



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR-A

“IMPLICACIÓN DE TIROSINASA EN LA RUTA BIOSINTÉTICA DE BETALAÍNAS”

Memoria presentada para aspirar al grado de
Doctor por la Universidad de Murcia

Fernando Gandía Herrero

2005

La presente Tesis Doctoral fue depositada y defendida en la Universidad de Murcia bajo la modalidad de compendio de publicaciones. Los capítulos con resultados experimentales se incluyeron de manera íntegra en forma de artículos publicados en revistas internacionales.

En esta versión electrónica de la Tesis, y **para respetar los derechos cedidos a las editoriales de las revistas científicas**, los artículos son citados mediante su referencia bibliográfica y doi (digital object identifier). Así mismo se incluyen los vínculos directos a los artículos en la base de datos PubMed (National Center for Biotechnology Information, NCBI), a partir de los cuales se puede acceder al contenido publicado.



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR-A

Los trabajos de investigación recogidos en la presente Memoria han sido financiados por los siguientes proyectos:

- "*Caracterización de variedades hortofrutícolas cultivadas en la Región de Murcia. Aspectos organolépticos y componentes relacionados con la salud*" (Proyecto AGR/11/FS/02), financiado por la Fundación Séneca, Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia) y FEDER.
- "*Implicación de polifenol oxidasa en el metabolismo secundario de pigmentos vegetales*" (Proyecto AGL 2003-05647), financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y FEDER.

El firmante de esta Memoria ha disfrutado de una “Beca de Formación de Personal Investigador” de la Fundación Séneca (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia). Así mismo, durante la estancia en el Instituto de Química Inorgánica y Analítica de la Universidad de Münster (Alemania) disfrutó de una “Ayuda para Estancias Cortas”, también de la Fundación Séneca.

Murcia, 4 de Julio de 2005

Fdo. Fernando Gandía Herrero

Abreviaturas

4MC	4-metilcatecol
4MN	4-metoxi-1-naftol
4tBC	4-tert-butilcatecol
AA	ácido ascórbico
Bis-Tris	2,2-bis-(hidroximetil)-2,2',2''-nitrilotrietanol
CDG	<i>ciclo</i> -DOPA-glucósido
CMC	concentración micelar crítica
DAA	ácido dehidroascórbico
DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ESI	ionización por electropulverización
FPLC	cromatografía líquida de flujo rápido
<i>g</i>	aceleración de la gravedad
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
IEF	isoelectroenfoque
kDa	kilodalton
K_m	constante de Michaelis
kV	kilovoltio
LDL	lipoproteínas de baja densidad
<i>m/z</i>	relación carga masa
MBTH	3-metil-2-benzotiazolina hidrazona
MetSO	sulfóxido de metionina
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MS	espectrometría de masas
NADP⁺	fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida

PDA	fotodiodos en serie
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonio
PPO	polifenol oxidasa
PVDF	fluoruro de polivinilideno
SDS	dodecil sulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamina
TFA	ácido trifluoroacético
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
UDP	uridina 5'-difosfato
V	voltio
V_m	velocidad máxima en estado estacionario

Índice General

Capítulo I. Introducción	1
1. Características Generales de las Betalaínas	3
1.1. Estructura	3
1.1.1. <i>Isómeros Estructurales</i>	4
1.2. Distribución de Betalaínas	5
1.2.1. <i>Localización Celular</i>	6
1.3. Actividad Biológica	7
1.4. Color	8
1.4.1. <i>Importancia del Color en Plantas</i>	8
1.4.2. <i>Estabilidad y Aplicación Industrial de las Betalaínas</i>	9
2. Obtención y Análisis de Betalaínas	10
2.1. Extracción	10
2.2. Análisis	11
2.3. Síntesis	12
3. Ruta Biosintética de Betalaínas	13
3.1. Tirosinasa	16
3.2. DOPA dioxigenasa	16
3.3. Glucosiltransferasas	17
4. Betacianinas Derivadas de Dopamina	18
5. Aspectos Generales de Tirosinasa	20
5.1. Melaninas	20
5.2. Pardeamiento Enzimático	21
6. Tirosinasa de Hongos y Plantas	22
6.1. Distribución y Localización	22
6.2. Función Fisiológica	23
6.2.1. <i>Transportador Electrónico</i>	24
6.2.2. <i>Defensa</i>	25
6.2.3. <i>Biosíntesis de Metabolitos Secundarios</i>	26

7. Estados Funcionales de Tirosinasa y Mecanismo de Reacción	26
7.1. Mecanismo de Reacción	28
7.1.1. Actividad Difenolasa	28
7.1.2. Actividad Monofenolasa	29
8. Propiedades Moleculares de Tirosinasa	31
8.1. Estructura primaria	31
8.2. Multiplicidad	31
8.3. Estructura Cristalina	33
9. Latencia y Activación de Tirosinasa	35
9.1. Activación por detergentes	36
9.2. Activación por proteasas	37
Capítulo II. Objetivos	39
Capítulo III. Materiales y Métodos	43
1. Material vegetal	45
2. Reactivos	45
3. Extracción y Purificación de Tirosinasa de Raíz de Remolacha	46
3.1. Fraccionamiento Subcelular	46
3.2. Purificación Cromatográfica	47
3.2.1. Enzima Soluble	48
3.2.2. Enzima Ligada a Membranas	49
4. Determinación de Proteínas	49
5. Técnicas Electroforéticas	50
5.1. Electroforesis Desnaturalizante	50
5.2. Electroforesis Parcialmente Desnaturalizante	50
5.3. Isoelectroenfoque	51

6. Tinción de Geles	51
6.1. <i>Tinción de Proteínas por Azul de Coomassie</i>	51
6.2. <i>Tinción de Proteínas por Plata</i>	51
6.3. <i>Tinción de Actividad</i>	52
7. Western Blot	52
8. Ensayos Espectrofotométricos	53
8.1. <i>Ensayos Enzimáticos sobre Fenoles Sencillos</i>	54
8.2. <i>Ensayos Enzimáticos sobre Betalaínas</i>	55
8.3. <i>Cuantificación de Betalaínas</i>	55
9. Extracción de Pigmentos	56
9.1. <i>Betanina de Raíz de Remolacha Roja</i>	56
9.2. <i>Pigmentos de Flores</i>	56
10. Semisíntesis de Betaxantinas	57
11. Purificación de Betalaínas	57
11.1. <i>Cromatografía en Gel G-25</i>	57
11.2. <i>Cromatografía en Q-Sefarosa</i>	58
11.3. <i>Extracción en Fase Sólida con Cartuchos C-18</i>	59
12. Espectrometría de Fluorescencia	59
13. Análisis por Cromatografía de Alto Rendimiento (HPLC)	60
13.1. <i>Detector de Absorbancia (PDA)</i>	60
13.2. <i>Detector de Fluorescencia</i>	60
13.3. <i>Detector de Espectrometría de Masas</i>	61
14. Técnicas de Imagen	61
14.1. <i>Fotografía de Fluorescencia</i>	61
14.2. <i>Microscopía Convencional</i>	62
14.3. <i>Microscopía Confocal</i>	62

Capítulo IV. “Purification and Characterization of a Latent Polyphenol Oxidase from Beet Root (<i>Beta vulgaris</i> L.)”	63
Capítulo V. “Evidence for a Common Regulation in the Activation of a Polyphenol Oxidase by Trypsin and Sodium Dodecyl Sulfate”	73
Capítulo VI. “Differential Activation of a Latent Polyphenol Oxidase Mediated by Sodium Dodecyl Sulfate”	83
Capítulo VII. “Development of a Protocol for Preparative Synthesis and Purification of Betaxanthins”	91
Capítulo VIII. “Fluorescent Pigments. New Perspectives in Betalain Research and Applications”	101
Capítulo IX. “A Novel Method Using High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection for the Determination of Betaxanthins”	109
Capítulo X. “Betaxanthins as Pigments Responsible for Visible Fluorescence in Flowers”	119
Capítulo XI. “Floral Fluorescence Effect”	129
Capítulo XII. “Betaxanthins as Substrates for Tyrosinase. An Approach to the Role of tyrosinase in the Biosynthetic Pathway of Betalains”	137
Capítulo XIII. “Characterization of the Activity of Tyrosinase on Betaxanthins Derived from R-Amino Acids”	151
Capítulo XIV. “Characterization of the Monophenolase Activity of Tyrosinase on Betaxanthins. The Tyramine-betaxanthin/Dopamine-betaxanthin Pair”	161
Capítulo XV. “Characterization of the Activity of Tyrosinase on the Structural Unit of Betacyanins”	175
Capítulo XVI. Discusión General	187

1. Caracterización de Tirosinasa de Raíz de Remolacha y su Activación	189
1.1. <i>Extracción y Purificación</i>	189
1.2. <i>Latencia y Caracterización Cinética</i>	191
2. Caracterización de la Fluorescencia de Betaxantinas.	193
2.1. <i>Síntesis y Purificación de Betaxantinas</i>	193
2.2. <i>Fluorescencia de Betaxantinas</i>	194
2.2.1. <i>Aplicación de la Fluorescencia al Análisis de Betaxantinas por HPLC</i>	196
2.2.2. <i>Implicación de la Fluorescencia de Betaxantinas en el Color de las Flores</i>	197
2.3. <i>Filtro Interno en Betalaínas</i>	198
3. Betalaínas como Substratos de Tirosinasa.	200
3.1. <i>Actividad Difenolasa sobre Betaxantinas</i>	200
3.1.1. <i>Actividad sobre Formas R de Betaxantinas</i>	203
3.2. <i>Actividad Monofenolasa sobre Betaxantinas</i>	204
3.3. <i>Actividad sobre la Unidad Estructural de las Betacianinas</i>	205
3.4. <i>Un Nuevo Esquema Biosintético</i>	207
3.4.1. <i>Formación de 2-Descarboxi-betacianinas y (R)-Betacianinas</i>	210
Capítulo XVII. Conclusiones	213
Capítulo XVIII. Resumen en Inglés (English Version)	217
1. Introduction	219
1.1. <i>General Properties of Betalains</i>	219
1.1.1. <i>Structure</i>	219
1.1.2. <i>Distribution</i>	220
1.1.3. <i>Activity</i>	222
1.1.4. <i>Colour</i>	223

1.2. Betalains Biosynthetic Pathway	224
1.2.1. Tyrosinase	226
1.2.2. DOPA-dioxygenase	226
1.2.3. Glucosyltransferases	227
1.2.4. Dopamine-derived Betacyanins	227
1.3. Tyrosinase General Aspects	228
1.3.1. Melanins	229
1.3.2. Enzymatic Browning	229
1.3.3. Fungi and Plant Tyrosinase	230
1.3.4. Physiological Role in Plants	230
1.4. Tyrosinase Mechanism of Action	232
1.4.1. Diphenolase Activity	232
1.4.2. Monophenolase Activity	232
1.5. Molecular Properties of Tyrosinase	234
1.5.1. Crystal Structure	235
2. Materials and Methods	237
2.1. Plant Material	237
2.2. Chemicals	237
2.3. Beet Root Tyrosinase Extraction and Purification	238
2.3.1. Subcellular Fractionation	238
2.3.2. Chromatographic Purification	239
2.4. Protein Determination	240
2.5. Electrophoretic Techniques	240
2.5.1. Denaturing SDS-PAGE	240
2.5.2. Partially Denaturing SDS-PAGE	240
2.5.3. Isoelectric Focusing	240
2.6. Gel Staining	240
2.7. Western Blotting	241
2.8. Spectrophotometric Assays	242
2.8.1. Spectrophotometric Assays on Simple Phenolics	242

2.8.2. <i>Spectrophotometric Assays on Betalains</i>	243
2.8.3. <i>Quantification of Betalains</i>	243
2.9. <i>Pigment Extraction</i>	243
2.9.1. <i>Beet Root Betanin</i>	243
2.9.2. <i>Flower Pigments</i>	244
2.10. <i>Betaxanthins Semi-synthesis</i>	244
2.11. <i>Betalain Purification</i>	245
2.11.1. <i>G-25 Chromatography</i>	245
2.11.2. <i>Q-Sepharose Chromatography</i>	245
2.11.3. <i>C-18 solid phase extraction</i>	246
2.12. <i>Fluorescence spectroscopy</i>	246
2.13. <i>HPLC analysis</i>	246
2.13.1. <i>Absorbance Detection (PDA)</i>	247
2.13.2. <i>Fluorescence Detection</i>	247
2.13.3. <i>Mass Spectrometry Detection</i>	247
2.14. <i>Image Techniques</i>	248
2.14.1. <i>Fluorescence Photography</i>	248
2.14.2. <i>Microscopy</i>	248
3. <i>Conclusions</i>	248
3.1. <i>Characterization of Beet Root Tyrosinase and its Activation</i>	248
3.2. <i>Characterization of Betaxanthins Fluorescence</i>	249
3.3. <i>Betalains as Substrates for Tyrosinase</i>	250
Capítulo XIX. <i>Bibliografía</i>	255

Índice de Figuras y Tablas

Capítulo I

Figura 1.1. Estructuras generales de las betalainas	4
Figura 1.2. Visión general de los principales pasos de la biosíntesis de betalainas recogida en la bibliografía	14
Figura 1.3. Esquema biosintético de 2-descarboxi-betacianinas	19
Figura 1.4. Reacciones catalizadas por tirosinasa	20
Figura 1.5. Ciclo catalítico de tirosinasa con indicación de la estructura del centro activo	27
Figura 1.6. Estructura de catecol oxidasa de batata (<i>Ipomoea batatas</i>)	34
Tabla 1.1. Selección de betalainas naturales caracterizadas en varias especies	5

Capítulo III

Tabla 3.1. Estructuras de los substratos de tirosinasa utilizados y características de absorción de sus productos de reacción	54
--	----

Capítulo IV

Figure 1. Effect of pH on the enzyme in the presence or absence of SDS	67
Figure 2. PPO purification from soluble and membrane fractions	68
Figure 3. Denaturing SDS-PAGE and Western blotting of samples from the purification of soluble PPO	68
Figure 4. Denaturing SDS-PAGE and Western blotting of samples from the purification of membrane PPO	69
Figure 5. Partially denaturing SDS-PAGE of the soluble fraction and the membrane fraction stained with tyramine and MBTH	69
Figure 6. IEF of the soluble fraction and the membrane fraction	69
Table 1. Summary of PPO extraction and purification from beet root	67
Table 2. Kinetic parameters for PPO from beet root	69

Capítulo V

Figure 1. Time-course of dopaminochrome formation during trypsin activation of red beet PPO	76
Figure 2. Effect of the [trypsin]/[PPO] ratio on the lag period (τ)	76
Figure 3. Effect of trypsin treatment on PPO activity in the absence and presence of SDS, for the membrane-bound and soluble enzyme	77
Figure 4. Effect of pH on the enzyme treated with trypsin	78
Figure 5. Partially denaturing SDS-PAGE and Western blotting after denaturing SDS-PAGE of the membrane and soluble PPO treated with trypsin	79
Scheme 1. Mechanism proposed for the proteolytic cleavage of beet root PPO by trypsin	76
 Table 1. Kinetic parameters for soluble and membrane-bound PPO activity	 79

Capítulo VI

Figure 1. Effect of pH on the soluble PPO in the presence or absence of SDS	87
Figure 2. Effect of pH on the membrane-bound PPO in the presence or absence of 0.69 mM SDS	87
Figure 3. Percentage of soluble PPO activation at different SDS concentrations in the presence of catechol, 4MC and 4tBC or L-tyrosine, L-dopa, tyramine and dopamine	87
Figure 4. Percentage of membrane PPO activation at different SDS concentrations in the presence of 4tBC and L-DOPA	88
 Table 1. Kinetic parameters for soluble and membrane-bound PPO activity	 89

Capítulo VII

Figure 1. Scheme for betaxanthin semi-synthesis, exemplified for dopamine-betaxanthin	94
Figure 2. Flow-chart for the synthesis and purification process of betaxanthins	97
Table 1. FPLC elution volumes and purification yields for betaxanthins	96
Table 2. HPLC elution and calibration characteristics for betaxanthins, betanin and betanidin	98

Capítulo VIII

Figure 1. General structures of betaxanthins, betalamic acid and betacyanins	104
Figure 2. Structure and fluorescence spectra for the tyramine-derived betaxanthin	105
Figure 3. HPLC chromatographic profiles obtained for yellow <i>Mirabilis jalapa</i> flower extract, measuring absorbance at 480nm or fluorescence	106
Figure 4. HPLC chromatographic profile obtained for white <i>M. jalapa</i> flower extract, using fluorescence detection	107

Capítulo IX

Figure 1. Structures of betalain pigments	112
Figure 2. Fluorescence spectra for the betaxanthin derived from alanine	114
Figure 3. HPLC profile following fluorescence for the analysis of a betaxanthin mixture	115
Figure 4. HPLC profile obtained for yellow <i>Carpobrotus acinaciformis</i> flower extract, measuring fluorescence	116
Table 1. Fluorescent properties of betaxanthins	114

Table 2. HPLC calibration parameters for betaxanthins, followed by fluorescence detection	116
--	-----

Capítulo X

Figure 1. General structures of betalain pigments	122
Figure 2. Photography filters and excitation and emission spectra for yellow <i>Portulaca grandiflora</i> extract	123
Figure 3. (a) HPLC elution profiles for the analysis of the pigment composition of yellow and white flowers of <i>Portulaca grandiflora</i> . (b) Excitation and emission spectra for synthetic dopaxanthin	123
Figure 4. White and yellow flowers of <i>P. grandiflora</i>	125
Figure 5. Fluorescent flowers of <i>L. productus</i> under white and blue light	126
Figure 6. Confocal microscope image of a yellow <i>P. grandiflora</i> petal obtained by exciting with blue light (laser, 488 nm)	127
Table 1. Fluorescence and HPLC data for pigments present in yellow <i>Portulaca grandiflora</i> flowers and indicaxanthin	124

Capítulo XI

Figure 1. Spectral comparison for dopaxanthin and betanin	131
Figure 2. Betaxanthin visible fluorescence in <i>Mirabilis jalapa</i> petals, and its absorption by betacyanins	131
Figure S1. Inner Filter Effect (IFE) on the visible fluorescence of dopaxanthin	134
Figure S2. HPLC profiles for the analysis of the pigment content of yellow, red, and violet shades of <i>M. jalapa</i> flowers	135

Capítulo XII

Figure 1. Biosynthetic scheme for betalamic acid formation	140
Figure 2. Betalain biosynthesis	141

Figure 3. Chromatographic profile for the purification of dopaxanthin from extracts of <i>L. productus</i> yellow flowers	142
Figure 4. HPLC elution profiles for (S)-Tyr and (S)-DOPA immonium conjugates of betalamic acid	142
Figure 5. Products obtained by the action of tyrosinase on dopaxanthin and discrimination between the products associated to the oxidation of the (2S/S)- and (2S/R)-forms	143
Figure 6. Dopaxanthin-quinone evolution to more stable species implies intramolecular nucleophilic cyclization leading to structures similar to leuko-DOPA-chrome	144
Figure 7. Progress curves for (2S/S)-dopaxanthin oxidation by tyrosinase	144
Figure 8. PDA spectra of the compounds present in the reaction medium during HPLC analysis after 50 min of reaction	145
Figure 9. (a) Consecutive scan spectra of (S)-dopaxanthin oxidation by tyrosinase. (b) Coleman graphic analysis	146
Figure 10. Lineweaver-Burk plot for the kinetic analysis of the action of tyrosinase on (2S/S)-dopaxanthin	146
Figure 11. Depletion of endogenous AA from <i>L. productus</i> flower extract	146
 Table 1. Retention times and HPLC-PDA and mass spectrometry data of (2S/S)-dopaxanthin, oxidation products, and betanidin	 143

Capítulo XIII

Figure 1. Activity of tyrosinase on (R)-betaxanthins	154
Figure 2. HPLC elution profiles for (R)-Tyr-betaxanthin, (R)-dopaxanthin and the products derived from enzymatic action of tyrosinase	156
Figure 3. Progress curves for (2R/S)-dopaxanthin oxidation by tyrosinase	157

Figure 4. (a) Consecutive scan spectra of (<i>R</i>)-dopaxanthin oxidation by tyrosinase. (b) Coleman graphic analysis	158
---	-----

Table 1. FPLC elution volumes, purification yields and data obtained by HPLC analysis for (<i>R</i>)-betaxanthins	156
--	-----

Table 2. Retention times and HPLC-PDA and MS data of the oxidation products of (<i>R</i>)-dopaxanthin.	157
---	-----

Capítulo XIV

Figure 1. Reaction mechanism proposed for the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase	164
---	-----

Figure 2. Products obtained by the action of tyrosinase on dopamine-betaxanthin and tyramine-betaxanthin	166
---	-----

Figure 3. Tyramine-betaxanthin oxidation by tyrosinase	167
---	-----

Figure 4. HPLC recording for the conversion of tyramine-betaxanthin to dopamine-betaxanthin by tyrosinase	168
--	-----

Figure 5. (a) Consecutive scan spectra of tyramine-betaxanthin oxidation by tyrosinase. (b) Coleman graphic analysis	169
---	-----

Figure 6. Enzymatic activities of tyrosinase on betaxanthins	169
---	-----

Figure 7. Effect of tyramine–betaxanthin concentration and enzyme concentration on monophenolase activity and on its lag period	170
--	-----

Figure 8. Biosynthetic scheme of betalains with the main steps proposed for the formation of pigments derived from dopamine	171
--	-----

Table 1. Retention times and HPLC-PDA and MS data of tyramine-betaxanthin, dopamine-betaxanthin, and their respective oxidation products	167
---	-----

Capítulo XV

Figure 1. Chromatographic profile for the purification of betanidin from extracts of <i>Lampranthus productus</i> violet flowers	180
---	-----

Figure 2. HPLC elution profiles for betanidin before and after the addition of tyrosinase	180
Figure 3. (a) Consecutive scan spectra of betanidin oxidation by tyrosinase. (b) Coleman graphic analysis	181
Figure 4. Lineweaver-Burk plot for the kinetic analysis of the action of tyrosinase on betanidin	181
Figure 5. Degradation kinetics of betanidin, in the absence of tyrosinase, under different conditions of pH and ionic strength	182
Figure 6. Endogenous AA depleted from <i>L. productus</i> violet flowers extract	182
Figure 7. Betalains biosynthetic scheme	183

Capítulo XVI

Figura 16.1. Esquema biosintético de betalaínas, donde se muestran los nuevos pasos propuestos para la formación de betacianinas	207
Tabla 16.1. Coeficientes de extinción molar para la oxidación de betaxantinas y betanidina	202
Tabla 16.2. Parámetros cinéticos de tirosinasa de hongo usando como substratos betaxantinas y betanidina	202

Capítulo XVIII

Figure 18.1. General structures of betalains	220
Figure 18.2. General overview of the main steps proposed for the biosynthesis of betalains	225
Figure 18.3. Reactions catalyzed by tyrosinase	228
Figure 18.4. Tyrosinase mechanism of action	233
Figure 18.5. Crystal structure of catechol oxidase from sweet potato (<i>Ipomoea batatas</i>)	236

Figure 18.6. Biosynthetic scheme for betalains, where the new steps proposed for the formation of betacyanins are shown	252
Table 18.1. Selected naturally occurring betalains characterized in different species	221
Table 18.2. Structures for the tyrosinase substrates used and absorbance characteristics for their reaction products.	242
Table 18.3. Kinetic parameters for tyrosinase using betaxanthins and betanidin as substrates	253

Capítulo I. Introducción

A diferencia de lo que ocurre con otras familias de pigmentos vegetales, como son los carotenoides (Hirschberg, 2001), las antocianinas (Saito y Yamazaki, 2002) o las clorofilas (Reinbothe y Reinbothe, 1996), la ruta biosintética de las betalainas (Strack et al., 2003) permanece todavía sin ser totalmente clarificada. Sin embargo, la implicación de la enzima tirosinasa ha sido sugerida y la hidroxilación de tirosina a DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina) se considera como el primer paso en la biogénesis de estos compuestos.

1. Características Generales de las Betalainas

1.1. Estructura

Las betalainas son pigmentos solubles en agua, que contienen nitrógeno y se acumulan en flores, frutas y ocasionalmente en el tejido vegetativo de plantas de la mayoría de familias del orden de las Cariofilales (Strack et al., 2003). También están presentes en hongos como *Amanita* (Musso, 1979) e *Hygrocybe* (von Ardenne et al., 1974). Hasta el momento se han identificado más de 50 moléculas distintas pertenecientes a betalainas en la naturaleza, viéndose este número incrementado constantemente (Kugler et al., 2004).

Las betalainas se dividen en dos grupos: las betacianinas, de color violeta (espectro de absorbancia con máximo en torno a $\lambda_m = 536$ nm) y las betaxantinas, de color amarillo ($\lambda_m = 480$ nm). La estructura básica de las betalainas fue elucidada por métodos químicos en los años 60. Wyler et al. (1963) identificaron la betanidina (betacianina) como un derivado imonio del ácido betalámico con la molécula *ciclo*-DOPA. Por su parte, Piattelli et al. (1964) caracterizaron la indicaxantina como un derivado imonio del ácido betalámico con el iminoácido prolina, aislándose así la primera estructura de las betaxantinas.

Estudios posteriores han confirmado la importancia del ácido betalámico (Figura 1.1) como unidad fundamental en la estructura de las betalainas y han revelado la existencia de betaxantinas (Figura 1.1) derivadas de multitud de aminoácidos y aminas, y de betacianinas (Figura 1.1) complejas, que incorporan fundamentalmente azúcares a su estructura (Strack et al., 2003). La incorporación

de azúcares y ácidos se produce a través de uno de los dos grupos hidroxilo presentes en el anillo aromático de betanidina y origina dos familias de compuestos, derivados de betanina (betanidina-5-*O*- β -glucósido) o de gomfrenina I (betanidina-6-*O*- β -glucósido).

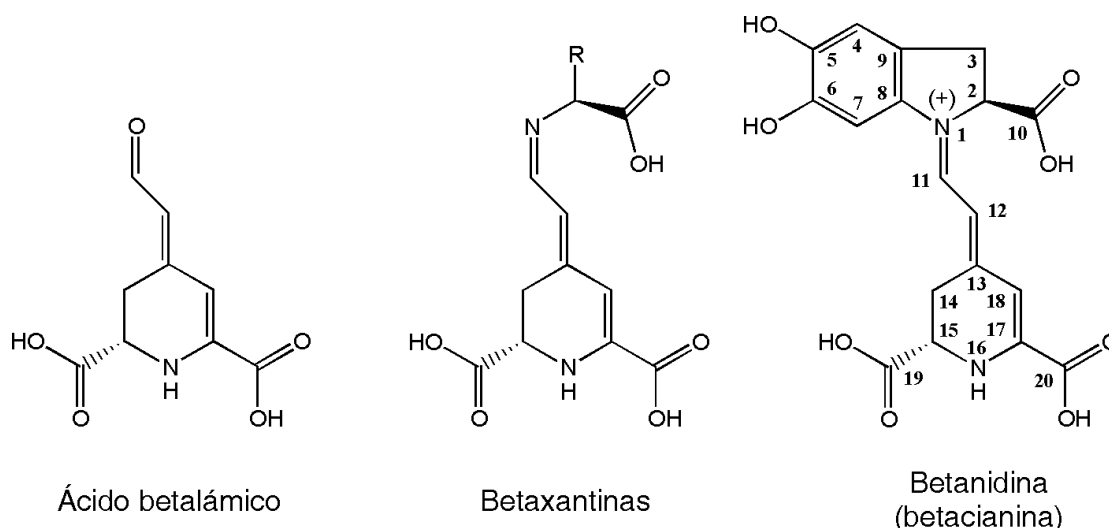


Figura 1.1. Estructuras generales de las betalainas.

1.1.1. Isómeros Estructurales

La presencia conjunta de diastereoisómeros en extractos naturales conteniendo betacianinas es bien conocida (Piattelli, 1981; Stintzing y Carle, 2004). Esta isomería es debida a la presencia del átomo de carbono quiral de la posición C-15 (Figura 1.1), que puede adoptar las configuraciones “*S*” o “*R*”. El átomo quiral en posición C-2 adopta en la naturaleza únicamente la configuración “*S*”. De este modo, para las betacianinas existen los compuestos 2-*S*/15-*S* y 2-*S*/15-*R*, abreviadamente 2*S*/*S* y 2*S*/*R*. De ellos el isómero 2*S*/*S* es el mayoritario y primario, postulándose que el 2*S*/*R* se obtiene por epimerización. La conversión de compuestos 2*S*/*S* en 2*S*/*R* ha sido descrita en función del pH (Schliemann y Strack, 1998). Por otro lado, de manera sintética pueden obtenerse los isómeros no naturales 2*R*/*S* y 2*R*/*R* de las betacianinas (Wilcox et al., 1965) y análogamente de las betaxantinas (Schliemann et al., 1999). Formas “*R*” de

aminoácidos libres suministrados a plantas fueron incorporadas como betaxantinas (Hempel y Böhm, 1997), llevando a consideraciones acerca de una posible condensación espontánea entre el ácido betalámico y los aminoácidos y/o la falta de estereoespecificidad de las enzimas implicadas.

1.2. Distribución de Betalaínas

La presencia de betalaínas en plantas está restringida al orden de las Cariofilales, que incluye familias como las Cactáceas o las Nictagináceas. Dentro de este orden sólo la pigmentación de las familias de las Cariofiláceas y las Molugináceas es debida a antocianinas.

Nombre trivial	Grupo amino	Fuente biológica	Referencia
Betaxantinas			
Dopaxantina	DOPA	<i>Glottiphyllum longum</i>	Impellizzeri et al., 1973
Indicaxantina	Pro	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Piattelli et al., 1964
Miraxantina I	MetSO ¹	<i>Mirabilis jalapa</i>	Piattelli et al., 1965a
Miraxantina II	Asp	<i>Mirabilis jalapa</i>	Piattelli et al., 1965a
Miraxantina III	Tiramina	<i>Mirabilis jalapa</i>	Piattelli et al., 1965a
Miraxantina V	Dopamina	<i>Mirabilis jalapa</i>	Piattelli et al., 1965a
Muscaurina VII	His	<i>Amanita muscaria</i>	Musso, 1979
Portulacaxantina II	Tyr	<i>Portulaca grandiflora</i>	Trezzini y Zrýd, 1991a
Vulgaxantina I	Gln	<i>Beta vulgaris</i>	Piattelli et al., 1965b
Vulgaxantina II	Glu	<i>Beta vulgaris</i>	Piattelli et al., 1965b
Vulgaxantina IV	Leu	<i>Beta vulgaris</i>	Hempel y Böhm, 1997
---	Ala	<i>Beta vulgaris</i>	Kugler et al., 2004
Betacianinas			
Betanidina	ciclo-DOPA	<i>Beta vulgaris</i>	Wyler y Dreiding, 1959
Betanina	CDG ²	<i>Beta vulgaris</i>	Wyler y Dreiding, 1957
2-descarboxi-betanidina	descarboxi-ciclo-DOPA	<i>Carpobrotus acinaciformis</i>	Piattelli e Impellizzeri, 1970
2-descarboxi-betanina	descarboxi-CDG ²	<i>Beta vulgaris</i>	Kobayashi et al., 2001

Tabla 1.1. Selección de betalaínas naturales caracterizadas en varias especies.
¹MetSO: sulfóxido de metionina; ²CDG: ciclo-DOPA-glucósido.

Betalaínas y antocianinas no han sido descritas juntas en la misma planta, evidenciando una divergencia a nivel bioquímico no bien entendida, pero de valor taxonómico (Stafford, 1994). La Tabla 1.1 muestra las especies en las que fueron identificadas por primera vez una selección de betalaínas naturales consideradas a lo largo de la presente memoria. El nombre trivial de la mayoría de estos compuestos fue asignado atendiendo a la fuente donde fue descrito, derivándolo del nombre de la planta y añadiendo el sufijo “-ina” (gr. *kyanos*, color azul) para las betacianinas, o “-xantina” (gr. *xanthos*, color amarillo) para las betaxantinas.

Las betalaínas se encuentran localizadas en diferentes órganos de las plantas, incluyendo raíces (Hempel y Böhm, 1997), frutas (Wybraniec y Mizrahi, 2002) y flores (Stintzing y Carle, 2004). La presencia de betalaínas en flores (*Bougainvillea*, *Celosia*, *Gomphrena*, *Mirabilis*, *Portulaca*,...) es especialmente interesante debido a la importancia del color en esas estructuras, habiendo sido propuestas una gran variedad de funciones para ellas, incluyendo la atracción de animales que actuarían como polinizadores y dispersadores de semillas. Sin embargo, el ejemplo más conocido de presencia de betalaínas en plantas superiores es la raíz de la remolacha roja (*Beta vulgaris*), donde no debe de estar relacionada con factores visuales. En estos casos se sugieren funciones de regulación osmótica y de almacenaje de compuestos nitrogenados (Stintzing y Carle, 2004). El descubrimiento de la actividad biológica de las betalaínas, comentada más adelante (apartado 1.3) aporta claves sobre posibles funciones no relacionadas con la coloración.

1.2.1. Localización Celular

Las betalaínas se acumulan en las vacuolas de las células que las sintetizan, principalmente en los tejidos epidermal y subepidermal (Wink, 1997; Strack et al., 2003). En plantas, otros pigmentos solubles en agua tales como flavonoides o antocianinas, también se acumulan en la vacuola central ocupando más del 90 % del total del volumen de la célula y son responsables de la

coloración brillante en flores y frutos. En algunos casos, las antocianinas también se han encontrado en el citoplasma (Markham et al., 2001).

La existencia de un transportador de ácido betalámico o de betalaínas en la membrana de la vacuola no ha sido demostrada. Sin embargo, se ha propuesto que la biosíntesis de betacianinas tiene lugar en el citoplasma aunque son almacenadas en la vacuola. Por otro lado el ácido betalámico sería transportado también a la vacuola donde se produciría una condensación espontánea con aminoácidos para formar las betaxantinas (Trezza y Zrýd, 1990; Strack et al., 2003).

1.3. Actividad Biológica

Aunque se está aun lejos del conocimiento existente sobre otras familias de pigmentos (Ferruzzi et al., 2002; Heim et al., 2002; Kähkönen y Heinonen, 2003; Fraser y Bramley, 2004), la actividad biológica de las betalaínas ha sido investigada en algunos trabajos recientes. Las primeras investigaciones que evidenciaron una actividad capturadora de radicales libre en betalaínas fueron llevadas a cabo con pigmentos, betacianinas y betaxantinas separadamente, extraídos de raíz de remolacha (Escribano et al., 1998). Subsiguientes trabajos extendieron la información disponible a otras betalaínas y aportaron datos acerca de la importancia de la presencia de grupos hidroxilo en la estructura para la existencia de actividad antioxidante (Butera et al., 2002; Pavlov et al., 2002; Cai et al., 2003). Kanner et al. (2001) demostraron la capacidad de betanina y betanidina de inhibir la peroxidación *in vitro* del ácido linoleico y la oxidación de las LDL a concentraciones más bajas que otros conocidos antioxidantes como el α -tocoferol o la catequina. Las betalaínas también han sido descritas como retiradores de ácido hipocloroso, producto de la enzima mieloperoxidasa implicado en la respuesta inflamatoria (Allegra et al., 2005).

Con anterioridad, las betalaínas habían demostrado ser colorantes seguros para la industria alimentaria al no promover hepatocarcinogénesis en animales (Schwartz et al., 1983), pero un papel protector frente al daño oxidativo

provocado por radicales libres estaba por determinar (Stintzing y Carle, 2004). Sólo recientemente se ha demostrado que concentraciones muy bajas de betanina en la dieta son capaces de inhibir la formación de tumores de piel e hígado en ratones (Kapadia et al., 2003), y que en humanos las concentraciones en plasma tras la ingesta de estos compuestos son suficientes para promover su incorporación en las LDL y en glóbulos rojos a los que protegen de daño oxidativo y hemólisis (Tesoriere et al., 2003, 2004, 2005).

1.4. Color

Entre las propiedades fisicoquímicas de las betalainas, el color y su estabilidad han recibido la mayor atención por parte de los investigadores. De este modo, desde los primeros trabajos en betalainas se caracterizaron los espectros de absorción de betacianinas (Wyler y Dreiding, 1957) y betaxantinas (Piattelli et al., 1964). El espectro de betanina presenta un máximo a 536 nm (Trezzini y Zrýd, 1991b), que se desplaza hipsocrómicamente con la descarboxilación del grupo del carbono C-2 (Kobayashi et al., 2001). Mayor desplazamiento, en el mismo sentido, se produce en el compuesto 14,15-dehidrobetanina (neobetanina) de color naranja y no violeta (Alard et al., 1985). En el otro sentido, un desplazamiento batocrómico se observa al esterificar betacianinas con ácidos hidroxicinámicos (Stintzing y Carle, 2004). En las betaxantinas puede observarse el mismo desplazamiento hipsocrómico con la descarboxilación C-2 de tirosina-betaxantina y de dopaxantina. El pigmento derivado de prolina presenta el máximo de mayor longitud de onda (484 nm), que contrasta con el del ácido betalámico libre (424 nm), que por otro lado presenta un coeficiente de absorción molar menor (Trezzini y Zrýd, 1991b).

1.4.1. Importancia del Color en Plantas

El color actúa en el mundo vegetal como una señal de comunicación entre especies. En general, las plantas se valen de señales visuales para atraer la atención de animales de los que potencialmente pueden aprovecharse para la

polinización y la dispersión de las semillas (Schaefer et al., 2004). En estos casos la coloración más efectiva es la que se muestra en flores y frutos. En cambio, la coloración que se exhibe en estructuras potencialmente defensivas, como son las espinas, parece transmitir una señal de advertencia dirigida a posibles predadores (Lev-Yadun, 2001). En flores, el color tiene un papel preponderante entre las características que atraen a los polinizadores (Gumbert, 2000; Larsson et al., 2003; Ayasse et al., 2003; De la Barrera y Nobel, 2004).

La capacidad de los insectos de detectar simetría y asimetría y las preferencias descritas por diseños especiales (Sasaki y Takahashi, 2002; Heiling et al., 2003) confieren una relevancia especial a la modulación del color en flores, y por lo tanto a la regulación de la biosíntesis y a las propiedades ópticas de los pigmentos que lo provocan.

1.4.2. Estabilidad y Aplicación Industrial de las Betalaínas

Las betalaínas, principalmente en forma de extractos concentrados o liofilizados de raíz de remolacha roja, son utilizadas por la industria alimentaria para modificar el color de una amplia variedad de productos bajo la denominación E-162. De este modo se aplican en alimentos tales como yogures, cremas o helados, pero también en salchichas y en jamón cocido, pasando por galletas, dulces y zumos (Delgado-Vargas et al., 2000). Recientemente se están abriendo nuevas posibilidades en la utilización de los frutos comestibles de cactus como *Opuntia ficus indica* (Mosshammer et al., 2005), principalmente debido a que su uso evita el sabor térreo de los extractos de remolacha, producido por la presencia de geosminas (Lu et al., 2003).

Cuando un compuesto es utilizado como colorante alimentario, la estabilidad del color es una de las mayores preocupaciones. La estabilidad de las betalaínas ha sido estudiada por varios autores en función de diversos parámetros. Valores de pH dentro del rango 3,0-7,0 y temperaturas no superiores a 25°C promueven la estabilidad de los pigmentos, estando descrito el efecto adverso de la presencia de oxígeno y luz (von Elbe et al., 1974; Attoe y von Elbe,

1981; Saguy et al., 1984; Huang y von Elbe, 1987; Pedreño y Escribano, 2001; Herbach et al., 2004; Wybraniec, 2005).

En betacianinas, otro factor negativo descrito es la presencia de enzimas degradativas. En remolacha se encontró que extractos de proteínas eran capaces de degradar a estos pigmentos y la actividad se relacionó con la presencia de peroxidasas (Soboleva et al., 1976; Wasserman y Guilfooy, 1983). Sin embargo, no fue hasta los estudios desarrollados por Martínez-Parra y Muñoz (1997, 2001) cuando se estableció el mecanismo de acción de peroxidasa sobre betacianinas y se identificaron los productos de reacción. Actividades degradativas han sido también observadas en las Amarantáceas y en *Phytolacca americana* (Elliott et al., 1983; Kumon et al., 1990; Zakharova et al., 1995).

