

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LA ENZIMA FENOLOXIDASA DE MANZANA (*Malus domestica*, var. Anna)

Herlinda Soto-Valdéz¹ y Augusto Trejo-González²

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.
Hermosillo, Sonora, México

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue el aislamiento y la caracterización parcial de la enzima polifenoloxidasas de manzana (*Malus domestica* Var. Anna), cosechada en la región semidesértica de la Costa de Hermosillo, Sonora, México. Se estudió el efecto que tienen el pH, temperatura, especificidad hacia sustratos y separación bajo condiciones de cromatografía hidrofóbica. La enzima se aisló a partir de manzanas maduras tratadas con acetona fría. Del polvo residual obtenido se extrajo la enzima con regulador de fosfatos, y el extracto se utilizó para realizar la caracterización, encontrándose que el pH y temperatura óptimos eran 5.36 y 35°C, respectivamente. La especificidad hacia sustratos mostró ser decreciente desde 4-metil catecol, ácido clorogénico, catecol y ácido cafeico hasta 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA). La enzima resultó ser más termoestable que la generalidad de las oxidasas en el intervalo de temperatura de 35°C a 60°C. El comportamiento del extracto a través de cromatografía hidrofóbica produjo un solo pico con actividad polifenolásica, lográndose una purificación de aproximadamente 300 veces. El contenido de compuestos con grupo fenólico fue de 1.16 g/100 g de fruta fresca. Las características polifenolásicas encontradas se asemejan a las de manzanas de regiones templadas, aunque éstas presentan una mayor termoestabilidad, lo que explica hasta cierto grado la gran influencia que la temperatura ejerce sobre el fenómeno del oscurecimiento enzimático en las condiciones tan cálidas en las que crece y se desarrolla la fruta en esta región. Aunado a ello, el alto contenido de compuestos con el grupo fenólico provoca mayor velocidad de la expresión del deterioro de la fruta por oscurecimiento enzimático.

Manuscrito modificado recibido: 6-9-88.

- 1 Técnico Académico, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Carretera La Victoria, km 0.6, Apartado Postal 1735, Hermosillo, Sonora, México 83000.
- 2 Investigador Titular, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., CIIDIR-PN, Justo Sierra No. 28, Jiquilpan, Michoacán, México 59510.

INTRODUCCION

Entre los frutales adaptados a climas cálidos que se cultivan en el Estado de Sonora (principalmente en la región de la Costa de Hermosillo), se encuentra la manzana *Malus domestica* Var. Anna. Esta es un híbrido que se obtuvo en Israel en 1967 (1-3), de manzana "Red Delicious" con manzana "Hashab", siendo esta última una variedad local que produce frutas de muy mala calidad, pero con muy baja necesidad de horas frío. Las características principales de la manzana objeto de estudio, son: buen sabor y aroma, balance azúcar:acidez regular, color que va de verde claro a rojo, peso promedio de 200 g, textura poco firme, forma cónica alargada y alta velocidad de oscurecimiento. Además, tiene buen rendimiento hortícola y es muy adaptable a condiciones semidesérticas (2, 4).

Un factor negativo de esta variedad es que presenta una vida de almacenamiento limitada (4), ya que por las características mencionadas, se magulla fácilmente durante su manejo, desencadenándose reacciones de oscurecimiento enzimático (5). A ello se aúna el hecho de que la cosecha se lleva a cabo a una temperatura ambiental de aproximadamente 40°C, lo que favorece la aceleración de los cambios en cuestión. El oscurecimiento enzimático en las manzanas es causado principalmente por la enzima polifenoloxidasas. La etapa fundamental de este fenómeno es la oxidación de compuestos fenólicos (sustratos) a o-quinonas, en presencia de oxígeno. Las o-quinonas posteriormente se condensan y polimerizan a melaninas (6) que son pigmentos oscuros y pueden interaccionar con proteínas formando complejos coloridos y estables llamados melanoproteínas (7). El tipo de interacción entre quinonas y proteínas es la formación de enlaces covalentes con los grupos amino, tiol y metileno de los aminoácidos (8).

El Estado de Sonora tiene un área de 1,568 hectáreas plantada con esta variedad de manzana, de las cuales, 441 se encuentran en la región de la Costa de Hermosillo, por lo que se considera entre los lugares de mayor extensión en el mundo con este frutal (9).

Se han hecho caracterizaciones de polifenoloxidasas en varias frutas, incluyendo manzana (10-20), pero no de la variedad Anna. Además, en la literatura revisada no se encontraron estudios de composición química general, a pesar de las diferencias que presenta con otras variedades de zonas templadas. Esta información es necesaria para evitar la actividad de la enzima al procesar la manzana, ya que los métodos para su inactivación se basan principalmente en aplicación de calor y cambios de pH.

En base a lo expuesto, los objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

a) Caracterizar la enzima polifenoloxidasas de la manzana (*Malus domestica* Var. Anna). Esto incluyó la determinación de su pH y sustrato óptimos de actividad, actividad específica, comportamiento térmico, y su purificación parcial a partir de un extracto enzimático.

- b) Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos y azúcares reductores en la fruta.
- c) Determinar la composición química general de la manzana.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizó manzana (*Malus domestica* Var. Anna), cosechada en la región de la Costa de Hermosillo, Sonora, México, durante los períodos de junio a agosto de 1985 y 1986.

