenols*. The addition of catalytic amounts of *o*-diphenol to the reaction medium diminished the lag period until it was abolished (Fig. 6), indicating that the level of *o*-diphenol in the steady state had been reached. If this level is exceeded, the excess *o*-diphenol is used by the diphenolase catalytic cycle, and activity increases (Fig. 7).
- Purification method used*. Because both monophenolase and diphenolase cycles overlap, a true tyrosinase must show both activities; the loss of monophenolase activity during purification reported in the bibliography must be due to a dramatic loss of enzymatic activity produced by acetone powder, reducing agents, or insoluble resins, which affect the monophenolase rather than the diphenolase activity [15]. Thus, mild purification methods based on Triton X-114 [11,15,26,28–32], or PEG-8000/phosphate as described in the present paper, both seems to be suitable methods for obtaining a tyrosinase showing both activities.
- Chemical characteristics of the monophenol used to test monophenolase activity*. As described above, a crucial step in the catalytic cycle is the chemical recycling of quinones. Thus, if a monophenol, such as *tert*-butylphenol, which gives the water stable *tert*-butyl-*o*-quinone, is used, no monophenolase can be detected unless H_2O_2 is used to obtain the E_{Oxy} form during the reaction [10].

5. Conclusion

This paper describes a new simple purification method using a PEG-8000/phosphate aqueous two-phase system, which not only increases the recovery of the enzyme, but also renders a clear and stable enzyme which allows a detailed kinetic characterization of its monophenolase and diphenolase activities, without the need for tedious chromatographic steps. This, opens up the possibility of characterize this activity in other microorganisms of such genera whose studies are hindered by the isolation of the enzyme from their dark broths. Moreover, this could

lead to possible biotechnological uses such as the synthesis or modification of high-value compounds like coumestrol, known for its oestrogenic activity, and L-DOPA, which is used for the treatment of Parkinson's disease [33].

Acknowledgements

This work was partially supported by MEC and FEDER (BIO2004-00439) and Fundación Séneca (00608/PI/04). E.O.P. is a holder of predoctoral research grant from Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.

References

- [1] Lerch K, Siegel H. Metal ions in biological system. New York: Dekker; 1981.
- [2] Lerch K, Ettliger L. Purification and characterization of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. Eur J Biochem 1972;31:427–37.
- [3] Küster E, Arai T, editors. Actinomycetes: the boundary microorganism. Tokyo: Toppan; 1976. p. 43–5.
- [4] Hintermann G, Zatchej M, Hutter R. Cloning and expression of the genetically unstable tyrosinase structural gene from *Streptomyces glaucescens*. Mol Gen Genet 1985;200:422–32.
- [5] Ling-Yun C, Mei-Yu C, Wei-Ming L, Tzun-Yuan T, Yan-Hwa WL. Mutational study of *Streptomyces tyrosinase* trans-activator MelC1. J Biol Chem 1993;268:18710–6.
- [6] Harrison MD, Jones CE, Solioz M, Dameron CT. Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. Trends Biochem Sci 2000;25:29–32.
- [7] Berman V, Filpula D, Herber W, Viv M, Katz E. The nucleotide sequence of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* and characterization of the gene product. Gene 1985;37:101–10.
- [8] Katz E, Betancourt A. Induction of tyrosinase by L-methionine in *Streptomyces antibioticus*. Can J Microbiol 1988;34:1297–303.
- [9] Sojo MM, Núñez-Delicado E, García-Carmona F, Sánchez-Ferrer A. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG-8000 for removal of polyphenols. J Agric Food Chem 1998;46:4924–30.
- [10] Jiménez M, García-Carmona F. Hydrogen peroxide-dependent 4-*tert*-butylphenol hydroxylation by tyrosinase: a new catalytic activity. Biochim Biophys Acta 1996;1297:33–9.
- [11] Sánchez-Ferrer A, Bru R, Cabanes J, García-Carmona F. Characterization of cresolase and catecholase activities of Monastrell grape polyphenol oxidase. Phytochemistry 1988;27:319–21.
- [12] Cabanes J, García-Cánovas F, Lozano JA, García-Carmona F. A kinetic study of the melanization pathway between L-tyrosine and dopachrome. Biochim Biophys Acta 1987;923:187–95.
- [13] Espín JC, Morales M, Varón R, Tudela J, García-Cánovas F. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. Anal Biochem 1995;231:237–46.
- [14] Espín JC, Morales M, Varón R, Tudela J, García-Cánovas F. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from *Verdoncella* apple. J Agric Food Chem 1995;43:2807–12.
- [15] Núñez-Delicado E, Sojo MM, García-Carmona F, Sánchez-Ferrer A. Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. J Agric Food Chem 2003;51:2058–63.
- [16] Bubacco L, Vijgenboom E, Gobin C, Tepper AW, Salgado J. Kinetic and parametric NMR investigations of the inhibition of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. J Mol Catal B 2000;8:27–35.
- [17] Streffer K, Vijgenboom E, Tepper AW, Makower A, Scheller FW, Canters GW, et al. Determination of phenolic compounds using recombinant tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. Anal Chim Acta 2001;427:201–10.
- [18] Kenten RH. Latent phenolase in extracts of broad bean (*Vicia faba* L.). 1. Activation by acid and alkali. Biochem J 1957;67:300–7.
- [19] Kenten RH. Latent phenolase in extracts of broad bean (*Vicia faba* L.) leaves. 2. Activation by anionic wetting agents. Biochem J 1958;68:244–51.
- [20] Sánchez-Ferrer A, Bru R, García-Carmona F. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenol oxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. Plant Physiol 1989;91:1481–7.
- [21] Moore BM, Flurkey WH. Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenol oxidase. J Biol Chem 1990;265:4982–8.
- [22] Espín JC, Morales M, Varón R, Tudela J, García-Cánovas F. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of pear polyphenol oxidase. J Food Sci 1996;61:1177–81.
- [23] Espín JC, Morales M, Varón R, Tudela J, García-Cánovas F. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Blanquilla pear. Phytochemistry 1996;44:17–22.
- [24] Espín JC, Ochoa M, Tudela J, García-Cánovas F. Monophenolase activity of strawberry polyphenol oxidase. Phytochemistry 1997;45:667–70.
- [25] Lavollay J, Legrand G, Lehongre G, Neumann J. The *o*-hydroxylation of phenol and *p*-cresol by tyrosinases in the presence of ascorbic acid. Physiol Veg 1975;13:667–76.
- [26] Pomerantz SH, Warner MC. 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine as the tyrosinase cofactor. J Biol Chem 1967;242:5308–14.
- [27] García-Carmona F, Pedreño E, Galindo JD, García-Cánovas F. A new spectrophotometric method for the determination of cresolase activity of epidermis tyrosinase. Anal Biochem 1979;95:433–5.
- [28] Ikediobi CO, Obasuyi HN. Purification and some properties of *o*-diphenolase from white yam tubers. Phytochemistry 1982;21:2815–20.
- [29] Sánchez-Ferrer A, Laveda F, García-Carmona F. Substrate dependent activation of latent leaf polyphenol oxidase by anionic surfactants. J Agric Food Chem 1993;41:1219–23.
- [30] Valero E, Varón R, García-Carmona F. Kinetic study of the effect of metabisulfite on polyphenol oxidase. J Agric Food Chem 1992;40:904–8.
- [31] Whitaker JR. Principles of enzymology for the food science. New York: Dekker; 1972.
- [32] Golan-Goldhirsh A, Whitaker JR. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. J Agric Food Chem 1984;32:1003–9.
- [33] Kwang-Hoon K, Min-Pyo H, Sang-Sook C, Yong-Tae K, Sung-Hye C. Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*. Biotechnol Appl Biochem 2000;31:113–8.

CAPÍTULO VII

“Kinetic characterization of diphenolase activity from *Streptomyces antibioticus* tyrosinase in the presence and absence of cyclodextrins”

Kinetic characterization of diphenolase activity from *Streptomyces antibioticus* tyrosinase in the presence and absence of cyclodextrins

Esteban Orenes-Piñero; Francisco García-Carmona and Alvaro Sánchez-Ferrer*

Department of Biochemistry and Molecular Biology-A, Faculty of Biology, University of Murcia, Campus Espinardo, E-30071 MURCIA, Spain.

Keywords: Tyrosinase, diphenolase activity, cyclodextrins, *Streptomyces antibioticus*, inhibitors, two-phase system.

*To whom the correspondence should be addressed:

Prof. Álvaro Sánchez-Ferrer

Department of Biochemistry and Molecular Biology-A, Faculty of Biology, University of Murcia, Campus Espinardo, E-30071 MURCIA, Spain.

Fax: +34968364147

e-mail: alvaro@um.es

Abstract

Streptomyces antibioticus tyrosinase was kinetically characterized after purification by PEG-8000/phosphate phase partitioning and ammonium sulfate fractionation using *tert*-butylcatechol (TBC) and dopamine. The enzyme showed an optimal pH at 6.5 and a K_M of 1.2 mM and 8.4 mM, respectively. The effect of several inhibitors was studied for the first time on a Gram-positive tyrosinase. In addition, previously undescribed characterization of inhibition and activation of a bacterial tyrosinase using different kinds of cyclodextrins was carried out. When a hydrophobic substrate of *S. antibioticus* tyrosinase, in this case, *tert*-butylcatechol was used, a marked inhibition was observed in the presence of hydroxypropyl- β -cyclodextrins (OH- β -CDs) and gamma cyclodextrins (γ -CDs). This inhibition was due to the complexation of TBC into the CD cavity. Moreover, the effect of some hydrophobic inhibitors in the presence of OH- β -CDs and γ -CDs was studied using dopamine, a hydrophilic substrate of *S. antibioticus* tyrosinase. Increasing concentrations of CDs in the presence of inhibitors like hexestrol or hinikitiol, were able to reactivate the inhibited enzyme to reach the non-inhibited level, as a result of the complexation of these inhibitory compounds in the hydrophobic core of the CDs.

1. Introduction

Tyrosinase (monophenol,dihydroxy-L-phenylalanine:oxygen oxidoreductase E.C. 1.14.18.1) is an enzyme that is widely distributed in nature and is responsible for the biosynthesis of melanins and other polyphenolic compounds (Orenes-Piñero et al., 2006a). It catalyzes both, the o-hydroxylation of monophenols to its corresponding o-diphenols (monophenolase activity) and the oxidation of o-diphenols to o-quinones (diphenolase activity). The o-quinones, thus generated, polymerize to synthesize melanin or melanin-like pigments in fungi, plants, unicellular bacteria and mammalian cells.

Streptomycetes are Gram-positive soil bacteria showing mycelious growth. Members of this genus are involved in the formation and/or degradation of complex biopolymers like lignins, melanins and humic substances (Kutzner, 1968). About 40% of *Streptomyces* species produce melanin-like exopigments on tyrosine-containing agar media, which mostly, but not always, coincide with the appearance of an extracellular tyrosinase activity (Harald and Decker, 2006).

Although several studies have been made of about the genetic and the molecular biology of tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*, there have been no kinetic studies on the diphenolase activity of this enzyme with TBC or dopamine as substrates, unlike in the case of *Streptomyces glaucescens* (Lerch and Ettlinger, 1972). This is perhaps due to the problems associated with its purification in the *Streptomyces antibioticus* broth, which is black. This color remains bound to the enzyme preparation even after the usual ammonium sulphate fractionation step, giving rise to an unstable enzyme form. In order to obtain a stable enzyme, our group has developed an easy and simple purification method based on an aqueous two-phase system with PEG-8000 (5% w/w)/potassium phosphate buffer (pH 7) (Orenes-Piñero et al., 2006) and a subsequent precipitation with ammonium sulphate.

Tyrosinase is an important enzyme in biotechnology (Kwang-Hoon et al., 2000) due to its role in the synthesis or modification of high-value compounds like the phytoestrogen coumestrol, known for its estrogenic activity, and L-DOPA, which is used for the treatment of Parkinson's disease. Moreover, it can be used as a biosensor since it shows excellent analytical performance when immobilized in a membrane (Yi-Feng and Hong-Yuan, 2001).

The aim of this paper was to characterize extensively the previously undescribed diphenolase activity from *Streptomyces antibioticus* using TBC and dopamine as substrates. This study was also extended to the effect of two different types of cyclodextrins (OH- β -CDs and γ -CDs) on enzymatic diphenolic oxidation, and represents the first study on a bacterial tyrosinase.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents

Biochemicals, including inhibitors (cinnamic acid, L-mimosine, tropolone, ascorbic acid, L-cysteine and metabisulfite) were purchased from Sigma (Madrid, Spain) and used without further purification. The 2-hydroxy-propyl- β -cyclodextrins (OH- β -CDs) and gamma-cyclodextrins (γ -CDs) were kindly supplied by Amaizo, American Maize Products Co., Hammond, IN. Hexestrol (4,4'-1,2-Diethylethylene-diphenol) and Hinokitiol were obtained from TCI (Japan).

2.2 Enzyme purification

Streptomyces antibioticus was obtained and purified using the method described by Orenes-Piñero et al. (2006a). Briefly, *Streptomyces antibioticus* was grown on GYM medium (Bernan et al., 1985; Katz and Betancourt, 1988). After 18 hours, the cultures were centrifuged at 10000 x g. The medium, containing the exocellular tyrosinase, was subjected to an aqueous two-phase system based on

PEG-8000 (5% w/w)/potassium phosphate buffer (pH 7.0) (Sojo et al., 1998). After the solution had been stirred for 15 min at room temperature, it was centrifuged at 10000 x g for 10 min at 25 °C. The upper black PEG-rich phase (20% of total volume) was discarded, and the clean phosphate-rich phase containing the *Streptomyces antibioticus* tyrosinase was brought to 60% saturation with (NH₄)₂SO₄ under continuous stirring at 4 °C. After 1 hour, the solution was centrifuged at 60000 x g for 30 min at 4 °C. The pellet, containing the tyrosinase activity, was collected and dissolved in a minimum volume of water.

2.3 Enzyme activity

The oxidation of the 4-*tert*-butylcatechol and dopamine was followed spectrophotometrically in an Uvikon 940 (Kontron Instruments, Italy) at their respectively absorption maxima, which are 400 nm for *tert*-butyl-*o*-quinone ($\epsilon = 1150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and 475 nm for dopaminochrome ($\epsilon = 3300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

The standard reaction medium at 25 °C contained, in a total volume of 1 mL, 4 µg/mL tyrosinase, 2.5 mM TBC or dopamine in 10 mM sodium phosphate buffer pH 6.5. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme that produced 1 µmol of *tert*-butyl-*o*-quinone/min, or 1 µmol of dopaminochrome/min, respectively.

3. Results and Discussion

3.1 Effect of pH

Figure 1 shows the pH profile for the oxidation of *tert*-butylcatechol (TBC) by tyrosinase. This oxidation was practically inexistent at acidic pH but showed a clear maximum at pH 6.5. The optimum pH agrees with that described for *Streptomyces antibioticus* activity towards L-DOPA (Bubacco et al., 2000; Streffer et al., 2001), but contrasts with the higher activity shown by some plant polyphenol

oxidases (PPOs) at acidic pH. This low pH optimum in plant PPOs is a result of the activation of the latent form of the enzyme by acid shock (Kenten, 1957, 1958; Núñez-Delicado et al, 2003; Jiménez and García-Carmona, 1996).

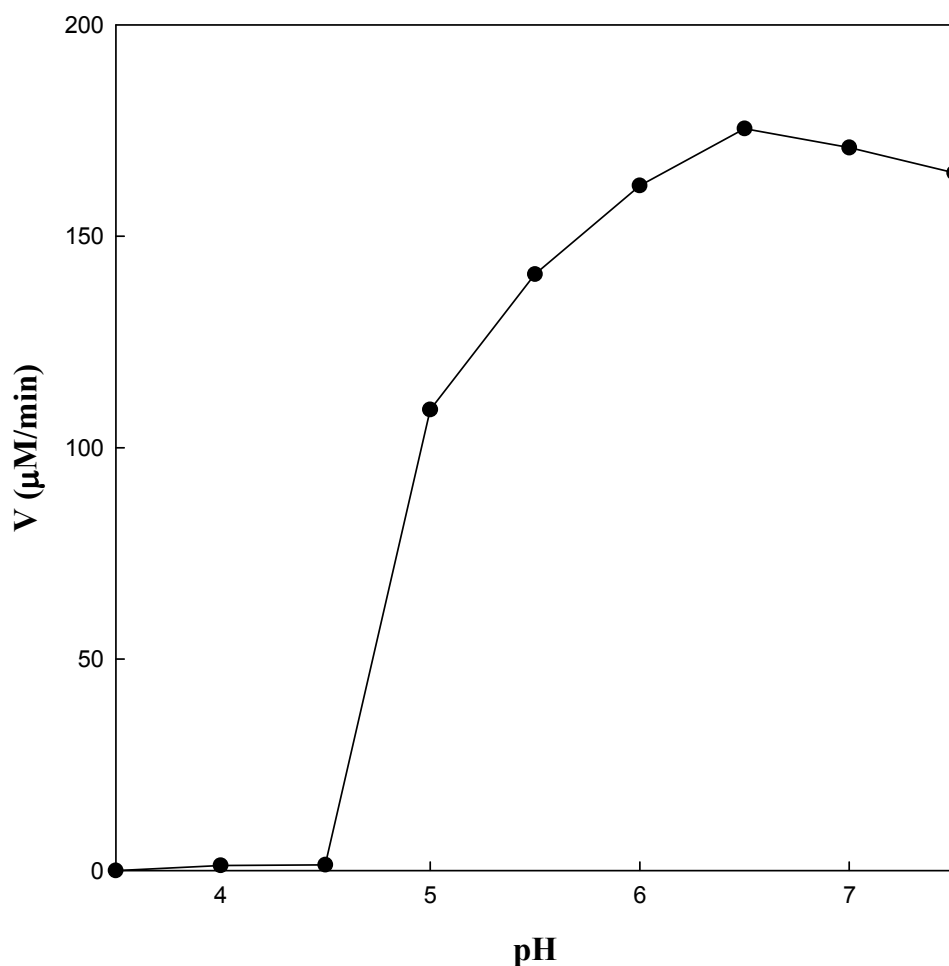


Figure VII.1. Effect of pH on *Streptomyces antibioticus* tyrosinase activity in 10 mM sodium acetate pH (3.5-5.5) and 10 mM sodium phosphate (pH 6.0-7.5). The reaction medium at 25 °C contained 2.5 mM TBC and 4 µg/mL tyrosinase

3.2 Effect of TBC and dopamine concentrations

The apparent kinetic parameters (V_{\max} and K_M) were fitted by nonlinear regression using the Michaelis-Menten equation for the activity data obtained when the TBC and dopamine concentrations were varied from 0 to 6.5 mM and 0 to 12 mM at pH 6.5 (Figure 2 and Figure 2 inset), respectively. The values obtained using TBC as substrate, were 265.7 $\mu\text{M}/\text{min}$ and 1.2 mM, respectively. The K_M value was the same to the one obtained for this substrate in quince fruit pulp (1.2 mM) (Orenes-Piñero et al., 2006b) but slightly higher than in *Streptomyces glaucescens* tyrosinase (0.9 mM) (Lerch y Ettliger, 1972) and in persimmon PPO (0.68 mM) (Núñez-Delicado et al., 2003).

In the case of dopamine, the values obtained were 51.68 $\mu\text{M}/\text{min}$ and 8.4 mM, respectively. The K_M value cannot be compared with any *Streptomyces sp.* tyrosinase, but it is higher than the values obtained for banana peel (3.9 mM) (Yang et al., 2001), for pulp PPO, which is its natural substrate (0.57 mM) (Sojo et al., 1998), and for *Hevea brasiliensis* (2.12 mM) (Wititsuwannakul et al., 2002).

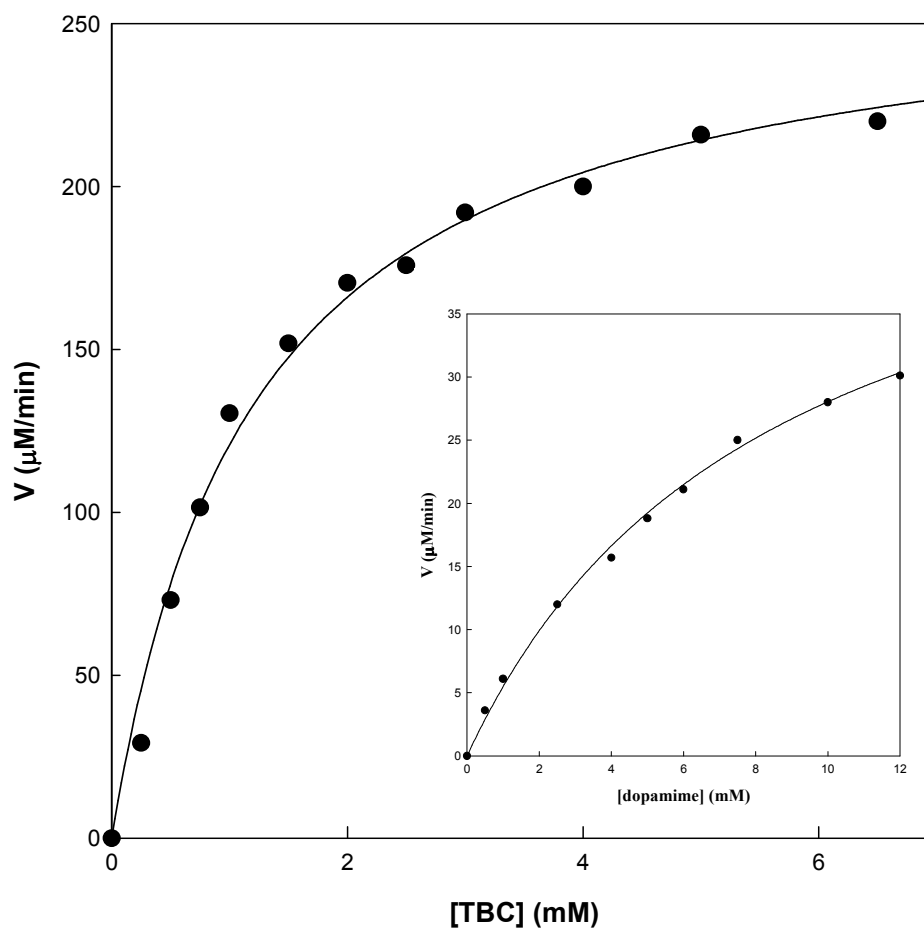


Figure VII.2. Effect of TBC concentration on *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. The reaction medium contained 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of partially purified tyrosinase, TBC concentration ranging from 0 to 6.5 mM in 10 mM sodium phosphate buffer pH 6.5. Inset. Effect of dopamine concentration on *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. The reaction medium was the same but with dopamine concentration ranging from 0 to 12 mM.

3.3 Effect of inhibitors

To further characterize the enzyme, a detailed kinetic study of its inhibition was carried out. Table 1 shows the effect of several inhibitors on the diphenolase activity of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase, using TBC as substrate, since it was the better of the two used in this paper. All of the inhibitors, reducing agents

and substrate analogues used in this study inhibited tyrosinase activity and the extent of the inhibition was dependent on the concentration of the compound used.

Table VII.1. Inhibition percentage of *S. antibioticus* tyrosinase using TBC as substrate

	1 μ M	10 μ M	100 μ M	1 mM
Reducing Agents				
Ascorbic Acid	5	6	23	100
L-cysteine	11	14	81	100
Metabisulfite	2	10	64	100
Substrate Analogues				
Tropolone	10	69	96	100
L-mimosine	1	20	45	85
Cinnamic Acid	5	6	7	17

Assayed under the standard reaction conditions with the appropriate concentration of inhibitor.

Among the reducing agents, L-cysteine appeared to be the most effective inhibitor (Table 1). The inhibition produced by thiol compounds may be due to an addition reaction, taking place with the quinones and the formation of stable colorless products (Ikediobi and Obasuyi, 1982) and/or to the L-cysteine binding to the active center of the enzyme, as in the case of metabisulfite (Valero et al., 1992). Ascorbate acts as an antioxidant rather than as an enzyme inhibitor because it reduces the initial quinone formed by the enzyme to the original diphenol before it undergoes the secondary reactions that lead to browning. Ascorbic acid has also been reported to cause irreversible inhibition (Golan-Goldhirsh and Whitaker, 1984).

With regard to substrate analogues (Table 1), tropolone was the most effective inhibitor using TBC as substrate because it nearly inhibited the enzyme at 0.1 mM and did so completely at 1 mM. This compound was therefore selected to carry out the kinetic analysis of its inhibition. The inhibition was determined by Lineweaver-Burk plots of $1/v$ versus $1/s$ (data not shown) at three inhibitor concentrations and confirmed by a Dixon plot of $1/v$ versus inhibitor concentration (Figure 3). The linear regression of the data defined the intersection point in the second quadrant. This means that the inhibition of tropolone on tyrosinase is competitive, and the inhibition constant, K_i , which showed a value of 4.2 μM , could be deduced from the interception points. However, the data cannot be compared since this is the first study of tyrosinase inhibition by tropolone in a Gram-positive bacteria although this value is very similar to the one obtained for quince fruit pulp PPO (4.7 μM) (Orenes-Piñero et al., 2006b) and nearly 10-times higher than the observed for tropolone on latent persimmon PPO (Núñez-Delicado et al., 2003).

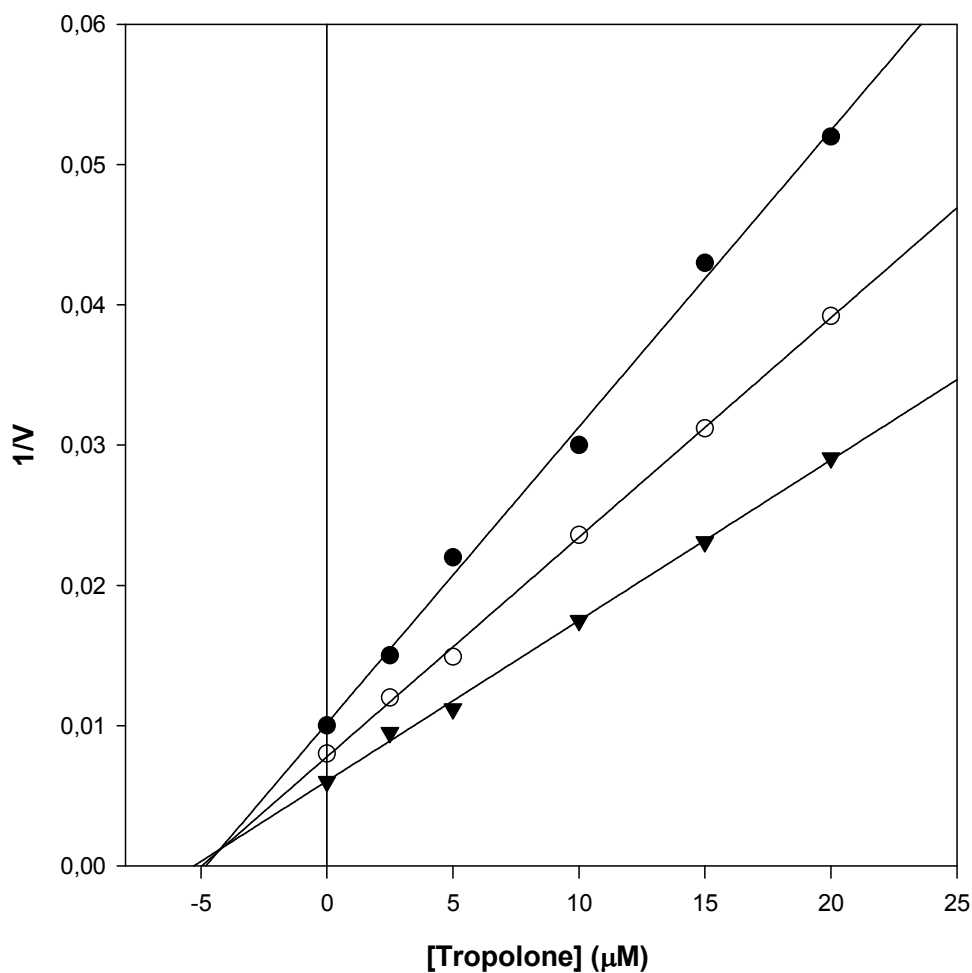


Figure VII.3. Effect of tropolone inhibition (Dixon plot) in *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. The reaction medium contained 4 μg/mL tyrosinase, tropolone (0-20 mM), and three different concentrations of TBC [0.625 mM (●), 1 mM (○) and 2.5 mM (▼)] in 10 mM sodium phosphate buffer.

3.4 Effect of cyclodextrins

To extend the study of the inhibition of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase, the effect of sequestrants such as cyclodextrins was studied. Cyclodextrins (CDs) are a group of naturally occurring cyclic oligosaccharides derived from starch with six, seven, or eight glucose residues linked by $\alpha(1\rightarrow4)$ glycosidic bonds in a

cylinder-shaped structure and are denominated α -, β - and γ -cyclodextrins, respectively. The central cavity of these molecules is hydrophobic, whereas the rims of the surrounding walls are hydrophilic. This hydrophobic cavity forms inclusion complexes with a wide range of organic guest molecules, including (poly)phenols (Cai et al., 1990). It has been suggested that cyclodextrins may moderate the enzymatic browning of different fruits and vegetables (Hicks et al., 1990; Fayad et al., 1997; Núñez-Delicado et al., 1997) because they form inclusion complexes with the substrates of polyphenol oxidase, thereby preventing their oxidation to quinones and subsequent polymerization to brown pigments. Our group has also observed this effect during the oxidation of phenols by lipoxygenase (Núñez-Delicado et al., 1999a), in which CDs act as secondary antioxidants in synergism with ascorbic acid.

Modified cyclodextrins, which have one or more branches of an α -D-glucopyranosil unit or a (1 \rightarrow 4)- α -D-glucan at the carbon site of the glucose residues, have many advantages over the parent cyclodextrins. For example, they are highly soluble, both in water and in organic solvents, and enhance the solubility of otherwise water insoluble compounds by complexation (Núñez-Delicado et al., 1997). Among them, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrins (OH- β -CDs) is one of the most widely used for its high solubility and low cost. These properties have been exploited commercially, especially in the pharmaceutical field (Kritharides et al., 1996).

When dopamine was assayed in the presence of OH- β -CDs or γ -CDs, the activity was not inhibited (data not shown). This clearly indicates that dopamine is a highly soluble and hydrophilic *o*-diphenol, which shows little or no complexation in CDs. To confirm this, TBC, a more hydrophobic *o*-diphenol, was used. In this case, a clear decrease in activity was found at three different concentrations of TBC in the presence of increasing concentration of OH- β -CDs (Figure 4A), and γ -CDs (Figure 4B).

