

## COMPORTAMENTO DAS POLIFENOLOXIDASES EM ALIMENTOS

*Maria Antonia Martins Galeazzi<sup>1</sup>*

Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola  
Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil

### RESUMO

Um dos problemas encontrados na manipulação e processamento de várias frutas é o escurecimento enzimático e não enzimático. As polifenoloxidasas estão estreitamente ligadas a este primeiro aspecto merecendo, portanto, a devida atenção por parte dos pesquisadores e indústrias de alimentos. Essas enzimas, oxidando mono, di e polifenóis na presença de oxigênio molecular, produzem dopacromos que são polimerizados e originam melaninas como produto final. Entretanto, o seu mecanismo de ação é ainda obscuro. O presente artigo tem o objetivo de fornecer informações específicas quanto a natureza e comportamento das polifenoloxidasas encontradas em diferentes frutas e alimentos.

### INTRODUÇÃO

O reconhecimento da existência de enzimas como catalizadores do escurecimento, observado em diferentes espécies de alimentos, foi feito por Lindet (1) e Kastle (2).

A maioria das pesquisas desenvolvidas durante essa época foi relacionada com caracterizações qualitativas e métodos de inativação. Não havia, portanto, nenhuma preocupação com a elucidação de problemas concernentes ao mecanismo dos sistemas enzimáticos envolvidos, natureza dos substratos e mesmo mecanismo de formação de pigmentos escuros observados nos alimentos.

Várias teorias foram então propostas para explicar o escurecimento enzimático. Chodat (3) propôs que os tecidos vegetais que escureciam com a danificação, continham substâncias denominadas oxigenases. Em contato com o oxigênio do ar elas geravam peróxido de hidrogênio que, ativado pela peroxidase contida nas plantas, acarretava a auto-oxidação de muito fenólicos naturais.

---

Manuscrito original recebido: 8-6-83.

<sup>1</sup> Professor Assistente Doutor do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, CEP 13.100 - ESP, Brasil.

Em 1931, Onslow (4), interessado no escurecimento resultante da danificação de tecidos vegetais, mostrou a presença de orto-difenóis livres, com o isolamento de catecol dos tecidos. Em seus experimentos observou que o escurecimento dos derivados catecóicos no tecido vegetal era mais rápido do que em solução aquosa. No entanto, esse escurecimento não se verificava quando o tecido era previamente fervido. Este fato levou-o a postular a existência de uma enzima que catalizava a auto-oxidação de derivados fenólicos que continham grupos hidroxílicos funcionais na posição orto. Onslow postulou, em adição ao conceito emitido por Chodat, a presença de uma enzima que, em contato com o ar oxidava os orto-fenóis gerando, como um dos produtos de oxidação, um peróxido, ou mesmo peróxido de hidrogênio. Este, na presença de peroxidase geraria finalmente, cromogênios característicos que, em sua concepção, eram pigmentos oriundos da oxidação secundária de mono, di e polifenóis.

Em estudos sistemáticos, Onslow pode classificar essas enzimas em dois grupos: um que continham oxigenases e outro, que continha peroxidases vegetais onde as oxigenases e os catecóis não estavam presentes. O primeiro grupo, que causava rápido escurecimento, podia ser encontrado nas seguintes frutas: maçã, apricot, banana, cereja, figo, uva, pêssego e morango. O segundo grupo era encontrado nas frutas cítricas.

Entretanto, Szent-Gyorgyi (5) já havia demonstrado, em batatas, que essas reações de escurecimento poderiam ocorrer na ausência de peróxidos.

Nessa mesma época, foi estabelecida a distinção entre as oxigenases, que continham cobre na molécula e catalizavam a oxidação de fenóis pelo oxigênio molecular e as peroxidases que catalizavam a oxidação de fenóis pelo peróxido de hidrogênio e continham ferroporfirina.

De acordo com as diferentes reações de oxidação de mono, di e polifenóis, as fenolases foram classificadas posteriormente em três grupos:

- a) Tirosinase – catalisando a oxidação de monofenóis, especificamente tirosina.
- b) Cresolase – catalisando a oxidação de polifenóis.
- c) Lacase – (obtida do látex) catalisando diferentes reações de oxidação (6).

Atualmente, prefere-se o termo de polifenoloxidase ou fenolase para o sistema de oxidação de polifenóis. A nomenclatura correta, apresentada pela "Comissão on Enzymes of the International Union of Biochemistry" em 1965 (7), é: o-difenol  $O_2$  - oxidoreductase E.C.1.10.3.1. e p-difenol  $O_2$  - oxidoreductase E.C.1.10.3.2.

#### OCORRENCIA E POSSIVEL FUNÇÃO DA POLIFENOLOXIDASE

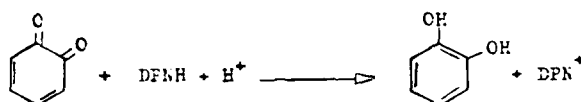
As polifenoloxidases ocorrem com muita frequência em tecidos vegetais e animais.

Palladin (8) foi o primeiro pesquisador a sugerir a existência, em vegetais, de um sistema polifenol-quinona como intermediário na oxidação de vários compostos orgânicos durante a respiração. Chamou esses polifenóis de cromogênios respiratórios. A polifenoloxidase, segundo esse autor, participaria no seguinte processo:



Em outros sistemas (21, 22), a redução das o-quinonas, em presença de enzimas e coenzimas apropriadas, tem sido acoplada à oxidação de catecol.

Formula 3



Em síntese, apesar desses sistemas serem largamente distribuídos nos vegetais e animais, parece ser pouco evidente que a etapa final da respiração de células vegetais não danificadas, possa envolver as quinonas formadas pela ação da fenolase, pois esse estágio de respiração é catalisado por outras enzimas (23-25).

O problema foi revisto por Towers (26), mas não se pode elucidar a participação da polifenoloxidase como enzima terminal pois não é possível eliminar-se o sistema oxidase dos citocromos, sem afetar a atividade da fenolase.

A localização da polifenoloxidase nos tecidos, tem sido investigada em grande número de plantas. Samisch (27), mostrou que fatias de damasco, quando imersas em catecol, apresentavam escurecimento rápido na casca e feixes vasculares, principalmente na porção ventral e dorsal. A parte restante da polpa, compreendida pelo pericarpo da fruta, era muito lentamente escurecida. Hussein e Cruess (28), de forma semelhante, encontraram em trabalhos com uvas, uma menor atividade de polifenoloxidase no pericarpo do que nos feixes vasculares. Por outro lado, Arnon (29), mostrou que a polifenoloxidase estava quase totalmente localizada no cloroplasto da folha de espinafre.

Tolbert (30), demonstrou que a polifenoloxidase localizada no cloroplasto de grande variedade de plantas, incluindo espinafre, apresentava atividade enzimática na estrutura lamelar. A enzima encontrava-se em estado latente, e era estimulada tanto pela luz, como por dimetiluréia ou antimicina A.

Em trabalhos mais recentes, Anderson (31), mostrou que a localização da polifenoloxidase nos tecidos não é ainda bem compreendida. Enquanto se acredita ser a polifenoloxidase uma enzima solúvel, vários trabalhos mostram que a atividade é localizada na mitocôndria e cloroplasto. Walker e Hulme (32), preparando mitocôndria de casca de maçã, utilizando polivinilpirrolidona solúvel na extração, encontraram duas polifenoloxidases tanto na mitocôndria como na fração solúvel que, possivelmente, seriam isoenzimas. Entretanto, os autores sugerem que a distribuição observada poderia ser um artefato, possivelmente causada pela adsorção de o-difenoloxidase citoplasmática que diferia da fração particulada.

