

# DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOL OXIDASA DE UCHUVA (*Physalis peruviana* L.) Y AISLAMIENTO POR SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS

DEVELOPMENT OF AN EXTRACTION METHOD OF GOLDEN BERRY (*Physalis peruviana* L.) POLYPHENOL OXIDASE AND ISOLATION BY AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM

Karent E. BRAVO M.<sup>1\*</sup>, Katalina MUÑOZ D.<sup>1</sup>, Jénifer CALDERÓN G.<sup>1</sup>, Edison J. OSORIO D.<sup>1</sup>

Recibido: Marzo 03 de 2010 Aceptado: Mayo 26 de 2011

## RESUMEN

La polifenol oxidasa es la enzima responsable del pardeamiento de frutas y vegetales, en los que ocasiona disminución de las propiedades organolépticas y nutricionales. En este trabajo se evaluó la influencia de las condiciones de extracción (pH, concentración, composición del buffer y precipitación proteica) sobre la actividad de la polifenol oxidasa extraída de uchuva. La actividad polifenol oxidasa más alta se obtuvo al extraer la enzima utilizando buffer fosfato 0,2 M pH 6,0 suplementado con Triton<sup>®</sup> X-100 y polivinil pirrolidona y concentrando las proteínas con acetona fría en una proporción sobrenadante:acetona 1:1. Posteriormente, la polifenol oxidasa se purificó parcialmente utilizando sistemas bifásicos acuosos formados por polietilenglicol y fosfato. Se evaluó el efecto de la composición de las fases, el peso molecular del polietilenglicol y el pH. Los mejores resultados se obtienen con un sistema formado por 5% de polietilenglicol 8000 y 14% de fosfato, en un pH de 5,5 con un factor de purificación de 4,65, un  $K_a$  de 4,70 y un porcentaje de rendimiento en la fase superior de 74,29%. Estos resultados indican un efecto significativo de las condiciones de extracción sobre la actividad polifenol oxidasa y proporcionan un método rápido, simple y eficiente para el aislamiento de esta enzima.

**Palabras clave:** uchuva, polifenol oxidasa, extracción, aislamiento, sistemas bifásicos acuosos.

## ABSTRACT

Polyphenol oxidase activity is responsible for the enzymatic browning of fruits and vegetables, and the end products of the catalyzed reaction are detrimental to food quality, in both sensory and nutritional properties. In this study we evaluated the influence of the extraction conditions (pH, concentration, composition of extraction buffer and protein precipitation agent) on the activity of golden berry polyphenol oxidase. The extraction of proteins with a mixture of Triton<sup>®</sup> X-100 and polyvinyl pyrrolidone in 0.2 M phosphate buffer at pH 6.0 and precipitation with cold acetone in a ratio supernatant-acetone of 1:1 gave the higher polyphenol oxidase activity. Partial purification of polyphenol oxidase was achieved using an aqueous two-phase system composed by polyethylene glycol and phosphate. Effect of phase composition, molecular weight of polyethylene glycol and pH of the system on enzyme partitioning was studied. The optimum system was found at pH 5.5 containing 5% polyethylene glycol 8000 and 14% phosphate, with  $K_a$  of 4.70, purification factor of 4.65 and a 74.29% yield of enzyme activity in the top phase. These results show a significant effect of extraction conditions on polyphenol oxidase activity and provide a quick, simple and efficient method for polyphenol oxidase isolation.

**Keywords:** Golden berry, polyphenol oxidase, extraction, isolation, aqueous two-phase systems.

---

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. A.A. 1226. Medellín, Colombia.

\* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: karenbramu@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

La polifenol oxidasa (PPO por sus siglas en inglés) es una metaloenzima que actúa durante el procesamiento y la senescencia de frutas y vegetales, catalizando dos tipos de reacciones que usan oxígeno molecular como agente oxidante: la *orto*-hidroxilación de monofenoles para producir *orto*-difenoles y la posterior oxidación de *orto*-difenoles a *orto*-quinonas. Estas especies producidas son altamente reactivas e inestables (1) y pueden reaccionar con grupos amino y tiol de aminoácidos libres y proteínas mediante mecanismos no enzimáticos, o reaccionar covalentemente con otros compuestos fenólicos para formar diferentes pigmentos, ocasionando así el efecto conocido como pardeamiento enzimático (2). Este fenómeno causa deterioro en las características organolépticas de los productos, disminuye su valor proteico y afecta las propiedades benéficas asociadas a los compuestos fenólicos, causando grandes pérdidas económicas en la industria de frutas y vegetales.

En un estudio realizado por Muñoz *et al.*, 2007 (3) se reporta la actividad polifenol oxidasa en frutos de uchuva, *Physalis peruviana* L., planta que tiene un alto contenido de compuestos fenólicos, vitaminas y minerales. Esta especie es usada en medicina tradicional como diurética, antipirética, en el tratamiento de las cataratas, cáncer, leucemia, hepatitis, y reumatismo (4,5); sin embargo, sus propiedades medicinales no han sido probadas científicamente (4). Algunos estudios indican que el consumo de frutos de uchuva reduce la glucosa en sangre en adultos jóvenes después de 90 minutos postprandial, causando un mayor efecto hipoglucémico después de este periodo (5). Además, es de gran importancia económica en el país, por ser la fruta exótica colombiana más exportada (6).

