

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Cuajimalpa



**Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Cuajimalpa**

**POSGRADO EN CIENCIAS NATURALES E
INGENIERÍA**

**PURIFICACIÓN PARCIAL Y GENERACIÓN DE MODELOS
MOLECULARES DE LA
POLIFENOL OXIDASA DEL AGUACATE**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MTRO. EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

P R E S E N T A:

BIO. MOL. CESAR GABRIEL VAZQUEZ LIMA

DIRECTOR DE TESIS: DR. HUGO NÁJERA PEÑA

ASESORAS: DRA. ANA LUISA BRAVO DE LA GARZA

DRA. ROXANA LÓPEZ SIMEON

2022



AGRADECIMIENTO A CONACYT

Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Maestría del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental y de cómputo, fue realizado de diciembre de 2019 a septiembre de 2022 en el laboratorio de Biofísicoquímica y vía remota derivado de la pandemia ocasionada por el virus SARS-COV2.

Agradezco la beca que está registrada con un CVU:1043299, la cual fue otorgada por CONACYT durante el tiempo establecido que corresponde a un proyecto de maestría, con este apoyo fue posible lograr este trabajo.



DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 03 del mes noviembre del año 2022, el que suscribe Cesar Gabriel Vazquez Lima alumno del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor (a) intelectual de la presente idónea comunicación de resultados titulada; “Purificación parcial y generación de modelos moleculares de la polifenol oxidasa del aguacate” realizada bajo la dirección del Dr. Hugo Nájera Peña cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación. Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso del director del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: (hnajerap@gmail.com) Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature appears to read "G. Vazquez" or similar.

Cesar Gabriel Vazquez Lima

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, Cesar Gabriel Vazquez Lima, alumno del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature appears to read "G. Vazquez" or similar, with a stylized flourish at the end.

Cesar Gabriel Vazquez Lima

DECLARACIÓN DE NO LUCRO

El que suscribe, Cesar Gabriel Vazquez Lima alumno del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Cesar Gabriel Vazquez Lima.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature appears to read "G. Vazquez" in a cursive style.

Cesar Gabriel Vazquez Lima

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al doctor Hugo Nájera Peña por ser el director de mi proyecto de maestría, por su apoyo, su guía y por todas las enseñanzas que me ha dado desde mis inicios en este camino de la investigación. Usted ha sido un gran profesor y gracias a ello he podido mejorar en aspectos académicos y de manera personal.

A mis asesoras, las doctoras Ana Luisa Bravo de la Garza y Roxana López Simeón por sus lecciones, por su paciencia y retroalimentación que me dieron durante todo este tiempo. Gracias por siempre impulsarme para que pueda dar lo mejor de mi y tenga un mayor crecimiento académico.

A la doctora Elizabeth Ortiz Gutiérrez por su orientación y apoyo que me dio durante el proyecto.

A los doctores Alejandro Sosa Peinado y María De Los Dolores Reyes Duarte por sus aportaciones en la idónea comunicación de resultados ya que gracias a ello se pudo enriquecer el trabajo.

Gracias a mi familia y amigos que me acompañaron durante todo este proceso y a que siempre me alentaron a superarme día a día sin importar que tan difícil pareciera el camino.

Gracias a todos por su apoyo.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	2
POLIFENOL OXIDASA DEL AGUACATE	4
PURIFICACIÓN DE POLIFENOL OXIDASA DEL AGUACATE	5
GENERACIÓN DE ESTRUCTURAS MOLECULARES A PARTIR DE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	7
VALIDACIÓN DE MODELOS	8
2. JUSTIFICACIÓN	8
3. OBJETIVOS	9
OBJETIVO GENERAL:	9
OBJETIVOS PARTICULARES:	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	9
REACTIVOS	9
DESARROLLO EXPERIMENTAL	10
PURIFICACIÓN PARCIAL	11
ELECTROFORESIS	11
PRECIPITACIÓN DIFERENCIAL CON SULFATO DE AMONIO	11
MEDICIÓN DE ACTIVIDAD Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	12
GENERACIÓN DE MODELOS MOLECULARES A TRAVÉS DE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	12
OBTENCIÓN DE LAS REGIONES DE LA PFO DENTRO DEL GENOMA DEL AGUACATE	13
OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	13
ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS	13
GENERACIÓN DE MODELOS DE LA PFO	13
ALINEAMIENTOS	14
VALIDACIÓN DE MODELOS	14
HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	14
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA POLIFENOL OXIDASA	15
ELECTROFORESIS Y DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR	17
PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO	19
7. GENERACIÓN DE MODELOS MOLECULARES A PARTIR DE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	20

IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES DE LAS PFO	20
OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	21
ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS	22
GENERACIÓN DE MODELOS DE LA PFO DEL AGUACATE	23
ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL	27
ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL DE LOS MODELOS VS. ESTRUCTURAS DE LAS PFO CRISTALIZADAS	30
VALIDACIÓN DE LOS MODELOS	32
8. CONCLUSIONES	36
9. PERSPECTIVAS	37
10. REFERENCIAS	37

Índice de figuras

Figura 1. Estructura general de la polifenol oxidasa..	3
Figura 2. Metodología experimental.	10
Figura 3. Desarrollo bioinformático.....	12
Figura 4. Perfil de elución de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).....	15
Figura 5. SDS PAGE.....	18
Figura 6. Secuencias de aminoácidos.....	21
Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos.	22
Figura 8. Modelos generados vistos desde el visualizador CHIMERA.	26
Figura 9. Alineamiento estructural de los modelos moleculares.....	28
Figura 10. Alineamiento estructural de PFO de <i>M. domestica</i> vs. modelos.	29
Figura 11. Alineamiento estructural de PFO cristalizadas vs. modelos.	31
Figura 12. Determinación de la calidad de los modelos mediante VERIFY 3D.....	33
Figura 13. Determinación de la calidad de los modelos mediante PROCHECK.....	35