Nuevas perspectivas de aplicación se abren gracias a los estudios sobre la actividad biológica de las betalainas y a su potencial sobre la salud humana, para ser utilizadas en composiciones farmacéuticas en la prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Kanner y Harel, 1998).

2. Obtención y Análisis de Betalainas

Muy relacionados con su uso como colorantes, se han descrito diversos métodos para extraer betalainas de fuentes vegetales o de cultivos celulares. Los métodos sintéticos son poco utilizados y apenas se han modificado desde los primeros estudios en la materia (Wyler et al., 1965). El uso preferente de extractos naturales por parte de la industria alimentaria puede ser una razón de peso para la escasa atención prestada al desarrollo de métodos sintéticos.

2.1. Extracción

La alta solubilidad de las betalainas en agua hace posible su extracción por disrupción tisular en disoluciones acuosas tamponadas (Escribano et al., 1998) o incluso en agua purificada (Kujala et al., 2002). Sin embargo, es habitual la adición de cantidades variables de disolventes orgánicos miscibles con el agua como etanol (Wybraniec et al., 2001), metanol (Cai et al., 2001) o acetona

(Martínez-Parra y Muñoz, 1997). Otras posibilidades de obtención de pigmentos incluyen la extracción sólido-líquido por aplicación de un campo eléctrico pulsante a secciones de tejido fresco (Fincan et al., 2004). En el trabajo con cultivos vegetales como fuente de betalaínas, además de adaptarse las condiciones usadas con productos agrícolas (Strack et al., 1988), se ha promovido la utilización de sistemas de extracción que no implican la destrucción del material de partida. De este modo se usan resinas para adsorber los pigmentos obtenidos en los reactores (Rudrappa et al., 2004), a los que además pueden aplicarse condiciones para permeabilizar el material vegetal (Mukundan et al., 1998). La permeabilización y la extracción simultánea de los pigmentos es el objetivo final de las mejoras introducidas (Yang et al., 2003).

2.2. Análisis

Los primeros estudios sobre la composición de pigmentos de plantas del orden de las Cariofiláceas se basaron en técnicas de cromatografía y electroforesis en papel (Piattelli y Minale, 1964; Piattelli et al., 1965a).

En la actualidad se han propuesto técnicas como la electroforesis capilar zonal (Stuppner y Egger, 1996), pero la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es la técnica de referencia utilizada para el análisis de betalaínas y de pigmentos vegetales en general (Schoefs, 2004). Varios son los sistemas de HPLC propuestos, pero todos implican el uso de cromatografía en fase reversa, normalmente con aplicación de un gradiente de disolvente orgánico (Trezza y Zrýd, 1991b; Schliemann et al., 1999; Stintzing et al., 2002; Wybraniec y Mizrahi, 2002).

Cabe destacar la posibilidad de separación de diastereoisómeros de betalaínas (Strack et al., 2003), pudiendo ser identificadas en la misma disolución la presencia de formas *2S/S* y *2S/R*. Para betaxantinas sintéticas (Schliemann et al., 1999) se ha descrito la coelución de los siguientes pares: *2S/S* con *2R/R* y *2S/R* con *2R/S*.

Los detectores más utilizados tras la separación cromatográfica en el análisis de betalainas son los de absorbancia (Huang y von Elbe, 1985; Schwartz y von Elbe, 1980) y de fotodiodos en serie (Trezza y Zrýd, 1991b; Kujala et al., 2002). Detectores de espectrometría de masas (Kugler et al., 2004) y resonancia magnética nuclear (Stintzing et al., 2004a) han ganado reciente relevancia debido a la información estructural que aportan al análisis.

La ausencia de trabajos en los que se desarrollen rectas de calibrado para HPLC mantiene la incógnita sobre la linealidad de las señales obtenidas de los detectores y hace que los métodos aplicados para la cuantificación individual de betalainas estén normalmente basados en medidas espectrofotométricas de la concentración total de pigmentos. Estas medidas son posteriormente corregidas en función de las áreas obtenidas en los cromatogramas con detección de absorbancia (Cai et al., 1998; Kugler et al., 2004; Stintzing et al., 2004b).

Un problema adicional en el análisis de betalainas, y en otros aspectos del trabajo con estos pigmentos, es la falta de patrones disponibles comercialmente. Para la identificación de compuestos en la búsqueda de nuevos extractos colorantes, pigmentos conocidos pueden ser utilizados desde fuentes vegetales previamente estudiadas. Esto ha sido frecuentemente descrito para la identificación de betacianinas, donde los residuos de azúcares unidos a la porción de *ciclo*-DOPA son difíciles de imitar en el laboratorio (Piattelli e Impellizzeri, 1970; Wybraniec y Mizrahi, 2002).

2.3. Síntesis

A pesar de lo comentado anteriormente, la síntesis de las betacianinas más sencillas se ha llevado a cabo para comprobar la posibilidad de algunos pasos biosintéticos. Así, se ha descrito *in vitro* la condensación del ácido betalámico con *ciclo*-DOPA para formar betanidina (Schliemann et al., 1998) o la glucosilación de ésta para formar betanina a través de la enzima glucosiltransferasa y UDP-glucosa (Heuer y Strack, 1992).

El caso de las betaxantinas es diferente. La ausencia de glicosilación y la disponibilidad de aminoácidos y aminos hacen que puedan ser obtenidos compuestos sintéticos, al menos a escala de laboratorio. El ácido betalámico es necesario para la síntesis y puede ser obtenido por medios químicos (Büchi et al., 1977), pero el proceso conlleva múltiples pasos a lo largo de varios días y bajos rendimientos. Otros autores usan el ácido betalámico procedente de la degradación a pH alto de betanina (por encima de pH 11.4 se produce su hidrólisis) (Wyler et al., 1965; Kimler et al., 1971). En este caso aparece en el medio el otro producto de degradación del pigmento, el *ciclo*-DOPA-glucósido, que revierte el proceso y regenera betanina (Huang y von Elbe, 1985). La solución a la reversión de la reacción se ha encontrado en la purificación del ácido betalámico tras la degradación de betanina, mediante extracción con acetato de etilo, previa acidificación del medio de hidrólisis (Schliemann et al., 1999). El ácido obtenido tras la evaporación del disolvente puede ser utilizado para realizar una reacción de condensación de Schiff entre el grupo aldehído de éste y el amino de otro compuesto (aminoácido o amina), que se añade en exceso para formar betaxantinas semisintéticas estables. A pesar de que los bajos rendimientos obtenidos en el proceso y de que la presencia del exceso de aminoácido o amina correspondiente limitan la aplicación de las disoluciones así obtenidas, éstas pueden ser usadas para la identificación de betaxantinas en extractos naturales o ser purificadas por HPLC. La falta de estudios bioquímicos sobre betaxantinas puede explicarse por la ausencia de protocolos para obtener estos metabolitos con rendimientos aceptables, sin *ciclo*-DOPA-glucósido y libres de los aminoácidos precursores.

3. Ruta Biosintética de Betalaínas

La determinación de la estructura química de las betalaínas y de algunos de los intermedios biosintéticos contribuyó a un primer establecimiento de su ruta. Las betalaínas son metabolitos secundarios y se consideran derivados del aminoácido tirosina.

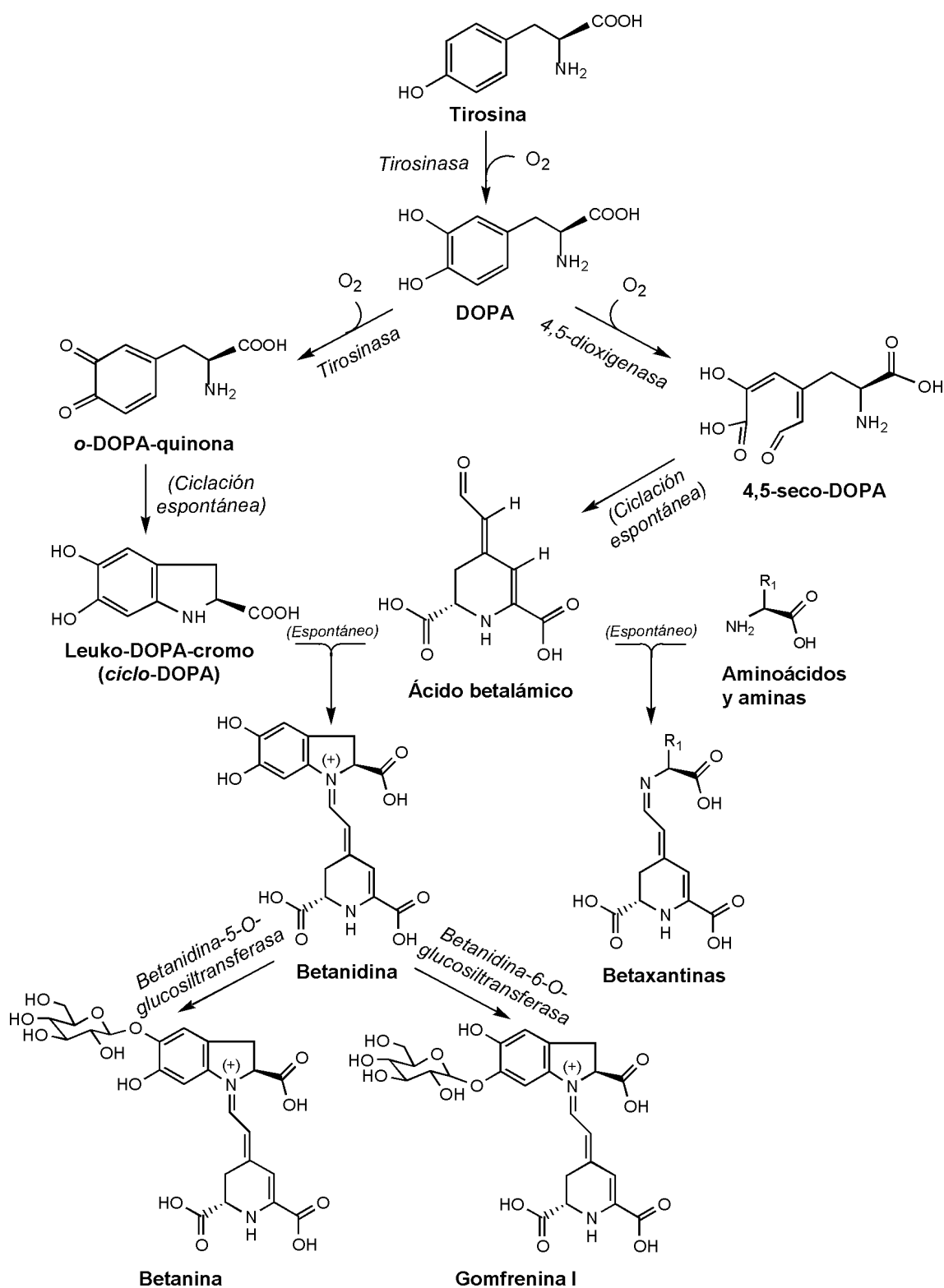


Figura 1.2. Visión general de los principales pasos de la biosíntesis de betalainas recogida en la bibliografía (Strack et al., 2003).

Las reacciones iniciales de la biosíntesis de las betalainas fueron elucidadas mediante experimentos de marcaje isotópico con tirosina y DOPA. De este modo, se demostró que el esqueleto completo de tirosina era incorporado en el ácido betalámico y *ciclo*-DOPA (Liebisch et al., 1969; Fischer y Dreiding, 1972). La Figura 1.2 muestra el esquema contemplado en la bibliografía de la ruta de biosíntesis de betalainas. Éste incluye tres enzimas fundamentales: tirosinasa, DOPA 4,5-dioxigenasa y betanidina glucosiltransferasa.

La hidroxilación de tirosina a DOPA está propuesta como el primer paso en la biogénesis de las betalainas. De acuerdo con el esquema, la ruta se iniciaría por la hidroxilación de tirosina a DOPA y la oxidación posterior de ésta a su *o*-quinona, mediante la acción de la enzima tirosinasa, utilizando oxígeno molecular. La ciclación espontánea conduce a *ciclo*-DOPA (leuko-DOPA-cromo), proponiéndose que éste reaccionaría entonces con una molécula de ácido betalámico por condensación para formar betanidina (Piattelli, 1981; Schliemann et al., 1998). Este compuesto puede ser considerado como la unidad estructural de la mayoría de las betacianinas y es transformado en betanina por una betanidina-5-*O*-glucosiltransferasa (Vogt et al., 1999; Hans et al., 2004). Posteriores glicosilaciones y/o acilaciones, principalmente con ácidos hidroxycinámicos, pueden conducir a oligoglicósidos acilados de betanidina. Una condensación de ácido betalámico con aminoácidos, análoga a la experimentada con *ciclo*-DOPA en las betacianinas, ha sido propuesta como etapa clave en la síntesis de betaxantinas (Schliemann et al., 1999), siendo ambas espontáneas.

En la ruta propuesta para la biosíntesis del ácido betalámico (Figura 1.2), éste se sintetiza a partir de DOPA por acción de la enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (Chang et al., 1974). Esta enzima abre el anillo aromático para formar 4,5-*seco*-DOPA que recicla espontáneamente por condensación intramolecular formando ácido betalámico.

3.1. *Tirosinasa*

Los experimentos con precursores marcados radiactivamente, comentados anteriormente, estaban de acuerdo con una propuesta formulada por Wyler et al., (1963) sobre la posibilidad de que betanidina se pudiera obtener a partir de dos moléculas de DOPA. Más tarde, Endress (1979) asumió la implicación de tirosinasa basándose en los efectos de cofactores e inhibidores de la enzima en la acumulación de betacianinas en *Portulaca grandiflora*. El papel de la enzima quedó establecido en la ruta biosintética, donde catalizaría las reacciones de formación de DOPA (por hidroxilación de tirosina) y su oxidación a DOPA-quinona (Piattelli, 1981). Más tarde, se detectaron transcritos de tirosinasa en frutos en desarrollo de *Phytolacca americana* que se correlacionaron con la acumulación de betacianinas (Joy et al., 1995). La actividad tirosinasa también se ha visto relacionada con la acumulación de betalaínas en diferentes órganos y en hipocotilos de plántulas de *Beta vulgaris* (Steiner et al., 1999).

La enzima tirosinasa ha sido descrita y purificada de extractos que contenían betalaínas en *Amanita muscaria* (Mueller et al., 1996) y *Portulaca grandiflora* (Steiner et al., 1999).

3.2. *DOPA dioxigenasa*

Esta enzima cataliza la transformación de DOPA a los intermedios 4,5-*seco*-DOPA y 2,3-*seco*-DOPA que reciclan espontáneamente a ácido betalámico y muscaflavina, respectivamente (Chang et al., 1974; Barth et al., 1979; Terradas y Wyler, 1991a y 1991b). El ácido betalámico es el cromóforo esencial de todas las betalaínas y además puede estar presente en forma libre, constituyendo un pigmento más.

DOPA dioxigenasa del hongo productor de betalaínas *Amanita muscaria* ha sido caracterizada (Girod y Zrýd, 1991a) y el gen codificando para la enzima ha sido clonado (Hinz et al., 1997). Análisis de Northern-blot de extractos de *Amanita muscaria* mostraron que dioxigenasa estaba regulada a nivel de

transcripción y el mRNA específico se acumulaba principalmente en el tejido coloreado.

El gen codificando para DOPA dioxigenasa de hongo ha sido además expresado en *Escherichia coli* (Mueller et al., 1997b) y la proteína recombinante obtenida catalizó la 4,5 y la 2,3-extradiol hidrólisis de DOPA. Así mismo, DOPA dioxigenasa de *Amanita muscaria* fue expresada en pétalos blancos de *Portulaca grandiflora* y condujo a la formación de betalaínas, complementando la ruta biosintética (Mueller et al., 1997a).

Por otro lado, recientemente se ha identificado el gen que codifica para 4,5-DOPA dioxigenasa en la planta *Portulaca grandiflora*, y se encontró que se expresa solo en pétalos de flores coloreadas. La función de este gen en la ruta biosintética de betalaínas se confirmó expresándolo en pétalos blancos de la misma planta lo que condujo a la formación de color (Christinet et al. 2004).

3.3. Glucosiltransferasas

Estas enzimas catalizan la incorporación de un residuo de glucosa a la unidad estructural de las betacianinas (betanidina), a partir de UDP-glucosa. La adición se produce de manera regioespecífica a través de uno de los grupos hidroxilo del anillo aromático, situados en los carbonos C-5 o C-6 para generar betanina o gomfrenina I, respectivamente. Estudios de marcaje radiactivo aportaron las primeras evidencias de la incorporación de betanidina en la molécula de betanina y con ello de la glucosidación de las betacianinas a nivel de betanidina (Sciuto et al., 1972). En la misma línea apuntaron los resultados de los estudios sobre la actividad glucosilante de extractos de *Dorotheanthus bellidiformis* (Heuer y Strack, 1992), a partir de los cuales se purificaron y caracterizaron las enzimas UDP-glucosa:betanidina 5-O- y 6-O-glucosiltransferasas (Heuer et al., 1996). Además estas enzimas son capaces de utilizar también flavonoides como sustratos (Vogt et al., 1997). La comparación de secuencias de diferentes glucosiltransferasas sugiere un origen común y ha llevado a la obtención de un modelo tridimensional para el centro activo de la 5-

O-glucosiltransferasa en virtud del cual se ha propuesto el mecanismo de acción de la enzima (Vogt, 2002; Hans et al., 2004).

A pesar de que *ciclo*-DOPA-glucósido libre fue detectado en remolacha (Wyler et al., 1984) y de que recientemente ha sido identificada una glucosiltransferasa que utiliza *ciclo*-DOPA como substrato (Sasaki et al., 2004 y 2005), se acepta que la adición de glucosa se produce a nivel de betanidina (Strack et al., 2003). La presencia de trazas de *ciclo*-DOPA-glucósido en extractos conteniendo betanina es achacable al equilibrio químico que el pigmento mantiene con los productos de su propia hidrólisis.

4. Betacianinas Derivadas de Dopamina

Dopamina es un *o*-difénol implicado en la biosíntesis de betalainas. La condensación de ácido betalámico con esta amina origina dopamina-betaxantina (Miraxantina V) que ha sido encontrada entre los pigmentos descritos en *Mirabilis jalapa* (Piattelli et al., 1965a), en cultivos de callos y raíces de remolacha amarilla (Girod y Zrýd 1991b; Schliemann et al., 1999), en inflorescencias de *Celosia* (Schliemann et al., 2001) y en cardo Suizo (Kugler et al., 2004). Por otro lado, la betaxantina derivada del monofenol tiramina (Miraxantina III) ha sido descrita en flores de *Mirabilis jalapa* (Piattelli et al., 1965) y en cardo Suizo (Kugler et al., 2004).

Además, un grupo de betacianinas, las 2-descarboxi-betacianinas, se derivan de dopamina en lugar de DOPA y se detectaron en primer lugar en flores de *Carpobrotus acinaciformis* (Aizoaceae) (Piattelli e Impellizzeri, 1970), una planta nativa de Sudáfrica. También están presentes en cultivos de remolacha amarilla (Schliemann et al., 1999; Kobayashi et al., 2001) y en inflorescencias de *Celosia* (Schliemann et al., 2001).

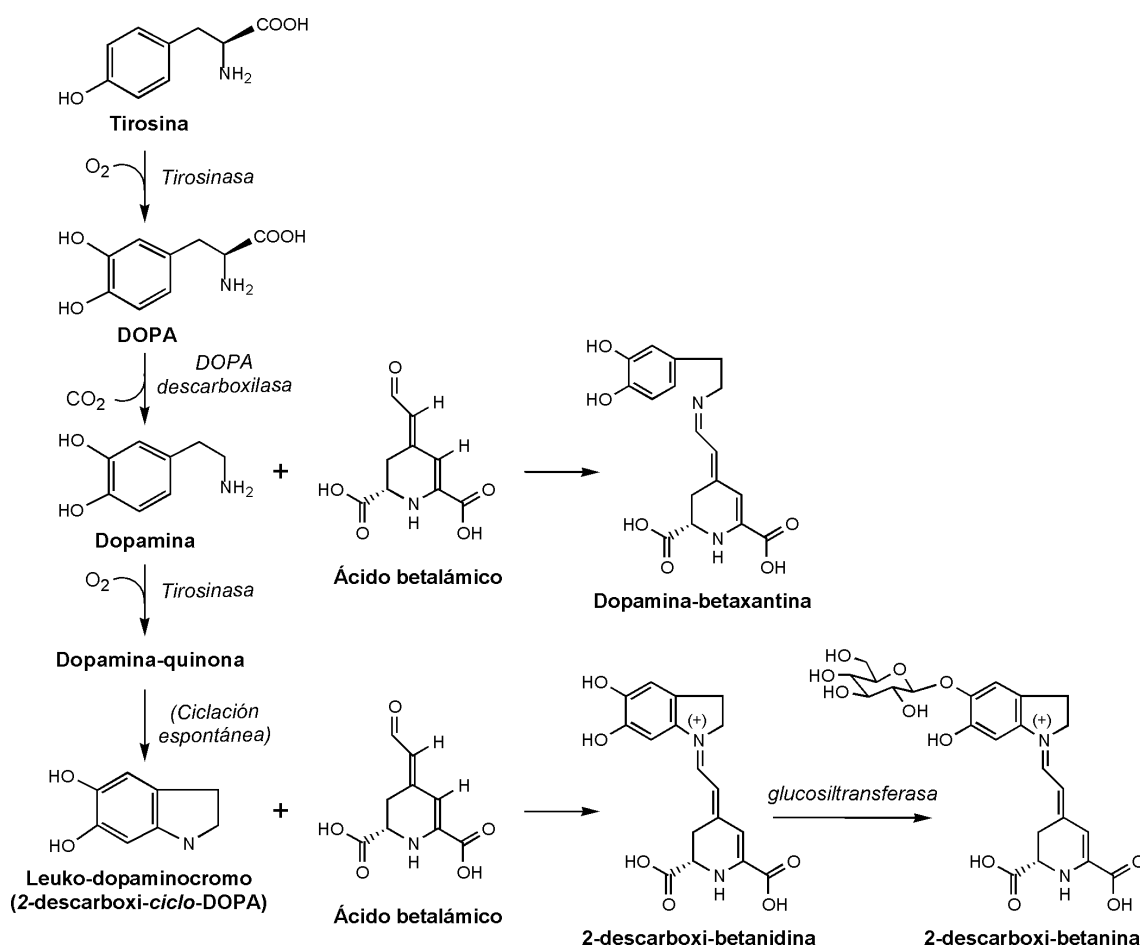


Figura 1.3. Esquema biosintético de 2-descarboxi-betacianinas (Kobayashi et al., 2001).

En la biosíntesis de las 2-descarboxi-betacianinas (Figura 1.3) se ha propuesto que la unidad estructural de éstas (2-descarboxi-betanidina) se forma por un paso de condensación espontáneo entre ácido betalámico y 2-descarboxi-*ciclo*-DOPA, por analogía a la biosíntesis de las betacianinas derivadas de DOPA (Kobayashi et al., 2001). De este modo, la descarboxilación de DOPA conduciría a dopamina y 2-descarboxi-*ciclo*-DOPA se obtendría por la oxidación de dopamina a dopaminocromo por tirosinasa y su posterior reducción por ácido ascórbico.

5. Aspectos Generales de Tirosinasa

La enzima tirosinasa o polifenol oxidasa (PPO) (monofenol, *o*-difenol:oxígeno óxido-reductasa, E.C.1.14.18.1) se encuentra ampliamente distribuida en toda la escala filogenética. Se trata de una cupoproteína que cataliza dos tipos de reacciones acopladas a expensas de oxígeno molecular:

- hidroxilación de monofenoles en posición *orto* para dar el correspondiente *o*-difenol (actividad monofenolasa) (Figura 1.4).
- oxidación de *o*-difenoles a sus correspondientes *o*-quinonas (actividad difenolasa) (Figura 1.4).

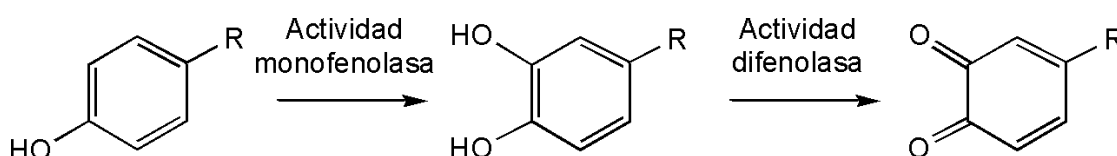


Figura 1.4. Reacciones catalizadas por tirosinasa.

La variedad de posibles sustratos y la elevada reactividad de las *o*-quinonas generadas por tirosinasa determinan la participación de esta enzima en procesos fisiológicos de formación de polímeros tan diversos como son la biosíntesis de ligninas, la esclerotización de la cutícula de artrópodos y la formación de las melaninas responsables de la pigmentación en animales (Mason, 1956; Vámos-Vigyázó, 1981; Robb, 1984; Lozano y Solano, 1989; Sugumaran, 2001).

5.1. Melaninas

Las melaninas son polímeros heterogéneos de carácter polifenólico y estructura compleja, con coloración variable desde el amarillo hasta el negro (Prota, 1988). Estos pigmentos están extensamente distribuidos en la naturaleza y desempeñan muchas funciones biológicas diferentes. Así, un importante papel de tirosinasa en artrópodos es favorecer el endurecimiento de la cutícula por el

proceso llamado esclerotización (Sugumaran, 1991; Parkinson et al., 2001), protegiéndose de la invasión de microorganismos y otros parásitos. En cefalópodos, la acción también es de defensa ya que al ser atacados expulsan tinta, una sustancia de naturaleza melánica (Piattelli et al., 1963; Naraoka et al., 2003). Los peces y reptiles llevan a cabo rápidos cambios de coloración, con fines de camuflaje, provocados por reorganización de los gránulos de pigmentos de la epidermis.

En mamíferos, la piel, cabello y ojos muestran variaciones en función del tipo y cantidad de melaninas. En estos organismos las melaninas participan en procesos de reconocimiento y atracción sexual, y de protección frente a las radiaciones solares, principalmente las ultravioleta, de características mutagénicas y cancerígenas. La deficiencia humana en melaninas provoca el albinismo y el vitiligo, enfermedades caracterizadas por la aparición en la piel de zonas sin pigmentar con extensión variable. Actualmente, existe gran interés hacia la implicación de las melaninas en los melanomas malignos, tumores cancerosos de la piel cuya incidencia esta aumentando entre la población, probablemente debido a una mayor exposición a las radiaciones solares y a la disminución de la capa de ozono sobre la tierra (Lozano y Solano, 1989; Kaur y Hill, 2001; Maczek et al., 2005).

5.2. Pardeamiento Enzimático

En vegetales la formación de melaninas y pigmentos pardos o negros, responsables del pardeamiento, constituye un grave problema en el procesamiento de frutas y hortalizas frescas así como en su transformación industrial. Los vegetales son una importante fuente de nutrientes, vitaminas y fibras en la dieta humana, sin embargo, su consumo depende enormemente de sus cualidades organolépticas. Estas cualidades, determinadas por el aspecto general y color del vegetal, por su sabor y su textura, pueden ser profundamente modificadas por la aparición de pigmentos pardos. Además de la pérdida de las propiedades organolépticas, tirosinasa también causa pérdidas en el valor

nutricional de los vegetales, bien por oxidación de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante, o por la reacción de las quinonas generadas enzimáticamente con aminoácidos, péptidos y proteínas.

La importancia económica de esta enzima en la industria alimentaria ha atraído la atención de muchos investigadores desde su descubrimiento hasta nuestros días, haciéndose cada vez más amplio el campo de investigación (Vámos-Vigyázó, 1995). De hecho hoy día se estudia también con atención la enzima de cereales, aceites de semillas, azúcar de caña y la de productos de origen animal como cangrejos y gambas (Zawistowski et al., 1991).

También existe un interés especial por tirosinasa en determinados productos en los que, por el contrario, el pardeamiento es deseable como en la maduración de dátiles, higos y ciruelas y en la elaboración de té, café, cacao, sidra y pasas donde un grado específico de pardeamiento no sólo es deseable sino esencial para el proceso de producción (McEvily et al., 1992).

6. Tirosinasa de Hongos y Plantas

6.1. Distribución y Localización

En **hongos**, la enzima de champiñón (*Agaricus bisporus*) y la del ascomiceto *Neurospora crassa* son las más conocidas desde el punto de vista molecular, estructural y mecanístico (Lerch, 1981; Robb, 1984; Gerritsen et al., 1994; Sánchez-Ferrer et al., 1995; Wichers et al., 1996; van Gelder et al., 1997; Seo et al., 2003), aunque en la actualidad se ha despertado interés hacia el comportamiento de la enzima en especies de trufas comestibles (Pérez-Gilabert, 2001a y 2001b). A nivel intracelular, la enzima de hongos no está ligada a membranas de orgánulos sino soluble en el citosol (Mayer y Harel, 1991; Wichers et al., 1995).

En **plantas**, tirosinasa está presente en briofitas, helechos, licopodias, gimnospermas y angiospermas. En plantas superiores la enzima se encuentra en gran variedad de órganos y tejidos, abunda en hojas, tubérculos, raíces de almacenamiento, partes florales y frutos. Su actividad va a ser distinta

dependiendo de la especie, el órgano de la planta y su estado de desarrollo. En tubérculos, hojas y frutos es más abundante en los estados tempranos (Mayer y Harel, 1991). Aunque la enzima está presente en cualquier tejido y estado de desarrollo, en la mayoría de las especies estudiadas, el mRNA de tirosinasa sólo se ha encontrado en los tejidos jóvenes (Lax y Cary, 1995), lo que sugiere que la enzima tiene una vida media muy larga.

La localización intracelular de la enzima en plantas depende del tejido, la especie y el estado de desarrollo (Zawistoski et al., 1991; Marqués et al., 1995), pero se ha descrito principalmente como una enzima cloroplastídica, ligada a la membrana tilacoidal (Mayer y Harel, 1991; Nicolas et al., 1994). Además de las evidencias obtenidas por tinción histoquímica, en la que los productos de reacción se acumulan en la luz del tilacoide (Vaughn y Duke, 1981; Olah y Mueller, 1981; Sherman et al., 1991), estudios de fraccionamiento y localización inmunocitoquímica han demostrado que tirosinasa se localiza en los granos tilacoidales, estrechamente asociada con el fotosistema II (Lax y Vaughn, 1991).

Además de en los cloroplastos, tirosinasa se ha localizado en mitocondrias, peroxisomas, microsomas o parcialmente asociada en la pared celular (Mayer y Harel, 1991; Zawistoski et al., 1991; Nicolas et al., 1994). También ha sido descrita su presencia en la fracción citosólica (Mayer y Harel, 1991; Nicolas et al., 1994; Marqués et al., 1995).

6.2. Función Fisiológica

La función de tirosinasa en hongos y plantas sigue siendo, hasta la fecha, confusa y objeto de controversia (Sommer et al., 1994; Joy et al., 1995; Seo et al., 2003). A este hecho se atribuyen varias características propias del sistema enzimático, como pueden ser su actividad bivalente y la complejidad en su extracción y purificación (Robb, 1984; Mayer, 1987; Zhang et al., 1999; Nagai y Suzuki, 2001), además de otras características de la enzima, como:

- Su localización subcelular, apareciendo frecuentemente en varias fracciones.

- La variación observada en el nivel de enzima durante los diversos períodos del desarrollo y crecimiento de las fuentes.
- La existencia de enzima en forma latente que puede ser activada bajo determinadas condiciones, como veremos más adelante.
- La separación de la enzima y sus substratos debido a la compartimentación celular.

Todo esto hizo que se considerara a tirosinasa como a “una enzima en busca de función” o una enzima “sin función establecida” (Mayer, 1987; Vaughn et al., 1988). Aún así, se han sugerido para ella funciones tan diversas y poco relacionadas como: actuación como amortiguador o atrapador de oxígeno, participación en los mecanismos de defensa, implicación en la regulación del crecimiento e intervención en la síntesis de compuestos fenólicos; basadas casi todas ellas en su capacidad generadora de quinonas.

A pesar de todo ello, parece muy probable que las diferentes funciones propuestas deben ser atribuidas a la misma enzima pero presente en diferentes tejidos, diferentes estados de desarrollo y diferentes localizaciones dentro de la célula (Mayer y Harel, 1991; Kim et al., 2001; Wang y Constabel, 2004a). Además, la existencia de varias funciones de la misma enzima en diferentes localizaciones podría ser el fundamento de su naturaleza multigénica y de su expresión génica específica de tejidos (Sherman et al., 1995).

6.2.1. *Transportador Electrónico*

Es posible que varias funciones no relacionadas utilicen la capacidad de las quinonas para interactuar en las reacciones redox durante el crecimiento y desarrollo de la planta (Sherman et al., 1995). En este sentido se ha sugerido que tirosinasa podría actuar como transportador electrónico, debido a que las *o*-quinonas que produce poseen un alto poder oxidante (Mayer y Harel, 1979). Estudios a cerca de esa hipótesis demuestran que quizá pudiera intervenir en dicho proceso al menos la enzima presente en la fracción mitocondrial. También se ha postulado que tirosinasa interviene en la modulación de la reducción de

oxígeno molecular en el fotosistema I (PSI), participando en la fosforilación pseudocíclica o “reacción de Mehler”, un sistema de transporte electrónico que implica al oxígeno en vez del NADP^+ como aceptor terminal (Tolbert, 1973; Vaughn y Duke, 1984; Vaughn et al., 1988; Sherman et al., 1995).

6.2.2. Defensa

Un corte, daño o infección en un tejido provocan la mezcla de la enzima con sus substratos, hasta entonces confinados en compartimentos celulares diferentes. Ello da lugar a la formación de quinonas y a la proposición de una función defensiva, puesto que éstas pueden unirse a proteínas, inactivándolas (Wang y Constabel, 2004b). También pueden formar polímeros insolubles que constituyen una barrera para prevenir la extensión de infecciones en la planta. Además, tanto las quinonas como las melaninas tienen gran poder bacteriostático (Pierpoint et al., 1977) e incluso la capacidad de inactivar parcialmente un tipo de virus de la patata y son esenciales en la resistencia de manzana a la infección por *Venturia inaequalis* (Overeem, 1976). Análogamente, parece claro que la función de tirosinasa en hongos radica en la formación de melaninas durante el desarrollo de cuerpos fructíferos y esporas (Bell y Wheeler, 1986), incrementando la resistencia de las paredes celulares de las esporas a las enzimas hidrolíticas originadas por bacterias (Kuo y Alexander, 1967).

En cuanto a cuál es el mecanismo que provoca la inducción de tirosinasa, es difícil de determinar puesto que el incremento de actividad observado puede ser resultado de la activación de la enzima latente o deberse a la síntesis de *novo* (Boss et al., 1995; Constabel et al., 1995; Thipyapong et al., 1995). Así, parece que la participación de tirosinasa en los procesos defensivos podría darse a dos niveles:

- Como un componente constitutivo de estos procesos mediante su interacción inmediata con los compuestos fenólicos tras la ruptura celular, dando lugar a una respuesta localizada.

- Como un componente inducible a través de la síntesis de *novo* de la enzima formando parte de una respuesta sistémica.

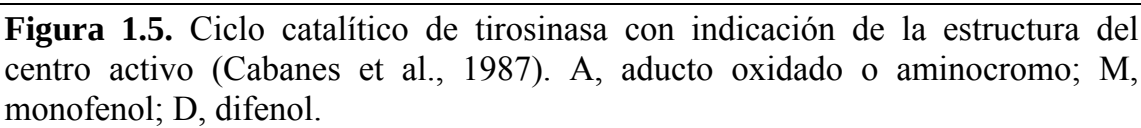
6.2.3. Biosíntesis de Metabolitos Secundarios

Además de las funciones tradicionalmente adscritas a tirosinasa, relacionadas con el mecanismo de protección frente a la luz ultravioleta en animales y fenómenos de defensa frente a patógenos en plantas, recientemente se han publicado estudios que implican a tirosinasa en otros procesos biológicos. Entre ellos se encuentra la participación de tirosinasa en la biosíntesis de betalainas (Strack et al., 2003) al nivel anteriormente comentado (apartado 3).

Un papel más relevante ha sido atribuido a una enzima homóloga de tirosinasa en la ruta biosintética de las auronas, la aureusidina sintasa. Esta enzima cataliza con una alta especificidad la ciclación oxidativa de chalconas para rendir auronas, una pequeña familia de pigmentos relacionada con los flavonoides (Nakayama et al., 2000 y 2001; Nakayama, 2002).

7. Estados Funcionales de Tirosinasa y Mecanismo de Reacción

Tirosinasas obtenidas a partir de diversas fuentes biológicas poseen similares características estructurales y funcionales (Robb, 1984). Esto ha favorecido la obtención de importantes avances en el conocimiento de la estructura del centro activo de la enzima, y en la comprensión de su mecanismo de reacción (Decker y Tuczec, 2000). Tirosinasa está clasificada como una proteína acoplada a cobre binuclear (cobre tipo 3) (Eickman et al., 1978, Himmelwright et al., 1980; Solomon et al., 1992; Solomon y Lowery, 1993). En el centro activo los átomos de cobre pueden encontrarse en diferentes estados funcionales que se conocen con los nombres “*met*”, “*oxi*” y “*desoxi*” tirosinasa (Jolley et al., 1974; Lerch, 1983) y dan lugar a tres estructuras geométricas y electrónicas diferentes del centro activo (Solomon et al., 1992).



Fernando Gandía Herrero
27

intermedio catalítico. *Oxi*-tirosinasa se puede obtener a partir de las otras formas enzimáticas mediante la adición de peróxido de hidrógeno a la forma *meta*-tirosinasa o mediante la unión reversible de una molécula de oxígeno a la forma *desoxi*-tirosinasa.

El modelo estructural del centro activo de la forma *met* (E_{met}) consiste en dos átomos de cobre tetragonales, Cu (II), enlazados por un puente endógeno de proteína y un ligando hidroxilo exógeno distinto a peróxido (Himmelwright et al., 1980; Solomon et al., 1996) (Figura 1.5). La enzima obtenida después de una purificación es una mezcla de E_{met} y E_{oxi} en proporciones de aproximadamente 85% y 15%, respectivamente (Jolley et al., 1974). *Met*-tirosinasa presenta absorción en la región visible del espectro y dicroísmo circular.

La estructura de la forma *desoxi* (E_{desoxi}) de tirosinasa se conoce muy poco debido a que no presenta absorción en la región visible del espectro; por analogía con *desoxi*-hemocianina se le ha asignado una estructura bicuprosa en el centro activo (Kuiper et al., 1980a y 1980b).

7.1. Mecanismo de Reacción

7.1.1. Actividad Difenolasa

La actividad difenolasa consiste en la oxidación de dos *o*-difenoles a dos quinonas, mediante la reducción concomitante de una molécula de oxígeno formándose dos moléculas de agua. El ciclo catalítico para la oxidación de un substrato *o*-difenólico a *o*-quinona por tirosinasa en presencia de oxígeno molecular se muestra en la Figura 1.5. Empezando por la forma *met*-tirosinasa, la unión de un *o*-difenol rinde el intermedio E_{met} -difenol a partir del cual se origina una *o*-quinona y se reduce el Cu^{2+} del centro activo al estado Cu^+ (Figura 1.5, etapas 1 y 2). Ya que no se forman intermedios semiquinónicos durante el ciclo catalítico de la enzima (Mason et al., 1961), la oxidación de *o*-difenol tiene lugar por un proceso en el que están implicados dos electrones. En la etapa siguiente (etapa 3), *desoxi*-tirosinasa reacciona reversiblemente con oxígeno molecular formándose *oxi*-tirosinasa. La reacción de esta forma enzimática con una segunda

molécula de *o*-difenol (etapas 4 y 5) implica la reducción de peróxido de hidrógeno endógeno a agua para formar una *o*-quinona y regenerar *met*-tirosinasa cerrándose el ciclo catalítico.