Puesto que los procesos de extracción y purificación de PPO son pasos fundamentales en la investigación sobre la caracterización bioquímica, los mecanismos de acción en los procesos de pardeamiento enzimático y en la búsqueda de acciones tendientes a disminuir o inhibir la actividad de esta enzima, se requieren sistemas de extracción y purificación enzimática sencillos, rápidos y eficientes. La literatura da cuenta de diversas metodologías para la extracción y purificación de PPO de frutas y vegetales. En el proceso de extracción se reportan metodologías con variaciones importantes en el pH, la concentración y la composición del buffer de extracción (7-9), y en los procesos de precipitación

proteica empleándose principalmente sulfato de amonio (7), y en algunas ocasiones acetona (10). Los métodos convencionales para la purificación de esta enzima emplean separaciones cromatográficas usando dietilaminoetil (DEAE) y celulosa o sefaraosa, fenil u octil sefaraosa, sephadex® G25 – G100 (11-13) como matrices. Sin embargo, son costosos y esto dificulta su escalado (14, 15).

En los últimos años, las particiones por sistemas bifásicos acuosos (SBA) han devenido una alternativa interesante para la recuperación y purificación de biomoléculas, entre otras las xilanasas, amilasas y aminoglucosidasas (16-19). Estos sistemas se forman al mezclar en un medio acuoso dos polímeros de cadena flexible o un polímero y una sal por encima de una concentración crítica, donde espontáneamente se originan 2 fases, una rica en polímero y otra rica en sal o polímero. Macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos se reparten entre las 2 fases, dependiendo de su peso molecular, carga e hidrofobicidad superficial y de las condiciones del sistema, relacionadas con el peso molecular, la concentración de polímero, el pH y la fuerza iónica (20). Esta metodología presenta algunas ventajas frente a las separaciones cromatográficas convencionales, puesto que es de fácil escalado, bajo costo y proporciona, además, ambientes favorables para las biomoléculas.

En este trabajo se evalúa la influencia de las condiciones de extracción de PPO de uchuva y se aísla esta enzima empleando sistemas acuosos de dos fases (SBA) formados por polietilenglicol (PEG) y fosfato. Además, se determina el efecto de la composición de las fases, el peso molecular del PEG y el pH del sistema en la purificación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Se emplearon uchuvas frescas en estados de maduración 4 y 5 (21), recolectadas en el municipio de Rionegro (Antioquia) en febrero de 2009. Este material fue identificado botánicamente en el Herbario de la Universidad de Antioquia donde se depositó un espécimen. Los reactivos empleados en este estudio fueron grado analítico. Se usó fosfato de sodio dibásico, fosfato de potasio monobásico y sulfato de amonio marca Carlo Erba®, polivinil pirrolidina, catecol y 4-metilcatecol (4MTC) marca Sigma, Triton® X-100 marca J. T. Baker®, acetona marca Merck®, PEG 600, PEG 4000 y PEG 8000 marca Fluka.

### Obtención del extracto enzimático

Se siguió el procedimiento reportado por Muñoz *et al.*, 2007 (3) con algunas modificaciones. Se partió de 20 g de frutos de uchuva previamente lavados con abundante agua y jabón, que fueron homogeneizados con 40 mL de buffer fosfato 0,1 M, pH 6,5 suplementado con Triton® X-100 (1,5%). El jugo obtenido se filtró sobre gasa y posteriormente se centrifugó a 1250 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se sonicó a 40 kHz sobre baño de hielo durante 45 minutos y se centrifugó nuevamente a 3200 x g durante 60 minutos, con el fin de precipitar los fenoles. El sobrenadante se designó como extracto inicial. A partir de éste, se concentraron las proteínas, usando acetona fría en una proporción de sobrenadante:acetona 1:2 y se separaron por centrifugación a 3200 x g durante 25 minutos a 4°C. El precipitado se suspendió en 1 mL del mismo buffer empleado en la extracción y se almacenó a -20°C hasta su utilización. Para determinar la influencia del pH, la concentración y la composición del buffer

de extracción sobre la actividad PPO de uchuva, se utilizó buffer citrato pH 4,0 y 5,0 y buffer fosfato pH 6,0, 6,5 y 7,0. Después de determinar el mejor pH para la extracción se evaluó la concentración del buffer, usando soluciones buffer 0,05 M, 0,1 M y 0,2 M. Para evaluar la composición del buffer se usó PEG, PVP, Triton® X-100, ácido ascórbico y cloruro de sodio (NaCl). Las combinaciones y concentraciones evaluadas se describen en la tabla 1. Después de determinar el pH, la concentración y composición del buffer de extracción que permitiera obtener PPO con mayor actividad, se evaluó la precipitación de proteínas empleando sulfato de amonio y acetona como agentes precipitantes. En el primer experimento se usó sulfato de amonio entre 40 y 80% de saturación, haciendo una diálisis durante 36 horas con 3 cambios de buffer para eliminar el exceso de sal. En el segundo se usaron diferentes proporciones de acetona a -20 °C (sobrenadante:acetona 1:1, 1:2 y 1:3). El extracto obtenido bajo las mejores condiciones se denominó extracto purificado.