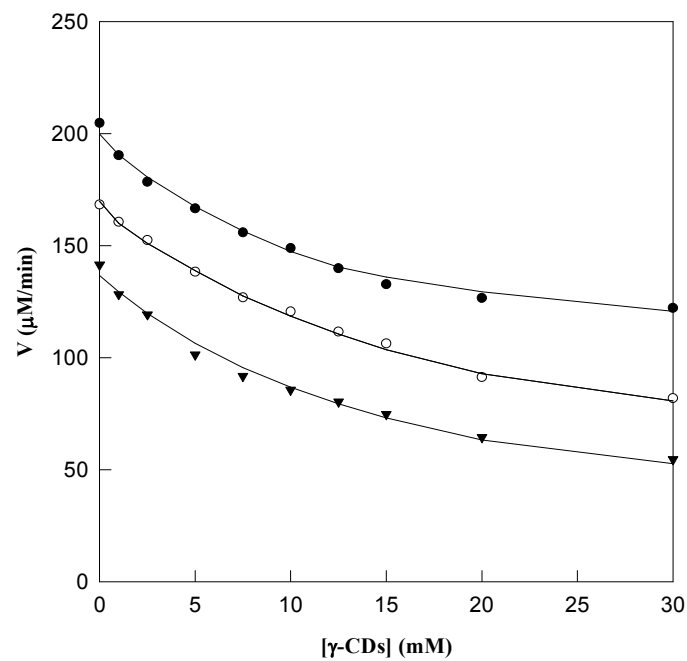
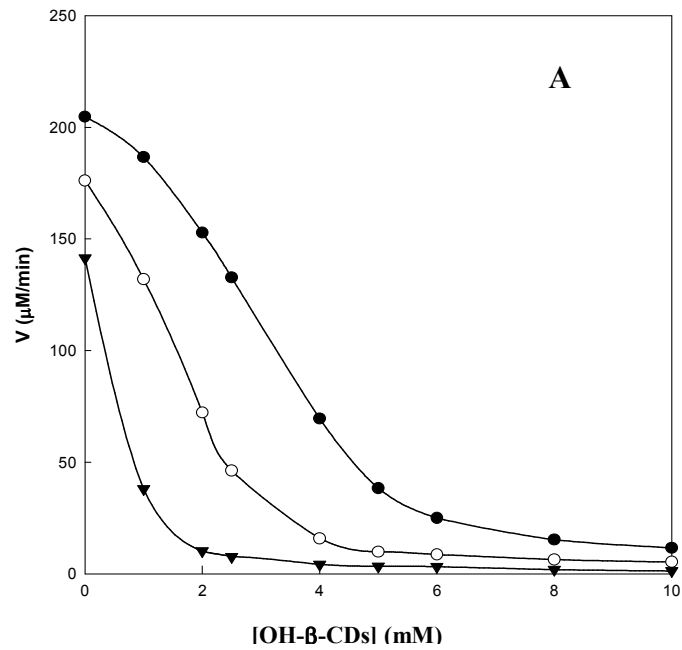


Figure VII.4. A. Effect of OH-β-CDs concentration on *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. The reaction medium at 25 °C contained 10 mM sodium phosphate buffer pH 6.5, 4 μg/mL of partially purified tyrosinase, increasing concentrations of OH-β-CDs (0-10 mM), and 5 mM TBC (●), 2.5 mM TBC (○) and 1 mM TBC (▼). B. The same reaction medium conditions but with γ-CDs. Solid lines represent the adjustment of experimental data to equation 2.

The modified cyclodextrin was selected to carry out a kinetic analysis of the inhibition because of its better complexation with TBC. This can be explained by the fact that TBC is a diphenolic compound with a hydrophobic group, which enters the hydrophobic cavity to form inclusion complexes, diminishing the free TBC concentration available for the enzyme. This concentration can be mathematically expressed as in Equation 1 (Núñez-Delicado et al., 1999b):

$$[TBC]_f = \left(-([CD]_t - [TBC]_t K_c + 1) + \sqrt{([CD]_t K_c - [TBC]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [TBC]_t} \right) / 2K_c \quad (1)$$

Where subscripts f and t refers to the concentration of the free and total compounds, respectively, in this case, TBC and CD. Thus, the complete Michaelis-Menten equation can be expressed as:

$$v = \frac{V_m \left[-([CD]_t K_c - [TBC]_t K_c + 1) + \sqrt{([CD]_t K_c - [TBC]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [TBC]_t} \right] / 2K_c}{K_M + \left[-([CD]_t K_c - [TBC]_t K_c + 1) + \sqrt{([CD]_t K_c - [TBC]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [TBC]_t} \right] / 2K_c} \quad (2)$$

Equation 2 shows a nonlinear relationship between v and $[CD]$, as depicted in Figure 4. Fitting the data of this figure to equation 2 by nonlinear regression gives a value of 13170 M^{-1} for the formation constant (K_c) of the inclusion complex between TBC and OH- β -CDs. This value is similar to that described for the oxidation of TBC by lipoxygenase (Núñez-Delicado et al., 1999a) in the presence of cyclodextrins. Similarly, the K_c obtained for TBC and γ -CDs was 603 M^{-1} . This K_c has never been described before.

To complete our study of the kinetic behavior of tyrosinase from *Streptomyces antibioticus* in the presence of CDs, the effect of inhibitors was studied using dopamine as substrate to avoid any interference of the substrate with CDs. Since the inhibitors used in Table 1 are highly hydrophilic, they did not interact with the CD core. Thus, two previously undescribed inhibitors for *S.*

antibioticus tyrosinase were found, hexestrol and hinokitiol. These two inhibitors were able to complex with cyclodextrins, entering its central cavity.

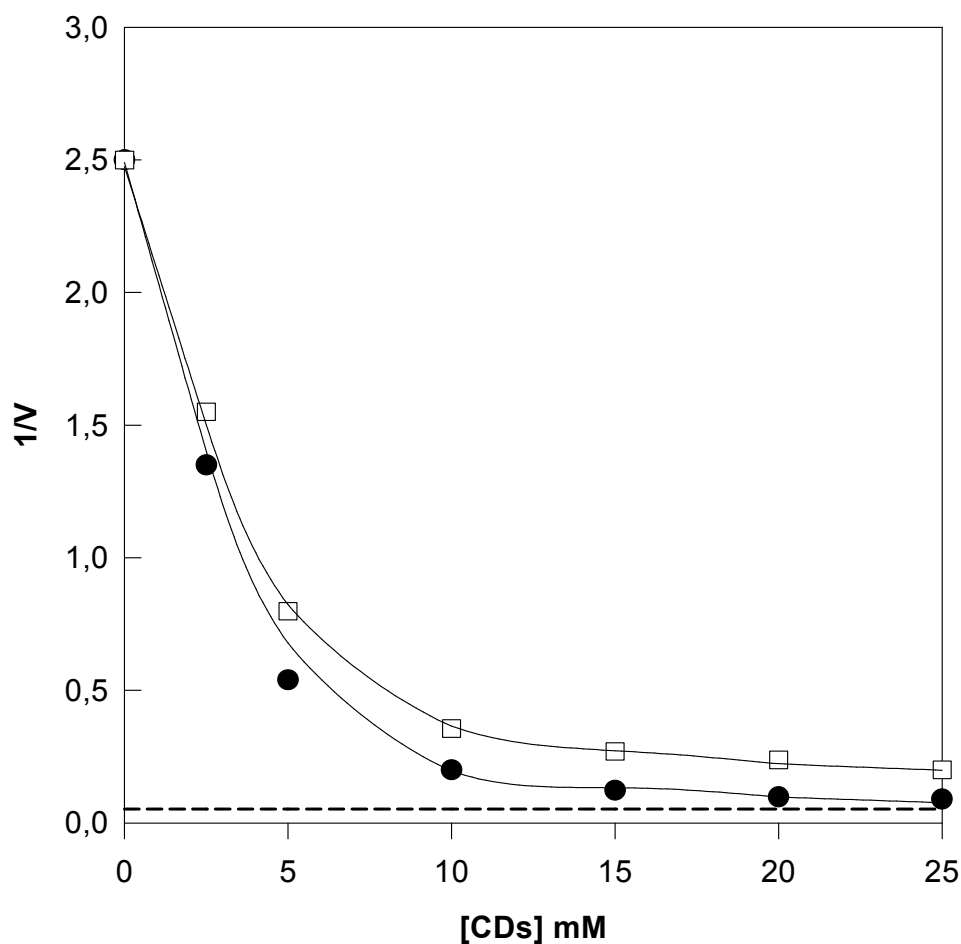


Figure VII.5. Effect of OH-β-CDs (●) and γ-CDs (○) on the oxidation of dopamine by tyrosinase in the presence of hinokitiol. The reaction medium at 25 °C contained 10 mM phosphate buffer (pH 6.5), 4 μg/mL of partially purified tyrosinase, dopamine 5 mM, hinokitiol 10 μM and increasing concentrations of CDs (0-25 mM). The dotted line represents the activity level without inhibitor. Solid lines represent the adjustment of experimental data to equation 7.

Hinokitiol shows the greater inhibition capacity because at 10 μM it completely inhibits the enzyme in the presence of dopamine. On the other hand, hexestrol only inhibits 36% at 10 μM . When the CD concentration was increased in the presence of any of the above inhibitors, a clear activation was found (Figures 5 and 6). At increasing CD concentrations, the enzyme was clearly uninhibited by hexestrol and hinokitiol, and the activity asymptotically approached the levels of activity obtained in the absence of inhibitors (0.053 min/mM). (Figures 5 and 6 dotted lines). This effect is more evident in the core of OH- β -CDs (Figures 5 and 6).

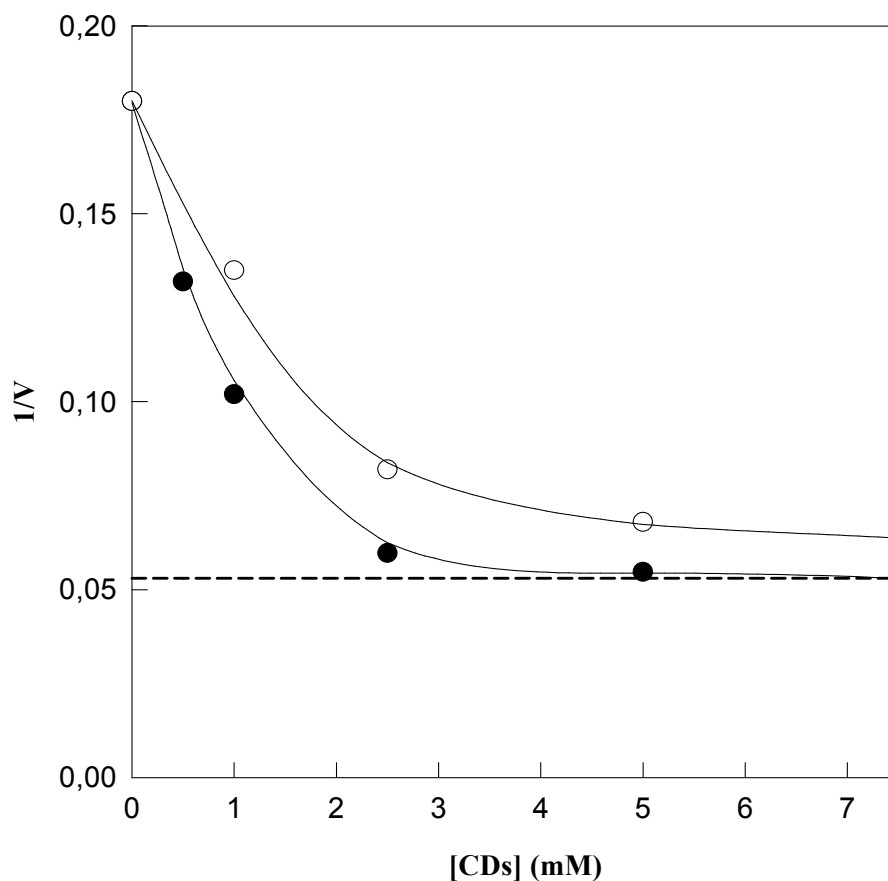
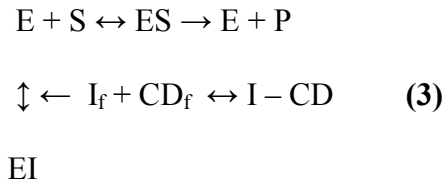


Figure VII.6. Effect of OH- β -CDs (●) and γ -CDs (○) on the oxidation of dopamine by tyrosinase in the presence of hexestrol. The reaction medium at 25 °C contained 10 mM phosphate buffer (pH 6.5), 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of partially purified tyrosinase, dopamine 5 mM, hexestrol 100 μM and increasing concentrations of CDs (0-7.5 mM). The dotted line represents the activity level without inhibitor. Solid lines represent the adjustment of experimental data to equation 7.

To understand the recovery of the activity in *Streptomyces antibioticus* tyrosinase when dopamine was used as substrate (Figures 5 and 6), a Michaelis-Menten equation for linear competitive inhibition must be obtained as a function of the known parameters, i.e., total CD concentration, total inhibitor concentration, V_{\max} and K_M . For this, the following scheme was assumed:



where subscript f refers to the concentration of the free inhibitor, in this case, hinokitiol or hexestrol, and I-CD refers to the complex formed by cyclodextrins and the inhibitory compound.

Assuming the above, the defining equation for linear competitive inhibition is:

$$v = \frac{V_m[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]_f}{K_I} + [S] \right)} \quad (4)$$

And thus

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_m[S]} + \frac{1}{V_m} + \frac{K_M}{V_m[S]K_I} [I]_f \quad (5)$$

where subscript f refers to the concentration of the free inhibitors – hexestrol and hinokitiol $[Ht]_f$. $[Ht]_f$ can be expressed as a function of $[Ht]_t$ in a similar way as described above for $[TBC]_f$ (Equation 1):

$$[Ht]_f = \left(-([CD]_t K_c - [Ht]_t K_c + 1) + \sqrt{([CD]_t K_c - [Ht]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [Ht]_t} \right) / 2K_c \quad (6)$$

and substituted in Equation 6 to give

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_m[S]} + \frac{1}{V_m} + \frac{K_M}{V_m[S]K_I} \left\{ -([CD]_t K_c - [H]_t K_c + 1) + \sqrt{([CD]_t K_c - [H]_t K_c + 1)^2 + 4K_c[H]_t} \right\} / 2K_c \quad (7)$$

Equation 7 shows a nonlinear relationship between $1/v$ and $[CD]_t$ as in Figures 5 and 6. Table 2 shows the data fitted by nonlinear regression.

Table VII.2. Kinetic constants of complexation between CDs and inhibitors after fitting the data of Figures 5 and 6 by nonlinear regression to Equation 7.

	Hinokitiol 10 μM		Hexestrol 100 μM	
OH-p-β-CDs	K_M	8.4	K_M	8.4
	V_{max}	62.5	V_{max}	48.36
	K_I	0.05	K_I	0.49
	K_c	12903.2	K_c	856
γ-CDs	K_M	8.4	K_M	8.4
	V_{max}	53.4	V_{max}	39.8
	K_I	0.05	K_I	0.49
	K_c	9813.5	K_c	792.6

When hinokitiol was used, the complexation constant (K_c) between this inhibitor and CDs was relatively high (12903 M^{-1}), showing that both hinokitiol and CDs form a good and stable complex. When hexestrol was used, the K_c obtained was lower (856 M^{-1}). The latter, is very similar to the value obtained for 4-iodophenol using PPO banana pulp (Sojo et al., 1999). In both cases, the complexation between OH- β -CDs and the inhibitors was better than the one with γ -CDs; this can be explained because modified cyclodextrins enhance the solubility of

otherwise water insoluble compounds and also because of the bigger cavity of γ -CDs, which reduces the hydrophobic interactions. These values cannot be compared because this is the first time that these inhibitors are used with any bacterial tyrosinase or PPO in the presence of CDs.

5. Conclusions

This paper deals with the kinetic characterization of diphenolase activity from *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. Of the several inhibitors used, hinokitiol, hexestrol and tropolone were the best. Moreover, none of them has been described previously for any bacterial tyrosinase. In addition, natural occurring compounds like cyclodextrins, which are used in food technology and in pharma, can release the inhibitory effect of the above inhibitors. This effect is also described for the first time in bacteria. These results, together with the simple purification system described by our group for this enzyme (Orenes-Piñero et al., 2006a), could lead to a low cost enzyme for pharmaceutical, food and polymer industries for transforming insoluble substrates in the presence of cyclodextrins.

Acknowledgements

This work was partially supported by MEC and FEDER (BIO2004-00439), and Fundación Séneca (00608/PI/2004). E.O.P. is a holder of predoctoral research grant from Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.

Literature Cited

- Bernan, V.; Filpula, D.; Herber, W.; Viv, M.; Katz, E. The nucleotide sequence of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* and characterization of the gene product. *Gene*. **1985**, *37*, 101-110.
- Bubacco, L.; Vijgenboom, E.; Gobin, C.; Tepper, AW.; Salgado, J. Kinetic and parametric NMR investigations of the inhibition of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. *J. Mol. Catal. B*. **2000**, *8*, 27-35.
- Cai, Y.; Gaffney, HG.; Lilley, TH.; Magnolato, D.; Martin, R.; Spencer, CM.; Haslam, E. Polyphenol interactions. Part 4, Model studies with caffeine and cyclodextrins. *J. Chem. Soc. Pekin Trans*. **1990**, *2*, 2197-2209.
- Fayad, N.; Marchal, L.; Billaud, C.; Nicolas, J. Comparison of β -cyclodextrin effect on polyphenol oxidation catalyzed by purified polyphenol oxidase from different sources. *J. Agric. Food. Chem*. **1997**, *45*, 2442-2446.
- Golan-Goldhirsh, A.; Whitaker, JR. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem*. **1984**, *32*, 1003-1009.
- Harald, C.; Decker, H. Bacterial tyrosinases. *Sist.. Appl. Microbiol*. **2006**, *29*, 1-14.
- Hicks, KB.; Sapers, GM.; Seib, PA. Process for preserving raw fruit and vegetable juices using cyclodextrins and compositions thereof, U.S.Pat. 4,975,293; **1990**.
- Ikediodi, CO.; Obasuyi, HN. Purification and some properties of *o*-diphenolase from white yam tubers. *Phytochemistry*. **1982**, *21*, 2815-2820.
- Jiménez, M.; García-Carmona, F. The effect of sodium dodecyl sulphate on polyphenol oxidase. *Phytochemistry*. **1996**, *42*, 1503-1509.
- Katz, E.; Betancourt, A. Induction of tyrosinase by L-methionine in *Streptomyces antibioticus*. *Can. J. Microbiol*. **1988**, *34*, 1297-1303.
- Kenten, RH. Latent phenolase in extracts of broad bean (*Vicia faba* L.) 1. Activation by acid and alkali. *Biochem. J*. **1957**, *67*, 300-307.

- Kenten, RH. Latent phenolase in extracts of broad bean (*Vicia faba* L.) leaves. 2. Activation by anionic wetting agents. *Biochem. J.* **1958**, *68*, 244-251.
- Kritharides, L.; Kus, M.; Brown, AJ.; Jessup, W.; Dean, RT. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-mediated efflux of 7-ketocholesterol from macrophage foam cells. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 27450-27455.
- Kutzner, HJ. Über die Bildung von Huminstoffen durch Streptomyceten. *Landwirt. Forsch.* **1968**, *31*, 48-61.
- Kwang-Hoon, K.; Min-Pyo, H.; Sang-Sook, C.; Yong-Tae, K.; Sung-Hye, C. Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2000**, *31*, 113-118.
- Lerch, K.; Ettliger, L. Purification and characterization of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *Eur. J. Biochem.* **1972**, *31*, 427-437.
- Núñez-Delicado, E.; Sánchez-Ferrer, A.; García-Carmona, F. Cyclodextrins as secondary antioxidants: synergism with ascorbic acid. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2830-2835.
- Núñez-Delicado, E.; Sojo, MM.; Sánchez-Ferrer, A.; García-Carmona, F. Hydroperoxidase activity of lipoxygenase in the presence of cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999a**, *367*, 274-280.
- Núñez-Delicado, E.; Sojo, MM.; Sánchez-Ferrer, A.; García-Carmona, F. Cyclodextrins as diethylstilbestrol carrier system: characterization of diethylstilbestrol-cyclodextrins complexes. *Pharm Res.* **1999b**, *16*, 854-858.
- Núñez-Delicado, E.; Sojo, MM.; García-Carmona, F.; Sánchez-Ferrer, A. Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 2058-2063.
- Orenes-Piñero, E.; Sánchez-Ferrer, A.; García-Carmona, F. Kinetic characterization of cresolase activity *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. *Enzyme Microb Technol.* **2006a**, *39*, 158-163.
- Orenes-Piñero, E.; García-Carmona, F.; Sánchez-Ferrer, A. Latent Polyphenol oxidase from Quince fruit pulp (*Cydonia oblonga*): Purification, activation and some properties. *J. Sci. Food Agric.* **2006b**,

- Sojo, MM.; Núñez-Delicado, E.; García-Carmona, F.; Sánchez-Ferrer A. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 8000 for removal of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4924-4930.
- Sojo, MM.; Núñez-Delicado, E.; García-Carmona, F.; Sánchez-Ferrer, A. Cyclodextrins as activator and inhibitor of banana pulp polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 518-523.
- Streffer, K.; Vijgenboom, E.; Tepper, AW.; Makower, A.; Scheller, FW.; Canters, GW.; Wollenberger, U. Determination of phenolic compounds using recombinant tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. *Anal. Chim. Acta.* **2001**, *427*, 201-210.
- Valero, E.; Varón, R.; García-Carmona, F. Kinetic study of the effect of metabisulfite on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 904-908.
- Wititsuwannakul, D.; Chareonthiphakorn, N.; Pace, M.; Wititsuwannakul, R. Polyphenol oxidases from latex of *Hevea brasiliensis*: purification and characterization. *Phytochem.* **2002**, *61*, 115-121.
- Yang, CP.; Fujita, S.; Kohno, K.; Kusubayashi, A.; Ashrafuzzaman, M.; Hayashi, N. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum L.*) peel. *J Agric Food Chem.* **2001**, *49*, 1446-1449.
- Yi-Feng, T.; Hong-Yuan, C. Studies of a disposable biosensor based on the β -cyclodextrin inclusion complex as mediator. *Anal. Biochem.* **2001**, *299*, 71-77.

CAPÍTULO VIII

“Synthesis of hidroxytyrosol using transformed *E. coli* whole cells with phenol hydroxylase gene from a thermophilic bacteria”

Synthesis of hydroxytyrosol using transformed *E. coli* whole cells with phenol hydroxylase gene from a thermophilic bacterium

Esteban Orenes-Piñero; Francisco García-Carmona and Alvaro Sánchez-Ferrer*

Department of Biochemistry and Molecular Biology-A, Faculty of Biology,
University of Murcia, Campus Espinardo, E-30071 MURCIA, Spain.

Running title: Synthesis of hydroxytyrosol using a transformed whole cell system

*To whom correspondence should be addressed:

Prof. Álvaro Sánchez-Ferrer

Department of Biochemistry and Molecular Biology-A, Faculty of Biology,
University of Murcia, Campus Espinardo, E-30071 MURCIA, Spain.

Fax: +34 968364147

e-mail: alvaro@um.es

Abstract

Cloning the gene *pheA* from the thermophilic bacteria *Geobacillus thermoglucosidasius* into *E.coli* Rosseta carried out the development of an effective procedure to hydroxylate tyrosol into a high-added-value compound like hydroxytyrosol. Phenol hydroxylase thus obtained is a two-component enzyme encoded by *pheA1* and *pheA2* genes. These two genes were subcloned together as a 2 Kb fragment in *E. coli* Rosetta and the transformants were able to grow and degrade phenol and tyrosol up to 5 mM, using IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) as an inducer. Moreover, a new fragment with 340 pb upstream *pheA1* gene was subcloned and a similar degradation rate was attained without IPTG, confirming that this fragment encodes for a phenol hydroxylase promoter that can be recognized by *Escherichia coli*. Both transformants achieved the total bioconversion of monophenols with a concentration 5-fold that previously described for this genus in the bibliography. This good conversion rate could not be obtained with polyphenol oxidase from *Cydonia oblonga* pulp or tyrosinase from *Streptomyces antibioticus* immobilized on different supports. The use of the transformant with its constitutive promoter is probably more interesting from a biotechnological point of view, since it is not necessary to use IPTG and also it has higher operational stability.

Introduction

Phenolic compounds are widespread in nature and the hydroxylation of aromatic rings is a fundamental reaction for the preparation of many active compounds (Allouche and Sayadi, 2005). This hydroxylation, which can be produced by several microorganisms, is an interesting method to obtain products of high added value for pharmaceutical, chemical or food companies in a single step reaction under mild conditions (Semba et al., 1996). These products are considered natural since the European Community Legislation includes compounds produced by living cells or enzymes from a natural source under the term “natural products” (Eyal et al., 2006).

On the other hand, phenolic derivatives are common pollutants in the wastewaters of oil refineries, petrochemical plants or olive oil mills. Phenol removal is a key process for the biodegradation of pollutants at high temperatures because even low concentrations of phenol can severely inhibit microorganism growth (Feitkenhauer et al., 2001).

Mesophilic microorganisms are widely used for degrading aromatic compounds but little is known about the transformation of these derivatives by thermophilic bacteria like *Geobacillus thermoglucosidasius* (Duffner et al., 2000; Kirchner et al., 2003). This microorganism degrades phenol through hydroxylation of the ring and subsequent ring fission by *meta*-cleavage (Duffner et al., 2000).

Hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphenylethanol) is the most abundant *ortho*-diphenol compound occurring in olive oil (Angerosa et al., 1995). It has powerful antioxidant properties and presents several interesting aspects for human health (Visioli et al., 2002). For example, *in vitro* results demonstrated that hydroxytyrosol inhibits human low-density lipoprotein oxidation (Arouma et al., 1998), scavenges free radicals (Visioli et al., 1998), inhibits platelet aggregation (Petroni et al., 1995) and leucotriene production for human neutrophils (De la Puerta et al., 1999), and confers cells protection (Manna et al., 1997). Moreover, it acts as an antibacterial agent *in vitro* (Bisignano et al., 1999) and recently it has been demonstrated to have

good bioavailability, which favors its addition to food (Manna et al., 2000). Although several studies exist about phenol hydroxylase from *Geobacillus thermoglucosidasius* (Duffner et al., 1998; Kirchner et al., 2003; Van der Heuvel et al., 2004), there are no studies concerning the bioconversion of this high valuable phenolic compound.

The aim of this paper is twofold: it not only represents the first study of tyrosol [2-(4-hydroxyphenyl)ethanol] hydroxylation to the corresponding hydroxytyrosol, using a phenol hydroxylase from the thermophilic microorganism *G. thermoglucosidasius* expressed into *E. coli* with and without IPTG induction, but also develops a new whole-transformed-cell system with a thermophilic phenol hydroxylase for synthesizing hydroxytyrosol. In addition, this bioconversion rate of tyrosol to hydroxytyrosol is compared with immobilized polyphenol oxidases or tyrosinases, like those obtained from quince fruit pulp (*Cydonia oblonga*) and *Streptomyces antibioticus*.

Material and Methods

- Materials

Geobacillus thermoglucosidasius A7 was obtained from DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Germany) with the accession number DSM 2542 and was cultured at 65 °C in HF medium containing 1% yeast extract, 0.2% (w/v) tryptone and 1 mM phenol, as described previously (Kirchner et al., 2003). The *E. coli* Rosetta (Novagen), used for construction and maintenance of plasmids, was cultured at 37 °C on Luria-Bertani (LB) medium. Phenol, tyrosol, ascorbic acid, sodium periodate, kanamycin and IPTG were purchased from SIGMA (Madrid, Spain). Restriction enzymes, T4 ligase and DNA polymerase (High-Expand Fidelity PCR System) were purchased from Roche. The plasmids pET-28a and pET-Duet were obtained from Novagen.

- Cloning of *pheA* gene from *G thermoglucosidasius* into *E. coli* Rosetta:

The genomic sequence that encodes *Geobacillus thermoglucosidasius* phenol hydroxylase gene was obtained online from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Oligonucleotides OL96 (CGGATCCATGAAAGATATGATGAATGGC), where the introduced *Bam*HI site is underlined, and OL97 (CCTTAAGTTAGCTCGACGTC TCCACTTT), where the introduced *Eco*RI site is underlined, were used to amplify the phenol hydroxylase gene without promoter from *Geobacillus thermoglucosidasius* genomic DNA, while OL126 (CCGGATCCCTGCGCGGGGCGGATGTGATT), OL127 (CCGGATCCTTAGCTCGACGTCTCCACTTTTTCG), where the introduced *Bam*HI restriction sites are underlined, were used in the amplification of the same gene with its own promoter. All of them were synthesized by Roche (Roche Spain, Barcelona). The amplification program was 2 min at 95 °C, followed by 30 repeats of 30 s at 95 °C, 30 s at 61 °C and 2.5 min at 72 °C, with a final step of 10 min at 72 °C.

The first PCR product was digested with *Bam*HI and *Eco*RI and subcloned into *Bam*HI/*Eco*RI pET-28a vector (Novagen) to form pET-*pheA*. The second PCR product was digested only with *Bam*HI and cloned into *Bam*HI pET-28a vector (Novagen), to form pET-*pheA** (with its own promoter).

Plasmids were introduced into *E. coli* Rosetta (Novagen) by electroporation and *E. coli* Rosetta harbouring pET-*pheA* (*E. coli-pheA*) and pET-*pheA** (*E. coli-pheA**) were cultivated on LB agar plates supplemented with 50 µg/mL of kanamycin. After 12 hours, colonies were picked into 96-well sterile plates containing 200 µL of LB broth with kanamycin. After 12 hours, they were induced for the production of phenol hydroxylase with 1 mM of IPTG (when necessary), for the same period, at 30 °C. After that, induced cells were harvested by centrifugation at 1700 x g for 20 min on a microplate centrifuge Sigma 2-16K (Sigma, Germany) and resuspended into new LB kanamycin medium with 5 mM of the corresponding monophenol. After 9 hours, *E. coli-pheA* and *E. coli-pheA** cells were harvested by centrifugation at 1700 x g for 20 min and the supernatants (containing the

biosynthesized diphenols) from each well were collected on an assay microplate for activity analysis.