A partir de las *o*-quinonas generadas enzimáticamente se produce la adición de un nucleófilo, intramolecular en el caso de DOPA o dopamina, o exomolecular en el caso de otros difenoles. Esto genera un difenol que experimenta oxidación con una molécula adicional de *o*-quinona, la cual se reduce al difenol original, obteniéndose así el aminocromo o el aducto oxidado correspondiente (etapa 9). Este modelo explica la existencia de un período de retardo en la actividad difenolasa cuando se sigue la acumulación de aminocromo a $\text{pH} < 6$ a causa de la ralentización de las reacciones químicas de reciclaje (etapa 9).

7.1.2. Actividad Monofenolasa

El mecanismo cinético de la actividad monofenolasa ha sido ampliamente estudiado (Mason, 1956; Cabanes et al., 1987; Naish-Byfield y Riley, 1992; Rodríguez-López et al., 1992) y entre las características de esta actividad destacan:

- La expresión conjunta de las actividades monofenolasa y difenolasa, actuando la segunda sobre el producto de la primera.
- La existencia de las mismas etapas no enzimáticas que las encontradas en la actividad difenolasa desde *o*-quinona hasta aminocromo.
- La presencia de un período de retardo en la expresión de la velocidad máxima de hidroxilación, observable tanto si se sigue el consumo de oxígeno como si se mide la acumulación de producto. La duración de este período de retardo puede variar con el pH, concentración de enzima, y de monofenol (García-Carmona et al., 1979; García-Cánovas et al., 1981; Rodríguez-López et al., 1992; Valero y García-Carmona, 1992). La presencia de cantidades catalíticas de *o*-difenol o de iones metálicos de transición puede eliminarlo por completo (Pomerantz y Warner, 1967; Palumbo et al., 1985; Ros et al., 1993). Se han propuesto varias

hipótesis para explicar la existencia de dicho período (Triphati et al., 1988; Hearing y Ekel, 1976; Duckworth y Coleman, 1970). Los estudios realizados en este Departamento condujeron al mecanismo general mostrado en la Figura 1.5 (Cabanés et al., 1987) que predice las características descritas para la actividad monofenolasa y permite ajustar satisfactoriamente los datos experimentales obtenidos para dicha actividad.

Según este modelo, el monofenol se une inicialmente en posición axial a uno de los átomos de cobre que componen el centro activo de la forma *oxi*-tirosinasa (Figura 1.5, etapa 6) lo que conduce a la hidroxilación del sustrato formándose E_{met} -difénol y agua como productos (etapa 7). En la etapa siguiente, E_{met} -difénol puede disociarse en difénol y E_{met} (etapa 1) o evolucionar para rendir *o*-quinona (etapa 2) y la forma E_{desoxi} que reacciona reversiblemente con oxígeno molecular formando E_{oxi} . Esta secuencia de reacciones coincide con parte del ciclo de la actividad difenolasa (etapas 2 y 3), confirmando el íntimo acoplamiento de ambas actividades de la enzima.

Por otro lado, la unión de monofenol a la forma E_{met} (etapa 8) origina un complejo de vía muerta ya que esta forma no presenta actividad catalítica sobre monofenoles. Este complejo de vía muerta atrapa a la enzima, sacándola del ciclo catalítico y provocando la aparición del período de retardo. La enzima puede volver a entrar lentamente al ciclo catalítico (etapas 1-3) mediante el *o*-difénol obtenido por reciclaje en las etapas químicas (etapa 9). El incremento en el nivel de *o*-difénol produce una mayor transformación de monofenol a *o*-quinona, acabándose el período de retardo cuando se produce el nivel de *o*-difénol necesario para mantener el estado estacionario.

8. Propiedades Moleculares de Tirosinasa

8.1. Estructura primaria

El empleo de técnicas de Biología Molecular ha hecho posible que el número de secuencias conocidas de tirosinasa haya aumentado en los último años en toda la escala filogenética (Haruta et al., 2001; Sánchez-Amat et al., 2001; Naraoka et al., 2003; Nishimura et al., 2003; Boonanuntanasarn et al., 2004; Obata et al., 2004; Sullivan et al., 2004) y que se hayan propuesto estrategias de terapia génica para el tratamiento del albinismo en mamíferos (Zhao et al., 2000).

De la comparación y análisis filogenético de las secuencias de tirosinasas aisladas de diferentes fuentes, se observa un agrupamiento en los grupos de plantas superiores, animales vertebrados, hongos y bacterias. Las homologías dentro de cada grupo son considerablemente mayores que entre ellos. Sin embargo, las secuencias responsables de la unión de cobre por tirosinasa se encuentran muy conservadas en todas las especies y son análogas a las descritas para las hemocianinas, enzimas transportadoras de oxígeno, de artrópodos y moluscos (van Gelder et al., 1997; Seo et al., 2003; Wichers et al., 2003). Dos átomos de cobre constituyen la base del centro activo de la enzima, y son el lugar de interacción de tirosinasa tanto con el oxígeno molecular como con sus substratos fenólicos. La unión de cada uno de ellos se produce por tres residuos de histidina altamente conservados.

8.2. Multiplicidad

A través de técnicas electroforéticas y cromatográficas se ha evidenciado la existencia de multitud de formas enzimáticas en los extractos de tirosinasa. Esta multiplicidad ha sido atribuida a fenómenos de asociación-disociación de subunidades similares y/o diferentes (Fling et al., 1963; Jolley et al., 1969; Chazarra et al., 2001a), la expresión de diferentes miembros de una familia de genes (Sommer et al., 1994); modificaciones postraslacionales (Ganesa et al., 1992); y fundamentalmente a artificios ocurridos durante el aislamiento como

proteólisis limitada (Robinson y Dry, 1992), polimerización con compuestos fenólicos y asociación con proteínas no enzimáticas (Mayer y Harel, 1991; Zawitowski et al., 1991). Estas formas pueden diferir en la especificidad de acción sobre los sustratos, pH óptimo, estabilidad térmica, y respuesta a agentes químicos e inhibidores, y en el caso de asociaciones, éstas pueden ser interconvertibles (en función de la fuerza iónica, pH o presencia de agentes disociantes).

En **hongos**, la enzima de *Agaricus bisporus* se ha descrito formada por dos tipos de cadenas polipeptídicas, una pesada (H) con un peso molecular de 43 kDa y una ligera (L) de 13,4 kDa. Estas subunidades se asocian dando lugar a un heterotetrámero de masa molecular 120 kDa, lo que corresponde a una agrupación de subunidades H₂L₂ (Strothkamp et al., 1976). En estudios más recientes, se ha clonado un gen de tirosinasa que codifica para una proteína de 64 kDa (Wichers et al., 1996). En *Neurospora crassa*, tirosinasa está formada por una única cadena polipeptídica, con un peso molecular de 46 kDa, derivada del procesamiento de un precursor de 75 kDa (Kupper et al., 1989).

En **plantas**, tirosinasa parece ser sintetizada como una pre-proteína de peso molecular comprendido en el rango 68-73 kDa, que es procesada a una proteína madura de peso 58-68 kDa, que a su vez puede dar lugar a una proteína monomérica activa con un peso molecular en torno a los 40-45 kDa mediante proteólisis *in vivo* e *in vitro* (van Gelder et al., 1997). Ello explica que los primeros trabajos de purificación hasta homogeneidad aparente describieran a tirosinasa como una forma monomérica con un peso molecular en torno a los 45 kDa (Vaughan et al., 1975; Wichers et al., 1984; Nakamura et al., 1983). En la actualidad, cuando se purifican tirosinasas hasta homogeneidad aparente, éstas se describen como monómeros (Ding et al., 1998; Bilka et al., 2003), que en algunos casos se asocian en multímeros, normalmente tetrámeros (Paul y Gowda, 2000; Chazarra et al., 2001a; Marri et al., 2003). Esto se ha descrito que puede generar fenómenos cinéticos de cooperatividad positiva (Chazarra et al., 2001b). Los datos indican que tirosinasa es sintetizada como una proteína precursora que

posee una secuencia de tránsito para su transporte hacia el interior del cloroplasto y una vez dentro de la membrana tilacoidal estas secuencias se pierden.

8.3. Estructura Cristalina

Las dificultades inherentes a la purificación de tirosinasa y las derivadas de su multiplicidad suponen que no se hayan obtenido cristales suficientemente puros para las técnicas de difracción de rayos X. Por lo tanto, esta enzima ha eludido hasta ahora la determinación de su estructura completa. Así, hasta hace unos años, las aproximaciones a la estructura de tirosinasa se hacían en base a los conocimientos sobre las hemocianinas de artrópodos (van Gelder et al., 1997).

Sin embargo, recientemente, se ha cristalizado y elucidado la estructura tridimensional de catecol oxidasa de batata (*Ipomoea batatas*) (Klabunde et al., 1998). Catecol oxidasa es una enzima análoga a tirosinasa, aunque carente de actividad hidroxilante (Rompel et al., 1999). En la estructura publicada (depositada bajo los códigos 1BT1-1BT3 en “Protein Data Bank”), el centro activo se encuentra en el centro de un haz de cuatro hélices (Figura 1.6.A). En él se encuentran dos átomos de cobre, CuA y CuB, con una esfera de coordinación piramidal trigonal formada por tres ligandos de histidina (histidinas 88, 109 y 118 para CuA e histidinas 240, 244 y 274 para CuB) (Figura 1.6.B). También se ha cristalizado la estructura del complejo tirosinasa-feniltiourea, cuyo átomo de azufre nucleofílico se enlaza a ambos cobres de tirosinasa, mientras que el anillo bencénico queda alojado en una cavidad hidrofóbica constituida por residuos de isoleucina, histidina y fenilalanina (I241, H244 y F261). En la proximidad del centro activo se ubica también un residuo de cisteína (C92) que se une a una de las histidinas ligantes de cobre (H109) a través de un enlace tioéter, que restringe las posibilidades de movimiento en el centro activo.

Un enlace análogo también ha sido descrito en la enzima tirosinasa del hongo *Neurospora crassa* entre C94 y H96 (Lerch, 1982), proponiéndose que podría desempeñar un papel en la regulación de la actividad de la enzima, y en la

hemocianina del molusco *Octopus dofleini* entre C2560 y H2562 (Cuff et al., 1998), anclando a la histidina en su posición de ligando.

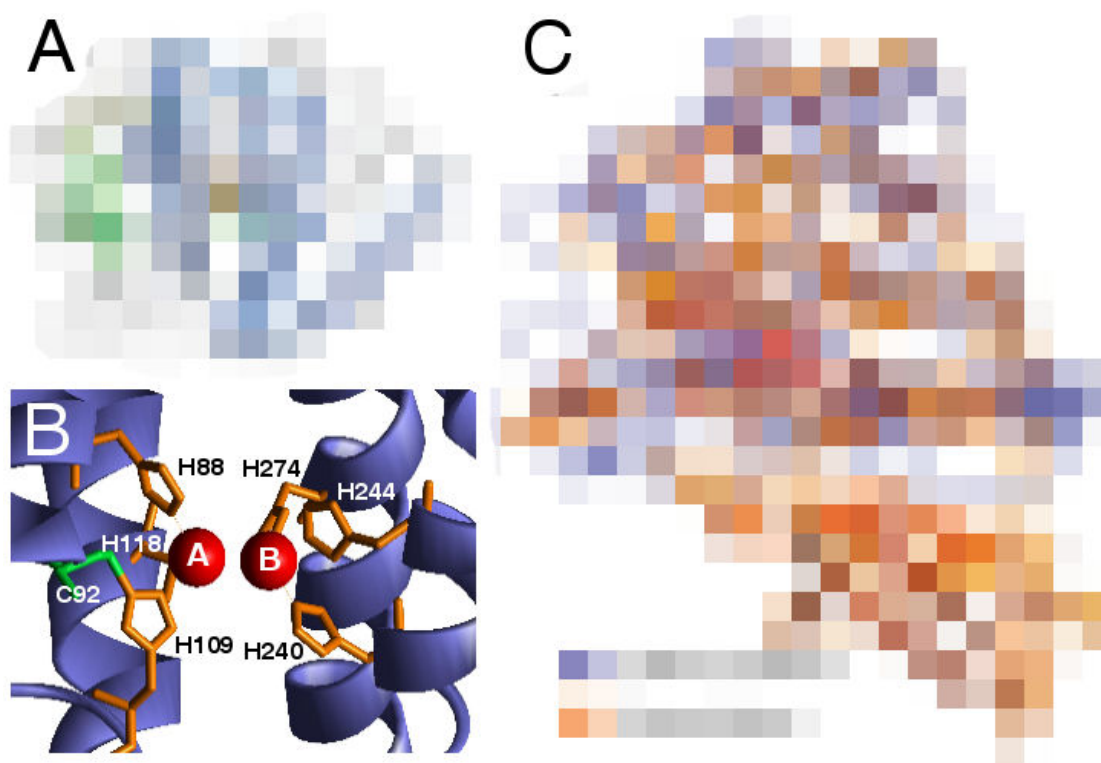


Figura 1.6. Estructura de catecol oxidasa de batata (*Ipomoea batatas*). A, vista general (átomos de cobre, naranja; hélices α , azul; hojas β , verde; puentes disulfuro, amarillo); B, centro activo (histidinas, naranja; cisteína, verde; cobres, rojo); C, superposición con la estructura de la hemocianina del molusco *Octopus dofleini* (naranja). A y C han sido tomados de Gerdemann et al. (2002a) y B ha sido generada a partir de la estructura PDB ID: 1BT3 con el programa WebLab Viewer (Molecular Simulations Inc.).

La región del centro activo de catecol oxidasa de *Ipomoea batatas* muestra una amplia homología estructural con los centros activos de las hemocianinas de moluscos y artrópodos (Eicken et al., 1999; Gerdemann et al., 2002a) (Figura 1.6.C). Del análisis comparativo de sus estructuras se pueden obtener conclusiones acerca del acceso de los substratos fenólicos a la cavidad conteniendo los átomos de cobre. La entrada al mismo se ve bloqueada en los casos de las hemocianinas, estando el de la de artrópodos protegido por una “región escudo” ubicada en el dominio N-terminal, donde además existe un

residuo de fenilalanina cuya posición se superpone a la que ocuparía un sustrato fenólico en el centro activo. En el caso de la hemocianina de molusco, se observa también una “región escudo” protegiendo al centro activo, pero en este caso localizada en la región C-terminal e introduciendo en la cavidad un residuo de leucina, que bloquea la entrada de sustratos fenólicos menos eficientemente, dejando la posibilidad de una actividad catecolasa limitada. Obviamente el acceso de sustratos fenólicos a la cavidad del centro activo no presenta barreras en el caso de la catecol oxidasa de batata, pero se ha propuesto que en la forma precursora latente, no madura, existe esta misma zona protectora en el dominio C-terminal (Gerdemann et al., 2002b). Este análisis estructural abre la posibilidad de poder generar hemocianinas con actividad catalítica si se promueve un cambio conformacional que abra suficientemente el acceso al centro activo potencial. Ello estaría en consonancia con experimentos en los que se observa actividad catecolasa en hemocianinas en presencia del detergente SDS (Jaenicke y Decker, 2004).

El conocimiento sobre el centro activo de catecol oxidasa y tirosinasa se ve apoyado por la síntesis y estudio de modelos estructurales desarrollados con complejos inorgánicos (Than et al., 1999; Gentshev et al., 2000).

9. Latencia y Activación de Tirosinasa

Uno de los aspectos más peculiares de la bioquímica de tirosinasa es la existencia de actividad enzimática latente, es decir, una porción o toda la enzima se encuentra en una forma inactiva susceptible de ser activada por uno o varios tratamientos. La presencia de esta forma latente se ha descrito en tirosinasas de diferente origen, en anfibios (Wittenberg y Triplett, 1985a y 1985b), insectos (Pye, 1974), crustáceos (Sugumaran y Nellaiappan, 1991a), hongos (Pérez-Gilabert et al., 2004) y especialmente en plantas donde se ha encontrado latente en aguacate (Kahn, 1977), espinaca (Golbeck y Cammarata, 1981), uva (Sánchez-Ferrer et al., 1989), hoja de patata (Sánchez-Ferrer et al., 1993), haba (Jiménez y García-Carmona, 1996), banana (Sojo et al., 1999), lechuga (Chazarra

et al., 1996), melocotón (Laveda et al., 2000) y hoja de remolacha (Escribano et al., 1997b).

Existe una gran variedad de sustancias o tratamientos que pueden provocar dicha activación (van Gelder et al., 1997). Así, la activación *in vitro* de tirosinasa se ha conseguido con una gran variedad de tratamientos o agentes que incluyen choque ácido (Kenten, 1957; Fujita et al., 1995) y básico (Kenten, 1957), urea (Swain et al., 1966; Lerner et al., 1972), cationes divalentes (Söderhall, 1995; Jiménez y García-Carmona, 1993), poliaminas (Jiménez-Atiénzar et al., 1991), ácidos grasos (Sugumaran y Nellaiappan, 1991b), detergentes aniónicos como el SDS (Moore y Flurkey, 1990; Jiménez y García-Carmona, 1996; Escribano et al., 1997a) y proteasas (Golbeck y Cammarata, 1981; King y Flurkey, 1987).

9.1. Activación por detergentes

La activación de tirosinasa por detergentes aniónicos fue descrita en primer lugar por Kenten (1958), quien describió que la concentración de detergente necesaria para la activación de la enzima era menor cuanto más larga era la cadena del alquil sulfato utilizado. Posteriormente se demostró que el proceso de activación era reversible y que la incubación prolongada con SDS provocaba una disminución de la actividad y se concluyó que la activación implicaba una reorganización de la estructura terciaria de la enzima, haciendo el centro activo más accesible a los substratos (Robb et al., 1964; Swain et al., 1966), lo cual fue confirmado por estudios posteriores (Wittenberg y Triplett, 1985b; Moore y Flurkey, 1990).

El uso de SDS como detergente aniónico modelo en la activación de tirosinasa está extendido y es de un interés particular puesto que muy pocas enzimas son activadas por su presencia, siendo la mayoría inactivadas. De este modo concentraciones que desnaturalizarían a otras enzimas, provocan la activación de tirosinasa (Moore y Flurkey, 1990). La reversibilidad del cambio conformacional limitado de la enzima ha sido inequívocamente demostrado

usando ciclodextrinas que, retirando el SDS del entorno de la enzima, devolvían a ésta a su estado inicial no activado (Laveda et al., 2000).

Se ha sugerido que a nivel fisiológico, el papel activador desarrollado por los detergentes corresponde a los lípidos (van Gelder et al., 1997), y la activación de tirosinasa por SDS se ha demostrado que ocurre *in vivo* en secciones de *Terfezia clavaryi* (Pérez-Gilabert et al., 2004).

9.2. Activación por proteasas

La existencia de proteínas que se sintetizan como precursores inactivos y que se activan por la ruptura selectiva de enlaces peptídicos constituye un mecanismo regulador de procesos tan diversos como son la producción de hormonas, la coagulación sanguínea, la activación del complemento, la fertilización, la metamorfosis y la digestión.

En tirosinasa, la activación *in vitro* por la acción de enzima hidrolíticos se ha descrito con frecuencia, siendo tripsina la enzima más efectiva en la activación de tirosinasa de plantas (Savagaon y Sreenivasan, 1978; Golbeck y Cammarata, 1981; Peñafiel et al., 1982; Söderhäll et al., 1985; King y Flurkey, 1987; Ferrer et al., 1989; Sánchez-Ferrer et al., 1989). La actividad de una tirosinasa aislada de la tinta del calamar *Illex argentinus* también fue aumentada por el efecto de tripsina (Naraoka et al., 2003). Por otro lado, la resistencia al tratamiento con proteasas puede ser considerada una medida de maduración de la enzima puesto que el plegamiento de las proteínas supone un estado conformacional estable que ayuda a evitar su digestión inespecífica (Francis et al., 2003).

Capítulo II. Objetivos

Del análisis de la bibliografía existente, y en función de lo comentado en la Introducción, se observa una ausencia de estudios acerca de la participación de la enzima tirosinasa en la ruta biosintética de betalaínas a un nivel distinto de la hidroxilación del aminoácido tirosina a DOPA y su posterior oxidación a dopaquinona.

Por ello, la presente Tesis Doctoral se planteó:

- Analizar la participación de la enzima tirosinasa en la ruta biosintética de betalaínas.

Para la consecución de este objetivo global fue necesario abordar los siguientes objetivos concretos:

- Caracterización de tirosinasa de raíz de remolacha roja.
- Establecimiento de métodos para la síntesis y análisis de betalaínas, y su caracterización físico-química.
- Implicación de las características físico-químicas de betalaínas en el color de las flores.
- Caracterización de la actividad de tirosinasa sobre betaxantinas difenólicas.
- Caracterización de la actividad de tirosinasa sobre betaxantinas monofenólicas.
- Caracterización de la actividad de tirosinasa sobre la unidad estructural de las betacianinas.

Capítulo III. Materiales y Métodos

1. Material Vegetal

Raíces frescas de remolacha roja (*Beta vulgaris*), variedad granadina fueron obtenidas de una plantación ecológica, donde fueron cultivadas sin la adición de pesticidas. Las raíces fueron peladas, troceadas y congeladas en nitrógeno líquido (Air Liquide, París, Francia) antes de su almacenamiento en una cámara a -86°C (UltraLow MDF-U3086S, Sanyo Electric, Japón). La piel fue desechada.

Las plantas *Portulaca grandiflora* (fenotipos blanco, amarillo, amarillo claro y violeta), *Lampranthus productus* (fenotipos amarillo y violeta), *Carpobrotus acinaciformis* (fenotipos amarillo y violeta), *Mirabilis jalapa* (con flores blancas, amarillas, violetas, rojas y mezclas) fueron obtenidas de viveros en Murcia (Eco-Flor; La Generala). Las plantas *Glottiphyllum oligocarpum* y *G. pigmaeum* fueron obtenidas de colecciones privadas en Europa a través de la Asociación de Amigos de los Cactus y demás Suculentas (ACYS) del Jardín Botánico de la Universidad de Valencia.

2. Reactivos

Substratos para tirosinasa, inhibidores de proteasas, sorbitol, AA, EDTA, BisTris, SDS, albúmina, MBTH, enzimas y aminoácidos se compraron a Sigma (St. Louis, EEUU). Sales y tampones inorgánicos, Triton X-114, 4MN y TFA fueron comprados a Fluka (Buchs, Suiza). Reactivos para electroforesis y determinación de proteínas fueron obtenidos de Bio-Rad (Hercules, EEUU). Disolventes orgánicos fueron comprados a Merck (Dorset, Inglaterra). Disolventes para uso en HPLC fueron obtenidos de Labscan (Dublin, Irlanda). El agua usada como disolvente se purificó a través de un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, EEUU).

3. Extracción y Purificación de Tirosinasa de Raíz de Remolacha

3.1. Fraccionamiento Subcelular

Fracciones soluble y de membrana de tirosinasa de raíz de remolacha fueron obtenidas a partir de 105 g de raíz a los que se añadieron 210 mL de tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,0, conteniendo D-sorbitol 0,33 M, AA 10 mM, EDTA 2 mM y MgCl_2 1 mM. Inmediatamente antes de su uso se añadieron al tampón los inhibidores de proteasas PMSF 1 mM y *p*-aminobenzamidina 1 mM. La mezcla se homogeneizó en una batidora modelo 230 Omnimixer (Sorvall, Norwalk, EEUU) en dos pulsos de 10 segundos cada uno a máxima potencia. El homogenado obtenido se filtró a través de dos capas de gasa y se centrifugó a 1.000g durante 10 min. El precipitado, conteniendo material no disgregado y paredes celulares, fue desechado y el sobrenadante se ultracentrifugó a 120.000g durante 40 min. El precipitado resultante se consideró como la fracción de membranas y el sobrenadante, como la fracción soluble. Ésta última fue sometida a fraccionamiento por precipitación con sulfato amónico. Se realizaron dos cortes consecutivos a 35% y 85% de saturación de sulfato amónico a 0°C, seguidos por sendas ultracentrifugaciones en las que se descartó el precipitado (primera centrifugación, 35%) o el sobrenadante (segunda centrifugación, 85%). El precipitado de la última centrifugación se resuspendió en 10 mL de tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,0. El contenido de sal fue eliminado por diálisis frente a un volumen de 2 litros del mismo tampón durante 20 horas con dos cambios de tampón. Todos estos pasos fueron realizados a 4°C.

La extracción de la enzima tirosinasa de la fracción de membranas se realizó mediante tres procedimientos paralelos:

- (1) Resuspensión de la fracción en tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,0 durante 20 min a 4°C, seguida de sonicación (homogeneizador ultrasónico 47010, Cole Parmer Instruments, Chicago, EEUU) durante 10 min para disgregar las membranas.
- (2) Tratamiento salino, incubando las membranas en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,0 con cloruro sódico 1 M, durante 60 min en agitación a 4°C. Las

fracciones obtenidas por estos dos métodos fueron centrifugadas a 120.000g durante 40 min a 4°C, para obtener en el sobrenadante la enzima solubilizada, que fue dializada frente a tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,0.

(3) Digestión con el detergente no iónico Triton X-114 (Sánchez-Ferrer et al., 1989), incubando la fracción de membranas en tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,0 con Triton X-114 al 1,5% (p/v) durante 30 min en agitación a 4°C. La disgregación de las membranas por efecto del detergente promueve la solubilización de la enzima que es separada de los restos de las primeras por centrifugación (120.000g durante 40 min a 4°C). El sobrenadante se sometió a una partición de fases inducida por temperatura tras la adición de Triton X-114 hasta una concentración final de 8% (p/v) e incubación a 4°C durante 15 min. La separación de fases tuvo lugar tras incubación de la muestra en un baño a 35°C durante 15 min. Tras este tiempo la solución se enturbió espontáneamente por formación, agregación y precipitación de micelas mixtas de detergente. La muestra se centrifugó a 15.000g durante 15 min a 30°C y la fase acuosa se utilizó como fuente de enzima solubilizada.

El precipitado obtenido a través de la solubilización con cloruro sódico (tratamiento 2) fue igualmente sometido a digestión con Triton X-114 (tratamiento 3) para solubilizar la enzima que pudiera seguir ligada a las membranas.

3.2. Purificación Cromatográfica

Para los pasos de purificación cromatográficos se utilizó el equipo de purificación automático Äkta purifier de General Electric Healthcare - Amersham Biosciences (Uppsala, Suecia), equipado con un sistema de bombas P-900, un inyector INV-907 y un colector de fracciones Frac-900. Se usaron columnas y marcadores de peso molecular obtenidos del mismo proveedor.

3.2.1. Enzima Soluble

Para la purificación de la enzima correspondiente a la fracción soluble se utilizó la técnica de separación Cromatografía de Interacción Hidrofóbica, en la que se explota la capacidad de interacción de las regiones de naturaleza hidrofóbica de las proteínas con fases estacionarias que poseen grupos de esta naturaleza. Se utilizó una columna Resource-ISO, formada por una matriz de poliestireno y divinilbenzeno (15 μm de tamaño de partícula) derivatizada con grupos isopropilo. La fracción soluble fue diluida en el mismo tampón utilizado para el equilibrado de la columna, tampón fosfato sódico 20 mM pH 7,0 con sulfato amónico 1,5 M e inyectada en la columna. La elución de tirosinasa se provocó al desfavorecer la interacción hidrofóbica por reducción de la fuerza iónica en base a un gradiente lineal con tampón fosfato sódico 20 mM pH 7,0 sin sulfato amónico, en 20 mL. El flujo utilizado fue de 2,0 mL min⁻¹. Las fracciones que contenían el pico de actividad se mezclaron, lavaron y concentraron por ultrafiltración con membranas YM-10 de Millipore, quedando la proteína finalmente disuelta en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7,0 con cloruro sódico 0,15 M. Este mismo tampón fue el utilizado para equilibrar la columna Superdex 200 HR 10/30, utilizada en el siguiente paso de purificación, la cromatografía de Filtración en Gel. El lecho de la columna, de 31 cm de longitud, está formado por agarosa porosa entrecruzada y unida covalentemente con dextrano. Tirosinasa fue eluída con el mismo tampón de equilibrio con un flujo de 1 mL min⁻¹ y su volumen de elución se determinó a partir del pico de actividad difenolasa. La columna se calibró con azul dextrano y los siguientes marcadores de peso molecular nativos: quimotripsinógeno A (25 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), albúmina (66 kDa), albúmina dimérica (132 kDa), aldolasa (158 kDa) y catalasa (232 kDa). El volumen muerto de la columna (V_o) y los volúmenes de elución (V_e) de los marcadores se determinaron a partir de los picos de absorbancia a 280 nm (proteínas) y 620 nm (azul dextrano). De la representación del coeficiente de partición, K_{av} , determinado como $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$, donde V_t es volumen total del lecho ($V_t = 24$ mL), frente al logaritmo del peso

molecular se obtuvo la recta de calibrado necesaria para la determinación del peso molecular de tirosinasa de raíz de remolacha.

3.2.2. Enzima Ligada a Membranas

Para la purificación de tirosinasa asociada a la fracción de membranas se utilizó la enzima solubilizada a través de tratamiento con Triton X-114. La fracción fue purificada a través de la técnica cromatográfica de Intercambio Iónico. Esta técnica se basa en el establecimiento de interacciones electrostáticas entre la matriz de la columna y las moléculas a separar. Las moléculas adsorbidas se eluyen en función de la fuerza de la interacción, viéndose desplazadas por contraiones de la misma carga neta. Se utilizó una columna Resource-Q cuya matriz de poliestireno y divinilbenzeno (15 μm de tamaño de partícula) se encuentra derivatizada con grupos de trimetilamonio. Se trata por tanto de un intercambiador aniónico fuerte. La columna fue equilibrada con tampón Bis-Tris 20 mM, cuyo pH fue ajustado a 6,0 con ácido clorhídrico. Tirosinasa fue eluída mediante la aplicación de un gradiente lineal de cloruro sódico (cloruro como contraión) desde 0 M a 0,7 M en 50 mL. El flujo utilizado fue de 1,0 mL min⁻¹. Las fracciones que contenían actividad tirosinasa fueron mezcladas, lavadas y concentradas por ultrafiltración (membranas YM-10 de Millipore). La proteína quedó finalmente disuelta en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7,0 con cloruro sódico 0,15 M, lista para ser utilizada en la columna Superdex 200 HR 10/30 y seguir un paso de Filtración en Gel análogo al descrito para la fracción soluble.

4. Determinación de Proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) siguiendo el protocolo de Bio-Rad. Para la elaboración de las rectas de calibrado se utilizó albúmina de suero bovino (Bio-Rad).

5. Técnicas Electroforéticas

5.1. Electroforesis Desnaturalizante

Las electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes se realizaron siguiendo el método de Laemmli (1970). El gel separador utilizado tenía un grosor de 1,5 mm y contenía acrilamida al 10% (p/v) [10% T (monómero total), 0,89% C (bisacrilamida)] en tampón Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 conteniendo SDS 0,1% (p/v), persulfato amónico 0,05% (p/v) y TEMED 0,07% (v/v), éste último como iniciador de la reacción de polimerización. Las muestras fueron aplicadas a un gel concentrador, que contenía acrilamida al 4% (p/v) (4% T, 0,36% C) en tampón Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 conteniendo SDS 0,1% (p/v), persulfato amónico 0,05% (p/v) y TEMED 0,07% (v/v).

Las muestras fueron preparadas por dilución 1:2 con tampón de carga desnaturalizante, formado por tampón Tris-HCl 94 mM, pH 6,8 conteniendo glicerol 15% (v/v), SDS 3% (p/v), azul de bromofenol 0,015% y β -mercaptoetanol 7,5% (v/v). Las muestras fueron calentadas durante 5 min a 100°C.

El tampón de recorrido estaba formado por Tris 25 mM y glicina 0,192 M (pH 8,3) con SDS 0,1% (p/v). Las muestras fueron corridas en un equipo Mini-Protean II de Bio-Rad a una diferencia de potencial constante de 180 V durante 50 min.

5.2. Electroforesis Parcialmente Desnaturalizante

Las electroforesis parcialmente desnaturalizantes se realizaron como se describe en el apartado anterior, pero sin la adición de β -mercaptoetanol al tampón de muestra y sin calentar las muestras para preservar la actividad enzimática de tirosinasa. El detergente SDS se mantuvo en todos los pasos anteriormente mencionados.

5.3. Isoelectroenfoque

El sistema Mini-Protean II se utilizó también para la determinación del perfil isoenzimático nativo de tirosinasa en función del punto isoeléctrico. El gel utilizado como soporte fue de un grosor de 1 mm y estaba formado por acrilamida al 5% (p/v) (5% T, 0,44% C) y glicerol 5% (v/v), conteniendo anfolitos de rango de pH 3,5-10,0 (General Electric Healthcare) 1% (v/v), persulfato amónico 0,05% (p/v) y TEMED 0,07% (v/v).

Las disoluciones de electrodo utilizadas fueron ácido acético 20 mM para el ánodo e hidróxido sódico 25 mM para el cátodo. Las muestras se prepararon por disolución 1:2 con tampón de carga, que consistió en glicerol 15% (v/v) y anfolitos 15% (v/v) en agua. El isoelectroenfoque fue corrido durante 2 horas a 200 V, seguido por 1,5 horas a 400 V. Durante todo el experimento el sistema se mantuvo en frigorífico a 4°C.

6. Tinción de Geles

6.1. Tinción de Proteínas por Azul de Coomassie

Después de la electroforesis, los geles fueron introducidos en disolución de tñido de Coomassie, durante 1 hora, en agitación y a temperatura ambiente. La disolución constó de azul brillante de Coomassie R-250 0,1% (p/v) (obtenido de Sigma), etanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). Tras la tinción, los geles fueron desteñidos en una disolución de etanol 5% (v/v) y ácido acético 7% (v/v) durante 15 horas, revelando las bandas de proteína.

6.2. Tinción de Proteínas por Plata

Para la tinción por plata, se introdujeron primero los geles durante 20 min en disolución de fijación [glicerol 2,5% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y etanol 50% (v/v)]. Tras la fijación, los geles fueron lavados con agua (2 lavados, 10 min) y preparados para la tinción. Ésta se llevó a cabo por adición a los geles de

una disolución formada por 5% (v/v) de disolución de reactivo de plata [nitrato de plata 2% (p/v), nitrato amónico 2% (p/v)], 5% (v/v) de moderador de la reducción [ácido tungstosilícico 10% (p/v)], 5% de reactivo de revelado [formaldehído 2,8% (v/v)] y 50% de acelerador del revelado [carbonato sódico 5% (p/v)]. Una vez que la tinción tuvo lugar, la reacción se detuvo con ácido acético 5%.

6.3. Tinción de Actividad

Después de una electroforesis parcialmente desnaturizante o de un isoelectroenfoque, los geles fueron equilibrados en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6,0 durante 10 min. Las bandas correspondientes a tirosinasa fueron reveladas con el mismo tampón conteniendo tiramina 5 mM, SDS 0,69 mM y MBTH 2 mM (Rodríguez-López et al., 1994). Cuando el inhibidor de tirosinasa tropolona se añadió a la disolución usada para la tinción, se hizo en una concentración 5 mM. La tinción por actividad se llevó a cabo de manera análoga en membranas de PVDF a las que se habían transferido previamente las proteínas separadas en geles parcialmente desnaturizantes (las condiciones de transferencia se detallan en el apartado de Western Blot).

7. Western Blot

Para experimentos de Western Blot se transfirieron las proteínas separadas por medios electroforéticos desde los geles de poliacrilamida a membranas de PVDF (Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo en un módulo Mini Trans-Blot del sistema Mini-Protean III de Bio-Rad a 4°C, bajo agitación constante a 100 V durante 1,5 horas. El tampón de transferencia constó de Tris 25 mM y glicina 0,192 M (pH 8,3) con metanol 15%, para la fracción soluble bajo condiciones desnaturizantes y de ácido acético 0,7% (v/v) con SDS 0,01% (p/v) para proteínas corridas bajo condiciones parcialmente desnaturizantes y para la fracción de membranas. Los geles fueron incubados durante 10 min en tampón de transferencia antes de su unión a la membrana para evitar cambios de tamaño

durante el transcurso de la transferencia. Cuando ésta terminó la membrana se recortó del tamaño del gel. Marcadores preteñidos (Bio-Rad) y tinción reversible de proteínas en la membrana con una disolución de rojo Ponceau S 0,1 % (p/v) en ácido acético 1% (v/v) fueron utilizados para comprobar la eficiencia del proceso. La membrana se bloqueó con tampón de lavado [tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7,2 con cloruro sódico 150 mM y detergente Tween-20 0,1% (v/v)] conteniendo albúmina de suero bovino 3% (p/v), durante 1 hora a 25°C. Tras tres lavados de 10 min con tampón de lavado, la membrana se incubó con el mismo tampón, al que se añadió albúmina de suero bovino 1% (p/v) y anticuerpos policlonales contra tirosinasa de hoja de haba proporcionados por el Dr. William H. Flurkey, de la Indiana State University. Estos anticuerpos fueron realizados en conejo y obtenidos como liofilizado tras precipitación fraccionada con sulfato amónico. La incubación se prolongó durante una noche a 4°C en agitación constante, tras la cual las membranas fueron lavadas e incubadas con tampón de lavado conteniendo albúmina 1% (p/v) y anticuerpos secundarios obtenidos de cabra contra conejo y conjugados con la enzima peroxidasa (Bio-Rad, dilución 1:12.000) durante 1 hora a 25°C, en agitación.

Finalmente, y tras volver a lavar con tampón, las bandas de proteína fueron detectadas utilizando un medio de reacción para peroxidasa que constó de tampón acetato sódico 50 mM, pH 5,0, 4MN 1 mM y peróxido de hidrógeno 0,45 mM (Ferrer et al., 1990). En las transferencias desde geles nativos, las membranas fueron hervidas durante 10 min para evitar la interferencia de posibles peroxidases endógenas. En todos los casos se llevaron a cabo controles en los que la mezcla de reacción fue añadida a membranas en las que se eliminó el paso de incubación con el anticuerpo primario.

8. Ensayos Espectrofotométricos

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un aparato Uvikon 940 (Kontron Instruments, Zurich, Suiza), con baño termostático. Registros consecutivos de espectros fueron llevados a cabo en el mismo equipo.

Alternativamente también fueron realizados en un espectrofotómetro de diodos HP 8452A (Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemania) acoplado a un módulo termoeléctrico HP 89090A (Hewlett-Packard).

8.1. Ensayos Enzimáticos sobre Fenoles Sencillos

Las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa de raíz de remolacha fueron determinadas para diferentes sustratos a 25°C siguiendo la aparición de los productos de reacción en el medio.

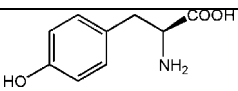
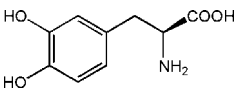
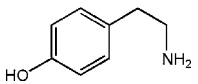
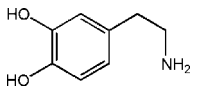
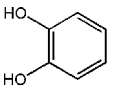
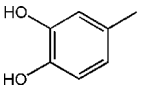
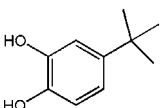
Substrato	Estructura	λ_m (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
L-tirosina		475	3.600
L-DOPA		475	3.600
tiramina		480	3.300
dopamina		480	3.300
catecol		390	1.450
4MC		400	1.350
4tBC		400	1.150

Tabla 3.1. Estructuras de los sustratos de tirosinasa utilizados y características de absorción de sus productos de reacción.

La oxidación de los sustratos catecol, 4MC, 4tBC fue seguida por la aparición de la correspondiente *o*-benzoquinona coloreada. Para los compuestos con grupos amonio susceptibles de experimentar ciclación interna, la reacción se siguió a través de la formación del correspondiente compuesto aminocromo. La tabla 3.1 muestra los valores de los coeficientes de absorción molar y las longitudes de onda de medida utilizados en cada caso (Waite, 1976). El análisis

de los datos cinéticos se llevó a cabo mediante regresión lineal y no lineal (Marquardt, 1963), usando el programa SigmaPlot para Windows (v 8.0, SPSS, Chicago, EEUU).

