

**POLIFENOLOXIDASA Y PEROXIDASA DE PULPA DE UVA
CAIMARONA (*Pourouma cecropiifolia*)**

**POLYPHENOL OXIDASE AND PEROXIDASE FROM CAIMARONA GRAPE
FLESH (*Pourouma cecropiifolia*)**

Ángela Patricia Rivera Camelo*, Patricia Restrepo** y Carlos Eduardo Narváez Cuenca**

Recibido: 11/05/04 – Aceptado: 30/06/04

RESUMEN

Las enzimas polifenoloxidasas (PFO) y peroxidasa (POD) fueron extraídas de la pulpa de uva caimaronas (*Pourouma cecropiifolia*) y caracterizadas parcialmente. Para PFO se encontró un pH óptimo de 7,0, temperatura óptima de 45 °C y K_M de 0,42 mM con L-Dopa como sustrato. Para POD se halló un pH óptimo de 6,0, temperatura óptima de 37 °C y valores de K_M de 2,0 mM para guaiacol y 0,72 mM para H_2O_2 . El perfil electroforético mostró cinco iso-PFO y tres iso-POD. POD fue más termorresistente que PFO. De cuatro inhibidores estudiados el ácido ascórbico fue el inhibidor más potente, seguido por el bisulfito de sodio, mientras que el ácido cítrico y el cloruro de sodio fueron los menos potentes.

Palabras clave: polifenoloxidasas, peroxidasa, *Pourouma cecropiifolia*, pardeamiento, inhibidores, frutas amazónicas, uva caimaronas.

ABSTRACT

Polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) were extracted from caimaronas grape (*Pourouma cecropiifolia*) flesh and they were partially characterized. The optimum pH for PPO was 7.0 and optimum temperature 45 °C. PPO had a K_M value of 0.42 mM for L-Dopa. POD had an optimum pH of 6.0 and optimum temperature of 37 °C. POD had K_M values of 2.0 mM and 0.72 mM for guaiacol and H_2O_2 , respectively. Five iso-PPO and three iso-POD were found. POD presented higher thermal stability than PPO. Ascorbic acid was the most effective inhibitor of both enzymes followed by sodium bisulfite. Sodium chloride and citric acid were poor inhibitors.

Key words: Polyphenol oxidase, peroxidase, *Pourouma cecropiifolia*, browning, inhibitors, Amazon fruit, uva caimaronas.

* Universidad de la Amazonia, Florencia, Caquetá.

** Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
Correo electrónico: cenarvaez@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

Es importante aclarar que aunque *Pourouma cecropiifolia* es conocida como uva caimaronana en la región amazónica colombiana esta fruta es diferente de la especie *Vitis*. Esta fruta, considerada como promisorio de la región, se distingue no sólo por su contenido de sustancias minerales sino también por su color y sabor (1). La uva caimaronana sólo es comercializada en la región amazónica y sitios alejados debido a que es altamente perecedera: cuando se almacena a 20 y 25 °C presenta un tiempo de vida útil de 5 y 2 días, respectivamente, y por debajo de 15 °C exhibe lesiones por frío, siendo su principal factor de daño el pardeamiento de su pulpa (2). La uva caimaronana es procesada en diferentes productos como vino, en almíbar y en mermelada, pero su mercado es limitado.

Diversas investigaciones han relacionado la actividad de la fracción citoplasmática (soluble) de polifenoloxidasas (EC 1.14.18.1, PFO) y peroxidasa (EC 1.11.1.7, POD) con el deterioro del color, sabor, textura y valor nutricional de vegetales frescos y procesados, ya que justamente esta fracción es la que entra más fácilmente en contacto con los sustratos propios de las células (3-6). Se sabe que las enzimas PFO y POD extraídas de diferentes tejidos vegetales pueden ser inactivadas por tratamientos térmicos (7-9) y por ciertos compuestos químicos usados en la industria de los alimentos, como cloruro de sodio, sulfitos, ácido ascórbico, sacarosa, EDTA y ácido benzoico (8-13). Es necesario caracterizar la PFO y la POD solubles extraídas de la pulpa de uva caimaronana para fortalecer la aplicación de métodos adecuados, permiti-