### PURIFICAÇÃO DE POLIFENOLOXIDASES

Sabe-se que durante a extração de fenolases em vegetais os compostos fenólicos ligam-se facilmente a proteínas, formando melanoproteínas, que são substâncias inibidoras de muitas enzimas (33). Uma vez que a natureza dos compostos fenólicos naturais varia entre os vegetais, tem-se procurado

rado encontrar sistemas de extração adequados para melhor solubilização da enzima.

Diversos solventes têm sido utilizados sendo que, de um modo geral, o emprego de soluções tamponadas neutras têm produzido boa extratibilidade. Um fator que determina o tipo de solução usada para extração é a natureza e localização da enzima na célula. Em batatas, as fenolases foram encontradas em maior concentração na fração solúvel (34), enquanto que em outros produtos, a enzima encontra-se ligada a cloroplastos ou à mitocôndria (35).

As etapas subseqüentes de purificação envolvem eliminação de fenólicos por precipitação em acetona a frio, fracionamento com solução de sulfato de amônio, e separação cromatográfica, tanto por colunas de adsorção como de troca iônica.

Walker e Hulme (36), utilizando casca de maçãs, mostraram que a polivinilpirrolidona insolúvel, quando associada a detergentes amônicos, aumenta a atividade fenolásica dos extratos.

Em preparações utilizando Triton X-100 seguidas de cromatografia em DEAE-celulose, foi possível separar duas frações enzimáticas que, por sua homogeneidade e semelhança nas propriedades físicas e químicas, foram consideradas isoenzimas (19).

Palmer (37) demonstrou que os extratos da polpa da banana madura, obtidos utilizando 10/o do detergente não iônico (Cutscum) em soluções tamponadas, desenvolviam alto índice de atividade enzimática. O detergente a seguir era liberado com a precipitação da enzima pela adição de 1.6 volumes de acetona a frio. Por cromatografia em DEAE-celulose, a enzima foi obtida com um grau de purificação de 10 a 12 vezes. Galeazzi (38) utilizando um congelamento prévio do precipitado acetônico, obteve após cromatografia em Sephadex G-100 e eletroforese preparativa em gel de poliácridamida uma fração enzimática de alta atividade específica com um grau de purificação final de 39 vezes.

Preparações purificadas de cogumelo, exibem dois tipos de atividade, dependendo da fonte e do método de purificação. Como regra geral, a relação da atividade catecolase e cresolase é de 10 para 80. Entretanto, têm sido publicadas relações extremas de 2 para 240. Para explicar essa multiplicidade de tipos de enzimas, Mallette e Dawson (39) sugeriram que as enzimas catecolases e as formas intermediárias eram resultados de degradações químicas, físicas ou fragmentações de uma enzima nativa, o que ocorreria durante o fracionamento. Entretanto, Smith e Krueger (40), purificaram extratos de cogumelos através de colunas de DEAE-celulose e hidróxi-apatita, mostrando a presença de diversos tipos de enzimas com alta atividade catecolase e cresolase. Electroforeses em gel de amido indicam que os diversos tipos de enzimas devem ocorrer naturalmente, e não resultar da degradação ou fragmentação de uma enzima nativa.

Kertsz e Zito (41) obtiveram, de cogumelo, preparações homogêneas, utilizando extrações e precipitações com acetona a frio, seguidas de precipitações fracionadas com soluções de sulfato de amônio e cromatografia em Sephadex G-100. As preparações finais apresentaram alta atividade específica. A tirosinase purificada mostrou um coeficiente de sedimentação correspondente ao peso molecular  $128,000 \pm 50/o$ . A enzima dissocia-se em sub-unidades, quando em solução saturada de uréia, as

quais são inativas. O conteúdo de cobre estimado foi de 0.200/o.

A tirosinase de *Neurospora*, obtida em estado homogêneo e cristalino, mostrou um pico de absorção característico a 280 nm e um "ombro" a 340 nm (42). Esta enzima apresentou-se em duas formas alélicas que se agregam irreversivelmente, com peso molecular  $63,000 \pm 2,000$ . A tirosinase purificada apresentou um coeficiente de sedimentação, em gradiente de sacarose, de 3.6 S, estando o peso molecular calculado entre 65,000 a 70,000.

Harel e Mayer (43), demonstraram, em preparações de cloroplastos de maçãs e, após tratamento com Triton X-100 e filtração em coluna de Sephadex G-100, três frações com atividade catecolase. O peso molecular estimado para as três frações foi de: 30,000 a 40,000, 60,000 a 70,000 e 120,000 a 130,000. Eletroforeses em gel de amido mostraram que a fração de peso molecular 60.000, tinha uma mobilidade eletroforética menos lenta em direção ao ânodo.

Com preparações de fenolase de batatas foram separados dois componentes por cromatografia em DEAE-celulose (44). Um dos componentes foi purificado por eluição em coluna de Sephadex G-100 e mostrou ser homogêneo por ultracentrifugação com um coeficiente de sedimentação de 5.9 S. O espectro de absorção da enzima apresentou um pico a 275 nm e um "ombro" na região de 320 nm a 380 nm. Essa enzima, submetida a luz fluorescente em comprimento de onda de excitação de 370 nm, mostrou alta fluorescência.

Gregory e Bendall (45) purificaram a polifenoloxidase de chá 5,000 vezes através de cromatografia de troca iônica e adsorção. Em um estágio intermediário de purificação, a enzima apresentou quatro frações solúveis de coloração amarela. Os autores acreditaram que essas frações representavam complexos de uma enzima básica, com produtos de oxidação de ácidos fenólicos. Após a remoção dos materiais complexantes, as frações tornaram-se de coloração azul e divididas em duas espécies: A e B. A enzima da espécie A mostrou uma absorção máxima a 279 nm e 611 nm com um "ombro" a 330 nm. O peso molecular calculado por difusão e sedimentação foi  $144,000 \pm 16,000$ , sendo que o teor de cobre encontrado foi de 0.320/o.

Galeazzi *et al.* (38) em fração purificada de polifenoloxidase de banana encontraram uma só espécie de enzima que apresentou um espectro de absorção com um máximo em 279 nm, e um ombro entre 320 e 350 nm, sendo que a relação entre a absorção em 330 nm e 279 nm foi de 0.11. A cromatografia em papel dessa fração mostrou que a absorção em 330 nm correspondia a presença de ácido clorogênio, complexado a molécula da enzima. O peso molecular calculado por gradiente de sacarose foi  $60,000 \pm 2,000$  correspondendo a um dímero com subunidade de PM igual a  $30,000 \pm 1,000$ . O teor de cobre encontrado foi insignificante evidenciando a ausência desse ion na molécula da enzima.

A evidência de ácido clorogênico como um fenólico ligado a moléculas protéicas foi sugerido por Amorim e Josephson (46). Preparações de extratos dialisados de dois tipos de cafés: Mole e Rio, mostraram por eletroforese em gel de agar, diferenças quanto à mobilidade electroforética das proteínas. Os autores relacionaram essas diferenças à presença de polifenoloxidases mais ativa e ligada ao ácido clorogênico (47).

Experimentos conduzidos com focalização isoeétrica em gel de po-

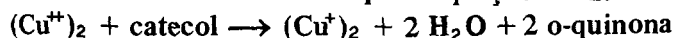
liacrilamida mostraram que os extratos de café tratados com uréia 7M, apresentaram ponto isoelétrico superior aos extratos de café não tratados, o que sugere a provável presença de ácido clorogênico ligado à proteína de maneira não covalente. Sabir, Sosulski e Finlayson (48), encontraram que proteínas de girassol podem estar ligadas por ligações covalentes e não covalentes ao ácido clorogênico e que, a uréia, tem efeito dissociante do ácido ligado de maneira não covalente.