Diseño experimental — Para la preparación del extracto enzimático crudo se hizo necesario elaborar un diseño de muestreo de la manzana, ya que la actividad de la polifenoloxidasas varía de una fruta a otra, aún en un mismo árbol. El lote experimental estaba compuesto de 7,200 árboles, de los cuales se muestrearon 85 (21). Luego la posición de los mismos se determinó al azar, mediante una tabla de números aleatorios (22).

Se muestrearon 10 manzanas de la parte oriente de cada árbol, tratando de disminuir la variación climática al máximo. El criterio a seguir para llevar a cabo el muestreo se basó en el color, escogiéndose manzana con 40% de rojo, que es el criterio utilizado para cosecharla. En esta etapa de madurez, la fruta presenta un contenido aproximado de sólidos solubles de 12 °Brix (23).

Las manzanas muestreadas de todos los árboles se mezclaron y de éstas se tomaron nueve submuestras que se analizaron por triplicado, para posteriormente medir las actividades específicas de polifenoloxidasas.

Preparación del polvo con actividad de polifenoloxidasas — Antes de llevar a cabo la preparación, a las muestras de manzana se les determinó la concentración de sólidos solubles (°Brix) en una pequeña porción de la fruta, escogiéndose manzanas que tuvieran 12 °Brix. Para extraer la enzima se utilizó el método descrito por Flurkey y Jen (24), modificado por Sciancalepore y Longone (25). Según éste, se homogeneizan muestras de 100 g de manzana con acetona fría (-20°C) durante un minuto, en la proporción de 2:1 (acetona:manzana), agregando 2.5 g de polietilén glicol con el fin de atrapar los compuestos fenólicos que se encuentran en forma natural en la fruta. El homogeneizado se filtra a través de papel filtro Ederol número 2, con ayuda de vacío; los sólidos se resuspenden en acetona y se vuelve a repetir la operación, obteniéndose un polvo blanco que se deja secar por 12 horas a temperatura ambiente (25°C) a fin de eliminar la acetona residual.

Extracción de enzima — El polvo se almacenó en un desecador a -5°C hasta el momento de utilizarlo para la extracción de la enzima. Para obtener el extracto enzimático se suspendieron 2 g del polvo en 100 ml de un regulador de fosfatos de 0.05 M a pH de 7, conteniendo KCl 1 M. La suspensión se agitó por 30 minutos a 4°C y luego se centrifugó a 21,000 g por 45 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada IEC. El sobrenadante se utilizó como extracto enzimático.

Actividad específica de la enzima — Esta evaluación se llevó a cabo espectrofotométricamente, usando un espectrofotómetro UV-VIS de

doble haz, Perkin-Elmer Modelo Lambda 3. El método empleado fue el descrito por Sciancalepore y Longone (25). La reacción enzimática se preparó mezclando 1.9 ml de solución reguladora de citrato 0.1 M a pH de prueba o a pH óptimo, 1.0 ml de una solución 0.02 M de sustrato en el mismo regulador, y 0.1 ml de extracto enzimático. La temperatura de reacción fue de 30°C y se leyó la absorbencia contra tiempo a la longitud de onda correspondiente al sustrato utilizado (26). La reacción se llevó a cabo por tres minutos, graficándose absorbencia contra tiempo, y la actividad enzimática se midió como la velocidad inicial (V_0) de la reacción dada por la pendiente de la porción recta inicial de la curva.

Con miras a determinar la actividad específica de la enzima, se analizó la concentración de proteína en el extracto enzimático por el método de Bradford (27), utilizando como estándar albúmina de plasma bovino. Una unidad de actividad enzimática específica se define como el cambio en absorbencia por minuto (V_0) por mg de proteína.

Determinación del sustrato óptimo de la enzima — Para este propósito se utilizaron como sustratos los cinco compuestos fenólicos más comunes en la manzana: ácido clorogénico, catecol, 4-metilcatecol, ácido caféico y dl-3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA).

Se usaron soluciones de sustrato en concentración de 0.02 M en regulador de citratos, 0.1 a un pH de 5.0. En seguida se midió la actividad enzimática de los extractos para cada sustrato según se mencionó en la parte correspondiente a este método. Se consideró como sustrato óptimo aquél sobre el cual la enzima acusó mayor actividad, y sobre éste se hicieron las mediciones de actividad específica.

Determinación del pH óptimo de la enzima — Con este objetivo se aplicó el método descrito por Satjawatcharaphong *et al.* (20). Se probó la solución reguladora de citrato de sodio 0.1 M a valores de pH desde 0.5 hasta 7.0, con variación de un decimal.

El pH óptimo de la enzima fue aquel valor en el que se presentó la mayor actividad enzimática en la mezcla de reacción con el sustrato óptimo, y fue en el que se efectuaron las mediciones de actividad específica.

Determinación de la temperatura óptima de actividad de la enzima — Se midió actividad enzimática a temperaturas de 15 a 60°C con una variación de 5°C, utilizando el sustrato y pH óptimo de actividad. Los resultados se graficaron como temperatura contra actividad específica y de ahí se obtuvo la temperatura óptima.