Índice de tablas

Tabla 1 Herramientas bioinformáticas utilizadas.....	14
Tabla 2 Purificación parcial de la polifenol oxidasa del aguacate.	17
Tabla 3. Precipitación diferencial.....	19

RESUMEN

El pardeamiento enzimático del aguacate se da como resultado de la actividad de las enzimas conocidas como polifenol oxidasas (PFO). Estas cuentan con un centro dinuclear de cobre y pueden llevar a cabo dos reacciones, la primera es la hidroxilación de monofenoles a difenoles y la segunda reacción es la oxidación del difenol a sus respectivas quinonas.

Debido a que el aguacate es uno de los frutos que presenta un alto pardeamiento, en este trabajo se realizaron estudios para purificar parcialmente a la polifenol oxidasa de *Persea americana* mediante el uso de cromatografía de interacción hidrofóbica, dando como resultados una actividad específica de 4038.7 U/mg de proteína, unas 4.2 de aumento en sus veces de purificación y un rendimiento de 5.06%.

Las pruebas de precipitación diferencial permitieron inferir la presencia de al menos dos isoformas de PFO con características hidrofóbicas distintas ya que precipitaron con diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

El uso de herramientas bioinformáticas permitió generar los modelos 0214, 0979 y 2162 a partir del genoma del aguacate presentaron los dos sitios de unión a cobre, cisteínas y fenilalaninas reportados previamente en estructuras de PFO cristalizadas. De igual manera cuentan con los dominios central, C-terminal y con 4 hélices α que se encuentran comúnmente en las estructuras de las PFO.

Todo esto sugiere que las secuencias estudiadas pertenecen a las isoformas de PFO lo cual permitió identificar las posibles estructuras, así como los pesos moleculares y porcentaje de identidad que pudieron compararse con los de otras especies. Al complementar la información obtenida experimental y bioinformáticamente puede inferirse que en el aguacate están presentes isoformas de la polifenol oxidasa en el aguacate Hass.

1. INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill) es uno de los frutos más importantes en México. La producción obtenida de aguacate en nuestro país en el año 2020 fue de 206,466 toneladas, siendo Michoacán el líder productor nacional (94.6%) (1). Dada la cantidad de producción de aguacate, México es un referente de calidad y productividad a nivel internacional.

Se conoce que el aguacate es uno de los frutos que se oxida rápidamente debido a la maduración y manipulación postcosecha. Esta oxidación da como resultado una coloración oscura en el tejido del fruto, a esta reacción se le conoce como pardeamiento enzimático. Este pardeamiento se da en frutas y verduras, como consecuencia del estrés y durante el procesamiento y almacenamiento postcosecha. La enzima responsable del pardeamiento enzimático es la polifenol oxidasa (2).

Las polifenol oxidasas (PFO) son una gran familia de enzimas presentes en animales, plantas, hongos y bacterias. Estas enzimas cuentan con un centro de cobre dinuclear. Las reacciones que pueden llevar a cabo son dos: la primera es la hidroxilación de monofenoles y la segunda reacción es la oxidación del difenol a quinona (3,4). La nomenclatura para la actividad de hidroxilación de monofenol a difenol (cresolasa) es EC 1.14.18.1 y para la oxidación de difenol a quinona (catecol oxidasa) es EC 1.10.3.2 (3).

Se ha demostrado que la PFO requiere de seis histidinas en el sitio activo para que pueda realizar su actividad, estos aminoácidos permiten coordinar a los dos átomos de cobre y de esta manera lograr la unión de la enzima con el sustrato (5). Además de la coordinación del metal, se ha reportado que una de las histidinas del sitio activo y una fenilalanina que se encuentra por encima de este sitio, fungen como guías para que el sustrato se estabilice por medio de interacciones π - π e interacciones π -catión (6). Esto permite comprender el por qué estos aminoácidos son altamente conservados en las polifenol oxidasas.

Se ha visto que la PFO se induce como respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas, algunos de los procesos en los que participa son la defensa y regulación de niveles de oxígeno (7). Se ha reportado que la PFO se induce como respuesta a heridas, a la fitohormona metil jasmonato, a patógenos o a ataques de herbívoros. La inducción de las polifenol oxidasas mediante metil jasmonato es una reacción común pero no universal, este fenómeno se ha encontrado en *Populus trichocarpa*, *Nicotiana tabacum* L., *Camellia sinensis* y *Salvia miltiorrhiza* (3,7). En algunos estudios se demostró que al aplicar metil jasmonato, aumentó la actividad de la PFO al activarse la transcripción de dos isoformas (PFO 2 y PFO 4) de *Camellia sinensis*, lo que dio como resultado el aumento de la defensa ante depredadores (8,9).

En plantas superiores se ha visto que las PFO se encuentran en la luz del tilacoide y en la membrana del cloroplasto, mientras que sus sustratos se encuentran en las vacuolas (10,11). Todas las PFO cuentan con tres dominios, central, C-terminal y N-terminal y cada uno de

estos dominios tienen sus funciones. Los dominios central y C-terminal forman una PFO latente (figura 1) (12). El dominio central es el que alberga al sitio activo, en este se encuentran dos sitios de unión a cobre nombrados Cu A y Cu B, en los cuales se encuentran las histidinas mencionadas anteriormente. Se ha reportado que C-terminal consta de un péptido de tránsito de cloroplasto y tiene un papel importante en la regulación de la actividad de la enzima en el interior de la célula, ya que protege el sitio activo y el dominio N-terminal (7,13).