### MECANISMOS PROPOSTOS PARA A REAÇÃO ENZIMÁTICA

A concordância de que a o-benzoquinona é a primeira etapa no processo de oxidação de catecóis a melanina em presença de polifenoloxidasas é geral. Estas são enzimas conhecidas como proteínas que contém cobre, catalisando as seguintes reações:

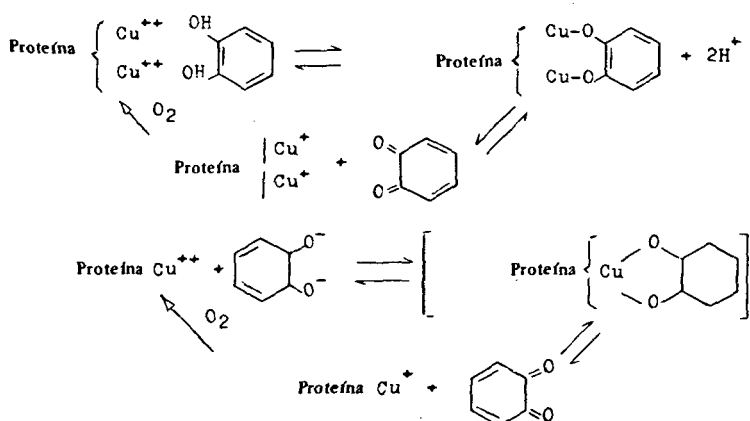
- a)  $4 \text{ Cu}^{++} - \text{proteína} + \text{catecol} \rightarrow 4 \text{ Cu}^{+} - \text{proteína} + 2 \text{ o-benzoquinona} + 4 \text{ H}^{+}$   
 b)  $4 \text{ Cu}^{+} - \text{proteína} + 4 \text{ H}^{+} + \text{O}_2 \rightarrow 4 \text{ Cu}^{++} - \text{proteína} + 2 \text{ H}_2\text{O}$

Warburg (49) sugeriu que as fenolases deveriam conter dois átomos de cobre no centro catalítico e que a equação seria:



Entre tanto, o mecanismo de utilização do oxigênio molecular não está claro nesta expressão. Segundo Mason (9), as reações na superfície catalítica deveriam ser:

#### Formula 4

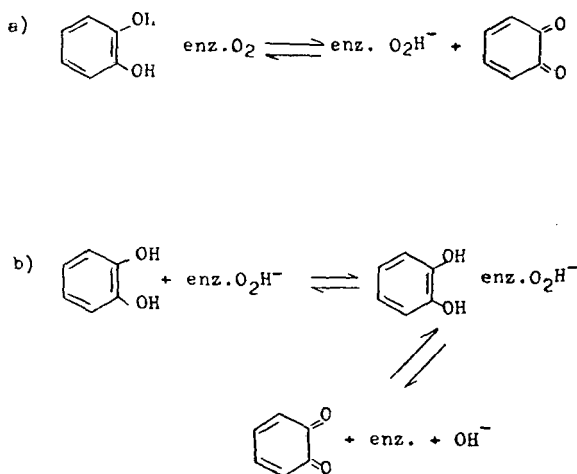


Contudo, deve-se lembrar que as fenolases na presença de o-difenóis ativam o oxigênio para hidroxilação do anel. Há razões para se acreditar que o oxigênio age de forma mais direta do que a proposta nas reações acima (50).

As proposições de Lu Valle e Goddard (51) para o mecanismo de

desidrogenação dos o-difenóis pela fenolase e oxigênio, enfatizam a possibilidade de formação de um complexo ternário de enzima-substrato-oxigênio à semelhança do que ocorre com a oxidase ascórbica que, na desidrogenação do ácido ascórbico, catalisa uma reação semelhante à desidrogenação de o-difenóis por fenolases.

### Formula 5



#### a) Formação de Melanina

Quimicamente as melaninas são polímeros amorfos, insolúveis, frequentemente ligados a proteínas. São altamente estáveis e têm sido isolados na forma não modificada em fósseis de 150 milhões de anos. As reações envolvidas na formação de melaninas têm sido propostas em modelos químicos (52). Um deles é o mecanismo de oxidação de tirosina a dopa (Formula 6).

Em animais, a hidroxilação da tirosina a dopa pela tirosinase é conhecida há muitos anos. A enzima tem duas atividades: uma, cresolase, que catalisa a hidroxilação de tirosina a dopa e a catecolase que catalisa a oxidação da dopa em dopaquinona, após o que segue o fechamento do anel, seguido por oxidação sucessiva até formação de melanina como produto final (53) (Formula 7).

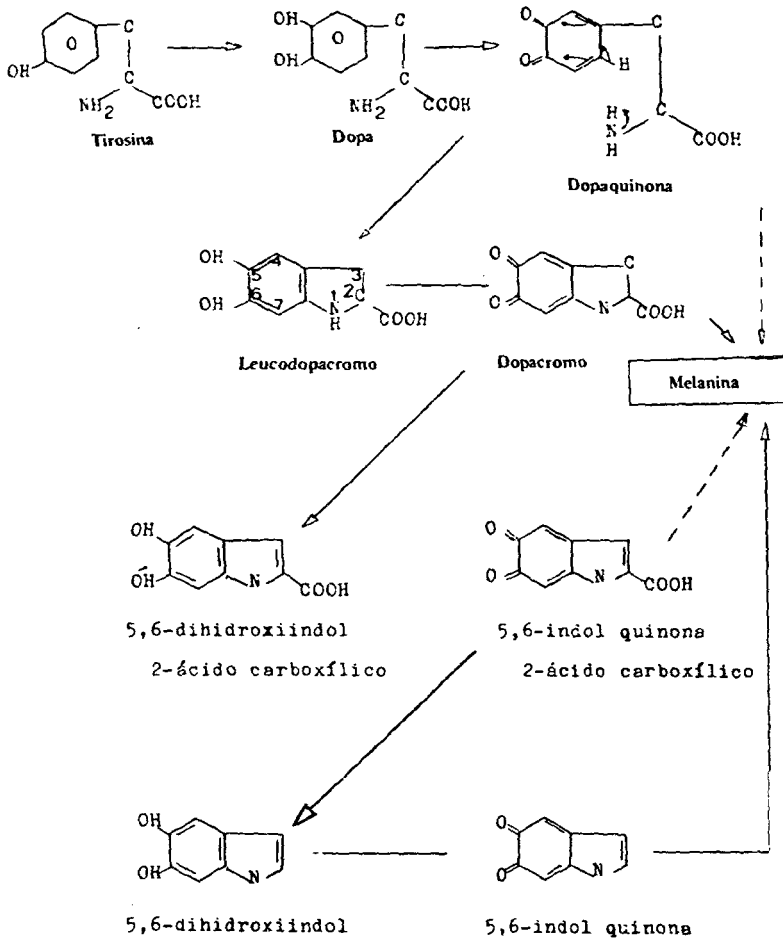
Outros mecanismos foram propostos para a oxidação enzimática de difenóis. Raper (54) propôs um mecanismo para a conversão enzimática de 3,4-dihidroxi-fenilalanina (dopa) a melanina (Formula 8).

Em trabalhos com polifenoloxidase de banana, Palmer (37) propôs um mecanismo para a oxidação de dopamina, baseado em determinações espectroquímicas dos intermediários formados durante a reação (Formula 9).