8.2. Ensayos Enzimáticos sobre Betalaínas

Para los ensayos con betaxantinas, el medio de reacción contenía tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6,0 y enzima tirosinasa de hongo ($12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) o de raíz de remolacha ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Se usaron cubetas de cuarzo de 0,5 y 1 cm de paso óptico. Para betanidina, el medio de reacción contenía tampón acetato sódico 20 mM, pH 5,0 y $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de enzima tirosinasa de hongo. La formación del producto de reacción correspondiente se siguió a 400 nm. El efecto del pH en la estabilidad de esta betacianina se midió en tampón acetato sódico 20 mM (pH 3,0-5,5) y en tampón fosfato sódico 20 mM (pH 5,5-8,0).

Los coeficientes de absorción molar, absolutos o aparentes, de los productos derivados de los nuevos substratos de tirosinasa fueron determinados por medio de medidas a punto final, partiendo de concentraciones conocidas de los compuestos. Los resultados obtenidos se ajustaron por regresión lineal. Los coeficientes fueron determinados a las longitudes de onda $\lambda = 480 \text{ nm}$ (dopaxantina, tiramina-betaxantina y dopamina-betaxantina) y $\lambda = 400 \text{ nm}$ (betanidina).

8.3. Cuantificación de Betalaínas

La concentración de pigmentos puros fue determinada por medidas de absorbancia, considerando un coeficiente de absorción molar de $\varepsilon = 48.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 480 nm para las betaxantinas (Trezzini y Zrýd, 1991b; Schliemann et al., 1999). Para las betacianinas consideradas, los coeficientes utilizados fueron $\varepsilon = 65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\varepsilon = 54.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 536 nm para betanina y betanidina respectivamente (Schwartz y von Elbe, 1980). Las medidas fueron realizadas en disoluciones acuosas a 25°C.

9. Extracción de Pigmentos

9.1. Betanina de Raíz de Remolacha Roja

Se utilizó remolacha roja (*Beta vulgaris*) adquirida en mercado local en Murcia. Las raíces fueron peladas, troceadas y homogeneizadas con tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,0 en una batidora 230 Omnimixer durante 10 segundos a máxima potencia. El homogenado obtenido se filtró a través de dos capas de gasa y se centrifugó a 120.000g durante 40 min. El precipitado fue desechado y el sobrenadante se ultrafiltró a través de membranas YM-10 de Millipore montadas en una célula con agitación Amicon 8050 (Millipore) con presión por nitrógeno (Air Liquide). Todos los pasos se desarrollaron a 4°C.

9.2. Pigmentos de Flores

La extracción de los pigmentos de flores de diversas plantas se llevó a cabo en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,0 conteniendo AA 10 mM. Se utilizó un homogeneizador Polytron (Kinematica AG, Littau, Suiza) a media potencia durante 2 pulsos de 5 segundos. El homogenado así obtenido fue filtrado a través de tela de nailon y centrifugado a 120.000g durante 40 min. El precipitado fue descartado y el sobrenadante se ultrafiltró a través de membranas YM-10 de Millipore en un sistema de filtración para centrífuga Centriplus de Millipore. Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C. La extracción del pigmento betanidina de flores violetas de *Lampranthus productus* se llevó a cabo en tampón acetato sódico 10 mM, pH 5,0, por favorecer este pH su estabilidad, siendo el resto de pasos iguales.

Los extractos de flores se realizaron con muestras frescas recién cortadas. Sólo en el caso de *Lampranthus productus* fenotipo amarillo se congelaron pétalos cortados y lavados en cámara a -80°C para garantizar un stock suficiente del pigmento dopaxantina. De cualquier modo los datos aportados respecto a la cantidad de pigmento u otros compuestos fueron obtenidos a partir de muestras frescas. Adicionalmente y sólo con fines analíticos, se realizaron extractos de las

flores en metanol puro bajo las mismas condiciones de homogeneización descritas. Los extractos fueron filtrados a través de membranas de PVDF de 0,45 μm de diámetro de poro (Millipore) antes de su análisis por HPLC.

10. Semisíntesis de Betaxantinas

Las betaxantinas sintéticas se obtuvieron por condensación entre el grupo amino de un aminoácido (formas L de DOPA, tirosina, glutamina, ácido glutámico, ácido aspártico, sulfóxido de metionina, prolina, alanina, fenilalanina, metionina, histidina y leucina, y formas D de DOPA y tirosina) o amina (dopamina y tiramina) y el grupo aldehído del ácido betalámico (reacción de Schiff). El ácido se obtuvo por hidrólisis a temperatura ambiente de disoluciones 0,15 mM de betanina purificada. El pH de la disolución se elevó hasta un valor de 11,4 con amoníaco lo que provocó la degradación de betanina para formar *ciclo*-DOPA-glucósido y ácido betalámico. A la misma cubeta de reacción se añadieron con anterioridad a la hidrólisis 700 μmol del aminoácido o amina correspondiente por μmol de ácido betalámico. La condensación se produjo al hacer descender el pH del medio por la adición de ácido acético glacial hasta alcanzar pH 5,0, manteniendo la cubeta de reacción refrigerada con hielo. Antes de su uso, todas las disoluciones empleadas fueron burbujeadas con nitrógeno durante 20 min para eliminar el oxígeno que contenían. Así mismo, todo el proceso se realizó bajo atmósfera de nitrógeno.

11. Purificación de Betalaínas

11.1. Cromatografía en Gel G-25

A partir del extracto de remolacha, betanina fue purificada a través de cromatografía en columnas de cristal de 30 mL rellenas con gel Sephadex G-25 (dextrano entrecruzado, 80 μm de tamaño de partícula), obtenido de Sigma (Escribano et al., 1998). La elución se desarrolló en 40 mL, usando agua como fase móvil y fue seguida midiendo absorbancia a 480 y 536 nm. Se recogieron

fracciones de 1 mL y aquellas conteniendo betanina fueron mezcladas y usadas como fuente de pigmento purificado.

11.2. Cromatografía en Q-Sepharosa

Inmediatamente después de su síntesis parcial, o bien a partir de extractos naturales ultrafiltrados, se llevó a cabo un proceso de purificación de betaxantinas. La purificación se realizó en columnas Q Sepharose Fast Flow (General Electric Healthcare) de intercambio aniónico formadas por una matriz de agarosa entrecruzada (90 μm de tamaño de partícula), derivatizada con grupos trimetilamonio. Se utilizó el equipo de purificación automático Äkta purifier (General Electric Healthcare) y las eluciones fueron seguidas a 280, 420, 480 y 536 nm.

Los disolventes usados fueron tampón BisTris 20 mM, pH 6,0 (disolvente A) y tampón BisTris 20 mM, pH 6,0 con cloruro sódico 2 M (disolvente B). Se utilizaron dos volúmenes de columna distintos, 1 y 5 mL, con la misma longitud. Para la columna de 1 mL el protocolo de elución (Método A) fue el siguiente: 100% A desde la inyección de la muestra hasta 7,5 mL (para eluciones analíticas) o hasta 15 mL (para eluciones semipreparativas), seguido de un gradiente lineal desde 0% B hasta 35% B en 20 mL, recogándose fracciones de 1 mL. Los procesos de lavado (7 mL, 50% B) y reequilibrado (7 mL, 100% A) de la columna se incluyeron en el mismo protocolo detrás de cada elución. El volumen de inyección para eluciones analíticas fue de 50 μL (flujo 0,4 mL min⁻¹) y de 1 mL para semipreparativas (flujo 0,5 mL min⁻¹).

Para la columna de 5 mL, el lavado inicial se realizó con 75 mL de disolvente A y el gradiente se desarrolló desde 0% B a 35% B en 100 mL. El volumen de inyección fue 5 mL y en este caso las fracciones recogidas fueron de 2 mL, con un flujo aplicado de 1 mL min⁻¹.

La purificación de betanidina a partir de extractos ultrafiltrados de flores violetas de *Lampranthus productus* se llevó a cabo con un proceso análogo en el

que la fase móvil utilizada estaba basada en tampón acetato sódico 10 mM, pH 5,0.

11.3. Extracción en Fase Sólida con Cartuchos C-18

Para eliminar el contenido de sales y tampones de betaxantinas se utilizaron cartuchos C-18, de un volumen de 1 mL y tamaño de partícula 80 μm (matriz de sílice derivatizada con grupos alquilo de 18 átomos de carbono), obtenidos de Waters (Milford, EEUU). Los procesos de activación (5 mL de metanol, seguidos de 10 mL de agua), carga y elución fueron operados manualmente con jeringuillas de 1 y 5 mL. Las betaxantinas derivadas de DOPA y tirosina fueron eluidas con agua y aquellas derivadas de tiramina y dopamina así como la betacianina betanidina fueron eluidas con acetona. Las fracciones orgánicas fueron concentradas a sequedad en rotavapor a temperatura ambiente y las acuosas fueron congeladas en nitrógeno líquido y liofilizadas.

12. Espectrometría de Fluorescencia

Los ensayos espectrofluorimétricos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de fluorescencia LS50B (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, EEUU) equipado con una célula termostatizable. Las medidas fueron realizadas en agua a 25°C en cubetas de cuarzo de 3 mL. Para la obtención de los espectros de excitación y de emisión de betaxantinas, la concentración final de los compuestos fue 6 μM , excepto para el pigmento derivado del sulfóxido de metionina para el que la concentración final utilizada fue 3 μM debido a la mayor intensidad de fluorescencia que presentaba. El espectro de excitación de cada especie fue obtenido siguiendo la fluorescencia a la máxima longitud de onda de emisión. Así mismo, el espectro de emisión se obtuvo excitando a la correspondiente longitud de onda máxima. Ambos valores máximos se obtuvieron de experimentos previos bajo las mismas condiciones.

13. Análisis por Cromatografía de Alto Rendimiento (HPLC)

Análisis de betalaínas por HPLC, aplicando cromatografía en fase reversa se llevaron a cabo de manera general en un equipo Shimadzu LC-10A (Shimadzu, Kyoto, Japón), usando una columna Kromasil 100 C-18 (250 × 4.6 mm) con partículas de 5 µm de tamaño, suministrada por Teknokroma (Barcelona, España). La elución de los compuestos se llevó a cabo mediante la aplicación de un gradiente lineal entre dos disolventes desgasificados con helio. El disolvente A (condiciones iniciales) fue agua acidificada con 0,05% TFA y el disolvente B estaba compuesto por acetonitrilo con 0,05% TFA. El gradiente se desarrolló durante 25 min desde 0% B hasta 35% B a 25°C con un flujo aplicado de 1 mL min⁻¹.

Para el análisis de la reacción enzimática de tirosinasa sobre betanidina se utilizó un sistema de fase móvil diferente. En este caso los disolventes utilizados, igualmente desgasificados con helio, fueron tampón acetato sódico 10 mM, pH 5,0 (disolvente A) y metanol puro (disolvente B). Un gradiente lineal se aplicó pasando de 90% A, 10% B a 40% A, 60% B en 11 min. El flujo fue de 1 mL min⁻¹, a 25° C.

13.1. Detector de Absorbancia (PDA)

El detector de fotodiodos en serie SPD-M10A (Shimadzu) fue utilizado para seguir las eluciones cromatográficas de HPLC por absorbancia a las longitudes de onda 405, 480 y 536 nm. Se registraron las longitudes de onda comprendidas entre 250 y 700 nm, obteniendo espectros de absorbancia de todas las especies analizadas. El volumen de inyección cuando se trabajó con este detector fue de 20 µL.

13.2. Detector de Fluorescencia

Para la detección por fluorescencia de betaxantinas se utilizó un detector RF-10AXL (Shimadzu). La excitación de los compuestos se llevó a cabo a 460

nm y la luz emitida fue seguida a 510 nm. El volumen de inyección con este detector fue de 10 μL .

Estudios preliminares en detección por fluorescencia de betaxantinas después de separación analítica por HPLC fueron llevados a cabo en un equipo Alliance 2695 de Waters, bajo las condiciones descritas.

13.3. Detector de Espectrometría de Masas

Tras la separación cromatográfica por HPLC, se realizaron análisis de espectrometría de masas con ionización por electrospray (HPLC-ESI-MS) con un equipo Agilent VL 1100 equipado con un detector LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Palo Alto, EEUU). Las condiciones de separación fueron las descritas con anterioridad, usando una columna Zorbax SB-C18 (30×2.1 mm) de 3.5 μm de tamaño de partícula (Agilent Technologies) y con un flujo de 0,3 mL min^{-1} .

La temperatura de vaporización utilizada fue 350°C, manteniendo un voltaje constante de 3,5 kV. Se usó nitrógeno como gas protector, operado a una presión de 35 psi. La ionización de las muestras se realizó en modo positivo y se detectaron masas en el rango m/z 60-600. El voltaje del multiplicador electrónico del detector fue 1.350 V.

14. Técnicas de Imagen

14.1. Fotografía de Fluorescencia

Las imágenes de fotografía de fluorescencia fueron tomadas usando un filtro de excitación que limitaba las longitudes de onda que eran recibidas por la muestra al rango comprendido entre 360 y 480 nm. Otro filtro se usó para bloquear la radiación no absorbida, reflejada por la muestra con longitudes de onda por debajo de 490 nm. Ambos filtros han sido desarrollados y suministrados por Physical Sciences (Andover, EEUU). Los espectros de la luz transmitida por los filtros se muestran en la Figura 2 del Capítulo X.

14.2. Microscopía Convencional

El microscopio vertical Leica DMRB (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) fue utilizado para la obtención de imágenes de secciones frescas de tejido vegetal, utilizándose las técnicas de campo claro y epifluorescencia. En este último caso los haces de luz fueron filtrados usando el sistema de filtros I3 (Leica Microsystems), que limitó la luz de excitación al rango 450-490 nm.

14.3. Microscopía Confocal

Imágenes de microscopía confocal por transmisión y fluorescencia fueron obtenidas en un microscopio Leica TCS SP (Leica Microsystems), el cual estaba equipado con un láser de argón. Las imágenes fueron tomadas de muestras frescas y aquellas que involucraron fluorescencia fueron realizadas por excitación a 488 nm con el haz de luz coherente obtenido del láser. La emisión se recogió en el rango de longitudes de onda 500-525 nm.

Capítulo IV. “Purification and Characterization of a Latent Polyphenol Oxidase from Beet Root (*Beta vulgaris* L.)”

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2004**, 52, pp 609-615
DOI: 10.1021/jf034381m

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759157>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2004**, 52, pp 609-615
DOI: 10.1021/jf034381m

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759157>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2004**, 52, pp 609-615
DOI: 10.1021/jf034381m

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759157>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2004**, 52, pp 609-615
DOI: 10.1021/jf034381m

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759157>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2004**, 52, pp 609-615
DOI: 10.1021/jf034381m

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759157>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2004**, 52, pp 609-615
DOI: 10.1021/jf034381m

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759157>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2004**, 52, pp 609-615
DOI: 10.1021/jf034381m

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759157>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2004**, 52, pp 609-615
DOI: 10.1021/jf034381m

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759157>

Capítulo V. “Evidence for a Common Regulation in the
Activation of a Polyphenol Oxidase by
Trypsin and Sodium Dodecyl Sulfate”

Biological Chemistry, **2005**, 6, pp 601-607
DOI: 10.1515/BC.2005.070

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006247>

Biological Chemistry, **2005**, 6, pp 601-607
DOI: 10.1515/BC.2005.070

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006247>

Biological Chemistry, **2005**, 6, pp 601-607
DOI: 10.1515/BC.2005.070

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006247>

Biological Chemistry, **2005**, 6, pp 601-607
DOI: 10.1515/BC.2005.070

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006247>

Biological Chemistry, **2005**, 6, pp 601-607
DOI: 10.1515/BC.2005.070

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006247>

Biological Chemistry, **2005**, 6, pp 601-607
DOI: 10.1515/BC.2005.070

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006247>

Biological Chemistry, **2005**, 6, pp 601-607
DOI: 10.1515/BC.2005.070

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006247>

Biological Chemistry, **2005**, 6, pp 601-607
DOI: 10.1515/BC.2005.070

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006247>

**Capítulo VI. “Differential Activation of a Latent
Polyphenol Oxidase Mediated by
Sodium Dodecyl Sulfate”**

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**, 53, pp 6825-6830
DOI: 10.1021/jf050505e

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104806>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**, 53, pp 6825-6830
DOI: 10.1021/jf050505e

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104806>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**, 53, pp 6825-6830
DOI: 10.1021/jf050505e

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104806>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**, 53, pp 6825-6830
DOI: 10.1021/jf050505e

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104806>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**, 53, pp 6825-6830
DOI: 10.1021/jf050505e

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104806>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**, 53, pp 6825-6830
DOI: 10.1021/jf050505e

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104806>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**, 53, pp 6825-6830
DOI: 10.1021/jf050505e

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104806>

Capítulo VII. “Development of a Protocol for Preparative Synthesis and Purification of Betaxanthins”

Phytochemical Analysis, **2006**, *17*, pp 262-269
DOI: 10.1002/pca.909

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16910043>

Phytochemical Analysis, **2006**, *17*, pp 262-269
DOI: 10.1002/pca.909

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16910043>

Phytochemical Analysis, **2006**, *17*, pp 262-269
DOI: 10.1002/pca.909

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16910043>

Phytochemical Analysis, **2006**, *17*, pp 262-269
DOI: 10.1002/pca.909

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16910043>

Phytochemical Analysis, **2006**, *17*, pp 262-269
DOI: 10.1002/pca.909

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16910043>

Phytochemical Analysis, **2006**, *17*, pp 262-269
DOI: 10.1002/pca.909

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16910043>

Phytochemical Analysis, **2006**, *17*, pp 262-269
DOI: 10.1002/pca.909

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16910043>

Phytochemical Analysis, **2006**, *17*, pp 262-269
DOI: 10.1002/pca.909

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16910043>

Phytochemical Analysis, **2006**, *17*, pp 262-269
DOI: 10.1002/pca.909

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16910043>

**Capítulo VIII. “Fluorescent Pigments. New Perspectives in
Betain Research and Applications”**

Food Research International, **2005**, 38, pp 879-884

DOI: 10.1016/j.foodres.2005.01.012

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996905000906>

Food Research International, **2005**, 38, pp 879-884
DOI: 10.1016/j.foodres.2005.01.012

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996905000906>

Food Research International, **2005**, 38, pp 879-884
DOI: 10.1016/j.foodres.2005.01.012

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996905000906>

Food Research International, **2005**, 38, pp 879-884
DOI: 10.1016/j.foodres.2005.01.012

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996905000906>

Food Research International, **2005**, 38, pp 879-884
DOI: 10.1016/j.foodres.2005.01.012

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996905000906>

Food Research International, **2005**, 38, pp 879-884
DOI: 10.1016/j.foodres.2005.01.012

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996905000906>

Food Research International, **2005**, 38, pp 879-884
DOI: 10.1016/j.foodres.2005.01.012

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996905000906>

**Capítulo IX. “A Novel Method Using High-Performance
Liquid Chromatography with Fluorescence Detection
for the Determination of Betaxanthins”**

Journal of Chromatography A, **2005**, 1078, pp 83-89
DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.013

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007985>

Journal of Chromatography A, **2005**, 1078, pp 83-89
DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.013

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007985>

Journal of Chromatography A, **2005**, 1078, pp 83-89
DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.013

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007985>

Journal of Chromatography A, **2005**, 1078, pp 83-89
DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.013

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007985>

Journal of Chromatography A, **2005**, 1078, pp 83-89
DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.013

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007985>

Journal of Chromatography A, **2005**, 1078, pp 83-89
DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.013

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007985>

Journal of Chromatography A, **2005**, 1078, pp 83-89
DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.013

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007985>

Journal of Chromatography A, **2005**, 1078, pp 83-89
DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.013

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007985>

Capítulo X. “Betaxanthins as Pigments Responsible
for Visible Fluorescence in Flowers”

Planta, **2005**, 222, pp 586-593
DOI: 10.1007/s00425-005-0004-3

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177911>

Planta, **2005**, 222, pp 586-593
DOI: 10.1007/s00425-005-0004-3

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177911>

Planta, **2005**, 222, pp 586-593
DOI: 10.1007/s00425-005-0004-3

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177911>

Planta, **2005**, 222, pp 586-593
DOI: 10.1007/s00425-005-0004-3

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177911>

Planta, **2005**, 222, pp 586-593
DOI: 10.1007/s00425-005-0004-3

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177911>

Planta, **2005**, 222, pp 586-593
DOI: 10.1007/s00425-005-0004-3

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177911>

Planta, **2005**, 222, pp 586-593
DOI: 10.1007/s00425-005-0004-3

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177911>

Planta, **2005**, 222, pp 586-593
DOI: 10.1007/s00425-005-0004-3

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177911>

Planta, **2005**, 222, pp 586-593
DOI: 10.1007/s00425-005-0004-3

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177911>

Capítulo XI. “Floral Fluorescence Effect”

Nature, **2005**, 437, p 334

DOI: 10.1038/437334a

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16163341>

Nature, **2005**, 437, p 334
DOI: 10.1038/437334a

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16163341>

Nature, **2005**, 437, p 334
DOI: 10.1038/437334a

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16163341>

Nature, **2005**, 437, p 334
DOI: 10.1038/437334a

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16163341>

Nature, **2005**, 437, p 334
DOI: 10.1038/437334a

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16163341>

Nature, **2005**, 437, p 334
DOI: 10.1038/437334a

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16163341>

Capítulo XII. “Betaxanthins as Substrates for Tyrosinase. An Approach to the Role of Tyrosinase in the Biosynthetic Pathway of Betalains”

Plant Physiology, **2005**, 138, pp 421-432

DOI: 10.1104/pp.104.057992

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805475>

Plant Physiology, **2005**, 138, pp 421-432
DOI: 10.1104/pp.104.057992

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805475>

Plant Physiology, **2005**, 138, pp 421-432
DOI: 10.1104/pp.104.057992

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805475>

Plant Physiology, **2005**, 138, pp 421-432
DOI: 10.1104/pp.104.057992

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805475>

Plant Physiology, **2005**, 138, pp 421-432
DOI: 10.1104/pp.104.057992

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805475>

Plant Physiology, **2005**, 138, pp 421-432
DOI: 10.1104/pp.104.057992

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805475>

Plant Physiology, **2005**, 138, pp 421-432
DOI: 10.1104/pp.104.057992

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805475>

Plant Physiology, **2005**, 138, pp 421-432
DOI: 10.1104/pp.104.057992

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805475>

Plant Physiology, **2005**, 138, pp 421-432
DOI: 10.1104/pp.104.057992

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805475>

Plant Physiology, **2005**, 138, pp 421-432
DOI: 10.1104/pp.104.057992

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805475>

Plant Physiology, **2005**, 138, pp 421-432
DOI: 10.1104/pp.104.057992

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805475>

Plant Physiology, **2005**, 138, pp 421-432
DOI: 10.1104/pp.104.057992

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805475>

Plant Physiology, **2005**, 138, pp 421-432
DOI: 10.1104/pp.104.057992

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805475>

Capítulo XIII. “Characterization of the Activity of
Tyrosinase on Betaxanthins Derived
from R-Amino Acids”

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**, 53, pp 9207-9212
DOI: 10.1021/jf0514120

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16277424>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**, 53, pp 9207-9212
DOI: 10.1021/jf0514120

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16277424>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**, 53, pp 9207-9212
DOI: 10.1021/jf0514120

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16277424>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**, 53, pp 9207-9212
DOI: 10.1021/jf0514120

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16277424>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**, 53, pp 9207-9212
DOI: 10.1021/jf0514120

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16277424>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**, 53, pp 9207-9212
DOI: 10.1021/jf0514120

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16277424>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**, 53, pp 9207-9212
DOI: 10.1021/jf0514120

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16277424>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2005**, 53, pp 9207-9212
DOI: 10.1021/jf0514120

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16277424>

Capítulo XIV. “Characterization of the Monophenolase
Activity of Tyrosinase on Betaxanthins. The
Tyramine-betaxanthin/Dopamine-betaxanthin Pair”

Planta, **2005**, 222, pp 307-318
DOI: 10.1007/s00425-005-1526-4

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968512>

Planta, **2005**, 222, pp 307-318
DOI: 10.1007/s00425-005-1526-4

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968512>

Planta, **2005**, 222, pp 307-318
DOI: 10.1007/s00425-005-1526-4

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968512>

Planta, **2005**, 222, pp 307-318
DOI: 10.1007/s00425-005-1526-4

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968512>

Planta, **2005**, 222, pp 307-318
DOI: 10.1007/s00425-005-1526-4

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968512>

Planta, **2005**, 222, pp 307-318
DOI: 10.1007/s00425-005-1526-4

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968512>

Planta, **2005**, 222, pp 307-318
DOI: 10.1007/s00425-005-1526-4

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968512>

Planta, **2005**, 222, pp 307-318
DOI: 10.1007/s00425-005-1526-4

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968512>

Planta, **2005**, 222, pp 307-318
DOI: 10.1007/s00425-005-1526-4

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968512>

Planta, **2005**, 222, pp 307-318
DOI: 10.1007/s00425-005-1526-4

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968512>

Planta, **2005**, 222, pp 307-318
DOI: 10.1007/s00425-005-1526-4

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968512>

Planta, **2005**, 222, pp 307-318
DOI: 10.1007/s00425-005-1526-4

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968512>

Planta, **2005**, 222, pp 307-318
DOI: 10.1007/s00425-005-1526-4

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968512>

Capítulo XV. “Characterization of the Activity of Tyrosinase on the Structural Unit of Betacyanins”

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2007**, 55, pp 1546-1551
DOI: 10.1021/jf062858z

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17256962>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2007**, 55, pp 1546-1551
DOI: 10.1021/jf062858z

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17256962>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2007**, 55, pp 1546-1551
DOI: 10.1021/jf062858z

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17256962>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2007**, 55, pp 1546-1551
DOI: 10.1021/jf062858z

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17256962>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2007**, 55, pp 1546-1551
DOI: 10.1021/jf062858z

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17256962>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2007**, 55, pp 1546-1551
DOI: 10.1021/jf062858z

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17256962>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2007**, 55, pp 1546-1551
DOI: 10.1021/jf062858z

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17256962>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2007**, 55, pp 1546-1551
DOI: 10.1021/jf062858z

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17256962>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2007**, 55, pp 1546-1551
DOI: 10.1021/jf062858z

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17256962>

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2007**, 55, pp 1546-1551
DOI: 10.1021/jf062858z

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17256962>

Capítulo XVI. Discusión General

1. Caracterización de Tirosinasa de Raíz de Remolacha y su Activación

1.1. Extracción y Purificación

La enzima tirosinasa de raíz de remolacha fue obtenida por fraccionamiento subcelular, separando la fracción soluble de la ligada a membranas. La mayor parte de la actividad tirosinasa fue detectada en forma soluble. La enzima asociada a las membranas se solubilizó de modo independiente siguiendo tres procedimientos distintos: sonicación, tratamiento con cloruro sódico y tratamiento con el detergente Triton X-114. El uso de sonicación apenas liberó actividad y fue descartado en posteriores consideraciones. La finalidad del tratamiento con cloruro sódico es debilitar las uniones de tipo iónico entre las moléculas y posibilitar así la liberación de proteínas asociadas a las membranas a través de este tipo de interacción. Por su parte, la utilización de Triton X-114 implica la desintegración de las membranas por el efecto del detergente sobre los lípidos que las constituyen. Este último procedimiento liberó mayor cantidad de enzima, obteniéndose además una actividad específica más alta (Tabla 4.1). Para determinar si la enzima extraída por el tratamiento salino presentaba alguna diferencia respecto de la enzima no extraída por este método y sólo liberada con Triton X-114, las membranas descartadas del proceso de solubilización con cloruro sódico fueron procesadas nuevamente con el método del detergente. Ello liberó nueva enzima. Todas estas fracciones presentaron análogos resultados en cuanto a su grado de latencia, movilidad en geles de poliacrilamida corridos bajo condiciones parcialmente desnaturalizantes y propiedades cinéticas medidas de forma preliminar frente a los substratos dopamina y 4tBC. Esto sugiere que tirosinasa se encuentra estrechamente ligada a las membranas, y que sólo tras la disgregación de estas últimas la enzima puede ser liberada. Se puede concluir que el procedimiento de extracción por Triton X-114 es el más eficiente de los utilizados, preservando además la latencia de tirosinasa, por lo cual la enzima extraída de membranas por este procedimiento se utilizó para una posterior purificación y caracterización.

En la purificación cromatográfica de la enzima se optimizaron las condiciones para separar el pico de actividad de la mayor cantidad posible de proteína, seguida por absorbancia a 280 nm (Figura 4.2). Durante el proceso se puso de manifiesto la labilidad de tirosinasa de raíz de remolacha cuando se somete a una interacción cromatográfica, invalidando los intentos de un segundo paso de purificación distinto del de Filtración en Gel. La labilidad de la enzima durante su purificación ha sido también descrita para otras fuentes, incluyendo callos productores de betacianinas y raíz de zanahoria (Söderhäll, 1995; Steiner et al., 1999). Sin embargo, las propiedades moleculares de la enzima pudieron ser investigadas. Mediante cromatografía de Filtración en Gel se estimó un peso molecular de 55 kDa para la forma soluble y de 54 kDa para la enzima ligada a membranas, no encontrándose evidencia alguna de la posible existencia de oligómeros. Estos resultados se vieron apoyados por los análisis electroforéticos desarrollados (Figuras 4.3 y 4.4), que evidenciaron, bajo condiciones desnaturalizantes, la presencia de una única banda de proteínas teñida por la técnica de plata. El peso molecular estimado a partir de la movilidad electroforética fue de 60 kDa para las dos fracciones consideradas. Para confirmar que la banda obtenida efectivamente correspondía a la tirosinasa purificada, se desarrollaron experimentos de reconocimiento por anticuerpos de la enzima tras la separación electroforética y transferencia a membranas (Western). Los anticuerpos utilizados, desarrollados en conejo contra una tirosinasa purificada de hoja de haba, fueron capaces de reconocer la enzima de remolacha, obteniéndose para la fracción soluble una única banda que correspondía exactamente a la teñida por la técnica de plata. La fracción de membranas rindió la misma banda de 60 kDa, coincidente con la revelada por plata, y una adicional de menor peso molecular que fue atribuida a una forma proteolizada de tirosinasa presente en el extracto inicial o a una reacción cruzada con otra proteína de membrana.

1.2. Latencia y Caracterización Cinética

Una de las características más llamativas de la enzima tirosinasa descrita en la bibliografía es la posibilidad de su existencia en una forma latente que puede activarse por diversos tratamientos. Ello genera que a nivel fisiológico pueda existir una cantidad de enzima disponible rápidamente cuando es necesaria en presencia del efector adecuado. Es conocido que la presencia en el medio del detergente SDS provoca un cambio limitado en la estructura de la enzima (Moore y Flurkey, 1990) que promueve su actividad. Con el trabajo descrito en la presente memoria se ha puesto de manifiesto como esta modificación conformacional no implica en la enzima de raíz de remolacha un mecanismo “todo-nada” (On-Off), sino que existe una gradación en el cambio, pasando por estados intermedios. Las diferencias entre los estados vienen marcadas por la posibilidad de acceso de determinados substratos al centro activo y su existencia puede ser interpretada en función del número de monómeros de SDS que se unen a la enzima durante el proceso. De este modo, desde la unión de las primeras moléculas de SDS a concentración baja de detergente se produce la activación de la enzima, observándose un aumento de la velocidad de reacción, para los substratos más hidrofóbicos, mientras que la activación para substratos hidrofílicos necesita de la unión de más moléculas de SDS (Figuras 6.3 y 6.4). Ello puede ser indicativo de la presencia en el entorno del centro activo de residuos de aminoácido capaces de bloquear el acceso de los substratos al mismo, siendo más eficaz el impedimento impuesto a los substratos hidrofílicos. El cambio conformacional provocado por el SDS modificaría la zona de acceso de los substratos al centro activo, abriendo más la misma conforme se unen más moléculas de detergente a la enzima. La existencia de formas enzimáticas con diferente actividad para los substratos, en función del número de moléculas de SDS que incorporan, ha sido integrada en el modelo cinético descrito en el Capítulo VI. Este modelo es capaz de describir el comportamiento sigmoideal de la activación de tirosinasa frente a substratos hidrofílicos, en función de la concentración de SDS.

El tratamiento con la proteasa tripsina también provocó la activación de tirosinasa de raíz de remolacha. Las características de esta activación fueron muy similares a las observadas en presencia de SDS para el sustrato dopamina en cuanto a grado de activación final, propiedades cinéticas (Tabla 5.1) y perfil de pH (Figuras 4.1 y 5.4). Además se ha encontrado que la acción de tripsina provoca la insensibilidad de la actividad enzimática resultante a la presencia de SDS (Tabla 5.1 y Figuras 5.3 y 5.4). La observación es compatible con la existencia de un mecanismo de regulación común para estos dos tratamientos. Atendiendo a las características estudiadas de la activación de tirosinasa de raíz de remolacha, se puede proponer la presencia de una porción de la enzima o péptido que bloquea el acceso de los sustratos al centro activo. Éste podría ser alternativamente eliminado por el tratamiento con proteasa o desplazado por efecto del cambio conformacional provocado por el SDS. Su existencia está de acuerdo con la “región escudo” descrita en la estructura de las hemocianinas y que podría tener un análogo en la forma latente de catecol oxidasa a partir de los modelos estructurales desarrollados (Gerdemann et al., 2002a y 2002b).

Debido a la influencia del SDS sobre la actividad de la enzima nativa, la caracterización cinética de la misma se llevó a cabo en ausencia y presencia del detergente. La afinidad de la enzima por una amplia variedad de sustratos no se vio afectada por la presencia de SDS. Sin embargo, la velocidad de reacción aumentó considerablemente para la fracción soluble de la enzima y especialmente para la ligada a membranas (Tabla 6.1). La modificación de la velocidad de reacción es reflejo del mejor acceso de los sustratos al centro activo de la enzima, tal y como se ha comentado anteriormente. El hecho de que los valores de K_m no varíen puede interpretarse como una preservación del centro activo de la enzima a pesar del cambio conformacional inducido en su entorno.

2. Caracterización de la Fluorescencia de Betaxantinas.

2.1. Síntesis y Purificación de Betaxantinas

El objetivo de abordar estudios sobre las propiedades ópticas de betaxantinas y acerca de la ruta biosintética de betalaínas, promovió la necesidad de establecer un método general para la obtención y purificación de los pigmentos amarillos. El protocolo desarrollado (Capítulo VII) se basa en la posibilidad de provocar un cambio del residuo condensado con el ácido betalámico a través de una reacción de condensación de Schiff para la formación de iminas (Figura 7.1) (Wyler et al., 1965). El proceso de descomposición del compuesto de partida (betanina), para rendir ácido betalámico, y la condensación de éste con el aminoácido o amina seleccionado para formar la correspondiente betaxantina se realizó por cambios de pH en el medio de reacción. Todos los compuestos de partida fueron dispuestos en el mismo matraz bajo atmósfera de nitrógeno, favoreciendo la formación de la betaxantina por la presencia de una alta concentración del compuesto amino. El exceso del mismo necesita ser eliminado una vez que la reacción ha concluido, así como el CDG, el otro compuesto procedente de la degradación de betanina. Para ello se utilizó un paso de purificación cromatográfica basado en un intercambiador aniónico (Q-Sefarosa), con el que todas las betaxantinas interaccionaron independientemente del residuo condensado. Por otro lado, los aminoácidos, aminas y el CDG eluyeron en la fracción inicial de lavado, sugiriendo la implicación del ácido betalámico en la interacción de los pigmentos. La presencia en esta molécula de dos grupos carboxilo, desprotonados al pH de trabajo, apoya esta hipótesis. El grupo amino condensado fortalece o debilita la unión de la betaxantina a la matriz en función de su naturaleza, observándose en general que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos determinó que las betaxantinas eluyeran fácilmente, mientras que la presencia de grupos hidroxilo o carboxilo fortalecieron la interacción. Por tanto, el comportamiento de las betaxantinas en la resina de intercambio aniónico se corresponde con el de una interacción iónica convencional, en contra de lo sugerido para intercambiadores catiónicos con

anterioridad en la bibliografía (Delgado-Vargas et al., 2000). Siguiendo el procedimiento descrito se obtuvieron betaxantinas puras con rendimientos superiores a los descritos en la bibliografía para compuestos no purificados (Tabla 7.1) (Schliemann et al., 1999).

Por otro lado, el mismo protocolo cromatográfico fue también aplicado a la purificación de la betaxantina natural derivada de DOPA, obtenida a partir de extractos de flores amarillas de *Lampranthus productus*, donde fue descrita como único pigmento (Figura 12.3).

2.2. Fluorescencia de Betaxantinas

Las propiedades fisicoquímicas de betalainas han sido ampliamente descritas en la bibliografía, especialmente aquellas relacionadas con su color. Así, desde los primeros trabajos con estos pigmentos (Wylter y Dreiding, 1957; Piattelli et al., 1964), los espectros de absorbancia de diferentes especies y el efecto limitado de diversos substituyentes sobre los mismos han sido caracterizados (Stintzing y Carle, 2004). Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios sobre betalainas en estos cincuenta años de investigación, la existencia de fluorescencia en betaxantinas no era conocida.

Con los datos recogidos en la presente memoria se han puesto de manifiesto por primera vez las propiedades fluorescentes de las betaxantinas. Disoluciones acuosas de betaxantinas purificadas fueron utilizadas para el registro de los espectros de fluorescencia, habiéndose determinado con anterioridad los máximos de excitación y de emisión para la realización de las medidas. Todas las especies analizadas mostraron un comportamiento similar, con máximos de excitación comprendidos entre 463 y 475 nm y máximos de emisión comprendidos entre 506 y 515 nm (Tabla 9.1). Es decir, las betaxantinas absorben luz en el rango visible del espectro electromagnético, correspondiente al color azul y emiten luz verde. Los espectros de excitación y emisión fueron muy similares en todos los casos y análogos al descrito para la betaxantina más sencilla considerada, alanina-betaxantina (Figura 9.2). Los valores del

desplazamiento de Stokes (separación entre las longitudes de onda máxima de excitación y de emisión) y de la anchura de los espectros (medida a un valor de intensidad mitad del máximo) resultaron también similares (Tabla 9.1). Todas estas analogías apuntan a que el motivo común en la estructura de las betaxantinas, correspondiente al ácido betalámico, pueda estar implicado en el fenómeno de la fluorescencia. Por otro lado, es conocido que esta parte de la estructura es la responsable del color de los pigmentos, gracias a su sistema de dobles enlaces conjugados.

La naturaleza de la amina o aminoácido con el que cada betaxantina es obtenida parece tener una contribución limitada en las características espectrales finales de las especies. No se encontraron diferencias significativas en relación a la longitud de la cadena del residuo o a su polaridad, siendo notable que las betaxantinas derivadas de leucina y ácido glutámico muestren máximos e intensidades relativas similares. Sin embargo, un papel secundario puede ser discutido en base al efecto dador o retirador electrónico de los sustituyentes. La alta fluorescencia que presenta el pigmento derivado del sulfóxido de metionina en comparación con el derivado de metionina (Tabla 9.1) sugiere que hay una intensificación de la fluorescencia cuando se retira densidad electrónica del sistema resonante. Del mismo modo, se esperaría una disminución de la fluorescencia por la presencia de grupos dadores de densidad electrónica. Ello se observa en las betaxantinas aromáticas derivadas de difenoles, que presentan intensidades más bajas que las correspondientes a los monofenoles. La presencia del grupo carboxilo retirador en el pigmento derivado del ácido glutámico refuerza su fluorescencia respecto al análogo derivado de glutamina. Además su presencia en las betaxantinas derivadas de DOPA y tirosina puede estar en relación con la mayor fluorescencia exhibida por éstas frente a las derivadas de dopamina y tiramina.

La caracterización de fluorescencia en betaxantinas se llevó a cabo en disoluciones acuosas, por las implicaciones fisiológicas que este medio puede tener y porque la mayoría de las aplicaciones posibles para estos pigmentos suponen un medio acuoso. Sin embargo, estas condiciones no son las óptimas

para la expresión de la fluorescencia, cuya intensidad se vio aumentada en disoluciones con el disolvente orgánico dimetil sulfoxido y en agua con cantidades crecientes de glicerol.