In order to co-express the two genes together, a pET-Duet vector was used. Oligonucleotides OL193 (CCGGATCCGATGAAAGATATGATGAATGGC AAGGAA), where the introduced *Bam*HI site is underlined, and OL194 (GGAATTCTTATTTCTGAACAATTTCTTTTTTCGGAGACAC), where the introduced *Eco*RI site is underlined, were used to amplify the *pheA1* subunit of phenol hydroxylase gene from *Geobacillus thermoglucosidasius* genomic DNA. Oligonucleotides OL195 (CCCATATGATGGACGATCGCTTATTTTCGCAATG CA), where the introduced *Nde*I site is underlined, and OL196 (CCTCGAGTTAGCTCGACGTCTCCACTTTTTTCG), where the introduced *Xho*I site is underlined, were used to amplify the *pheA2* subunit of phenol hydroxylase gene. The amplification programs were 2 min at 95 °C, followed by 30 repeats of 30 s at 95 °C, 30 s at 64 °C and 2 min at 72 °C, with a final step of 10 min at 72 °C.

The *pheA1* PCR product was digested with *Bam*HI/*Eco*RI and subcloned into *Bam*HI/*Eco*RI pET-Duet vector (Novagen). The *pheA2* PCR product was digested with *Nde*I/*Xho*I and subcloned into the same pET-Duet vector, now digested with *Nde*I/*Xho*I, to obtain the vector with the two genes together. Later, the plasmid was introduced into *E. coli* Rosetta (Novagen) by electroporation.

- High-throughput enzymatic assay

To measure the phenol hydroxylase activity with high-throughput in 96-well plates, we developed a new colorimetric method, based on the addition of sodium periodate to the above described assay microplate. The oxidant converts the o-diphenol generated by phenol hydroxylase in the supernatant to its corresponding o-quinone, causing a yellow color to appear. The reaction medium contained in a total volume of 200 µL, 180 µL of cell-free supernatant and 20 µL of 100 mM sodium periodate. Activities were measured at 400 nm on a microplate reader Synergy HT (Biotek, USA) under kinetic mode at 37 °C.

Clones that showed higher rates of activity were selected from a master plate and grown in 50 mL Terrific Broth (TB) kanamycin to late-exponential phase. 1 mM of IPTG was added and incubated overnight (when necessary). TB medium was only used to increase the growth of the culture cells. After incubation on TB, cells were centrifuged at 6000 x g for 15 minutes and transferred to a new 50 mL LB medium to follow the bioconversion of monophenol into diphenol due to its lower cost and the presence of lower amounts of inorganic salts that could be harmful for the HPLC. This LB medium also contained kanamycin, 10 mM of ascorbic acid, and 5 mM of phenol or tyrosol. The bioconversion reaction was monitored and incubated on a rotary shaker at 37 °C. Samples were withdrawn periodically, filtered with 0.22 µm nylon syringe filters and analyzed by HPLC.

- HPLC analysis

HPLC analyses were carried out in an Agilent 1100 at 280 nm with a constant flow rate of 1 mL/min. The mobile phase consisted of 60% tetrabutylammonium bisulfate, and 185 mM potassium dihydrogen phosphate in water, 40% methanol (HPLC grade from Labscan) adjusted to pH 6.5 with 3 M ammonia. The column used was a Kromasil C8, 5 µm, 150 x 4.6 mm and its temperature was fixed at 30 °C.

The retention time obtained for phenol, catechol, tyrosol and hydroxytyrosol were 10.7 min, 5.7 min, 4.3 min and 3.1 min, respectively. The commercial patterns of these compounds are shown in Figure 1, except for hydroxytyrosol, whose identity was verified with a GC-MS and NMR analysis.

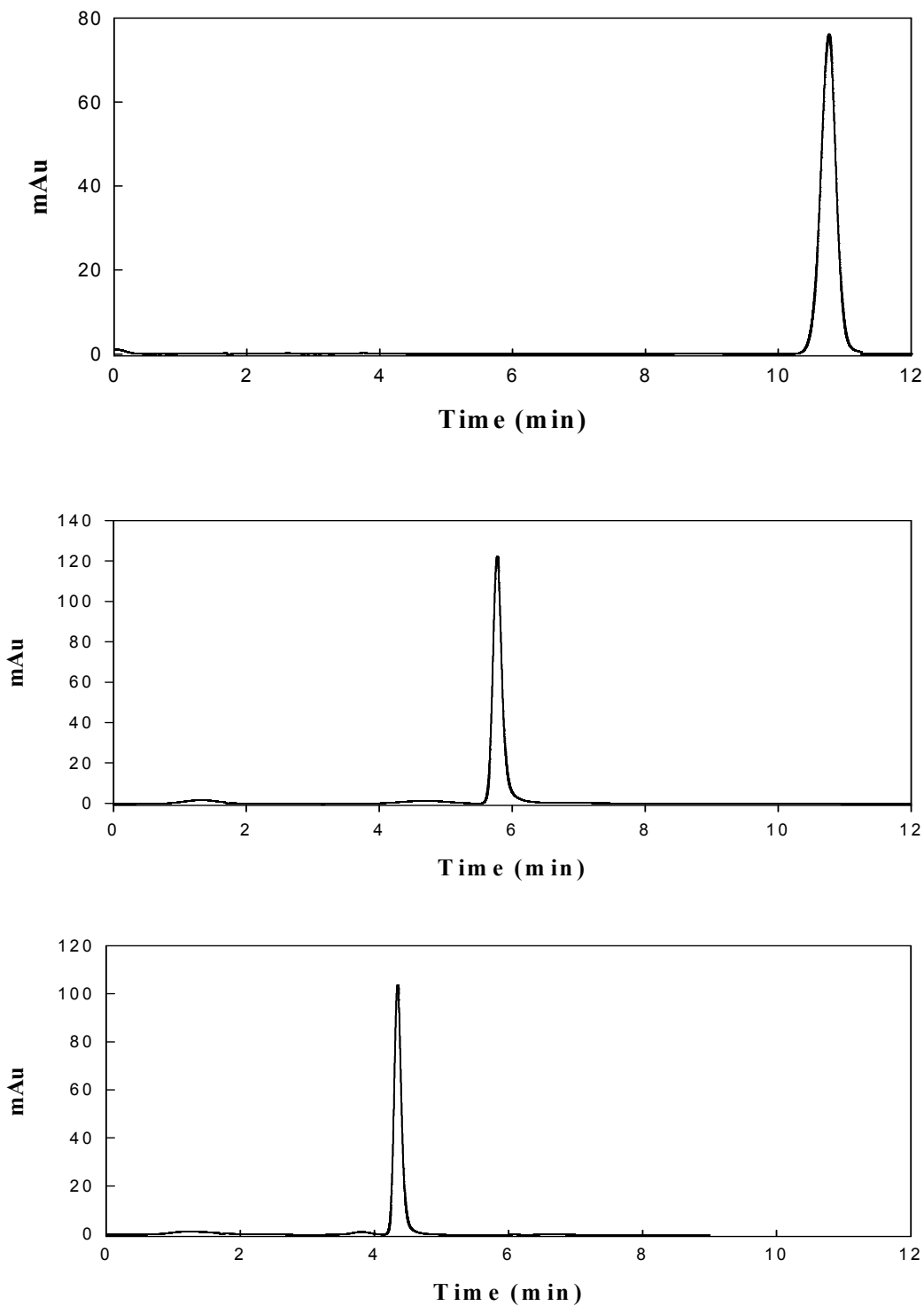


Figure VIII.1. HPLC patterns of phenolic compounds. (A) Phenol; (B) Catechol; (C) Tyrosol in 60% tetrabutylammonium bisulfate, and 185 mM potassium dihydrogen phosphate in water, 40% methanol mobile phase at 280 nm.

- GC-MS and NMR analysis

The hydroxytyrosol obtained from the growth medium of *E. coli*-pheA was purified using a column with a hydrophobic polystyrene resin (Amberlite XAD-4), extracted with 30% methanol in water and dissolved in DMSO-d6.

To carry out the GC-MS, the instrument used was an Agilent 5973 Mass Spectra coupled with an Agilent 6890N Gas Chromatograph. The analytical capillary column was an HP-5MS with a length of 30 m using Helium as carrier gas.

The NMR instrument was a Bruker Avance 300 Hz equipped with a QNP probe with gradient for liquid or dissolved samples in 5 mm tubes for ^1H , ^{13}C , ^{31}P and ^{19}F nucleus.

- Immobilization of tyrosinase/PPO

- *Binary immobilizations*

Immobilization of tyrosinase from *Streptomyces antibioticus* and polyphenol oxidase from quince fruit pulp (*Cydonia oblonga*) was carried out as described by Yahsi et al. (2005). Briefly, the first immobilization was developed using alginate gel beads. Enzyme solutions (70 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added in Na-alginate solution (95 mL, 1% w/v). This mixture added dropped wise to 0.27 M CaCl_2 solution. As a result of this procedure, tyrosinase/PPO was entrapped in Ca^{2+} -alginate spherical beads. The immobilized enzyme was washed twice with distilled water. Beads were stored in 0.027 M CaCl_2 solution at 4 °C for 24 hours. After which, surface modifications of the Ca^{2+} -alginate beads were made by adding 50 mL of epichlorhydrin solution and stirring at 25 °C for 12 hours. Later, a new enzyme solution was used to attach tyrosinase/PPO to the beads surface at 25 °C in a water bath that was shaken for 12 hours.

The second type of immobilization was performed by using a mixture of poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels followed by the immobilization of more

tyrosinase molecules through its amino groups, which were activated by epichlorhydrin. Hydrogels were synthesized by free-radical crosslinking polymerization of acrylamide and acrylic acid using a small amount of bisacrylamide as the crosslinker. Ammonium persulfate and TEMED were used as the redox initiator system. The same enzyme solutions were used. After polymerization, hydrogels were cut into cubes and waited in distilled water for 1 hour at 4 °C. As a result of the first immobilization procedure, tyrosinase/PPO were entrapped in the hydrogels. Binary immobilization was carried out with epychlorhydrin in the same manner.

- *Immobilization on hydrophilic membranes*

Immobilization was carried out using the method described by Boshoff et al. (2002). In brief, nitrocellulose membrane disks were soaked overnight in distilled water. Each membrane was then placed in a 10 mL solution of tyrosinase/PPO. Membranes were left in the enzyme solutions for 1 hour at 4 °C. Glutaraldehyde was then added to a final concentration of 1%, and a further 30 minutes was allowed for crosslinking. Membranes were removed, washed twice in 50 mM phosphate buffer pH 7.0 and then used for biocatalytic reactions.

- Protein analysis

The molecular mass under denaturing conditions (SDS-PAGE) was performed at room temperature using 10% acrylamide resolving gel and 5% acrylamide stacking gel. Protein percentage and size were determined using an Image Scanner (Amersham Biosciences) by analyzing the image obtained with the Image Quant TL (Amersham Biosciences) software. Soluble fractions were purified by thermoprecipitation, heating the samples at 65 °C for 30 min. Samples were centrifugated at 14000 x g for 10 min, thus eliminating, most of the proteins from *E. coli*.

Results

- Cloning and over-expression of *pheA1* and *pheA2*

The initial degradation of phenolic compounds by *Geobacillus thermoglucosidasius* in nature is carried out by a two-component protein named phenol hydroxylase (PheA). The large component is encoded by *pheA1* gene and gives rise to a 57 kDa protein. This protein has hydroxylase activity, it is a homodimer, but has no activity on its own. The minor component (encoded by *pheA2* gene) has a predicted molecular mass of 17.8 kDa; it is also a homodimer and show reductase activity (Duffner et al., 2000). This enzyme is an unusual example of a two-component flavoprotein hydroxylase, in which flavin reduction and substrate oxygenation take place in the same protein (Van der Heuvel et al., 2004).

Genomic DNA from *Geobacillus thermoglucosidasius* was used to amplify the gene *pheA* with a PCR reaction using the four primers described in Materials and Methods. Once the gene was amplified, it was digested with the restriction enzymes *Bam*HI-*Eco*RI (gene without phenol hydroxylase promoter) and *Bam*HI-*Bam*HI (gene with its constitutive promoter), obtaining fragments of 2 Kb, and a 2.3 Kb, respectively. This bigger size of the second digested fragment is due to the presence of the *Geobacillus thermoglucosidasius pheA1* promoter. After ligation with pET-28a, the constructs pET-*pheA* and pET-*pheA** (with its own promoter) (Figures 2 A and B), were transformed into *E. coli* Rosetta.

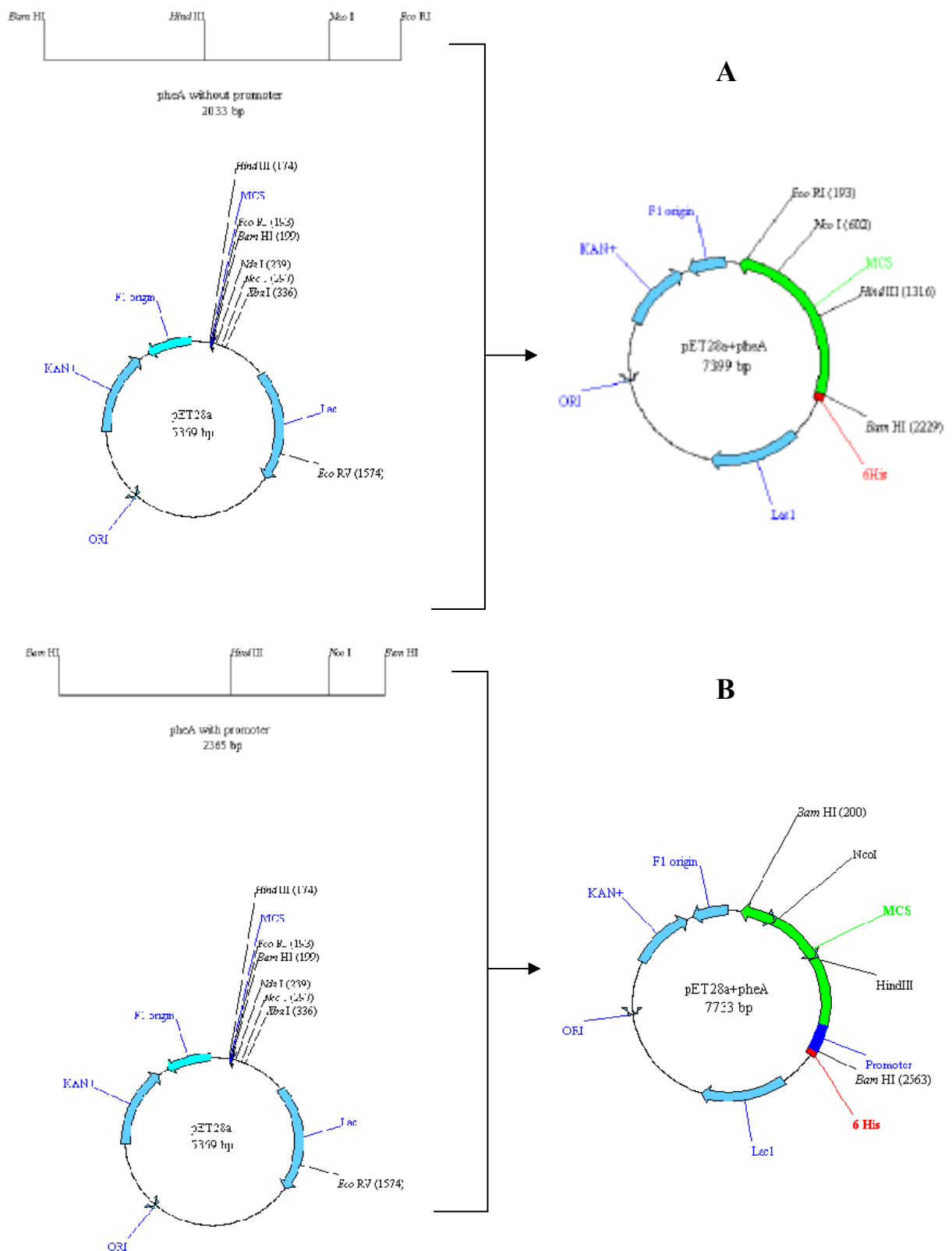


Figure VIII.2. (A). Strategy for construction of pET-*pheaA*. (B). Strategy for construction of pET-*pheaA**. Expression plasmids were built as described in Materials and Methods.

Although both protein components (PheA1 and PheA2) are necessary for phenol hydroxylase activity, *E. coli* containing the plasmid pET-28a with the genes in tandem did not express PheA2 and only one clear protein band (PheA1) could be detected by SDS-PAGE (Figure 3; line B).

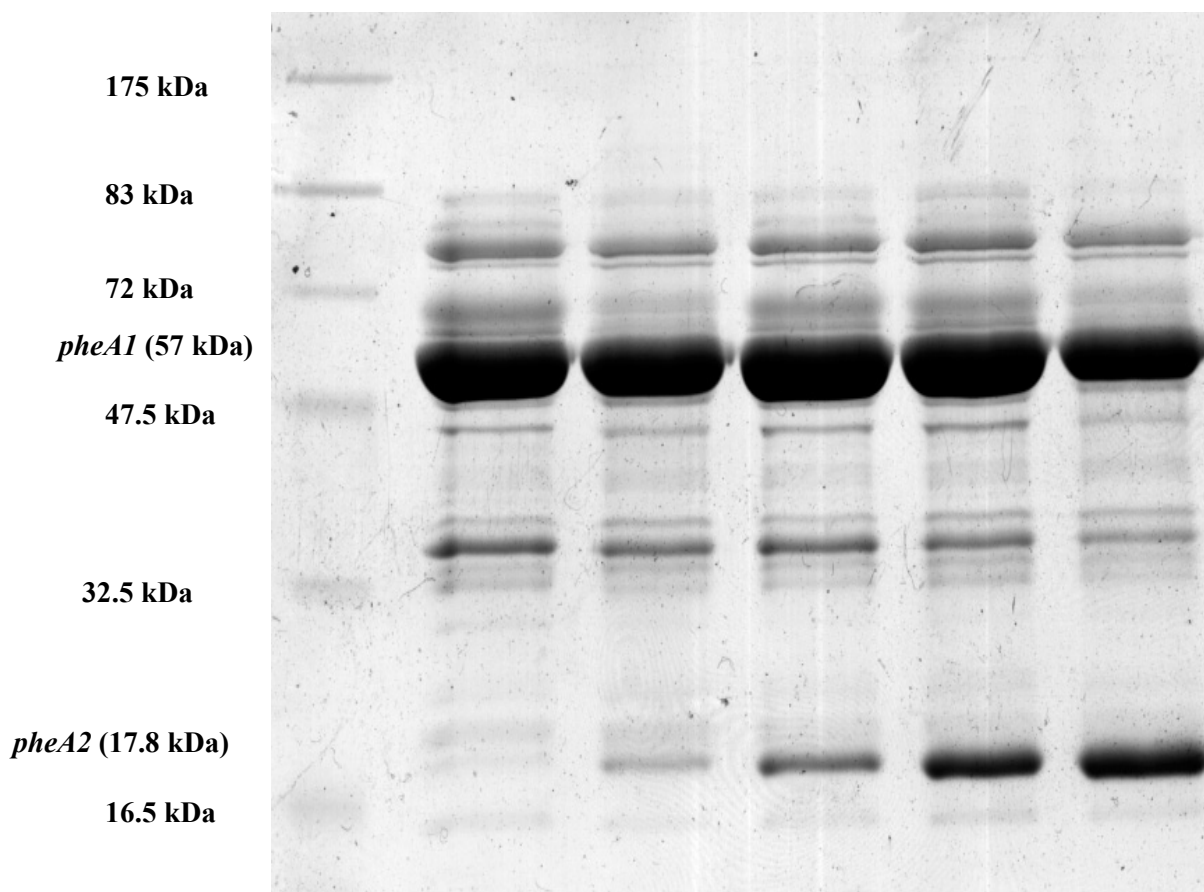


Figure VIII.3. SDS-PAGE 10% acrylamide resolving gel. Lane A, molecular markers (in kDa). Lane B, soluble fraction of *E. coli-pheA* with overnight induction with 1 mM IPTG and after 30 minutes at 65 °C for thermoprecipitation of *E. coli* proteins. Lanes C-F, soluble fractions using pET-Duet system with the two components of *G. thermoglucosidasius* phenol hydroxylase after 3, 6, 9 and 12 hours of induction with 1 mM IPTG in *E. coli* Rosetta and after 30 minutes at 65 °C for the thermoprecipitation of *E. coli* proteins.

The over-expression of PheA1 reached in this study was superior to 40% of the total amount of protein, whose molecular mass was 57 kDa, but no expression was found for the band of 17.8 kDa (subunit PheA2). It seems that, in this construct, *pheA2* expression uses its own *Geobacillus thermoglucosidasius* ribosome-binding site, which might not be effective in *E. coli*. (Van der Heuvel et al., 2004). This assumption was demonstrated when both genes were cloned in the pET-Duet vector (Novagen) which permits the co-expression of genes. In this case, the oxidase and the reductase component were expressed (Figure 3; lines C-F). However, when activity was followed, the clone with only *pheA1* into pET-28a and the clone with *pheA1* and *pheA2* into pET-Duet, give rise to the same activity. These results indicate that that *E. coli* Rosetta can supply the reductase component needed for phenol hydroxylase activity.

- Conversion of phenol or tyrosol by transformants with and without its promoter:

Transformants of *E. coli* Rosetta that showed the highest bioconversion rate of monophenols to its corresponding *o*-diphenols (see Material and Methods) were grown on TB medium with kanamycin to obtain a big amount of biomass before starting biocatalyst. When an absorbance of 3.5 was reached, 1 mM of IPTG was added (when necessary) and incubated overnight. When no IPTG was used, the overnight incubation was avoided. Afterwards, the cells were centrifuged at 6000 x *g* for 10 minutes. The medium was discarded and cells were washed twice. In all biotransformation experiments, the amount of transformed cells used was 1.5 g dry weight.

These cells (*E. coli-pheA* and *E. coli-pheA**) were then transferred to a new LB-kanamycin medium (50 mL) with 10 mM of ascorbic acid to avoid the oxidation of the diphenols synthesized, and 5 mM of phenol or tyrosol. The resulting bioconversion rate was followed by HPLC. Figures 4 and 5 show the time course of the monophenolic compound depletion and the concomitant diphenol

accumulation in the medium after induction with IPTG and without induction (*pheA* promoter). The accumulation of diphenolic compounds increase constantly.

Regardless of the absence (+ IPTG) or the presence (- IPTG) of the *Geobacillus thermoglucosidasius* phenol hydroxylase promoter, all the monophenol was consumed, although the maximum concentration of diphenol was reached after 12 or 16 hours, respectively.

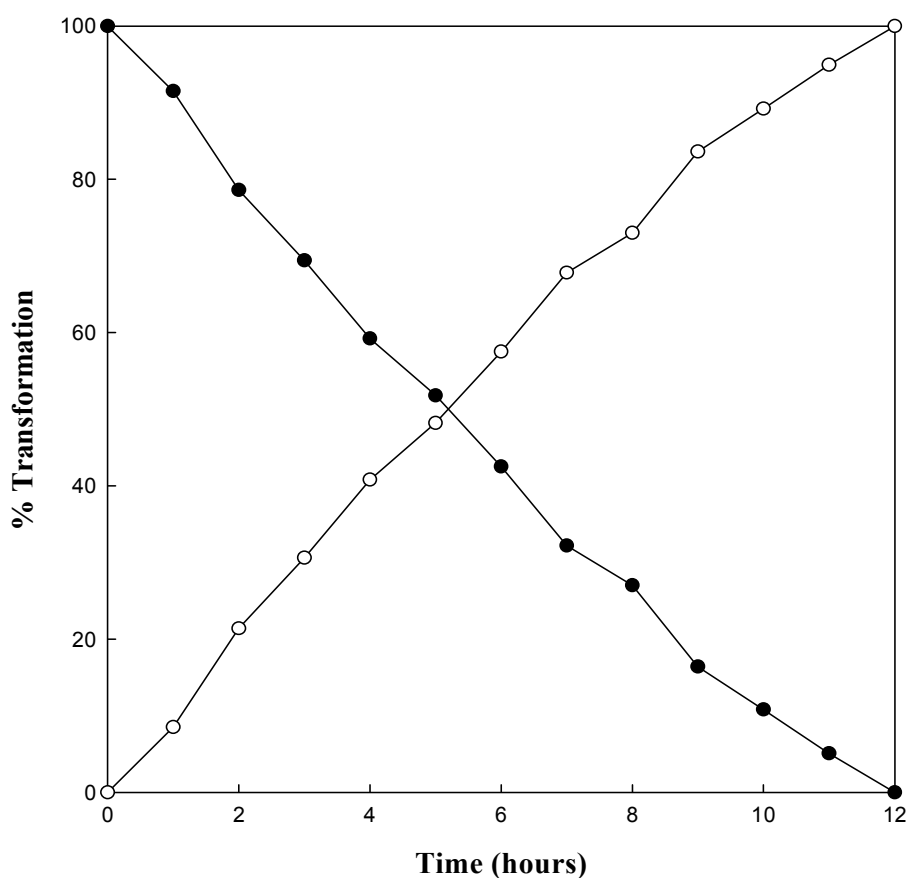


Figure VIII.4. Time-course transformation of phenol (●) into catechol (○) using *E. coli-pheA* at 37 °C in LB-kanamycin medium with 5 mM phenol and 10 mM ascorbic acid.

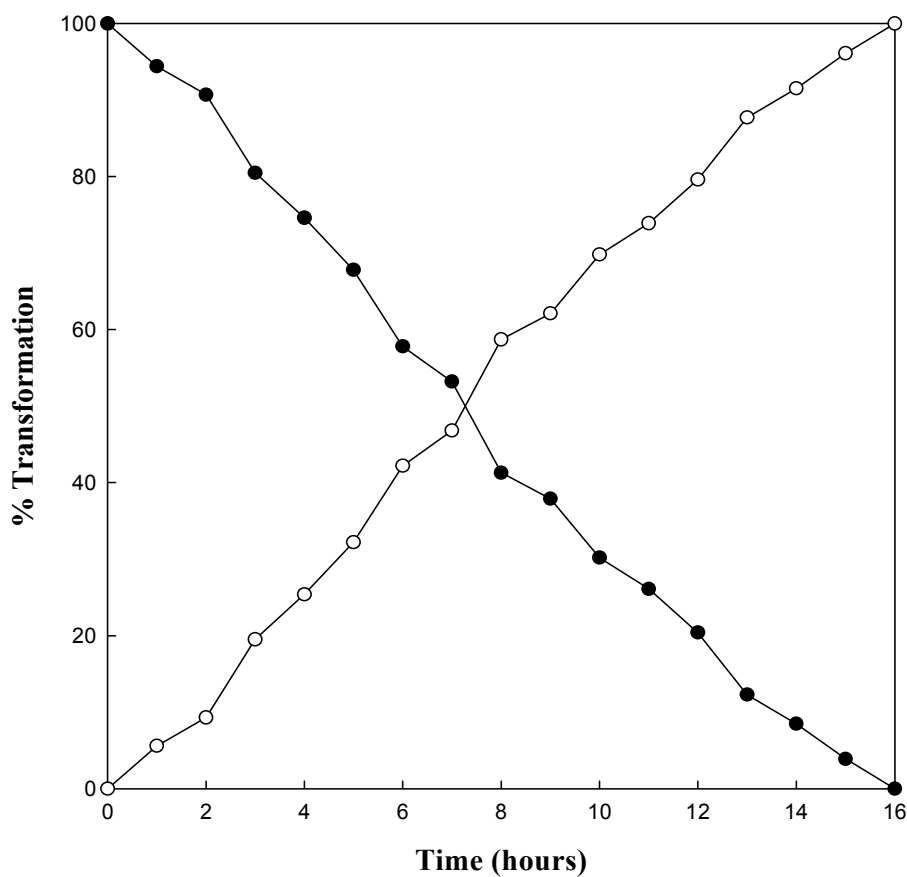


Figure VIII.5. Time-course transformation of phenol (●) into catechol (○) using *E. coli-pheA** at 37°C. The reaction medium is the same as in Figure 4.

When tyrosol was assayed, similar results were obtained, but the time needed to transform all the monophenol was shorter, 10 and 14 hours, respectively (Figures 6 and 7). In order to ensure that the hydroxylation of phenol and tyrosol was mediated by *G. thermoglucosidasius* phenol hydroxylase, new transformants with an empty vector were grown in the same medium and no bioconversion at all was found (data not shown).

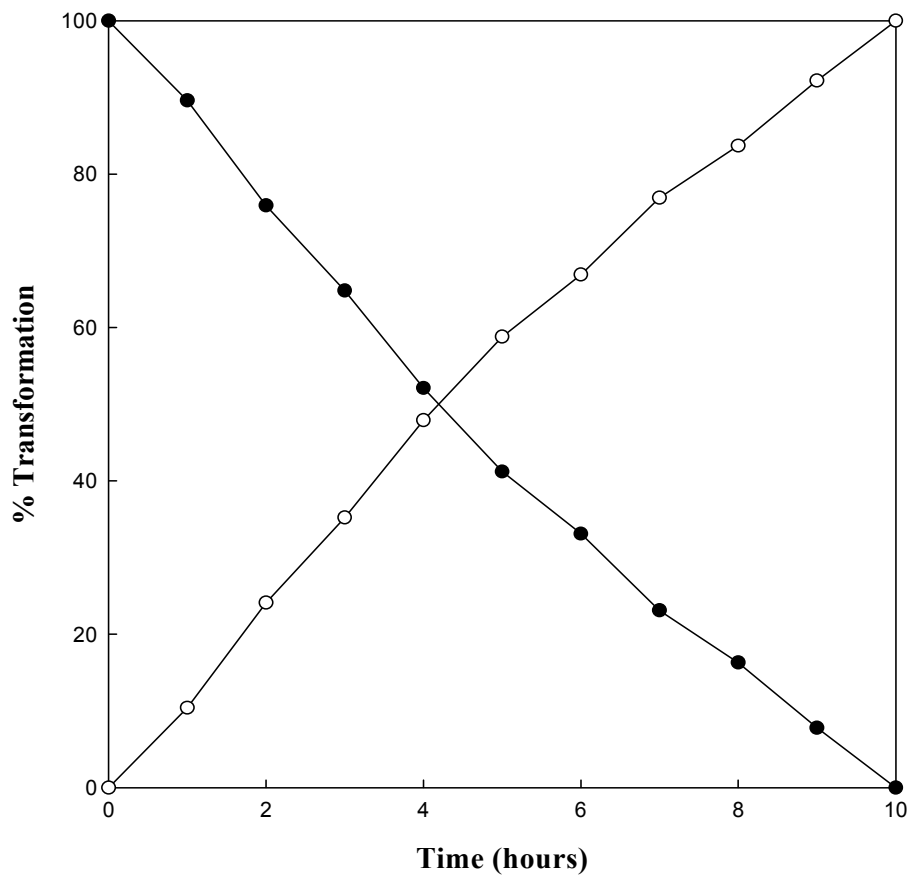


Figure VIII.6. Time-course transformation of tyrosol (●) into hydroxytyrosol (○) using *E. coli-pheA* at 37 °C in LB-kanamycin medium with 5 mM tyrosol and 10 mM ascorbic acid.