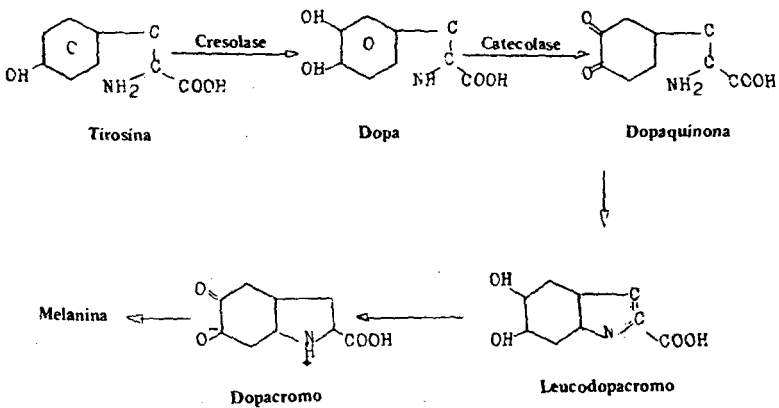
#### b) Formação de Intermediários

Alguns intermediários da ação de polifenoloxidases sobre o-difenóis,

**Formula 6**

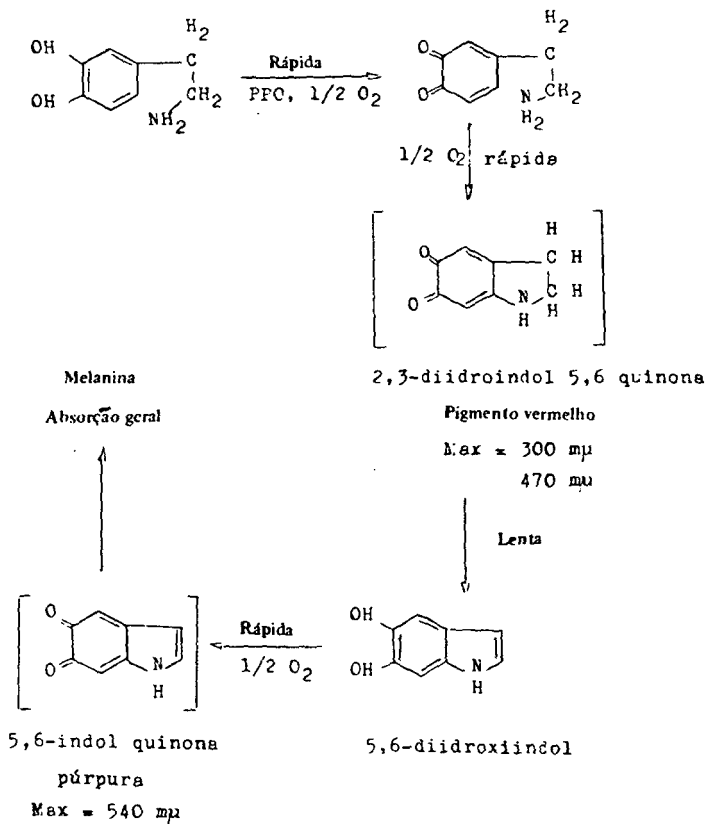


**Formula 7**

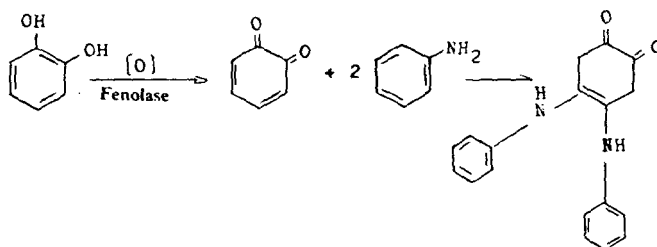




## Formula 9



## Formula 10



que apresentam ausência de grupos orto-difenólicos. Corroborando essa afirmação, Brown e Ward (57) isolaram por cromatografia em DEAE-celulose, três componentes ativos da tirosinase de camundongo Harding Pessey. Estes apresentaram atividade para tirosina e dopa, sendo quatro vezes mais ativos para dopa. Através de seus trabalhos experimentais, sugeriram que a mesma enzima pode ser responsável pela oxidação de mono e difenóis.

Onslow (58), em trabalhos realizados com pêssegos, isolou diversos

compostos fenólicos e mostrou a presença de enzimas oxidantes. Posteriormente, Reyes e Luh (59) demonstraram que nessa fruta, a atividade polifenoloxidase era mais efetiva ao se utilizar catecol como substrato. Wong, Luh e Whitaker (60), estudando iso-enzimas de pêssegos mostraram atividade para o-difenóis com maior especificidade para o-catecol e o-catequina. Nenhuma atividade para monofenóis e m-fenóis foi encontrada nessas preparações.

Walker (61) encontrou que polifenoloxidases de pera e maçã eram semelhantes quanto à especificidade a substratos representados por um grande número de polifenóis, incluindo ácido clorogênico. Uma alta especificidade para ácido clorogênico e 4-metil-catecol foi encontrada em tubérculos de batata (62) e a atividade da enzima no extrato cru era semelhante para ácido clorogênico e catecol, enquanto que, na preparação purificada a atividade foi maior para o ácido clorogênico, sendo inibida por altas concentrações de catecol.

Dizik e Knapp (63), em extratos purificados de abacate, separaram a enzima em cinco frações. Os autores concluíram que a atividade de uma das frações era responsável pela real atividade obtida no extrato cru e purificado. Isto porque ela se mostrou mais ativa para todos os substratos, bem como desenvolveu coloração muito mais rapidamente que para as outras frações. Racusen (64) encontrou, em folhas de *Phaseolus vulgaris*, que a oxidase apresentava especificidade para ácido caféico, dopa e pirgalol, enquanto que nenhuma atividade foi encontrada para tirosina.

Griffiths (65) mostrou que o escurecimento de bananas era uma oxidação de dopamina. Estudos mais intensivos realizados por Palmer (57) mostraram que nessa fruta a polifenoloxidase tinha especificidade somente para o-difenóis com maior afinidade para dopamina. O autor menciona que no estado semi-purificado, a enzima apresentava-se mais ativa para L-dopa do que para D-dopa como substrato. Essa diferença da especificidade foi confirmada em BPO purificada de banana nanica (66). Apesar da enzima ser mais específica para dopamina ( $k_m = 1.7 \times 10^{-4}$ ) o qual é considerado o seu substrato natural, ela evidenciou ser estereoespecífica, com maior afinidade para os substratos na forma L. Entre os substratos analisados a L-dopa, D-dopa e D-catequina mostraram  $k_m$ s iguais a  $6.6 \times 10^{-3}$ ;  $2.5 \times 10^{-2}$  e  $2.5 \times 10^{-2}$  moles/litro respectivamente.

Montgomery e Sgarbieri (67), estudando a ação de diversos substratos em diferentes partes da banana madura, mostraram que o catecol e 4-metil catecol eram melhores substratos para a polifenoloxidase. A enzima apresentou maior especificidade para dopamina, dentre os fenólicos estudados. Os autores sugerem que a diferença em especificidade encontrada para dopamina prendeu-se ao fato do grupo carboxílico da dopa induzir um decréscimo na atividade enzimática.

Em trabalhos recentes, Aragão e Bacila (68) mostraram que a polifenoloxidase de *Biomphalaria glabrata*, embora com baixa especificidade para os substratos estudados, mostrou-se mais ativa para di e tri-fenóis, bem como para várias aminas aromáticas.

Os autores sugerem que a posição do aminogruppo das aminas fenólicas influi na formação do complexo enzimático. Assim, a presença de grupos metilos, hidrofóbicos modificariam a estrutura do substrato, produzindo uma melhor adaptação do centro ativo da enzima. Por outro lado, os mesmos autores mostraram que as aminas aromáticas, embora possuindo o

grupo hidroxila na cadeia, não eram substratos para a polifenoloxidase.

#### EFEITO DE INIBIDORES

Vários inibidores têm sido utilizados para investigar o mecanismo de inibição das reações de oxidação provocadas pela fenolases.

Há muito tempo sabia-se que o ácido ascórbico era oxidado por quatro sistemas:

- a) Oxidação direta pela oxidase do ácido ascórbico (69).
- b) Oxidação direta pela o-quinona gerada da ação de peroxidase, por flavonas na presença de peroxidase e peróxido (70).
- c) Oxidação direta por o-quinonas formadas por catecol e polifenoloxidase (71, 72).
- d) Oxidação direta pelo sistema de citocromos (73).