2.2.1. Aplicación de la Fluorescencia al Análisis de Betaxantinas por HPLC

Tal y como se comentó en la Introducción (apartado 2.2), la técnica más utilizada para el análisis de betalainas es la cromatografía en equipos de HPLC y los detectores habitualmente empleados se basan en medidas de absorbancia. Puesto que las propiedades fluorescentes de betaxantinas no eran conocidas, los detectores de fluorescencia, a pesar de su alta sensibilidad, no habían sido considerados hasta ahora.

En función de las características descritas para los espectros de fluorescencia de las betaxantinas, se ha puesto a punto un método para su detección después de la separación analítica en HPLC. Sin necesidad de derivatización, todas las betaxantinas estudiadas pueden ser detectadas con excitación a 460 nm y seguimiento de la emisión a 510 nm, independientemente del tiempo de retención (que determina el contenido de acetonitrilo de la fase móvil) (Tabla 9.2). La aplicación del método de análisis se llevó a cabo en la determinación de pigmentos naturales extraídos de flores de las plantas *Mirabilis jalapa* (Figuras 8.3 y 8.4) y *Carpobrotus acinaciformis* (Figura 9.4). En el primer caso se constató por primera vez la presencia de trazas de betaxantinas (derivadas de las aminas dopamina y tiramina) en flores blancas y en el segundo se describió la presencia de los pigmentos derivados de glutamina, glutámico y tirosina en las flores amarillas.

La calibración del equipo es posible para permitir análisis cuantitativos de betaxantinas. Los valores determinados para los límites de detección y cuantificación de los pigmentos para el detector de fluorescencia suponen una mejora general del proceso, respecto a la detección por absorbancia. Se ven disminuidos especialmente los límites de detección de las betaxantinas derivadas de histidina, alanina y leucina y los de cuantificación de las derivadas del

sulfóxido de metionina, prolina, tirosina y leucina (Tabla 9.2), en un protocolo que además utiliza la mitad de volumen de muestra para el análisis.

2.2.2. Implicación de la Fluorescencia de Betaxantinas en el Color de las Flores

La misma fluorescencia visible descrita para las betaxantinas sintetizadas se detectó en extractos de flores amarillas conteniendo betaxantinas. Puesto que la emisión de luz aparece en disoluciones acuosas, su caracterización llevó a plantear la posibilidad de que pudiera estar implicada en un fenómeno de fluorescencia a nivel de las estructuras que las contienen en las plantas. Como modelo de estudio se eligieron las flores debido a la importancia del color como un elemento de atracción para los animales polinizadores.

En base a los espectros obtenidos para los procesos de excitación y de emisión, se utilizó un sistema de filtros con el que pudiese ser apreciada la fluorescencia de las betaxantinas (Figura 10.2). De este modo se limitaron las longitudes de onda para la excitación de los pigmentos de la muestra y se filtró la luz residual reflejada por la misma. El resultado fue la demostración de que la emisión de luz visible por parte de las betaxantinas se mantiene en su entorno fisiológico y que las flores que las contienen pueden ser consideradas como elementos fluorescentes (Figuras 10.4 y 10.5). A través de microscopía de fluorescencia también pueden ser observadas las células que contienen a los pigmentos, excitándolos apropiadamente mediante sistemas de filtros o con el haz de luz coherente de un láser (Figura 10.6). Esto constituye el primer caso de fluorescencia visible natural descrito en flores, lo cual podría tener implicaciones a nivel fisiológico y comercial.

Desde el punto de vista del estudio de las relaciones entre animales y plantas se abren nuevas posibilidades, puesto que la emisión de luz por parte de flores nunca ha sido considerada como una señal. Sin embargo, existen datos que permiten especular sobre la importancia fisiológica de la fluorescencia. Los agentes polinizadores tienen sensibilidades distintas y perciben los colores de diferentes formas. Recientemente se ha encontrado que un murciélago

polinizador de plantas de las Cactáceas es capaz de ver con un único receptor que tiene una longitud de onda máxima de 510 nm (Winter et al., 2003), que coincide con la correspondiente a la emisión de las betaxantinas. Por otro lado, las abejas son polinizadoras de numerosas plantas y han sido tomadas como modelo en el estudio de la visión animal y la polinización (Gumbert et al., 1999). Estos insectos poseen también un receptor para la luz verde y se ha demostrado que son capaces de percibir más eficazmente los objetos que brillan (De Ibarra et al., 2000). La importancia fisiológica de la fluorescencia ha sido constatada en loros, donde la presencia de plumas fluorescentes fue descrita y relacionada con un mayor éxito en la búsqueda de pareja (Arnold et al., 2002).

Por otro lado, la búsqueda de nuevas tonalidades en flores de plantas ornamentales constituye un campo de investigación para la industria de la floricultura. En este sentido, la fluorescencia visible ya había sido considerada como un factor y se desarrollaron plantas modificadas genéticamente que expresaban en sus pétalos proteínas verdes fluorescentes (Mercuri et al., 2001). Entonces no se tuvo en cuenta que las flores que contienen betaxantinas presentan de forma natural este efecto.

2.3. Filtro Interno en Betalaínas

Los pigmentos violetas análogos de las betaxantinas y compañeros en la coloración de plantas del orden de las Cariofilales, las betacianinas, no presentaron fluorescencia. La unidad estructural de estos pigmentos, betanidina, puede considerarse como un derivado del ácido betalámico que contiene además la estructura cerrada del *ciclo*-DOPA (Figura 1.1). En ella puede observarse una peculiaridad no presente en las estructuras de las betaxantinas: la conexión de la resonancia electrónica entre el sistema propio del ácido betalámico con otro sistema resonante, el del anillo aromático del *ciclo*-DOPA. Esta ampliación del sistema resonante es la responsable del desplazamiento del máximo del espectro de absorbancia de 480 a 540 nm, y también parece ser la responsable de la ausencia del fenómeno fluorescente en los pigmentos violetas. El hecho de que

exista fluorescencia en las betaxantinas estructuralmente relacionadas con las betacianinas, indicaxantina (Figura 10.1) y dopaxantina (Figura 10.3), con propiedades análogas a cualquier otra betaxantina (Tabla 9.1), apoya la importancia del enlace que une los dos sistemas resonantes en la pérdida de la fluorescencia.

Por otro lado, en el análisis comparativo de los espectros de betaxantinas y betacianinas (Figura 11.1) se observa un solapamiento entre el espectro de emisión de las primeras y el de absorbancia de las últimas. Esta situación puede provocar en un sistema de dos componentes fluoróforo-cromóforo la atenuación de la fluorescencia, si el cromóforo es capaz de absorber la radiación emitida por el compuesto fluorescente. El proceso es conocido como “efecto de filtro interno”. La adición de cantidades crecientes de una betacianina a una disolución de betaxantina provocó la extinción por este efecto de la fluorescencia medida (Figura 11.S1). Así, las betacianinas no sólo no son fluorescentes, sino que además son capaces de absorber la radiación emitida por las betaxantinas.

Considerando el mantenimiento de las propiedades fluorescentes de las betaxantinas en flores, la absorción de la luz emitida por éstas tiene implicación en la fluorescencia final de las estructuras que presentan los dos tipos de pigmentos asociados. Son muchas las plantas del orden de las Cariofilales que poseen variedades con flores amarillas, violetas y rojas, conteniendo betaxantinas, betacianinas y una mezcla de las dos respectivamente. Entre los casos más llamativos se encuentra *Mirabilis jalapa*, que puede presentar flores con patrones de colores variados dentro de la misma planta. En este caso, zonas conteniendo solamente betaxantinas se encuentran junto a otras que contienen además betacianinas. Filtrando la radiación de excitación y la luz emitida puede observarse que el efecto de filtro interno descrito en disolución se mantiene en el entorno fisiológico, y las flores presentan patrones fluorescentes de contraste. La interferencia de la fluorescencia puede apreciarse tanto en imágenes completas de las flores como a través de microscopía de fluorescencia (Figura 11.2).

La existencia de patrones de color de contraste ha sido descrita en algunos casos como de especial atracción para los polinizadores e incluso los

depredadores de insectos son capaces de manipularlos en su estrategia de caza (Giurfa et al., 1996; Sasaki y Takahashi, 2002; Heiling et al., 2003). La importancia del color y de los patrones formados por su distribución en las flores como factores en la atracción de polinizadores, a los que ahora puede sumarse la fluorescencia y sus correspondientes patrones, confiere una especial relevancia a la regulación de la ruta biosintética de los pigmentos que los originan.

3. Betalaínas como Substratos de Tirosinasa.

El esquema biosintético establecido para betalaínas no contempla la existencia de actividad enzimática sobre betaxantinas ni la formación final de pigmentos por otro medio distinto al de la condensación de ácido betalámico con aminas, aminoácidos o *ciclo*-DOPA (Figura 1.2).

Además, hasta ahora, no aparecía en la bibliografía la existencia de actividad tirosinasa sobre betaxantinas. Ensayos preliminares acerca de la actividad de esta enzima sobre los pigmentos difenólicos, mostraron que se producía un cambio limitado a nivel espectral. Para abordar la caracterización del sistema y seguir la evolución de la reacción se utilizó el protocolo de HPLC descrito en el Capítulo VII. Éste es compatible con la detección por espectrometría de masas y se utilizó en los análisis de los diferentes productos de reacción.

3.1. Actividad Difenolasa sobre Betaxantinas

La adición de tirosinasa a disoluciones estables de las betaxantinas difenólicas, dopaxantina y dopamina-betaxantina, derivó en la transformación del pigmento original en una serie de compuestos no descritos en la bibliografía y que fueron separados por HPLC (Figuras 12.5 y 14.2). El seguimiento de la evolución de los substratos hacia esta serie de productos muestra como el compuesto original es totalmente transformado (Figura 12.7). El cambio en la absorbancia de la disolución es limitado por la similitud del espectro del

substrato con el resultante de la suma de los correspondientes a los productos (Figura 12.8) y no debido a una transformación parcial.

De acuerdo con el mecanismo de acción de tirosinasa (Figura 1.5), la *o*-quinona correspondiente al difenol es el producto de la actividad enzimática. Sin embargo, éste no fue el compuesto final obtenido para las betaxantinas en el medio de reacción. En general, las *o*-quinonas son moléculas altamente reactivas y evolucionan hacia formas más estables. En el caso de las betaxantinas, las masas determinadas para todos los compuestos formados no indican la formación de dímeros u otras formas poliméricas, sino que corresponden a quinonas estables o formas “leuko” derivadas de éstas por ciclación intramolecular (Tablas 12.1 y 14.1). La presencia de quinonas pudo ser descartada ya que la adición de ácido ascórbico (AA) a los productos de reacción no hizo variar el perfil de HPLC obtenido, como ocurriría si las hubiera por formación de difenoles. Así, los productos derivados de la actividad de tirosinasa sobre dopaxantina y dopamina-betaxantina son formas “leuko” generadas por ciclación intramolecular de las correspondientes quinonas (Figura 12.6), análogas a betanidina y 2-descarboxi-betanidina, respectivamente. El proceso de ciclación intramolecular de las *o*-quinonas generadas por tirosinasa a partir de DOPA y dopamina es bien conocido y conduce a la formación de leuko-DOPA-cromo (*ciclo*-DOPA) y leuko-dopamino-cromo (2-descarboxi-*ciclo*-DOPA), respectivamente (Jiménez et al., 1984; Sánchez-Ferrer et al., 1995).

Para la evaluación espectrofotométrica de los parámetros cinéticos de tirosinasa actuando sobre las betaxantinas difenólicas, y sobre otros pigmentos betalámicos que se comentan más adelante, se hizo necesaria la determinación de los coeficientes de extinción molar asociados a la reacción enzimática. La Tabla 16.1 resume los valores determinados para diferentes betaxantinas y que sirvieron para relacionar los cambios medidos en absorbancia con el cambio de la concentración de las especies consideradas.

Substrato	ϵ_{app} ($M^{-1}cm^{-1}$)	Capítulo
(S)-Dopaxantina	9.580	XII
Dopamina-betaxantina	8.740	XIV
Tiramina-betaxantina	10.870	XIV
Betanidina	18.600 (ϵ)	XV

Tabla 16.1. Coeficientes de extinción molar aparentes (ϵ_{app}) para la oxidación de betaxantinas determinados a 480 nm. En el caso de betanidina el valor mostrado corresponde al coeficiente de extinción molar absoluto (ϵ) calculado para la quinona a 400 nm.

De este modo fueron calculados por primera vez los parámetros cinéticos de la enzima tirosinasa sobre substratos betalámicos, cuyos valores se resumen en la Tabla 16.2.

Substrato	K_m (μM)	V_m ($\mu M \min^{-1}$)	V_m/K_m ($\min^{-1}$)
(S)-Dopaxantina	84,3	9,5	0,11
Dopamina-betaxantina	94,7	74,4	0,79
Tiramina-betaxantina	126,9	10,4	0,082
Betanidina	662,0	10,3 ^a	0,016 ^a

Tabla 16.2. Parámetros cinéticos de tirosinasa de hongo usando como substratos betaxantinas y betanidina. ^a El valor de V_m sobre betanidina ha sido normalizado para la misma cantidad de enzima usada con betaxantinas ($12.5 \mu g mL^{-1}$).

En lo referente a la actividad difenolasa sobre betaxantinas, puede observarse que dopamina-betaxantina es mejor substrato que dopaxantina. La diferencia en los valores de eficacia catalítica (V_m/K_m) entre ambos substratos está motivada por la menor velocidad de reacción de la enzima cuando actúa sobre dopaxantina. En cualquier caso, los valores determinados para la constante de Michaelis son muy bajos, denotando una alta afinidad de la enzima por estos substratos. En el caso de dopaxantina, la presencia del ácido betalámico en la molécula hace que el valor de K_m se reduzca a la mitad respecto a DOPA libre y

para el pigmento derivado de dopamina, el valor es cinco veces menor que el determinado para la catecolamina (Ros et al., 1994).

3.1.1. Actividad sobre Formas R de Betaxantinas

Las betaxantinas naturales están derivadas sólo de aminoácidos con configuración S (Steglich y Strack, 1990), lo que puede estar relacionado con estereoespecificidad en las enzimas de la ruta biosintética. Por otro lado, betaxantinas derivadas de formas R de aminoácidos fueron identificadas *in vivo* tras la adición de los compuestos precursores a la planta (Hempel y Böhm, 1997; Schliemann et al., 1999). Puesto que el efecto de la estereoisomería de betaxantinas sobre la actividad de las enzimas de la ruta no había sido estudiado, se decidió investigar el comportamiento de tirosinasa sobre el pigmento derivado de (R)-DOPA.

(R)-dopaxantina, y también (R)-tirosina-betaxantina, fueron sintetizadas y purificadas con el protocolo utilizado para las formas S, obteniéndose rendimientos similares (Tabla 13.1). En el análisis por HPLC de los pigmentos formados se pudo observar inversión en los tiempos de retención de los pigmentos 2R/S y 2R/R respecto a las formas S (2S/S y 2S/R), tal y como ya había sido descrito en la bibliografía (Strack et al., 2003).

La adición de tirosinasa a disoluciones de (R)-dopaxantina provocó un cambio espectral (Figura 13.4) análogo al descrito para la forma S. En el análisis por HPLC de los productos de reacción se observó la presencia de un perfil cromatográfico con cinco productos mayoritarios distintos, pero con la misma masa molecular y espectros de absorbancia similares (Figura 13.2 y Tabla 13.2). Tras la comparación con el perfil obtenido para los productos derivados de (S)-dopaxantina (Figura 12.5) puede observarse inversión en los tiempos de retención de los productos de reacción, al menos en los identificados como 3, 4 y 5.

La actividad de la enzima sobre la forma R de dopaxantina mostró una afinidad mucho menor que la exhibida frente a la forma S, y el valor de la K_m

correspondiente no pudo ser evaluada. Además se estimó, por medidas a concentraciones fijas de los sustratos, que la velocidad de reacción era casi la mitad de la obtenida para la forma *S*. De este modo se pone de manifiesto una estereoespecificidad limitada en la acción de tirosinasa sobre betaxantinas, ya que aunque las formas *R* son también sustratos, las *S* están favorecidas.

3.2. Actividad Monofenolasa sobre Betaxantinas

Los pigmentos tiramina-betaxantina y tirosina-betaxantina tienen estructuras monofenólicas susceptibles de ser sustratos de la actividad monofenolasa de tirosinasa. La actividad sobre estos compuestos tuvo como resultado la formación de los mismos productos obtenidos para las betaxantinas difenólicas correspondientes (Figura 14.2). Esto está en consonancia con el mecanismo de acción de la enzima (Figura 14.1), según el cual, la *o*-quinona formada es la misma y por consiguiente, la evolución experimentada hacia las formas “leuko” bajo las mismas condiciones también lo es.

La presencia en el medio de reacción de un agente reductor como el AA hace que la *o*-quinona se transforme en el *o*-difénol del que proviene, no teniendo ningún efecto sobre las formas “leuko” ya cicladas. De este modo, si se encuentra presente AA en el medio durante la reacción, lo que se observa es la conversión del monofenol en el difenol (Valero et al., 2003). Para tirosina-betaxantina, su transformación en dopaxantina fue puesta de manifiesto por HPLC en presencia de ácido ascórbico, tanto para el pigmento derivado de la forma *S* de tirosina como para el derivado de la forma *R*.

En el caso de tiramina-betaxantina, el mayor rendimiento en el proceso de obtención del pigmento, permitió seguir la reacción en mayor detalle, tanto por HPLC como espectrofotométricamente. La conversión de tiramina-betaxantina en dopamina-betaxantina provoca muy pocos cambios a nivel espectral, dada la similitud de sus propiedades ópticas. Sin embargo, a través del análisis por HPLC (Figura 14.4) puede verse cómo en presencia de AA se obtiene el difenol, que es estable y se acumula en el medio a la vez que desaparece el sustrato

monofenólico. Una vez que el AA se agota por su acción continuada sobre las quinonas generadas por la enzima, el difenol desaparece y se forman los correspondientes productos de reacción ya comentados para la actividad en ausencia de AA (Figura 14.3).

La caracterización cinética de tirosinasa sobre tiramina-betaxantina permitió obtener los valores descritos en la Tabla 16.2 para los parámetros cinéticos. Como en el caso de dopamina-betaxantina, el valor de K_m obtenido fue cinco veces inferior al obtenido para tiramina libre.

La expresión de la velocidad en el estado estacionario de la actividad de tirosinasa sobre monofenoles se ve afectada por un período de retardo, tal y como se comentó en la Introducción (apartado 7.1.2). Este período de retardo pudo ser observado para la actividad sobre la betaxantina derivada de tiramina (Figura 14.6). La presencia de concentraciones crecientes de pigmento provocó un aumento en el período de retardo (Figura 14.7), que según el mecanismo de acción de la enzima puede explicarse por el aumento en la formación del complejo enzimático de vía muerta E_{met} -M (Figura 14.1), sin actividad sobre monofenoles. Por otro lado, un aumento en la concentración de enzima incrementa la disponibilidad de la forma E_{oxi} , que sí es capaz de catalizar la reacción sobre monofenoles. De este modo, se produce una disminución del período de retardo de la hidroxilación de tiramina-betaxantina, hasta prácticamente hacerlo desaparecer, cuando se aumenta la cantidad de enzima en el medio de reacción (Figura 14.7).

3.3. Actividad sobre la Unidad Estructural de las Betacianinas

La actividad de la enzima tirosinasa fue también estudiada sobre betanidina. La estructura de este compuesto está presente en casi todas las betacianinas y corresponde a una forma “leuko”. Los estudios sobre la unidad estructural de las betacianinas se han visto limitados debido a su labilidad y dificultad de obtención. Durante la realización de la presente Tesis Doctoral, se analizó el contenido en pigmentos de flores de diversas plantas pertenecientes al

orden Cariofilales. En el caso de *Lampranthus productus* se determinó la presencia mayoritaria de betanidina, sólo acompañada por el glucósido betanina (Figura 15.1). El protocolo de extracción y purificación cromatográfica utilizado para betaxantinas fue aplicado también a la obtención del pigmento violeta, considerando en este caso un pH de trabajo durante todo el proceso de 5.0. Al final del proceso, betanidina pura fue obtenida según el análisis de HPLC.

La estabilidad del compuesto en ausencia de enzima fue evaluada y por primera vez la cinética de su degradación estudiada (Figura 15.5). Ello puso de manifiesto la labilidad del compuesto bajo condiciones de fuerza iónica alta y pH superior a 6.0. El estudio de la actividad de la enzima tirosinasa se llevó a cabo en condiciones en las que el pigmento permanecía estable. La presencia de enzima en el medio provocó la desaparición del compuesto original, siendo transformado en un único producto (Figura 15.2). El compuesto, correspondiente a betanidina-quinona, se mantuvo en el medio de reacción y fue capaz de regenerar la betanidina original tras la adición de AA. Estos resultados están de acuerdo con los estudios desarrollados sobre la actividad de la enzima peroxidasa, la cual a través de un mecanismo de radicales libres dependiente de peróxido de hidrógeno distinto al de tirosinasa, es también capaz de formar betanidina-quinona (Martínez-Parra y Muñoz, 2001).

La actividad de tirosinasa sobre betanidina fue seguida a nivel espectral (Figura 15.3). La formación de betanidina-quinona conlleva una disminución de la absorbancia a 542 nm, con la formación de un nuevo máximo a 400 nm. El coeficiente de absorción molar para la quinona fue determinado a esta longitud de onda (Tabla 16.1) y utilizado para la evaluación de los parámetros cinéticos de la actividad de tirosina sobre betanidina. Como puede observarse en la Tabla 16.2, la afinidad de tirosinasa por betanidina es mucho menor que la mostrada para las betaxantinas, incluida la estructuralmente relacionada dopaxantina. Del mismo modo, la eficacia sobre este sustrato es la más baja entre las determinadas para betalaínas.

3.4. Un Nuevo Esquema Biosintético

Tal y como se ha comentado en la Introducción (apartado 3), la hidroxilación del aminoácido tirosina a DOPA y su posterior oxidación a *o*-DOPA-quinona por la enzima tirosinasa se consideran en la bibliografía como los primeros pasos en la ruta biosintética de betalainas. Por su parte, la ciclación intramolecular espontánea de la quinona conduce a la formación de *ciclo*-DOPA, que es capaz de reaccionar con una molécula de ácido betalámico para formar betanidina (Figura 16.1, etapas 1-3 y 9).

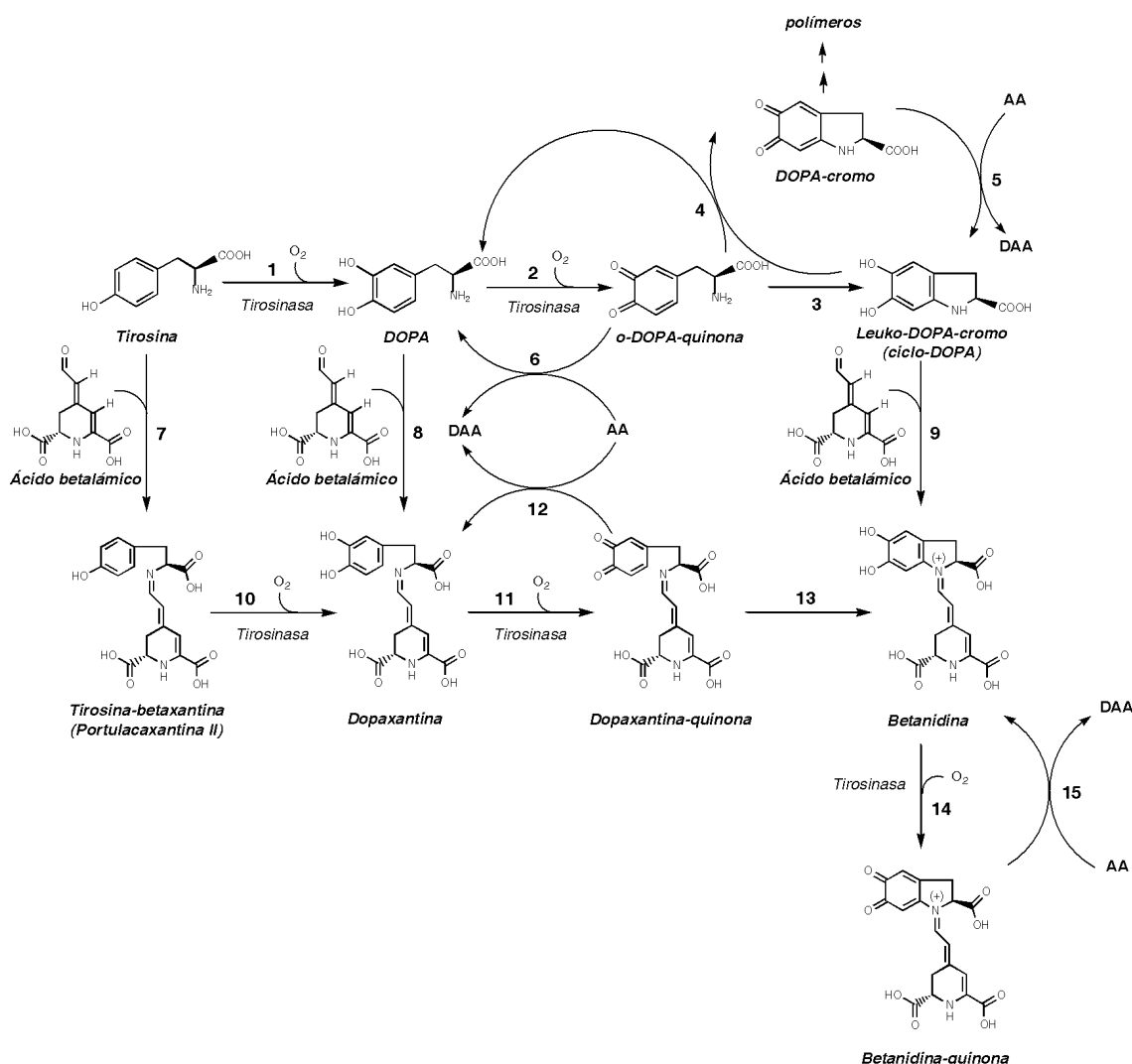


Figura 16.1. Esquema biosintético de betalainas, donde se muestran las nuevas etapas propuestas para la formación de betacianinas (etapas 7, 8 y 10-15) y las previamente consideradas en la bibliografía (etapas 1-3 y 9).

Sin embargo, esta ruta no ha sido establecida con claridad y betanidina sólo ha podido ser obtenida tras la oxidación de tirosina o DOPA a DOPA-cromo y su reducción posterior por AA a *ciclo*-DOPA (Figura 16.1, etapa 5), el cual experimenta entonces una condensación espontánea con el ácido betalámico. Esta ruta no parece posible que ocurra a nivel fisiológico puesto que si el AA está presente durante la oxidación de tirosina o DOPA, sería capaz de reducir la DOPA-quinona a difenol (Figura 16.1, etapa 6), y *ciclo*-DOPA o DOPA-cromo no serían nunca obtenidos. Además, la presencia de ácido betalámico durante las primeras etapas propuestas implicaría su condensación con tirosina o DOPA (Figura 16.1, etapas 7 y 8), lo que conduciría espontáneamente a la formación de las betaxantinas correspondientes. Por tanto, la ruta propuesta no parece que pueda conducir *in vivo* a la formación de betacianinas.

Por otro lado, la dificultad de obtención de betaxantinas ha limitado los estudios sobre estos compuestos, que nunca habían sido considerados en la biosíntesis de betacianinas. Así, un mecanismo alternativo puede ser propuesto en base a la condensación de ácido betalámico con tirosina y DOPA (Figura 16.1, etapas 7 y 8) y a la caracterización de la actividad de la enzima tirosinasa sobre las betaxantinas formadas (Figura 16.1, etapas 10-11). Ha sido demostrado que tirosinasa cataliza la hidroxilación de tirosina-betaxantina a dopaxantina (actividad monofenolasa) y la oxidación de ésta en una reacción subsiguiente para rendir la correspondiente *o*-quinona (actividad difenolasa). Estas etapas pueden ocurrir *in vivo* en la ruta biosintética. En ausencia de agentes reductores en el medio de reacción, la quinona evolucionaría de forma no enzimática hacia especies más estables, como betanidina, en línea con la evolución seguida por la *o*-DOPA-quinona libre (Figura 16.1, etapa 13) (Cánovas et al., 1982). Ha sido demostrado que dopaxantina-quinona se transforma en especies análogas a betanidina a las que se llega por ciclación intramolecular. Las masas determinadas para los productos, junto con su insensibilidad al tratamiento con AA y el mecanismo de reacción establecido para tirosinasa, hacen de la ciclación interna la única explicación satisfactoria para la multiplicidad de productos derivada de la acción sobre dopaxantina. Considerando las dos actividades de

tirosinasa sobre estas betaxantinas para la formación de betanidina, tirosina sería el aminoácido de partida para la condensación con el ácido betalámico. Ello está de acuerdo con la acumulación de tirosina, y no de DOPA, en los momentos previos a la formación de betacianinas en flores violetas de *Portulaca* y a su evolución sincronizada (Kishima et al., 1991).

Aunque el pigmento betanidina no pudo ser identificado entre los productos derivados de la actividad enzimática, la formación de éste a partir de dopaxantina-quinona puede verse favorecida *in vivo* bajo condiciones específicas. Para dirigir la ciclación hacia betanidina se ensayaron diferentes condiciones de pH y temperatura y se adicionó al medio de reacción cantidades crecientes de disolventes orgánicos para modificar el entorno de la enzima, no obteniéndose diferencias respecto a los respectivos controles.

Por otro lado, en los últimos años se ha establecido la ruta biosintética de otra familia de pigmentos, las auronas (Nakayama, 2002). Se ha descrito que las etapas finales de formación de la unidad estructural de esta clase de flavonoides (aureusidina) desde chalconas, son catalizados por la enzima aureusidina sintasa, que es una oxidasa con alta homología con tirosinasa (Nakayama et al., 2000). La hidroxilación y ciclación oxidativa de los substratos propuesta para estos pigmentos está de acuerdo con el mecanismo descrito para las betalaínas. Además, para la aureusidina, la ciclación se desarrollaría en el interior del centro activo de la enzima específica (Sato et al., 2001). El hecho de que la ciclación se produjera en el centro activo de una tirosinasa una vez que se forma la quinona podría dirigir específicamente, en el caso de betalaínas, la formación de betanidina (Figura 16.1, etapa 14) y evitar la formación de compuestos “leuko” diferentes. De este modo se conseguiría para la ciclación un microentorno libre de AA, el cual protege de la oxidación, inespecífica o mediada por la propia tirosinasa, al producto final de la ruta, una vez que se ha formado (Figura 16.1, etapa 15). AA ha sido detectado en flores de *Lampranthus productus* conteniendo tanto betanidina (Figura 15.6) como dopaxantina (Figura 12.11). En flores amarillas la ausencia de una tirosinasa capaz de dirigir la ciclación en su centro activo haría que el producto liberado al exterior fuese la quinona, que

como se ha demostrado se transforma en dopaxantina por efecto del AA. En el nuevo esquema propuesto, el AA sería necesario para la protección de los grupos fenólicos de los pigmentos y de DOPA, mientras la enzima 4,5-dioxigenasa lo transforma en ácido betalámico (Figura 12.1).

3.4.1. Formación de 2-Descarboxi-betacianinas y (R)-Betacianinas

La hidroxilación de tiramina-betaxantina y la oxidación de dopamina-betaxantina por parte de tirosinasa, junto con la alta afinidad de la enzima por estos dos nuevos substratos, puede tener una implicación fisiológica no sólo en la conversión entre betaxantinas, sino también en la formación de 2-descarboxi-betacianinas. El esquema biosintético propuesto en la bibliografía (Figura 1.3) se basa en la descarboxilación de DOPA para rendir dopamina que es entonces convertida en dopaminocromo y 2-descarboxi-ciclo-DOPA. Éste condensa entonces con ácido betalámico para formar 2-descarboxi-betanidina de manera análoga a la formación de betanidina. Nuevamente este modelo no contempla la participación de las betaxantinas derivadas de las aminas precursoras en la ruta biosintética y las mismas consideraciones comentadas sobre el mecanismo de biosíntesis de betanidina son aplicables aquí.

Con los experimentos descritos en la presente Memoria, se pone de manifiesto que dopamina-betaxantina puede ser obtenida por la acción enzimática de tirosinasa a partir de tiramina-betaxantina. Por su parte, la betaxantina difenólica es además oxidada para formar dopamina-betaxantina-quinona (Figura 14.8), la cual no es estable y cicla intramolecularmente para formar los compuestos “leuko”. Análogamente a lo ocurrido para el caso de dopaxantina-quinona, entre estos compuestos no se encontró la 2-descarboxi-betanidina. La variación en las condiciones del medio para favorecer la estabilización de la quinona a través de este pigmento incluyó cambios en el pH del medio de reacción y la adición de cantidades crecientes de disolvente orgánico. Además se añadieron al medio cationes divalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) sin provocar cambios significativos en el perfil de

los productos de reacción. Como en el caso de betanidina, la formación de 2-descarboxi-betanidina puede estar favorecida *in vivo*, probablemente a través de la existencia de una tirosinasa específica.

Por otro lado, se ha demostrado que la actividad de tirosinasa puede expresarse sobre las formas *R* de betaxantinas derivadas de tirosina y DOPA (Figura 13.1). Así, un esquema biosintético análogo al de la Figura 16.1 puede ser planteado para la obtención de betacianinas basadas en (*R*)-betanidina. La existencia de una estereoespecificidad limitada en la actividad de tirosinasa sobre betaxantinas implica que, aunque los isómeros *S* se ven favorecidos, pigmentos con configuración *R* pueden ser obtenidos por la enzima. Esto sugiere que la existencia de isómeros específicos de betalainas debe ser determinada en la síntesis del aminoácido precursor.

Bajo la perspectiva de los nuevos esquemas propuestos para la biosíntesis de betalainas, tirosinasa es la enzima decisiva en el cambio de color de amarillo a violeta en las estructuras coloreadas de plantas del orden de las Cariofilales. La implicación de tirosinasa en la ruta biosintética de betalainas, así como los resultados de las investigaciones sobre auronas (Nakayama, 2002), apoyan la existencia de una función biológica de tirosinasa en la biosíntesis de pigmentos.

Capítulo XVII. Conclusiones

Conclusiones

1. Tirosinasa de raíz de remolacha roja puede ser obtenida por fraccionamiento subcelular, tanto en su forma soluble como ligada a membranas. La purificación y caracterización de estas fracciones muestran una forma enzimática de naturaleza monomérica de 60 kDa. La extracción con el detergente Triton X-114 resultó ser el procedimiento más eficaz en la liberación de actividad de las membranas.
2. La enzima fue obtenida en estado latente. Las características de los fenómenos de activación por el detergente SDS y la proteasa tripsina indican la existencia de un mecanismo de regulación común, que puede ser explicado en base a la presencia de un péptido protector del centro activo. El fenómeno mediado por SDS muestra una activación diferencial, dependiente del sustrato utilizado, interpretada por un modelo cinético. Éste está basado en la existencia de estados intermedios de activación en función del número de moléculas de detergente que incorporan.
3. Se ha desarrollado un protocolo para la síntesis y purificación cromatográfica de los pigmentos betaxantinas, en base a su interacción con una matriz de intercambio aniónico.
4. La fluorescencia visible de las betaxantinas ha sido caracterizada. El fenómeno parece responder a la presencia de un sistema de dobles enlaces, aportado a la estructura del pigmento por el ácido betalámico, mientras que el aminoácido o amina condensado tiene una contribución limitada. Las betacianinas no sólo no son fluorescentes, sino que además absorben la radiación emitida por las betaxantinas, en un fenómeno de filtro interno.
5. La fluorescencia de las betaxantinas se ha aplicado a su determinación en un protocolo de análisis por HPLC. Los valores determinados para los límites de detección y cuantificación de los pigmentos suponen una mejora general del proceso, respecto a la detección por absorbancia, en un análisis que además

utiliza la mitad de volumen de muestra. La fluorescencia de las betaxantinas se mantiene en su entorno fisiológico, haciendo que las flores de plantas del orden de las Cariofilales puedan considerarse como elementos fluorescentes. Esta contribución puede observarse tanto a nivel macroscópico como microscópico, a través de un sistema de filtros. La presencia conjunta de betaxantinas y betacianinas origina patrones fluorescentes de contraste.

6. Las betaxantinas derivadas de DOPA y dopamina son sustratos de la actividad difenolasa de tirosinasa. Los compuestos son transformados en quinonas que ciclan a formas “leuko”, análogas a las betacianinas betanidina y 2-descarboxi-betanidina. El pigmento no fisiológico derivado de *R*-DOPA fue también utilizado por la enzima como sustrato, aunque la eficacia catalítica fue menor.
7. Las betaxantinas derivadas de tirosina y tiramina son sustratos de la actividad monofenolasa de tirosinasa. El período de retardo propio de esta actividad ha sido caracterizado, estando de acuerdo con el mecanismo general de la enzima. En presencia de ácido ascórbico se estudió la conversión a las betaxantinas difenólicas correspondientes, y los productos de reacción en su ausencia fueron los mismos que los obtenidos para los difenoles. La existencia de estas reacciones plantea un nuevo esquema biosintético para betalainas, en el que existe conversión entre betaxantinas y en el que éstas podrían ser compuestos de partida para las betacianinas.
8. La unidad estructural de las betacianinas, betanidina, fue extraída y purificada a partir de extractos naturales de flores violetas de *Lampranthus productus*, donde fue identificada como el pigmento mayoritario. El lábil compuesto fue sustrato de la actividad de tirosinasa, aunque la eficacia fue menor a la observada para la betaxantina relacionada, derivada de DOPA. Una única quinona fue obtenida como producto de la reacción enzimática.

Capítulo XVIII. Resumen en Inglés (English Version)

La realización de este Capítulo forma parte de los requisitos para la obtención del Doctorado Europeo.

The following is a reduced English version including “Introduction”, “Materials and Methods”, and “Conclusions”, for the European Doctor degree.

1. Introduction

Contrary to other families of plant pigments, like carotenoids (Hirschberg, 2001), anthocyanins (Saito and Yamazaki, 2002) and chlorophylls (Reinbothe and Reinbothe, 1996), the biosynthetic pathway of betalains (Strack et al., 2003) still remains to be clarified. However, the implication of the enzyme tyrosinase has been suggested and the hydroxylation of tyrosine to DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine) is considered as the first step in the biogenesis of these compounds.

1.1. General Properties of Betalains

1.1.1. Structure

Betalains are water soluble nitrogen-containing pigments present in flowers and fruits of plants belonging to the order Caryophyllales (Strack et al., 2003). They have also been described in fungi such as *Amanita* (Musso, 1979) and *Hygrocybe* (von Ardenne et al., 1974), and to date more than 50 different structures have been described in nature.

Betalains can be divided into two structural groups:

- Betacyanins, where a molecule of betalamic acid appears condensed with *cyclo*-DOPA. These pigments are violet and the absorbance spectrum has a maximum wavelength of $\lambda_m = 536$ nm. Betanidin (Figure 18.1) is considered the structural unit and complex pigments can be obtained by glycosylation and acylglycosilation (Wyler et al., 1963; Stintzing and Carle, 2004).

- Betaxanthins, which are immonium derivatives of betalamic acid with different amino acids (Figure 18.1). All betaxanthins described are yellow and their absorbance spectrum has a maximum wavelength around $\lambda_m = 480$ nm, independently of the amino acid nature. The first betaxanthin characterized was indicaxanthin, derived from proline (Piattelli et al., 1964).