**Tabla 1.** Efecto de la composición del buffer de extracción (0,2 M, pH 6,0) sobre la actividad PPO, usando catecol 20 mM como sustrato.

Sistema	Agentes adicionados	Actividad enzimática (UPPO)
1	PEG (1%)	86 ± 10
2	PEG (5%)	146 ± 23
3	PVP (0,5%)	85 ± 23
4	PVP (1,5%)	174 ± 23
5	Triton® X-100 (1,5%)	199 ± 33
6	PEG (5%) + ácido ascórbico 10 mM	126 ± 20
7	PVP (0,5%) y ácido ascórbico 10 mM	60 ± 16
8	Triton® X-100 (1,5%) + PEG (1%)	313 ± 60
9	Triton® X-100 (1,5%) + PEG (1%) + NaCl (0,1%)	203 ± 33
10	Triton® X-100 (1,5%) + PVP (0,5%)	369 ± 28
11	Triton® X-100 (1,5%) + PVP (0,5%) + ácido ascórbico (10 mM)	131 ± 26

### Evaluación de la actividad enzimática

La actividad PPO se determinó por la medida de la velocidad inicial de la formación de *orto*-quinona a 25°C, indicada por un incremento en la absorbancia a 400 nm, usando catecol 20 mM y 4MTC 20 mM como sustratos. Un incremento en la absorbancia de 0,001 por minuto por mL de extracto se tomó como una unidad de actividad PPO (UPPO) (8). El incremento en la absorbancia fue lineal durante el primer minuto y se midió en una cubeta que con-

tenía 960 µL de sustrato (catecol o 4MTC), disuelto en buffer fosfato 0,2 M, pH 6,0 y 40 µL de extracto enzimático. Como control se utilizó una mezcla de 960 µL de sustrato y 40 µL de buffer fosfato. Todas las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Varian CaryBio® 50.

### Determinación del contenido proteico

El contenido de proteínas se determinó siguiendo el método de Bradford, 1976 (22), usando gammaglobulina (OVA) como estándar.

### Aislamiento por SBA

Una vez estandarizadas las condiciones de extracción de PPO de uchuva, se partió de 150 g de fruta y se obtuvo cantidad suficiente de extracto enzimático que fue usado en este paso de purificación preliminar. Se siguió la metodología reportada por Bhalchandra *et al.*, 2006 (23), con algunas modificaciones. El sistema bifásico se formó por PEG y fosfato de potasio. Se prepararon 2 g de cada sistema a pH 6,0. Los constituyentes fueron mezclados y equilibrados durante 30 minutos a 8°C. La separación de las fases se hizo por centrifugación durante 15 minutos a 3200 x g a 8°C. Se evaluó el efecto de peso molecular (PM) del PEG, empleando PEG 600, PEG 4000 y PEG 8000. Con el fin de determinar la partición de la PPO en una u otra fase se evaluó la actividad enzimática en ambas fases. La concentración de PEG y de fosfato para cada una de las fases fue seleccionada con base en particiones ya reportadas (23, 24). La composición de cada sistema se puede observar en la tabla 2. Los parámetros de purificación, el coeficiente de partición de la enzima y de la proteína,  $K_a$  y  $K_p$ , el factor de purificación ( $FP$ ), el porcentaje de recuperación de la actividad en la fase que contiene la enzima ( $\%R_F$ ) y el porcentaje de recuperación de la actividad total ( $\%R_a$ ) se obtuvieron a partir de las siguientes ecuaciones:

$$K_a = \frac{A_s}{A_i} \quad \text{Ecuación 1.}$$

$$K_p = \frac{p_s}{p_i} \quad \text{Ecuación 2.}$$

donde  $A_s$  y  $A_i$  son actividad enzimática, en UPPO, en la fase superior e inferior respectivamente, y  $p_s$  y  $p_i$  son concentración de proteínas en  $\mu\text{g/mL}$  de OVA en la fase superior e inferior, respectivamente.

$$FP = \frac{A_F/P_F}{A_E/P_E} \quad \text{Ecuación 3.}$$

donde  $A_F$  y  $A_E$  representan la actividad enzimática en UPPO de la fase que contiene la enzima y del extracto purificado respectivamente, y  $P_F$  y  $P_E$  representan la concentración de proteínas en  $\mu\text{g/mL}$  de OVA de la fase que contiene la enzima y del extracto purificado, respectivamente.

$$\%R_F = \frac{100}{1 + \left[ K_a \left( \frac{V_F}{V_A} \right) \right]} \quad \text{Ecuación 4.}$$

$$\%R_a = \frac{A_F}{A_E} \quad \text{Ecuación 5.}$$

donde  $V_F$  y  $V_A$  son los volúmenes de la fase que contiene la enzima y la fase que no la contiene respectivamente.

**Tabla 2.** Efecto del método de concentración proteica sobre el factor de purificación y el porcentaje de rendimiento. La actividad se midió empleando 4MTC 20 mM como sustrato.