Em trabalhos realizados com maçãs, foi observado que apesar da existência de ácido ascórbico como substrato natural da fruta, não foi localizada nenhuma atividade ascorbase (74). Por outro lado, verificou-se a presença de polifenoloxidase e peroxidase nos tecidos dessa fruta. Concluiu-se, então, que a oxidação do ácido ascórbico estava intimamente relacionada com o escurecimento, sendo que este não ocorria antes de todo o ácido ascórbico ter sido oxidado.

Em anos posteriores foi proposto como regra geral, que o ácido ascórbico seria um agente redutor para qualquer o-quinona produzida durante a oxidação de substratos fenólicos.

Drueger (75), estudando o efeito do ácido ascórbico na velocidade de reação da oxidação da tirosina pela polifenoloxidase de cogumelo, concluiu que o ácido tinha inicialmente um efeito pró-oxidante no sistema, passando a anti-oxidante na ação sobre o produto da reação. Tem sido mostrado que a concentração de íons cúpricos influi nas velocidades de oxidação dos sistemas polifenoloxidases, na presença de ácido ascórbico (76, 77).

Em estudos com batatas (78), observou-se que o ácido ascórbico, quando presente no sistema catecol-polifenoloxidase, provoca um retardamento no desenvolvimento da cor até que haja oxidação completa do ácido. Por outro lado, esses autores mostraram que a presença desse inibidor afeta de forma irreversível o centro ativo da enzima, dependente de cobre iônico.

Los grupos sulfidrilos desempenham papel importante na formação biológica da melanina. O problema de uma ligação química das melaninas às proteínas não está, até o momento, resolvido.

A tendência de numerosas quinonas simples combinarem-se com grupos aminados e com tióis, tem levado à hipótese de uma condensação das quinonas com esses grupos livres nas proteínas. Os grupos sulfidrilos estão presentes nas queratinas e sabe-se que a presença de enxofre nas melaninas, obtidas pela digestão pancreática de melano-proteínas naturais, foi interpretada como a indicação da participação deste elemento na ligação melano-proteína (79). A ação inibitória dos tióis sobre a melanogênese *in vivo* ou *in vitro*, já é conhecida (80).

Mason (81) mostrou não ter observado nenhuma reação inibitória de tióis com a dopamina, mas assinala modificações espectrofotométricas do

indol 5,6-quinona em presença de glutatona, que ele atribuiu a uma forma oxidada destes dois compostos. Posteriormente, foi mostrado que a oxidação da tirosina ou da dopa pela polifenoloxidase, em presença de um excesso de glutatona ou de cisteína, conduziu à formação de um composto de adição da dopamina com o tiol (82). O dopacromo formado em presença de glutatona re-arranja-se tanto em 5,6-diidroxi indol a pH 6,8, como em 2-diidroxi indol a pH mais baixo, que são capazes de reagir com o tiol em meio oxidante. Por outro lado, mostrou que a oxidação da dopa pela polifenoloxidase em presença de glutatona ou cisteína em quantidades próximas à estequiométrica, gera um complexo misto destas substâncias com seus produtos de oxidação.

Experimentos desenvolvidos com cromatografia em papel, mostraram, em extratos de maçã, o efeito inibitório da cisteína e glutatona, utilizando ácido clorogênico como substrato para a polifenoloxidase. A mistura desses compostos inibiu o escurecimento pela formação de um complexo cisteína-ácido clorogênico, identificados por fluorescência no cromatograma (83). Em estudos com polifenoloxidase de batatas, a ação da cisteína não se mostrou eficaz ao utilizar ácido clorogênico como substrato para a enzima (84). Este composto inibidor mostrou ser efetivo para a ação tirosinase, enquanto que, para a inibição da reação com dopa, foram necessárias concentrações mais elevadas.

Dentre os agentes sulfurados, o mais comumente utilizado é o SO<sub>2</sub>. Ponting e Johnson (85) acreditavam que o SO<sub>2</sub> inibia a atividade enzimática simplesmente pela sua capacidade redutora, agindo competitivamente com o oxigênio. Diemair, Koch e Hess (86), mostraram que quando a polifenoloxidase de batata era tratada com SO<sub>2</sub> a enzima era inativada antes que fosse adicionado o substrato.

Embs e Markakis (87), trabalhando com polifenoloxidase de cogumelos, mostraram que o sulfito agia como um inibidor pela combinação com o-quinonas, prevenindo, portanto, a condensação até melanina. Os autores verificaram também que uma pré-incubação do sulfito com a enzima inibia sua capacidade de reagir com o substrato. Confirmando essa proposição, Wong, Luh e Whitaker (60), mostraram que em pêssegos o metabissulfito de sódio provocava uma diminuição na absorção da reação de oxidação a 420 nm, devido à redução de o-benzoquinona. Essa diminuição dependia da concentração do inibidor utilizado.

O cobre desempenha papel importante no centro catalítico da enzima (88-90). Assim sendo, têm-se procurado investigar os compostos capazes de agir como quelantes de cobre e, conseqüentemente inibir a atividade enzimática.

Reyes e Luh (59), em estudos com polifenoloxidase de pêssegos, mostraram que ditiocarbamato, bem como 1-fenil 2-tiouréia, são quelantes muito efetivos de cobre e que, fluoroglucinol, na concentração de 3 mM era um inibidor competitivo para a polifenoloxidase.

Pomerantz (91) pôde demonstrar que tanto o ditiocarbamato como o cianeto de potássio produziam inibição de polifenoloxidase de melanoma de "hamster", cuja atividade era restaurada pela adição de Cu<sup>++</sup>. Também mostraram que a adição de ditiocarbamato produz um período de retardamento na formação do dopacromo intermediário.

Polifenoloxidase de duas espécies de uvas, parcialmente purificada, parece degradar antocianina *in vitro*, sendo esta degradação inibida por

ácido ditiocarbâmico, cianeto de potássio e tiouréia (92). Prabhakaran, Harris e Kirchheimer (93) mostraram que o ácido ditiocarbâmico penetra no *Micobacterium leprae* inibindo completamente a atividade da polifenoloxidase.

Em o-difenoloxidase de folha de fumo, foi demonstrado, utilizando ácido clorogênico como substrato, que vários outros compostos capazes de reagir com quinonas afetam a oxidação do ácido clorogênico. A cor dos produtos formado e o oxigênio absorvido na sua formação, sugerem que a quinona reage com estes compostos do mesmo modo que reagem com quinonas simples (94).

Macrae e Duggleby (72), em estudo com fenolases de batata, mostraram que os diferentes tipos de inibição e as constantes de inibição encontradas com tirosina e dopa como substratos, indicam a existência de dois centros ativos distintos: um para oxidação de o-difenóis e outro para hidroxilação de mono-fenóis. Os autores sugerem uma teoria na qual os dois centros ativos estão em diferentes moléculas de proteína. Se cada uma das moléculas tiver um centro adicional que liga fenóis ácido e ácidos carboxílicos, então, substâncias ligadas a este centro inibidor poderão reagir com o centro catalítico. Considerando a forma oxidada de o-difenóis, inibidores o-difenóis poderão ligar-se em ambos os centros. Se a afinidade para o centro catalítico é muito maior do que para o centro inibidor, observar-se-á inibição competitiva e, se a afinidade para o centro inibidor foi muito maior do que para o centro catalítico, será observada inibição não competitiva. Consequentemente, se as afinidades para os dois centros são aproximadamente iguais, será observada inibição mista. Inibidores monofenóis ligar-se-ão no centro inibidor, dando uma inibição não competitiva ou mista. De forma semelhante, para a hidroxilação do monofenol, o-difenóis e ácidos carboxílicos, podem agir como inibidores competitivos, não competitivos ou mistos.