dos en la industria de los alimentos, que generen productos con buena aceptación, para controlar el pardeamiento de la pulpa de uva caimaronana. Este trabajo se planteó con el objeto de estudiar algunas características cinéticas de la fracción soluble de PFO y POD extraídas de la pulpa de uva caimaronana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Frutas de uva caimaronana. Las frutas estudiadas en este experimento fueron cosechadas en su madurez sensorial (100% color morado en corteza). Éstas se obtuvieron de un cultivo tecnificado en Corpoica-Macagual, ubicado a 20 km de Florencia, Caquetá (25 °C, 85% HR), en la Amazonia colombiana. Se seleccionaron las frutas sanas, libres de infección y se despulparon manualmente.

Obtención del extracto enzimático. La pulpa fue congelada con aire líquido y homogenizada con acetona a -20 °C durante 20 s en relación 1 a 5 (w/v). El polvo de acetona resultante fue filtrado al vacío y lavado con acetona fría hasta lograr un filtrado incoloro. Los polvos de acetona fueron agitados durante 24 h con buffer fosfatos 100 mM, pH 7,0 (relación pulpa:extractante, 1:1, w/v). La suspensión resultante fue centrifugada a 12.000 x g durante 10 min. El sobrenadante fue usado para determinar las actividades de PFO y POD solubles. Durante todo el proceso de extracción la temperatura no subió de 4 °C.

Determinación de proteína. La proteína se cuantificó de acuerdo con el método de Bradford (14) modificado por Zor y Sellinger (15) con albúmina sérica bovina como estándar.

Actividad enzimática. Para medir la actividad de PFO se adicionaron 100 μL de extracto enzimático sobre 900 μL de L-Dopa 7,0 mM en buffer fosfatos 200 mM pH 7,0 y lectura del cambio de absorbancia respecto al tiempo a 475 nm (16) a 45 °C. Para evaluar la actividad de POD se mezclaron 25 μL de extracto enzimático, previamente diluido 1 a 20, con 975 μL de una mezcla de guayacol 40 mM y H_2O_2 5,0 mM en buffer fosfatos 200 mM pH 6,0 y lectura del cambio de absorbancia respecto al tiempo a 470 nm a 37 °C (7).

Las unidades de PFO y POD (UPFO, UPOD) fueron definidas como el incremento en una unidad de absorbancia por minuto (2). Las actividades específicas se expresaron como unidades enzimáticas por mg de proteína (UPFO/mg proteína y UPOD/mg proteína).

CARACTERIZACIÓN CINÉTICA

Efecto del pH y de la temperatura. Se evaluó la actividad enzimática a valores de pH entre 4,0 y 5,5 usando buffer citratos 200 mM y entre 6,0 y 8,0 empleando buffer fosfatos 200 mM. Para PFO se empleó L-Dopa 7,0 mM y medida de la actividad a 45 °C. Para POD se empleó una mezcla de donador de protones/sustrato: guayacol/ H_2O_2 , 40 mM/5,0 mM y medida de la actividad a 37 °C. Para evaluar el efecto de la temperatura los ensayos se efectuaron variándola entre 20 a 70 °C. La estabilidad térmica de ambas enzimas fue evaluada por incubación de los extractos proteicos a temperaturas entre 37 a 98 °C durante 10 min. Al finalizar este tiempo los extractos fueron enfriados en un baño de hielo y se evaluó la actividad enzimática.

Determinación de K_M . Para determinar el valor de K_M para PFO se ensayaron concentraciones de L-Dopa comprendidas entre 0,1 y 10,0 mM a pH y temperatura óptimos. Para POD se evaluó el valor de K_M a pH y temperatura óptimos para el donador de protones (guayacol) y el sustrato (H_2O_2); se ensayaron concentraciones de guayacol entre 0,25 y 40 mM a 5,0 mM de H_2O_2 , y concentraciones de H_2O_2 entre 0,025 y 20,0 mM a 40 mM de guayacol.