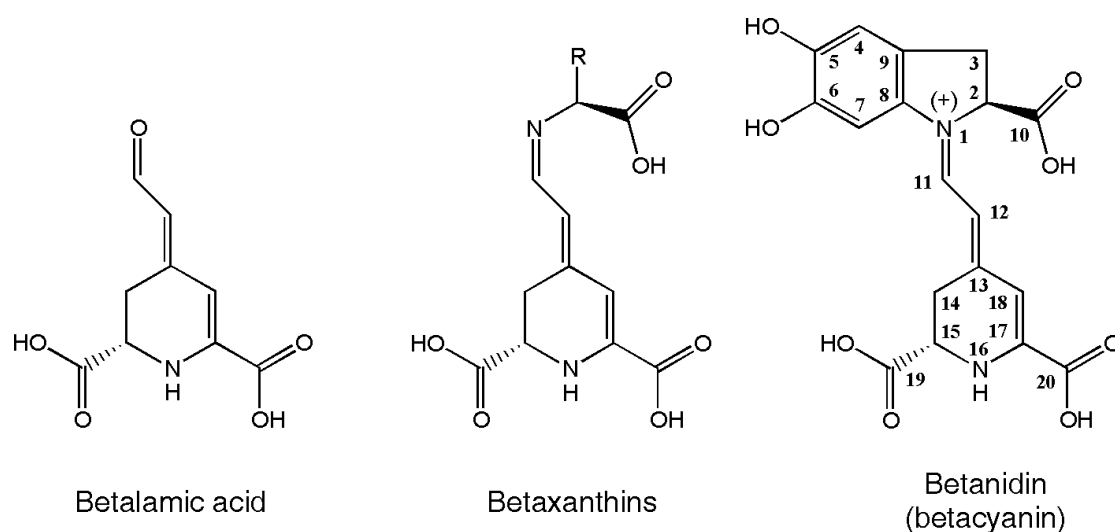


Figure 18.1. General structures of betalains.

The presence of diastereoisomers in natural extracts containing betacyanins is well-known (Piattelli, 1981; Stintzing and Carle, 2004). This isomerism is due to the presence of the chiral carbon at position C-15 (Figure 18.1), which can adopt configurations “*S*” or “*R*”. In nature, the chiral atom at C-2 only adopts configuration “*S*”. Thus, for betacyanins the compounds 2-*S*/15-*S* and 2-*S*/15-*R* exist, written briefly as 2*S*/*S* and 2*S*/*R*. The main isomer is 2*S*/*S*, and it is postulated that 2*S*/*R* is obtained by epimerization (Schliemann and Strack, 1998). On the other hand, non-natural isomers 2*R*/*S* and 2*R*/*R* of betacyanins and betaxanthins can be obtained (Wilcox et al., 1965; Schliemann et al., 1999). Additionally “*R*” forms of free amino acids administrated to plants were incorporated to betaxanthins (Hempel and Böhm, 1997).

1.1.2. Distribution

The presence of betalains in plants is restricted to the order Caryophyllales, which includes families like *Cactaceae* or *Nyctaginaceae*. Within this order only the pigmentation of the families *Caryophyllaceae* and *Molluginaceae* is due to anthocyanins. Betalains and anthocyanins have never been described together in the same plant, demonstrating a little understood

divergence at a biochemical level, but of taxonomic relevance (Stafford, 1994). Table 18.1 shows the species in which a selection of natural betalains, taken into account throughout the present work, were identified for the first time. The trivial name of most of these compounds was assigned according to the source where they were described. It is derived from the name of the plant plus the suffix “- in” for the betacyanins (gr. *kyanos*, blue colour), or “- xanthin” for the betaxanthins (gr. *xanthos*, yellow colour).

Trivial name	Amine group	Biological source	Reference
<i>Betaxanthins</i>			
Dopaxanthin	DOPA	<i>Glottiphyllum longum</i>	Impellizzeri et al., 1973
Indicaxanthin	Pro	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Piattelli et al., 1964
Miraxanthin I	MetSO ¹	<i>Mirabilis jalapa</i>	Piattelli et al., 1965a
Miraxanthin II	Asp	<i>Mirabilis jalapa</i>	Piattelli et al., 1965a
Miraxanthin III	Tyramine	<i>Mirabilis jalapa</i>	Piattelli et al., 1965a
Miraxanthin V	Dopamine	<i>Mirabilis jalapa</i>	Piattelli et al., 1965a
Muscaurin VII	His	<i>Amanita muscaria</i>	Musso, 1979
Portulacaxanthin II	Tyr	<i>Portulaca grandiflora</i>	Trezzini and Zrýd, 1991a
Vulgaxanthin I	Gln	<i>Beta vulgaris</i>	Piattelli et al., 1965b
Vulgaxanthin II	Glu	<i>Beta vulgaris</i>	Piattelli et al., 1965b
Vulgaxanthin IV	Leu	<i>Beta vulgaris</i>	Hempel and Böhm, 1997
---	Ala	<i>Beta vulgaris</i>	Kugler et al., 2004
<i>Betacyanins</i>			
Betanidin	<i>cyclo</i> -DOPA	<i>Beta vulgaris</i>	Wyler and Dreiding, 1959
Betanin	CDG ²	<i>Beta vulgaris</i>	Wyler and Dreiding, 1957
2-descarboxy-betanidin	descarboxy- <i>cyclo</i> -DOPA	<i>Carpobrotus acinaciformis</i>	Piattelli and Impellizzeri, 1970
2-descarboxy-betanin	descarboxy-CDG ²	<i>Beta vulgaris</i>	Kobayashi et al., 2001

Table 18.1. Selected naturally occurring betalains characterized in different species. ¹MetSO: methionine sulphoxide; ²CDG: *cyclo*-DOPA-glucoside.

Betalains are located in different plant organs, including roots (Hempel and Böhm, 1997), fruits (Wybraniec and Mizrahi, 2002) and flowers (Stintzing and Carle, 2004). The presence of the pigments in flowers (*Bougainvillea*,

Celosia, *Gomphrena*, *Mirabilis*, *Portulaca*...) is especially interesting due to the relevance of colour in these structures to attract animals for pollination. Nevertheless, the best-known case of betalain presence in plants is red beet root (*Beta vulgaris*), where no function related to visual factors is considered. Functions related to osmotic regulation and nitrogen compound storage are also suggested (Stintzing and Carle, 2004). Betalains are accumulated in the vacuoles of the cells that synthesize them, mainly in epidermal and sub-epidermal tissues (Wink, 1997; Strack et al., 2003). In plants, other soluble water pigments such as anthocyanins are also accumulated in the central vacuole, although in some cases they have been described in the cytoplasm (Markham et al., 2001).

1.1.3. Activity

The biological activity of betalains has been investigated in some recent papers. The first investigations that demonstrated a radical scavenging capacity in betalains were carried out with pigments, betacyanins and betaxanthins separately, extracted from beet root (Escribano et al., 1998). Subsequent works extended the information available to other betalains and pointed out the importance of the presence of hydroxyl groups (Butera et al., 2002; Pavlov et al., 2002; Cai et al., 2003). Kanner et al. (2001) demonstrated the capacity of betanin and betanidin to inhibit the peroxidation of linoleic acid and the oxidation of LDL (low density lipoproteins) at lower concentrations than other known antioxidants such as α -tocopherol or catechin. Betalains have also been described as scavengers of hypochlorous acid, the most powerful oxidant produced by human neutrophils in inflammatory processes (Allegra et al., 2005).

Recently, the inhibition of skin and liver tumour formation in mice has been demonstrated with very low concentrations of dietary betanin (Kapadia et al., 2003). In addition, plasma concentrations, after the ingestion of these compounds, are sufficient to promote their incorporation into the LDL and red cells, which are then protected from oxidative damage and hemolysis in humans (Tesoriere et al., 2003, 2004, 2005).

1.1.4. Colour

Among the properties of betalains, colour and stability have received the greater attention by researchers. Since the first reports in betalains, the absorption spectra of betacyanins (Wyler and Dreiding, 1957) and betaxanthins (Piattelli et al., 1964) were characterized. The betanin spectrum displays a maximum at 536 nm (Trezzini and Zrýd, 1991b), but a hypsochromic shift occurs with the decarboxylation at C-2 (Kobayashi et al., 2001). A greater shift, in the same direction, occurs in the 14,15-dehydrobetanin compound (neobetain), orange and not violet (Alard et al., 1985). Elsewhere, a bathochromic shift is observed with the esterification of betacyanins by hydroxycinnamic acids (Stintzing and Carle, 2004).

In betaxanthins, a hypsochromic shift can be observed with the C-2 decarboxylation of tyrosine-betaxanthin and dopaxanthin. The pigment derived from proline displays the maximum of highest wavelength (484 nm), which contrasts with that of free betalamic acid (424 nm), which presents the lowest molar extinction coefficient (Trezzini and Zrýd, 1991b).

Colour acts in plants as a signal for communication with other species. In general, plants take advantage of visual signals to attract animals' attention for pollination and seed dispersal (Schaefer et al., 2004). In these cases the most effective colouration is that shown in flowers and fruits. However, colouration of potentially defensive structures, such as thorns, seems to transmit a warning signal for herbivores (Lev-Yadun, 2001). In flowers, colour stands high among the characteristics known to attract pollinators (Gumbert, 2000; Larsson et al., 2003; Ayasse et al., 2003; De la Barrera and Nobel, 2004). Insects' capacity to detect symmetry and asymmetry and the preferences described for special patterns (Sasaki and Takahashi, 2002; Heiling et al., 2003) confer relevance to colour modulation in flowers, and therefore to the regulation of the biosynthesis and the optical properties of the pigments behind it.

1.2. Betalains Biosynthetic Pathway

The determination of the chemical structures of betalains and some of their biosynthetic intermediates contributed to an initial establishing of the biosynthetic pathway. Betalains are secondary metabolites and can be considered derivatives of the amino acid tyrosine. The initial reactions for the biosynthesis of betalains were elucidated from experiments with labelled tyrosine and DOPA. The incorporation of tyrosine into the betalamic acid and *cyclo*-DOPA structures was thus demonstrated (Liebisch et al., 1969; Fischer and Dreiding, 1972). Figure 18.2 shows the scheme for the biosynthesis of betalains reported in the bibliography, and includes three main enzymes: tyrosinase, DOPA-4,5-dioxygenase and betanidin-glucosyltransferase.

The pathway begins with the hydroxylation of tyrosine to DOPA and its oxydation to the corresponding *o*-quinone, by means of the action of tyrosinase using molecular oxygen. The spontaneous cyclization leads to *cyclo*-DOPA (leuko-DOPA-chrome), and it is proposed that this would react then with a betalamic acid molecule to form betanidin (Piattelli, 1981; Schliemann et al., 1998). The latter can be considered as the structural unit of most betacyanins and it is transformed into betanin by the enzyme betanidin-5-O-glucosyltransferase (Vogt et al., 1999; Hans et al., 2004). Further glycosylations and/or acylations lead to a variety of compounds. Betalamic acid spontaneous condensation with amino acids has been proposed as the final step in the biosynthesis of betaxanthins (Schliemann et al., 1999).

The biosynthesis of betalamic acid is achieved from DOPA by the activity of DOPA-4,5-dioxygenase (Chang et al., 1974). This enzyme cleaves the aromatic ring and the 4,5-seco-DOPA intermediate formed experiments a spontaneous cyclization to yield betalamic acid.

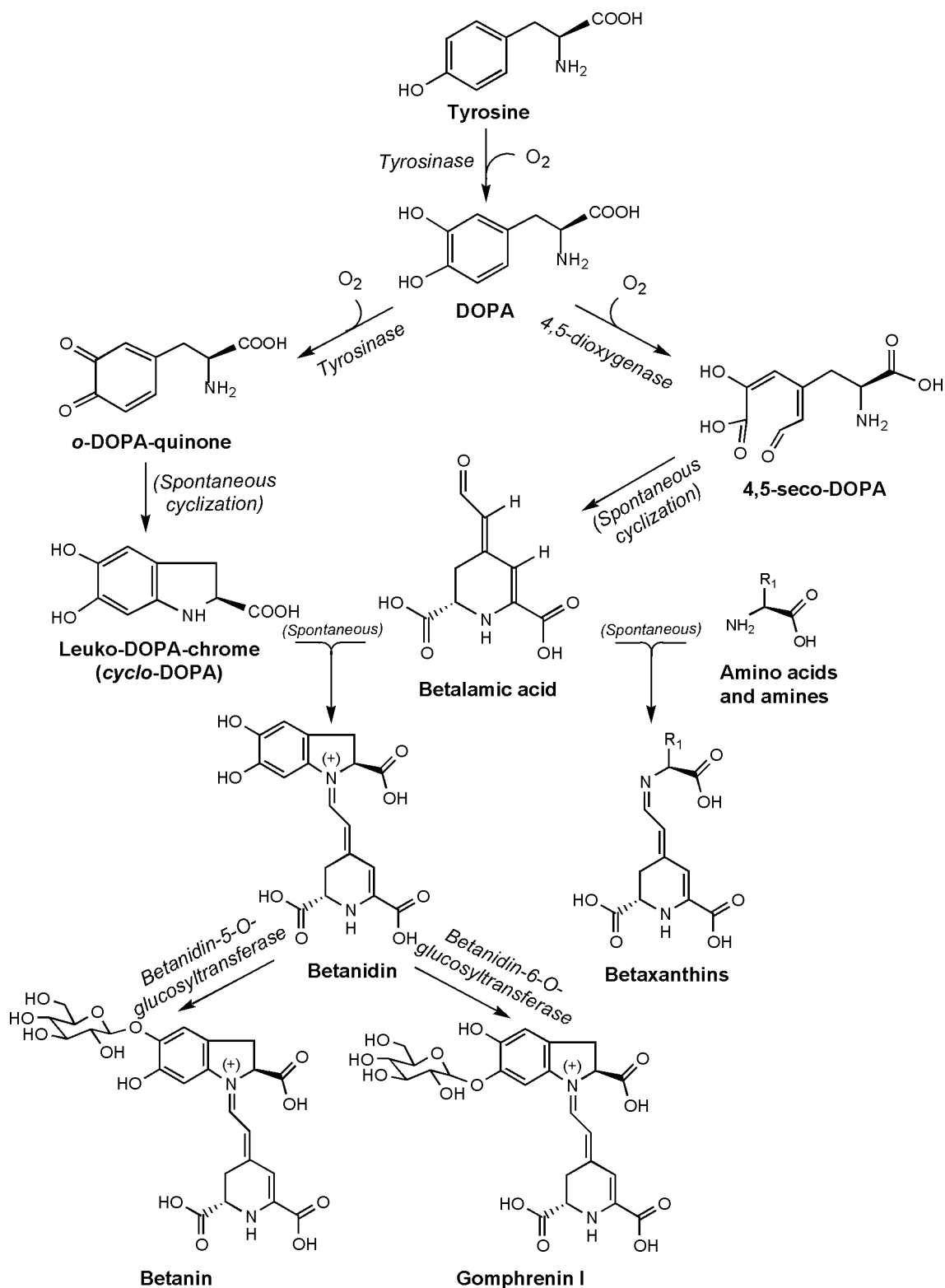


Figure 18.2. General overview of the main steps proposed for the biosynthesis of betalains (Strack et al., 2003).

1.2.1. Tyrosinase

The results of the experiments with labelled precursors were in agreement with a proposal first formulated by Wyler et al., (1963) on the possibility that betanidin could be obtained from two molecules of DOPA. Later, Endress (1979) assumed the implication of tyrosinase due to the influence of enzyme cofactors and inhibitors on betacyanin accumulation in *Portulaca grandiflora*. The role of the enzyme was established in the biosynthetic pathway, where it would catalyze the formation of DOPA and its oxidation to DOPA-quinone (Piattelli, 1981). Later, tyrosinase transcripts correlating with betacyanin accumulation in *Phytolacca americana* fruits were detected (Joy et al., 1995). Tyrosinase activity has also been related to the accumulation of betalains in *Beta vulgaris* (Steiner et al., 1999). The enzyme has been purified from betalain-containing extracts of *Amanita muscaria* (Mueller et al., 1996) and *Portulaca grandiflora* (Steiner et al., 1999).

1.2.2. DOPA-dioxygenase

This enzyme catalyzes DOPA transformation to the 4,5-seco-DOPA and 2,3-seco-DOPA intermediates, which spontaneously evolve to betalamic acid and muscaflavin, respectively (Chang et al., 1974; Barth et al., 1979; Terradas and Wyler, 1991a and 1991b). Betalamic acid can be present in free form, as a pigment.

The enzyme from the betalain producing fungus *Amanita muscaria* has been characterized (Girod and Zrýd, 1991a) and the codifying gene has been cloned (Hinz et al., 1997). Northern-blot analyses revealed regulation at the transcription level and the mRNA was accumulated mainly in the coloured tissues. The expression of the enzyme in white flowers of *Portulaca grandiflora* led to the formation of betalains (Mueller et al., 1997a). Recombinant dioxygenase was also obtained from *Escherichia coli* (Mueller et al., 1997b), catalyzing both 4,5 and 2,3-extradiol cleavage of DOPA. Plant 4,5-DOPA

dioxygenase gene has recently been identified (*P. grandiflora*) (Christinet et al. 2004).

1.2.3. Glucosyltransferases

These enzymes catalyze the incorporation of glucose to betanidin. The addition is directed at one of the hydroxyl groups in C-5 or C-6 to generate betanin or gomphrenin I, respectively. UDP-glucose:betanidin 5-*O*- and 6-*O*-glucosyltransferases were purified and characterized from *Dorotheanthus bellidiformis* extracts (Heuer and Strack, 1992; Heuer et al., 1996). These enzymes are also able to use flavonoids as substrates (Vogt et al., 1997). Sequence comparison among glucosyltransferases from different sources suggests a common phylogenetic origin and allowed the establishment of a model for 5-*O*-glucosyltransferase active site and the action mechanism (Vogt, 2002; Hans et al., 2004).

1.2.4. Dopamine-derived Betacyanins

Dopamine is an *o*-diphenol involved in betalain biosynthesis. The derived betaxanthin, dopamine-betaxanthin (miraxanthin V), has been found in *Mirabilis jalapa* (Piattelli et al. 1965a), in hairy root cultures from yellow beet (Schliemann et al. 1999), in orange callus cultures of *Beta vulgaris* (Girod and Zrýd 1991b), in *Celosia* sp. inflorescences (Schliemann et al. 2001), and in Swiss chard (Kugler et al. 2004). Tyramine-derived betaxanthin (miraxanthin III) is a betaxanthin also described in *Mirabilis jalapa* flowers, (Piattelli et al. 1965) and in coloured Swiss chard (Kugler et al. 2004). Furthermore, a group of betacyanins, the 2-descarboxy-betacyanins, are derived from dopamine instead of DOPA, and are present in flowers of *Carpobrotus acinaciformis* (Aizoaceae) (Piattelli and Impellizzeri 1970), in hairy root cultures of yellow beet (Schliemann et al. 1999; Kobayashi et al. 2001), and in *Celosia* sp. inflorescences (Schliemann et al. 2001).

In the biosynthesis of 2-descarboxy-betacyanins it has been proposed by analogy to DOPA-derived betacyanins, that the structural unit (2-descarboxy-betanidin) is obtained by spontaneous condensation between betalamic acid and 2-descarboxy-*cyclo*-DOPA (Kobayashi et al., 2001).

1.3. Tyrosinase General Aspects

The enzyme tyrosinase or polyphenol oxidase (PPO) (monophenol, *o*-diphenol:oxygen oxidoreductase, E.C.1.14.18.1) is widely distributed in microorganisms, plants and animals. It is a copper-containing enzyme that catalyses two different reactions using molecular oxygen:

- the hydroxylation of monophenols to *o*-diphenols (monophenolase activity) (Figure 18.3).
- the oxidation of the *o*-diphenols to the corresponding *o*-quinones (diphenolase activity) (Figure 18.3).

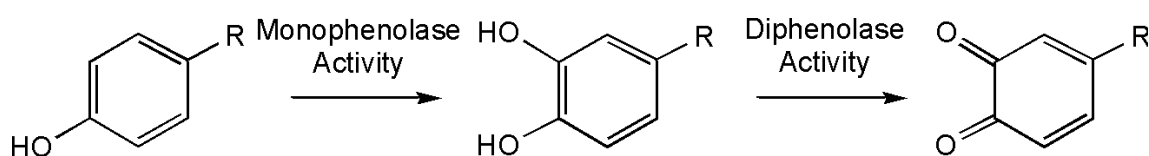


Figure 18.3. Reactions catalyzed by tyrosinase.

The variety of possible substrates and the high reactivity of the *o*-quinones generated determine the participation of tyrosinase in physiological processes related to polymer formation. Among these are the biosynthesis of lignin, the sclerotization of arthropod cuticle and the formation of the melanins responsible for animal pigmentation (Mason, 1956; Vámos-Vigyázó, 1981; Robb, 1984; Lozano and Solano, 1989; Sugumaran, 2001).

1.3.1. *Melanins*

Melanins are heterogenous polymeric compounds of a polyphenolic nature and of complex structure, with variable colouration from yellow to black (Prota, 1988). These pigments are extensively distributed in nature and play different biological functions. Thus an important role for tyrosinase in arthropods is to favour the cuticle hardening by the so called sclerotization process (Sugumaran, 1991; Parkinson et al., 2001), thus protecting the animal from microorganisms and parasite invasion. In cephalopods, the action is also a defence one since the ink they expel is a substance of melanic nature (Piattelli et al., 1963; Naraoka et al., 2003). Fish and reptiles perform changes in colouration, for camouflage, by reorganization of pigment cells in the epidermis.

In mammals, the colour of skin, hair and eyes shows variations according to the type and amount of melanins. In these cases melanins play a role in recognition and sexual attraction and act as a solar radiation protector. Currently there is a great interest in the implication of melanins on skin cancer, whose growing incidence is probably related to the weakening of the ozone layer (Lozano and Solano, 1989; Kaur and Hill, 2001; Maczek et al., 2005).

1.3.2. *Enzymatic Browning*

In plants, the formation of melanins and brown or black polymers, responsible for browning, are a main problem in fresh fruits and vegetables processing and industrial transformation. Vegetables are an important source of nutrients, vitamins and fibre for human diet. However, customer acceptance greatly depends on their general aspect and on colour, taste and texture, which can be heavily altered by the presence of brown polymers. Moreover, tyrosinase activity also causes nutritional loss by antioxidant phenolics oxidation and quinone reactions with amino acids, peptides and proteins. Economic relevance has attracted researchers' attention, and the enzyme from cereals, seed oils and sugar cane has also been studied (Zawistowski et al., 1991; Vámos-Vigyázó, 1995).

On the other hand, the interest for tyrosinase activity in other products is based on desired browning reactions. This is the case of dates, figs and plums maturation and tea, cocoa and cider production (McEvily et al., 1992).

1.3.3. *Fungi and Plant Tyrosinase*

In ***fungi***, mushroom (*Agaricus bisporus*) and *Neurospora crassa* enzymes are the best known at molecular, structural, and mechanistic levels (Lerch, 1981; Robb, 1984; Gerritsen et al., 1994; Sánchez-Ferrer et al., 1995; Wichers et al., 1996; van Gelder et al., 1997; Seo et al., 2003), with a growing interest on edible truffle sources (Pérez-Gilabert et al., 2001a and 2001b). Fungi tyrosinase is not associated to membrane organules, but it is present in the cytosol (Mayer and Harel, 1991; Wichers et al., 1995).

In ***plants***, the enzyme is present in a wide variety of organs, and is abundant in leaves, tuber roots, flowers and fruits. The activity depends on the species, organ and developmental stage (Mayer and Harel, 1991). Tyrosinase mRNAs have been found in young tissues, suggesting a long life for the enzyme (Lax and Cary, 1995). Cellular localization depends on the species and stage (Marqués et al., 1995; Zawistoski et al., 1991), but has been mainly described on chloroplasts (Mayer and Harel, 1991; Nicolas et al., 1994), and is associated to thylakoid grana (Lax and Vaughn, 1991). It has also been detected on mitochondrias, peroxisomes, microsomes, and partially associated to the cell wall (Zawistoski et al., 1991; Mayer and Harel, 1991; Nicolas et al., 1994). The enzyme is also present in the cytosolic fraction (Mayer and Harel, 1991; Nicolas et al., 1994; Marqués et al., 1995).

1.3.4. *Physiological Role in Plants*

The role for tyrosinase in fungi and plants is to date, unclear and the subject of debate (Sommer et al., 1994; Joy et al., 1995; Seo et al., 2003). This may be due to several enzyme characteristics such as (Robb, 1984; Mayer, 1987; Zhang et al., 1999; Nagai and Suzuki, 2001):

- Bivalent activity and complex extraction and purification.
- Cellular location, appearing in different fractions.
- Variations according to source development and growth.
- Existence of a latent fraction, which can be activated under different conditions.
- Enzyme compartmentalization, being separated from the substrates.

All this led to tyrosinase being considered an enzyme “with no established function” (Mayer, 1987; Vaughn et al., 1988). However, some roles have been suggested.

Electronic Transport. It is possible that several non-related functions use quinone capacity to interact with redox reactions during plant growth and development (Sherman et al., 1995). In this sense, it has been suggested that tyrosinase acts as an electronic transporter (Mayer and Harel, 1979), or at least the fraction located in the mitochondria. The implication of the enzyme in the reduction of molecular oxygen in photosystem I (PSI) has been also postulated. It would take part in an electronic system that uses oxygen instead of NADP^+ as final acceptor (Tolbert, 1973; Vaughn and Duke, 1984; Vaughn et al., 1988; Sherman et al., 1995).

Defence. Cuts, damages, and infections promote the mixture of the enzyme with the substrates. This generates the formation of quinones, able to bind and inactivate proteins (Wang and Constabel, 2004b). They can also constitute insoluble polymers that may act as a barrier, preventing infection from spreading. In addition, melanins have bacteriostatic capacity (Pierpoint et al., 1977). Analogously, the fungi tyrosinase role lies in the formation of melanins which increase fruit bodies and spores resistance to bacterial hydrolytic enzymes (Kuo and Alexander, 1967; Bell and Wheeler, 1986).

Secondary Metabolites Biosynthesis. In plants belonging to the order Caryophyllales, tyrosinase participation has been proposed at the previously commented level (1.2.1 section) (Strack et al., 2003). A more relevant role has been ascribed to a homologous enzyme in the biosynthesis of aurones, aureusidin synthase. This enzyme catalyzes the oxidation and cyclization of chalcones with

a high specificity to yield aurones, a small family of pigments related to flavonoids (Nakayama et al., 2000 and 2001; Nakayama, 2002).

1.4. Tyrosinase Mechanism of Action

1.4.1. Diphenolase Activity

The catalytic cycle for the oxidation of an *o*-diphenolic substrate to an *o*-quinone by tyrosinase in the presence of molecular oxygen is shown in Figure 18.4. Beginning with the *met*-tyrosinase form, the binding of an *o*-diphenol yields the E_{met} -diphenol intermediate that generates an *o*-quinone and reduces active site Cu^{2+} to Cu^{+} (Figure 18.4, steps 1 and 2). No semiquinone intermediates are generated (Mason et al., 1961). In the following step (step 3), *deoxy*-tyrosinase reacts in a reversible way with molecular oxygen being formed *oxy*-tyrosinase. This enzymatic form reacts with a second *o*-diphenol molecule (steps 4 and 5), implying the reduction of the endogenous hydrogen peroxide to water to form an *o*-quinone and regenerate *met*-tyrosinase.

The *o*-quinones enzymatically generated suffer a nucleophilic addition, which is intramolecular for DOPA or dopamine. This generates a diphenol that is oxydized by an additional *o*-quinone, which is reduced to the original *o*-diphenol. Thus, the corresponding aminochrome or oxidized aduct are generated (step 9).

1.4.2. Monophenolase Activity

The monophenolase activity of tyrosinase is characterized by the existence of a lag period in the expression of the steady-state rate. The duration of this period depends on the pH and on the enzyme and monophenol concentration (García-Carmona et al., 1979; García-Cánovas et al., 1981; Rodríguez-López et al., 1992; Valero and García-Carmona, 1992). The presence of catalytic amounts of *o*-diphenol or metal ions can reduce it to suppression (Pomerantz and Warner, 1967; Palumbo et al., 1985; Ros et al., 1993). Several hypotheses have been proposed in the literature to explain the existence of the lag period (Tripathi et

al., 1988; Hearing and Ekel, 1976; Duckworth and Coleman, 1970). Studies performed in this Department allowed the establishment of the general mechanism shown in Figure 18.4 (Cabanes et al., 1987), which is able to predict the described characteristics and to adjust the experimental data.

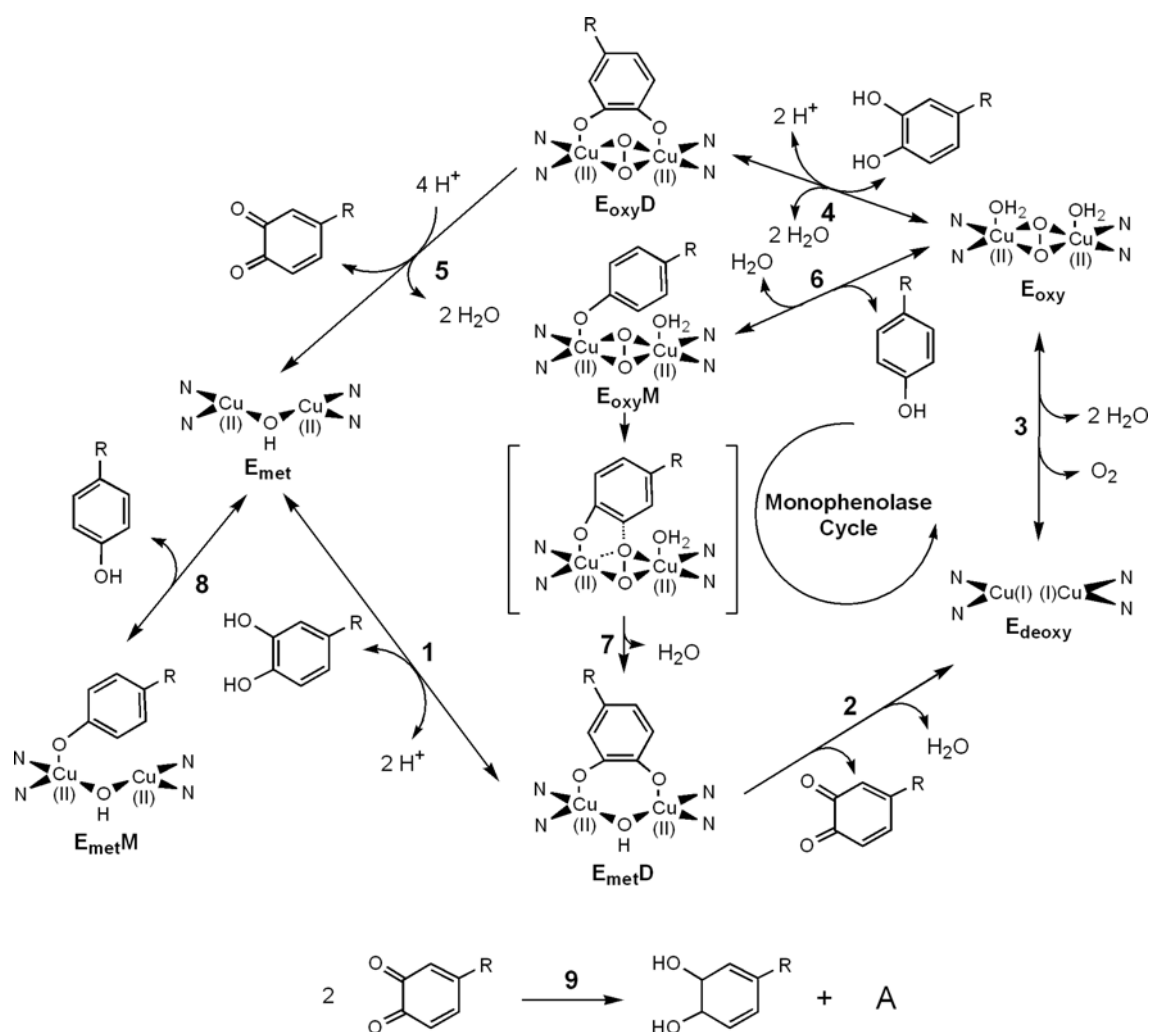


Figure 18.4. Tyrosinase mechanism of action (Cabanes et al., 1987). A, oxidized aduct or aminochrome; M, monophenol; D, diphenol.

The monophenol binds to the active site of the *oxy*-tyrosinase form (Figure 18.4, step 6). This leads to substrate hydroxylation and to the formation of E_{met} -diphenol and water as products (step 7). In the following step, E_{met} -diphenol can dissociate into diphenol and E_{met} (step 1) or evolve to the production of the *o*-quinone (step 2) and the form E_{deoxy} , which reacts with molecular oxygen to yield

E_{oxy} . The last steps overlap with part of the diphenolase cycle (steps 2 and 3), thus confirming the deep relation between both activities of the enzyme.

On the other hand, the binding of monophenol to the enzymatic form E_{met} (step 8) generates a dead-end complex since this form is not able to hydroxylate monophenols. The dead-end complex traps the enzyme and withdraws it from the catalytic turnover, and is the cause of the observed lag period. The enzyme re-enters the catalytic cycle (steps 1-3) through the *o*-diphenol obtained in the chemical steps (step 9). An increase in *o*-difenol level produces a higher monophenol transformation to *o*-quinone, and the lag period disappears when the level of *o*-diphenol is sufficient to maintain the stationary state.

1.5. Molecular Properties of Tyrosinase

The use of Molecular Biology techniques has made it possible in recent years to increase the number of known sequences of tyrosinase (Haruta et al., 2001; Sánchez-Amat et al., 2001; Naraoka et al., 2003; Nishimura et al., 2003; Boonanuntanasarn et al., 2004; Obata et al., 2004; Sullivan et al., 2004). Sequence analysis and comparison show a tyrosinase division in plants, vertebrates, fungi and bacteria. Homologies within each group are considerably higher than between them. However sequences responsible for copper binding are highly conserved in all the species and are analogous to the sequences of oxygen transport enzymes hemocyanins (van Gelder et al., 1997; Seo et al., 2003; Wichers et al., 2003). Two copper atoms are the base of the active site, and each is coordinated by three highly conserved histidine residues. Copper is the interaction site of tyrosinase with oxygen and substrates.

Chromatography and electrophoresis experiments revealed the existence of multiplicity in tyrosinase extracts. This has been attributed to subunits association-dissociation phenomena (Fling et al., 1963; Jolley et al., 1969; Chazarra et al., 2001a), expression of different related genes (Sommer et al., 1994), posttranslational modifications (Ganesa et al., 1992), and mainly extraction artefacts such as limited proteolysis (Robinson and Dry, 1992),

polymerization with phenolics and association with other proteins (Mayer and Harel, 1991; Zawitowski et al., 1991).

In plants, tyrosinase seems to be synthesized as a pre-protein with a molecular weight of 68-73 kDa, which is processed to a mature protein of 58-68 kDa. This can originate a monomeric active protein of 40-45 kDa through *in vivo* and *in vitro* proteolysis (van Gelder et al., 1997). When tyrosinase has been purified to homogeneity, it is frequently described as a monomer (Ding et al., 1998; Bilka et al., 2003), that in some cases can be associated to yield multimers, normally tetramers (Paul and Gowda, 2000; Chazarra et al., 2001a; Marri et al., 2003). This has been described to generate a positive cooperative behaviour (Chazarra et al., 2001b).

1.5.1. Crystal Structure

Difficulties inherent to tyrosinase purification and those derived from its multiplicity, have prevented pure crystals suitable for X-rays diffraction experiments being obtained. To date, structure elucidation of a complete tyrosinase has not been reported, and structural approximations were based on the knowledge of arthropods hemocyanin (van Gelder et al., 1997). However, the crystal structure of a catechol oxidase from sweet potato (*Ipomoea batatas*) has recently been obtained (Klabunde et al., 1998). Catechol oxidase is an enzyme analogous to tyrosinase with no hydroxylating activity (Rompel et al., 1999). The reported structure (Protein Data Bank codes 1BT1-1BT3) shows the active site at the centre of a four helix bundle (Figure 18.5.A). Two copper atoms are coordinated by three histidine ligands (histidines 88, 109 and 118 for CuA, and histidines 240, 244 and 274 for CuB) (Figure 18.5.B). In addition, next to the active site there is a cysteine residue binding to the ligand histidine H109 through a thioether bond. The crystal structure of catechol oxidase reveals that this covalent bond puts additional structural restraints on the ligand sphere of the CuA center.

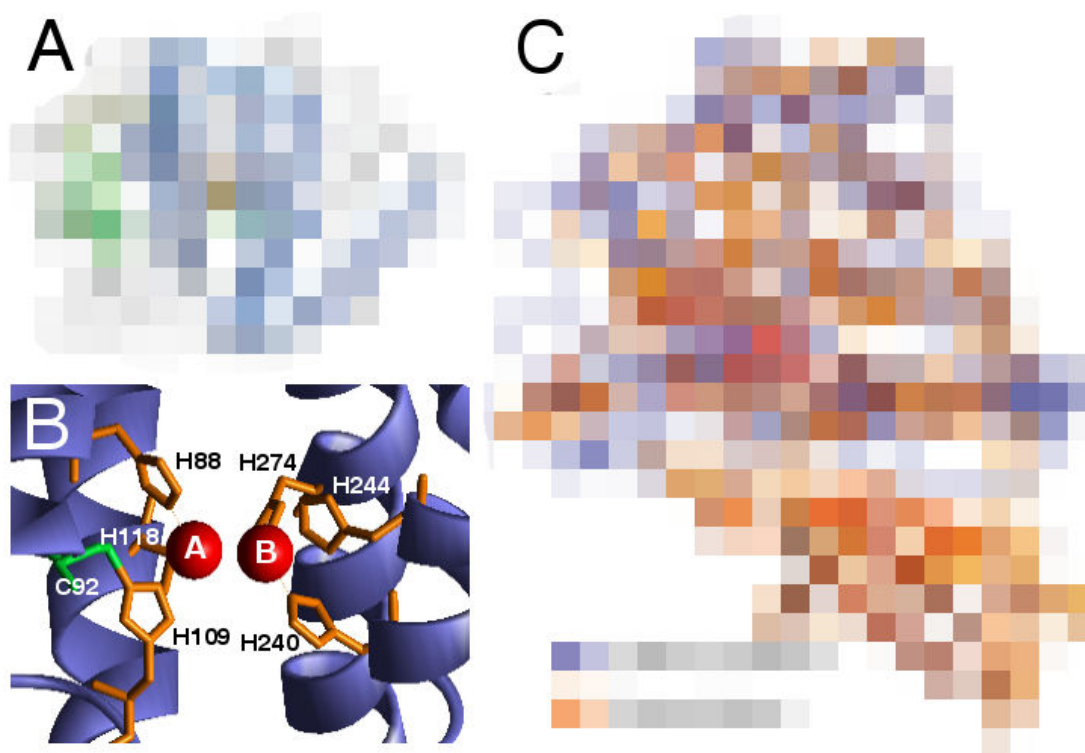


Figure 18.5. Crystal structure of catechol oxidase from sweet potato (*Ipomoea batatas*). A, general overview (copper atoms, orange; α -helices, blue; β -sheets, green; disulfide bonds, yellow); B, active site (histidines, orange; cysteine, green; copper atoms, red); C, comparison with the structure of the hemocyanin from *Octopus dofleini* mollusc (orange). A and C are from Gerdemann et al. (2002a), and B has been generated from the structure PDB ID: 1BT3 by using WebLab Viewer software (Molecular Simulations Inc.).

Active site region of *Ipomoea batatas* catechol oxidase shows structural analogy with mollusc and arthropod hemocyanins active sites (Eicken et al., 1999; Gerdemann et al., 2002a) (Figura 18.5.C). Ideas on substrate accessibility to the copper atoms can be drawn from comparative structure analysis. Phenolic compounds access is blocked in the case of hemocyanins, and the arthropod enzyme active site is protected by a “shield region” found in the N-terminal domain with a phenylalanine residue which occupies the position of a hypothetical phenolic substrate. In the case of molluscs, the same “shield region” is observed. However, in this case it is located in the C-terminal domain and the phenylalanine is substituted by a leucine residue which blocks substrates access less effectively, allowing the existence of a residual catechol oxidase activity. For

sweet potato catechol oxidase there are no limitations to the access of substrates to the active site. However it has been proposed that the latent non-mature form presents the same protecting region in the C-terminal domain (Gerdemann et al., 2002b). These considerations open up possibilities for the existence of enzymatic activity in hemocyanins if a conformational change is able to promote the access of phenolics to the potential active site. This is related to experiments where the presence of the detergent SDS promotes catecholase activity in hemocyanins (Jaenicke and Decker, 2004).

Knowledge on tyrosinase and catechol oxidase active sites is also supported by the synthesis and study of structural models developed with inorganic complexes (Than et al., 1999; Gentshev et al., 2000).

