



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Pardeamiento enzimático del fruto de níspero (*Eriobotrya japonica* cv. Algerie):
enzimología y fisiología de las polifenol
oxidases.

Susana Sellés Marchat

Tesis

Doctorales

www.eltallerdigital.com

UNIVERSIDAD de ALICANTE

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE AGROQUÍMICA Y BIOQUÍMICA

**Pardeamiento enzimático del fruto de
níspero (*Eriobotrya japonica* cv. *Algerie*):
enzimología y fisiología de las polifenol oxidasas**



Memoria presentada para aspirar al

grado de Doctor en Química

Susana Sellés Marchart

2007

El Dr. D. JUAN SANCHEZ ANDREU, Director del Departamento de Agroquímica y Bioquímica de la Universidad de Alicante,

CERTIFICA

Que los trabajos experimentales conducentes a la elaboración de la presente memoria titulada **“Pardeamiento enzimático del fruto de níspero (*Eriobotrya japonica* cv. *Algerie*): enzimología y fisiología de las polifenol oxidasas”** presentada por D^a. SUSANA SELLES MARCHART para aspirar al grado de Doctor han sido realizados en los laboratorios del Departamento de Agroquímica y Bioquímica de la Universidad de Alicante bajo la dirección del Dr. D. ROQUE BRU MARTINEZ.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Alicante, a 24 abril de 2007.

Fdo: Juan Sánchez Andreu

El Dr. D. ROQUE BRU MARTINEZ, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Agroquímica y Bioquímica de la Universidad de Alicante,

CERTIFICA

Que los trabajos conducentes a la elaboración de la presente memoria titulada **Pardeamiento enzimático del fruto de níspero (*Eriobotrya japonica* cv. Algerie): enzimología y fisiología de las polifenol oxidasas**” presentada por D^a. SUSANA SELLÉS MARCHART para aspirar al grado de Doctor han sido realizados bajo mi dirección.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Alicante, a 24 de abril de 2007.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Fdo: Roque Bru Martinez

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido directa o indirectamente para que este trabajo se lleve a cabo.

En primer lugar quiero agradecer a mi director de Tesis, El Dr. Roque Bru Martínez, por darme la oportunidad de introducirme en el mundo de la investigación y por su contribución a mi formación científica durante estos años. Su continua y constante disponibilidad, junto con su espíritu investigador, ha sido para mí un gran estímulo en el trabajo desarrollado día a día. Gracias por todo.

Al Doctor Juan Casado Vela por la ayuda que me ha brindado en todo momento haciendo más fácil este trabajo. Por contar con su apoyo y amistad desde el primer día que entré en el Departamento de Agroquímica y Bioquímica, por los buenos momentos y por no permitir que la distancia merme nuestra amistad.

Al Dr. Ignacio Luque Romero, científico investigador del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, por su contribución en una parte importante de esta tesis. Además quiero agradecerle sus consejos, apoyo y amabilidad en todo momento que ha sido una muestra de lo grato que puede ser una colaboración.

A mis primeros y antiguos compañeros del laboratorio- Juan, Diego, Nacho y Loli- y a mis compañeros actuales -Maite, M^a José y Juan Carlos- que todos por igual y cada uno a su manera, han contribuido con su amistad y ayuda a la realización de este trabajo. Gracias a todos por hacer del laboratorio una segunda casa, donde he pasado tanto momentos divertidos como inolvidables. A Diego, por la amistad que nos une y por sus ánimos constantes. A mis compañeros actuales, por saber escuchar y animarme en los momentos más difíciles, fuera de lo estrictamente profesional, que se han dado a lo largo de este trabajo.

A Maite Vilella, por su ayuda técnica en la realización del trabajo, por ayudarme siempre que le he pedido consejo, por ser una buena compañera y sobre todo, una gran amiga.

A María José Martínez, por ayudarme en mis deficiencias sobre temas de Biología, por su apoyo, consejos y amistad.

A Juan Carlos Vera, por tenderme una mano siempre que me ve estresada, por intentar responder a todas mis preguntas y por su amistad.

A Alfonso, por ayudarme con la técnica de western-blot, por los buenos momentos compartidos y porque siempre me hace reír.

Al Dr. Vicente Micol Molina y a Lorena Funes Gómez por su ayuda técnica en los experimentos de fluorescencia.

Al Dr. Luis Vicente López-Llorca, a Jose, Javi y Sonia por la ayuda prestada en el uso del lector de placas Tecan Genios.

A la Dra. M^a Ángeles Pedreño, por su constante ánimo en el tramo final de este trabajo.

A Miriam, por su apoyo, ánimo y amistad. Por ser una gran persona y transmitirme tranquilidad.

A mis mejores amigos, Héctor, Auro, Pecho, Frank, Maria, Lola, Victor, Juanra, Ali, Gloria, Jose, M^a José, Mari Luz, Raquel, Longui, Lidia, Clara, Sento, Carmen, Miguel, Alvaro..., por su ánimo en todo momento. Y por esas ganas locas de que termine, que sólo muestran lo mucho que me echan de menos, tanto como yo a ellos.