Perfil electroforético. Se desarrollaron electroforesis en condiciones nativas con geles de poliacrilamida (10%) en un equipo Biorad miniprotean two cell unit, 200 V por 45 min. Para la detección de las iso-PFO el gel fue sumergido en buffer fosfatos 200 mM pH 7,0 con L-Dopa 7 mM e incubación a 45 °C durante 20 min, las bandas aparecieron teñidas de negro. Para la detección de las iso-POD, los geles fueron sumergidos en buffer fosfatos 200 mM pH 6,0 con guayacol 40 mM y H_2O_2 5,0 mM durante 20 min a 37 °C, las bandas aparecieron teñidas de color rosado intenso. El teñido de las bandas fue detenido por lavado con agua fría.

Inhibidores. Se evaluó el efecto del cloruro de sodio, ácido cítrico, ácido ascórbico y bisulfito de sodio, en tres dosis, sobre la actividad enzimática. Se procedió igual que en la evaluación de la actividad enzimática, excepto la presencia del aditivo: se adicionaron 100 μL del aditivo de concentraciones iniciales 1,0, 10,0 y 100,0 mM para proporcionar en la mezcla de reacción concentraciones de 0,1, 1,0 y 10,0 mM, por lo que se incorporaron 100 μL menos de buffer.

Análisis de datos. A partir de las medidas de actividad de PFO y POD se calcularon los valores promedio y las desviaciones estándar ($n=3$). Se efectuaron los ANOVA y se evaluaron las diferencias entre tratamientos por la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Caracterización cinética

Debido a que los valores de pH óptimo, T óptima y K_M dependen del tipo de sustrato empleado, las comparaciones con otros reportes efectuadas en este texto serán con L-Dopa para PFO y con guayacol/ H_2O_2 para POD. La Figura 1a muestra que la actividad de PFO y POD es máxima a valores de pH de 7,0 y 6,0, respectivamente. Estos valores coinciden con los encontrados en un trabajo previo para PFO y POD extraídas del conjunto pulpa más corteza de uva caimaron (2) y similares a los encontrados para tres isoPOD de arveja (*Pisum sativum*): 5,0, 6,0 y 5,0 (7) y de repollo (*Brassica oleracea*): 6,4 (10). El valor de 8,0 para PFO de dog rose (*Rosa dum-*

lis) (11) difiere del encontrado en este trabajo para uva caimaron.

En la Figura 1b se representa el efecto de la temperatura sobre la actividad de PFO y POD. La temperatura que genera la máxima actividad de PFO es 45 °C y de POD es 37 °C; a partir de 60 °C la actividad de POD no fue detectable mientras que la de PFO representó un 20% de la máxima actividad. El valor de temperatura óptima para PFO es igual al reportado para PFO de frutos de dog rose (11). Los valores encontrados en nuestro estudio son diferentes a los reportados para PFO y POD de uva caimaron (corteza más pulpa), en el que la actividad de ambas enzimas es óptima entre 30 a 40 °C (detectable para POD incluso a 80 °C) (2) y para POD extraída de repollo, 45 °C (10).

Tras la evaluación de la estabilidad térmica de PFO y POD (Figura 2) se encontró que POD es más termorresistente que PFO. La actividad de PFO descende al 60% al calentar el extracto a 60 °C durante 10 min, mientras que para lograr este mismo efecto sobre POD el extracto

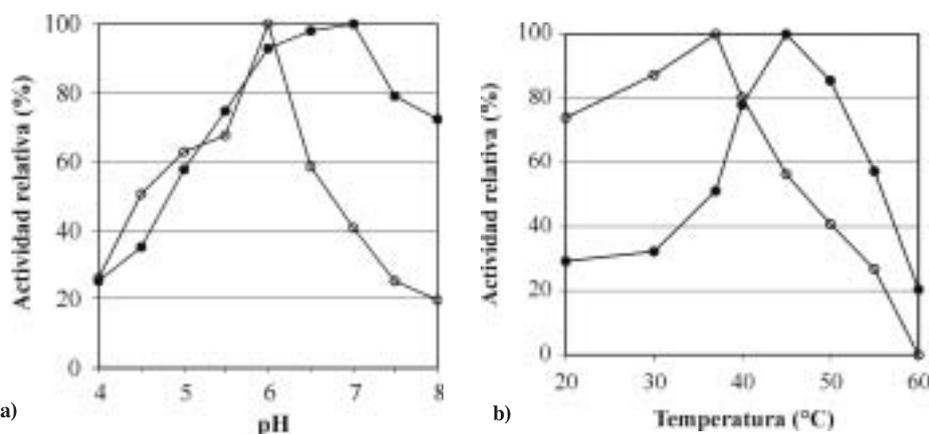


Figura 1. Efecto del pH y de la temperatura sobre la actividad de polifenoloxidasas (•) y peroxidadasas (o).