Em trabalhos com tirosinase de melanoma de camundongo Harding Passey, foi visto que a oxidação de dopa a dopaquinona, catalisada por tirosinase, foi inibida por tirosina (95). Estudos cinéticos sugeriram a existência de dois centros ativos na molécula da tirosinase; um onde a dopa é oxidada e outro, onde a tirosina é ligada mas não oxidada durante a primeira fase da reação.

Em experimentos recentes, foram isolados dois inibidores de tirosinase de cogumelo (96). Um deles, de peso molecular 1,200 apresentou inibição competitiva para dopa como substrato, o outro, apresentou inibição não competitiva para a tirosinase. Os autores sugeriram que a incubação prolongada do primeiro inibidor com a enzima provocava mudanças conformacionais na molécula.

#### FORMAS MOLECULARES ATIVAS

O termo isozima tem sido usado para descrever as diferentes formas moleculares em muitos sistemas enzimáticos.

Jornvall (97), mostrou que diferentes enzimas que exibem especificidades semelhantes, apresentam diferentes perfis eletroforéticos e cromatográficos. Para muitas dessas isozimas é evidente, agora, que são formas relacionadas da mesma enzima.

Kaplan (98), apresentou extensa revisão de isozimas de desidrogenase

lática a fim de estudar, em base molecular, a natureza das formas múltiplas das enzimas. As formas moleculares múltiplas podem ser oriundas de diferentes agregados de uma determinada enzima. A estrutura dos agregados pode ser de tal natureza, que a carga na superfície seja diferente a ponto de produzir diferenças nas suas mobilidades eletroforéticas. O termo "conformers" foi descrito pelo autor para descrever um grupo de formas múltiplas de enzimas que possuem a mesma sequência de aminoácidos mas, diferem em sua conformação. Esta diferença na conformação produz variações eletroforéticas bem como diferentes comportamentos em resinas de troca iônica. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar as múltiplas formas moleculares da polifenoloxidase.

Harel e Mayer (43), sugeriram que as três frações de catecol oxidase purificadas de cloroplastos de maçã, eram resultantes da agregação de sub-unidades de uma mesma enzima. Estas frações quando submetidas a tratamento com cloreto de sódio e Triton X-100 e estocadas entre 2 a 40°C, se interconvertem.

Constantinides e Bedford (99), usando eletroforese em gel de poli-acrilamida, estudaram o sistema polifenoloxidase em tecidos de cogumelos, batatas e maçãs. O sistema enzimático mostrou um fenômeno de formas múltiplas apresentando diferenças de especificidade e características próprias a cada espécie e variedade estudadas. O sistema polifenoloxidase de cogumelo apresentou nove formas múltiplas com alta atividade para DL-dopa e três formas reativas com L-tirosina. Em batatas, foram encontradas onze formas com atividade para DL-dopa enquanto que, em maçãs, três formas eram ativas com esse substrato. Os autores verificaram que as formas de polifenoloxidase de cogumelo eram diferentemente afetadas pela temperatura. A atividade de todas as formas foi destruída após um minuto a 100°C, enquanto que, algumas das formas submetidas a 40°C, 50°C e 60°C eram destruídas após 60 minutos e outras, quebradas em fragmentos distintos. A 70°C, a banda de maior mobilidade foi estável por mais de 60 minutos.

Jolley e Mason (100), estudando formas múltiplas de tirosinase de cogumelo, encontraram que as isozimas apresentaram um certo grau de interconversão dependendo das condições de força iônica, pH e concentração protéica. Os seus resultados indicaram que para determinadas condições existia um equilíbrio entre 5 a 6 isozimas. A separação das isozimas de tirosinase mostrou uma mistura de formas poliméricas com predominância de um tetrâmero (101). A dissociação é facilitada a 50°C sob alta força iônica e em presença de 0.25% de dodecil sulfato de sódio. Em eletroforese de gel de poli-acrilamida as bandas foram identificadas como monômeros, dímeros e tetrâmeros. Bouchilloux, McMahill e Mason (102) mostraram também que a tirosinase de cogumelo era composta por formas múltiplas com aparente dissociação em sub-unidades ativas, na presença de dodecil sulfato de sódio.

Horowitz, Fling e McLeod (103) mostraram a presença de diversas formas de tirosinase em *Neurospora crassa*, distintas pela termo-resistência e propriedades eletroforéticas. Posteriormente, Fling, Horowitz e Heinemann (42), em preparações homogêneas na forma cristalina, isolaram duas tirosinases alélicas S e L. O peso molecular de ambas foi de  $63,000 \pm 2,000$  e pareciam se agregar reversivelmente em solução. A forma S era consideravelmente mais termolábil que a forma L.

Extratos acetônicos de pêssegos mostraram por eletroforese em gel de poli(acrilamida), quatro bandas com atividade de polifenoloxidase. Essas quatro isozimas isoladas A, B, C e D, diferem pela termoestabilidade, sendo que a forma D foi a mais estável a 76°C (60). Por outro lado, a isozima A apresentou-se resistente aos inibidores metabissulfito de sódio, glutatona, ácido ascórbico e ditiocarbamato.

Estudos recentes, realizados com eletroforese em gel de poli(acrilamida) mostraram nove isozimas com atividade de polifenoloxidase no interior da polpa de banana, oito no exterior da polpa e dez na casca (67). As isozimas do interior e do exterior da polpa mostraram-se iguais diferindo da casca em apenas uma. Compostos químicos como ditiocarbamato de sódio, cisteína, 2-mercaptoetanol e cianeto de sódio inibiram todas as isozimas de polifenoloxidase, enquanto que metabissulfito de sódio inibiu apenas algumas.

Harel, Mayer e Lehman (104) observaram formas múltiplas de catecol oxidase de uva. Eletroforeses em gel de poli(acrilamida) mostraram oito bandas ativas, que eram interconvertidas durante o isolamento, estocagem, tratamento com uréia e pH ácido. Essa interconversão deveria originar-se da dissociação da enzima em sub-unidades. A análise de várias bandas sugeriram que algumas formas da enzima teriam o mesmo peso molecular mas difeririam na distribuição de cargas.

## SUMMARY

### BEHAVIOR OF POLYPHENOLOXIDASES IN FOODS

One of the problems in the handling and processing of various kinds of fruits, is the enzymatic and nonenzymatic browning. The polyphenoloxidases are strictly related with the first aspect, needing therefore, more attention from the scientists and food industries. These enzymes oxidize mono, di and polyphenols in the presence of molecular oxygen, producing dopachromes which are polymerized to melanins as a final product. Their mechanism of action, however, is still unknown. The purpose of this article is to provide specific information as to the nature and behavior of the polyphenoloxidases found in different kinds of fruits and foods.

## BIBLIOGRAFIA

1. Lindet, M. Sur l'oxidation du tannin de la pomme à cidre. *Compt. Rend.*, 120: 370, 1958.
2. Kastle, J. H. The oxidases and other oxygen-catalysts concerned in biological oxidation. *Hyg. Lab. Washington Bull.*, 59:1, 1910.
3. Chodat, R. Darstellung und Nachweis von Oxydasen und Katalasen pflanzlicher und tierischer Herkunft methoden ihrer Anwendung. In: **Emil Abderhalden's Handbuch der Biologischen Arbeits Methoden**. Berlin, Urban und Schwarzenberg, 1936. (Abst. IV, Teil I, 319-410).
4. Onslow, M. W. *The Principles of Plant Biochemistry*. Cambridge, England, Cambridge University Press, 1931.
5. Szent-Gyorgyi, A. Observation on the function of peroxidase system and chemistry of the adrenal cortex. *Biochem. J.*, 22:1387, 1928.