A Pili, Mari Pepa y Nuria, compañeras de la carrera y grandes amigas, por animarme a realizar esta etapa investigadora.

A la cooperativa de Callosa D'Ensarrià y en concreto a Esteban Soler, por haberme proporcionado los nísperos para el trabajo.

En último lugar, y no por ello menos importante, a mi familia que me ha dado todo sin pedir nada a cambio. Gracias por vuestro apoyo incondicional, y por el ánimo e ilusión que me habeis transmitido. Y junto a ellos, mi mejor amigo y compañero, la persona que ha estado siempre a mi lado, en los momentos buenos y sobre todo en los más duros, donde su presencia, apoyo y ánimo han sido fundamentales. Gracias Héctor por reunir todo lo que he necesitado.

El presente trabajo de investigación ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y los Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER). Proyectos: AGF99-0396, BIO-2002-03100 y BIO-2005-00332.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

El contenido de esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente publicado en los siguientes trabajos:

1. Sellés-Marchart, S., Casado-Vela, J. and Bru-Martínez, R. 2006. Isolation of a latent polyphenol oxidase from loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.): Kinetic characterization and comparison with the active form. *Archiv. Biochem. Biophys.* 446: 175-185.

2. Sellés-Marchart, S., Casado-Vela, J. and Bru-Martínez, R. Effect of detergents, trypsin and unsaturated fatty acids on latent loquat fruit polyphenol oxidase. Basis for the enzyme's activity regulation. *Archiv. Biochem. Biophys.* (en prensa).



A Héctor, a mi familia

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Índice

Capítulo I. Introducción general y antecedentes

| | |
|---|-----------|
| I.1 Introducción general..... | 1 |
| I.1.1 Origen, clasificación taxonómica e importancia del cultivo del níspero..... | 1 |
| I.1.2 Calidad del fruto del níspero | 2 |
| I.1.2.1 Tamaño del fruto | 2 |
| I.1.2.2 Magulladuras..... | 3 |
| I.1.2.3 La mancha púrpura..... | 4 |
| I.1.3 Polifenol oxidasas en plantas..... | 6 |
| I.1.3.1 Relevancia de PPO en frutos usados como alimentos | 6 |
| I.1.3.2 Distribución y localización | 10 |
| I.1.3.3 Propiedades moleculares | 12 |
| I.1.3.4 Estructura y mecanismo catalítico | 14 |
| I.1.3.5 Función biológica..... | 18 |
| I.1.3.6 Latencia | 21 |
| Objetivos..... | 25 |

Capítulo II. Purificación y caracterización cinética de la polifenol oxidasa latente

| | |
|---|----|
| II.1 Introducción..... | 26 |
| II.2 Materiales y métodos | 28 |
| II.2.1 Material vegetal..... | 28 |
| II.2.2 Reactivos | 28 |
| II.2.3 Métodos | 28 |
| II.2.3.1 Purificación del Triton X-114..... | 28 |
| II.2.3.2 Método de extracción y purificación de la enzima polifenol oxidasa | 29 |
| II.2.3.3 Ensayo de actividad de polifenol oxidasa..... | 30 |
| II.2.3.4 Cuantificación del contenido total de proteínas..... | 31 |
| II.2.3.5 Cuantificación de compuestos fenólicos..... | 31 |
| II.2.3.6 Especificidad de sustrato | 31 |
| II.2.3.7 Estudios de inhibición..... | 32 |
| II.3 Resultados y discusión..... | 33 |
| II.3.1 Extracción y purificación enzimática | 33 |

| | |
|--|----|
| II.3.2 Caracterización cinética de PPO | 39 |
| II.3.2.1 Parámetros cinéticos de las isoenzimas de PPO | 39 |
| II.3.2.2 pH óptimo | 43 |
| II.3.2.3 Temperatura óptima y termoestabilidad | 45 |
| II.3.2.4 Especificidad de sustrato | 48 |
| II.3.2.5 Inhibidores | 50 |

Capítulo III. Propiedades moleculares de la polifenol oxidasa latente

| | |
|--|----|
| III.1 Introducción..... | 55 |
| III.2 Materiales y métodos..... | 55 |
| III.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida..... | 55 |
| III.2.1.1 Reactivos y soluciones utilizadas | 55 |
| III.2.1.2 Métodos | 56 |
| - Preparación de las muestras | 56 |
| - Preparación del gel de acrilamida | 56 |
| - Condiciones de la electroforesis | 57 |
| - Tinción de los geles..... | 57 |
| III.2.2 Cromatografía de filtración en gel | 58 |
| III.2.3 Amino terminal | 58 |
| III.3 Resultados y discusión | 60 |
| III.3.1 Pureza de PPO latente y masa aparente de la proteína | 60 |
| III.3.2 Amino terminal y análisis de similitud de secuencia..... | 64 |