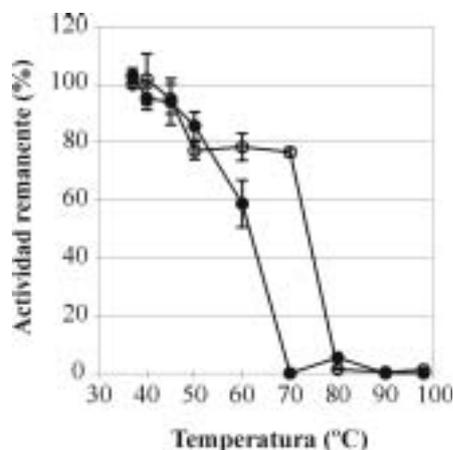


Figura 2. Inactivación térmica de polifenoloxidasas (●) y peroxidasa (○) extraídas de *Pourouma cecropiifolia*. Los resultados son el promedio de tres determinaciones \pm SD.

se debe calentar a temperaturas superiores a 70 °C. Por encima de 80 °C la actividad de estas dos enzimas cae por debajo del 5%, lo cual hace pensar que tratamientos térmicos a 80 °C o mayores durante 10 min sean adecuados para controlar el pardeamiento de la pulpa. Sin embargo, se debe tener cuidado con posibles fenómenos de reactivación, no estudiados aquí, que pueden presentar estas enzimas luego del calentamiento como aparece reportado en POD extraída de ar-

veja (7) y en PFO de frutos de dog-rose (11). Aunque la POD y la PFO están relacionadas con el pardeamiento de vegetales, la mayor termorresistencia y mayor actividad de la POD (Tabla 1) puede indicar que esta enzima tiene un papel más importante que la PFO en el pardeamiento de la pulpa de uva caimaroná.

Los valores de actividad enzimática en función de la concentración fueron analizados de acuerdo con el modelo de Lineweaver-Burk y se calcularon los valores aparentes de K_M y $V_{Máx}$ (Tabla 1). Para PFO se encontró un valor de K_M de 0,42 mM, valor que indica mayor afinidad por L-Dopa al reportado para PFO extraída de uva caimaroná ($K_M = 2,70$ mM) (2) y a los encontrados para PFO de pera (*Pyrus bretschneideri*) ($K_M = 8,9$ mM) (8) y de dog rose ($K_M = 0,606$ mM) (11). Al evaluar el efecto de la concentración de guayacol sobre la actividad de POD se encontró un valor K_M de 1,97 mM. Esta enzima presenta mayor afinidad por este tipo de donador de protones que POD extraídas del fruto entero sin semilla de uva caimaroná ($K_M = 10,0$ mM) (2) y de arveja verde ($K_M = 10,2, 10,2$ y $10,8$ mM, para tres isoenzimas) (7). Al evaluar el efecto de la concentración del H_2O_2 sobre

Tabla 1. Valores de K_M y $V_{máx}$ de polifenoloxidasas y peroxidasa extraídas de *Pourouma cecropiifolia*

	PPO L-DOPA	POD guayacol/ H_2O_2
Linealización de acuerdo con Lineweaver-Burk	mg prot/U = 0,150/L-DOPA + 0,359	mg prot/U = 0,0103/guayacol + 0,00514 mg prot/U = 0,00355/ H_2O_2 + 0,00492
r	0,9198**	0,9631**/0,9956**
K_M (mM)	0,42	2,0/0,72
$V_{Máx}$ (U/mg prot)	2,79	195/203