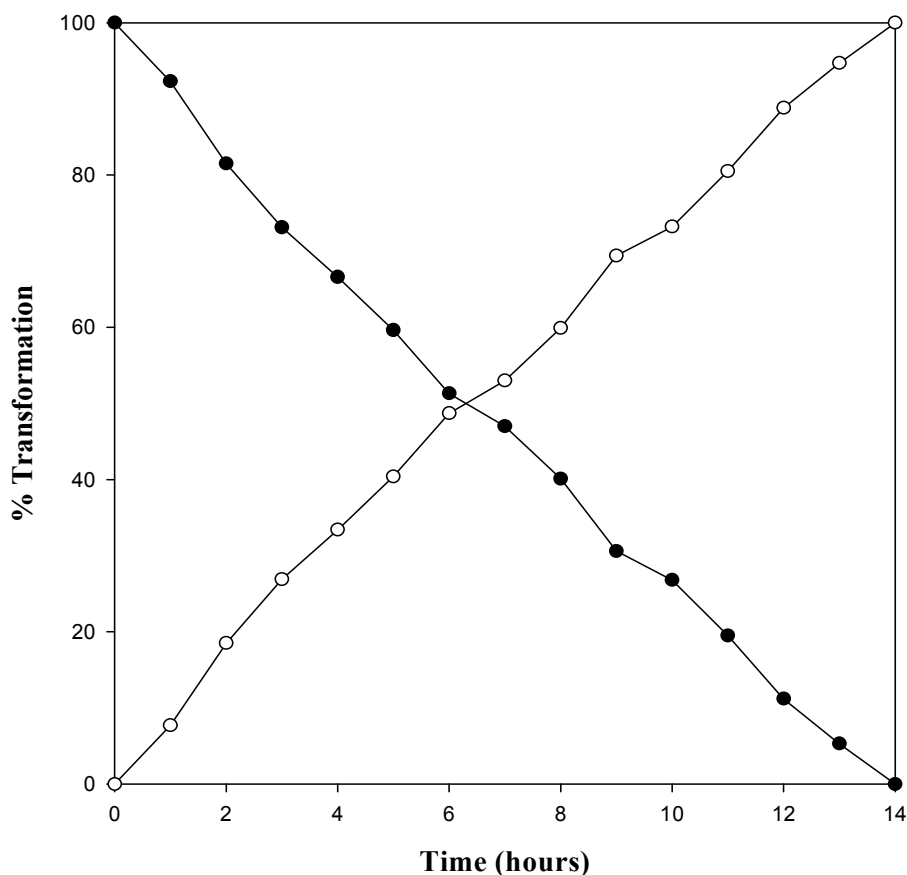


Figure VIII.7. Time-course transformation of tyrosol (●) into hydroxytyrosol (○) using *E. coli-pheA** at 37°C. The reaction medium is the same as in Figure 6.

To make sure that the compound synthesized by the transformed *E. coli* Rosetta was hydroxytyrosol, the reaction medium was passed through a hydrophobic resin (Amberlite XAD-4). The purified hydroxytyrosol product was analyzed by mass spectrography (GC-MS) and one-dimensional ($^1\text{H-NRM}$) and two-dimensional (HMBC-NMR) spectrography.

Figures 8A and 8B show the chromatograms (GC-MS) of the purified reaction medium and the mass spectra of hydroxytyrosol with a molecular ion (M^+) of 154 units and the mass spectra of tyrosol with a molecular ion (M^+) of 123 units with a fragmentation of 31 units corresponding to its hydroxymethylene fraction.

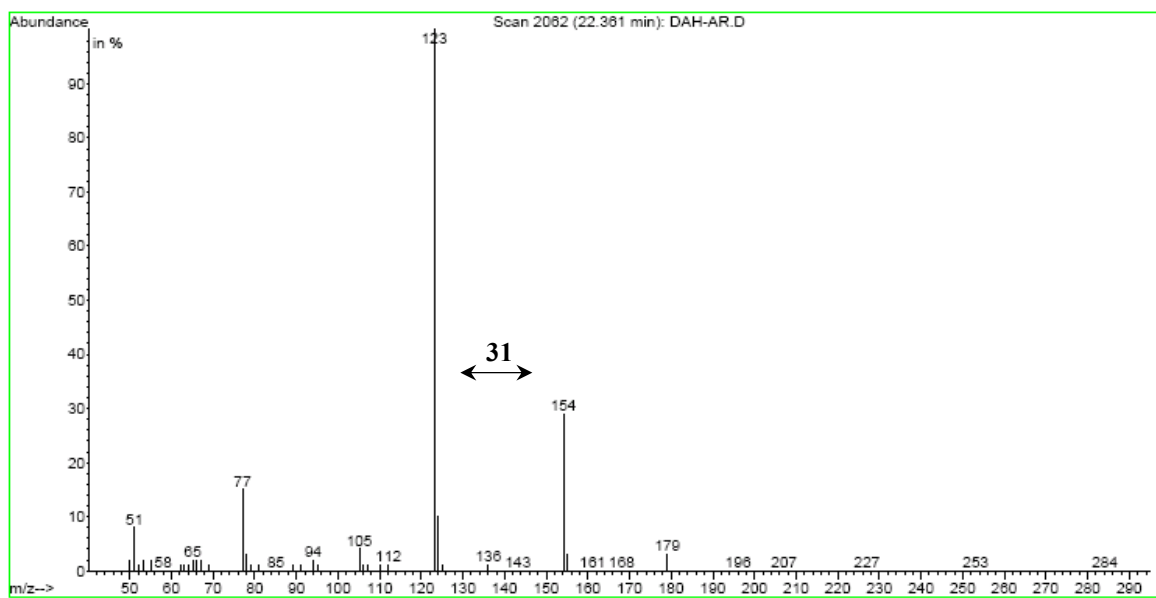
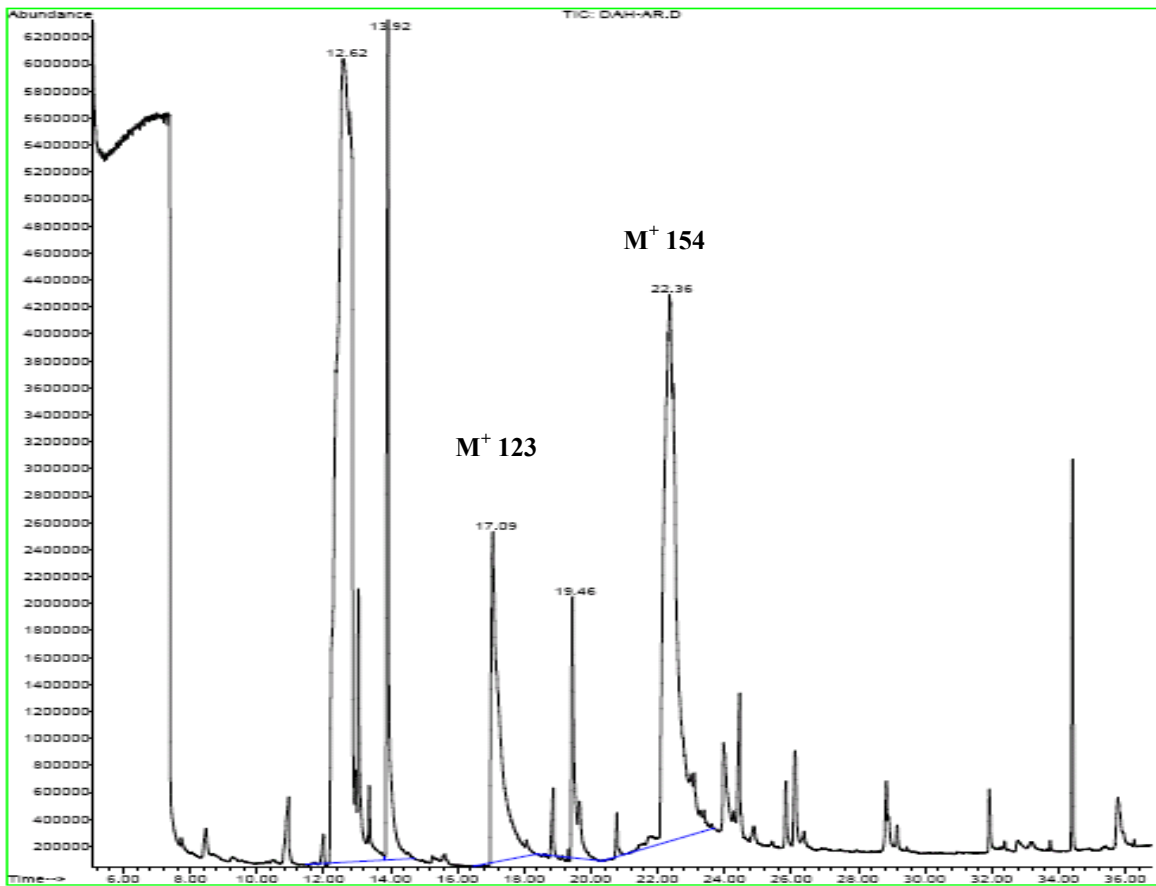


Figure VIII.8. GC-MS of purified LB growth medium. (A) Retention time of tyrosol (17.06 min) and hydroxytyrosol (22.36 min). (B) Fragmentation (EI) of hydroxytyrosol peak into its hydroxymethylene fraction.

The $^1\text{H-NMR}$ of the aromatic ring of hydroxytyrosol can be seen in Figure 9. This figure shows the substitution pattern (C_1 , C_2 and C_4) and two broad singlets attributable to the two phenolic hydroxide groups.

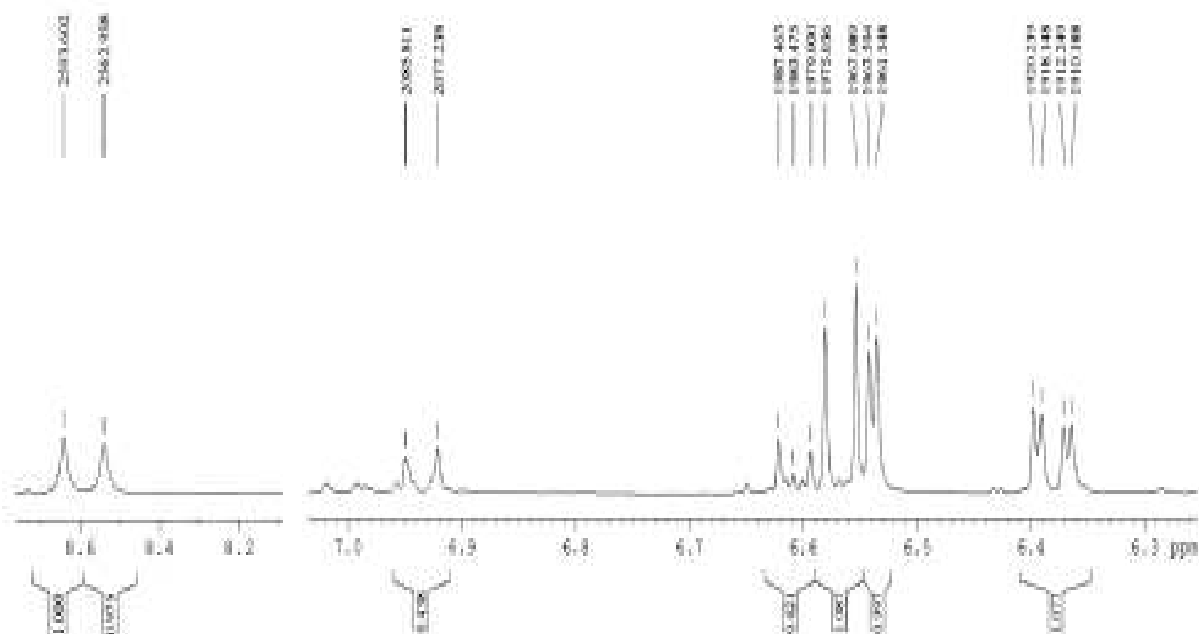


Figure VIII.9. Aromatic $^1\text{H-NMR}$ spectra of purified hydroxytyrosol obtained from enzymatic synthesis.

The relative position of the three substituents is confirmed with Hydrogen-Carbon large distance correlation (HMBC) (Figure 10). All these results confirm that tyrosol is transformed into hydroxytyrosol by phenol hydroxylase.

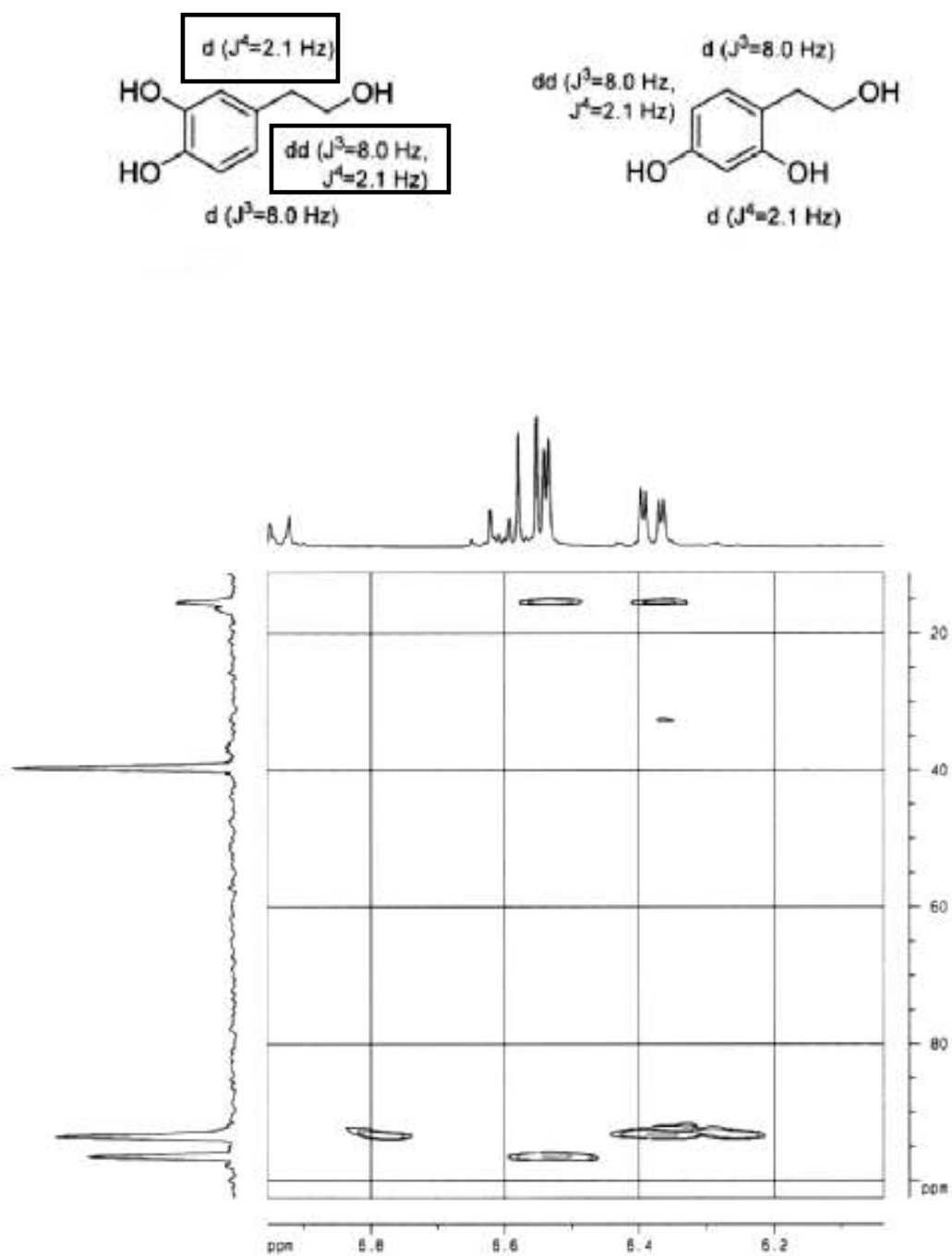


Figure VIII.10. Two-dimensional NMR spectra of purified hydroxytyrosol confirming the position of the suitable substituents.

- Optimization of conditions for diphenols production by transformed cells

To improve diphenol production and to avoid its subsequent degradation by *E. coli* cells, additional conversion studies were performed. Firstly, transformed cells were cultivated in LB medium alone, but after several hours, the diphenols synthesized evolved to their corresponding quinones and the time needed to transform the monophenols completely was much longer (data not shown). For that reason, we chose ascorbic acid to avoid the oxidation of diphenols, and terrific broth (TB) to obtain a larger amount of cells and to reduce the conversion time. The optimum concentration of ascorbic acid was found to be 10 mM, since at this concentration it is totally consumed during the reaction and no quinones are formed (Figures 11A and B).

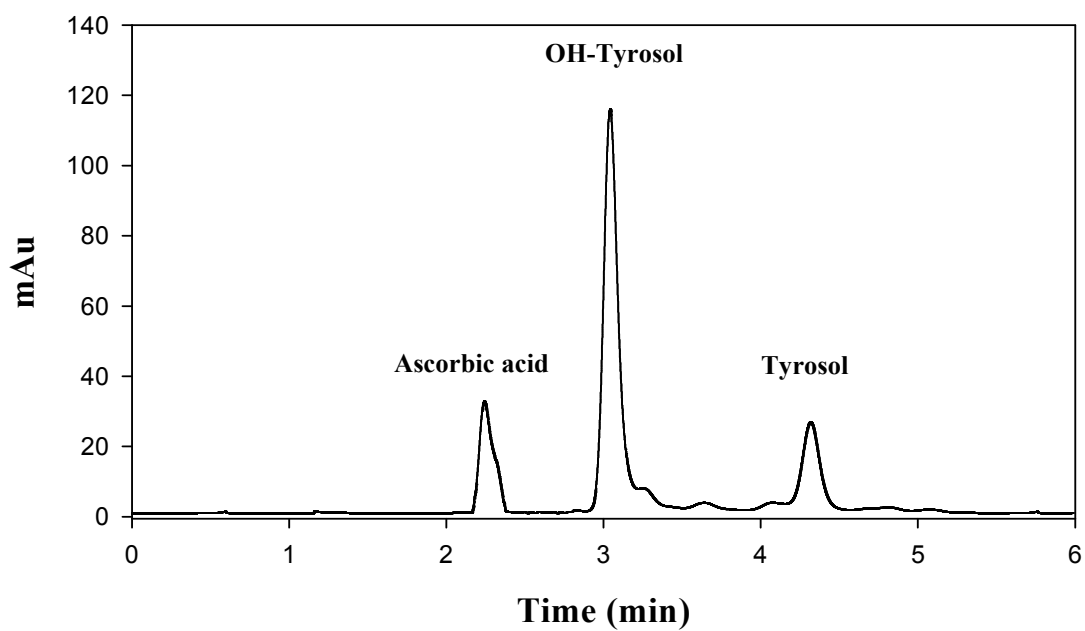
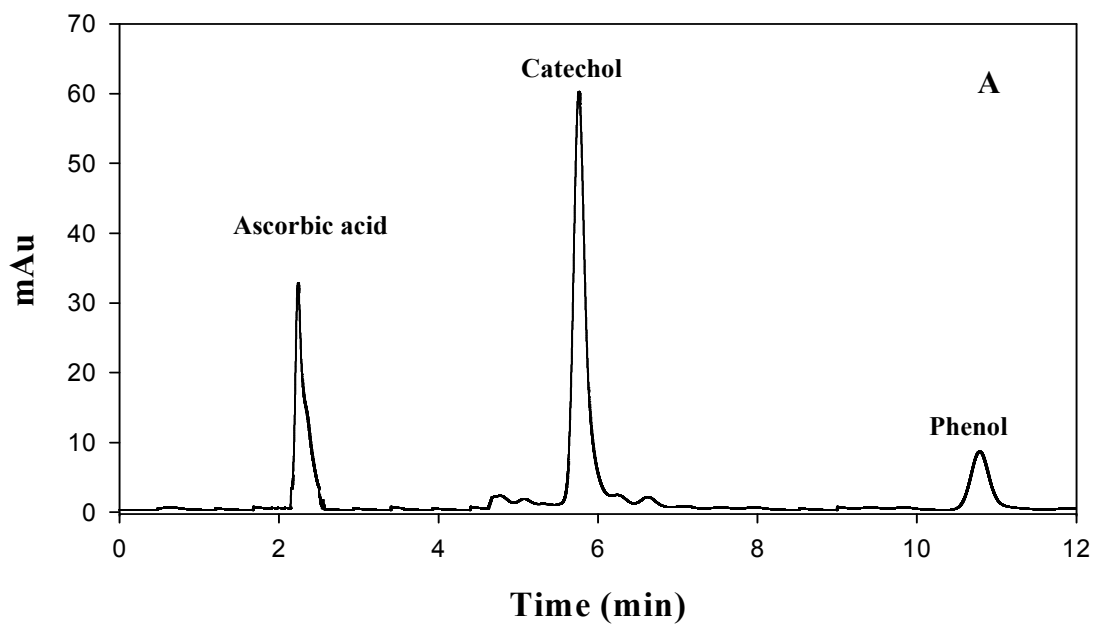


Figure VIII.11. HPLC determination of the different phenolic compounds and ascorbic acid indicating the absence of quinone formation under these conditions. (A) Phenol conversion after 9 hours with IPTG induction. (B) Tyrosol conversion after 7 hours with IPTG induction.

In order to examine the effect of the monophenols concentration on the formation of diphenols, cells were resuspended in LB medium with different concentrations of monophenols (1, 2.5, 5 and 10 mM). The optimal monophenol concentration is that which allows the greatest efficiency and yield of diphenols. The maximum concentration of diphenols that transforms 100% of monophenols was 5 mM. A higher monophenol concentration was detrimental to the increase in the amount of diphenols obtained, which was probably due to the toxicity of phenol and tyrosol in *E. coli*. Similar results were reported for tyrosol toxicity in *Pseudomonas aeruginosa* (Allouche et al., 2004).

- Operational stability of transformed cells

To further characterize this transformation system, the reusability of the cell catalyst was examined in batch bioreactors due to its economic importance (Figure 12). Transformed cells were used repeatedly 5 times. After each cycle, cells were centrifuged at 6500g at 4 °C for 15 min, washed twice and resuspended in fresh LB-kanamycin medium with phenol or tyrosol (5 mM) and ascorbic acid (10 mM), and kept at 37 °C with continuous shaking. The residual activity was always higher in *E. coli-pheA** than in *E. coli-pheA* indicating the need of the repetitive use of IPTG, which could be detrimental for the cells. In addition, both transformed cells better tolerated tyrosol than phenol.

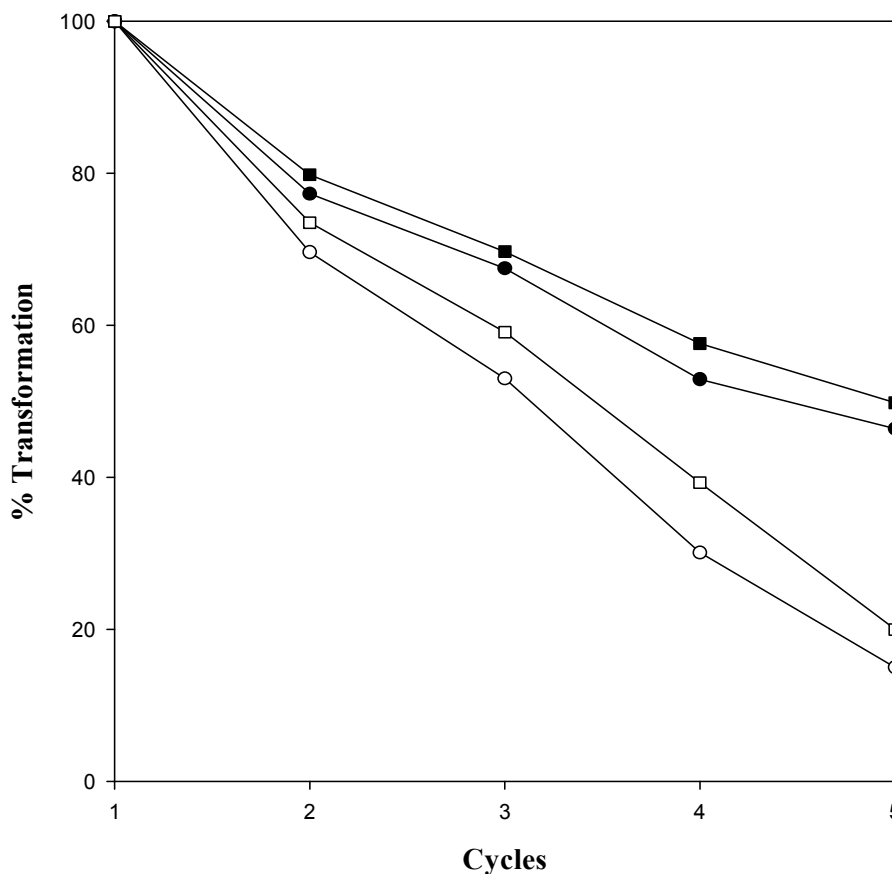


Figure VIII.12. Operational stability of phenol hydroxylase as biocatalyst. (●) *E. coli-pheA** and phenol as substrate; (○) *E. coli-pheA* and phenol as substrate; (■) *E. coli-pheA** and tyrosol as substrate; (□) *E. coli-pheA* and tyrosol as substrate.

- Bioconversion using different enzyme sources

To compare this biotransformation system of monophenols into diphenols, two different polyphenol oxidases were evaluated. One of them was polyphenol oxidase from quince fruit pulp (*Cydonia oblonga*) and the other one was tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. Both of them were previously purified by our group (Orenes-Piñero et al., 2005; Orenes-Piñero et al., 2006). They were immobilized onto different supports, including alginate gel beads, poly(acrylamide-co-acrylic)hydrogels and hydrophilic membranes (Figure 13).

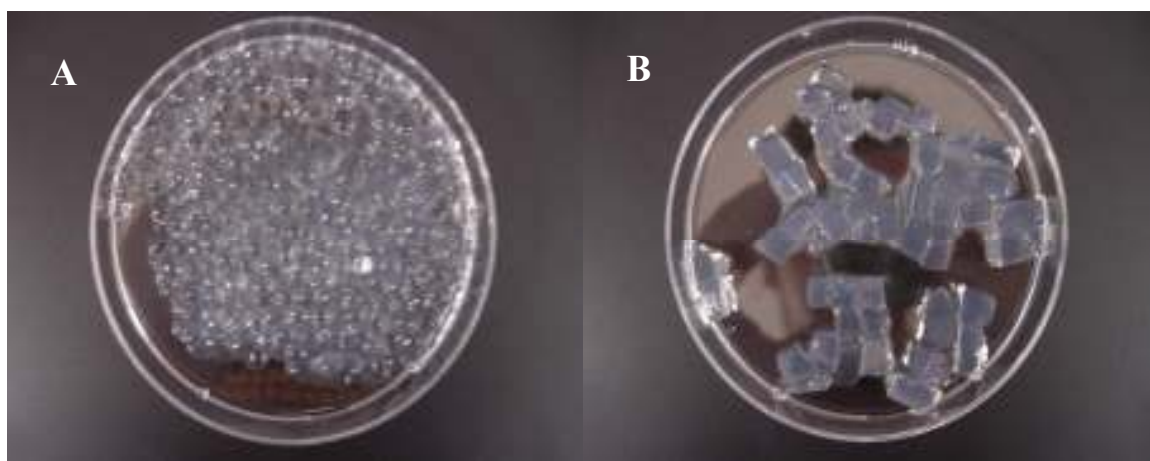


Figure VIII.13. PPO/tyrosinase immobilization in different supports. (A) alginate gel beads, (B) poly(acrylamide-co-acrylic)hydrogels.

The bioconversion percentage of tyrosol to hydroxytyrosol was monitored for 7 cycles of one hours each, using all these supports (Figure 14). Hydrogels were the best support, while the degree of transformation of tyrosol was 40% lower than with *E. coli-pheA* and *E. coli-pheA** complete cells.

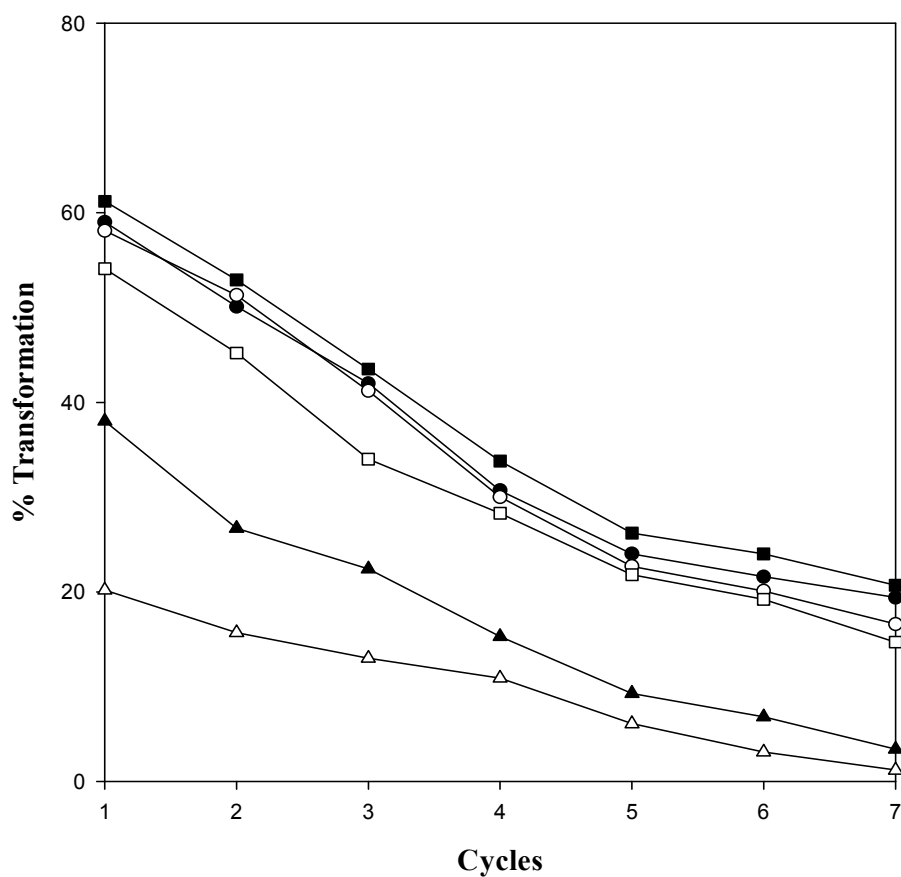


Figure VIII.14. Operational stability of quince PPO and *Streptomyces antibioticus* tyrosinase, both immobilized on alginate gel beads, poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels and hydrophilic cellulose membranes, towards tyrosol as substrate. Representation of the percentage of transformation vs number of cycles (1 hour duration) at 5 mM tyrosol in 50 mM phosphate buffer pH 7.0. (■) Hydrogel with immobilized PPO; (□) Hydrogel with tyrosinase; (●) Gel beads with PPO; (○) Gel beads with tyrosinase; (▲) hydrophilic membrane with PPO and (△) hydrophilic membrane with tyrosinase.