6. Graubard, M. A comparative study of some oxidases and peroxidases. *Enzymologia*, **5**:332, 1939.
7. International Union of Biochemistry. **Enzyme Nomenclature, Recommendations (1964) of the International Union of Enzymes Together with Their Units and the Symbols of Enzyme Kinetics**. New York, N. Y., Elsevier Publishing Co., 1961.
8. Palladin, V. I. The respiration of plants and its relationship to the transformation of substances and energy in plants. *Zap. Akad. Nauk. SSSR*, **8**:37, 1930.
9. Mason, H. S. Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Adv. Enzymol.*, **16**:105, 1955.
10. Boswell, J. G. & G. C. Whitting. A study of the polyphenoloxidase system in potato tubers. *Ann. Bot.*, **2**:847, 1938.
11. Robinson, E. S. & J. M. Nelson. The tyrosine-tyrosinase reaction and aerobic plant respiration. *Arch. Biochem.*, **4**:111, 1944.
12. Walter, E. M. & J. M. Nelson. Further studies on tyrosinase in aerobic plant respiration. *Arch. Biochem.*, **6**:131, 1945.
13. Szent-Gyorgyi A. & K. Victorisz. Bemerkungen uber die Funktion und Bedeutung der Polyphenoloxidase der Kartoffel. *Biochem. Z.*, **168**: 1931.
14. Forsyth, W. G. C. Cacao polyphenolic substances. II. Changes during fermentation. *Biochem. J.*, **51**:516, 1952.
15. Hushima, Y. T., T. Nakabayashi & S. Nishida. Cited in: Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Adv. Enzymol.*, **16**:105, 1955.
16. Nakabayashi, T. J. Cited in: Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Adv. Enzymol.*, **16**:105, 1955.
17. Nakabayashi, T. J. Browning of apple fruit. II. Terminal oxidase of the respiration of apple fruit. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **28**:212, 1954.
18. Keilin, D. & J. Mann. Polyphenoloxidase: Purification nature and properties. *Proc. Roy. Soc. London*, **125 B**:187, 1938.
19. Kendall, L. P. The action of tyrosinase on monophenols. *Biochem. J.*, **44**:442, 1949.
20. Sreerangachar, H. B. Studies on the fermentation of Ceylon tea. *Biochem. J.*, **87**: 653, 1943.
21. Kubowitz, F. Schwermetallprotein und Pyridinprotein die Komponenten blausaure und Kohlenoxydempfindlicher Alkoholdehydrasen. *Biochem. Z.*, **293**: 308, 1937.
22. Roberts, E. A. H. & D. J. Wood. Separation of tea polyphenols on paper chromatograms. *Biochem. J.*, **53**:332, 1953.
23. Hackett, D.P., H.A. Schneiderman & K.V. Thimann. Terminal oxidase mediating water uptake by potato tissue. *Arch. Biochem. Biophys.*, **47**:205, 1953.
24. James, W. O. **Plant Respiration**. Oxford, England, Clarendon Press, 1953.
25. Webster, G. C. The effect of carbon monoxide on respiration in the sweet potato, *Ipomoea batatas L.* *Science*, **117**:530, 1953.
26. Towers, G. H. N. **Metabolism of Phenolics in Higher Plants and Microorganisms. Biochemistry of Phenolic Compounds**. New York, N. Y., The Academic Press, 1964.
27. Samisch, R. The location of oxidase in the apricot. *Am. J. Botany*, **22**:291, 1935.
28. Hussein, A. A. & M. J. Cruess. Properties of the oxidizing enzymes of certain vinifera grapes. *Food Res.*, **5**:637, 1940.
29. Arnon, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, **24**:1, 1949.
30. Tolbert, N. E. Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. *Plant Physiol.*, **51**:234, 1973.

31. Anderson, J. M. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*, 7: 1968.
32. Walker, J. R. L. & A. C. Hulme. Studies on the enzymic browning of apples. III. Purification of apple phenolase. *Phytochemistry*, 5:259, 1966.
33. Sanderson, G. W. The action of polyphenolic compounds on enzymes. *Biochem. J.*, 95:248, 1965.
34. Craff, C. C. Localization and activity of phenolase in potato tubers. *Am. Potato J.*, 43:112, 1966.
35. Bendall, D. S. & R. P. F. Gregory. **Purification of Phenoloxidase. Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds.** Chapter 7. Oxford, England, Pergamon Press, 1963.
36. Walker, J. R. L. & A. C. Hulme. The inhibition of the phenolase from apple peel by polyvinylpyrrolidone. *Phytochemistry*, 4:677, 1965.
37. Palmer, J. K. Banana polyphenoloxidase: Purification and properties. *Plant Physiol.*, 38:508, 1963.
38. Galeazzi, M., A. Martins, V. C. Sgarbieri & S. M. Constantinides. Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenoloxidase (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii*, L.). *J. Agr. Food. Chem.* Enviado para publicación.
39. Mallette, M. F. & C. R. Dawson. On the nature of highly purified mushroom tyrosinase preparations. *Arch. Biochem.*, 23:29, 1949.
40. Smith, J. L. & R. C. Krueger. Separation and purification of the phenolases of the common mushroom. *J. Biol. Chem.*, 23:4, 1121, 1962.
41. Kertesz, D. & R. Zito. Mushroom polyphenoloxidase. 1. Purification and general properties. *Biochem. Biophys. Acta*, 96:447, 1965.
42. Fling, M., N. H. Horowitz & S. F. Heinemann. The isolation and properties of crystalline tyrosine from neurospora. *J. Biol. Chem.*, 238:6, 1963.
43. Harel, E. & A. M. Mayer. Interconversion of subunits of catechol oxidase from apple chloroplasts. *Phytochemistry*, 7:199, 1968.
44. Pařil, S. S. & M. Zucker. Potato phenolases: Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 240:10, 1965.
45. Gregory, R. P. F. & D. S. Bendall. The purification and some properties of the polyphenoloxidase from tea (*Camellia sinensis*, L.). *Biochem. J.*, 101:569, 1966.
46. Amorim, H. V. & R. V. Josephson. Water soluble protein and nonprotein components of Brazilian green coffee beans. *J. Food Sci.*, 40:1179, 1975.
47. Amorim, H. V., A. A. Teixeira, M. Melo, V. F. Cruz & E. Malavolta. Chemistry of Brazilian green coffee and the quality of the beverage. 4. Electrophoresis of soluble proteins in agar-gel and its interaction with chlorogenic acid. *Turrialba*, 25:18, 1975.
48. Sabir, M. A., F. W. Sosulski & A. J. Finlayson. Chlorogenic acid-protein interactions in sunflower. *J. Agr. Food Chem.*, 22:575, 1974.
49. Warburg, O. **Heavy Metal Prosthetic Groups and Enzyme Action.** Oxford, England, Oxford, University Press, 1949.
50. Mason, H. S., W. L. Fowlks & E. Peterson, Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J. Am. Chem. Soc.*, 77:2914, 1955.
51. Lu Valle, J. E. & D. R. Goddard. The mechanism of enzymatic oxidations and reductions. *Quart. Rev. Biol.*, 23:197, 1948.
52. Marin, L. **Secondary Metabolism in Plants and Animals.** New York, N. Y., The Academic Press, Inc., 1972.
53. Finkle, B. J. & V. C. Runeckles. **Phenolic Compounds and Metabolic Regulation.** New York, N. Y., Appleton Century Crofts, 1967.