** Altamente significativo.

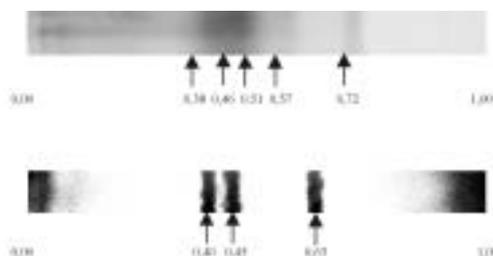


Figura 3. Perfil electroforético en condiciones nativas de polifenoloxidasas y peroxidasa extraídas de *Pourouma cecropiifolia*. Poliacrilamida al 10%, 200 V por 45 min. Detección de iso-PFO con L-Dopa 7 mM a 45 °C/20 min. Detección de iso-POD con guayacol 40 mM y H₂O₂ 5,0 mM a 37 °C/20 min.

la actividad de POD se encontró que a partir de 10 mM la actividad se inhibe. El efecto inhibitor de H₂O₂ ha sido descrito en otros trabajos y puede estar relacionado con el efecto oxidante de este compuesto sobre algunos aminoácidos del sitio activo (2, 7). El valor de K_M para H₂O₂ de 0,72 mM muestra menor afinidad que la POD extraída de uva caimaron (pulpa más corteza) ($K_M = 0,17$ mM) (2) pero mayor afinidad que para las isoPOD extraídas de arveja verde ($K_M = 2,6, 7,2$ y 4,3 mM) (7).

Perfil electroforético. Una vez corridas las electroforesis aparecieron 5 bandas con actividad de PFO con movilidades electroforéticas de 0,38, 0,46, 0,51, 0,57 y 0,72 y tres bandas con actividad de POD con movilidades electroforéticas de 0,40, 0,45 y 0,63 (Figura 3). La existencia de diverso número de iso-PFO e iso-POD ha sido reportada en otros tejidos. Así por ejemplo, para PFO se han encontrado entre 1 a 6 isoenzimas (3, 10-12, 17, 18), y para POD entre 1 a 11 (3, 4, 7, 10, 19, 20).

Inhibidores. En la Tabla 2 se muestra el efecto del ácido ascórbico, ácido cítrico, bisulfito de sodio y cloruro de sodio, en tres dosis cada uno, sobre la actividad de POD y PFO. Al emplear ácido ascórbico se encontró que la PFO fue inactivada totalmente incluso a la concentración más baja ensayada, mientras que la POD sufrió menos inactivación; una solución 0,1 mM de este ácido inhibió en un 64 % la actividad de POD. Este ácido fue el inhibidor más fuerte de los evaluados para ambas enzimas. La acción de este compuesto sobre el pardeamiento enzimático se debe a que reduce las quinonas, formadas por la enzima, al difenol original antes de que éstas sufran reacciones secundarias para generar compuestos pardos (21). Para PFO y POD solubles extraídas de repollo el ácido ascórbico se reporta como el inhibidor más potente dentro de los estudiados (10). Préstamo y Manzano (19) han determinado que el ácido ascórbico en concentraciones entre 2 a 170 μ M inhibe completamente la POD de papa (*Solanum tuberosum* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), kiwi [*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang and A. R. Ferguson], coliflor [*Bassica oleracea* (Botrytis group)], arveja (*Phaseolus vulgaris* L.) y rábano (*Armoracia rusticana* Gaertn, Mey Scherb.).

Una concentración de 0,1 mM de ácido cítrico se mostró con un efecto activante de POD, mientras que a esta misma concentración la actividad de PFO no se vio afectada respecto al testigo. El efecto activante observado para POD no fue significativamente diferente del control. Al incrementar la concentración del ácido cítrico, la pérdida de actividad aumentó.

Tabla 2. Efecto de cuatro inhibidores en la actividad de PFO y POD

Tratamiento(mM)	Actividad remanente (%)	
	PPO	POD
Control	100,0 ± 6,4 a (a)	100,0 ± 9,9 a (a)
Ácido ascórbico		
0,1	0,0 ± 0,0 e (b)	33,8 ± 1,5 e (a)
1,0	0,0 ± 0,0 e (a)	0,0 ± 0,0 f (a)
10,0	0,0 ± 0,0 e (a)	0,0 ± 0,0 f (a)
Ácido cítrico		
0,1	98,6 ± 5,6 a (a)	107,3 ± 6,2 a (a)
1,0	89,5 ± 0,9 b (a)	89,3 ± 2,6 b (a)
10,0	70,8 ± 4,3 c (a)	73,6 ± 3,6 c (a)
Bisulfito de sodio		
0,1	73,4 ± 4,6 c (a)	70,8 ± 0,9 c (a)
1,0	7,9 ± 1,6 d (b)	65,3 ± 12,0 cd (a)
10,0	0,0 ± 0,0 e (b)	52,6 ± 8,0 d (a)
Cloruro de sodio		
0,1	92,4 ± 5,6 a (a)	99,0 ± 14,6 a (a)
1,0	94,9 ± 2,7 a (a)	74,0 ± 3,6 c (b)
10,0	74,2 ± 1,4 c (a)	70,0 ± 2,6 c (a)