Therefore, hydrogels were also used to measure the transformation of phenol to catechol (Figure 15), obtaining less conversion and a drastic reduction of the operational stability when compared with tyrosol.

Hydrophilic membranes were the worst option in both cases because its overall yield was very low (about 20%) and the loss of the activity was higher than with the other systems assayed in this paper.

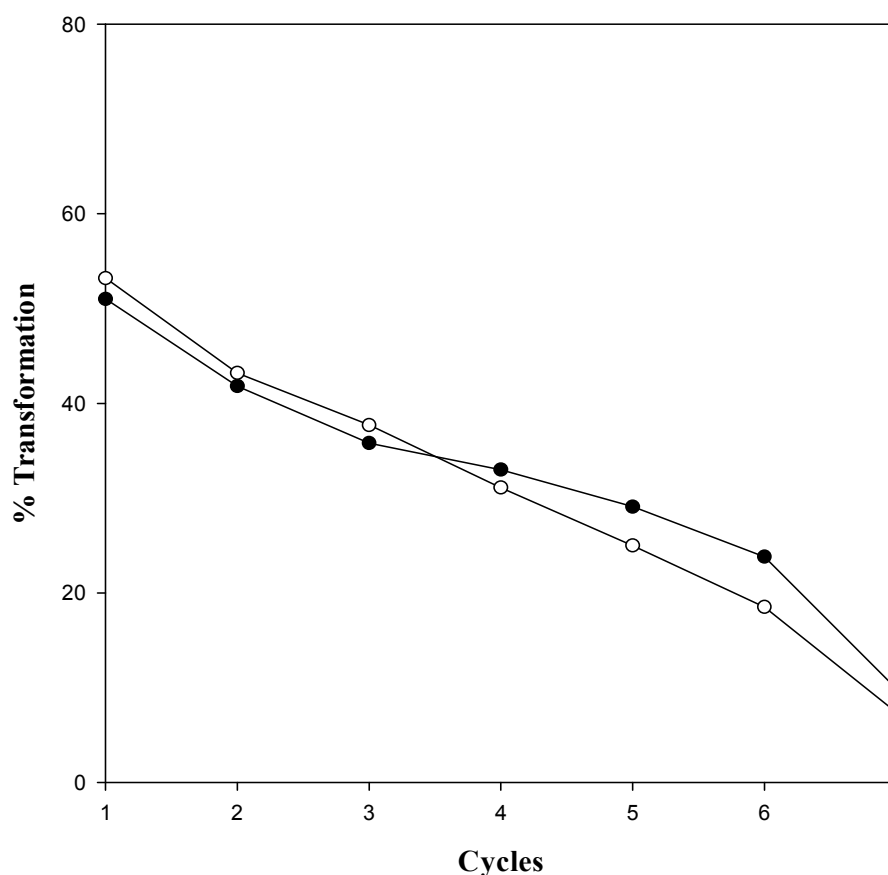


Figure VIII.15. Operational stability of quince PPO and *Streptomyces antibioticus* tyrosinase, both immobilized on poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels, towards phenol as substrate. Representation of the percentage of transformation vs number of cycles (2 hours duration) at 5 mM phenol in 50 mM phosphate buffer pH 7.0. (●) Hydrogel with immobilized PPO; (○) Hydrogel with immobilized tyrosinase.

Discussion

Many companies in the pharma, chemical, and food industries have shown interest in the development of biotransformations using enzymes as biocatalysts, either free, immobilized, or in whole cells. In particular, there is considerable interest in using microbial transformations for producing natural antioxidants, especially orthodiphenolic compounds (Allouche and Sayadi, 2005). Hydroxytyrosol presents several interesting aspects for human health and is not commercially available. In this paper, we studied its production by whole-cell

transformation using synthetic tyrosol as precursor. On the other hand, phenol is a pollutant in many wastewaters. We investigated the production of hydroxytyrosol and the degradation of phenol using the phenol hydroxylase gene from thermophilic bacteria.

The over-expression of PheA1 was more than 40% of the total amount of *E. coli*-pheA proteins. However, no expression appeared of PheA2 protein. Although the two subunits are necessary for phenol hydroxylase activity, *E. coli* Rosetta seems to supply the missing reductase. In order to verify the importance of *G. thermoglucosidasius* reductase, a pET-Duet vector was used (Fig 3; lines C-E). In this vector, the two phenol hydroxylase components from *G. thermoglucosidasius* were over-expressed but the activity was the same as when only the large component was assayed. Because of the simplicity of using only one component of *G. thermoglucosidasius* phenol hydroxylase, we chose pET-28a vector rather than the pET-Duet system for the transformation of *E. coli* Rosetta (Figures 2 A and B).

Figures 4 and 5 show the transformation percentage of phenol into catechol. When IPTG was used as an inducer, the reaction finished in 12 hours. However, when phenol hydroxylase gene was cloned with its own promoter, the rate of transformation was slower and 16 hours were necessary to obtain 100% catechol. A likely reason for this is that there is more over-expression of this enzyme mediated by IPTG in the pET-system than the one obtained in *E. coli* with *Geobacillus thermoglucosidasius* constitutive promoter.

The same fact can be seen in Figures 6 and 7, although the time needed for the transformation of tyrosol to hydroxytyrosol was two hours less than for phenol bioconversion. These results cannot be compared because this is the first work describing tyrosol conversion using this thermophilic source of enzyme.

However, compared with previous studies dealing with phenol degradation using different species of *Geobacillus* (Duffner and Müller, 1998; Duffner et al., 2000; Kim and Oriel, 1995), the hydroxylating activity of this enzyme was produced at a higher phenol concentration (5-fold) and with a complete conversion to catechol.

To improve the study of *E. coli* cells transformed with phenol hydroxylase from *G. thermoglucosidasius*, the continuous bioconversion of monophenols to their corresponding diphenols was tested. Figure 12 shows the residual activity remaining after 5 cycles. In the case of *E. coli-pheA**, cells retained nearly 50% of activity after 5 cycles. On the other hand, in *E. coli-pheA*, the activity dropped to approximately 20%. This can be explained because IPTG was not incubated between the different cycles and the gene was not induced. For this reason, the bioconversion rate was much higher in cells with a constitutive promoter. This latter approach (no IPTG) has three important advantages; (i) overnight incubation was not necessary, (ii) the costs were much lower and (iii) the operational stability of transformed cells was better.

The bioconversion of tyrosol from *G. thermoglucosidasius* phenol hydroxylase in transformed *E. coli* cells was compared with the bioconversion capacity of immobilized *Cydonia oblonga* polyphenol oxidase and *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. The use of epichlorhydrin during the binary immobilization allows a second immobilization of the polyphenol oxidase on the support surface. When no epichlorhydrin was used, there was only internal immobilization and the yield was 20% lower. Both, alginate gel beads and poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels showed almost the same bioconversion rate (Figure 14), although the residual activity after 7 cycles was a little higher in poly(acrylamide-co-acrylic acid) as described before (Yahsi et al., 2005). However, this yield was much lower than that obtained with phenol hydroxylase expressed with its own promoter even after several cycles.

In conclusion, this paper shows the total conversion of high concentrations of phenol and tyrosol using a simple, environmentally friendly and cheap process that can be adapted to a bioreactor for industrial application. In comparison with other methods reported in the literature, this procedure appears to be more convenient and interesting for several reasons. It produces a high yield (100% conversion) without using toxic reagents at a 5 times higher concentration of monophenols (5 mM); it is cheap (no IPTG is needed) and it is an easy system to manage from an industrial

point of view. However, further studies are needed to improve the operational stability of *E. coli* Rosetta cells before scaling up.

Acknowledgements

This work was partially supported by MEC and FEDER (BIO2004-00439), and Fundación Séneca (00608/PI/2004). E.O.P. is a holder of predoctoral research grant from Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.

Literature cited

- Allouche, N., and S. Sayadi.** 2005. Synthesis of Hydroxytyrosol, 2-Hydroxyphenylacetic acid, and 3-Hydroxyphenylacetic acid by differential conversion of tyrosol isomers using *Serratia marcescens* strain. *J Agric. Food Chem.* **53**: 6525-6530.
- Allouche, N., M. Damak, R. Ellouz, S. Sayadi.** 2004. Use of whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol via conversion of tyrosol. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2105-2109.
- Angerosa, F., N. D'Alessandro, P. Kostantinou, and I. Giacinto.** 1995. GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 1802-1807.
- Aruoma, O. I., M. Deiana, A. Jenner, B. Halliwell, H. Kaur, S. Banni, F. P. Corongiu, M. A. Dessi, and R. Aeschbach.** 1998. Effects of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and low-density lipoprotein oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 5181-5187
- Bisignano, A., A. Tomaino, R. Lo Cascio, G. Crisafi, N. Uccella, and A. Saija.** 1999. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**: 971-974.
- Boshoff, A., M.H. Burton, and S.G. Burton.** 2002. Optimization of catechol production by membrane-immobilized polyphenol oxidase: a modeling approach. *Biotechnol Bioeng.* **83**: 1-7.
- De la Puerta, R., V. Ruiz-Gutiérrez, and J. R. Houtl.** 1999. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem. Pharmacol.* **57**: 445-449.
- Duffner, F. M., and R. Müller.** 1998. A novel phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* strain A2: nucleotide sequence and analysis of the genes. *FEMS Microb. Lett.* **161**: 37-45.
- Duffner, F. M., U. Kirchner, M.P. Bauer, and R. Müller.** 2000. Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7: cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. *Gene.* **256**: 215-221.

- Eyal, S., R. Uzi, and S. Yuval.** 2000. Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin. *J. Biotechnol.* **78**: 1-9.
- Feitkenhauer, H., S. Schnicke, R. Müller, and H. Märkl.** 2001. Determination of the kinetic parameters of the phenol-degrading thermophile *Bacillus thermoleovorans* sp. A2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 744-750.
- Kirchner, U., A.H. Westphal, R. Müller, and W.J.H. van Berkel.** 2003. Phenol hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidasius* A7, a two-protein component monooxygenase with a dual role for FAD. *J. Biol. Chem.* **48**: 47545-47553.
- Kim, C., and P.J. Oriel.** 1995. Characterization of the *Bacillus stearothermophilus* BR219 phenol hydroxylase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1252-1256.
- Manna, C., P. Galletti, V. Cucciolla, O. Moltedo, A. Leone, and V. Zappia.** 1997. The protective effect of olive oil polyphenols (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-cells. *J. Nutr.* **127**: 286-292.
- Manna, C., P. Galletti, G. Maisto, V. Cucciolla, S. D'Angelo, and V. Zappia.** 2000. Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2-cells. *FEBS Lett.* **470**: 341-344.
- Orenes-Piñero, E., F. García-Carmona, and Á. Sánchez-Ferrer.** 2005. A kinetic study of *p*-cresol oxidation by quince fruit polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 1196-1200.
- Orenes-Piñero E., F. García-Carmona, and Á. Sánchez-Ferrer.** 2006. Kinetic characterization of cresolase activity of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. *Enzyme Microb. Tech.* **39**: 158-163.
- Petroni, A., M. Blasevich, M. Salami, N. Papini, G. F. Montedoro, and C. Galli.** 1995. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic component of olive oil. *Thromb. Res.* **78**: 151-160.
- Semba, H., M. Mukouyama, and K. Sakano.** 1996. A *para*-site-specific hydroxylation of various aromatic compounds by *Mycobacterium* sp. Strain 12523. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 432-437.
- van der Heuvel, R. H. H., A.H. Westphal, A.J.R. Hecks, M.A. Walsh, S. Rovida, W.J.H. van Berkel, and A. Mattevi.** 2004. Structural studies on flavin

reductase PheA2 reveal binding of NAD in an unusual folded conformation and support novel mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **279**: 12860-12867.

Visioli, F., A. Poli, and C. Galli. 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.* **22**: 65-75.

Visioli, F., G. Bellomo, and C. Galli. 1998. Free radical scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**: 60-64.

Yahsi, A., F. Sahin, G. Demirel, and Tümtürk, H. 2005. Binary immobilization of tyrosinase by using alginate gel beads and poly(acrylamide-co-acrylic) hydrogels. *Int J Biol Macromol.* **36**: 253-258.

CAPÍTULO IX
Discusión General

1. Caracterización de Polifenol oxidasa y Tirosinasa

Uno de los objetivos de la presente tesis era la obtención de polifenol oxidasa y tirosinasa para la transformación de monofenoles en difenoles por la importancia que estos compuestos pueden tener a nivel industrial. Además, con esta tesis se querían encontrar fuentes de esta enzima a diferentes niveles en la escala filogenética. De esta forma, se eligió al membrillo porque era una fruta con interés comercial en los países mediterráneos y por la dificultad en la purificación, hecho por el cual, aún no se había llevado a cabo una completa caracterización cinética. En el único trabajo sobre su caracterización cinética (Yagar y Sagiroglu, 2002) se detectó actividad difenolasa pero no monofenolasa. La labilidad de la actividad monofenolasa durante el proceso de purificación es bien conocido en diferentes PPO de frutas (Mayer y Harel, 1979; Matheis, 1987), provocada por cambios en la estructura de la proteína durante la purificación (Walter y Purcell, 1980) debido a las uniones covalentes con pigmentos polifenólicos. El uso de métodos drásticos de purificación, como pueden ser los polvos acetónicos o el fraccionamiento mediante sulfato amónico pueden dañar a la enzima provocando la pérdida de la actividad monofenolasa, mientras que los métodos más suaves basados en detergentes no iónicos la preservan.

En cuanto a la tirosinasa de *Streptomyces antibioticus*, se conocía mucho sobre su genética y biología molecular, pero no se había realizado un estudio completo sobre su caracterización cinética debido a los problemas de purificación de la enzima por la existencia de pigmentos oscuros que modificaban covalentemente la enzima, dando lugar a un extracto enzimático negro e inestable que impedía su estudio incluso después de su fraccionamiento con sulfato amónico.

Por todas estas razones, se eligieron estas fuentes enzimáticas y se optimizaron los procesos de purificación para obtener extractos enzimáticos claros y estables.

1.1 Extracción y Purificación de PPO de membrillo

La polifenol oxidasa latente de membrillo fue extraída y purificada mediante un sistema secuencial de dos fases basado en Triton X-114 y PEG-8000/fosfato, con un fraccionamiento final con sulfato amónico, debido a la gran cantidad de sustancias rápidamente oxidables que aparecen en el extracto de la pulpa del membrillo tras su homogeneización, que provocan su pardeamiento instantáneo. Para evitar la oxidación de estos compuestos, fue necesario incluir una cantidad substancial de Triton X-114 (4% p/v) en el tampón de extracción para llevar a cabo una partición de fases, como es costumbre en la purificación de PPO de plantas (Sánchez-Ferrer et al., 1989b; Onsa et al., 2000; Beena y Gowda, 2000).

Además, y para obtener un mayor rendimiento del Triton X-114 en la eliminación de fenoles y proteínas hidrofóbicas (Sánchez-Ferrer et al., 1993), otro 6% p/v de Triton X-114 se añadió al primer sobrenadante a 4 °C. Para favorecer la separación de fases, esta solución se mantuvo a 37 °C durante 15 minutos. Estas particiones de dos fases basadas en Triton X-114 provocaron una ligera pérdida de actividad (27%) y una reducción de los niveles de fenoles de un 37% (Tabla V.1). Sin embargo, este descenso en los niveles de compuestos fenólicos, no fue suficiente para detener el pardeamiento de la solución enzimática. Por esta razón, fue necesario utilizar un sistema de dos fases diferente basado en PEG-8000/fosfato. Se realizaron estudios con PEGs de diferentes tamaños y se observó que con el que se obtenía un mejor resultado era con el PEG-8000 (datos no mostrados). Tras la centrifugación, la fase superior rica en PEG, que contenía los compuestos oxidados, fue descartada, y la polifenol oxidasa permaneció en la fase clara rica en fosfato. Es importante destacar el efecto estabilizador de la fase rica en fosfato ya que el grado de activación de la enzima latente fue de 46 veces (Tabla V.1). Este efecto de los iones fosfato fue descrito anteriormente en PPO de plátano (Galeazzi y Sgarbieri, 1981).

La fase rica en fosfato, se llevó a un doble fraccionamiento con sulfato amónico con un 30-75% de saturación, obteniéndose una solución enzimática clara y limpia, purificada 16 veces y con un 47% de recuperación (Tabla V.1). El grado

de purificación fue 3.8 veces mayor que cuando únicamente se utilizó el fraccionamiento por sulfato amónico para obtener PPO de membrillo (Yagar y Sagiroglu, 2002). Además, este método de purificación reduce el contenido de compuestos fenólicos hasta sólo el 5% de la cantidad original. La eliminación de estos compuestos oxidados por la polifenol oxidasa fue suficiente para evitar el pardeamiento de la solución enzimática.

1.2 Purificación de tirosinasa de *Streptomyces antibioticus*

La tirosinasa extracelular de *Streptomyces antibioticus* se purificó parcialmente usando una modificación del sistema de dos fases utilizado para la PPO de pulpa de membrillo, debido a la existencia de pigmentos negros que provocaban el oscurecimiento del medio de cultivo durante el crecimiento del microorganismo, impidiendo la caracterización cinética del extracto enzimático.

El resultado fue un extracto enzimático claro y limpio (Figura VI.1A) comparado con el obtenido si únicamente se realiza un fraccionamiento con sulfato amónico (Figura VI.1B). El grado de purificación y la recuperación fueron muy similares a los anteriormente obtenidos en la bibliografía para *Streptomyces glaucescens* (Lerch y Ettliger, 1972), pero se produjo una reducción drástica de compuestos fenólicos y melaninas, sin la necesidad de utilizar complejos pasos cromatográficos.

2. Latencia y Activación por SDS

Una de las características más llamativas de la polifenol oxidasa descrita en la bibliografía es la posibilidad de su existencia en una forma latente que puede activarse por diversos tratamientos. Ello genera que a nivel fisiológico pueda existir una cantidad de enzima disponible rápidamente cuando sea necesaria en presencia del efector adecuado. Es conocido que la presencia en el medio del detergente SDS provoca un cambio limitado en la estructura de la enzima (Moore y Flurkey, 1990) que promueve su actividad. Con el trabajo descrito en el capítulo V (Figura V.1) de

la presente memoria, se ha puesto de manifiesto como esta modificación conformacional no implica en la enzima de pulpa de membrillo un mecanismo “todo-nada”, sino que existe una gradación en el cambio. La diferencia de actividad viene marcada por la posibilidad de acceso de determinados sustratos al centro activo y su existencia puede ser interpretada en función del número de monómeros de SDS que se unen a la enzima durante el proceso. De este modo, desde la unión de las primeras moléculas de SDS a concentración baja de detergente, se produce la activación de la enzima, observándose un aumento de la velocidad de reacción (Figura V.1). Ello puede ser indicativo de la presencia en el entorno del centro activo de residuos de aminoácidos capaces de bloquear el acceso de los sustratos al mismo. El cambio conformacional provocado por el SDS modificaría la zona de acceso del sustrato al centro activo, abriendo más la misma conforme se unen más moléculas de detergente a la enzima.

Atendiendo a las características estudiadas de la activación de polifenol oxidasa de pulpa de membrillo, se puede proponer la presencia de una porción de la enzima o péptido que bloquea el acceso del sustrato al centro activo. Éste sería desplazado por efecto del cambio conformacional provocado por el SDS. Su existencia está de acuerdo con la “región escudo” descrita en la estructura de las hemocianinas y que podría tener un análogo en la forma latente de catecol oxidasa a partir de los modelos estructurales desarrollados (Gerdemann et al., 2002a y 2002b).

Debido a la influencia del SDS sobre la actividad de la enzima nativa, la caracterización cinética de la misma se llevó a cabo en ausencia y presencia del detergente. La velocidad máxima de reacción de la enzima aumentó 15 veces (Figura V.3). La modificación de la velocidad de reacción es reflejo del mejor acceso de los sustratos al centro activo de la enzima, tal y como se ha comentado anteriormente. El hecho de que los valores de K_M no varíen puede ser interpretado como una preservación del centro activo de la enzima a pesar del cambio conformacional inducido en su entorno.

En el caso de tirosinasa de *Streptomyces antibioticus*, esta activación no se observa, lo que indicaría que no existe una zona de residuos aminoácidos hidrofóbicos en las cercanías del centro activo de la enzima.

3. Actividad Monofenolasa

Para demostrar que la enzima obtenida tanto de la pulpa de membrillo como de *Streptomyces antibioticus* es una verdadera tirosinasa, ésta debe mostrar tanto la actividad difenolasa (Figura IV.1a, en el caso de membrillo; Figura VI.2a, en el caso de *S. antibioticus*) como la actividad monofenolasa (Figura IV.1b-e, en membrillo; Figura VI.2b-e, en *S. antibioticus*). La actividad monofenolasa se caracteriza por la presencia de un período de retardo, que se define como la intercepción de la abscisa obtenida por la extrapolación de la parte lineal de la curva de acumulación del producto. Este período de retardo ha sido descrito en diferentes fuentes de PPO (Sánchez-Ferrer et al., 1988; Núñez-Delicado et al., 1996 y 2003). El período de retardo y el estado estacionario, que se define como la pendiente de la parte lineal de la curva de acumulación del producto, se ven afectados por el pH, la concentración de sustrato y la presencia de concentraciones catalíticas de o-difenoles (Figuras IV.1b-e y VI.2b-e).

3.1 Efecto del pH

La actividad monofenolasa de la PPO de membrillo aumenta a medida que se incrementa el pH desde 3.5 hasta 7.5 frente al p-cresol (Figura IV.2), aunque no se puede definir claramente un máximo. Se eligió pH 7 como el óptimo para caracterizar la enzima porque a pH superiores es difícil seguir la aparición de la 4-metil-o-benzoquinona debido a su gran inestabilidad. El período de retardo es inversamente proporcional al pH, es decir, que a medida que aumenta el pH disminuye el período de retardo.

En el caso de tirosinasa de *S. antibioticus*, se obtuvieron los mismos resultados cuando el sustrato utilizado era el p-cresol, sin embargo, al estudiar el perfil de oxidación del 4-metilcatecol, se obtuvo una actividad máxima a pH 6.5 (Figura VI.3), por lo que la caracterización cinética se realizó a ese pH. Este pH óptimo concuerda con el descrito para *S. antibioticus* frente a L-DOPA (Streffer et al., 2001).

Los resultados de la PPO de membrillo y de la tirosinasa de *S. antibioticus* concuerdan con los obtenidos en otras fuentes de PPO, como uva (Sánchez-Ferrer et al., 1988) o caqui (Núñez-Delicado et al., 2003), aunque difiere del perfil en meseta obtenido para manzana (Espín et al., 1995) y plátano (Sojo et al., 1998).

En ninguno de los dos casos se encontró un aumento de la actividad a pH ácido, efecto encontrado en algunas PPO latentes de plantas, debido a la activación de la forma latente de la enzima por choque ácido (Sánchez-Ferrer et al., 1989).

3.2 Efecto de la concentración de sustrato

El aumento en la concentración de monofenol provoca un aumento en el período de retardo tanto en PPO de membrillo (Figura IV.4) como en tirosinasa de *S. antibioticus* (Figura VI.5); este efecto ya se ha descrito anteriormente para otras PPO de plantas (Núñez-Delicado et al., 2003). Aunque la explicación de este fenómeno es complejo porque el perfil de la curva depende de la fuente enzimática utilizada, podría decirse que el aumento de la cantidad de monofenol en el medio de reacción provoca que la enzima entre en una vía muerta, $E_{met}M$ y que necesite más tiempo para alcanzar el estado estacionario (Esquema IV.1). Por esta razón, cuando se estudia la actividad monofenolasa, la cantidad de monofenol utilizado debe limitarse, porque de lo contrario, el período de retardo puede aumentar considerablemente.

La constante cinética, K_M , se evaluó en ambos casos a partir del ajuste de los datos mediante regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten. El valor de la K_M en la PPO de membrillo para el p-cresol fue de 2.2 mM. Este valor es más alto que el obtenido para el mismo sustrato con la enzima de *S. antibioticus* (0.97 mM), en PPO de patata (0.5 mM) (Sánchez-Ferrer et al., 1993) y PPO de melocotón (0.28 mM) (Laveda et al., 2001).

Cuando el sustrato utilizado fue el 4-metilcatecol, las K_M obtenidas fueron muy similares, siendo de 1.2 mM para el membrillo y 1.3 para *S. antibioticus*. Ambas son inferiores a la K_M de tirosinasa de *Streptomyces glaucescens* para dicho sustrato (1.9 mM) (Lerch y Ettliger, 1972).

En la tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* se observa un fenómeno nunca antes descrito en una tirosinasa de una bacteria Gram positiva y que tampoco aparece en la PPO de membrillo. Al incrementar la concentración de sustrato monofenólico aumenta la actividad, sin embargo, a partir de 5 mM, la actividad disminuye, lo que indicaría que la enzima se inhibe a elevadas concentraciones de *p*-cresol. Esta inhibición puede deberse a que el exceso de sustrato provocaría que dos moléculas de éste pudieran unirse de forma no productiva al centro activo de la enzima, disminuyendo así la actividad enzimática.

3.3 Presencia de concentraciones catalíticas de *o*-difenoles

El período de retardo de la actividad cresolasa puede ser acortado o eliminado por la adición de agentes reductores u *o*-difenoles, que actúan como cosubstratos. (García-Carmona et al., 1979). El efecto de estos últimos sobre el período de retardo fue estudiado tanto en la PPO de membrillo como en la tirosinasa de *S. antibioticus* de acuerdo al protocolo de Pomerantz and Warner (1967), asumiendo que el *o*-difenol se une al centro activo de la enzima por una simple isoterma y que el período de retardo es proporcional a la concentración de enzima no activa a tiempo cero.

Las Figuras IV.5 y VI.6 muestran la influencia del 4-metilcatecol en la reducción del período de retardo en PPO de membrillo y tirosinasa de *S. antibioticus*, respectivamente. En el caso de PPO, una concentración de 30 μ M fue necesaria para eliminar completamente el período de retardo, sin embargo, sólo 1.2 μ M se necesitó para anular este período de retardo en tirosinasa de *S. antibioticus*. Para demostrar que el 4-metilcatecol era usado como cosustrato y no como sustrato, se representó la concentración de este difenol frente a la actividad enzimática (Figuras IV.6 y VI.7), y no se observó ningún aumento de la actividad, sólo una disminución del período de retardo, hasta que se superó la concentración de 30 μ M para la PPO de membrillo y 1.2 μ M para la tirosinasa de *S. antibioticus*. De esta forma, se puede asegurar que el difenol sólo es usado como cosustrato en

la actividad monofenolasa, una vez superados estos niveles catalíticos de *o*-difeno, la actividad aumenta debido a la contribución de la actividad difenolasa.

4. Actividad Difenolasa

Como ya se ha comentado anteriormente, la actividad difenolasa consiste en la oxidación de dos *o*-difenoles a dos *o*-quinonas, mediante la reducción concomitante de una molécula de oxígeno formándose dos moléculas de agua. Para demostrar que las dos enzimas purificadas procedentes de membrillo y *S. antibioticus* eran auténticas tirosinasas, éstas debían mostrar tanto actividad monofenolasa como difenolasa.

La actividad difenolasa se caracterizó frente a tert-butilcatecol (TBC) en el caso de PPO de membrillo y frente a TBC y dopamina, para la tirosinasa de *S. antibioticus*.

Además, para una mejor caracterización cinética de ambas enzimas, se realizó un completo estudio con inhibidores sintéticos y con moléculas naturales que pueden actuar como inhibidores o como activadores, las ciclodextrinas.

4.1 Efecto de los substratos

Los parámetros cinéticos (V_{\max} y K_M) fueron obtenidos mediante ajuste por regresión no lineal, usando la ecuación de Michaelis-Menten, a los datos de actividad obtenidos variando la concentración de TBC entre 0-6.5 mM para PPO de membrillo y tirosinasa de *S. antibioticus*. En el caso de PPO de membrillo el estudio se realizó en presencia y en ausencia de SDS. Los valores obtenidos a partir de la actividad máxima muestran que la presencia del SDS provoca un aumento de la V_{\max} de 15 veces ($V_{\max} = 751 \mu\text{M}/\text{min}$ en presencia de SDS y $49 \mu\text{M}/\text{min}$ en su ausencia) (Figura V.1). Este incremento en la V_{\max} sin cambios en la K_M (1.2 mM), es acorde con lo descrito anteriormente en PPO latente de hoja de patata (Sánchez-Ferrer et al., 1993), en PPO latente de haba (Jiménez y García-Carmona, 1996b) y en PPO latente de caqui (Núñez-Delicado et al., 2003).

Los valores obtenidos para la tirosinasa de *S. antibioticus* usando TBC como sustrato fueron de 265.7 $\mu\text{M}/\text{min}$ para la V_{max} y 1.2 mM para la K_{M} , siendo este último valor igual al de la PPO de membrillo (Figura VII.2).

Dicho estudio también se realizó utilizando la dopamina como sustrato, variando su concentración entre 0-12 mM en tirosinasa de *S. antibioticus*. Este sustrato no había sido caracterizado cinéticamente en ningún estudio de este género bacteriano. Los valores obtenidos fueron de 51.68 $\mu\text{M}/\text{min}$ para la K_{M} y 8.4 mM para la V_{max} (Figura VII.2 Interior). Estos valores no pueden ser comparados con ninguna tirosinasa del género *Streptomyces*, pero es superior a los obtenidos en la PPO de piel de plátano (3.9 mM) (Yang et al., 2001), y en *Hevea brasiliensis* (2.12 mM) (Wititsuwannakul et al., 2002).

4.2 Efecto de inhibidores

Todos los inhibidores testados en estos estudios, ya sean agentes reductores o análogos de sustrato, provocaron inhibición en las actividades de la PPO de membrillo o en tirosinasa de *S. antibioticus* usando TBC como sustrato, y la intensidad de esta inhibición dependió de la concentración del compuesto utilizado.