Comportamiento térmico de la enzima — Para conocer el comportamiento térmico de la enzima se siguió básicamente el método notificado por Whitaker y Bernhard (28). Se aplicaron tratamientos térmicos a extractos enzimáticos desde 15 a 90°C con una variación de 5°C, durante 10 minutos. Posteriormente se midió la actividad a 30°C, utilizando el sustrato y pH óptimos.

Para obtener la energía de activación se utilizó la ecuación de Arrhenius.

Purificación parcial del extracto enzimático — Esta medición se llevó a cabo aplicando cromatografía hidrofóbica (29). Así, se empacó una columna de vidrio BIO-RAD de 0.7 x 20 cm con la resina hidrofóbica

Phenyl-Sepharose CL-4B (Pharmacia Fine Chemicals), previamente deaerada por acción de vacío antes de ponerla en la columna. Una vez preparada, se equilibró con una solución reguladora (SR) de fosfatos 0.05 M, con KCl 1 M y sulfato de amonio 1 M a un pH de 6.8. El extracto enzimático se aplicó en la parte superior de la columna; las proteínas fueron eluidas usando la solución reguladora en concentraciones decrecientes (SR, 0.8 SR, 0.6 SR, 0.4 SR, 0.2 SR y 0.1 SR). El último tratamiento se efectuó eluyendo con una solución al 50% de etilén-glicol en agua; la cantidad de cada eluyente fue de 20 ml y se colectaron fracciones de 2.0 ml. La concentración de proteína se calculó utilizando el método espectrofotométrico, que consiste en medir absorbencia a 280 nm (30). Se sabe que puede haber interferencia con ácidos nucleicos que tienen su longitud de onda máxima a 260 nm, pero es un método muy utilizado en este tipo de separaciones cromatográficas porque tiene la ventaja de no destruir la muestra, cuya cantidad en estos casos es crítica. La actividad enzimática fue determinada por el método descrito anteriormente.

Análisis de Compuestos con Grupo Fenólico

La determinación de compuestos con grupo fenólico se llevó a cabo de acuerdo con la técnica descrita por Weurman y Swain (31), utilizando el reactivo de fenol de Folin-Ciocalteau (32). El procedimiento para extraer las sustancias fenólicas de la fruta fue el informado por Joslyn y Goldstein (33), y se utilizan dos series de extracciones: una con metanol absoluto, y la otra con metanol al 50%. En este caso, se realizó una serie de dos extracciones más con agua destilada. Luego se analizó cada serie de extracciones y, finalmente, se sumaron para obtener los fenoles totales.

Análisis de Azúcares Reductores

Esta determinación se realizó de acuerdo al método de Somogyi (34).

Análisis Proximal

La determinación de los contenidos de humedad, proteína, grasa, fibra y cenizas se llevó a cabo por los métodos publicados por la AOAC (35). El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia.

RESULTADOS Y DISCUSION

La actividad que acusó la polifenoloxidasas de la manzana *Malus domestica* Var. Anna sobre los diferentes sustratos sometidos a prueba se presenta en la Figura 1, en donde se observa que la afinidad enzimática es más alta para 4-metil catecol, seguida por ácido clorogénico, catecol, ácido caféico y 3-4 DOPA. En base a estos resultados, se escogió el 4-metil catecol para llevar a cabo todos los ensayos enzimáticos.

Los datos obtenidos concuerdan con los informados por Vámos-Vigyázó y Gajzágó (19), con relación al 4-metil catecol como el mejor sustrato para la enzima polifenoloxidasas de la manzana de la variedad

“Jonathan”. El mismo comportamiento se observó para la cáscara de manzana de la variedad “Cox Orange Pippin”, tanto de una preparación cruda, como el de una preparación purificada. Asimismo, se informa que en una preparación de polifenoloxidasas de cáscara de manzana de la variedad “Red Delicious” también se presenta la misma afinidad específica para 4-metil catecol (36).

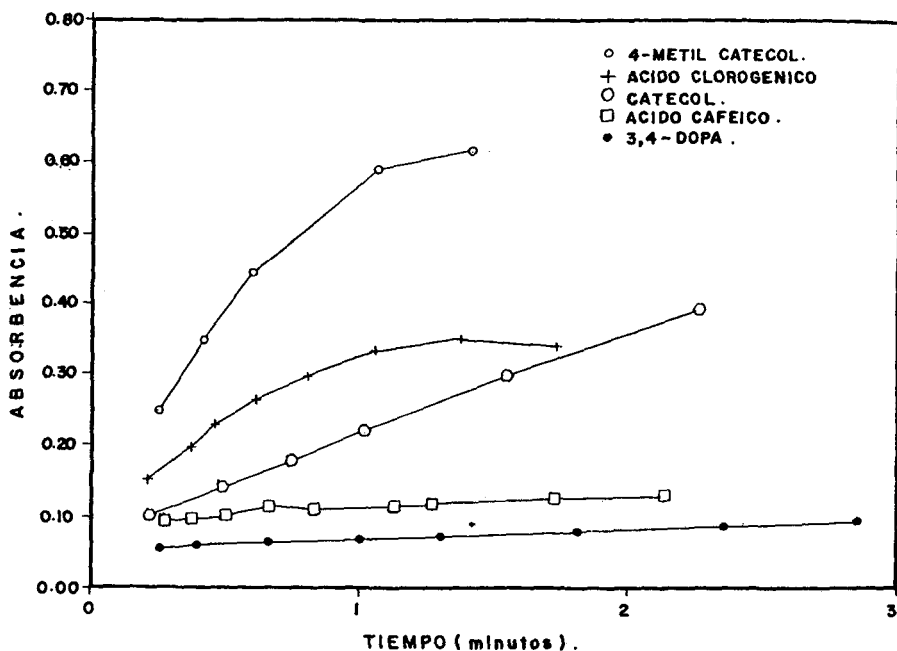


FIGURA 1

Actividad de la enzima polifenoloxidasas de manzana *Malus domestica* Var. Anna, sobre diferentes sustratos