Concentración proteica	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Sobrenadante:acetona (1:1)	29,4 ± 0,4	69,1 ± 1,0
Sobrenadante:acetona (1:2)	13,7 ± 2,2	47,4 ± 7,5
Sobrenadante:acetona (1:3)	9,5 ± 4,4	33,5 ± 15,6
Sulfato de amonio (40% sat)	0,4 ± 0,1	4,2 ± 1,3
Sulfato de amonio (80% sat)	14,3 ± 3,1	8,1 ± 1,7

### Efecto del pH del SBA

El pH del sistema se varió entre 4,5 y 6,5. Se usó buffer citrato para pH 4,5 a 5,5 y buffer fosfato para pH 6,0 a 6,5.

### Análisis estadístico

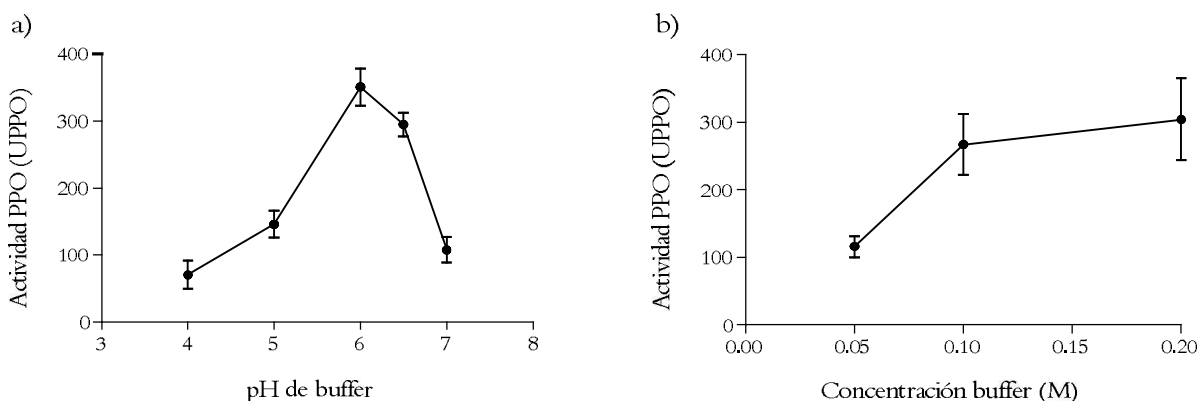
Los resultados muestran el promedio de dos evaluaciones y cada evaluación se hizo por duplicado, dichos resultados se analizaron con ANOVA, utilizando el test de Turkey como método de comparaciones múltiples, con un nivel de confianza del 95% ( $\alpha = 0,05$ ). El análisis de varianza se efectuó con el paquete estadístico GraphPad Prisma® 5.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación de condiciones de extracción

#### pH y concentración del buffer de extracción

Los gráficos de la figura 1 muestran la actividad PPO de los extractos enzimáticos de PPO de uchuva obtenidos empleando buffer de extracción con diferente pH y concentración.



**Figura 1.** Efecto del pH y de la concentración del buffer de extracción sobre la actividad PPO de uchuva. Se usó Triton® X-100 y acetona en el proceso de extracción y catecol 20 mM como sustrato. 1a) Efecto de pH. Para pH 4,0 y 5,0 se usó buffer citrato 0,1 M y para pH 6,0 a 7,0 se usó buffer fosfato 0,1 M. 1b) Efecto de concentración de buffer. Se usó buffer fosfato pH 6,0 en el proceso de extracción.

En los procesos de extracción de PPO de frutas y vegetales se han empleado diversas soluciones buffer con un amplio rango de pH, con lo cual se ve la necesidad de determinar el pH del buffer que garantice la mayor actividad de la PPO de uchuva. El análisis de varianza (ANOVA) de la medición de la actividad PPO de uchuva extraída bajo diferentes pH muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos ( $p < 0,0001$ ). Como se observa en la figura 1a, se presenta una mayor actividad PPO a pH 6,0, mientras que una unidad por encima y por debajo de este pH disminuye aproximadamente al 40% la actividad enzimática. Este hecho puede atribuirse a que a un pH 6,0, la carga neta de los aminoácidos del sitio activo y de la enzima, puede favorecer las interacciones con el sustrato. Estudios realizados en PPO de diversas fuentes muestran que las propiedades de la enzima y las condiciones de extracción difieren según la especie vegetal. Diferente a la PPO de uchuva, la PPO de férula requiere un pH de 5,2 para su extracción (8) mientras que la PPO de vainilla requiere un pH de 8,0 (9).

Al igual que el pH, las propiedades de las proteínas están influenciadas también por la fuerza iónica, que es una función de la concentración de sales en el buffer. El análisis de varianza (ANOVA) muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre la actividad PPO de la enzima extraída con buffer fosfato a diferentes concentraciones ( $p < 0,05$ ). En la figura 1b) se observa que, a medida que aumenta la concentración del buffer

de extracción, aumenta la actividad enzimática. El empleo de buffer fosfato 0,2 M incrementa 2,6 veces la actividad PPO con respecto a la obtenida con el mismo buffer a una concentración de 0,05 M. Este hecho puede ser atribuido a diferentes causas; la PPO es una enzima que es afectada por la concentración de iones fosfato, por lo tanto, la fuerza iónica del medio puede alterar su actividad; por otro lado, una concentración baja del buffer (0,05 M) puede no ejercer la capacidad amortiguadora requerida.