Otra característica importante reportada es el residuo Ile456 que funciona como un tapón al bloquear la entrada al sitio activo y se encuentra fuera del mismo sitio. El residuo tapón está estabilizado por interacciones hidrofóbicas entre Phe273, la His252 de unión a Cu B y Thr253. La responsable de conectar el dominio central y el dominio C-terminal es la región enlazadora. Las interacciones que se encuentran cercanas a esta región son las responsables de mantener la integridad estructural de la proenzima. Con lo que respecta al enlace entre dominios se encontró que en las estructuras maduras su función principal es la retención del péptido residual (6).

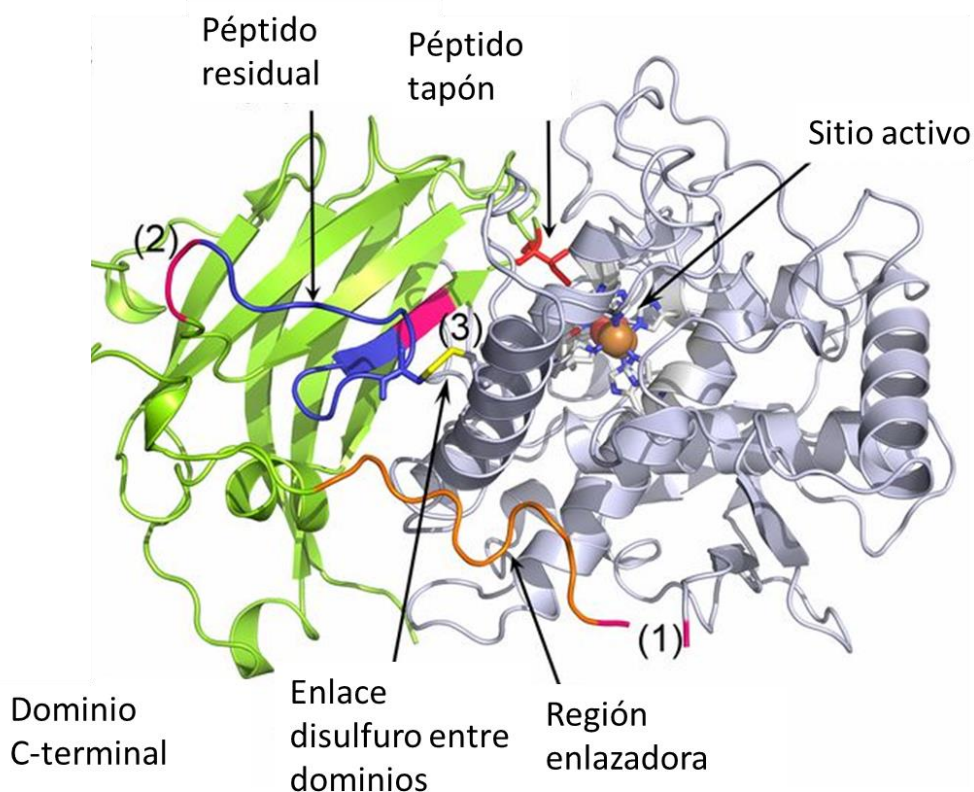


Figura 1. Estructura general de la polifenol oxidasa. El dominio C-terminal cuenta con tres sitios de escisión proteolítica que se presentan en color magenta y enumerados (1), (2) y (3). La PFO presenta una región enlazadora (naranja) que conecta el dominio central (gris)

y el dominio C-terminal (verde), péptido residual del dominio C-terminal (azul), residuo de tapón (rojo) y enlace entre dominios (amarillo). Imagen modificada de (6).

A lo largo de los años se ha demostrado que muchas de las enzimas existen en múltiples formas moleculares, hoy en día se cree que es la excepción y no la regla que una enzima exista en una sola forma (14). A estas múltiples formas se les conoce como isoenzimas o isoformas, las cuales son una serie de proteínas diferentes con una actividad similar (15) y su presencia es una característica común entre las frutas y verduras (4,16).

Las isoenzimas pueden presentar diferencias desde un nivel de secuencia de aminoácidos hasta la estructura cuaternaria, en donde la mayoría presentan regiones conservadas. Cada una de estas estructuras poseen propiedades cinéticas, reguladoras y electroforéticas distintas, mismas que permiten su separación (17).

Las isoformas pueden originarse por medio de agentes ambientales que afecten a la transcripción del gen, el estado de madurez del fruto y la zona o tejido en el que está asociada la enzima (4,18).

POLIFENOL OXIDASA DEL AGUACATE

El primer intento por caracterizar la polifenol oxidasa del aguacate fue realizado por Samich en 1937. En dicho reporte se realizaron estudios cinéticos con distintos sustratos en donde se demostró que este fruto presentaba una enzima capaz de oxidar los ortofenoles y que podía formar parte del grupo “plantas de catecol” (19). Los estudios posteriores a este mostraron evidencia acerca de múltiples formas de la PFO en el aguacate, en donde el principal reto ha sido realizar un tren de purificación que permita la obtención de estas enzimas.

En 1965 se reportó por primera vez la presencia de isoformas de la PFO en frutos del aguacate. Cinco años después de este hallazgo Dizik y Knapp identificaron cinco isoformas con pesos moleculares de 14, 28, 56, 112 y 400 kDa en una variedad de aguacate híbrido Guatemalan x West Indian (20). Otras variedades estudiadas del aguacate han sido Fuerte, Horishim y Lerman, en donde se identificaron seis isoformas, la nueva estructura identificada presentó un peso molecular de 35 kDa. Por otro lado, mediante isoelectroenfoque con un pH de 4-10, demostraron la presencia de 7 isoformas en donde la actividad se midió con 4-metilcatecol (21).