En lo referente al pH óptimo de actividad de la enzima, en la Figura 2 se expone la curva típica de campana que produce la polifenoloxidasas, donde el pH óptimo fue 5.36. Este valor de pH se utilizó para llevar a cabo todos los ensayos enzimáticos con el fin de optimizar la caracterización.

Entre los trabajos informados en la literatura de determinación de pH óptimo de polifenoloxidasas de manzana con valores cercanos al encontrado en la variedad Anna, están los de Shannon y Pratt, quienes encontraron en las variedades “Rome Beauty”, “Winesap” y “Cortland”, un pH óptimo de actividad de 5.2 (14). Walker notificó para la variedad “Sturmer Pippin”, un pH óptimo de actividad de 5.0 (11).

Los resultados de actividad específica de las nueve muestras analizadas según el diseño experimental se agrupan en tres niveles de actividad,

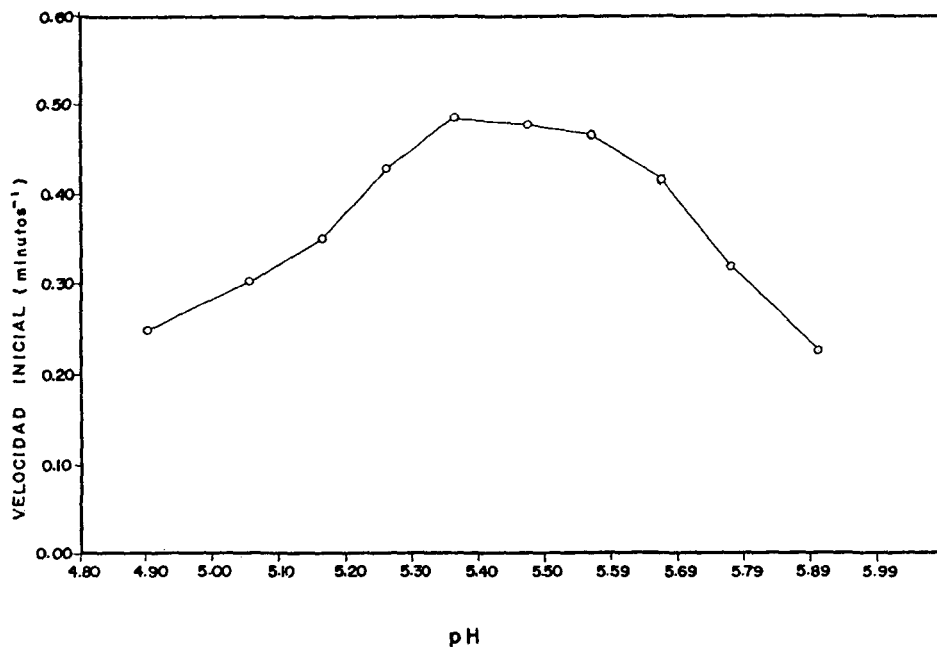


FIGURA 2

pH óptimo de la enzima polifenoloxidasas, utilizando como sustrato 4-metil catecol

como se muestra en la Tabla 1. Esta presenta un primer grupo de alta actividad, con actividad específica media de 96.2 unidades; un segundo grupo de mediana actividad, con 61.4 unidades, y un tercer grupo de baja actividad, con 46.8 unidades. Si no se utiliza esta agrupación se obtiene una dispersión de datos muy grande. Ello no es raro tratándose de actividades enzimáticas, ya que éstas varían hasta en frutas de un mismo árbol.

Se escogió una muestra del nivel de alta actividad para purificarla parcialmente por el método de cromatografía hidrofóbica, obteniéndose los resultados que ilustra la Figura 3. Según se observa, la proteína eluida con 0.2 SR tiene actividad de polifenoloxidasas, y comparando la actividad específica de la fracción más pura con el extracto crudo original, se calcula un incremento en actividad de 307 veces al purificarla. Comportamientos semejantes se han descrito para purificaciones de polifenoloxidasas tanto de durazno "Red Haven" en estado maduro (37), como en la uva "Ravat" (38).

En este experimento, la proteína se midió por el método espectrofotométrico, que consiste en medir absorbencia a 280 nm (30), y se encontró que existe una diferencia apreciable con el método de Bradford. Por este motivo, en la Figura 3 las unidades de actividad específica son más bajas que las descritas en la Tabla 1.

TABLA 1

CLASIFICACION DE ACTIVIDADES DE POLIFENOLOXIDAS DE
MANZANA (*Malus domestica* Var. Anna)

Tipo de actividad	Número de submuestras	Unidades de actividad específica ^a
Alta	3	96.2 ± 4.4
Mediana	2	61.4 ± 1.5
Baja	4	46.8 ± 2.6

^a Una unidad de efectividad específica equivale al cambio en absorbencia por minuto, por mg de proteína en la reacción enzimática.