#### *Composición del buffer de extracción*

En los procesos de extracción de PPO de diferentes fuentes vegetales se ha empleado buffer de extracción con variada composición. Así, se reporta el empleo de diversos suplementos, entre ellos PVP, Triton® (25), PEG o sus combinaciones, sales como NaCl (7) y antioxidantes como el ácido ascórbico (26). A partir de procedimientos de extracción reportados, se seleccionaron las concentraciones y las combinaciones de las sustancias adicionadas en el proceso de extracción de la PPO de uchuva. En la tabla 1 se indica la composición y la actividad enzimática encontrada con cada buffer, con su respectiva desviación estándar.

Es posible que durante la extracción de PPO ocurran reacciones de pardeamiento que causen una inactivación parcial de la enzima. Pero estas reacciones se pueden prevenir mediante la utilización de agentes adsorbentes de fenoles como PEG y PVP (27). Así, los resultados obtenidos muestran que una mayor concentración de PEG o PVP permite una

mayor actividad enzimática. La combinación del detergente Triton® X-100 con un agente reductor de fenoles (PEG o PVP) incrementa significativamente la actividad enzimática, en contraste con los sistemas en que estas sustancias se usan individualmente, como se puede notar al comparar los sistemas 1 y 3 con 8 y 10 respectivamente, donde se produce un incremento de 3,6 y 4,3 veces, respectivamente, en la actividad enzimática al adicionar Triton® X-100. Otros autores han informado sobre un incremento en la actividad enzimática por el tratamiento con el detergente Triton® X-100 (28, 29).

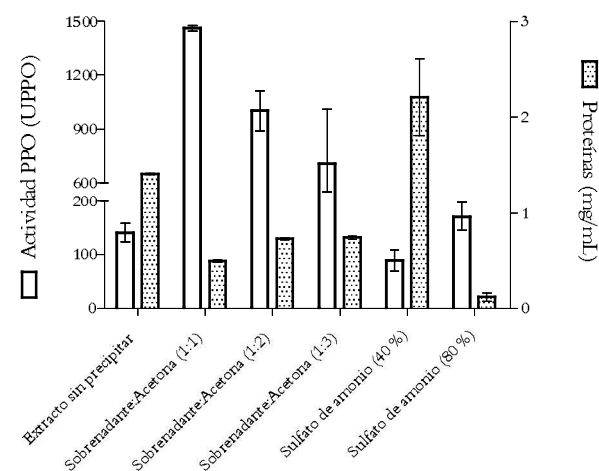
La adición de NaCl produjo una disminución significativa en la actividad PPO, como se muestra en los sistemas 8 y 9. El NaCl puede producir un incremento en la fuerza iónica que modifica la carga neta de la enzima y por tanto la reactividad de sus grupos catalíticos. Además, un aumento en la fuerza iónica puede provocar una deshidratación de los grupos iónicos superficiales de la enzima, ocasionando un rompimiento en los puentes de hidrógeno y/o en las interacciones electrostáticas y, por lo tanto, una agregación de la proteína ocasionando su desnaturalización. La adición de ácido ascórbico en el buffer, para prevenir la oxidación durante la extracción, disminuye también la actividad enzimática. Esto se nota al comparar los sistemas 2, 3 y 10 con los sistemas 6, 7 y 11, respectivamente, donde se ve una disminución del 14, 29 y 65% en la actividad enzimática de los sistemas que contienen ácido ascórbico. Este hecho puede atribuirse a una inhibición de la enzima por este compuesto durante el aislamiento, ya que el ácido ascórbico, además de reducir las quinonas formadas durante la oxidación, puede quelar el cobre del sitio activo de la enzima (30) o reducir el  $\text{Cu}^{2+}$  del sitio catalítico a  $\text{Cu}^+$  (31).

### Concentración de proteínas

En la figura 2 se muestra el efecto de la acetona y del sulfato de amonio sobre la actividad enzimática y la concentración de proteínas. Se observa que la concentración con acetona aumenta significativamente la actividad enzimática con respecto al extracto inicial (sin precipitar), mientras que la concentración con sulfato de amonio no muestra incrementos significativos en esta actividad.

La actividad PPO de uchuva se incrementa 10, 4, 7,1 y 5,0 veces al concentrar la proteína con proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 de sobrenadante:acetona respectivamente, mientras que la actividad se incrementa sólo en 1,2 veces al concentrar con sulfato de

amonio. Además se muestra que, a medida que se incrementa la proporción de acetona se incrementa la concentración proteica y se disminuye la actividad PPO. Este hecho se observa en la tabla 2, donde el factor de purificación es mayor para la concentración con acetona. Así, un mayor volumen de acetona hace al método de concentración menos selectivo para la PPO de uchuva. De igual manera se observa que la concentración con sulfato de amonio no es selectiva para esta enzima. Al igual que el factor de purificación, el rendimiento de esta enzima es significativamente mayor al usar acetona, en comparación con el rendimiento obtenido al emplear sulfato de amonio. En la concentración con acetona se observa que los incrementos en la proporción de acetona disminuyen ampliamente el factor de purificación y el rendimiento de esta enzima.