En un estudio reciente Moeini *et al.* (22) reportó la separación de 4 isoformas de PFO con pesos moleculares de 35 kDa, 50 kDa, 70 kDa y 100 kDa, mediante el uso de dos tipos de columnas de cromatografía de afinidad.

El análisis de las isoenzimas puede abordarse experimentalmente mediante su separación por purificación y electroforesis y bioinformáticamente por estudio del genoma, alineamiento de secuencias de nucleótidos y aminoácidos y alineamiento estructural.

PURIFICACIÓN DE POLIFENOL OXIDASA DEL AGUACATE

A lo largo de los años se ha estudiado la PFO de diferentes fuentes y se ha purificado utilizando distintas metodologías, en donde la mayoría de los reportes utilizan un tren de purificación a partir del extracto crudo que puede obtenerse a partir de acetona (C_3H_6O) o amortiguador, siendo fosfato de sodio el más usado, precipitación con sulfato de amonio $((NH_4)_2SO_4)$ o acetona y cromatografías de interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía de intercambio iónico (IEC) y cromatografía de exclusión molecular (SEC). Dependiendo del tipo de purificación que se requiera (total o parcial), se pueden combinar estos pasos.

A pesar de las diferencias que presentan las polifenol oxidasas, se logra identificar que existe un tren de purificación en el que se han obtenido una mayor cantidad de enzimas. Este tren consta de la utilización de amortiguador fosfato de sodio como base para el extracto crudo, la precipitación con sulfato de amonio y cromatografía, la elección de esta última depende de la pureza, carga y tamaño de la enzima.

La elección correcta del tipo de amortiguador es de suma importancia para la purificación ya que las proteínas requieren de ciertas condiciones en su entorno para su correcto funcionamiento como el pH, polaridad, y fuerza iónica. Cualquier fluctuación en estas características pueden afectar la estructura y el funcionamiento de las proteínas. El amortiguador fosfato de sodio es uno de los más utilizados por los investigadores para la purificación ya que logra la estabilización de la enzima para su almacenamiento a largo plazo (23).

Una vez separado los compuestos celulares del extracto proteico se realiza una separación de las diversas proteínas contenidas en el aguacate por medio de precipitación salina. La precipitación con sulfato de amonio ha sido una de las técnicas más utilizadas. La solubilidad de las proteínas se ve afectada por los iones, por esta razón cuando las concentraciones de sal son bajas, la solubilidad de las proteínas aumenta al igual que la fuerza iónica. Cuando hay una fuerza iónica muy alta, la solubilidad de las proteínas disminuye, este proceso es conocido como *salting-out* (24).

Se han reportado algunos estudios de purificación de PFO que comparten esta metodología como *Mangifera indica* cv., Manila (25), *M. domestica* (26), *Pouteria sapota* (27), *Annona muricata* L. (28) y *Solanum melongena* (29). Otro aspecto importante que tienen en común estos reportes es que utilizan cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) dentro de los pasos finales para lograr aislar la PFO de estas especies.

La HIC permite la separación de las proteínas en función de la forma y tamaño de las regiones “parches” hidrofóbicas accesibles en la superficie. Estos parches hidrofóbicos están formados por la presencia de cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos o no polares como la fenilalanina, triptofano, alanina y metionina (30). Estas regiones interactúan con grupos hidrofóbicos inmovilizados y soportados en matrices (31). La cromatografía de interacción hidrofóbica es usualmente utilizada porque explota las características hidrofóbicas de las proteínas como base para su separación de mezclas biológicas complejas (30).

Con lo que respecta a la purificación de la PFO de *P. americana*, en 1965 comenzaron las pruebas para aislar la PFO de este fruto mediante un protocolo en donde se combinó acetona con amortiguador McIlvaine, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de exclusión molecular (20). Las PFO de las variedades Fuerte, Horishim y Lerman lograron aislarse mediante el tren de purificación que constó de acetona combinado con amortiguador fosfato de sodio, precipitación con sulfato de amonio y las cromatografías de exclusión molecular (SEC) e interacción iónica (IEC) (21).

La cromatografía de exclusión molecular como paso final ha permitido la separación de las PFO con base a su tamaño ya que la columna está empaquetada con una matriz de filtración en gel con una distribución de tamaño de poro definido, lo que permite que las proteínas atraviesen la columna en diferentes caminos según sus tamaños (32).

El método de cromatografía de intercambio iónico para la separación de la PFO se basa en la resolución de las proteínas que tienen una carga particular. El material con el que están empacadas las columnas está diseñado para poseer una carga contraria a la del analito de interés. Las matrices de intercambio catiónico atraen a los analitos con carga positiva y las de intercambio iónico atraen a las de carga negativa, logrando de esta manera separar las proteínas (33).

En un estudio reciente, Moeini *et al.* (22) utilizó un tren de purificación para separar las PFO de aguacate, este se basó en el uso de amortiguador de fosfato dipotásico, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de afinidad. Este tipo de cromatografía es un método más selectivo para la separación de la polifenol oxidasa debido a que utiliza un inhibidor reversible para que la enzima pueda unirse a la matriz y de esta forma se logre obtener pura.

Se han utilizado diversas formas para lograr la purificación de PFO de aguacate, por lo que en este trabajo se propuso utilizar el tren de purificación con el cual en varios estudios se han logrado aislar totalmente la enzima en distintas especies.