Se observó que los polvos (precipitados con acetona) obtenidos de cada muestra, conservaron su actividad de un año a otro, almacenados en un desecador, con atmósfera baja de O₂ y -5°C.

En la Figura 4 se presenta la variación de actividad enzimática respecto a la temperatura, siendo 35°C la temperatura óptima de actividad.

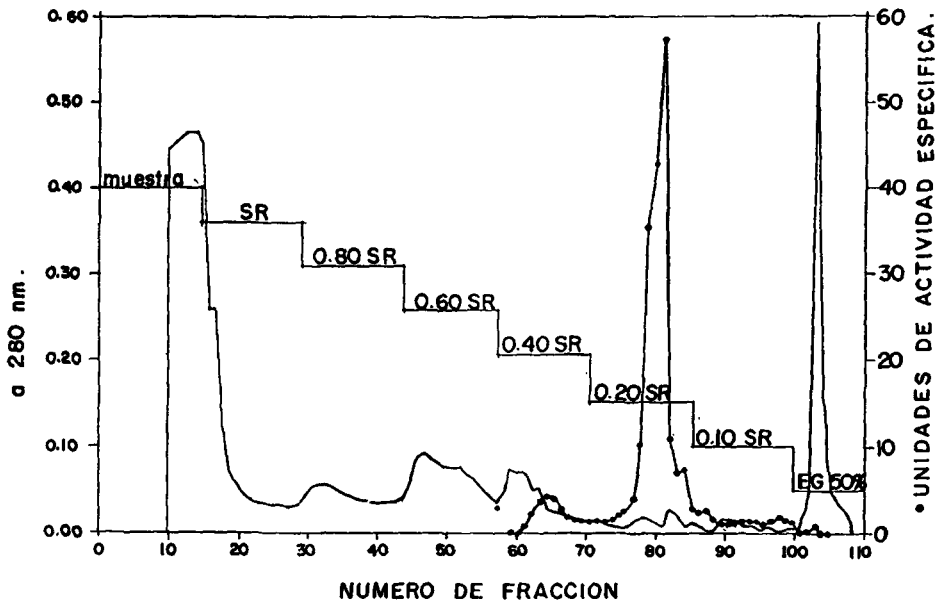


FIGURA 3

Purificación parcial del extracto enzimático, utilizando la resina hidrofóbica Phenyl sepharose CL-4B.

SR: Solución reguladora de fosfatos 0.05 M, con KCl 1 M y sulfato de amonio 1 M
EG 50%: Etilén glicol al 50%

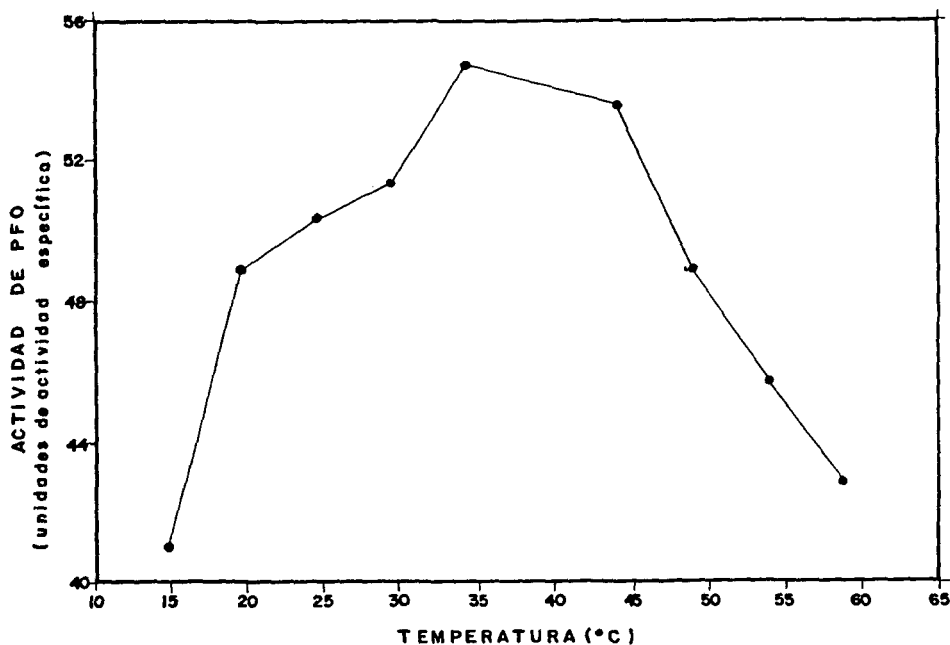


FIGURA 4

Temperatura óptima de actividad de la enzima polifenoloxidasasa de manzana, *Malus domestica* Var. Anna. La temperatura óptima fue de 35°C

Satjawatcharaphong *et al.*, informan para polifenoloxidasasa de manzana "Red Delicious", una temperatura óptima de actividad de 30°C (20).