**Figura 2.** Actividad enzimática y concentración proteica de extractos enzimáticos empleando fraccionamiento *salting out* con sulfato de amonio y precipitación por solventes orgánicos empleando acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La actividad se midió empleando 4MTC 20 mM como sustrato.

### Purificación por SBA

#### Efecto de la composición de las fases

Como se observa en la tabla 3, la composición de las fases afecta significativamente el coeficiente de partición de la enzima,  $K_a$  y el factor de purificación, FP. La PPO de uchuva se localiza en la fase superior rica en PEG, de manera similar a lo reportado para PPO de batata (23). Los mejores resultados, en términos de altos valores de  $K_a$ , FP y % de recuperación, se obtuvieron en los sistemas

1 y 5, que contienen la menor concentración de PEG. Los incrementos en la concentración de PEG disminuyen significativamente el coeficiente  $K_a$  y el factor de purificación. Como la partición de las biomoléculas en estos sistemas depende de un efecto de exclusión por volumen en la fase rica en

polímero y de un efecto *salting out* en la fase rica en sal (24), la disminución en el coeficiente  $K_a$  y en el factor de purificación de PPO de uchuva con incrementos sucesivos de PEG permite establecer que en la partición de esta enzima predomina el efecto de exclusión por volumen sobre el efecto *salting out*.

**Tabla 3.** Efecto del peso molecular de PEG y la concentración de PEG y fosfato sobre la partición de PPO de uchuva, usando 4MTC como sustrato y manteniendo el sistema a un pH de 6,0.

No.	PM PEG	PEG (% p/p)	Fosfato (% p/p)	$K_a$	$K_p$	FP	% $R_s$	% $R_a$
1	4000	5	14	4,3 ± 0,3	2,1 ± 0,0	4,2 ± 0,5	61,4 ± 0,3	55,0 ± 2,6
2	4000	8	21	3,6 ± 0,8	1,4 ± 0,1	3,0 ± 0,5	65,9 ± 7,5	41,4 ± 2,4
3	4000	12	12	2,0 ± 0,3	1,9 ± 0,1	2,4 ± 0,2	69,1 ± 3,5	42,6 ± 2,7
4	4000	18	12	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,2	72,6 ± 2,5	37,3 ± 1,6
5	8000	5	14	4,7 ± 0,5	1,6 ± 0,1	4,7 ± 0,5	74,3 ± 4,6	50,0 ± 1,7
6	8000	8	21	3,8 ± 0,4	1,3 ± 0,0	3,2 ± 0,8	70,5 ± 1,4	44,1 ± 2,3
7	8000	12	12	2,3 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,3 ± 0,3	71,9 ± 1,8	39,8 ± 2,0
8	8000	18	12	1,7 ± 0,1	1,3 ± 0,0	1,5 ± 0,1	72,0 ± 1,9	28,5 ± 2,7

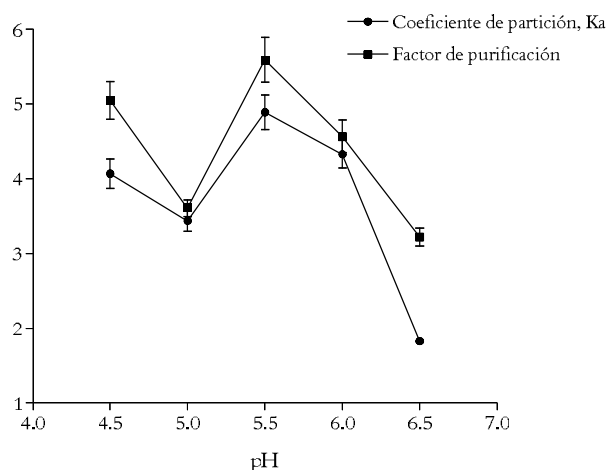
#### Efecto del peso molecular del PEG

En este estudio se determinó el efecto del peso molecular del PEG 600, PEG 4000 y PEG 8000. Sin embargo, con PEG 600 no hubo formación de dos fases y, por tanto, no se muestran resultados al respecto. Como se observa en la tabla 3, el peso molecular de los PEG evaluados, 4000 y 8000, no tuvo un efecto significativo sobre la partición de la PPO de uchuva. Se ha reportado que el peso molecular del PEG contribuye significativamente al comportamiento en la partición de proteínas que tienen un peso molecular mayor a 50 kDa (32, 33). Sin embargo, estudios electroforéticos por SDS-PAGE han mostrado que la PPO de uchuva tiene un peso molecular de  $\approx 30$  kDa (34). Este hecho podría explicar el poco efecto del peso molecular del PEG sobre la partición de PPO de uchuva, contrario a lo observado en la partición de PPO de batata que registra un peso molecular de  $\approx 60 - 69$  kDa (23) y donde los valores  $K_a$  y FP varían substancialmente al usar PEG 4000 y PEG 8000.