GENERACIÓN DE ESTRUCTURAS MOLECULARES A PARTIR DE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Por medio del modelado molecular es posible construir una estructura tridimensional de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos. Para poder obtener el modelo, se requiere una estructura que se encuentre en las bases de datos que será usada como plantilla, por ejemplo, para lograr crear el modelo PFO de *Taraxacum officinale* se utilizó *Ipomoea batatas* como referencia (34). El modelo de *S. melongena* se generó a partir de *Vitis vinifera* como plantilla.

Estos modelos permiten identificar las diferencias entre otros generados bioinformáticamente, así como se puede comparar con polifenol oxidasas obtenidas experimentalmente. En este trabajo se utilizaron distintas herramientas bioinformáticas (tabla 1) que permitieron generar modelos estructurales a partir del genoma del aguacate.

La polifenol oxidasa está codificada por una familia de genes que están conservados (11). Una familia de genes es un grupo de genes que descienden de un gen ancestral común, por lo que tienen secuencias y funciones similares (7). En 2019 se publicó el genoma nuclear del aguacate, el cual cuenta con 12 cromosomas, 912.69 Mb y con una relación filogenéticamente cercana con *Musa acuminata* y otras especies (35).

La base de datos *Universal Protein Resource (UniProt)* es un gran recurso de secuencias de proteínas la cual contiene más de 60 millones de secuencias, lo que ha permitido a los científicos navegar por la gran cantidad de información que se encuentra disponible (36). Después de haber obtenido la secuencia de aminoácidos deseada es necesario realizar un alineamiento contra el genoma de interés, en este caso el del aguacate, utilizando **tblastn**. Esta función opera traduciendo secuencias de nucleótidos a secuencias de aminoácidos en los seis marcos de lectura y luego alineando las secuencias de aminoácidos con la consulta (37).

Después de que se obtienen las secuencias alineadas se requiere de una herramienta que traduzca estas secuencias, un ejemplo de este tipo de herramienta es **EMBOSS Transeq** que traduce las secuencias de ácidos nucleicos a sus correspondientes secuencias peptídicas. Como paso final se utiliza un generador de modelos como **SWISS-MODEL**.

Este fue el primer servidor de modelado por homología de proteínas totalmente automatizado y ha mejorado durante los últimos 25 años. Su funcionalidad se ha ampliado recientemente para incluir el modelado de complejos homo y heteroméricos.

Los pasos que lleva a cabo **SWISS-MODEL** son: inserción de los datos de entrada (secuencia de aminoácidos), búsqueda de plantilla (se buscan estructuras proteínicas relacionadas con la secuencia insertada en el primer paso), selección de plantilla (las plantillas se clasifican de acuerdo con la estimación de la calidad del modelo global),

construcción de modelos (para cada plantilla seleccionada se realiza una estructura tridimensional) y estimación de calidad de modelo (se basa en la puntuación de Qmean) (38).

VALIDACIÓN DE MODELOS

Un factor importante por considerar es la validación de los modelos moleculares. Algunas de las herramientas que permiten conocer la calidad de las estructuras son **PROCHECK** y **VERIFY 3D**. La primera genera un gráfico de Ramachandran que brinda información acerca de la estereoquímica de una estructura proteínica (39).

La segunda aporta una tabla calculada a partir de las coordenadas atómicas de la estructura, con la cual se busca observar la compatibilidad del modelo vs. su secuencia de aminoácidos. En perfiles calculados a partir de estructuras proteínicas correctas coinciden con sus secuencias de aminoácidos en puntuaciones altas (40).

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el aguacate es uno de los frutos que muestra un alto pardeamiento enzimático en poco tiempo, como consecuencia de la actividad de PFO al interactuar con sus sustratos, se requiere estandarizar un procedimiento para obtener la enzima pura. La obtención de la enzima permitirá realizar pruebas de caracterización estructural para conocer las propiedades bioquímicas, así como los cambios estructurales de la PFO al entrar en contacto con un inhibidor ya que hoy en día se desconoce para la(s) de este fruto. Esto proporcionará valiosa información para desarrollar un producto eficaz de inhibición de la enzima con utilidad para los consumidores y la industria alimenticia, que no afecte las propiedades organolépticas del aguacate.

El desarrollo de modelos estructurales a partir del genoma del aguacate proporcionará información acerca de la cantidad de isoformas de PFO presentes en este fruto. Con la obtención de estos modelos pueden realizarse pruebas *in silico* para visualizar la interacción entre las estructuras terciarias generadas con potenciales inhibidores de su actividad.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- ❖ Purificar parcialmente la(s) PPO del aguacate para identificar sus isoenzimas y generar sus modelos moleculares.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ❖ Purificar parcialmente la enzima para identificar la presencia y cantidad de isoenzimas.
- ❖ Identificar mediante herramientas bioinformáticas las regiones en donde se encuentran las secuencias de nucleótidos de las PPO.
- ❖ Obtener las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las polifenol oxidasas para generar los modelos moleculares.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS

Se utilizó aguacate fresco (*Persea americana*) adquirido en un mercado local de la Ciudad de México, México. La columna 4 fenil sefarosa de fluido rápido de GE Healthcare (Nueva York, NY, EE. UU.). El reactivo fosfato de sodio de la marca JT Baker, el marcador molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards de BioRad, los reactivos Tritón X-100 para la recuperación de constituyentes de la membrana debido a que es un detergente suave y por tal razón no desnaturaliza las proteínas (25), polivinilpolipirrolidona (PVPP) que funciona como secuestrador de fenoles (41), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) para inhibir la actividad de las proteasas (27), catecol y dimetilsulfóxido (DMSO) fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.), en todos los casos se ocupó agua ultrapura Milli-Q® IQ 7000 de la marca Merck.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

A continuación, se presenta en resumen los experimentos realizados para cumplir con los objetivos planteados (figura 2). Los resultados experimentales presentados en la sección 5 de este documento siguen este esquema de desarrollo experimental.