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

Beta vulgaris L. roots (granadina variety) were grown in an organic plantation without addition of pesticide. The roots were harvested, sliced, and frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. *Glottiphyllum oligocarpum* and *Glottiphyllum pigmaeum* plants were obtained from private collections from the association of Friends of the Cacti and Other Succulents (ACYS; Botanical Garden of the University of Valencia, Valencia, Spain). *Portulaca grandiflora* (white, yellow, pale yellow, and violet phenotypes), *Lampranthus productus* (yellow and violet phenotypes), *Carpobrotus acinaciformis* (yellow and violet phenotypes), *Mirabilis jalapa* (white, yellow, violet, red, and variegated flowers) were obtained from plant nurseries and suppliers in Murcia (Eco-Flor; La Generala), and grown by the authors in Murcia, Spain.

2.2. Chemicals

Tyrosinase substrates, protease inhibitors, sorbitol, AA, EDTA, BisTris, SDS, albumin, MBTH, enzymes, and aminoacids were purchased from Sigma

(St. Louis, USA). Inorganic salts and buffers, Triton X-114, 4MN, and TFA were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). The reagents for electrophoresis and protein determination were procured from Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA). Organic solvents were from Merck (Dorset, UK). HPLC grade solvents were obtained from Labscan (Dublin, Ireland). Distilled water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, USA).

2.3. Beet Root Tyrosinase Extraction and Purification

2.3.1. Subcellular Fractionation

Soluble and membrane fractions were obtained from 105 g of beet root slices, which were homogenized twice at maximum speed for 10 s in a Model 230 Omnimixer (Sorvall Inc. Norwalk, USA) with 210 mL of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.33 M sorbitol, 10 mM ascorbic acid, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF, and 1 mM benzamidine. All procedures were carried out at 4°C. The homogenate was filtered through two layers of cheesecloth and centrifuged at 1,000g for 10 min. The pellet, containing the wall fraction, was discarded, and the supernatant was centrifuged at 120,000g for 40 min. The resultant supernatant was considered to be the soluble fraction, and the pellet, the membrane fraction. Soluble fraction was brought up to 35-85% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The salt content was removed by dialysis against 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. The extraction of PPO from the membrane fraction was carried out by using three parallel treatments (1): sonication for 10 min in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0 (2); salted treatment, incubating for 60 min in 0.1 M sodium phosphate buffer containing 1M NaCl (3); and treatment with Triton X-114 (Sánchez-Ferrer et al., 1989). These fractions were centrifuged at 120,000g for 40 min to obtain the solubilized enzyme in the supernatant and dialyzed against 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) overnight to remove the salt content. The pellet obtained after the solubilization with NaCl was treated with TritonX-114, to solubilize the remaining proteins.

2.3.2. Chromatographic Purification

For chromatographic steps, an automated purifier Äkta purifier (General Electric Healthcare - Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), equipped with a pump system P-900, an injector INV-907, and a fraction collector Frac-900. Columns and standards were purchased from the same supplier.

Soluble Enzyme Purification. Soluble PPO was purified by hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. After 35-85% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, the concentrated fraction was loaded onto a 1-mL Resource-ISO pre-packed column equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. PPO was eluted with a linear gradient of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ from 1.5 to 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) within 20 mL (flow rate was 2.0 mL min^{-1}). The fractions containing PPO activity were pooled, desalted, and concentrated by ultrafiltration with a YM 10 membrane (Millipore). For gel filtration, the concentrated peak fractions were applied to a Superdex 200 HR 10/30 column equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.15 M NaCl. The protein was eluted with the same buffer at a flow rate of 1 mL min^{-1} . The eluate was collected in fractions, and PPO activity was measured. A calibration curve was determined for molecular weight estimation using chymotrypsinogen A (25 kDa), ovalbumin (43 kDa), albumin (66 kDa), albumin dimer (132 kDa), aldolase (158 kDa), and catalase (232 kDa).

Membrane-Bound Enzyme Purification. Membrane bound PPO was purified by anion exchange chromatography and gel filtration. The sample, partially purified with Triton X-114, was loaded onto a 1-mL Resource-Q column equilibrated with 20 mM Bis-tris (HCl) buffer (pH 6.0). PPO was eluted with a linear gradient from 0 to 0.7 M NaCl within 50 mL (flow rate was 1.0 mL min^{-1}). The fractions containing PPO activity were pooled, desalted, and concentrated by ultrafiltration. For gel filtration, the same column and method as described for the soluble fraction were used.

2.4. Protein Determination

Protein concentration was determined according to the Bradford Bio-Rad protein assay using serum albumin as standard (Bradford, 1976).

2.5. Electrophoretic Techniques

2.5.1. Denaturing SDS-PAGE

Electrophoresis was carried out using the method of Laemmli (1970). Samples were applied to 10% polyacrylamide gels. The slab gels of 1.5 mm thickness were run in a Miniprotean II cell (Bio-Rad) at a constant current of 180 mV for 50 min.

2.5.2. Partially Denaturing SDS-PAGE

The SDS-PAGE was performed under the same conditions for denaturing PAGE, but in the absence of β -mercaptoethanol and without heating, to preserve the enzymatic activity. SDS detergent was maintained.

2.5.3 Isoelectric Focusing

Isoelectric focusing was performed on 5% (w/v) polyacrylamide gels, containing glycerol 5% (v/v) in a pH gradient 3.5-10.0 using a MiniProtein II (BioRad) electrophoresis kit. Ampholites were obtained from General Electric Healthcare.

2.6. Gel Staining

Gels were stained for protein using a standard Coomassie Blue or silver staining method. For activity staining, after partially denaturing electrophoresis and isoelectric focusing, the gels were equilibrated into 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.0 for 10 min. Staining for PPO activity was carried out in

the same buffer with 5 mM tyramine, SDS 0.69 mM, and 2 mM MBTH (Rodríguez-López et al., 1994). When tyrosinase inhibitor tropolone was added to the staining solution, it was used at a final concentration 5 mM. Activity staining was analogously carried out in PVDF membranes where proteins were transferred from partially denaturing gels (transfer condition are detailed in the following section)

2.7. Western Blotting

Electrophoretic transfer of the proteins onto PVDF membranes (Bio-Rad) was performed using a Mini Trans-Blot apparatus (Bio-Rad). The transfer was carried out at 4°C, under constant stirring in 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 15% MeOH at pH 8.3 (as transfer solution for the soluble fraction after denaturing SDS-PAGE) or in 0.7% acetic acid and 0.01% SDS (as transfer solution for partially denaturing gels and for the membrane fraction after denaturing SDS-PAGE) at 100 V for 1.5 h. Once the transfer was finished, the membranes were blocked in PBST (25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2), 150 mM NaCl, and 0.15% Tween 20) containing 3% albumin at 25°C for 1 h and then incubated overnight at 4°C in PBST containing 1% albumin and polyclonal antibodies against PPO from broad bean leaf (a gift from Dr. William H. Flurkey). To detect the relevant proteins, the membranes were incubated with secondary antibodies conjugated with peroxidase for 1 h, under constant stirring, at 25°C. Finally, protein bands were detected on the membranes using the reaction medium described previously for the peroxidase activity staining (Ferrer et al., 1990), in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), 1 mM 4MN, 0.45 mM H₂O₂. In all experiments, after the transfer, a control membrane without the primary antibodies incubation step was carried out and incubated with this staining solution. Estimations of molecular mass values were based on non-prestained molecular mass markers stained with Ponceau S. Prestained molecular mass markers were used to indicate approximate size and transfer efficiency.

2.8. Spectrophotometric Assays

2.8.1. Spectrophotometric Assays on Simple Phenolics

Monophenolase and diphenolase activities were determined spectrophotometrically at 25°C by measuring the appearance of reaction products in the medium. Catechol, 4-methylcatechol (4MC) and 4-*tert*-butylcatechol (4tBC) oxidations were followed by the appearance of the *o*-benzoquinone product. Aminechrome formation was monitored for L-tyrosine, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), tyramine, and dopamine. Table 18.2 shows molar extinction coefficients and measurement wavelengths used in each case (Waite, 1976). Determination of K_m and V_m values were performed from measurements of the steady-state rate, V_{ss} . The lag period was estimated as the intercept on the abscissa axis obtained by extrapolation of the linear portion. Kinetic data analysis was carried out by using linear and nonlinear regression fitting (Marquardt, 1963), using the SigmaPlot Scientific Graphing for Windows (v 8.0, SPSS, Chicago, USA).

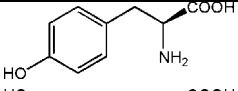
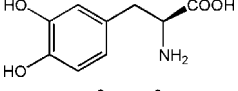
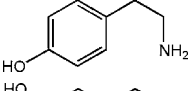
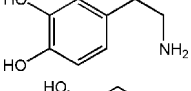
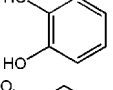
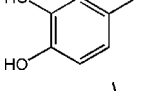
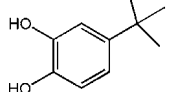
Substrate	Structure	λ_m (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
L-tyrosine		475	3,600
L-DOPA		475	3,600
tyramine		480	3,300
dopamine		480	3,300
catechol		390	1,450
4MC		400	1,350
4tBC		400	1,150

Table 18.2. Structures for the tyrosinase substrates used and absorbance characteristics for their reaction products.

2.8.2. Spectrophotometric Assays on Betalains

For betaxanthins, the reaction medium (1.0 mL) contained 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, and 12.5 mg mL⁻¹ of mushroom or 50 µg mL⁻¹ of beet root tyrosinase. Quartz cuvettes of 0.5 and 1 cm of light path were used. For betanidin, the reaction medium contained 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, and 50 µg mL⁻¹ of enzyme.

The apparent molar extinction coefficients corresponding to betaxanthins and the extinction coefficient of betanidin were determined by an end-point method, carrying out a set of experiments at initial known pigment concentrations and allowing the reaction to proceed until all the substrate had been converted to product. The data thus obtained were fit by least-squares linear regression. Coefficients were determined at wavelengths $\lambda = 480$ nm (dopaxanthin, tyramine-betaxanthin, and dopamine-betaxanthin) and $\lambda = 400$ nm (betanidin).

2.8.3. Quantification of Betalains

Pigment concentration was evaluated through absorbance, taking a molar extinction coefficient of $\epsilon = 48,000$ M⁻¹ cm⁻¹ at 480 nm for betaxanthins (Trezza and Zrýd, 1991b; Schliemann et al., 1999) and $\epsilon = 65,000$ M⁻¹ cm⁻¹ and $\epsilon = 54,000$ M⁻¹ cm⁻¹ at 536 nm for betanin and betanidin, respectively (Schwartz and von Elbe, 1980). Measurements were made in water at 25°C.

2.9. Pigment Extraction

2.9.1. Beet Root Betanin

Betanin from commercial red beet was extracted in 10 mM phosphate buffer, pH 6.0, in a 230 Omnimixer (Sorvall) at maximum speed for 10 s. The homogenate was filtered through cheesecloth and centrifuged at 120,000g for 40

min. The supernatant was then filtered using a YM-10 membrane (Millipore) to remove proteins. All steps were carried out at 4°C.

2.9.2. Flower Pigments

Flower samples were carefully collected, and the petals were removed and washed. Pigments were extracted in 10 mM phosphate buffer, pH 6.0, containing 10 mM AA in a polytron homogenizer (5 s, 2 pulses at medium speed; Kinematica AG, Littau, Switzerland). For betanidin extraction from violet flowers of *Lampranthus productus*, the process was performed in 10 mM sodium acetate buffer, pH 5.0. in all cases, the homogenate was filtered through nylon cloth and centrifuged at 120,000g for 40 min. The supernatant was then filtered through Centriplus YM-10 membranes (Millipore) to remove proteins and the filtrate was used for pigment analysis or further purification. The whole process was carried out at 4°C. For analytical purposes, flower extracts were also carried out in pure MeOH and filtrated through 0.45-mm PVDF filters (Millipore) before analysis.

2.10. Betaxanthins Semi-synthesis

In standard assays, betalamic acid was obtained by basic hydrolysis at room temperature from 2 mL of 0.15 mmol L⁻¹ purified betanin (pH was raised to 11.4 with NH₃). The process was scaled up to 10 mL and repeated in order to obtain higher amounts of selected betaxanthins. 700 µmol of the corresponding amine (dopamine or tyramine) or amino acid (L forms of DOPA, tyrosine, glutamine, glutamic acid, aspartic acid, methionine sulfoxide, proline, alanine, phenylalanine, methionine, histidine, and leucine, and D forms of DOPA and tirosina) per µmol of betalamic acid were added prior to the hydrolysis. After hydrolysis, the pH was lowered with acetic acid to pH 5.0 under ice-cooling, thus allowing condensation between betalamic acid and the amine (Wyler et al., 1965). All solutions were degassed and the whole process was carried out in a N₂ atmosphere.

2.11. Betalain Purification

2.11.1. G-25 Chromatography

Betanin from beet root was purified through G-25 chromatography (Escribano et al., 1998). Purified water (Milli-Q, Millipore) was used as mobile phase, thus simplifying the subsequent processes. A Sephadex G-25 gel (Sigma) was used in a 30 mL column. Elution was performed in 40 mL, and 1 mL fractions were collected. The elution process was followed at 536 and 480 nm. Fractions containing purified betanin were pooled.

2.11.2. Q-Sepharose Chromatography

Immediately after the partial synthesis or after natural extracts ultrafiltration, a purification process for betaxanthins was carried out. Anionic exchange Q-Sepharose Fast Flow columns (cross-linked agarose with quaternary ammonium as exchanger group, 90 μm of particle size) were used in the automatic Äkta purifier (General Electric Healthcare). Elutions were followed at 280, 420, 480, and 536 nm.

Solvents used were 2,2-bis-(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol (BisTris) 20 mM, pH 6.0 (solvent A) and BisTris 20 mM, pH 6.0 with 2 M NaCl (solvent B). Two columns of the same length and volumes of 1 and 5 mL were used. For the 1 mL column (25 $\times$ 7 mm) the elution process was as follows: 0% B from beginning to 7.5 mL (for analytical purposes) or to 15 mL (for semi-preparative elution); then a linear gradient was developed from 0% B to 35% B in 20 mL, collecting 1 mL fractions. Cleaning (7 mL, 50% B) and re-equilibration (7 mL, 100% A) steps were performed between each elution. Injection volume for analytical purposes was 50 μL (flow rate 0.4 mL min⁻¹) and 1 mL (flow rate 0.5 mL min⁻¹) for semi-preparative use.

For the 5 mL column (25 $\times$ 16 mm), the washing of unbound molecules was carried out with 75 mL of starting buffer and the gradient was performed

from 0% B to 35% B in 100 mL. Fractions collected were all of 2 mL. Injection volume was 5 mL (flow rate was 1 mL min⁻¹).

For betanidin purification an analogous solvent system was used based on 10 mM sodium acetate buffer, pH 5.0.

2.11.3. C-18 solid phase extraction

1 mL C-18 cartridges (360 mg packing material), provided by Waters (Milford, MA, USA), were conditioned with 5 mL of methanol followed by 10 mL of purified water. Betalains were injected and bound to the column. Salts and buffers were washed off by rinsing the column with water. DOPA and tyrosine-betaxanthin were eluted later with water and dopamine and tyramine-derived betaxanthins, as well as the betacyanin betanidin, with acetone. Acetone samples were concentrated to dryness under vacuum, and aqueous samples were lyophilized and the compounds were obtained as powders.

2.12. Fluorescence spectroscopy

Fluorescence excitation and emission spectra of betaxanthins were recorded in water at 25°C in a LS50B spectrofluorometer (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, MA, USA). Excitation was measured for emission at the maximum wavelength, and emission was measured for excitation at the corresponding maximum. The final concentration of individual pigments in the quartz cuvette was 6 µM.

2.13. HPLC analysis

A Shimadzu LC-10A apparatus (Kyoto, Japan) was used for analytical HPLC purifications. Reversed phase chromatography was performed with a 250 × 4.6 mm Kromasil 100 C-18 column packed with 5µm particles (Teknokroma, Barcelona, Spain). Gradients were formed between two helium degassed solvents. Solvent A was water acidified with 0.05% trifluoroacetic acid, and

solvent B was composed of acetonitrile with 0.05% trifluoroacetic acid. Linear gradient was performed in 25 min from 0% B to 35% B. The flow rate was 1 mL min⁻¹, operated at 25° C.

2.13.1. Absorbance Detection (PDA)

The photodiode array detector SPD-M10A (Shimadzu) was used for absorbance detection, following elutions at the wavelengths 405, 480, and 536 nm. The range of wavelengths covered was from 250 to 700 nm, and absorbance spectra were recorded for all the species analyzed. Injection volume with this detector was 20 µL.

2.12.2. Fluorescence Detection

For fluorescence detection an RF-10AXL fluorescence detector (Shimadzu) was used. Excitation was carried out at 460 nm and emission was followed at 510 nm. The injection volume was 10 µL. In this case, injection volume was 10 µL. Preliminary analysis were carried out in an Alliance 2695 equipment (Waters), under the same conditions.

2.13.3. Mass Spectrometry Detection

For HPLC-ESI-MS analyses, an Agilent VL 1100 apparatus with LC/MSD Trap (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) was used. Elution conditions were as described above using a Zorbax SB-C18 (30 × 2.1 mm, 3.5 µm) column (Agilent Technologies Inc.) with a flow rate of 0.3 mL min⁻¹. Vaporiser temperature was 350° C and voltage was maintained at 3.5 kV. Sheath gas was nitrogen operated at a pressure of 35 psi. Samples were ionized in positive mode. Ion monitoring mode was full scan in the range *m/z* 60-600. For detection, the electron multiplier voltage was 1,350 V. Injection volume was 20 µL.

2.14. Image Techniques

2.14.1. Fluorescence Photography

Fluorescence photographs were taken using an excitation filter limiting the flash output between 360 nm and 480 nm. A yellow barrier filter blocked off the reflected blue light under 490 nm, and transmitted only the wavelengths emitted by the fluorochrome. Both filters were performed and supplied by Physical Sciences (Andover, MA, USA). Spectra for transmitted light are shown in Chapter X, Figure 2.

2.14.2. Microscopy

Brightfield and fluorescence microscopy were performed in a Leica DMRB microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) with incident light beam. The filtercube I3 (Leica Microsystems) was used (excitation: 450-490 nm). Confocal microscopy images were obtained in a Leica TCS SP confocal microscope (Leica Microsystems), equipped with a Kripto-Argon ion laser. Images of fresh samples were obtained by excitation at 488 nm with the laser beam. Emission was recorded at 500-525 nm.

3. Conclusions

3.1. Characterization of Beet Root Tyrosinase and its Activation

Tyrosinase from red beet root was extracted and purified (Chapter IV). Two fractions were obtained, soluble and membrane bound, with the latter being efficiently solubilized by treatment with the detergent Triton X-114 (Table 4.1). In both cases, the enzyme was characterized as a monomer with masses of 55 kDa (soluble enzyme) and 54 kDa (membrane-bound enzyme) by gel filtration (Figure 4.2) and of 60 kDa by denaturing SDS-PAGE (Figures 4.3 and 4.4). The use of antibodies against a broad bean tyrosinase confirmed the protein's identity.

A high degree of latency was observed for the activity of the enzyme extracted (Chapters V and VI). Limited proteolysis by trypsin and a conformational change promoted by the detergent SDS induced the activity of tyrosinase. Similarities in the activation by these two treatments (Table 5.1 and Figures 4.1 and 5.4) suggest the existence of a common regulation mechanism in the activation processes mediated by the two factors. In addition, the proteolyzed enzyme lost the capacity to be activated by the detergent (Table 5.1 and Figures 5.3 and 5.4).

It has also been demonstrated that beet root tyrosinase activation by SDS depends on the substrate nature, and is able to express activity towards a specific substrate while remaining latent to others (Figures 6.3 and 6.4). The conformational change provoked by the detergent is described by a step-wise model based on cooperativity, which allows the determination of the number of SDS molecules binding to PPO in the activating process (Scheme on Chapter VI). The characteristics of the activation are in agreement with the existence of the “shield region” described in hemocyanins to block the access of phenolic compounds and also proposed in the structural model of a latent catechol oxidase (Gerdemann et al, 2002a and 2002b).

3.2. Characterization of Betaxanthins Fluorescence

Despite the numerous studies in the last 50 years (Piattelli et al., 1964; Stintzing and Carle, 2004), fluorescence in betaxanthins has not been considered. In the works described in the present report, a wide variety of synthetic betaxanthins were obtained (Chapter VII) and their fluorescent properties characterized (Chapters VIII and IX). All the pigments showed a similar behaviour, with excitation maxima between 463 and 475 nm (blue colour) and emission maxima between 506 and 515 nm (blue colour) (Table 9.1). Similarities in fluorescence characteristics point to the responsibility of betalamic acid in fluorescence while the amine moiety represents a limited contribution.

Fluorescent properties of betaxanthins were applied to the detection of the pigments after separation by high-performance liquid chromatography. Wavelengths used were 460 nm for excitation and 510 nm for emission, which were suitable for detecting the native fluorescence of all the pigments assayed independently of the elution time (or acetonitrile content). Fluorescence detection allowed a reduction in the sample volume and in the minimum concentration suitable for quantification in most betaxanthins (Table 9.2). Pre-existing protocols for betaxanthin analysis can be improved by using fluorescence detection.

The establishment of the fluorescent properties of individual pigments and flower extracts raised the question of whether flowers containing betaxanthins could be considered as fluorescent (Chapters X and XI). To observe the fluorescent phenomenon, the incident light was filtered in order to avoid contamination of the emitted fluorescence. Based on the properties of betaxanthins in aqueous solution, a photography filter system specially designed for green fluorescence visualization was used (Figure 10.2). The resulting images show how fluorescence is maintained in the physiological environment (Figures 10.4 and 10.5).

Betacyanins were not found to fluoresce, and due to the overlapping observed between the betacyanin absorbance and the betaxanthin emission spectra (Figure 11.1), the former are able to absorb a high degree of the light emitted by the fluorophores (Figure 11.S1). This inner filter effect is able to generate a contrasting pattern in flower fluorescence (Figure 11.2). In any case, fluorescence can be used in microscopy to observe betaxanthin-containing cells by using a filter system or the 488 nm line of an Argon laser (Figure 10.6 and 11.2).

3.3. Betalains as Substrates for Tyrosinase

As commented in the Introduction (section 1.2), the hydroxylation of tyrosine to DOPA and further oxidation to the *o*-quinone by tyrosinase have been

considered as the first steps in the biosynthesis of betacyanins (Strack et al., 2003). Spontaneous cyclization leads to the formation of *cyclo*-DOPA, which is able to react with one molecule of betalamic acid to form betanidin (Figure 18.6, steps 1-3 and 9), as suggested by Piattelli (1981). However, the pathway has not been clearly demonstrated experimentally, and betanidin has been obtained *in vitro* through the oxidation of tyrosine or DOPA to DOPA-chrome, its subsequent reduction by high concentrations of AA (Figure 18.6, step 5), and later addition to betalamic acid (Schliemann et al., 1998). This mechanism is not likely to occur at a biological level because, if the AA is present during the tyrosine or DOPA oxidation, this would reduce DOPA-quinone to the diphenol (step 6), and *cyclo*-DOPA or DOPA-chrome could not be obtained. Moreover, the presence of betalamic acid during the first steps should imply its condensation with tyrosine or DOPA, leading spontaneously to the corresponding betaxanthins (steps 7 and 8).

On the other hand, betaxanthins had not been considered as taking part in the biosynthesis of betacyanins and the enzymatic activity of tyrosinase on the pigments had not been reported. Two different pathways were assumed which only shared the formation of the structural unit betalamic acid. The results commented in this report (Chapters XII-XV) indicate that tyrosinase may be involved in betalains biosynthesis at a previously unconsidered level. The conversion of betaxanthins derived from monophenols to diphenolic betaxanthins has been demonstrated (Figure 14.4), with characterization of the lag period of the monophenolase activity of tyrosinase on tyramine-betaxanthin (Figures 14.6 and 14.7). Further evolution of diphenolic betaxanthins mediated by tyrosinase yielded a complex profile of “leuko” forms (Figures 12.5, 13.2, and 14.2), related to betanidin.

An alternative biosynthetic pathway for betacyanins is proposed based on the addition of betalamic acid to tyrosine and/or DOPA to form the corresponding betaxanthins (Figure 18.6, steps 7 and 8). In it, tyrosinase catalyzes the ortho-hydroxylation of the monophenol tyrosine-betaxanthin to the diphenol dopaxanthin (monophenolase activity). Dopaxanthin is oxidized in a

subsequent reaction also catalyzed by tyrosinase (diphenolase activity) to give the corresponding *o*-quinone (dopaxanthinquinone), with both steps occurring in the presence of molecular oxygen (Figure 18.6, steps 10 and 11). In the absence of any reducing agent in the reaction medium, the *o*-quinone evolves nonenzymatically to yield a “leuko” product, such as betanidin (Figure 18.6, step 13), in line with the behaviour experienced by DOPA (Cánovas et al., 1982).

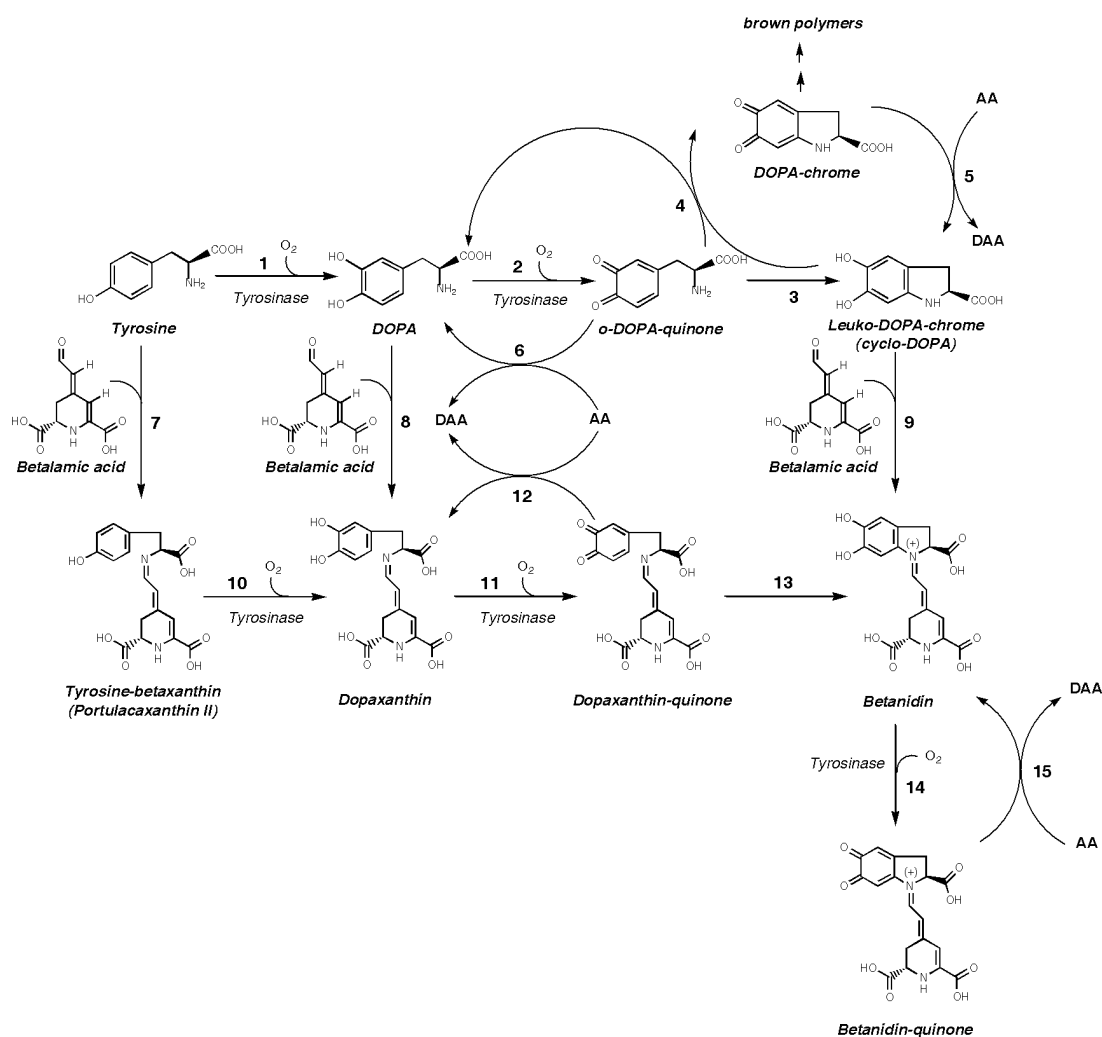


Figure 18.6. Biosynthetic scheme for betalains. New steps proposed for the formation of betacyanins (steps 7, 8 and 10-15) and those previously considered in the bibliography (steps 1-3 and 9) are shown.

Conditions for the formation of betanidin from dopaxanthin-quinone are still to be fully determined, but this pathway is plausible at a biological level. The formation of betanidin may be favoured *in vivo*. A suitable micro-environment

(free from ascorbic acid) may be necessary for conducting internal-cyclization and may be procured by the active site of a specific tyrosinase. This was also indicated for the oxidative cyclization yielding aureusidin from chalcones (Sato et al., 2001). Betanidin has also been described as a tyrosinase substrate stabilized by the presence of ascorbic acid in the medium (Chapter XV). The enzyme affinity and catalytic efficiency (V_m/K_m) on the betacyanin are lower than those found for the betaxanthins studied (Table 18.3).

Substrate	K_m (μM)	V_m ($\mu\text{M min}^{-1}$)	V_m/K_m (min^{-1})	Chapter
(<i>S</i>)-Dopaxanthin	84.3	9.5	0.11	XII
Dopamine-betaxanthin	94.7	74.4	0.79	XIV
Tyramine-betaxanthin	126.9	10.4	0.082	XIV
Betanidin	662.0	10.3 ^a	0.016 ^a	XV

Table 18.3. Kinetic parameters for tyrosinase using betaxanthins and betanidin as substrates. ^a V_m value on betanidin has been normalized for the same enzyme amount used for betaxanthins ($12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

An analogous biosynthetic scheme can be followed for the formation of *R*-betacyanins derived from *R*-tyrosine-betaxanthin (Chapter XIII) or for the formation of 2-descarboxy-betacyanins from tyramine-betaxanthin (Figure 14.8). The formation of betacyanins from betaxanthins would make tyrosinase the decisive enzyme responsible for the change of colour from yellow to violet in plants of the order Caryophyllales. The implication of tyrosinase on the betalain biosynthetic scheme, together with the results of the research on aurones (Nakayama, 2002), support the existence of a biological role for tyrosinase in the biosynthesis of plant pigments.

Capítulo XIX. Bibliografía

La bibliografía aquí incluida contiene las citas correspondientes a los Capítulos de Introducción, Materiales y Métodos, y Discusión General.

- Alard, D., Wray, V., Grotjahn, L., Reznik, H., y Strack, D. (1985). Neobetanin: Isolation and identification from *Beta vulgaris*. *Phytochemistry*, **24**, 2383–2385.
- Allegra M., Furtmüller P.G., Jantschko W., Zederbauer M., Tesoriere L., Livrea M.A., Obinger C. (2005) Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **332**, 837-844.
- Arnold, K.E., Owens, I.P.F. y Marshall, N.J. (2002). Fluorescent signaling in parrots. *Science*, **295**, 92.
- Attoe E.L. y von Elbe, J.H. (1981). Photochemical degradation of betanine and selected anthocyanins. *J. Food Sci.*, **46**, 1934-1937.
- Ayasse, M., Schiestl, F.P., Paulus, H.F., Ibarra, F. y Francke, W. (2003). Pollinator attraction in a sexually deceptive orchid by means of unconventional chemicals. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **270**, 517-522.
- Barth, H., Kobayashi, M. y Musso, H. (1979). Über die Synthese des Muscaflavins. *Helv. Chim. Acta*, **62**, 1231-1235.
- Bell, A.A. y Wheeler, M.H. (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **24**, 411-451.
- Bilka, F., Balazová, A., Bilková, A., Subr, Z. y Psenák, M. (2003). Characterization of polyphenol oxidase from the latex of opium poppy. *Biologia Planta.*, **47**, 111-115.
- Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki, G., Iwai, K. y Takeuchi, T. (2004). Molecular cloning, gene expression in albino mutants and gene knockdown studies of tyrosinase mRNA in rainbow trout. *Pigment Cell Res.*, **17**, 413-21.
- Boss, P.K., Gardner, R.C., Janssen, B. y Ross, G.S. (1995). An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues. *Plant Mol. Biol.*, **27**, 429-433.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-258.
- Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F, Bongiorno, A., Allegra, M. Pintaudi A.M., Kohen, R. y Livrea, M.A. (2002).Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6895-6901.
- Büchi, G., Fliri, H. y Shapiro, R. (1977). A synthesis of betalamic acid. *J. Org. Chem.*, **42**, 2192-2194.
- Cabanes, J., García Cánovas. F., Lozano, J.A. y García-Carmona, F. (1987). A kinetic study of the melanization pathway between L-tyrosine and dopachrome. *Biochim. Biophys. Acta*, **923**, 187-195.

- Cai, Y., Sun, M. y Corke, H. (2001). Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in the Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1971-1978.
- Cai, Y., Sun, M. y Corke, H. (2003). Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2288-2294.
- Cai, Y., Sun, M., Wu, H., Huang, R. y Corke, H. (1998). Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 2063-2070.
- Cánovas, F.G., García-Carmona, F., Sánchez, J.V., Pastor, J.L.I. y Teruel, J.A.L. (1982). The role of pH in the melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.*, **257**, 8738-8744.
- Chang, C., Kimler, L. y Mabry, T.J. (1974). Biogenesis of betalamic acid. *Phytochemistry*, **13**, 2771-2775.
- Chazarra, S., Cabanes, J., Escribano, J. y García-Carmona, F. (1996). Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 984-988.
- Chazarra, S., García-Carmona, F. y Cabanes, J. (2001a). Evidence for a tetrameric form of Iceberg Lettuce (*Lactuca Sativa* L.) polyphenol oxidase: Purification and Characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4870-4875.
- Chazarra, S., García-Carmona, F. y Cabanes, J. (2001b). Hysteresis and positive cooperativity of iceberg lettuce polyphenol oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 769-775.
- Christinet, L., Burdet, F.X., Zaiko, M., Hinz, U. y Zrýd, J.-P. (2004) Characterization and functional identification of a novel plant 4,5-extradiol dioxygenase involved in betalain pigment biosynthesis in *Portulaca grandiflora*. *Plant Physiol.*, **134**, 265-274.
- Constabel, C.P., Bergey, D.R. y Ryan, C.A. (1995). Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 407-411.
- Cuff, M.E., Miller, K.I., van Holde, K.E. y Hendrickson, W.A. (1998). Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin. *J. Mol. Biol.*, **278**, 855-870.
- De Ibarra, N.H., Vorobyev, M., Brandt, R. y Giurfa, M. (2000). Detection of bright and dim colours by honeybees. *J. Exp. Biol.*, **203**, 3289-3298.
- De la Barrera, E. y Nobel, P.S. (2004). Nectar: Properties, floral aspects, and speculations on origin. *Trends Plant Sci.*, **9**, 65-69.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A.R. y Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **40**, 173-289.

- Decker H. y Tuczec F. (2000). Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 392-397.
- Ding, C.-K., Chachin, K., Ueda, Y. y Imahori Y. (1998). Purification and properties of polyphenol oxidase from loquat fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4144-4149.
- Duckworth, H.W. y Coleman, J.E. (1970). Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 1613-1625.
- Eicken, C., Krebs, B y Sacchettini, J.C. (1999). Catechol oxidase - structure and activity. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 677-683.
- Eickman, N.C., Solomon, E.I., Larrabee, J.A., Spiro, T.G. y Lerch, K. (1978). Ultraviolet resonance Raman study of oxytyrosinase. Comparison with hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 6529-6531.
- Eickman, N.C., Himmelwright, R.S. y Solomon, E.I. (1979). Geometric and electronic structure of oxyhemocyanin: Spectral and chemical correlations to met apo, half met, met, and dimer active sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2094-2098.
- Elliott, D.C., Schultz, C.G. y Cassar, R.A. (1983). Betacyanin-decolourizing enzyme in *Amaranthus tricolor* seedlings. *Physiol. Plant.*, **59**, 428-437.
- Endress, R. (1979). Mögliche Beteiligung einer Phenylalaninhydroxylase und einer Tyrosinase bei der Betacyan-Akkumulation in *Portulaca Kallus*. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **174**, 17-25.
- Escribano, J., Cabanes, J. y García-Carmona, F. (1997a). Characterization of latent polyphenol oxidase in table beet: effect of sodium dodecyl sulphate. *J. Sci. Food Agric.*, **45**, 4209-4214.
- Escribano, J., Cabanes, J., Chazarra, S., García-Carmona, F. (1997b). Characterization of monophenolase activity of table beet polyphenol oxidase. Determination of kinetic parameters on the tyramine/dopamine pair. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4209-4214.
- Escribano, J., Pedreño, M.A., García-Carmona, F. y Muñoz, R. (1998). Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochem. Anal.*, **9**, 124-127.
- Ferrer, M.A., Calderón, A.A., Muñoz, R. y Ros Barceló, A. (1990). 4-metoxi- α -naphthol as a specific substrate for kinetic, zymographic and cytochemical studies on plant peroxidase activities. *Phytochem. Anal.*, **1**, 63-69.
- Ferrer, O.J., Koburger, J.A., Otwell, W.S., Gleeson, R.A., Simpson, B.K. y Marshall, M.R. (1989). Phenoloxidase from the cuticle of Florida spiny lobster (*Panulirus argus*): Mode of activation and characterization. *J. Food Sci.*, **54**, 63-67.

- Ferruzzi, M.G., Böhm, V., Courtney, P.D. y Schwartz, S.J. (2002). Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *J. Food. Sci.*, **67**, 2589-2595.
- Fincan, M., De Vito, F. y Dejmek, P. (2004). Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment. *J. Food Eng.*, **64**, 381-388.
- Fischer, N. y Dreiding, A.S. (1972). Biosynthesis of betalaines. On the cleavage of the aromatic ring during the enzymatic transformation of dopa into betalamic acid. *Helv. Chim. Acta*, **55**, 649-658.
- Francis, E., Wang, N., Parag, H., Halaban R., and Hebert, D.N. (2003). Tyrosinase maturation and oligomerization in the endoplasmic reticulum require a melanocyte-specific factor. *J. Biol. Chem.*, **278**, 25607-25617.
- Fraser, P.D y Bramley, P.M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.*, **43**: 228-265.
- Fling, M., Horowitz, N.H. y Heinemann, S.F. (1963). The isolation and properties of crystalline tyrosinase from *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, **238**, 2045-2052.
- Fujita, Y., Uraga, Y. y Ichisima, E. (1995). Molecular cloning and nucleotide sequence of the protyrosinase gene, *melO*, from *Aspergillus oryzae* and expression of the gene in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1261**, 151-154.
- Ganesa, C., Fox, M. T. y Flurkey, W. H. (1992). Microheterogeneity in purified broad bean polyphenol oxidase. *Plant. Physiol.*, **98**, 472-479.
- García-Cánovas, F., García-Carmona, F. y Lozano J.A. (1981). Hysteresis of mushroom tyrosinase. Lag period of cresolase activity. *Phytochemistry*, **20**, 1215-1217.
- García-Carmona, F., Pedreño, E., Galindo, J.D. y García-Canovas, F. (1979). A new spectrophotometric method for the determination of cresolase activity of epidermis tyrosine. *Anal. Biochem.*, **95**, 433-435.
- Gentshev, P., Möller, N. y Krebs, B. (2000). New functional models for catechol oxidases. *Inorg. Chim. Acta*, **300-302**, 442-452.
- Gerdemann, C., Eicken, C. y Krebs, B. (2002a). The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. *Acc. Chem. Res.*, **35**, 183-191.
- Gerdemann, C., Eicken, C., Galla, H.-J. y Krebs, B. (2002b). Comparative modeling of the latent form of a plant catechol oxidase using a molluscan hemocyanin structure. *J. Inorg. Biochem.*, **89**, 155-158.
- Gerritsen, Y.A.M., Chapelon, C.G.J. y Wichers, H.J. (1994). The low-isoelectric point tyrosinase of *Agaricus bisporus* may be a glycoprotein. *Phytochemistry*, **35**, 573-577.