Capítulo IV. Regulación de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa latente

| | |
|--|----|
| IV.1 Introducción | 66 |
| IV.2 Materiales y métodos | 66 |
| IV.2.1 Materiales | 66 |
| IV.2.2 Métodos | 66 |
| - Ensayos enzimáticos | 66 |
| - Ensayos de activación de PPO | 66 |
| - Ensayos de inhibición de PPO | 67 |
| - Cromatografía de filtración en gel | 67 |
| - Espectroscopia de fluorescencia | 67 |

| | |
|--|----|
| - Determinación fluorimétrica de la concentración micelar crítica de detergentes . | 68 |
| IV.2.3 Análisis de datos cinéticos..... | 68 |
| IV.3 Resultados | 70 |
| IV.3.1 Efecto del SDS y la tripsina sobre los perfiles de pH..... | 70 |
| IV.3.2 Efecto del SDS en la fluorescencia intrínseca de la PPO latente..... | 72 |
| IV.3.3 Efecto del pH, sustrato y tripsina en los parámetros cinéticos | 74 |
| IV.3.4 Efecto de los detergentes en la actividad PPO..... | 80 |
| IV.3.5 Efecto de los detergentes sobre el tamaño aparente de la PPO latente..... | 84 |
| IV.3.6 Efecto de los ácidos grasos | 88 |
| IV.4 Discusión..... | 90 |

Capítulo V. Identificación molecular de polifenol oxidasas de níspero mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS)

| | |
|--|-----|
| V.1 Introducción..... | 95 |
| V.2 Materiales y métodos..... | 97 |
| V.2.1 Preparación de los extractos proteicos | 97 |
| V.2.2 Separación y detección de péptidos con nanoflujo LC-MS/MS | 98 |
| V.2.2.1 Digestión triptica de proteínas en gel | 98 |
| V.2.2.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) | 98 |
| V.2.3 Identificación de péptidos y proteínas | 98 |
| V.2.3.1 Identificaciones basadas en los espectros MS/MS | 99 |
| V.2.3.2 Identificaciones basadas en la secuenciación <i>de novo</i> | 100 |
| V.2.4 Construcción de árboles filogenéticos. | 101 |
| V.3 Resultados..... | 102 |
| V.3.1 Determinación de la diversidad de PPO en frutos de níspero..... | 102 |
| V.3.2 Determinación de la secuencia parcial de la PPO latente purificada de 59.2 kDa | 103 |
| V.3.3 Determinación de la secuencia parcial de las bandas inmunoreactivas de PPO... | 106 |
| V.3.4 Relaciones filogenéticas entre las PPO de níspero. | 112 |
| V.4 Discusión | 117 |

Capítulo VI. Estudio fisiológico de las polifenol oxidasas de frutos de níspero

| | |
|---|-----|
| VI.1 Introducción | 120 |
| VI.2 Materiales y métodos | 121 |
| VI.2.1 Análisis de pH, azúcar y acidez en frutos de níspero. | 121 |

| | |
|---|-----|
| VI.2.2 Niveles de actividad y fenoles en las diferentes fracciones de PPO..... | 121 |
| VI.2.3 Western blot..... | 121 |
| VI.2.3.1 Reactivos | 121 |
| VI.2.3.2 Métodos:..... | 122 |
| VI.2.3.2.1 Obtención del anticuerpo | 122 |
| VI.2.3.2.2 Preparación de los extractos proteicos. | 125 |
| - Precipitación con TCA y DXC | 126 |
| - Extracción y precipitación con fenol/acetato amónico / metanol | 126 |
| VI.2.3.2.3 Electrotransferencia | 127 |
| VI.2.3.2.4 Inmunodetección..... | 127 |
| VI.2.3.2.5 Tinción de las membranas | 128 |
| VI.2.3.2.6 Titulación del antisuero..... | 128 |
| - Determinación de la cantidad mínima de proteína control y de la dilución del anticuerpo. | 128 |
| - Determinación de la dilución de anticuerpo primario para la fracción particulada de PPO de níspero. | 131 |
| VI.3 Resultados y discusión | 133 |
| VI.3.1 Evolución de PPO durante el desarrollo y la maduración. | 133 |
| VI.3.1.1 Caracterización del desarrollo y maduración mediante variables físicoquímicas..... | 133 |
| VI.3.1.2 Evolución de los niveles de ácido clorogénico, actividad PPO y bandas inmunoreactivas..... | 136 |
| - Fenoles totales y ácido clorogénico | 136 |
| - Actividad de PPO activa y latente en fracciones solubles y particuladas | 137 |
| - Análisis de Western-blot de bandas inmunoreactivas de PPO | 139 |
| VI.3.2 Evolución de PPO durante la post-recolección..... | 145 |
| - Aspecto visual de los frutos | 145 |
| - Actividad PPO activa y latente de fracciones solubles y particuladas..... | 146 |
| - Análisis de western blot de bandas inmunoreactivas de PPO..... | 147 |
| VI.3.3 Evolución de PPO tras el magullado de los frutos | 149 |
| - Aspecto visual de los frutos | 149 |