Los resultados son el promedio de tres determinaciones ± SD. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Letras diferentes en paréntesis en la misma fila indican diferencias significativas (prueba de Tukey).

Debido a que las enzimas en estudio requieren de la presencia de metales para su actividad (son metaloenzimas: PFO contiene cobre y POD contiene hierro), el ión citrato puede actuar como secuestrante formando complejos estables con estos cationes, disminuyendo así la actividad de estas enzimas.

Al emplear bisulfito de sodio la inhibición fue significativamente mayor para PFO que para POD, lográndose una inactivación total de PFO a una concentración 10,0 mM de bisulfito, mientras que a esta misma concentración la inhibición para POD fue del 47%. También se observa,

para ambas enzimas, que al incrementar la concentración se aumentó la inhibición. Este tipo de compuestos controla el pardeamiento enzimático debido a reacciones de adición de éstos sobre las quinonas, generando productos incoloros estables, por reacciones de reducción de las quinonas a los fenoles iniciales (22), o por enlace al sitio activo de la enzima (23, 24). Si bien algunos autores indican que el bisulfito de sodio es un inhibidor potente de PFO (8, 23, 24) y que la inhibición de esta enzima por efecto del ácido ascórbico no es del todo clara (25), para PFO extraída de piña se reporta que el ácido ascórbico es mejor inhibidor que el bisul-

fito, ambos a la misma concentración (12). Adicionalmente, el efecto inhibitorio de los sulfitos es dependiente del tiempo de incubación (24).

Al incrementar la concentración del cloruro de sodio el poder inhibitor tendió a incrementarse. El efecto sobre las enzimas en estudio fue inferior al mostrado por el ácido ascórbico y por el bisulfito de sodio, y similar al del ácido cítrico. El cloruro de sodio se reporta, dentro de 13 inhibidores estudiados, como un inhibidor pobre de la actividad de PFO y POD extraídas de repollo (10). Sin embargo, este mismo compuesto aparece como promotor de la actividad enzimática de PFO extraída de pera (8) y de frutos de dog-rose (11). El efecto inhibitor de esta sal puede surgir como resultado de la unión de los iones cloruro a formas protonadas de la enzima, a enzima libre o al complejo enzima-sustrato, generando un cambio conformacional (26).

CONCLUSIONES

Se efectuó una caracterización cinética parcial de PFO-soluble y POD-soluble extraídas de la pulpa de la uva caimaroná. Se encontró que estas enzimas, además de estar relacionadas con el pardeamiento de la pulpa, pueden ser inactivadas en gran medida por tratamientos de escaldado a 80 °C o temperaturas superiores durante 10 min y por incorporación de ácido ascórbico y bisulfito de sodio. Los inhibidores estudiados tienen mayor efecto sobre la actividad de PFO que sobre POD. Si se considera el pardeamiento enzimático como principal causa del cambio de color en la pulpa de la uva caimaroná es de esperar que tratamientos de este tipo sean efectivos en el control del mismo. Debido