#### Efecto del pH sobre la partición de PPO

El efecto del pH fue evaluado empleando el sistema 5. Se hizo variación en el pH del sistema entre 4,5 y 6,5. Como se observa en la figura 3, el pH ejerció un efecto significativo sobre el  $K_a$  y el FP, observándose que un pH de 5,5 es adecuado para el aislamiento de PPO de uchuva. Una unidad por encima de este pH (6,5) disminuye de 4,89 a 1,83 el  $K_a$  y de 5,59 a 3,22 el FP.

Se observa también que no hay un comportamiento regular en la partición de la PPO de uchuva, puesto que se presentan dos pH con buenos reportes de  $K_a$  y FP (pH 4,5 y 5,5). Finalmente, en la tabla 4 aparece un resumen de las características de la purificación obtenidas durante la estandarización de las condiciones de extracción y la purificación por sistemas bifásicos partiendo del extracto inicial (sin precipitar). Puede verse cómo la metodología propuesta en este trabajo es una buena alternativa en la purificación de PPO porque logra altos niveles de purificación. Sin embargo, es necesario continuar el estudio para proponer una alternativa con mayores rendimientos en la purificación.



**Figura 3.** Efecto del pH del sistema sobre el aislamiento de PPO de uchuva, empleando un sistema bifásico acuoso formado por 5% de PEG 8000 y 14% de fosfato. La actividad enzimática se midió usando 4MTC 20 mM como sustrato.

**Tabla 4.** Parámetros de purificación de PPO de uchuva después de estandarizar las condiciones de extracción y posterior purificación por SBA. La actividad enzimática se determinó usando 4-MTC 20 mM como sustrato.

Fracción	Volumen (mL)	Concentración de proteínas (mg/mL)	Actividad (UPPO)	Actividad específica (UPPO/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto inicial	15	1,40	141,0 ± 25	100,4 ± 17	1,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
Acetona (1:1)	1	0,39	1260,8 ± 21	3224,6 ± 53	32,1 ± 0,5	59,6 ± 1,0
SBA	0,55	0,03	532,6 ± 18	17016,0 ± 566	169,4 ± 5,6	13,9 ± 0,5

## CONCLUSIONES

Este trabajo muestra cómo modificaciones en las condiciones de extracción, como pH, concentración, composición del buffer de extracción y precipitación proteica, afectan significativamente la actividad catalítica de la PPO. El empleo de buffer fosfato 0,2 M, pH 6,0 conteniendo 0,5% (v/v) de Triton® X-100 y 1,5% (p/v) de PVP durante la extracción y la concentración proteica con acetona, en una proporción de sobrenadante:acetona 1:1 permite la obtención de PPO de uchuva con mayor actividad. Además, se propone una metodología sencilla y rápida para el aislamiento de PPO de uchuva, por medio de un sistema acuoso de dos fases formado por 5% de PEG 8000 y 14% de fosfato, lo que permite obtener un alto factor de purificación y buen rendimiento. Se propone la partición por sistemas acuosos de dos fases como técnica de purificación primaria para reducir el volumen de interferencias durante la extracción y purificación de PPO.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al proyecto E01467 Sostenibilidad 2009-2010 por el apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mayer AM. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*. 2006 Nov; 67 (21): 2318-2331.
- Prota G. Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med Res Rev*. 1988 Oct-Dec; 8 (4): 525-556.
- Muñoz K, Bravo K, Zapata P, Londoño J. Caracterización preliminar de la enzima polifenol oxidasa en frutas tropicales: Implicaciones en su proceso de industrialización. *Scientia et Technica*. 2007 May; 33 (8): 161-164.
- Zavala D, Quispe M, Pelayo A, Posso M, Rojas, Wolach V. Efecto citotóxico de *Physalis peruviana* (capuli) en cáncer de colon y leucemia mieloide crónica. *An Fac Med*. 2006 Oct-Dec; 67 (4): 283-289.
- Rodríguez S, Rodríguez E. Efecto de la ingesta de *Physalis peruviana* (aguaymanto) sobre la glicemia postprandial en adultos jóvenes. *Rev Med Vallejana*. 2007; 4 (1): 43-53.
- Florez V, Fischer G, Sora A. Producción, poscosecha y exportación de la uchuva. Santa Fe de Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2000. p. 131-143.