La energía de activación (E_a) de la reacción catalizada por polifenoloxidasasa —elaborada de acuerdo al método gráfico de Arrhenius— se detalla en la Figura 5. Como puede apreciarse, en el intervalo de 288 a 333 K (15 a 60°C) la enzima es bastante termoestable, y hasta el intervalo de 333 a 353 K (60 a 80°C) se presenta una pendiente de inactivación por desnaturalización proteínica (en la Figura 5 no es posible graficar los puntos correspondientes a 75 y 80°C porque es escala no logarítmica). Cuando se calcula la pendiente de una línea que pase por los puntos correspondientes a las temperaturas de 288 a 308 K (15 a 35°C) se puede obtener la E_a para la conversión de sustrato a producto; este valor es de 1,562.71 kcal/mol (6,543.4 J/mol), con una pendiente de -342.2 kcal.

Un comportamiento semejante al encontrado en este trabajo, con relación a la termoestabilidad de la preparación de polifenoloxidasasa, lo informan Walker y Hulme para manzana de la variedad "Sturmer Pippin". Dichos investigadores observaron la inactivación arriba de los 60°C y, además, encontraron dos bandas de actividad hacia 4-metil catecol por electroforesis en gel de almidón (13).

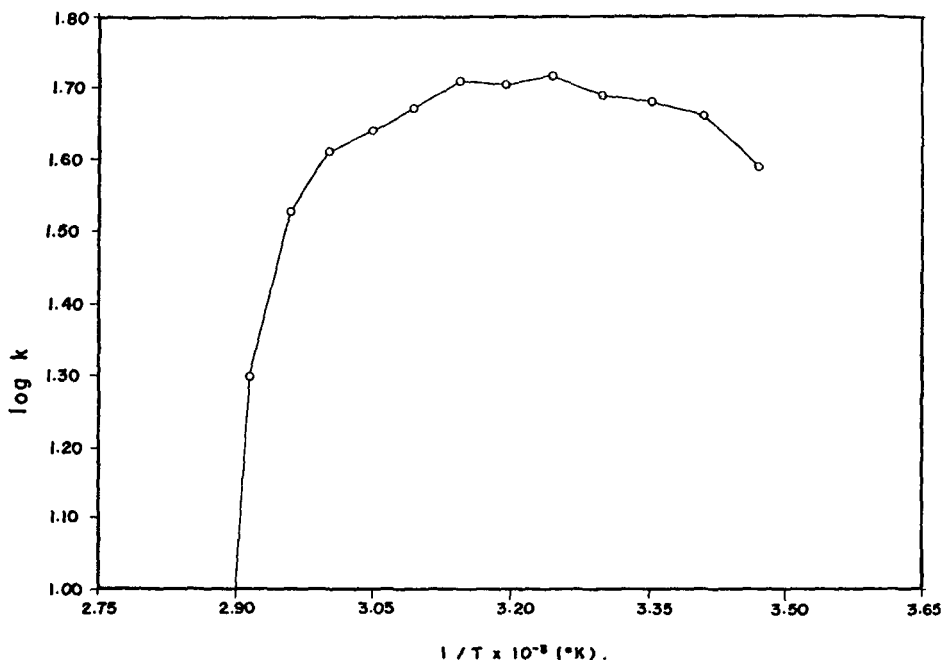


FIGURA 5

Comportamiento térmico de la enzima polifenoloxidasas de manzana, *Malus domestica* Var. Anna. La Energía de activación (E_a) de la reacción enzimática, según la ecuación de Arrhenius [$k = A \exp(-E_a/RT)$] fue de 1,567.7 kcal/mol (6,543.4 J/mol). K es actividad enzimática

La E_a obtenida para la conversión de sustrato a producto en este trabajo es baja, comparándola con la mencionada por Whitaker y Bernhard para reacciones enzimáticas en general, (de 6,000 a 12,000 kcal/mol) (28). El que se presente una E_a tan baja se debe a que la actividad de la enzima varía muy poco de los 20 a los 35°C, en comparación con la mayoría de las enzimas en las que normalmente hay un incremento considerable.

El valor de energía de activación de este orden podría interpretarse como un cambio conformacional de la enzima, o cambios en el grado y tipo de agregación de las subunidades, que le otorgan menor termolabilidad, o bien al efecto de la temperatura sobre la activación de alguna forma latente en la fenolasa (39).

En cuanto a la temperatura de inactivación total, ésta fue de 80°C por 10 minutos en el extracto enzimático. Esto no significa que la enzima en la manzana se inactive bajo estas condiciones, ya que puede ser más estable a la temperatura en el tejido original, donde es protegida por la presencia de otros materiales coloidales (proteínas, carbohidratos, pectinas, etc.),

que se pierden al extraer la enzima de la fruta. No obstante, el dato es fundamental para establecer su inactivación térmica.

El contenido de compuestos con el grupo fenólico de la manzana (*Malus domestica* Var. Anna) fue 1.16 ± 0.12 g/100 g de fruta fresca, valor que es superior a los encontrados para otras variedades de manzana, ya que los datos que se informan están comprendidos en un rango de 0.1 a 1.0 g/100 g (40). La concentración de fenoles influye directamente en el grado de oscurecimiento de la fruta, en virtud de que mientras mayor sea la concentración de sustratos que exista, mayor será la actividad que presente. En este caso, el rápido deterioro de la fruta puede atribuirse al alto contenido de fenoles, y no a la actividad de la enzima.