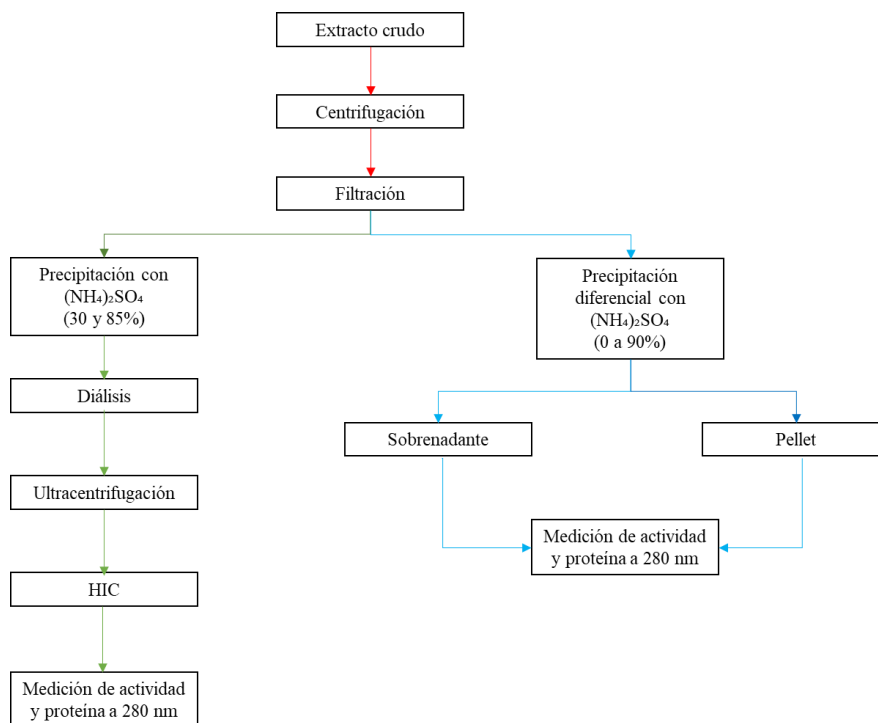


Figura 2. Metodología experimental.

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

Para la preparación del extracto crudo se utilizaron 500 g de pulpa de aguacate, se licó con 1 L de amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7, 10 mL de tritón X-100, 10 g de PVPP y 0.1 mM de PMSF disuelto en DMSO. Posteriormente se centrifugó a 10,650 g por 30 min. El sobrenadante se filtró a partir de una filtración a través de un filtro de celulosa de 25 μ m (figura 2, línea verde).

PURIFICACIÓN PARCIAL

El extracto crudo filtrado se sometió a una precipitación diferencial con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una concentración de 30 y 85%. Posteriormente se centrifugó a una velocidad de 10,650 g por 30 minutos. Todos estos pasos se llevaron a cabo a una temperatura de 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió con amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 7, sulfato de amonio 1.2 M y de cloruro de potasio 0.6 M y se dializó durante toda la noche con tres cambios de amortiguador. La solución dializada se centrifugó a 34,500 g durante 30 minutos y se recogió el sobrenadante (figura 2 línea verde).

La cromatografía se realizó a temperatura ambiente utilizando un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC). El sobrenadante se cargó en una columna vacía XK 16/20 empaquetada con 4 fenil sefarosa de fluido rápido de marca GE healthcare, esta columna se equilibró previamente con el amortiguador de diálisis (amortiguador de equilibrio), véase figura 2 línea verde. La columna se lavó con 70 mL de amortiguador de equilibrio para eliminar las proteínas hidrofílicas. La elusión de las proteínas hidrofóbicas se realizó con un gradiente escalonado de sulfato de amonio cada 15 o 20 mL (según la etapa), diluyendo un 20% el amortiguador de equilibrio en cada etapa mediante la adición de agua destilada. El flujo utilizado durante toda la cromatografía fue de 1 mL/min y se recolectaron fracciones de 2 mL. Se determinó la actividad de la PFO y concentración de proteína para cada fracción.

ELECTROFORESIS

Se determinó el peso molecular de las proteínas purificadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (42). La concentración del gel de separación fue de 12% (V/V) y la del gel concentrador del 4%. La estimación se generó a partir de la ecuación de la recta obtenida al graficar el logaritmo del peso molecular vs. R_f (distancia de migración de la proteína a través del gel dividida por la distancia de migración del frente del colorante).

PRECIPITACIÓN DIFERENCIAL CON SULFATO DE AMONIO

Esta etapa de precipitación (figura 2 línea azul) se realizó a partir del extracto crudo previamente descrito. Éste se separó en vasos de precipitado y posteriormente se agregó en cada uno de ellos una concentración de 10 a 90% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se finalizó centrifugando a 10,650 g. Posteriormente se midió la concentración de proteína y la actividad enzimática del precipitado y el sobrenadante, en donde la fracción soluble con una concentración de 60% de sulfato de amonio se eligió para la segunda precipitación (tabla 3).

MEDICIÓN DE ACTIVIDAD Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La actividad de la enzima se midió en el extracto crudo, en sobrenadantes y precipitados las fracciones obtenidas por cromatografía y en la precipitación diferencial. Para evaluarla se mezclaron 967 μL de catecol 50 mM con 33 μL de la muestra correspondiente y se midió el cambio en la absorbancia a 420 nm utilizando un espectrofotómetro Agilent 8453. El valor de ΔAbs_{420} se registró cada 5 s durante 5 min a 25 °C. Una unidad de actividad de la PPO se definió como el cambio en la absorbancia de $0.001 \text{ min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ de enzima (43).