En el caso de PPO de membrillo, entre los agentes reductores, (Tabla V.2), la L-cisteína y el ácido ascórbico parecen ser los mejores inhibidores tanto en presencia como en ausencia de SDS. La inhibición producida por los grupos tiol puede ser debida a una reacción de adición que se produce con las quinonas dando lugar a compuestos incoloros y estables (Ikediobi y Obayusi, 1982) y/o por la unión al centro activo de la enzima, como en el caso del metabisulfito. La inhibición producida por este último inhibidor es dependiente de SDS, y más efectiva en ausencia de éste. El ácido ascórbico actúa más como un antioxidante que como un inhibidor enzimático porque reduce la cantidad inicial de quinona sintetizada por la enzima a partir de los difenoles originales, antes de que se produzcan las reacciones posteriores que dan lugar al pardeamiento (Whitaker, 1972).

En cuanto a los análogos de sustrato (Tabla V.2), la tropolona es el inhibidor más potente, ya que inhibe casi completamente a la enzima a 100 μM y lo hace totalmente a 1 mM tanto en presencia como en ausencia de SDS. En cambio, la inhibición provocada por la L-mimosina y por el ácido cinámico es dependiente de SDS y más afectiva en su presencia.

Resultados muy similares se observan al interpretar los datos de inhibición del ácido ascórbico y de la tropolona en tirosinasa de *S. antibioticus* (Tabla VII.1), aunque hay diferencias reseñables en el caso de la L-cisteína y L-mimosina (mucho más activas frente a tirosinasa de *S. antibioticus*) y el ácido cinámico (más activa frente a PPO de membrillo, tanto en presencia como en ausencia de SDS).

Como la tropolona fue el mejor inhibidor de los estudiados tanto en PPO de membrillo como en tirosinasa de *S. antibioticus*, se procedió a realizar un análisis cinético de su inhibición. La inhibición se determinó, en ambos casos, mediante gráficos de Lineweaver-Burk a tres concentraciones diferentes de inhibidor y fue confirmada por un gráfico de Dixon en el que se representó $1/v$ frente a la concentración de inhibidor (Figura VII.3 para tirosinasa de *S. antibioticus*). El estudio de PPO de membrillo se realizó tanto en ausencia (Figura V.4A), como en presencia de SDS (Figura V.4B). La regresión lineal de los datos define el punto de intersección en el segundo cuadrante en ambas enzimas. Esto significa que la inhibición de la tropolona sobre la PPO y tirosinasa es competitiva y las constantes de inhibición (K_I), que se deducen a partir de los puntos de intersección de las rectas, fueron de 4.7 μM para PPO de membrillo tanto en presencia como en ausencia de SDS, y 4.2 μM para tirosinasa de *S. antibioticus*. La constante de inhibición de la tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* frente a la tropolona no puede ser comparada con la de ninguna otra bacteria Gram positiva porque este es el primer estudio de inhibición de este compuesto en este grupo bacteriano. Sin embargo, ambas K_I son muy parecidas y casi 10 veces mayores que las observadas para este mismo inhibidor en PPO latente de caqui (Núñez-Delicado et al., 2003).

4.2 Efecto de las ciclodextrinas

Para completar el estudio de la inhibición de ambas enzimas, se estudió el efecto de compuestos secuestrantes como son las ciclodextrinas. Las ciclodextrinas son un grupo de oligosacáridos naturales formados por moléculas de glucosa unidas por enlace glucosídico α -(1 \rightarrow 4) (Saenger, 1983), producidas a partir de la degradación enzimática del almidón por la acción de la enzima ciclodextrin-glicosil-transferasa (E.C. 3.2.1.19) llevada a cabo por distintos microorganismos del género *Bacillus* (Nakamura y Horikoshi, 1977). Dependiendo de las condiciones de reacción, las CDs pueden quedar formadas por 6, 7 u 8 residuos de glucosa, siendo denominadas α -, β - y γ -ciclodextrinas, respectivamente (Figura IX.1).

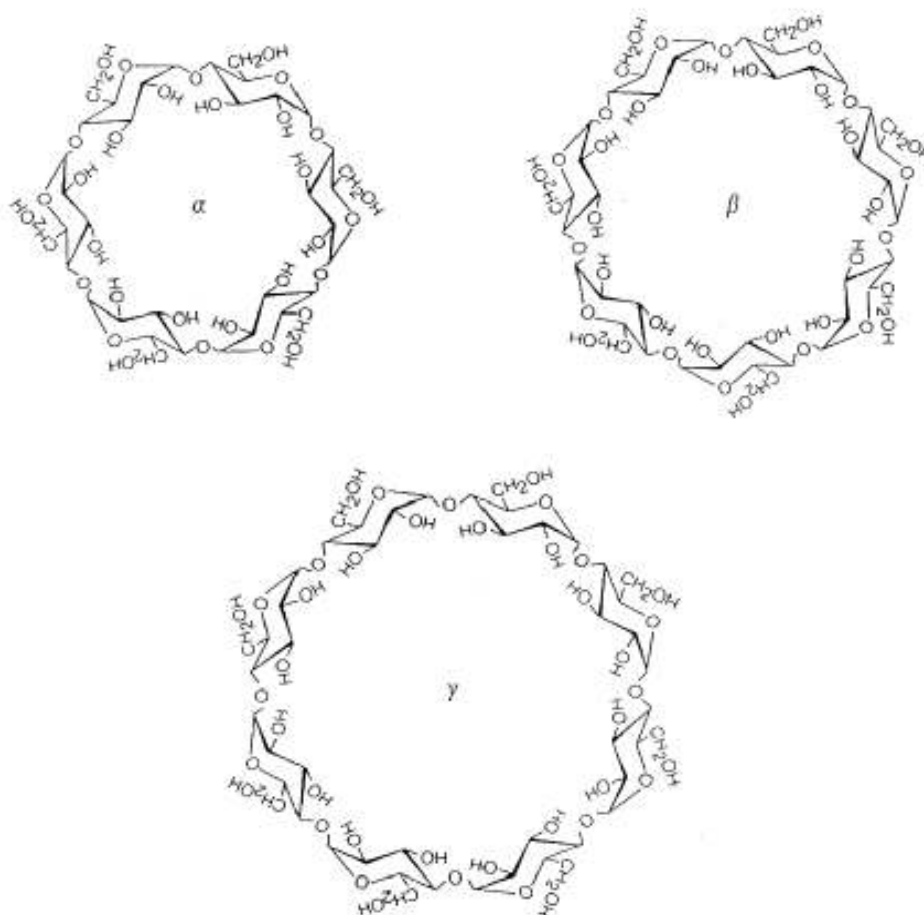


Figura IX.1. Estructura de α -, β - y γ -ciclodextrinas

Las estructuras formadas por estos anillos tienen forma tronco cónica, generando una cavidad interna hidrofóbica, mientras que su superficie externa es hidrofílica, por lo que son compuestos solubles en agua. Las bases de estos cilindros son diferentes. Mientras que una está recubierta por los hidroxilos secundarios de los azúcares, la otra contiene los hidroxilos primarios de los mismos y debido a su libertad de rotación, reducen el diámetro efectivo de dicha cavidad. La hidrofobicidad de la cavidad interna es debida a los hidrógenos y los oxígenos de los enlaces glicosídicos entre las moléculas de glucosa que la están recubriendo (Figura IX.2).

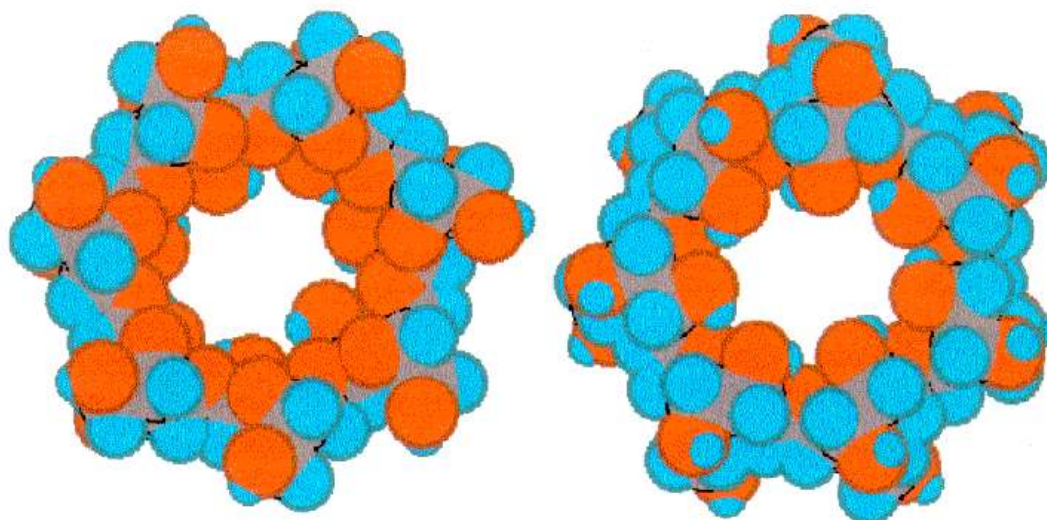


Figura IX.2. Estructura tronco-cónica de una molécula de β -ciclodextrinas en modelo CPK. A la izquierda, visión desde la parte ancha del cono (recubierta por los hidroxilos secundarios de los azúcares). A la derecha, visión desde la parte estrecha del cono (recubierta por los hidroxilos primarios de los azúcares). Los hidrógenos se han dibujado en azul, el oxígeno en rojo y los carbonos en negro.

El grupo hidroxilo del C2 de cada molécula de glucosa, puede formar un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo del C3 de la glucosa adyacente, formándose así un “cinturón” de enlaces que le da rigidez a la estructura. Este “cinturón” sólo se forma completamente en el caso de las β -CDs, ya que todas las moléculas de glucosa están en el mismo plano, por lo que este puede ser el motivo de su baja solubilidad en agua respecto al resto de las CDs.

Las dimensiones aproximadas de los distintos tipos de CDs se pueden observar en la Figura IX.3.

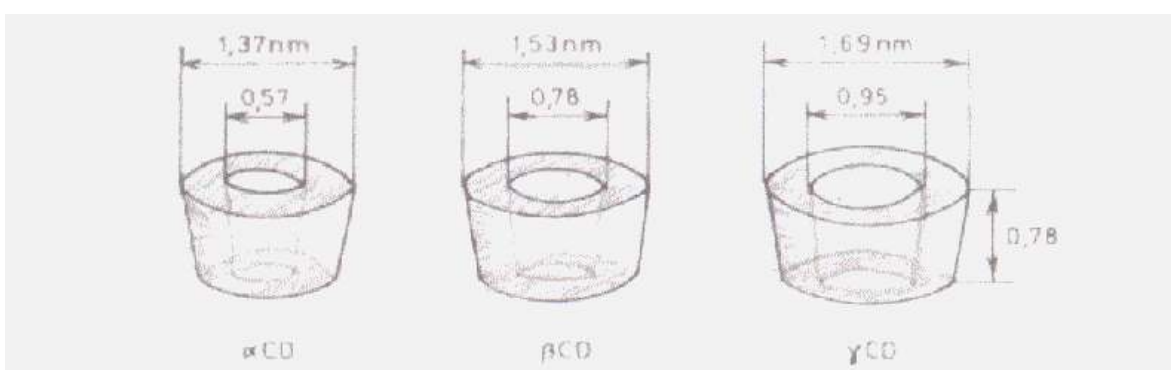
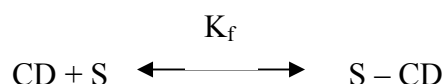


Figura IX.3. Dimensiones de los distintos tipos de CDs.

Actualmente y por diversas razones (precio, disponibilidad, dimensiones de la cavidad interna, etc...) las β -CDs son las más producidas y consumidas, aunque de los tres tipos son las menos solubles en agua (1.85 g/100 mL). Sin embargo, la solubilidad de las CDs puede ser aumentada por modificaciones tanto químicas como enzimáticas, sintetizando, de esta forma, gran variedad de CDs modificadas: metil- β -CDs (80 g/100 mL), dimetil- β -CDs (>50 g/100 mL) y 2-hidroxipropil- β -CDs (OH- β -CDs) (115 g/100 mL). Dentro de las CDs modificadas, las OH- β -CDs son las más baratas.

Una de las propiedades más importantes de las CDs es su capacidad selectiva para incluir una amplia gama de moléculas orgánicas, inorgánicas o iones en su cavidad hidrofóbica. A la estructura resultante de esta unión, se la llama “complejo de inclusión”. La formación del complejo de inclusión entre la CD y la molécula “huésped” es un proceso de equilibrio dinámico que puede ser representado como:



La estabilidad de los complejos de inclusión formados puede ser descrita cuantitativamente en términos de una constante de equilibrio de formación K_f que se define como:

$$K_f = \frac{[S - CD]}{[S]_L [CD]_L}$$

donde [S-CD] representa la concentración de sustrato complejoado con ciclodextrinas, mientras que $[CD]_L$ y $[S]_L$ representan la concentración de ciclodextrinas y sustrato libre en el equilibrio. Cuanto mayor sea el valor numérico de la constante de equilibrio de formación K_f , más estable será el complejo formado. El valor de esta constante de equilibrio es dependiente del pH, cuando la molécula a complejar es ionizable; y en general, como toda constante de equilibrio, de la temperatura.

La cavidad hidrofóbica permite a las CDs formar complejos de inclusión con gran cantidad de moléculas hidrofóbicas, entre ellas polifenoles (Cai et al., 1990). Se ha sugerido que las ciclodextrinas podrían moderar el pardeamiento causado por PPO en diferentes frutas y vegetales (Fayad et al., 1997), ya que forman complejos de inclusión con los sustratos de polifenol oxidasa, previniendo, de esta forma, la oxidación de las quinonas y su polimerización subsecuente hacia pigmentos oscuros. En la figura IX.4 se puede observar la unión de las OH- β -CDs con un sustrato, quedando los grupos hidrofílicos hacia el exterior y los grupos hidrofóbicos en el interior de la cavidad de las ciclodextrinas.

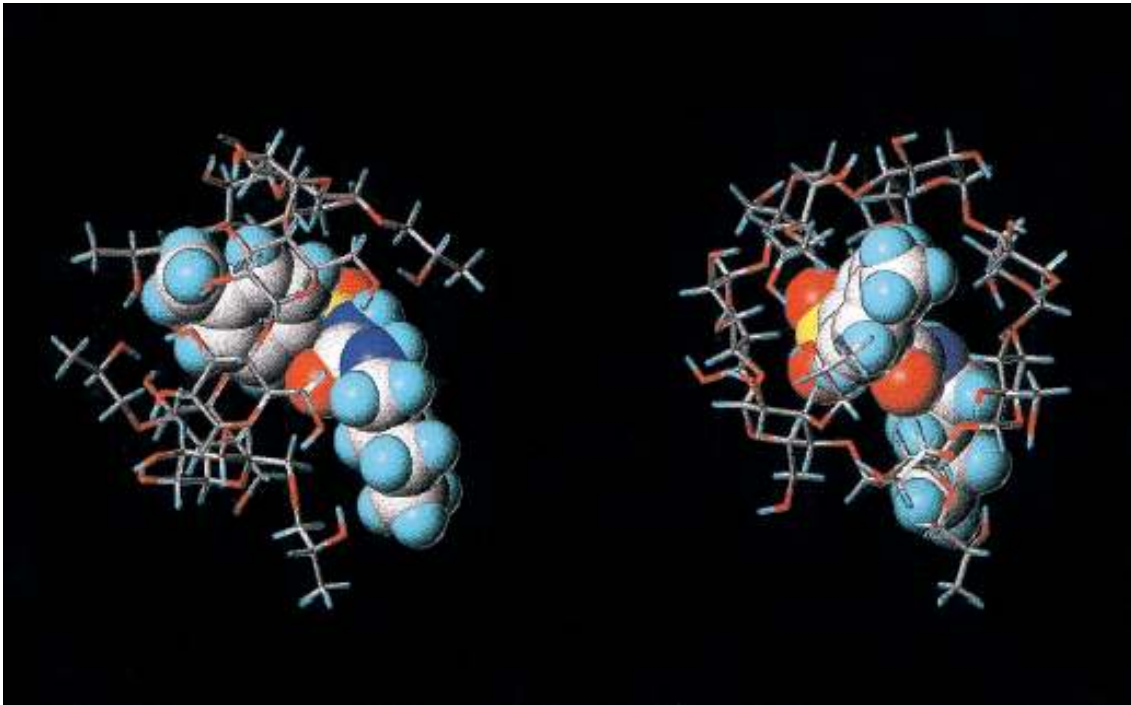


Figura IX.4. Hidroxipropil- β -ciclodextrina con sustrato unido. El sustrato se une por interacciones hidrofóbicas, quedando los grupos hidrofílicos hacia el exterior y los hidrofóbicos en contacto con la cavidad interna de la ciclodextrina modificada (Suihko et al., 2000).

En la caracterización de polifenol oxidasa de membrillo llevada a cabo en esta tesis, sólo se observó el papel de las ciclodextrinas como inhibidores de la actividad enzimática por la acción “secuestrante” frente al sustrato, en este caso, *tert*-butilcatecol (TBC). Sin embargo, en la tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* también se estudió el papel de las ciclodextrinas como activadores al ser capaces de incluir en su cavidad interna inhibidores competitivos hidrofóbicos de la tirosinasa, como son el hinokitiol y el hexestrol, cuyo uso no había sido descrito anteriormente en bacterias.

Cuando se midió la actividad tirosinasa de *S. antibioticus* frente a dopamina en presencia de OH- β -CDs o de γ -CDs, no se observó disminución alguna en su actividad. Este hecho, indica claramente que la dopamina es un *o*-difenoil altamente hidrofílico que no se compleja con las CDs. Para comprobarlo, se usó TBC, un *o*-difenoil más hidrofóbico. En este caso, una disminución clara de la actividad se

observó en tirosinasa de *Streptomyces* (Figura VII.4A en presencia de OH-β-CDs y Figura VII.4B en presencia de γ-CDs).

Las ciclodextrinas modificadas (OH-β-CDs) fueron seleccionadas, por su mayor capacidad de inhibición, para llevar a cabo un análisis más completo de la disminución de la actividad frente a las enzimas de membrillo y de *S. antibioticus*. Cuando la concentración de CDs se incrementó desde 0 hasta 10 mM, se observó un claro descenso de la actividad de la PPO de membrillo a tres concentraciones diferentes de sustrato (Figura V.5). Este descenso indica que el TBC libre entra en la cavidad hidrofóbica de las CDs formando complejos de inclusión, disminuyendo la concentración de TBC libre disponible para la enzima. Esta concentración puede expresarse matemáticamente como en la Ecuación 1 (Núñez-Delicado et al., 2003):

$$[TBC]_f = \left(-([CD]_t - [TBC]_t K_c + 1) + \sqrt{([CD]_t K_c - [TBC]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [TBC]_t} \right) / 2K_c \quad (1)$$

Donde los subíndices *f* y *t* representan la concentración libre y total de los compuestos, en este caso, TBC y CDs. De este modo, la ecuación completa de Michaelis-Menten puede ser expresada (Núñez-Delicado et al., 2003):

$$v = \frac{V_m \left[-([CD]_t K_c - [TBC]_t K_c + 1) + \sqrt{([CD]_t K_c - [TBC]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [TBC]_t} \right]}{K_M + \left[-([CD]_t K_c - [TBC]_t K_c + 1) + \sqrt{([CD]_t K_c - [TBC]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [TBC]_t} \right]} \quad (2)$$

La Ecuación 2 muestra una relación no lineal entre *v* y la [CD], como puede observarse en las Figuras V.5 para PPO de membrillo y VII.4A y B para tirosinasa. El ajuste de los datos experimentales de la disminución de la actividad de PPO de membrillo, mediante regresión no lineal a la Ecuación 2, muestra un valor para la constante de formación de los complejos (*K_c*) de 15310 M⁻¹ entre TBC y las ciclodextrinas modificadas.

En el caso de tirosinasa de *S. antibioticus*, esta constante usando el mismo sustrato y el mismo tipo de CDs, es de 13170 M⁻¹. Ambos valores son similares a

los descritos anteriormente para la oxidación del TBC por lipoxigenasa en presencia de ciclodextrinas (Núñez-Delicado et al., 1999a).

Del mismo modo, se calculó esta constante para el TBC y las γ -CDs, dando un valor de 603 M^{-1} . Esta K_c no se ha descrito anteriormente en la bibliografía.

Para completar el comportamiento cinético de la tirosinasa de *S. antibioticus* en presencia de ciclodextrinas, se estudió el efecto de inhibidores hidrofóbicos usando un substrato hidrofílico para evitar cualquier interferencia del substrato con las CDs. El substrato utilizado fue la dopamina y se buscaron dos inhibidores hidrofóbicos cuyo uso no había sido descrito anteriormente en bacterias. Estos inhibidores, al ser hidrofóbicos, pueden interactuar con las CDs entrando en su cavidad central. De esta manera, el efecto secuestrante de las ciclodextrinas provocó un aumento de la actividad al estar disponible menos cantidad de inhibidor libre para unirse a la enzima. Como puede observarse en las Figuras VII.5 y VII.6, a medida que aumenta la concentración de cualquiera de los dos tipos de ciclodextrinas utilizados, se produce un incremento asintótico de la actividad hasta llegar al nivel de actividad obtenido en ausencia de inhibidores. (Figuras VII.5 y VII.6, línea punteada).

Para entender la recuperación de la actividad de tirosinasa cuando la dopamina es usada como substrato, es necesario el ajuste de los datos obtenidos experimentalmente a una regresión no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten, de lo que se deduce, que el hinokitiol y las CDs forman un complejo altamente estable, ya que su K_c es relativamente alta (12903 M^{-1}) y que el hexestrol tiene una menor capacidad de complejación porque su K_c es de sólo 856 M^{-1} . Este valor es muy similar al obtenido para el inhibidor 4-iodofenol y las OH- β -CDs usando PPO de pulpa de plátano (Sojo et al., 1999).

Como se puede observar en la Tabla VII.2, la capacidad de unión de las OH- β -CDs a los inhibidores hidrofóbicos es mucho mayor que la de las γ -CDs; este hecho puede explicarse fácilmente ya que las ciclodextrinas modificadas, como ya se ha explicado con anterioridad, tienen una mayor capacidad de solubilizar los compuestos insolubles en agua. Además, el mayor tamaño de la cavidad de las γ -

CDs podría reducir las interacciones hidrofóbicas, lo que impediría una óptima unión entre las ciclodextrinas y los compuestos insolubles en agua.

Una vez llevada a cabo la caracterización cinética de las actividades monofenolasa y difenolasa de las enzimas de membrillo y de *S. antibioticus*, se planteó el objetivo de conseguir el mayor rendimiento en la síntesis de compuestos difenólicos a partir de compuestos monofenólicos.

5. Fenol y Tirosol como substratos monofenólicos

Los compuestos monofenólicos que se eligieron para su bioconversión fueron el fenol y el tirosol. El fenol es un compuesto altamente contaminante que se encuentra en altas concentraciones en aguas residuales de refinerías petrolíferas, en plantas petroquímicas y en almazaras de aceite de oliva. La eliminación del fenol es un punto crítico para la biorremediación de contaminantes a elevadas temperaturas porque incluso bajas concentraciones de fenol pueden inhibir en gran medida el crecimiento de los microorganismos (Feitkenhauer et al., 2001). Además, en la mayoría de estudios realizados hasta el momento (Kim y Oriel, 1995; Duffner y Müller, 1998; Duffner et al., 2000; Feitkenhauer et al, 2001, Chen et al., 2004), los microorganismos sólo eran capaces de crecer y degradarlo hasta concentraciones de 1 mM. Por su alta capacidad contaminante y por la inhibición que provoca en el crecimiento de los microorganismos, se estudió la capacidad de las enzimas de membrillo y de *S. antibioticus* de transformar el fenol a elevadas concentraciones.

El tirosol 2-(4-hidroxifenil)etanol y el hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol) son los compuestos fenólicos mayoritarios en el aceite de oliva (Angerosa et al., 1995). La concentración de compuestos fenólicos en el aceite de oliva virgen extra puede variar de 50 a 800 mg/Kg (Visioli y Galli, 1994), con un valor medio en el aceite comercial de 180 mg/Kg (Owen et al., 2000). Se ha demostrado que los *o*-difenoles presentes en el aceite de oliva, de los cuales el hidroxitirosol es el más abundante, contribuyen a la estabilidad oxidativa del aceite (Rice-Evans et al., 1996; Visioli y Galli, 1998). Además, los *o*-difenoles han

demostrado capacidad antioxidante *in vitro*, mientras que los monofenoles muestran muy poca o ninguna capacidad (Leenen et al., 2002).

Sin embargo, estos no son los únicos beneficios para la salud humana encontrados en el hidroxitirosol, ya que resultados *in vitro*, han demostrado que este *o*-difenoil inhibe la oxidación de las lipoproteínas humanas de baja densidad (LDL) (Arouma et al., 1998), elimina radicales libres (Visioli y Galli, 1998), inhibe la agregación plaquetaria que puede provocar aterosclerosis (Petroni et al., 1995) y confiere protección a los neutrofilos en humanos (De la Puerta et al., 1999). Además, actúa como agente antibacteriano (Bisignano et al., 1999) y por su fácil absorción permite su aporte a la dieta (Manna et al., 2000). Por todas estas razones, sumando el interés económico que tiene el aceite de oliva no sólo en España sino también en el resto de países mediterráneos, y que el hidroxitirosol no está disponible comercialmente, se estudió la capacidad de bioconversión de las enzimas de membrillo y *Streptomyces antibioticus* de tirosol a hidroxitirosol.

6. Inmovilización de PPO y tirosinasa en diferentes soportes

Para ello, se inmovilizaron la polifenol oxidasa de membrillo y la tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* en diferentes soportes. Se utilizaron tres soportes diferentes para comparar los rendimientos de transformación de fenol en catecol y de tirosol en hidroxitirosol. Las tasas de bioconversión fueron seguidas por HPLC. Los soportes utilizados se diseñaron según el apartado 6 de Materiales y Métodos, y los resultados de la capacidad biosintética de difenoles a partir de monofenoles puede observarse en la Figura VIII.14 para el hidroxitirosol en todos los soportes, y en la Figura VIII.15 para el catecol en cubos de hidrogel. Se eligió este último soporte para el estudio sobre el fenol porque como puede observarse en la figura VIII.14 fue el que dio un mayor rendimiento en la biotransformación en los 7 ciclos en los que se midió el rendimiento del proceso. Tanto las esferas de alginato como los cubos de hidrogel (Figura VIII.14) dieron un resultado muy parecido en ambas enzimas inmovilizadas (aproximadamente un 60%), sin embargo, el uso de las

membranas provocó una disminución en la conversión de un 20% en PPO de membrillo y de hasta un 40% en tirosinasa de *Streptomyces antibioticus*.

7. Fenol Hidroxilasa de *Geobacillus thermoglucosidasius*

Como los resultados de bioconversión obtenidos en el apartado anterior eran insuficientes, se buscó una nueva enzima capaz de hidroxilar el fenol y el tirosol con un mayor rendimiento.

Para ello se eligió la bacteria termofílica *Geobacillus thermoglucosidasius* que es capaz de hidroxilar el fenol a temperaturas superiores a 65 °C. La enzima que realiza este proceso es la fenol hidroxilasa (PheA). El uso de enzimas termofílicas puede ser más ventajoso en términos de tasas metabólicas más altas, mayor solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos monofenólicos, menos viscosidad y un aumento de la estabilidad enzimática (Berquist et al., 1987). En la actualidad, se sabe muy poco sobre las características cinéticas de fenol hidroxilasa de *G. thermoglucosidasius*. Además, el hecho de que el fenol inhiba el crecimiento de los microorganismos, ha provocado que sólo se haya estudiado la biotransformación de este compuesto hasta una concentración de 1 mM. A parte de lo anteriormente mencionado, la capacidad de esta enzima de transformar el tirosol en hidroxitirosol nunca ha sido estudiada.

El hecho de que *G. thermoglucosidasius* sea una bacteria termófila entrañaba serias dificultades para su crecimiento, mantenimiento y posteriores estudios enzimáticos, por lo que se decidió extraer el gen que codifica para la fenol hidroxilasa e introducirlo en *E. coli* Rosetta, bacteria que está perfectamente definida tanto en sus medios de crecimiento y propagación, como en su temperatura óptima que es de 37 °C. Además, esta bacteria tiene capacidad para leer codones raros, por lo que es capaz de sintetizar proteínas de microorganismos que presentan estos codones en su secuencia aminoacídica, los cuales aparecen en un gran número de bacterias termófilas.

7.1 Clonación de Fenol Hidroxilasa

Fenol hidroxilasa de *G. thermoglucosidasius* es una enzima formada por dos componentes codificados por los genes *pheA1* y *pheA2*. Estos dos genes codifican para dos proteínas con pesos moleculares de 57 kDa y 17.8 kDa, respectivamente. Ambos componentes son necesarios para su actividad. El componente más grande codificado por *pheA1*, tiene actividad hidroxilasa. Su estructura es de un homodímero, pero no muestra actividad por sí mismo. El componente pequeño, codificado por *pheA2*, también se muestra como un homodímero y tiene actividad reductasa (Duffner et al., 2000).

En estudios anteriores se sugería la presencia de un sitio de comienzo de lectura del que no se conocía su función aguas arriba del gen *pheA1* (Duffner et al., 2000), por lo que en el desarrollo del trabajo de esta tesis se llevaron a cabo dos estrategias diferentes de clonaje con los dos genes en tandem.

En la primera de ellas se clonaron, en el vector pET-28a, los dos genes desde el comienzo de lectura del gen *pheA1* hasta el final del gen *pheA2* ya que sólo 20 nucleótidos separan a los dos genes en el genómico de la bacteria (Figura VIII.2A). En la segunda, además se clonó el fragmento aguas arriba del gen *pheA1* que corresponde al sitio de comienzo de lectura de función desconocida. El resto del fragmento a clonar era exactamente igual al de la primera estrategia y el vector utilizado también fue el mismo (Figura VIII.2B).

Como ya se ha comentado anteriormente, los dos homodímeros son necesarios para la actividad fenol hidroxilasa. Sin embargo, al inducir la síntesis de la proteína con IPTG, se observó que sólo se expresaba la subunidad grande (PheA1) y que no había nada de expresión de la segunda subunidad (PheA2) (Figura VIII.3, línea B). La explicación podría ser que, con los genes en tandem, la expresión de la proteína PheA2 debe usar el sitio de unión al ribosoma propio de *G. thermoglucosidasius*, que no es efectivo en *E. coli*. Sin embargo, estos transformantes sí mostraban actividad, por lo que *E. coli*, debe aportar la actividad reductasa.