En el caso de azúcares reductores, los resultados acusaron un porcentaje de peso en fresco de 7.3 ± 1.26 , lo que muestra que esta variedad de manzana se encuentra dentro del rango considerado normal, (6.3 – 10.67%) (40). Por lo tanto, el oscurecimiento no enzimático no influye en el rápido deterioro de la fruta.

Los resultados de composición proximal de la manzana se dan a conocer en la Tabla 2. Según se observa, los datos encontrados son similares a la composición informada para otras variedades de manzana (40).

TABLA 2

COMPOSICION PROXIMAL DE LA MANZANA (*Malus domestica* Var. Anna)^a

Componente	$\bar{x} \pm DE$ (g/100 g)
Agua	84.11 \pm 1.11
Proteína	0.32 \pm 0.02
Grasa	0.19 \pm 0.04
Fibra	0.79 \pm 0.06
Cenizas	0.35 \pm 0.07
Carbohidratos ^b	14.24 \pm 0.97

a Los resultados son producto del análisis de 5 muestras por triplicado.

b Los carbohidratos se calcularon por diferencia.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La caracterización parcial de la enzima polifenoloxidasa de manzana, *Malus domestica* Var. Anna, muestra un comportamiento semejante al de otras variedades de manzana; sin embargo, presenta mayor termoestabilidad respecto a oxidasas en general.

La termoestabilidad observada puede explicar la gran estabilidad de la enzima y su tremenda influencia en el fenómeno del oscurecimiento, aún a temperaturas tan extremas como a las que crece y desarrolla la fruta en la región, donde soporta temperaturas hasta de 45°C o más. Además, la concentración alta de compuestos con grupo fenólico contribuye a la

rápida aparición de los productos coloridos ante el mínimo traumatismo externo. Lo dicho, aunado a las características estructurales de esta manzana (blandura, células grandes, forma, tamaño, etc.) provoca el alto grado de oscurecimiento en contraste con otras variedades de clima más templado.

Ello presenta un gran reto al tratar de inactivar a la enzima por otros medios, como son utilizar pH bajo, exclusión de oxígeno o conservadores. Por lo tanto, es recomendable combinarlos con aplicación de temperatura, a fines de obtener resultados eficaces.

La información anterior puede servir de base para el desarrollo tecnológico del aprovechamiento industrial de esta manzana y, en nuestro criterio, constituye un aporte a la literatura científica, muy escasa en cuanto a este frutal de reciente introducción en las zonas áridas de México.

SUMMARY

ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF POLYPHENOLOXIDASE FROM APPLE (*Malus domestica* Anna var.)

This study pursued the isolation and partial characterization of the enzyme polyphenoloxidase from apple (*Malus domestica* Anna variety), grown in the Hermosillo Coast (State of Sonora, Mexico). The effects of pH and temperature as well as its specificity towards substrates, and its behavior under conditions of hydrophobic chromatography, were studied. The enzyme was isolated from a residual powder obtained from ripe apples homogenized with cold acetone. The extract thus prepared was used to characterize the enzyme, and it showed an optimum pH of 5.36 and an optimum temperature of 35°C. The substrate specificity proved to decrease from 4-methyl catechol, chlorogenic acid, catechol, and caffeic acid, to 3,4-dihydroxyphenyl alanine (DOPA). The enzyme resulted to be more thermostable (temperature range: 35°C to 60°C) than the rest of oxidases of plant origin. When the extract was eluted under conditions of hydrophobic chromatography separation, it appeared as a single peak resulting in a 300 fold purification. The phenolase activity characteristics found in the present study were similar to those observed in other apples from temperate climates; however, this particular polyphenoloxidase is more thermostable under natural conditions. This explains why apples of the Anna variety, at the high harvesting temperature, show a very fast formation of brown spots even when there is a minor damage. The content of compounds with phenolic group was high (1.16 g/100 g fresh weight). Further increase of the velocity of fruit enzymatic browning was due to this reason.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado para la realización de este estudio, y al Sr. Alfredo Noriega desean agradecer, asimismo, el haberles proporcionado la fruta necesaria para dicho propósito.