La concentración de proteína se determinó por absorbancia UV a 280 nm (44), se utilizó un factor de corrección de 0.8 (45).

GENERACIÓN DE MODELOS MOLECULARES A TRAVÉS DE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Para obtener los modelos moleculares de las PFO del aguacate se llevaron a cabo un desarrollo bioinformático el cual se describe a continuación (figura 3), es importante destacar que los resultados experimentales presentados en la sección 5 siguen este esquema de desarrollo.

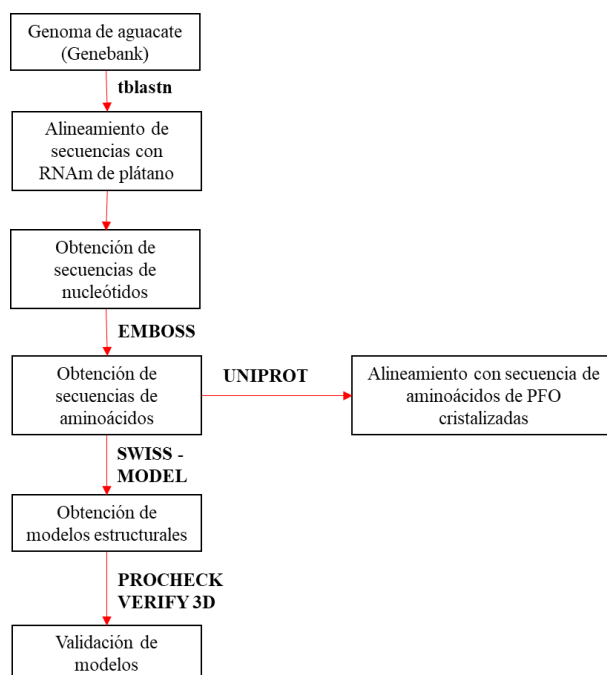


Figura 3. Desarrollo bioinformático para la predicción de los modelos moleculares a partir de las secuencias obtenidas del genoma del aguacate.

OBTENCIÓN DE LAS REGIONES DE LA PFO DENTRO DEL GENOMA DEL AGUACATE.

Se utilizó el ARNm de la PFO del plátano (código UniProt: W5VXS2) debido a que en la base de datos esta secuencia es la que brinda mayor confiabilidad con respecto a las demás de la misma especie ya que esta se obtuvo por homología. De igual manera se usó el genoma de *P. americana* (identificador genbank: GCA_008087245.1) para realizar un alineamiento mediante la herramienta **tblastn** (figura 3).

Las regiones elegidas fueron aquellas que contenían un puntaje de alineamiento ≥ 200 (46). Las regiones putativas que contaron con este puntaje fueron tres: la primera 160177 a 161715 (0979), la segunda de 351412 a 353013 (0214) y 28917 a 30455 (2162).

OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS.

Se utilizó la herramienta Transeq (**EMBOSS**) para traducir las secuencias de nucleótidos que se obtuvieron en los alineamientos del ARNm y el genoma. Esta herramienta permitió conseguir las secuencias de aminoácidos de las regiones 0979, 0214 y 2162.

ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS

El alineamiento se realizó mediante UniProt, se ingresaron las secuencias de aminoácidos de 0979, 0214, 2162 y las secuencias de aminoácidos de las PFO cristalizadas *M. domestica* (6ELS), *J. regia* (5CE9), *I. batatas* (1BT3), *V. vinifera* (2P3X), *Coreopsis grandiflora* (4Z11) y *S. lycopersicum* (6HQI) (figura 3).

GENERACIÓN DE MODELOS DE LA PFO.

Se utilizó la herramienta **SWISS-MODEL** para generar las estructuras terciarias de las secuencias de aminoácidos obtenidas de 0979, 0214 y 2162. Al ingresar las secuencias en el servidor se generaron distintas estructuras terciarias debido a que **SWISS-MODEL** las predice por el uso diferentes plantillas que encuentra en las bases de datos. Se eligió el modelo de cada región con el valor de Qmean más cercano a cero y se descargó en formato pdb (figura 3).

ALINEAMIENTOS

Los alineamientos estructurales se generaron a partir de **UCSF CHIMERA**. Se ingresaron cada una de las estructuras dependiendo del tipo de alineamiento: modelos-modelos, estructuras cristalizadas-estructuras cristalizadas, modelos- *M. domestica* y modelos-estructuras cristalizadas (figura 3).

VALIDACIÓN DE MODELOS

La validación de las estructuras se realizó en el servidor SAVES 6.0. Se insertaron los modelos moleculares con formato pdb para la obtención de gráficos de Ramachandran y de la compatibilidad de la estructura del modelo atómico con su secuencia de aminoácidos (figura 3).

HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

A continuación, se presenta en resumen de las herramientas bioinformáticas utilizadas para cumplir con los objetivos planteados (tabla 1).

Tabla 1 Herramientas bioinformáticas utilizadas.