7. Aydemir T. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. Food Chem. 2004 Aug; 87 (1): 59-67.
8. Erat M, Sakiroglu H, Kufrevioglu I. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. Food Chem. 2005 Apr; 95 (3): 503-508.
9. Krzysztof W, Márquez O, Pardo V. Quantification and characterization of polyphenol oxidase from vanilla bean. Food Chem. 2009 Nov 15; 117 (2): 196-203.
10. Unal M. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). Food Chem. 2007 Feb; 100 (3): 909-913.
11. Zhao G, Xiao H, Xing X. Purification and characterization of polyphenol oxidase from red Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cida*) leaves. Food Chem. 2009 Nov 15; 117 (2): 342-348.
12. Marri C, Frazzoli A, Hochkoeppler F, Poggi V. Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. Phytochemistry. 2003 Aug; 63 (7): 745-752.
13. Partington J, Bolwell G. Purification of polyphenol oxidase free of the storage protein patatin from potato tuber. Phytochemistry. 1996 Aug; 42 (6): 1499-1502.
14. Albertsson PA. Partition of cell particles and macromolecules. 3<sup>rd</sup> ed. New York: United States: John Wiley and Sons; 1986.
15. Neidleman S, Laskin A. Advances in applied microbiology. Volume 41. San Diego, California: Academic Press; 1995. p. 97-171.
16. Gaikawari R, Shendye A, Kulkarni M. Two-phase separation of xylanases from alcalophilic thermophilic *Bacillus* using a polyethyleneglycol-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> system. Biotechnol Appl Bioc. 1996 Jun 28; 23 (3): 237-241.
17. Andersson E, Johansson A, Hagerdal GB. Amylase production in aqueous two-phase system with *Bacillus subtilis*. Enzyme Microb Tech. 1985 Jul; 7 (7): 333-338.
18. Tanuja S, Srinivas ND, Raghavarao KS, Gowthaman MK. Aqueous two phase extraction for downstream processing of amyloglucosidase. Process Biochem. 1997 Nov; 32 (8): 635-641.
19. Li M, Zhu ZQ, Mei LH. Partitioning of amino acids by aqueous two-phase systems combined with temperature induced phase formation. Biotechnol Progress. 1997 Jan-Feb; 13 (1): 105-108.
20. Safarik I, Safarikova M, Forsythe SJ. The application of magnetic separations in applied microbiology. J Appl Bacteriol. 1995 Jun; 78 (6): 575-585.
21. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Norma Técnica Colombiana NTC 4580. Frutas Frescas. Uchuva. Especificaciones. Bogotá: ICONTEC; 1999. p. 1-15.
22. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May 7; 72 (1-2): 248-254.
23. Bhalchandra V, Hitesh S, Kasture S, Nene S. Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two-phase system. Biochem Eng J. 2006 Feb 15; 28 (2): 161-166.
24. Ravindra B, Rastogi NK, Raghavarao KS. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. Chem Eng Process. 2008 Jan; 47 (1): 83-89.
25. Rocha A, Morais A. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from Jonagored apple. Food Control. 2001 Mar; 12 (2): 85-90.
26. Dogan S, Turan P, Erturk H, Arslan O. Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). J Agr Food Chem. 2005 Feb 9; 53 (3): 776-785.
27. Mayer A, Harel E. Polyphenol oxidases in plants. Phytochemistry. 1979 Feb; 18 (2): 193-215.
28. Cano MP, Lobo MG, Ancos B, Galeazzi M. Polyphenol oxidase from Spanish hermaphrodite and female papaya fruits (*Carica papaya*). J Agr Food Chem. 1996 Oct 17; 44 (10): 3075-3079.
29. Zhou H, Feng V. Polyphenol oxidase from Yali pears (*Pyrus bretschneideri*). J Sci Food Agr. 1991 Nov; 57 (3): 307-313.
30. Zawitowski J, Bilideris C, Eskin N. Polyphenol Oxidase. In D. S. Robinson & N. A. M. Eskin (Eds.), Oxidative enzymes in foods. New York, United States: Elsevier; 1991. p. 217-273.
31. Hsu A, Shieh J, Bills D, White K. Inhibition of mushroom polyphenoloxidase by ascorbic acid derivatives. J Food Sci. 1988 May; 53 (3): 765-767.
32. Franco T, Andrews AT, Asenjo JA. Use of chemically modified proteins to study the effect of a single protein property on partitioning in aqueous two-phase systems: effect of surface hydrophobicity. Biotechnol Bioeng. 1996 Feb 5; 49 (3): 300-308.
33. Harris M. Poly (ethylene glycol) chemistry: biothechnical and biomedical application. New York, United States: Plenum Press; 1992. Tjerneld F. PEG modified protein hybrid catalyst; p. 85-102
34. Muñoz K. Estudio de las propiedades nutraceuticas y de la enzima polifenol oxidasa (PPO) de dos ecotipos comerciales de uchuva (*Physalis peruviana* L.), en diferentes estadios de maduración [Tesis de Maestría]. [Medellín, Colombia]: Universidad de Antioquia; 2011.

**GRUPO DE EXTENSIÓN SOLIDARIA E INVESTIGACIÓN EN SEGURIDAD ALIMENTARIA PARA LA REGIÓN VICERRECTORÍA DE EXTENSIÓN**

**Facultad de Química Farmacéutica**

Departamento de Alimentos  
Universidad de Antioquia



**NUESTROS SERVICIOS**

- Asesoría técnica en procesos de alimentos a microempresas y vendedores ambulantes.
- Propuesta educativa para el fomento de hábitos de alimentación saludable en estudiantes de básica primaria y bachillerato (Media Técnica).
- Asesorías para comedores comunitarios y restaurantes escolares con énfasis en transformación de alimentos, apun-

tando a mejorar el consumo y la calidad de los nutrientes carenciales que padece nuestra población.

- Formulación y ejecución de proyectos comunitarios enfocados a la explotación de recursos agrícolas de la región.
- Capacitación en transformación de alimentos tales como: Yogur, Kumis, Queso Crema, Mermeladas, Compotas, Pulpas, entre otros.
- Asesoría empresarial en las buenas prácticas de manufactura.

**COORDINADORA: Diana María Granda Restrepo**  
dgranda@farmacia.udea.edu.co / Teléfono: 219-54-74