- Girod P.A. y Zrýd, J.-P. (1991a). Biogenesis of betalains: purification and partial characterization of DOPA 4,5-dioxygenase from *Amanita muscaria*. *Phytochemistry*, **30**, 169-174.
- Girod, P.A. y Zrýd, J.-P. (1991b). Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells: differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **25**, 1–12.
- Giurfa, M., Eichmann, B. y Menzel, R. (1996). Symmetry perception in an insect. *Nature*, **382**, 458-461.
- Golbeck, J.H. y Cammarata, K.V. (1981). Spinach thylakoid polyphenoloxidase. Isolation, activation and properties of native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.*, **67**, 977-984.
- Gumbert, A. (2000). Color choices by bumble bees (*Bombus terrestris*): innate preferences and generalization after learning. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **48**, 36-43.
- Gumbert, A., Kunze, J. y Chittka, L. (1999). Floral colour diversity in plant communities, bee colour space and a null model. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **266**, 1711-1716.
- Gutteridge, S. y Robb, D.A. (1975). The catecholase activity of *Neurospora* tyrosinase. *Eur. J. Biochem.*, **54**, 107-116.
- Hans, J., Brandt, W. y Vogt, T. (2004). Site-directed mutagenesis and protein 3D-homology modeling suggest a catalytic mechanism for UDP-glucose-dependent betanidin 5-O-glucosyltransferase from *Dorotheanthus bellidiformis*. *Plant J.*, **39**, 319-333.
- Haruta, M., Pedersen J.A. y Constabel, C.P. (2001). Polyphenol oxidase and herbivore defense in trembling aspen (*Populus tremuloides*): cDNA cloning, expression, and potential substrates. *Physiol. Plant.*, **112**, 552–558.
- Hearing, V.J. y Ekel, J.M. (1976). Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation. *Biochem. J.*, **157**, 549-557.
- Heiling, A.M., Herberstein, M.E. y Chittka L. (2003). Pollinator attraction: Crab-spiders manipulate flower signals. *Nature*, **421**, 334.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. y Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, **13**, 572-584.
- Hempel, J. y Böhm, H. (1997). Betaxanthin pattern of hairy roots from *Beta vulgaris* var. *lutea* and its alteration by feeding of amino acids. *Phytochemistry*, **44**, 847-852.

- Herbach, K.M., Stintzing, F.C. y Carle, R. (2004). Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *J. Food Sci.*, **69**, 491-498.
- Heuer, S. y Strack, D. (1992). Synthesis of betanin from betanidin and UDP-glucose by a protein preparation from cell suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* (Burm. f.) N.E.Br. *Planta*, **186**, 626-628.
- Heuer, S., Vogt, T., Böhm, H. y Strack, D. (1996). Partial purification and characterization of UDP-glucose:betanidin 5-O- and 6-O-glucosyltransferases from cell suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* (Burm. f.) N.E.Br. *Planta*, **199**, 244-250.
- Himmelwright, R.S., Eickman, N.C., Lu Bien, C.D., Lerch, K. y Solomon, E.I. (1980). Chemical and spectral studies of the binuclear copper active site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7339-7344.
- Hinz, U.G., Fivaz, J., Girod, P.-A. y Zyrd, J.-P. (1997). The gene coding for the DOPA dioxygenase involved in betalain biosynthesis in *Amanita muscaria* and its regulation. *Mol. Gen. Genet.*, **256**, 1-6.
- Hirschberg, J. (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**, 210-218.
- Huang, A.S. y von Elbe, J.H. (1985). Kinetics of the degradation and regeneration of betanine. *J. of Food Sci.*, **50**, 1115-1120.
- Huang, A.S. y von Elbe, J.H. (1987). Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine. *J. Food Sci.*, **52**, 1689-1693.
- Impellizzeri, G., Piattelli, M. y Sciuto, S. (1973). A new betaxanthin from *Glottiphyllum longum*. *Phytochemistry*, **12**, 2293-2294.
- Jaenicke, E. y Decker, H. (2004). Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase. *Micron*, **35**, 89-90.
- Jiménez, M. y García-Carmona, F. (1993). Measurement of latent polyphenol oxidase activity in the presence of the divalent cations Ca^{+2} , Mg^{+2} and Mn^{+2} . *Phytochem. Anal.*, **4**, 149-151.
- Jiménez, M. y García-Carmona, F. (1996). The effect of sodium dodecyl sulphate on polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, **42**, 1503-1509.
- Jiménez, M., García-Carmona, F., García-Canovas, F., Iborra, J.L., Lozano, J.A. y Martínez, F. (1984). Chemical intermediates in dopamine oxidation by tyrosinase, and kinetic studies of the process. *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 438-448.
- Jiménez-Atiénzar, M., Pedreño, M.A. y García-Carmona, F. (1991). Activation of polyphenol oxidase by polyamines. *Biochem. Int.*, **25**, 861-868.

- Jolley, R.L., Evans, L.H., Makino, N. y Mason, H.S. (1974). Oxytyrosinase. *J. Biol. Chem.*, **249**, 335-345.
- Jolley, R.L., Robb, D.A. y Mason, H.S. (1969). Multiple forms of mushroom tyrosinase. Association-dissociation phenomena. *J. Biol. Chem.*, **244**, 1593-1599.
- Joy, R.W., Sugiyama, M., Fukuda, H. y Komamine, A. (1995). Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant. Physiol.*, **107**, 1083-1089.
- Kähkönen, M.P. y Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 628-633.
- Kahn, V. (1977). Latency properties of polyphenol oxidase in two avocado cultivars differing in their rate of browning. *J. Sci. Food Agric.*, **28**, 233-239.
- Kanner, J. y Harel, S. (1998). Compositions containing antioxidants and a method for their preparation. Patente Internacional WO 98/26792.
- Kanner, J., Harel, S. y Granit, R. (2001) Betalains, a new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5178-5185.
- Kapadia, G.J., Azuine, M.A., Sridhar, R., Okuda, Y., Tsuruta, A., Ichiishi, E., Mukainake, T., Takasaki, M., Konoshima, T., Nishino, H. y Tokuda, H. (2003). Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot. *Pharmacol. Res.*, **47**, 141-148.
- Kaur, J. y Hill, H.Z. (2001) Transfection of nonmelanocytic cells with tyrosinase gene constructs for survival studies. *Environ. Mol. Mutagen.*, **38**, 216-222.
- Kenten, R.H. (1957). Latent phenolase in extracts of broad bean (*Vicia faba* L.) leaves. 1. Activation by acid and alkali. *Biochem. J.*, **67**, 300-307.
- Kenten, R.H. (1958). Latent phenolase in extracts of broad-bean (*Vicia faba* L.) leaves. 2. Activation by anionic wetting agents. *Biochem. J.*, **68**, 244-251.
- Kim, J.Y., Seo, Y.S., Kim, J.E., Sung, S.-K., Song K.J., An, G. y Kim, W.T. (2001). Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. *Plant Sci.*, **161**, 1145-1152.
- Kimler, L., Larson, R.A., Messenger, L., Moore, J.B. y Mabry, T.J. (1971). Betalamic acid, a new naturally occurring pigment. *J. Chem. Soc. D, Chem. Commun.*, **21**, 1329-1330.
- King, R.S. y Flurkey, W.H. (1987). Effects of limited proteolysis on broad bean polyphenoloxidase. *J. Sci. Food Agric.*, **41**, 231-240.

- Kishima, Y., Suiko, M. y Adachi, T. (1991). Betalain pigmentation in petal of *Portulaca* is preceded by a dramatic tyrosine accumulation. *J. Plant Physiol.*, **137**, 505-506.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C., Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 1084–1090.
- Kobayashi, N., Schmidt, J., Wray, V. y Schliemann, W. (2001). Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. *Phytochemistry*, **56**, 429-436.
- Kugler, F., Stintzing, F.C. y Carle, R. (2004) Identification of betalains from petioles of differently colored Swiss chard (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla* [L.] alef. cv. bright lights) by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 2975-2981
- Kuiper, H.A., Finazzi-Agro, A., Antonini, E. y Brunori, N. (1980a). Luminiscence of carbon monoxide hemocyanins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2387-2389.
- Kuiper, H.A., Lerch, K., Brunori, M. y Finazzi-Agro, A. (1980b). Luminescence of the copper carbon monoxide complex of *Neurospora* tyrosinase. *FEBS Lett.*, **111**, 232-236.
- Kujala, T.S., Vienola, M.S., Klika, K.D., Lojonen, J.M. y Pihlaja, K. (2002). Betalain and phenolic compositions of four beetroot (*Beta vulgaris*) cultivars. *Eur. Food Res. Technol.*, **214**, 505-510.
- Kuo, M.J. y Alexander, M. (1967) Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *J. Bacteriol.*, **94**, 624-629.
- Kumon, K., Sasaki, J., Sejima, M., Takeuchi, Y. y Hayashi, Y. (1990). Betacyanin-decolorizing enzymes from *Phytolacca americana*. *Plant Cell Physiol.*, **31**, 233–240.
- Kupper, U. Niedermann, D.M., Travaglini, G. y Lerch, K. (1989). Isolation and characterization of the tyrosinase gene from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17250-17258.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Larsson, M.C., Stensmyr, M.C., Bice, S.B. y Hansson, B.S. (2003). Attractiveness of fruit and flower odorants detected by olfactory receptor neurons in the fruit chafer *Pachnoda marginata*. *J. Chem. Ecol.*, **29**, 1253-1268.
- Laveda, F., Nuñez-Delicado, E., García-Carmona, F. y Sánchez-Ferrer, A. (2000). Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys.* **379**, 1-6.

- Lax, A.R. y Cary, J.W. (1995). Biology and molecular biology of polyphenol oxidase. En *Enzymatic browning and its prevention*, Lee, C.Y. y Whitaker, J.R., eds. ACS Symposium Series 600, pp. 120-128.
- Lax, A.R. y Vaughn, K.C. (1991). Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant. Physiol.* **96**, 26-31.
- Lerch, K. (1976). *Neurospora* tyrosinase: molecular weight, copper content and spectral properties. *FEBS Lett.*, **69**, 157-160.
- Lerch, K. (1981). Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine β -monooxygenase. En *Metal ions in biological systems. Copper proteins*, Sigel, H., ed. Marcel Dekker, New York, pp. 143-186.
- Lerch, K. (1982). Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, **257**, 6414-6419.
- Lerch, K. (1983). *Neurospora* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell Biochem.*, **52**, 125-138.
- Lerner, H.R., Mayer, A.M. y Harel, E. (1972). Evidence for conformational changes in grape catechol oxidase. *Phytochemistry*, **11**, 2415-2421.
- Lev-Yadun, S. (2001). Aposematic (warning) coloration associated with thorns in higher plants. *J. theor. Biol.*, **210**, 385-388.
- Liebisch, H.-W., Matschiner, B. y Schütte, H.R. (1969). Beiträge zur Physiologie und Biosynthese des Betanins. *Z. Pflanzenphysiol.*, **61**, 269-278.
- Lozano, J.A. y Solano F. (1989). Bioquímica de la pigmentación en mamíferos. *Investigación y Ciencia*, **157**, 87-93.
- Lu, G., Edwards, C.G., Fellman, J.K., Mattinson, D.S., Navazio, J. (2003). Biosynthetic origin of geosmin in red beets (*Beta vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 1026-1029.
- Maczek, C., Berger, T.G., Schuler-Thurner, B., Schultz, E.S., Hamann, A., Dunbar, P.R., Cerundolo, V., Steinkasserer, A. y Schuler, G. (2005). Differences in phenotype and function between spontaneously occurring melan-A-, tyrosinase- and influenza matrix peptide-specific CTL in HLA-A*0201 melanoma patients. *Int. J. Cancer*, **115**, 450-455.
- Markham, K.R., Gould, S. y Ryan, K.G. (2001). Cytoplasmic accumulation of flavonoids in flower petals and its relevance to yellow flower colouration. *Phytochemistry*, **58**, 403-413.
- Marquardt, D.W. (1963). An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.*, **11**, 431-441.

- Marqués, L., Fleuriet, A. y Macheix, J.J. (1995). Fruit polyphenol oxidases. New data on an old problem. En *Enzymatic browning and its prevention*, Lee, C.Y. y Whitaker, J.R., eds. ACS Symposium Series 600, pp. 90-102.
- Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoeppler, A. y Poggi, V. (2003). Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry*, **63**, 745–752.
- Martínez-Parra, J. y Muñoz, R. (1997). An approach to the characterization of betanine oxidation catalyzed by horseradish peroxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2984-2988.
- Martínez-Parra, J. y Muñoz, R. (2001). Characterization of betacyanin oxidation catalyzed by a peroxidase from *Beta vulgaris* L. roots. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4064-4068.
- Mason, H.S. (1956). Structures and functions of the phenolase complex. *Nature*, **177**, 79-81.
- Mason, H.S., Spencer, E. y Yamasaki, I. (1961). Identification by electron spin resonance spectroscopy of the primary product of tyrosinase-catalyzed catechol oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **4**, 236-238.
- Mayer, A.M. (1987). Polyphenol oxidases in plants - recent progress. *Phytochemistry*, **26**, 11-20.
- Mayer, A.M. y Harel, E. (1979). Polyphenol oxidases in plants - review. *Phytochemistry*, **18**, 193-218.
- Mayer, A.M. y Harel, E. (1991). Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. En *Food Enzymology*, Fox, P.F. ed., Elsevier, New York, pp. 373-398.
- McEvily, A.J., Iyengar, R. y Otwell, W.S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **32**, 253-273.
- Mercuri, A., Sacchetti, A., De Benedetti, L., Schiva, T. y Saverio, A. (2001). Green fluorescent flowers. *Plant Sci.*, **161**, 961-968.
- Moore, B.M. y Flurkey, W.H. (1990). Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *J. Biol. Chem.*, **265**, 4982-4990.
- Mosshammer M.R., Stintzing F.C. y Carle R. (2005). Development of a process for the production of a betalain-based colouring foodstuff from cactus pear. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, en prensa.
- Mueller, L.A., Hinz, U. y Zrýd, J.-P. (1996). Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. *Phytochemistry*, **42**, 1511-1515.

- Mueller, L.A., Hinz, U., Uzé, M., Sautter, C. y Zrýd, J.-P. (1997a). Biochemical complementation of the betalain biosynthetic pathway in *Portulaca grandiflora* by a fungal 3,4-dihydroxyphenylalanine dioxygenase. *Planta*, **203**, 260-263.
- Mueller, L.A., Hinz, U. y Zrýd, J.-P. (1997b). The formation of betalamic acid and muscaflavin by recombinant DOPA-dioxygenase from *Amanita*. *Phytochemistry*, **44**, 567-569.
- Mukundan, U., Bhide, V., Singh, G. y Curtis, W.R. (1998). pH-mediated release of betalains from transformed root cultures of *Beta vulgaris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 241-245.
- Musso, H. (1979). Pigments of fly agaric, *Amanita muscaria*. *Tetrahedron*, **35**, 2843-2853.
- Nagai, T. y Suzuki, N. (2001). Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese cabbage *Brassica rapa* L. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3922-3926.
- Naish-Byfield, S. y Riley, P.A. (1992). Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase: An oximetric study. *Biochem. J.*, **288**, 63-67.
- Nakamura, K., Amano, Y. y Kagami, M. (1983). Purification and some properties of a polyphenol oxidase from Koshu grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **34**, 122-127.
- Nakayama, T. (2002). Enzymology of aurone biosynthesis. *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 487-491.
- Nakayama, T., Sato, T., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Hayashi, H., Tanaka, Y., Kusumi, T. y Nishino, T. (2001). Specificity analysis and mechanism of aurone synthesis catalyzed by aureusidin synthase, a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *FEBS Lett.*, **499**, 107-111.
- Nakayama, T., Yonekura-Sakakibara, K., Sato, T., Kikuchi, S., Fukui, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Ueda, T., Nakao, M., Tanaka, Y., Kusumi, T. y Nishino, T. (2000). Aureusidin synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science*, **290**, 1163-1166.
- Naraoka, T., Uchisawa, H., Mori, H., Matsue, H., Chiba, S., y Kimura, A. (2003). Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from the cephalopod mollusk, *Illex argentinus*. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 4026-4038.
- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M. y Aubert, S.Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *CRC Rev. Food Sci. Nutr.*, **34**, 109-157.
- Nishimura, M., Fukuda, C., Murata, M. y Homma, S. (2003). Cloning and some properties of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) polyphenol oxidase, and changes in browning potential during fruit maturation. *J. Sci. Food Agric.*, **83**, 1156-1162.

- Obata, H., Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Asao, T., Akita, O. y Ichishima, E. (2004). Cloning of a novel tyrosinase-encoding gene (*melB*) from *Aspergillus oryzae* and its overexpression in solid-state culture (rice koji). *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 400-405.
- Olah, A.F. y Mueller, W.C. (1981). Ultrastructural localization of oxidative and peroxidative activities in carrot suspension cell culture. *Protoplasma*, **106**, 231-248.
- Overeem, J.C. (1976). Pre-existing antimicrobial substances in plants. En *Biochemical aspects of plant-parasite relationships*, Friend, J. y Threlfall, D.R. eds., Academic Press, London, pp. 195-206.
- Palumbo, A., Misuraca, G., D'Ischia, M. y Prota, G. (1985). Effect of metal ions on the kinetics of tyrosinase oxidation catalysed by tyrosinase. *Biochem. J.*, **228**, 647-651.
- Parkinson, N., Smith, I., Weaver, R. y Edwards, J.P. (2001). A new form of arthropod phenoloxidase is abundant in venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. *Insect Biochem.Mol.Biol.*, **31**, 57-63.
- Paul, B. y Gowda, L.R. (2000). Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*). *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3839-3846.
- Pavlov, A., Kovatcheva, P., Georgiev, V., Koleva, I. y Ilieva M. (2002). Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of red beet (*Beta vulgaris*) hairy root cultures. *Z. Naturforsch.*, **57c**, 640-644.
- Pedreño, M.A. y Escribano, J. (2001). Correlation between antiradical activity and stability of betanine from *Beta vulgaris* L roots under different pH, temperature and light conditions. *J. Sci. Food Agric.*, **81**, 627-631.
- Peñafiel, R., Galindo, J.D., Pedreño, E. y Lozano, J.A. (1982). The process for the activation of frog epidermis pro-tyrosinase. *Biochem. J.*, **205**, 397-404.
- Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M. y García-Carmona, F. (2001a). Partial purification, characterization, and histochemical localization of fully latent desert truffle (*Terfezia Claveryi* Chatin) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1922-1927.
- Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M. y García-Carmona, F. (2001b). Monophenolase activity of latent *Terfezia claveryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiologia Planta.*, **113**, 203-209.
- Pérez-Gilabert, M., Morte, A. y García-Carmona, F. (2004). Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Sci.*, **166**, 365-370.

- Piattelli, M. (1981). The betalains: structure, biosynthesis, and chemical taxonomy. En *The biochemistry of plants*, Vol 7, Conn, E.E. ed., Academic Press Inc., New York, pp. 557-575.
- Piattelli, M., Fattorusso, E., Magno, S. y Nicolaus, R.A. (1963). The structure of melanins and melanogenesis. III. The structure of sepiomelanin. *Tetrahedron*, **19**, 2061-2072.
- Piattelli, M. e Impellizzeri, G. (1970). 2-Descarboxybetanidin, a minor betacyanin from *Carpobrothus acinaciformis*. *Phytochemistry*, **9**, 2553-2556.
- Piattelli, M. y Minale, L. (1964). Betacyanins from *Phyllocactus hybridus* hort. and *Opuntia ficus-indica* Mill. *Phytochemistry*, **3**, 307-311.
- Piattelli, M., Minale, L. y Nicolaus, R.A. (1965a). Betaxanthins from *Mirabilis jalapa* L. *Phytochemistry*, **4**, 817-823.
- Piattelli, M., Minale, L. y Prota, G. (1964). Isolation, structure and absolute configuration of indicaxanthin. *Tetrahedron*, **20**, 2325-2329.
- Piattelli, M., Minale, L. y Prota, G. (1965b). Betaxanthins from *Beta vulgaris* L. *Phytochemistry*, **4**, 121-125.
- Pierpoint, W.S., Ireland, R.J. y Carpenter, J.M. (1977). Modification of proteins during the oxidation of leaf phenols: reaction of potato virus X with chlorogenoquinone. *Phytochemistry*, **16**, 29-34.
- Pomerantz, S.H. y Warner, M.C. (1967). 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine as the tyrosinase cofactor. *J. Biol. Chem.*, **242**, 5308-5314.
- Prota, G. (1988). Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med. Res. Rev.*, **8**, 525-556.
- Pye, A.E. (1974). Microbial activation of prophenoloxidase from immune insect larvae. *Nature*, **251**, 610-613.
- Reinbothe, S. y Reinbothe, C. (1996). The regulation of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis. *Eur. J. Biochem.*, **237**, 323-343.
- Robb, D.A. (1984). Tyrosinase. En *Copper proteins and copper enzymes*, Lontie, R. ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 207-241.
- Robb, D.A., Mapson, L.W., y Swain, T. (1964). Activation of the latent tyrosinase of broad bean. *Nature*, **201**, 503-504.
- Robinson, S.P. y Dry, I.B. (1992). Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60-kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage. *Plant Physiol.*, **99**, 317-323.

- Rodríguez-López, J.N., Escribano, J. y García-Cánovas, F. (1994). A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *Anal. Biochem.*, **216**, 205-212.
- Rodríguez-López, J.N., Tudela, J., Varón, R. y García-Cánovas, F. (1992). Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.*, **267**, 3801-3806.
- Rompel, A., Fischer, H., Meiwes, D., Buldt-Karentzopoulos, K., Dillinger, R., Tuczek, F., Witzel, H. y Krebs B. (1999). Purification and spectroscopic studies on catechol oxidases from *Lycopus europaeus* and *Populus nigra*: evidence for a dinuclear copper center of type 3 and spectroscopic similarities to tyrosinase and hemocyanin. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **4**, 56-63.
- Ros, J.R., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (1993). Effect of ferrous ions on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1163**, 303-308.
- Ros, J.R., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (1994). Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. *Biochim. Biophys. Acta*, **1204**, 33-42.
- Rudrappa, T., Neelwarne, B. y Aswathanarayana, R.G. (2004). In situ and ex situ adsorption and recovery of betalains from hairy root cultures of *Beta vulgaris*. *Biotechnol. Prog.*, **20**, 777-785.
- Saguy, I., Goldman, M., Bord, A. y Cohen E. (1984). Effect of oxygen retained on beet powder on the stability of betanine and vulgaxanthine I. *J. Food Sci.*, **49**, 99-101.
- Saito, K. y Yamazaki, M. (2002) Biochemistry and molecular biology of the late-stage of biosynthesis of anthocyanin: lessons from *Perilla frutescens* as a model plant. *New Phytol.*, **155**, 9-23.
- Sánchez-Amat, A., Lucas-Elio, P., Fernández, E., García-Borrón, J.C. y Solano, F. (2001). Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1547**, 104-116.
- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R. y García-Carmona, F. (1989). Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol.*, **91**, 1481-1487.
- Sánchez-Ferrer, A., Laveda, F. y García-Carmona, F. (1993). Substrate-dependent activation of latente potato leaf polyphenol oxydase by anionic surfactants. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1583-1584.
- Sánchez-Ferrer, A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, **1247**, 1-11.

- Sasaki, K. y Takahashi, T. (2002). A flavonoid from *Brassica rapa* flower as the UV-absorbing nectar guide. *Phytochemistry*, **61**, 339-343.
- Sasaki, N., Adachi, T., Koda, T. y Ozeki, Y. (2004). Detection of UDP-glucose:cyclo-DOPA 5-O-glucosyltransferase activity in four o'clocks (*Mirabilis jalapa* L.). *FEBS Lett.*, **568**, 159-162.
- Sasaki, N., Wada, K., Koda, T., Kasahara, K., Adachi, T. y Ozeki, Y. (2005). Isolation and characterization of cDNAs encoding an enzyme with glucosyltransferase activity for cyclo-DOPA from four o'clocks and feather cockscombs. *Plant Cell. Physiol.*, **46**, 666-670.
- Sato, T., Nakayama, T., Kikuchi, S., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Ueda, T., Nishino, T., Tanaka, Y. y Kusumi, T. (2001). Enzymatic formation of aurones in the extracts of yellow snapdragon flowers. *Plant Sci.*, **160**, 229-236.
- Savagaon, K.A. y Sreenivasan, A. (1978). Activation mechanism of pre-phenolase in lobster and shrimp. *Fish. Technol.*, **15**, 49-55.
- Schaefer, H.M., Schaefer, V. y Douglas, J.L. (2004). How plant-animal interactions signal new insights in communication. *Trends Ecol. Evol.*, **19**, 577-584.
- Schliemann, W., Cai, Y., Degenkolb, T., Schmidt, J. y Corke, H. (2001). Betalains of *Celosia argentea*. *Phytochemistry*, **58**, 159-165.
- Schliemann, W., Kobayashi, N. y Strack, D. (1999). The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. *Plant Physiol.*, **119**, 1217-1232.
- Schliemann, W., Steiner, U. y Strack, D. (1998). Betanidin formation from dihydroxyphenylalanine in a model assay system. *Phytochemistry*, **49**, 1593-1598.
- Schliemann, W. y Strack, D. (1998). Intramolecular stabilization of acylated betacyanins. *Phytochemistry*, **49**, 585-588.
- Schoefs, B. (2004). Determination of pigments in vegetables. *J. Chromatogr. A*, **1054**, 217-226.
- Schwartz, S.J. y von Elbe, J.H. (1980). Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 540-543.
- Schwartz, S.J., von Elbe, J.H., Pariza, M.W., Goldsworthy, T. y Pilot, H.C. (1983). Inability of red beet betalain pigments to initiate or promote hepatocarcinogenesis. *Food Chem. Toxicol.*, **21**, 531-535.
- Sciuto, S., Oriente, G. y Piattelli, M. (1972). Betanidin glucosylation in *Opuntia dillenii*. *Phytochemistry*, **11**, 2259-2262.
- Seo, S-Y., Sharma, V.K. y Sharma, N. (2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2837-2853.

- Sherman, T.D., Vaughn, K.C. y Duke, S.O. (1991). A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, **30**, 2499-2506.
- Sherman, T.D., Le Gardeur, T. y Lax, A.R. (1995). Implications of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase in plants. En *Enzymatic browning and its prevention*, Lee, C.Y. y Whitaker, J.R. eds. ACS Symposium Series 600, pp. 101-119.
- Soboleva, G.A., Ulianova, M.S., Zakharova, N.S. y Bokuchava, M.A. (1976). Betacyanin-decolorizing enzyme, *Biochemistry (Moscow)*, **41**, 794-799.
- Söderhäll, I. (1995). Properties of carrot polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, **39**, 33-38.
- Söderhäll, K., Carlberg, I. y Eriksson, T. (1985). Isolation and partial purification of prophenoloxidase from *Daucus carota* L. cell cultures. *Plant Physiol.*, **78**, 730-733.
- Sojo, M.M., Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F. y Sánchez-Ferrer, A. (1999). Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 8000 for removal of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4924-4930.
- Solomon, E.I., Baldwin, M.J. y Lowrey, M.D. (1992). Electronic structures of active sites in copper proteins: Contributions to reactivity. *Chem. Rev.*, **92**, 521-542.
- Solomon, E.I. y Lowrey, M.D. (1993). Electronic structure contribution to function in bioinorganic chemistry. *Science*, **259**, 1575-1581.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M. y Machonkin, T.E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.*, **96**, 2563-2605.
- Sommer, A., Newman, E., Steffens, C., Mayer, A.M. y Harel, E. (1994). Import, targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant. Physiol.*, **105**, 1301-1311.
- Stafford, H.A. (1994). Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Sci.*, **101**, 91-98.
- Steglich, W. y Strack, D. (1990). Betalains. En *The alkaloids. Chemistry and pharmacology*, Brossi, A. ed., Academic Press, London, pp 1-62.
- Steiner, U., Schliemann, W., Böhm, H.; Strack, D. (1999). Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta*, **208**, 114-124.
- Stintzing, F.C. y Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, **15**, 19-38.
- Stintzing, F.C., Conrad, J., Klaiber, I., Beifuss, U. y Carle, R. (2004a). Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. *Phytochemistry*, **65**, 415-422.

- Stintzing, F.C., Kammerer, D., Schieber, A., Adama, H., Nacoulma, O.G. y Carle, R. (2004b). Betacyanins and phenolic compounds from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhavia erecta* L. *Z. Naturforsch.*, **59c**, 1-8.
- Stintzing F.C., Schieber, A. y Carle, R. (2002). Identification of Betalains from Yellow Beet (*Beta vulgaris* L.) and Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2302-2307.
- Strack, D., Bokern, M., Marxen, N. y Wray, V. (1988). Feruloylbetanin from petals of *Lampranthus* and feruloylamaranthin from cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Phytochemistry*, **27**, 3529-3531.
- Strack, D., Vogt, T. y Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, **62**, 247-269.
- Strothkamp, K.G., Jolley, R.L. y Mason, H.S. (1976). Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 519-524.
- Stuppner, H. y Egger, R. (1996). Application of capillary zone electrophoresis to the analysis of betalains from *Beta vulgaris*. *J. Chromatogr. A*, **735**, 409-413.
- Sugumaran, M. (1991). Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis. Comparison with insect cuticular sclerotization. *FEBS Lett.*, **295**, 233-239.
- Sugumaran, M. (2001). Control mechanisms of the prophenoloxidase cascade. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **484**, 289-298.
- Sugumaran, M. y Nellaiappan, K. (1991a). Lysolecithin - A potent activator of prophenoloxidase from the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 1371-1376.
- Sugumaran, M. y Nellaiappan, K. (1991b). Prophenoloxidase activation by lipids. *Am. Zool.*, **31**, A88.
- Sullivan, M.L., Hatfield, R.D., Thoma, S.L. y Samac, D.A. (2004). Cloning and characterization of red clover polyphenol oxidase cDNAs and expression of active protein in *Escherichia coli* and transgenic alfalfa (1[w]). *Plant Physiol.*, **136**, 3234-3244.
- Swain, T., Mapson, L.W. y Robb, D.A. (1966). Activation of *Vicia faba* (L.) tyrosinase as effected by denaturing agents. *Phytochemistry*, **5**, 469-482.
- Terradas, F. y Wyler, H. (1991a). 2,3-secodopa and 4,5-secodopa, the biosynthetic intermediates generated from L-dopa by an enzyme-system extracted from the fly agaric, *Amanita muscaria* L, and their spontaneous conversion to muscaflavin and betalamic acid, respectively, and betalains. *Helv. Chim. Acta*, **74**, 124-140.
- Terradas, F. y Wyler, H. (1991b). The secodopas, natural pigments in *Hygrocybe conica* and *Amanita muscaria*. *Phytochemistry*, **30**, 3251-3253.

- Tesoriere, L., Butera, D., Allegra, M., Fazzari, M. y Livrea, M.A. (2005). Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1266-1270.
- Tesoriere, L., Butera, D., D'Arpa, D., Di Gaudio, F., Allegra, M., Gentile, C. y Livrea, M.A. (2003). Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins. *Free Radic. Res.*, **37**, 689-696.
- Tesoriere, L., Butera, D., Pintaudi, A.M., Allegra, M. y Livrea, M.A. (2004). Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *Am. J. Clin. Nutr.*, **80**, 391-395.
- Than, R., Feldmann, A.A. y Krebs, B. (1999). Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatases and catechol oxidases. *Coord. Chem. Rev.*, **182**, 211-241.
- Thipyapong, P., Hunt, M.D. y Steffens, J.C. (1995). Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, **40**, 673-676.
- Tolbert, N.E. (1973). Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. *Plant Physiol.*, **51**, 234-244.
- Trezzini, G.F. y Zrýd, J.-P., (1990). *Portulaca grandiflora*: a model system for the study of the biochemistry and genetics of betalain synthesis. *Acta Horticult.*, **280**, 581-585.
- Trezzini, G.F. y Zrýd, J.-P. (1991a). Two betalains from *Portulaca grandiflora*. *Phytochemistry*, **30**, 1897-1899.
- Trezzini, G.F. y Zrýd, J.-P. (1991b). Characterization of some natural and semi-synthetic betaxanthins. *Phytochemistry*, **30**, 1901-1904.
- Valero, E. y García-Carmona, F. (1992). pH-induced kinetic co-operativity of a thylakoid-bound polyphenol oxidase. *Biochem. J.*, **286**, 623-626.
- Valero, E., Lozano, M.I., Varón, R. y García-Carmona, F. (2003). Enzymatic synthesis of 3'-hydroxyacetaminophen catalyzed by tyrosinase. *Biotechnol. Prog.*, **19**, 1632-1638.
- Vámos-Vigyázó, L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **15**, 49-57.
- Vámos-Vigyázó, L. (1995). Prevention of enzymatic browning in fruits and vegetables. A review of principles and practice. En *Enzymatic browning and its prevention*, Lee, C.Y. y Whitaker, J.R., eds. ACS Symposium Series 600, pp. 49-62.
- van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H. y Wichers, H.J. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, **45**, 1309-1323.

- Vaughan, P.F.T., Eason, R., Paton, J. y Ritchie, G.A. (1975). Molecular weight and amino acid composition of purified spinach beet phenolase. *Phytochemistry*, **14**, 2383-2386.
- Vaughn, K.C. y Duke, S.O. (1981). Tissue localization of polyphenol oxidase in *Sorghum*. *Protoplasma*, **108**, 319-327.
- Vaughn, K.C. y Duke, S.O. (1984). Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.*, **60**, 106-112.
- Vaughn, K.C., Lax, A.R. y Duke, S.O. (1988). Polyphenol oxidase: The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.*, **72**, 659-665.
- Vogt, T. (2002). Substrate specificity and sequence analysis define a polyphyletic origin of betanidin 5- and 6-O-glucosyltransferase from *Dorotheanthus bellidiformis*. *Planta*, **214**, 492-495.
- Vogt, T., Grimm, R. y Strack, D. (1999). Cloning and expression of a cDNA encoding betanidin 5-O-glucosyltransferase, a betanidin -and flavonoid- specific enzyme with high homology to inducible glucosyltransferases from the Solanaceae. *Plant J.*, **19**, 509-519.
- Vogt, T., Zimmermann, E., Grimm, R., Meyer, M. y Strack, D. (1997). Are the characteristics of betanidin glucosyltransferases from cell-suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* indicative of their phylogenetic relationship with flavonoid glucosyltransferases?. *Planta*, **203**, 349-361.
- von Ardenne, R., Döpp, H., Musso, H. y Steiglich, W. (1974) Über das Vorkommen von Muscaflavin bei Hygrocyben (Agaricales) und seine Dihydroazepin-Struktur. *Z. Naturforsch.*, **29c**, 637-639.
- von Elbe, J.H., Maing, I.-L. y Amundson C.H. (1974). Color stability of betanin. *J. Food Sci.*, **39**, 334-337.
- Waite, J.H. (1976). Calculating extinction coefficients for enzymatically produced o-quinones. *Anal. Biochem.*, **75**, 211-218.
- Wang, J. y Constabel, C.P. (2004a). Three polyphenol oxidases from hybrid poplar are differentially expressed during development and after wounding and elicitor treatment. *Physiologia Planta.*, **122**, 344-353.
- Wang, J. y Constabel, C.P. (2004b). Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta*, **220**, 87-96.
- Wasserman, B.P. y Guilfooy, M.P. (1983). Peroxidative properties of betanin decolorization by cell walls of red beet. *Phytochemistry*, **22**, 2653-2656.
- Wichers, H.J., Gerritsen, Y.A.M. y Chapelon, C.G.J. (1996). Tyrosinase isoform from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*, **43**, 333-337.

- Wichers, H.J., Peetsma, G.J., Malingré, T.M. y Huizing, H.J. (1984). Purification and properties of a phenol oxidase derived from suspension cultures of *Mucuna pruriens*. *Planta*, **162**, 334-341.
- Wichers, H.J., Recourt, K., Hendriks, M., Ebbelaar, C.E.M., Biancone, G., Hoeberichts, F.A., Mooibroek, H., Soler-Rivas, C. (2003). Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**, 336-341.
- Wichers, H.J., Van der Bosch, T., Gerritsen, Y.A.M., Oyeveaar, J.I., Ebbelaar, C.E.M., Recourt, K. y Kerrigan, R.W. (1995). Enzymology and molecular biology of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Sci.*, **14**, 720-728.
- Wilcox, M.E., Wyler, H. y Dreiding, A.S. (1965). Stereochemie von Betanidin und Isobetanidin. *Helv. Chim. Acta*, **48**, 1134-1147.
- Wink, M. (1997). Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. *Adv. Bot. Res.*, **25**, 141-169.
- Winter, Y., Lopez, J. y von Helversen, O. (2003). Ultraviolet vision in a bat. *Nature*, **425**, 612-614.
- Wittenberg, C. y Triplett, E.L. (1985a). A detergent-activated tyrosinase from *Xenopus laevis*. I. Purification and partial characterization. *J. Biol. Chem.*, **260**, 12535-12541.
- Wittenberg, C. y Triplett, E.L. (1985b). A detergent-activated tyrosinase from *Xenopus laevis*. II. Detergent activation and binding. *J. Biol. Chem.*, **260**, 12542-12546.
- Wybraniec, S. (2005). Formation of decarboxylated betacyanins in heated purified betacyanin fractions from red beet root (*Beta vulgaris* L.) monitored by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 3483-3487.
- Wybraniec, S., Platzner, I., Geresh, S., Gottlieb, H.E., Haimberg, M., Mogilnitzki, M. y Mizrahi Y. (2001). Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhizus*. *Phytochemistry*, **58**, 1209-1212.
- Wybraniec, S. y Mizrahi, Y. (2002). Fruit flesh betacyanin pigments in *Hylocereus cacti*. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6086-6089.
- Wyler, H. y Dreiding, A.S. (1957). Kristallisiertes Betanin. *Hel. Chim. Acta*, **40**, 191-192.
- Wyler, H. y Dreiding, A.S. (1959). Darstellung und Abbauprodukte des Betanidins. *Hel. Chim. Acta*, **42**, 1699-1702.
- Wyler, H., Mabry, T.J. y Dreiding, A.S. (1963). Zur Struktur des Betanidins. *Hel. Chim. Acta*, **46**, 1745-1748.

- Wyler, H., Meuer, U., Bauer, J. y Stravs-Mombelli, L., (1984). Cyclodopa glucoside (= (2S)-5-(β -D-glucopyranosyloxy)-6-hydroxyindoline-2-carboxylic acid) and its occurrence in red beet (*Beta vulgaris* var. *rubra* L.). *Helv. Chim. Acta*, **67**, 1348-1355.
- Wyler, H., Wilcox, M.E. y Dreiding, A.S. (1965). Umwandlung eines Betacyans in ein Betaxanthin. Synthese von Indicaxanthin aus Betanin. *Helv. Chim. Acta*, **48**, 361-366.
- Yang, R.Y.K., Bayraktar, O. y Pu, H.T. (2003). Plant-cell bioreactors with simultaneous electroporabilization and electrophoresis. *J. Biotechnol.*, **100**, 13-22.
- Zakharova, N.S., Petrova, T.A., Shcherbukhin, V.D. y Gins, V.K. (1995). Betacyanin and betalain oxidase in different *Amaranthus* species. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **31**, 202-205.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G. y Eskin, N.A.M. (1991). Polyphenol oxidase. En *Oxidative enzymes in foods*, Robinson, D.S. y Eskin, N.A.M., eds. Elsevier, London pp. 217-273.
- Zhang, X., van Leeuwen, J., Wichers, H.J. y Flurkey, W.H. (1999). Characterization of tyrosinase from the cap flesh of portabella mushrooms. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 374-378.
- Zhao, M., Saito, N., Li, L., Baranov, E., Kondoh, H., Mishima, Y., Sugiyama, M., Katsuoka, K. y Hoffman, R.M. (2000). A novel approach to gene therapy of *Albino* hair in histoculture with a retroviral *Streptomyces* tyrosinase gene. *Pigment Cell Res.*, **13**, 345-351.