Para analizar si la falta de la reductasa propia de *G. thermoglucosidasius* disminuía la actividad fenol hidroxilasa, se utilizó un nuevo vector (pET-Duet) que es capaz de sobreexpresar dos genes a la vez. Los distintos grados de expresión, dependiendo de las horas de inducción, del componente PheA2 de la enzima se pueden observar en la Figura VIII.3; calles C-F. La sobreexpresión de la subunidad PheA2 no corresponde con un aumento en la actividad fenol hidroxilasa. La explicación podría ser porque la concentración de la subunidad grande debe ser hasta 50 veces más que la de la subunidad pequeña (van der Heuvel et al., 2004). Por lo que no es necesario sobreexpresar la segunda y la proporcionada por *E. coli* aparece en suficiente cantidad como para no ser limitante en la reacción. Así que, al resultar más sencillo y cómodo trabajar con una sola enzima (PheA1, subunidad grande), se decidió continuar los estudios de bioconversión con las bacterias transformadas según la estrategia de clonación anteriormente mencionada.

7.2 Selección de clones con mayor actividad

Tras los procesos de ligación de los genes amplificados por PCR con los vectores digeridos con las enzimas de restricción (Figura VIII.2A y B), y transformación de *E. coli* Rosetta con los constructos obtenidos, se llevó a cabo la selección de los clones que mostraban más actividad. Esta selección se realizó a partir de una colección de más de 300 colonias de cada uno de los constructos realizados. Para una selección rápida y eficaz, este grupo desarrolló un sistema de detección de difenoles en el medio de crecimiento de *E. coli* Rosetta según el apartado 8.2.1 de Materiales y Métodos. Esta selección se realizó en placas de 96 pocillos con periodato sódico, que oxida a los compuestos difenólicos presentes en el medio convirtiéndolos en quinonas, apareciendo un color amarillo típico de estos compuestos. La presencia de este color se midió a 400 nm en un lector de placas de 96 pocillos.

Tras la selección de los clones con mayor actividad, es decir, aquellos que presentaban mayor absorbancia a 400 nm, los clones elegidos, se cultivaban, a partir de glicerol stock previamente almacenados, en 50 mL de medio Terrific Broth con

kanamicina (TB). Este medio permite un mayor crecimiento de *E. coli* que el medio LB, pero también es más caro y su contenido en sales es mayor. Por esta razón, este medio fue utilizado únicamente para el crecimiento a partir de glicerol stock y para obtener la mayor densidad óptica posible. Una vez conseguido este objetivo, el resto de cultivos se realizaron con medio LB por ser menos costoso, parámetro muy importante para el escalado de este proceso a nivel industrial y porque el contenido en sales es menor, permitiendo una mejor medida de la capacidad de bioconversión de los monofenoles a difenoles en el HPLC. El resumen esquemático de los pasos realizados desde la ligación hasta la medida de bioconversión de los clones con mayor actividad en el HPLC puede observarse en la Figura IX.5.

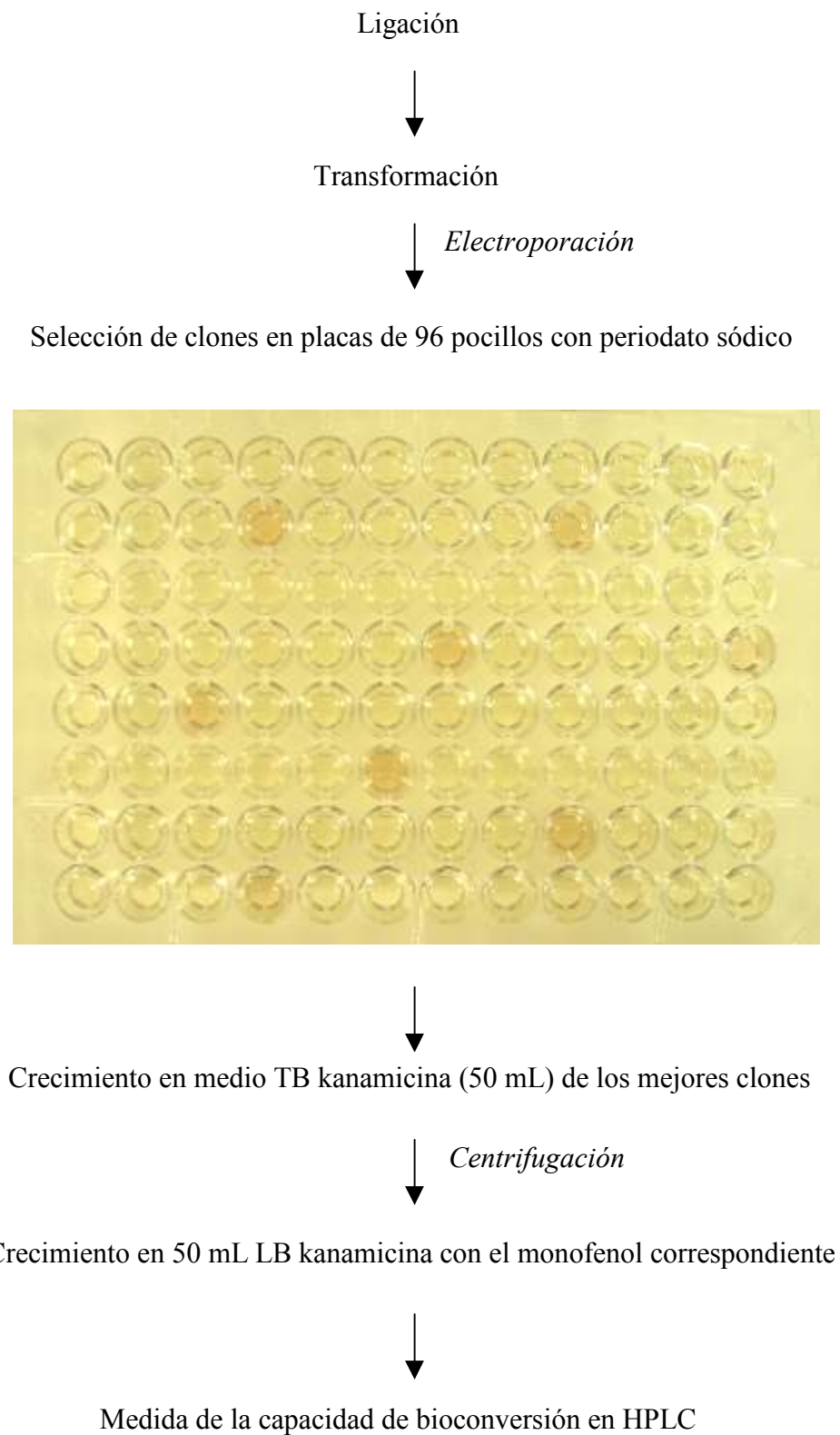


Figura IX.5. Resumen esquemático del proceso para la obtención de clones capaces de bioconvertir monofenoles en difenoles.

7.3 Bioconversión de monofenoles a *o*-difenoles

Una vez conseguido una densidad celular máxima, se optimizaron otros parámetros para obtener la mayor bioconversión posible. Para ello, se añadió al medio de cultivo (LB con kanamicina) 10 mM de ácido ascórbico, para evitar la oxidación de los *o*-difenoles dando lugar a sus correspondientes *o*-quinonas.

Tras la optimización de todos los parámetros del sistema, se procedió a medir mediante HPLC la tasa de bioconversión obtenida para ambos sustratos con cada uno de los transformantes. En la Figura VIII.4 puede observarse la reacción de bioconversión del fenol a catecol con el mejor de ellos, tras la inducción con IPTG durante 12 horas; y en la Figura VIII.5 la misma reacción pero sin necesidad utilizar el inductor, ya que esta construcción tiene el promotor constitutivo de fenol hidroxilasa de *G. thermoglucosidasius*. El rendimiento del proceso fue del 100% en ambos casos, sin embargo, el tiempo necesario para conseguir la total bioconversión fue diferente dependiendo de la presencia o ausencia del promotor propio. Así, cuando se indujo con IPTG el tiempo necesario fue solo de 12 horas, mientras que con el promotor constitutivo, el tiempo empleado fue de 16 horas.

Resultados similares se obtuvieron del estudio de bioconversión cuando el sustrato utilizado fue el tirosol. De la misma manera, cuando se indujo con IPTG, el tiempo que se necesitó para consumir todo el monofenol fue de 10 horas, mientras que con el promotor constitutivo fue de 14 horas. La explicación podría ser que con el IPTG se obtiene un mayor nivel de sobreexpresión de la subunidad grande de fenol hidroxilasa que con el promotor constitutivo.

Para asegurarnos que el producto obtenido a partir de la bioconversión del fenol era el catecol, se comparó el tiempo de retención de catecol comercial (Figura VIII.1) con el del producto obtenido (Figura VIII.11A).

Esta comparación no puede realizarse en el caso del hidroxitirosol ya que este compuesto no se puede obtener comercialmente. Por esa razón, se purificó el medio de cultivo pasándolo a través de una columna rellena con una resina hidrofóbica (Amberlite XAD-4). El hidroxitirosol purificado fue analizado por espectrometría de masas (GC-MS), y resonancia magnética nuclear de una

dimensión (1H-NRM) y de dos dimensiones (HMBC). De estos estudios cabe destacar, según la espectrometría de masas (GC-MS), un ión molecular M⁺ con una relación carga/masa de 154 (la relación descrita para el hidroxitirosol) con una primera pérdida de 31 unidades correspondiente a una fracción hidroximetileno (CH₂OH) (Figura VIII.8). En cuanto a la resonancia magnética nuclear de una dimensión (1H-NRM), se observa un patrón de sustitución en el anillo aromático que denota la presencia de tres sustituyentes en las posiciones relativas C1, C2 y C4, así como dos singletes anchos a 8.64 y 8.53 ppm atribuibles a dos grupos hidróxido fenólicos (Figura VIII.9). La posición real de los tres sustituyentes quedó confirmada al observar la correlación (HMBC) entre el carbono alifático a menor desplazamiento químico y las señales de protón del anillo correspondientes al doblete de 2.1 Hz y al doblete de dobletes con 2.1 y 8 Hz (Figura VIII.10).

7.4 Estabilidad operacional de las células transformadas

Una vez conseguida la bioconversión total de ambos monofenoles a sus correspondientes difenoles, se intentó definir un sistema de células completas con la capacidad de llevar a cabo este proceso de forma continua. Para ello se utilizaron las células transformadas con las construcciones anteriores. En la Figura VIII.12 puede observarse la capacidad de reutilización de las células de *E. coli* transformadas tanto con el gen con el promotor propio de fenol hidroxilasa, como con el gen sin este promotor constitutivo. En el primer caso, las células mantuvieron aproximadamente el 50% de la actividad inicial tras 5 ciclos. Sin embargo, en las células transformadas que necesitaban IPTG para ser inducidas la actividad cayó hasta el 20% con el mismo número de ciclos. Este hecho puede explicarse porque entre un ciclo y otro, las células no se incubaban durante toda la noche con IPTG, por lo que no se producía la inducción del gen *pheA1*. De este modo, las células con el promotor constitutivo mantenían mejor la actividad inicial. Además, este sistema de bioconversión mediante el uso de células completas muestra una capacidad más alta cuando el substrato utilizado es el tirosol que cuando es el fenol, tanto con el uso de la construcción con el promotor de *G. thermoglucosidasius* como sin él.

El estudio de todas las características de este sistema de células completas de *E. coli* transformadas con el gen de fenol hidroxilasa con y sin promotor propio para la producción de difenoles, muestra tres importantes ventajas que recomiendan el uso de la construcción con el promotor constitutivo y desaconseja el uso del IPTG, como son:

- No es necesaria una incubación de doce horas para la inducción.
- El coste es mucho menor.
- La reutilización de las células permite un rendimiento mucho mayor.

En comparación con la capacidad de bioconversión mostradas por otros sistemas celulares, la bioconversión mostrada por las células de *E. coli* Rosetta con el gen *pheA1* es del 100%, siendo, con diferencia, el sistema que ofrece un mayor rendimiento para la obtención de hidroxitirosol a partir de tirosol de la bibliografía, ya que el uso de otros sistemas con células completas sólo permite una capacidad máxima de bioconversión del 80%, como ocurre en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* (Allouche et al., 2004) y *Serratia marcescens* (Allouche y Sayadi, 2005).

CAPÍTULO X

Conclusiones

Conclusiones

1. Polifenol oxidasa de membrillo ha sido purificada mediante un sistema secuencial de separación de dos fases usando en primer lugar Triton X-114, seguido del uso de PEG-8000/fosfato con un fraccionamiento final con sulfato amónico. La utilización del Triton X-114 y el PEG-8000 fue indispensable para obtener un extracto enzimático estable y claro, ya que los estudios anteriores no conseguían caracterizar esta enzima porque el método de extracción era demasiado agresivo y laborioso.

2. La PPO de membrillo purificada por el método anteriormente descrito es latente, siendo activada por el detergente SDS hasta 15 veces. Además, es una auténtica polifenol oxidasa ya que muestra tanto actividad difenolasa como monofenolasa, siendo esta última actividad la primera vez que se describe en membrillo.

3. La purificación de tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* se realizó de manera similar a la de PPO de membrillo debido a la existencia de una alta concentración de pigmentos oscuros en el medio de cultivo que impedían su caracterización. Además, con este simple método se obtiene un extracto enzimático purificado y limpio sin necesidad de utilizar complejos pasos cromatográficos como hasta ahora estaba descrito en la bibliografía.

4. La presencia de actividad monofenolasa y difenolasa en el extracto enzimático demuestra que la enzima de *Streptomyces antibioticus* purificada a partir del caldo de cultivo es una verdadera tirosinasa. Dicha purificación ha permitido, por vez primera, la caracterización cinética de varios inhibidores, como tropolona, hinokitiol y hexestrol, sobre una tirosinasa de una bacteria Gram positiva.

5. El estudio cinético de la tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* sobre un substrato hidrofílico y otro hidrofóbico, junto con el uso de inhibidores altamente insolubles en agua, permitió demostrar, por primera vez, la inhibición y activación en una tirosinasa bacteriana llevada a cabo por ciclodextrinas, mediante la capacidad de incluir en su cavidad substratos o inhibidores hidrofóbicos.

6. La biotransformación de los monofenoles, fenol y tirosol, se ha ensayado en diferentes soportes de inmovilización de enzimas, observando que tanto PPO de membrillo, como tirosinasa de *Streptomyces antibioticus*, no eran capaces de una conversión total en catecol e hidroxitirosol, respectivamente.

7. La clonación del gen *pheA1* de *Geobacillus thermoglucosidasius* en *E. coli* Rosetta en presencia y ausencia de su promotor constitutivo, ha permitido la obtención de bioconversiones del 100% con concentraciones de monofenoles de 5 mM. Este proceso se ha completado entre 10 y 14 horas, dependiendo del monofenol y de la construcción usada (con IPTG o con promotor propio), siendo este último resultado (sin necesidad de IPTG) muy prometedor desde el punto de vista biotecnológico.

CAPÍTULO XI

Bibliografía

La bibliografía incluida en este apartado contiene las citas correspondientes a los Capítulos I, III y IX.

- Allouche, N., M. Damak, R. Ellouz, S. Sayadi. (2004). Use of whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol via conversion of tyrosol. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2105-2109.
- Allouche, N., and S. Sayadi. (2005). Synthesis of Hydroxytyrosol, 2-Hydroxyphenylacetic acid, and 3-Hydroxyphenylacetic acid by differential conversion of tyrosol isomers using *Serratia marcescens* strain. *J Agric. Food Chem.* **53**, 6525-6530.
- Ambrosi, C., Leoni, L., Putignani, L., Orsi, N., y Visca, P. (2000). Pseudobactin biogenesis in the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* strain B10: identification and functional analysis of the L-ornithine N(5)-oxygenase (psbA) gene. *J. Bacteriol.*, **182**, 6233-6238.
- Angerosa, F., D'Alessandro, N., Kostantinou, P., y Giacinto, I. (1995). GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1802-1807.
- Antson A.A., Demidkina, T.V., Gollnick, P., Dauter, Z., von Tersch, R.L., Long, J., Berezhnoy, S.N., Phillips, R.S., Harutyunyan, E.H., y Wilson, K.S. (1993). Three-dimensional structure of tyrosine phenol-lyase. *Biochemistry*, **32**, 4195-4206.
- Aruoma, O. I., Deiana, M., Jenner, A., Halliwell, B., Kaur, H., Banni, S., Corongiu, F.P., Dessi, M.A., y Aeschbach, R. (1998). Effects of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and low-density lipoprotein oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 5181-5187.
- Ballou, D.P., Entsch, B., y Cole, L.J. (2005). Dynamics involved in catalysis by single-component and two-component flavin-dependent aromatic hydroxylases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **338**, 590-598.
- Barto, E.K., y Cipollini, D. (2005). Testing the optimal defense theory and the growth-differentiation balance hypothesis in *Arabidopsis thaliana*. *Oecologia*. **146**, 169-178.

- Beaty, N.B., y Ballou, D.P. (1981). The oxidative half-reaction of liver microsomal FAD-containing monooxygenase. *J. Biol. Chem.*, **256**, 4619-4625.
- Beena, P., y 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.
- Bell, C.E., Yeates, T.O., y Eisenberg, D. (1997). Unusual conformation of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) bound to diphtheria toxin: a comparison with NAD bound to the oxidoreductase enzymes. *Protein Sci.*, **6**, 2084-2096.
- Berquist, P.L., Love, D.R., Croft, J.E., Streiff, M.B., Daniel, R.M. y Morgan, W.H. (1987). Genetics and potencial biotechnological applications of thermophilic and extremely thermophilic microorganism. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **5**, 199-204.
- Bilka, F., Balazova, A., Bilkova, A., Subr, Z., y Psenak, M. (2003). Characterization of polyphenol oxidase from the latex of opium poppy. *Biología Planta.*, **47**, 111-115.
- Bisignano, A., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., y Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**, 971-974.
- Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki, G., Iwai, K., y Takeuchi, T. (2004). Molecular cloning, gene expression in albino mutants and gene knockdown studies of tyrosinase mRNA in rainbow trout. *Pigment Cell Res.*, **17**, 413-421.
- Boss, P.K., Gardner, R.C., Janssen, B., y Ross, G.S. (1995). An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues. *Plant Mol. Biol.*, **27**, 429-433.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and densitive method for the quantification of microgram cuantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-258.
- Brender, J.R., Dertouzos, J., Ballou, D.P., Massey, V., Palfey, B.A., Entsch, B., Steel, D.G., y Gafni, A. (2005). Conformational dynamics of the

- isoalloxazine in substrate-free p-hydroxybenzoate hydroxylase: single-molecule studies. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 18171-18178.
- Burton, K.S., Love, M.E. y Smith, J.F. (1993a) Biochemical changes associated with mushroom quality in *Agaricus* spp. *Enzyme Microbiol. Technol.* **15**, 736-741.
- Burton, K.S., Woot, D.A., Thurston, C.F. y Barker, P.J. (1993b) Purification and characterization of a serine protease from senescent sporophores of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1379-1386.
- Cabanes, J., García-Cánovas, F., Lozano, J.A. y García-Carmona, F. (1987) A kinetic study of the melanization pathway between L-tyrosine and dopachrome. *Biochim. Biophys. Acta.* **923**, 187-195.
- Cai, Y., Gaffney, S.H., Lilley, T.H., Magnolato, D., Martin, R., Spencer, C.M., y Haslam, E. (1990). Polyphenol interactions. Part 4. Model studies with caffeine and cyclodextrins. *J. Chem. Soc. Pekin Trans.*, **2**, 2197-2209.
- Cary, J.W., Lax, A.R. y Flurkey, W.H. (1992). Cloning and characterization of cDNAs coding for *Vicia faba* polyphenol oxidase. *Plant. Mol. Biol.* **20**, 245-253.
- Cashman, J.R. (2004). The implications of polymorphisms in mammalian flavin-containing monooxygenases in drug discovery and development. *Drug. Discov. Today*, **9**, 574-581. Review.
- Chazarra, S., Cabanes, J., Escribano, J. y 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.
- Chazarra, S., García-Carmona, F., y Cabanes, J. (2001a). Hysteresis and positive cooperativity of iceberg lettuce polyphenol oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.*, **289**, 769-775.

- Chazarra, S., García-Carmona, F., y Cabanes, J. (2001b). Evidence for a tetrameric form of iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.) polyphenol oxidase: purification and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4870-4875.
- Chen, P., y Solomon, E.I. (2004). O₂ activation by binuclear Cu sites: noncoupled versus exchange coupled reaction mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 13105-13110.
- Chen, W.M., Chang, J.S., Wu, C.H., y Chang, C.S. (2004). Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. *Res. Microbiol.*, **155**, 672-680.
- Chiu, H.J., Johnson, E., Schroder, I., y Rees, D.C. (2001). Crystal structures of a novel ferric reductase from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus* and its complex with NADP⁺. *Structure*, **9**, 311-319.
- Claus, H., y Decker, H. (2006) Bacterial tyrosinases. *Syst. Appl. Microbiol.*, **29**, 3-14.
- Constabel, C.P., Bergey, D.R., y Ryan, C.A. (1995). Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signalling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 407-411.
- Cuff, M.E., Miller, K.I., van Holde, K.E., y Hendrickson, W.A. (1998). Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin. *J. Mol. Biol.*, **278**, 855-870.
- De la Puerta, R., Ruiz-Gutiérrez, V., y Houtl, J.R. (1999). Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 445-449.
- Decker, H., y Tuczec, F. (2000). Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 392-397. Review.
- Decker, H., Dillinger, R., y Tuczec, F. (2000). How Does Tyrosinase Work? Recent Insights from Model Chemistry and Structural Biology. *Angew Chem Int Ed Engl.*, **39**, 1591-1595.

- Decker, H., Ryan, M., Jaenicke, E., y Terwilliger, N. (2001). SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 17796-17799.
- Ding, C.K., Chachin, K., Ueda, Y., y Imahori, Y. (1998). Purification and properties of polyphenol oxidase from loquat fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4144-4149.
- Divari, S., Valetti, F., Caposio, P., Pessione, E., Cavaletto, M., Griva, E., Gribaudo, G., Gilardi, G., y Giunta, C. (2003). The oxygenase component of phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 2244-2253.
- Duckworth, H.W. y Coleman, J.E. (1970). Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **245**, 1613-1625.
- Duffner, F. M., y Müller, R. (1998). A novel phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* strain A2: nucleotide sequence and analysis of the genes. *FEMS Microb. Lett.*, **161**, 37-45.
- Duffner, F.M., Kirchner, U., Bauer, M.P., Muller, R. (2000). Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7: cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. *Gene*, **256**, 215-221.
- Eicken, C., Krebs, B., y Sacchettini, J.C. (1999). Catechol oxidase-structure and activity. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 677-683. Review.
- Eickman, N.C., Solomon, E.I., Larrabee, J.A., Spiro, T.G. and Lerch, K. (1978). Ultraviolet resonance Raman study of oxytyrosinase. Comparison with oxyhemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 6529-6531.
- Entsch, B., Cole, L.J., y Ballou, D.P. (2005). Protein dynamics and electrostatics in the function of p-hydroxybenzoate hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **433**, 297-311. Review.

- Escribano, J., Cabanes, J., y García-Carmona, F. (1997a). Characterization of latent polyphenol oxidase in table beet: effect of sodium dodecyl sulphate. *J. Sci. Food Agric.*, **73**, 34-38.
- Escribano, J., Cabanes, J., Chazarra, S., y García-Carmona, F. (1997b). Characterization of monophenolase activity of table beet polyphenol oxidase. Determination of kinetic parameters on the tyramine/dopamine pair. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4209-4214.
- Escribano, J., Gandia-Herrero, F., Caballero, N., y Pedreño, M.A. (2002). Subcellular localization and isoenzyme pattern of peroxidase and polyphenol oxidase in beet root (*Beta vulgaris* L.), *J Agric Food Chem.* **50**, 6123-6129.
- Espín, J.C., Morales, M., Varón, R., Tudela, J., y García-Cánovas, F. (1995). Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Verdoncella apple. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2807-2812.
- Fayad, N., Marchal, L., Billaud, C., y Nicolas, J. (1997). Comparison of β -cyclodextrin effect on polyphenol oxidation catalysed by purified polyphenol oxidase from different sources. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2442-2446.
- Feitkenhauer, H., Schnicke, S., Muller, R., y Markl, H. (2001). Determination of the kinetic parameters of the phenol-degrading thermophile *Bacillus thermoleovorans* sp. A2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 744-750.
- Filisetti, L., Fontecave, M., y Niviere, V. (2003). Mechanism and substrate specificity of the flavin reductase ActVB from *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 296-303.
- Francis, E., Wang, N., Parag, H., Halaban, R., y Hebert, D.N. (2003). Tyrosinase maturation and oligomerization in the endoplasmic reticulum require a melanocyte-specific factor. *J. Biol. Chem.*, **278**, 25607-25617.
- Frederick, K.K., y Palfey, B.A. (2005). Kinetics of proton-linked flavin conformational changes in p-hydroxybenzoate hydroxylase. *Biochemistry*, **44**, 13304-13314.
- Fuerst, E.P., Anderson, J.V., Morris, C.F. (2006). Delineating the role of polyphenol oxidase in the darkening of alkaline wheat noodles. *J Agric Food Chem.* **54**, 2378-2384.

- Fujita, Y., Uraga, I. y Ichisima, E. (1995). Molecular cloning and nucleotide sequence of the protyrosinase gene *melO*, from *Aspergillus oryzae* and expression of the gene in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1261**, 151-154.
- Galán, B., Díaz, E., Prieto, M.A., y García, J.L. (2000). Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of *Escherichia coli* W: a prototype of a new Flavin:NAD(P)H reductase subfamily. *J. Bacteriol.*, **182**, 627-636.
- Galeazzi, M.A.M., y Sgarbieri, V.C. (1981). Substrate specificity and inhibition of polyphenol oxidase from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1826-1831.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. (2005a). Characterization of the activity of tyrosinase on betaxanthins derived from (R)-amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 9207-9212.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. (2005b). Betaxanthins as pigments responsible for visible fluorescence in flowers. *Planta*, **222**, 586-593.
- Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., Escribano, J. (2005c). Botany: floral fluorescence effect. *Nature*, **437**, 334.
- Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., Escribano, J. (2005d). A novel method using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of betaxanthins. *J Chromatogr A.*, **1078**, 83-89.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. (2005e). Characterization of the monophenolase activity of tyrosinase on betaxanthins: the tyramine-betaxanthin/dopamine-betaxanthin pair. *Planta*, **222**, 307-318.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. (2005f). Betaxanthins as substrates for tyrosinase. An approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. *Plant Physiol.*, **138**, 421-432.
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atienzar, M., Cabanes, J., García-Carmona, F., y Escribano, J. (2005g). Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem.*, **386**, 601-607.

- García-Borrón, J.C., y Solano F. (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment. Cell Res.*, **15**, 162-173.
- García-Cánovas, F., García-Carmona, F., y Lozano, J.A. (1981). Hysteresis of mushroom tyrosinase. Lag period of cresolase activity. *Phytochemistry*, **20**, 1215-1217.
- García-Carmona, F., Pedreño, E., Galindo, J.D., y García-Cánovas, F. (1979). A new spectrophotometric method for the determination of cresolase activity of epidermis tyrosine. *Anal. Biochem.* **95**, 433-435.
- García-Carmona, F., García-Cánova, F., Iborra, J.L. y Lozano, J.A. (1982). Kinetic study of the pathway of melanization between L-Dopa and Dopachorome. *Biochim. Biophys. Acta.* **717**, 124-131.
- Gatti, D.L., Palfey, B.A., Lah, M.S., Entsch, B., Massey, V., Ballou, D.P., y Ludwig, M.L. (1994). The mobile flavin of 4-OH benzoate hydroxylase, *Science*, **266**, 110-114.
- Gentschev, P., Möller, y Krebs, B. (2000). New functional models for catechol oxidases. *Inorg. Chim. Acta*, **300-302**, 442-452.
- Gerdemann, C., Eicken, C., Galla, H.J., y Krebs, B. (2002a). Comparative modeling of the latent form of a plant catechol oxidase using a molluskan hemocyanin structure. *J. Inorg. Biochem.*, **89**, 155-158.
- Gerdemann, C., Eicken, C., y Krebs, B. (2002b). The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. *Acc. Chem. Res.*, **35**, 183-191. Review.
- Golan-Goldhirsh, A., y Whitaker, J.R. (1984). Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1003-1009.
- Goldbeck, J.H. y Cammarata, K.V. (1981) Spinach tylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant. Physiol.* **67**, 977-984.

- Griva, E., Pessione, E., Divari, S., Valetti, F., Cavaletto, M., Rossi, G.L., y Giunta, C. (2003). Phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* S13. Isolation and characterization of the regulatory component. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1434-1440.
- Gutteridge, S. y Robb, D.A. (1975) The catecholase activity of *Neurospora* tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **54**, 107-116.
- Haruta, M., Pedersen, J.A., y Constabel, C.P. (2001). Polyphenol oxidase and herbivore defense in trembling aspen (*Populus tremuloides*): cDNA cloning, expresión, and potential substrates. *Physiol. Plant.*, **112**, 552-558.
- Hearing, V.J., Ekel, J.M. (1976). Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosinase hydroxylation and melanin formation. *Biochem. J.*, **157**, 549-557.
- Himmelwright, R.S., Eickmen, N.C., LuBien, C.D., Lerch, K. y Solomon, E.I. (1980) Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7339-7344.
- Hintermann, G., Zatchej, M., y Hutter, R. (1985). Cloning and expression of the genetically unstable tyrosinase structural gene from *Streptomyces glaucescens*. *Mol Gen Genet.*, **200**, 422-432.
- Hunt, M.D., Eannetta, N.T., Yu, H., Newman, S.M., y Steffens, J.C. (1993). cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant. Mol. Biol.*, **21**, 59-68.
- Ikedioji, C.O., y Obasuyi, H.N. (1982). Purification and some properties of diphenolase from white yam tubers. *Phytochemistry*, **21**, 2815-2820.
- Jaenicke, E., y Decker, H. (2004). Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase. *Micron*. **35**, 89-90.
- Jiménez-Atienzar, M., Pedreño, M.A., y García-Carmona, F. (1991). Activation of polyphenol oxidase by polyamines. *Biochem. Int.*, **25**, 861-868.
- Jiménez, M., y García-Carmona, F. (1993). Measurement of latent polyphenol oxidase activity in the presence of the divalents cations Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺. *Phytochem. Anal.*, **4**, 149-151.