BIBLIOGRAFIA

1. Crocker, T.E. & W.B. Sherman. The apple. **Fruit Crops Fact Sheet**. University of Florida, FC-14, 1979.
2. Markus, Z., J. Rojas & M.A. Solís. Manzana variedad "Anna". **Fruticultura**. Costa Rica, Programa Nacional del Manzano del Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1984. (Boletín Divulgativo No. 1).
3. Sherman, W.B., R.H. Sharpe & J.B. Aitken. Subtropical apples. **Proc. Fla. State Hort. Soc.** 84: 9-11, 1971.
4. Rushing, J.W. & W.B. Sherman. Storage and marketing potential of Florida apples and pears. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, 94: 358-359, 1981.
5. Miller, E.P. & L.H. Baker. An evaluation of apple cultivars for Central and North Florida. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, 95: 88-90, 1982.
6. Matheis, G. Enzymatic browning of foods. **Z. Lebensm. Unters Forsh.**, 176: 454-462, 1983.
7. Martins, M.A. Comportamento das polifenoxidasês em alimentos. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, 34(2): 269-287, 1984.
8. Sosulski, F. Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oil seed protein products: A review. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 56: 711-715, 1979.
9. Martínez, J. **Comunicación Personal**. Centro de Investigaciones Agrícolas del Noroeste. Hermosillo, Sonora, México, 1987.
10. Weurman, C. & T. Swain. Changes of browning of Bramely's seedling apples during their development. **J. Sci. Food Agric.**, 6: 186-192, 1955.
11. Walker, J.R.L. Studies on the enzymic browning of apples. **Aust. J. Biol. Sci.**, 17: 360-371, 1964.
12. Walker, J.R.L. & A.C. Hulme. The inhibition of the phenolase from apple peel by polyvinylpyrrolidone. **Phytochem**, 4: 677-685, 1965.
13. Walker, J.R.L. & A.C. Hulme. Studies on the enzymic browning of Apple-III. **Phytochem**, 5: 259-262, 1966.
14. Shannon, C.T. & D.E. Pratt. Apple polyphenol oxidase activity in relation to various phenolic compounds. **J. Food Sci.**, 32: 479-483, 1967.
15. Liffen, C.L. & H.N. Cleeve. Some aspects of enzymatic browning in apples. **J. Biological Education**, 9: 127-133, 1975.
16. Walker, J.R.L. & E.L. Wilson. Studies on the enzymic browning of apples. Inhibition of apple o-Diphenol oxidase by phenolic acids. **J. Sci. Fd Agric.**, 26: 1825, 1975.
17. Constantinides, S.M. & C.L. Bedford. Multiple forms of phenolase. **J. Food Sci.**, 32: 446-450, 1967.
18. Vamós-Vigyázó, L., I. Gajzágó, K. Mihályi & V. Nádudvari-Márcus. Changes in enzymic browning, polyphenol oxidase and polyphenol contents of Jonathan apples during storage. **Acta Alimentaria**, 6: 389-400, 1977.
19. Vamós-Vigyázó, L. & I. Gajzágó. Substrate specificity of the enzymic browning of apple. **Acta Alimentaria**, 7: 79-90, 1978.
20. Satjawstcharaphong, C., K.S. Rymal, W.A. Dozier, Jr. & R.C. Smith. Polyphenol oxidase system in Red Delicious apples. **J. Food Sci.**, 48: 1879-1880, 1983.
21. Nickerson, J.T. & A.J. Sinskey. **Microbiology of Foods and Processing**. USA, American Elsevier Publishing Co., 1974. p. 2.
22. Dixon, W.J. & F.J. Massey. **Introducción al Análisis Estadístico**. 2a. ed. México, Ed. McGraw-Hill, 1985, p. 362.
23. Díaz, M.D. & A.A. Alvarez. El cultivo de frutales en la Costa de Hermosillo. **SARH, INIA, CIANO**, 1: 27-34, 1982.

24. Flurkey, W.H. & J.J. Jen. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *J. Food Sci.*, **43**: 1826-1831, 1978.
25. Sciancalepore, V. & V. Longone. Polyphenol oxidase activity and browning in green olives. *J. Agric. Food Chem.*, **32**: 320-321, 1984.
26. Interesse, F.S., P. Ruggiero, G. Davella & F. Lamparelli. Partial purification and some propeties of wheat (*Triticum aestivum*) o-phenolase. *J. Sci., Fd Agric.*, **31**: 459-466, 1980.
27. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248, 1976.
28. Whitaker, J.R. & R.A. Bernhard. **Experiments for an Introduction to Enzymology.** Department of Food Science and Technology, University of California, Davis, The Whiber Press, 1985, p. 35.
29. Flurkey, W.H. & J.J. Jen. Hidrophobic adsorption chromatography of peach polyphenol oxidase. *J. Food Sci.*, **45**: 1622, 1980.
30. Layne, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: **Methods in Enzymology**, Vol. 3 S.P. Colowick and N.O. Kaplan (Eds.). Nueva York, NY., Academic Press, Inc., 1957, p. 447.
31. Weurman, C. & T. Swain. Changes in the enzymic browning of Bramley's seedling apples during their development. *J. Sci. Fd Agric.*, **6**: 186-192, 1955.
32. Singleton, V.L. & J.H. Rossi. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *J. Enol. Vitiv.*, **16**: 144-158, 1965.
33. Joslyn, M.A. & J.A. Goldstein. Changes in phenolic content in persimmons during ripening and processing. *J. Agric. Food Chem.*, **12**(6): 511-519, 1964.
34. Somogyi, M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**: 19-23, 1952.
35. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC.** 14th ed. Washington, D.C., The Association, 1984, p. 418-420.
36. Stelzig, D.A., S. Akhtar & S. Ribeiro. Catechol oxidase of Red Delicious apple peel. *Phytochem.*, **11**: 535-539, 1972.
37. Jen, J.J. & W.H. Flurkey. Hidrophobic chromatography of peach fruit polyphenol oxidase. *Hort Science*, **14**: 516-518, 1979.
38. Wissemann, S.W. & C.Y. Lee. Purification of grape polyphenoloxidase with hydrophobic chromatography. *J. Chromatography*, **192**: 232-235, 1980.
39. Vaughn, K.C. & S.D. Duke. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant*, **60**: 106-112, 1984.
40. Hulme, A.C. **The Biochemistry of Fruits and Their Products.** Vol. I. London and New York, Academic Press, Inc., 1970, p. 4, 270.