54. Raper, H. S. Some problems of tyrosine metabolism. *J. Chem. Soc.*, **125**:333, 1938.
55. Forsyth, W. G. C. & V. C. Quesnel. Intermediates in the enzymatic oxidation of catechol. *Biochem. Biophys. Acta*, **25**:155, 1957.
56. Platt, B.S. & A.B. Wormal. Cited in: Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Adv. Enzymol.*, **16**:105, 1955.
57. Brown, F.C. & D.N. Ward. Studies on mammalian tyrosinase. I. Chromatography on cellulose ion exchange agents. *J. Biol. Chem.*, **233**:77, 1958.
58. Onslow, M. W. Oxidizing enzymes. III. The oxidizing enzymes of some common fruits. *Biochem. J.*, **14**:541, 1920.
59. Reyes, P. & B. S. Luh. Characteristics of browning enzymes in Fay Elbert freestone peaches. *Food Technol.*, **14**:570, 1960.
60. Wong, T. C., B. S. Luh, & J. R. Whitaker. Isolation and characterization of polyphenoloxidase isozymes of clingstone peach. *Plant Physiol.*, **49**:19, 1971.
61. Walker, J. R. L. The polyphenoloxidase of pear fruit. *Australian J. Biol. Sci.*, **17**: 575, 1964.
62. Alberghina, F. A. A. Chlorogenic acid oxidase from potato tuber slices: Partial purification and properties. *Phytochemistry*, **3**:65, 1964.
63. Dizik, N. S. & F. W. Knapp. Avocado polyphenoloxidase purification and fractionation on Sephadex thin layers. *J. Food Sci.*, **35**:282, 1970.
64. Racusen, D. The catechol oxidase of bean leaves (*Phaseolus vulgaris*). *Can. J. Biol.*, **48**:1029, 1970.
65. Griffiths, L. A. Detection and identification of the polyphenoloxidase substrate of banana. *Nature*, **184**:58, 1959.
66. Galeazzi, M. A. M. **Extração, Purificação e Propriedades da Polifenoloxidase de Banana Nanica (*Musa cavendishii*, L.)**. Tese de Doutorado. UNICAMP, Campinas, Brasil, 1978.
67. Montgomery, M. W. & V. C. Sgarbieri. Isoenzymes of banana polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, **14**:1245, 1975.
68. Aragão, G. A. & M. Bacila. Purification and properties of a polyphenoloxidase from the fresh water snail *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **53**, B:179, 1976.
69. Tauber, H., I. S. Kleiner & D. Mishkind. Ascorbic acid (vitamin C) oxidase. *J. Biol. Chem.*, **110**:211, 1935.
70. Tauber, H. The interaction of peroxidase and ascorbic acid (vitamin C) in biological oxidations and reductions. *Enzymologia*, **1**:209, 1936.
71. Keiling, D. & T. Mann. Polyphenoloxidase: Purification, nature and properties. *Proc. Roy. Soc., London*, **125 B**: 138, 1938.
72. Macrae, A. R. & R. G. Duggleby. Substrates and inhibitors of potato tuber phenolase. *Phytochemistry*, **7**:855, 1968.
73. Keiling, D. & E. F. Hartree. Polyphenoloxidase: Purification, nature and properties. *Proc. Roy. Soc., London*, **125 B**:171, 1938.
74. Ponting, J. D. & M. A. Joslyn. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. *Arch. Biochem.*, **19**:47, 1948.
75. Krueger, R. C. The effect of ascorbic acid on the enzymatic oxidation of monohydric and o-dehydric phenols. *J. Am. Chem. Soc.*, **72**:5582, 1950.
76. Kertesz, D. Cuivre, polyphénoloxidase (tyrosinase), catéchol et acide ascorbique. *Bull. Soc. Chim. Biol., Paris*, **33**:1400, 1951.
77. Kertesz, D. Tyrosinase and polyphenoloxidase. The role of metallic ions in melanogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **9**:170, 1952.
78. Baruah, P. & T. Swain. The effect of L-ascorbic acid on the *in vitro* activity of

- polyphenoloxidase from potato. **Biochem. J.**, 55:392, 1953.
79. Greenstein, J. P. & M. Winitz. **Chemistry of the Amino Acids**. Vol. I. New York, N. Y., Wiley & Sons, Ltd., 1971.
  80. Lerner, A. B. & T. B. Fitzpatrick. **Pigment Cell Growth**. Myron Gordon (Ed.). New York, N. Y., The Academic Press, Inc., 1953.
  81. Mason, H. S. **Pigment Cell Biology**. Myron Gordon (Ed.). New York, N. Y., The Academic Press, Inc., 1959.
  82. Bouchilloux, S. & A. Kodja. Combinaison des thiols avec les quinones se formant au cours de la melanogénèse. **Bull. Soc. Chim. Biol.**, 42:9, 69, 1960.
  83. Henze, R. E. Inhibition of enzymatic browning of chlorogenic acid solution with cysteine and glutathione. **Science**, 123:390, 1956.
  84. Muneta, A. & J. Walradt. Cysteine inhibition of enzymatic blackening with polyphenoloxidase from potatoes. **J. Food Sci.**, 33:606, 1968.
  85. Ponting, J. D. & C. Johnson. Determination of SO<sub>2</sub> in fruits. **Ind. Eng. Chem.**, 17:682, 1945.
  86. Diemair, W., J. Koch & D. Hess. Einfluss der schwefligen Saure und L-Ascorbic-saure bei der Weinbereitung. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, 113:381, 1960.
  87. Embs, R. J. & P. Markakis. Mechanism of sulfite inhibition of browning caused by polyphenoloxidase. **J. Food Sci.**, 30:753, 1965.
  88. Mason, H. S. Structures and functions of the phenolase complex. **Nature (London)**, 177:79, 1956.
  89. Mason, H. S. Mechanism of oxygen metabolism. **Adv. Enzymol.**, 19:79, 1957.
  90. Mathew, A. G. & H. A. B. Parpia. Food browning as a polyphenol reaction. **Adv. Food Res.**, 19:75, 1971.
  91. Pomerantz, S. H. Separation, purification and properties of two tyrosinases from hamster melanoma. **J. Biol. Chem.**, 238:7, 1963.
  92. Segal, B. & R. M. Segal. Enzymatic degradation of grape anthocyanins. **Rev. Ferment. Ind. Aliment.**, 24:22, 1969.
  93. Prabhakaran, K., E.B. Harris & W.F. Kirchheimer. Effect of inhibitors on phenoloxidase of *Mycobacterium leprae*. **J. Bacteriol.**, 100:935, 1969.
  94. Pierpoint, W. S. The enzymic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. **Biochem. J.**, 98:567, 1966.
  95. Shimao, K. Partial purification and kinetic studies of mammalian tyrosinase. **Biochim. Biophys. Acta**, 62:205, 1962.
  96. Madhosingh, C. & L. Sundberg. Purification and properties of tyrosinase inhibitor from mushroom. **FEBS Letters**, 49:2, 1974.
  97. Jornvall, H. Multiple molecular forms of enzymes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 151:1, 1968.
  98. Kaplan, N. O. Nature of multiple molecular forms of enzymes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 151:382, 1968.
  99. Constantinides, S. M. & C. L. Bedford. Multiple forms of phenoloxidase. **J. Food Sci.**, 132:446, 1967.
  100. Jolley, R. L. & H. S. Mason. The multiple forms of mushroom tyrosinase. **J. Biol. Chem.**, 240, P.C. 1489, 1965.
  101. Jolley, R. L., D. A. Robb & H. S. Mason. The multiple forms of mushroom tyrosinase. **J. Biol. Chem.**, 244:1593, 1969.
  102. Bouchilloux, S., P. McMahill, & H. S. Mason. The multiple forms of mushroom tyrosinase. **J. Biol. Chem.**, 238:1699, 1963.
  103. Horowitz, N.H., M. Fling & H.L. McLeod. Structural and regulative genes controlling tyrosinase synthesis in neurospora. **Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.**, 26:233, 1961.
  104. Harel, E., A. M. Mayer & E. Lehman. Multiple forms of *Vitis vinifera* catechol oxidase. **Phytochemistry**, 12:2649, 1973.