- Jiménez, M. y García-Carmona, F. (1996a). The effect of sodium dodecyl sulphate on polyphenol oxidase. *Phytochemistry* **42**, 1503-1509.
- Jiménez, M. y García-Carmona, F. (1996b) Hydrogen peroxide-dependent 4-tert-butylcatechol hydroxylation by tyrosinase. A new catalytic activity. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1297**, 33-39.
- Jiménez-Cervantes, C., García-Borron, J.C., Lozano, J.A. y Solano, F. (1995). Effect of detergents and endogenous lipids on the activity and properties of tyrosinase and its related proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1243**, 421-430.
- Jones, K.C., y Ballou, D.P. (1986). Reactions of the 4a-hydroperoxide of liver microsomal flavin-containing monooxygenase with nucleophilic and electrophilic substrates. *J. Biol. Chem.*, **261**, 2553-2559.
- Jolley, R.L. Jr, Evans, L.H., Makino, N. y Mason, H.S. (1974) Oxytyrosinase. *J. Biol. Chem.* **249**, 335-345.
- Joy, R.W., Sugiyama, M., Fukuda, H., y Komamine, A. (1995). Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant. Physiol.*, **107**, 1083-1089.
- Kahn, V. (1977) Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two avocado varieties differing in their browning rates. *J. Food Sci.* **42**, 38-43.
- Karplus, P.A., Daniels, M.J., y Herriott, J.R. (1991). Atomic structure of ferredoxin-NADP⁺ reductase: prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science*, **251**, 60-66.
- Katagiri, M., Maeno, H., Yamamoto, S., Hayaishi, O., Kitao, T., y Oae, S. (1965). Salicylate hydroxylase, a monooxygenase requiring flavin adenine dinucleotide II. The mechanism of salicylate hydroxylation to catechol. *J. Biol. Chem.*, **240**, 3414-3417.
- Kenten, R.H. (1957). Latent phenolase in extracts of broad-bean (*Vicia faba* L.) leaves. I. Activation by acid and álcali. *Biochem J.*, **67**, 300-307.
- Kenten, R.H. (1958). Latent phenolase in extracts of broad-bean (*Vicia faba* L.) leaves. 2. Activation by anionic wetting agents. *Biochem J.*, **68**, 244-251.
- Kim, C., y Oriel, P.J. (1995). Characterization of the *Bacillus stearothermophilus* BR219 phenol hydroxylase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1252-1256.

- Kim, J.Y., Seo, Y.S., Kim, J.E., Sung, S.K., Song, K.J., An, G., y 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 Sci.*, **161**, 1145-1152.
- King, R.S. y Flurkey, W.H. (1987). Effects of limited proteolysis on broad bean polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.* **41**, 231-240.
- Kirchner, U., Westphal, A.H., Muller, R., y van Berkel, W.J. (2003). Phenol hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidasius* A7, a two-protein component monooxygenase with a dual role for FAD. *J. Biol. Chem.* **278**, 47545-47553.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C., y Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 1084-1090.
- Kupper, U., Niedermann, D.M., Travaglini, G. y Lerch, K. (1989) Isolation and characterization of the tyrosinase gene from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **264**, 1250-1258.
- Kwang-Hoon, K., Min-Pyo, H., Sang-Sook, C., Yong-Tae, K., y Sung-Hye, C. (2000). Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **31**, 113-118.
- Laden, B.P., Tang, Y., y Porter, T.D. (2000). Cloning, heterologous expression, and enzymological characterization of human squalene monooxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **374**, 381-388.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lanker, T., Flurkey, W. H. y Hughes, J.P. (1988). Cross-reactivity of polyclonal and monoclonal antibodies to polyphenol oxidase in higher plants. *Phytochemistry* **27**, 3731-3734.
- Laveda, F., Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F., y Sánchez-Ferrer, A. (2000). Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch Biochem Biophys.*, **379**, 1-6.

- Laveda, F., Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F., y Sánchez-Ferrer, A. (2001). Proteolytic activation of latent Paraguaya peach PPO. Characterization of monophenolase activity. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1003-1008.
- Lax, A.R., y Vaughn, K.C. (1991). Colocation of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.*, **96**, 26-31.
- Lax, A.R. y Cary, J.W. Biology and molecular biology of polyphenol oxidase. En *Enzymatic browning and its prevention*, Lee, C. Y., Whitaker, J.R., Ed., Am. Chem. Soc.: Washington, DC, 1995, pp 120-128.
- Leenen, R., Roodenburg, A.J., Vissers, M.N., Schuurbijs, J.A., van Putte, K.P., Wiseman, S.A., y van de Put, F.H. (2002). Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: influence on LDL oxidation. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1290-1297.
- Lerch, K. y Ettliger, L. (1972). Purification and characterization of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *Eur. J. Biochem.* **31**, 427-437.
- Lerch, K. (1976) *Neurospora* tyrosinase: molecular weight, copper content and spectral properties. *FEBS Lett.* **69**, 157-160.
- Lerch, K. (1983). *Neurospora* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell Biochem.*, **52**, 125-138.
- Lerner, H.R., Mayer, A.M., y Harel, E. (1972). Evidence for conformational changes in grape catechol oxidase. *Phytochemistry*, **11**, 2415-2421.
- Ling-Yun, C., Wei-Ming, L., Kung-Tsung, W., y Yan-Hwa, W.L. (1992). Copper transfer and activation of the *Streptomyces* apotyrosinase are mediated through a complex formation between apotyrosinase and its trans activator melC1. *J Biol Chem.*, **267**, 20100-20107.
- Ling-Yun, C., Mei-Yu, C., Wei-Ming, L., Tzung-Yuan T., y Yan-Hwa, W.L. (1993). Mutational study of *Streptomyces* tyrosinase trans-activator melC1. *J Biol Chem.*, **268**, 18710-18716.

- Liu, N., Zhang, T., Wang, Y.J., Huang, J.H., Ou, J.H. y Shen, P. (2004). A heat inducible tyrosinase with distinct properties from *Bacillus thuringiensis*. *Lett Appl Microbiol.*, **39**, 407-412.
- Louie, T.M., Xie, X.S., y Xun, L. (2003). Coordinated production and utilization of FADH₂ by NAD(P)H-flavin oxidoreductase and 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase. *Biochemistry*, **42**, 7509-7517.
- Manna, C., Galletti, P., Maisto, G., Cucciolla, V., D'Angelo, S., y Zappia, V. (2000). Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2-cells. *FEBS Lett.* **470**, 341-344.
- Marqués, L, Fleuriet, A y Macheix, J.J. Fruit polyphenol oxidase. New data on and old problem. En *Enzymatic browning and its prevention*, Lee, C. Y., Whitaker, J.R., Ed., Am. Chem. Soc.: Washington, DC, 1995, pp 90-102.
- Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoeppler, A., y Poggi, V. (2003). Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry*, **63**, 745-752.
- Mason, H.S., Fowlks, W.B., y Peterson, E.W. (1955) Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J.Am. Chem. Soc.* **77**, 2914-2915.
- Mason, H.S. (1965) Oxidases. *Ann. Rev. Biochem.* **34**, 595-634.
- Matheis, G. (1987). Polyphenol oxidase and enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). I. Properties of potato polyphenol oxidase. *Chem Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, **11**, 33-41.
- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., y Sugiyama, M. (2006). Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J Biol Chem.*, **281**, 8981-8990.
- Mayer, A.M. y Harel, E. (1979) Review: Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, **18**, 193-225.
- Mayer, A.M. (1987) Polyphenol oxidases in plants: recent progress. *Phytochemistry*, **26**, 11-20.

- Mayer, A.M. y Harel, E. Phenoloxidasas and their significance in fruits and vegetables. En *Food Enzymology*, Fox, P.F., Eds, Elsevier Applied Sciences: London, 1991, pp 373-398.
- Melo, G.A., Shimizu, M.M., y Mazzafera, P. (2006). Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. *Phytochemistry*, **67**, 277-285.
- Moran, G.R., Entsch, B., Palfey, B.A., y Ballou, D.P. (1996). Evidence for flavin movement in the function of p-hydroxybenzoate hydroxylase from studies of the mutant Arg220Lys. *Biochemistry*, **35**, 9278-9285.
- Moran, G.R., Entsch, B., Palfey, B.A., y Ballou, D.P. (1997). Electrostatic effects on substrate activation in para-hydroxybenzoate hydroxylase: studies of the mutant lysine 297 methionine. *Biochemistry*, **36**, 7548-7556.
- Moore, B.M. y Flurkey, W. H. (1990). Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenol oxidase. *J. Biol. Chem.* **265**, 4982-4988.
- Murzin, A.G. (1998). Probable circular permutation in the flavin-binding domain. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 101.
- Nagai, T., y Suzuki, N. (2001). Partial purification of polyphenol oxidase from chinese cabbage *Brassica rapa* L. *J Agric Food Chem.*, **49**, 3922-3926.
- Naish-Byfield, S., y Riley, P.A. (1992). Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase: An oximetric study. *Biochem. J.*, **288**, 63-67.
- Nakamura, K., Amano, Y., y Kagami, M. (1983). Purification and some properties of a polyphenol oxidase from kosu grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **34**, 122-127.
- Nakamura, N., y Horikoshi, K. (1977). Production of Schardinger beta-dextrin by soluble and immobilized cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus sp.* *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 87-99.
- Nakayama, T., Yonekura-Sakakibara, K., Sato, T., Kikuchi, S., Fukui, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Ueda, T., Nakao, M., Tanaka, Y., Kusumi, T., y Nishino, T.

- (2000). Aureusidin synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science*, **290**, 1163-1166.
- Nakayama, T., Sato, T., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Hayashi, H., Tanaka, Y., Kusumi, T., y Nishino, T. (2001). Specificity analysis and mechanism of aurone synthesis catalyzed by aureusidin synthase, a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *FEBS Lett.*, **499**, 107-111.
- Nakayama T. (2002). Enzymology of aurone biosynthesis. *J Biosci Bioeng.*, **94**, 487-491.
- Naraoka, T., Uchisawa, H., Mori, H., Matsue, H., Chiba, S., y Kimura, A. (2003). Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from the cephalopod mollusk, *Illex argentinus*. *Eur J Biochem.* **270**, 4026-4038.
- Newman, S.M., Eannetta, N.T., Yu, H., Prince, J.P., de Vicente, M.C., Tanksley, S.D., Steffens, J.C. (1993). Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Mol. Biol.* **21**, 1035-1051.
- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M., y Aubert, S.Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *CRC Rev. Food Sci. Nutr.*, **34**, 109-157.
- Nishimura, M., Fukuda, C., Murata, M., y Homma, S. (2003). Cloning and some properties of japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) polyphenol oxidase, and changes in browning potential during fruit maturation. *J. Sci. Food Agric.*, **83**, 1156-1162.
- Nordlund, I., Powlowski, J., y Shingler, V. (1990). Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.*, **172**, 6826-6833.
- Núñez-Delicado, E., Bru, R., Sánchez-ferrer, A. y García-Carmona, F. (1996). Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **680**, 105-112.

- Núñez-Delicado, E., Sojo, M.M., García-Carmona, F., y Sánchez-Ferrer, A. (2003). Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2058-2063.
- Núñez-Delicado, E., Serrano-Megías, M., Pérez-López, A.J., y López-Nicolás, J.M. (2005). Polyphenol oxidase from dominga table grape. *J. Agric. Food. Chem.* **53**, 6087-6093.
- Obata, H., Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Akao, T., Akita, O., y Ichishima, E. (2004). Cloning of a novel tyrosinase-encoding gene (melB) from *Aspergillus oryzae* and its overexpression in solid-state culture (Rice Koji). *J Biosci Bioeng.*, **97**, 400-405.
- Ono, E., Hatayama, M., Isono, Y., Sato, T., Watanabe, R., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Tanaka, Y., Kusumi, T., Nishino, T., y Nakayama, T. (2006). Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Plant J.* **45**, 133-143.
- Onsa, G.H., bin Saari, N., Selamat, J., y Bakar, J. (2000). Latent polyphenol oxidases from sago log (Metroxylon sago): partial purification, activation, and some properties. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5041-5045.
- Ortíz-Maldonado, M., Ballou, D.P., y Massey, V. (1999). Use of free energy relationships to probe the individual steps of hydroxylation of p-hydroxybenzoate hydroxylase: studies with a series of 8-substituted flavins. *Biochemistry*, **38**, 8124-8137.
- Ortiz-Maldonado, M., Aeschliman, S.M., Ballou, D.P., y Massey, V. (2001). Synergistic interactions of multiple mutations on catalysis during the hydroxylation reaction of p-hydroxybenzoate hydroxylase: studies of the Lys297Met, Asn300Asp, and Tyr385Phe mutants reconstituted with 8-Cl-flavin. *Biochemistry*, **40**, 8705-8716.
- Ortíz-Maldonado, M., Entsch, B., y Ballou, D.P. (2004). Oxygen reactions in p-hydroxybenzoate hydroxylase utilize the H-bond network during catalysis. *Biochemistry*, **43**, 15246-15257.

- Otto, K., Hofstetter, K., Rothlisberger, M., Witholt, B., y Schmid, A. (2004). Biochemical characterization of StyAB from *Pseudomonas* sp. strain VLB120 as a two-component flavin-diffusible monooxygenase. *J. Bacteriol.*, **186**, 5292-5302.
- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalder, B., y Bartsch, H. (2000). Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.*, **1**, 107-112. Review.
- Palfey, B.A., Ballou, D.P., Massey, V. En: *Oxygen activation by flavins and pterins*. Valentine, J.S., Foote, C.S., Greenberg, A., Liebman, J.F. (Eds.), Active oxygen in biochemistry, Blackie Academic and Profesional, New York, 1995, pp 37-83.
- Palfey, B.A., Ballou, D.P., y Massey, V. (1997). Flavin conformational changes in the catalytic cycle of p-hydroxybenzoate hydroxylase substituted with 6-azido- and 6-aminoflavin adenine dinucleotide. *Biochemistry*, **36**, 15713-15723.
- Palfey, B.A., y Massey, V. En: Flavin-dependent enzymes. Sinnott, M. (Ed.), Comprehensive biological catalysis, Academic Press, New York, 1998, pp 83-154.
- Palfey, B.A., Moran, G.R., Entsch, B., Ballou, D.P., y Massey, V. (1999). Substrate recognition by "password" in p-hydroxybenzoate hydroxylase. *Biochemistry*, **38**, 1153-1158.
- Palfey, B.A., Basu, R., Frederick, K.K., Entsch, B., y Ballou, D.P. (2002). Role of protein flexibility in the catalytic cycle of p-hydroxybenzoate hydroxylase elucidated by the Pro293Ser mutant. *Biochemistry*, **41**, 8438-8446.
- Palumbo, A., Misuraca, G., D'Ischia, M., y Prota, G. (1985). Effect of metal ions on the kinetics of tyrosine oxidation catalyzed by tyrosinase. *Biochem. J.*, **288**, 647-651.

- Park, H.S., Xing, R., y Whitman, W.B. (1995). Nonenzymatic acetolactate oxidation to diacetyl by flavin, nicotinamide and quinone coenzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1245**, 366-370.
- Partington, J.C., Smith, C., y Bolwell, G.P. (1999). Changes in the location of polyphenol oxidase in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber during cell death in response to impact injury: comparison with wound tissue. *Planta*, **207**, 449-460.
- Paul, B., y 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.
- Peñafiel, R., Galindo, J.D., Pedreño, E., y Lozano, J.A. (1982). The process for the activation of frog epidermis pro-tyrosinase. *Biochem. J.*, **205**, 397-404.
- Pérez-Gilabert, M., Morte, A., y García-Carmona, F. (2004). Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Sci.*, **166**, 365-370.
- Petroni, A., Blasevich, M., Salami, M., Papini, N., Montedoro, G.F., y Galli, C. (1995). Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic component of olive oil. *Thromb. Res.*, **78**, 151-160.
- Pless D.D., Aguilar, M.B., Falcon, A., Lozano-Alvarez, E., y Heimer de la Cotera, E.P. (2003). Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean. *Arch. Biochem. Biophys.*, **409**, 402-410.
- Pomerantz, S.H. y Warner, M.C. (1967) 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine as the tyrosinase cofactor. *J. Biol. Chem.* **242**, 5308-5314.
- Poon, W.W., Davis, D.E., Ha, H.T., Jonassen, T., Rather, P.N., y Clarke, C.F. (2000). Identification of *Escherichia coli* ubiB, a gene required for the first monooxygenase step in ubiquinone biosynthesis. *J. Bacteriol.*, **182**, 5139-5146.

- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., y Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, **20**, 933-56.
- Robb, D.A., Mapson, L.W., y Swain, T. (1964). Activation of the latent tyrosinase of broad bean. *Nature*, **201**, 503-504.
- Robb, D.A. En *Copper Proteins and Copper Enzymes*, Lontie, R., Ed., CRC Press: Boca Raton, FL, 1984, Vol 2.
- Robinson, S.P. y Dry, I.B. (1992). Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60 kDa protein susceptible to proteolytic cleavage. *Plant Physiol.* **99**, 317-323.
- Rodríguez-López, J.N., Tudela, J., Varón, R., y García-Cánovas, F. (1992). Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.*, **267**, 3801-3806.
- Rompel, A., Fischer, H., Meiwes, D., Buldt-Karentzopoulos, K., Dillinger, R., Tuzek, F., Witzel, H., y Krebs, B. (1999). Purification and spectroscopic studies on catechol oxidases from *Lycopus europaeus* and *Populus nigra*: evidence for a dinuclear copper center of type 3 and spectroscopic similarities to tyrosinase and hemocyanin. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **4**, 56-63.
- Ros, J.R., Rodríguez-López, J.N., y García-Cánovas, F. (1993). Effect of ferrous ions on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1163**, 303-308.
- Rost, B., y Sander, C. (2000). Third generation prediction of secondary structures. *Methods Mol. Biol.*, **143**, 71-95.
- Saenger, W. (1983). Stereochemistry of circularly closed oligosaccharides: cyclodextrin structure and function. *Biochem. Soc. Trans.*, **11**, 136-139.
- Sánchez-Amat, A., Lucas-Elio, P., Fernández, E., García-Borron, J.C., y Solano, F. (2001). Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim Biophys Acta*, **1547**, 104-116.

- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R., Cabanes, J. y García-Carmona, F. (1988) Characterization of cresolase and catecholase activities of Monastrell grape polyphenol oxidase. *Phytochemistry* **27**, 319-321.
- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R. y García-Carmona, F. (1989a) 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., Villalba, J. y García-Carmona, F. (1989b). Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase. *Phytochemistry* **28**, 1321-1325.
- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R. y García-Carmona, F. (1990). Partial purification of a thylakoid-bound enzyme using temperature-induced phase partitioning. *Anal. Biochem.* **184**, 279-282.
- Sánchez-Ferrer, A., Laveda, F., y García-Carmona, F. (1993). 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, Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y García-Carmona, F. (1995) Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1247**, 1-11.
- Sato, T., Nakayama, T., Kikuchi, S., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Ueda, T., Nishino, T., Tanaka, Y., y Kusumi, T. (2001). Enzymatic formation of auronones in the extracts of yellow snapdragon flowers. *Plant Sci.*, **160**, 229-236.
- Savagaon, K.A., y Sreenivasan, A. (1978). Activation mechanism of pre-phenolase in lobster and shrimp. *Fish. Technol.*, **15**, 49-55.
- Schwimmer, S. En *Source boox of Food Enzymology*: AVI Publishing: Westport, CT, 1981, pp 267-285.
- Seo, S.Y., Sharma, V.K., y Sharma, N. (2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J Agric Food Chem.*, **51**, 2837-2853.

- Shahar, T., Hennig, N., Gutfinger, T., Hareven, D., y Lifschitz, E. (1992). The tomato 66.3-kD polyphenoloxidase gene: molecular identification and developmental expression. *Plant Cell.*, **4**, 135-147.
- Sheng, D., Ballou, D.P., y Massey, V. (2001). Mechanistic studies of cyclohexanone monooxygenase: chemical properties of intermediates involved in catalysis. *Biochemistry*, **40**, 11156-11167.
- Sherman, T.D., Vaughn, K.C., y Duke, S.O. (1991). A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, **30**, 2499-2506.
- Shermann, T.D., Le Gardeur, T. y Lax. Implication of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase in plants. En *Enzymatic browning and its prevention*, Lee, C.Y., Whitaker, J.R., Ed., American Chemical Society: Washington, DC, 1995, pp 103-119.
- Siegbahn, P.E., y Blomberg, M.R. (2004). Important roles of tyrosines in photosystem II and cytochrome oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1655**, 45-50. Review.
- Smith, P.E., y Tanner, J.J. (2000). Conformations of nicotinamide adenine dinucleotide NAD(+) in various environments. *J. Mol. Recognit.*, **13**, 27-34.
- Söderhäll, K., Carlberg, I., y Eriksson, T. (1985). Isolation and partial purification of prophenoloxidase from *Daucus carota* L. Cell cultures. *Plant Physiol.*, **78**, 730-733.
- Söderhäll, I. (1995) Properties of carrot polyphenol oxidase. *Phytochemistry* **39**, 33-38.
- Sojo, M.M., Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F., y 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.
- Sojo, M.M., Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F., y Sánchez-Ferrer, A. (1999). Cyclodextrins as activator and inhibitor of banana pulp polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 518-523.

- Solomon, E.I., Baldwin, M.J. y Lowery, M.D. (1992). Electronic structure of active sites in copper proteins: contributions to reactivity. *Chem. Rev.* **92**, 521-542.
- Solomon, E.I. y Lowery, M.D. (1993). Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science*, **259**, 1575-1581.
- Sommer, A., Neeman, E., Steffens, J.C., Mayer, A.M. y Harel, E. (1994) Import, targeting and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant. Physiol.* **105**, 1301-1311.
- Strothkamp, K.G., Jolley, R.L. y Mason, H.S. (1976) Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **70**, 519-524.
- Sttefens, J.C., Harel, E. y Hunt, M.D. En *Genetic Engineering of plant secondary metabolism*, Eds. B.E. Ellis et al. Plenum Press, New York, 1994, pp. 275-286.
- Strack, D., Vogt, T., y Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalains research. *Phytochemistry*, **62**, 249-269.
- Streffer, K., Vijgenboom, E., Tepper, A.W., Makower, A., Scheller, F.W., Canters, G.W., Wollenberger, U. (2001). Determination of phenolic compounds using recombinant tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. *Anal. Chim. Acta.*, **427**, 201-210.
- Sugumaran, M., y Nellaiappan, K. (1991). Prophenoloxydase activation by lipids. *Am. Zool.*, **31**, 88.
- Suihko, E., Poso, A., Corhonen, O., Gynther, J., Ketolainen, J., y Paronen, P. (2000). Deformation behaviors of tolbutamide, hydroxypropyl- β -cyclodextrin and their dispersions. *Pharmaceut. Res.*, **17**, 942-948.
- Sullivan, M.L., Hatfield, R.D., Thoma, S.L., y Samac, D.A. (2004). Cloning and characterization of red clover polyphenol oxidase cDNAs and expression of active protein in *Escherichia coli* and transgenic alfalfa. *Plant Physiol.*, **136**, 3234-3244.
- Swain, T., Mapson, L.W., y Robb, D.A. (1966). Activation of *Vicia faba* (L.) tyrosinase as effected by denaturing agents. *Phytochemistry*, **5**, 469-482.

- Takizawa, N., Yokoyama, H., Yanagihara, K., Hatta, T., y Kiyohara, H. (1995). A locus of *Pseudomonas pickettii* DTP0602 that encodes 2,4,6-trichlorophenol-4-dechlorinase with hydroxylase activity, and hydroxylation of various chlorophenols by the enzyme. *J. Ferm. Bioeng.* **80**, 318-326.
- Tamada, T., Kitadokoro, K., Higuchi, Y., Inaka, K., Yasui, A., de Ruiter, P.E., Eker, A.P., y Miki, K. (1997). Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 887-891.
- Than, R., Feldmann, A.A., y Krebs, B. (1999). Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatases and catechol oxidases. *Coord. Chem. Rev.*, **182**, 211-214.
- Thipyapong, P., Hund, M.D., y Steffens, J.C. (1995). Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, **40**, 673-676.
- Tripathi, R., Hearing, V., Urabe, K., Aroca, P. y Spritz, R. (1992) Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 23707-23712.
- Tzung-Yuan, T., y Yan-Hwa, W.L. (1998). Roles of Copper ligands in the activation and secretion of *Streptomyces* tyrosinase. *J Biol Chem.*, **273**, 19243-19250.
- Vadas, A., Monbouquette, H.G., Johnson, E., y Schroder, I. (1999). Identification and characterization of a novel ferric reductase from the hyperthermophilic Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 36715-36721.
- Valero, E. y García-Carmona, F. (1992). pH induced kinetic co-operativity of a thylakoid-bound polyphenol oxidase. *Biochem. J.* **286**, 623-626.
- Valero, E., Varón, R. y García-Carmona, F. (1992). Kinetic study of effect of metabisulfite on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 904-908.
- Valero, E., y García-Carmona, F. (1998). pH dependent effect of sodium chloride on latent grape polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 2447-2451.
- Valero, E., Lozano, M.I., Varón, R., García-Carmona, F. (2003a). Enzymatic synthesis of 3'-hydroxyacetaminophen catalyzed by tyrosinase. *Biotechnol. Prog.*, **19**, 1632-1638.

- Valero, E., Varón, R., García-Carmona, F. (2003b). Catalytic oxidation of acetaminophen by tyrosinase in the presence of L-proline: a kinetic study. *Arch. Biochem. Biophys.*, **416**, 218-226.
- Valton, J., Fontecave, M., Douki, T., Kendrew, S.G., y Niviere, V. (2006). An aromatic hydroxylation reaction catalyzed by a two-component FMN-dependent Monooxygenase. The ActVA-ActVB system from *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.*, **281**, 27-35.
- van Gelder, C.W., Flurkey, W.H., y Wichers, H.J. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*. **45**, 1309-1323. Review.
- van den Heuvel, R.H., Westphal, A.H., Heck, A.J., Walsh, M.A., Rovida, S., van Berkel, W.J., y Mattevi, A. (2004). Structural studies on flavin reductase PheA2 reveal binding of NAD in an unusual folded conformation and support novel mechanism of action. *J. Biol. Chem.*, **279**, 12860-12867.
- Vaughan, P.F.T., Eason, R., Paton, J., y Ritchie, G.A. (1975). Molecular weight and aminoacid composition of purified spinach beet phenolase. *Phytochemistry*, **14**, 2383-2386.
- Vaughn, K.C. y Duke, S.O. (1981) Tissue localization of polyphenol oxidase in *Sorghum*. *Protoplasma*, **108**, 319-327.
- Vaughn, K.C. y Duke, S.O. (1984) Function of polyphenol oxidase in higher plants. Minireview. *Physiol. Plant.* **60**, 106-112.
- Vaughn, K.C., Lax, A.R. y Duke, S.O. (1988) Polyphenol oxidase: chloroplast enzyme with no established function. *Physiol. Plant.* **72**, 659-665.
- Visioli, F., Galli, C. (1994). Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sci.*, **55**, 1965-1971.
- Visioli, F., y Galli, C. (1998). The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr. Rev.*, **56**, 142-147. Review.
- Walter, W.M., y Purcell, A.E. (1980). Effect of substrate on polyphenol oxidase activity related to darkening of potato cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 941-944.

- Wang, J., y Constabel, C.P. (2004a). Three polyphenol oxidases from hybrid poplar are differentially expressed during development and after wounding and elicitor treatment. *Physiol. Plant.*, **122**, 344-353.
- Wang, J., y Constabel, C.P. (2004b). Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta*, **220**, 87-96.
- Wang, N., y Hebert, D.N. (2006). Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life. *Pigment Cell Res.*, **19**, 3-18. Review.
- Whitaker JR, *Principles of Enzymology for the Food Science*; Dekker: New York, (1972).
- Whitaker, J. En *Food Enzymes. Structure and mechanism*. Eds, D. Wong. Chapman and Hall, (1995) pp 271-307.
- Wichers, H.J., Peetsna, G.J., Malingré, Th. M. y Huizing, H.J. (1984) Purification and properties of a phenoloxidase derived from suspension cultures of *Mucuna pruriens*. *Planta*, **162**, 334-341.
- Wichers, H.J., Recourt, K., Hendriks, M., Ebbelaar, C.E., Biancone, G., Hoerberichts, F.A., Mooibroek, H., y Soler-Rivas, C. (2003). Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**, 336-341.
- Wilcox, D.E., Porras, A.G., Hang, Y.T., Lerch, K., Winkler, M.E. y Solomon, E.I. (1985). Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosine. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 4015-4027.
- Wititsuwannakul, D., Chareonthiphakorn, N., Pace, M., y Wititsuwannakul, R. (2002). Polyphenol oxidases from latex of *Hevea brasiliensis*: purification and characterization. *Phytochem.* **61**, 115-121.
- Wittenberg, C., y Triplet, E.L. (1985a). A detergent-activated tyrosinase from *Xenopus laevis*. I. Purification and partial characterization. *J. Biol. Chem.*, **260**, 12535-12541.

- Wittenberg, C., y Triplet, E.L. (1985b). A detergent-activated tyrosinase from *Xenopus laevis*. II. Detergent activation and binding. *J. Biol. Chem.*, **260**, 12542-12546.
- Yagar, H., y Sagiroglu, A. (2002). Partial purification and characterization of *Cydonia oblonga* polyphenol oxidase of quince. *Turk J Chem.*, **26**: 97-103.
- Yamamoto, S., Katagiri, M., Maeno, H., y Hayaishi, O. (1965). Salicylate hydroxylase, a monooxygenase requiring flavin adenin dinucleotide I. Purification and general properties. *J. Biol. Chem.*, **240**, 3408-3413.
- Yang, C.P., Fujita, S., Kohno, K., Kusubayashi, A., Ashrafuzzaman, M., y Hayashi, N. (2001). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum L.*) peel. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1446-1449.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C. G. y Eskin, N.A.M. Polyphenol oxidase. En *Oxidative Enzymes in Foods*. Robinson, D.S., Eskin, N.A.M., Eds. Elsevier: London, 1991, pp. 217-273.
- Zhang, X., van Leeuwen, J., Wichers, H.J., y Flurkey, W.H. (1999). Characterization of tyrosinase from the cap flesh of portabella mushrooms. *J Agric Food Chem.*, **47**, 374-378.
- Zhao, M., Saito, N., Li, L., Baranov, E., Kondoh, H., Mishima, Y., Sugiyama, M., Katsuoka, K., y Hoffman, R.M. (2000). A novel approach to gene therapy of albino hair in histoculture with a retroviral *Streptomyces* tyrosinase gene. *Pigment. Cell Res.* **13**, 345-351.
- Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D., y Chory, J. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*, **291**, 306-309.