a que la pulpa es un sistema más complejo que el extracto crudo aquí estudiado es importante evaluar el efecto del escaldado y de la incorporación de inhibidores de pardeamiento sobre la evolución de la actividad de estas enzimas y de las características sensoriales de la pulpa durante su almacenamiento congelado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Camargo, C. H.; Acosta, M. M. R.; Velásquez, B. M. A. (1991). Caracterización de la uva caimaroná (*Pourouma cecropiifolia*). *Colombia Amazónica* **5**, 9-26.
2. Narváez, C. C. E.; Restrepo, P. (2002). Efecto del almacenamiento de la uva caimaroná (*Pourouma cecropiifolia*) a diferentes temperaturas sobre la actividad de polifenoloxidasas y peroxidasa. *Rev. Col. Quím.* **31**, 131-44.
3. Cano, P.; Marín, M. A.; Fúster, C. (1990). Effects of some thermal treatments on polyphenoloxidase and peroxidase activities of banana (*Musa cavendishii*, var enana). *J. Sci. Food Agric.* **51**, 223-31.
4. Marín, M. A.; Cano, M. P. (1992). Patterns of peroxidase in ripening mango (*Mangifera indica*, L.) fruits. *J. Food Sci.* **57**, 690-92, 734.
5. Fuster, C.; Préstamo, G.; Cano, M. P. (1994). Drip Loss, peroxidase and sensory changes in kiwi fruit slices during frozen storage. *J. Sci. Food Agric.* **64**, 23-29.
6. Escribano, J.; Cabanes, J.; García-Carmona, F. (1997). Characteri-

- zation of latent polyphenol oxidase in table beet: effect of sodium dodecyl sulphate. *J. Sci. Food Agric.* **73**, 34-38.00
7. Halpin, B.; Pressey, R.; Jen, J.; Mondy, N. (1989). Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *J. Food Sci.* **54**, 644-9.
 8. Zhou, H.; Feng, X. (1991). Polyphenol oxidase from yali pear (*Pyrus bretschneideri*). *J. Sci. Food Agric.* **57**, 307-13.
 9. Raymond, J.; Rakariyatham, N.; Aranza, L. (1993). Purification and some properties of polyphenol oxidase from sunflowers seeds. *Phytochemistry* **34**, 927-31.
 10. Fujita, S.; Bin Saari, N.; Maegawa, M.; Tetsuka, T.; Hayashi, N.; Tono, T. (1995). Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1138-42.
 11. Sakiroglu, H.; Kúfrevioglu, Ö. I.; Kocacaliskan, I.; Oktay, M.; Onganer, Y. (1996). Purification and characterization of dog-rose (*Rosa dumalis* Reht.) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2982-86.
 12. Das, J. R.; Bhat, S. G.; Gowda, L. R. (1997). Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the kew cultivar of indian pineapple fruit. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2031-35.
 13. Nagai, T.; Suzuki, N. (2003). Polyphenol oxidase from bean sprouts (*Glycine max* L.). *J. Food Sci.* **68**, 16-20.
 14. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-54.
 15. Zor, T.; Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* **236**, 302-08.
 16. Sánchez-Ferrer, A.; Rodríguez-López, J. N.; García-Cánovas, F.; García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochem. Biophys. Acta.* **1247**, 1-11.
 17. Fujita, S.; Tono, T.; Kawahara, H. (1991). Purification and properties of polyphenol oxidase in head lettuce (*Lactuca sativa*). *J. Sci. Food Agric.* **33**, 643-51.
 18. Takeo, T.; Baker, J. E. (1972). Changes in multiple forms of polyphenol oxidase during maturation of tea leaves. *Phytochemistry* **12**, 21-4.
 19. Préstamo, G.; Manzano, P. (1993). Peroxidases of selected fruits and vegetables and the possible use of ascorbic acid as an antioxidant. *Hort-Science* **28**, 48-50.
 20. Grison, R.; Pilet, P-M. (1985). Cytoplasmatic and wall isoperoxidases in growing maize roots. *J. Plant Physiol.* **118**, 189-99.

21. Matheis, G.; Whitaker, J. R. (1984). Modification of protein by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *J. Food Biochem.* **8**, 137-62.
22. Janovitz-Klapp, A. H.; Richard, F. C.; Goupy, P. M.; Nicolas, J. J. (1990). Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1437-41.
23. Valero, E.; Varon, R.; García-Carmona, F. (1992). Kinetic study of effect of metabisulfite on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 904-8.
24. Ricquebourg, S. L.; Christine, M-F.; Da Silva, R.; Rouch, C. C.; Cadet, F. R. (1996). Theoretical support for a conformational change of polyphenol oxidase induced by metabisulfite. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3557-60.
25. Golan-Golhirsh, A.; Whitaker, J. R. (1984). Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **32**, 1003-09.
26. Valero, E.; García-Carmona, F. (1998). pH-dependent effect of sodium chloride on latent grape polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2447-51.