Herramienta	Uso en este trabajo	Enlace
PDB	Compilación de secuencias de aminoácidos de PFO cristalizadas	https://www.rcsb.org/
UNIPROT	Búsqueda de mRNA Alineamientos de secuencia	https://www.UniProt.org/
Blast (tblastn)	Alineamiento de mRNA vs. genoma del aguacate	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
EMBOSS (Transeq)	Traducción de nucleótidos a aminoácidos	https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/
SWISS-MODEL AlphaFold	Generación de modelos	https://swissmodel.expasy.org/interactive https://alphafold.ebi.ac.uk/
UCSF CHIMERA	Alineamientos estructurales	https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/
VERIFY 3D PROCHECK	Calidad de los modelos generados	https://saves.mbi.ucla.edu/

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA POLIFENOL OXIDASA

Después de que el extracto crudo se sometió a los pasos de precipitación con sulfato de amonio (30 y 85%), diálisis y ultracentrifugación, el sobrenadante obtenido de este último se inyectó a una columna del tipo de interacción hidrofóbica. En el cromatograma obtenido (figura 4) se observó la separación de las proteínas en dos grandes grupos. El primero corresponde a proteínas con características hidrofílicas, encontradas en un volumen de elución de 0 a 100 mL y el segundo con características hidrofóbicas presentes en volumen de elución de 125 a 200 mL.

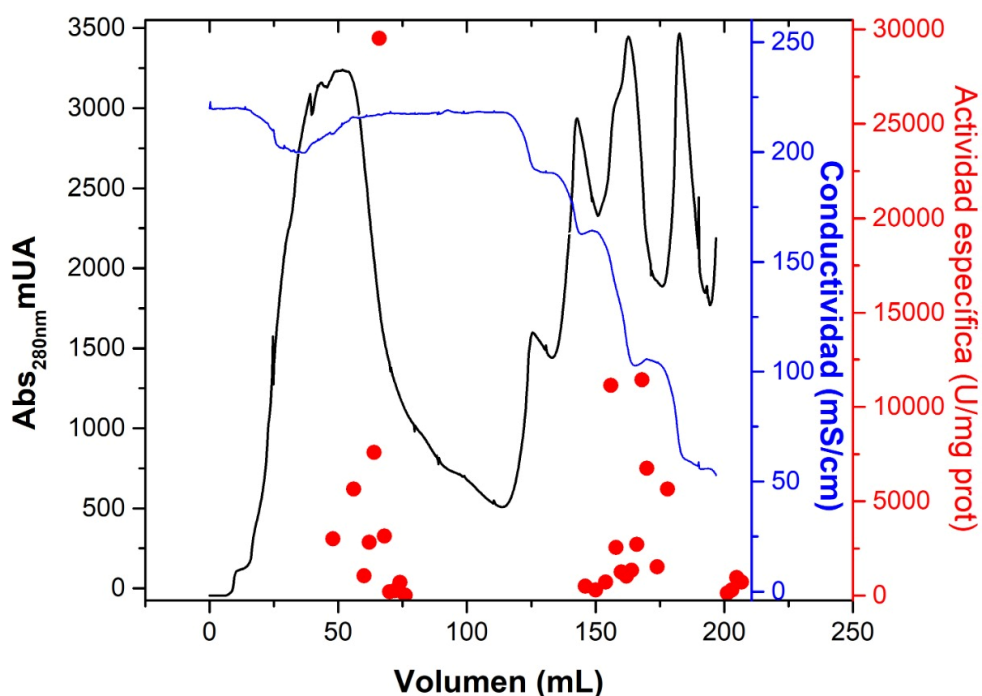


Figura 4. Perfil de elución de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). La línea negra continua es la absorbancia (280 nm), la línea azul muestra la conductividad (mS/cm) y los puntos rojos representan la actividad específica (U/mg proteína).

En el primer grupo puede observarse que en las fracciones correspondientes a 58, 64 y 66 mL presentaron una actividad específica (puntos rojos) mayor a 2,500 U/mg de proteína, las cuáles fueron eluidas con el amortiguador de equilibrio sin diluir (≈ 220 mS/cm) (figura 4). La fracción con mayor de actividad específica (29,500 U/mg de proteína) se obtuvo en un volumen de 64 mL.

Las proteínas del segundo grupo eluyeron cuando se disminuyó la concentración de las sales del amortiguador de equilibrio. Dentro de las fracciones obtenidas en este grupo la mayor actividad PFO (11,421 U/mg de proteína) se encontró en el volumen de elución de 170 mL. Las proteínas de dicha fracción eluyeron cuando el amortiguador de equilibrio tenía una dilución del 60% (≈ 160 mS/cm) con respecto a la concentración inicial (figura 4).

La presencia de fracciones cromatográficas con actividades enzimáticas en los dos grupos de proteínas (figura 4) infiere la presencia de al menos 2 isoformas de PFO del aguacate con características hidrofóbicas distintas.

La cromatografía de interacción hidrofóbica ha sido utilizada en diversos estudios como uno de los pasos para purificar la polifenol oxidasa (25–29,31,47). En el caso específico de Mishra *et al.* (29), se observa un comportamiento similar al que se muestra en la figura 4, en su estudio mencionan que obtuvieron dos fracciones con características hidrofóbicas distintas, lo que indica la presencia de dos isoformas de PFO en la berenjena. Puede inferirse que en este trabajo se encontraron de igual manera al menos dos isoformas de PFO de aguacate con características hidrofílicas e hidrofóbicas utilizando el mismo tipo de cromatografía (20–22).

Utilizando otros tipos de cromatografía también se han llegado a encontrar diversas isoenzimas en el aguacate. En estudios previos se lograron purificar 7 isoformas de PFO de aguacate utilizando cromatografías de intercambio iónico y de exclusión molecular (20,21). En la investigación de Moeini *et al.* (21) plantearon el uso de la cromatografía por afinidad en donde se funcionalizó la columna con un inhibidor reversible de la polifenol oxidasa, lo que les permitió separar 4 isoformas en el aguacate.

En el presente estudio se evaluó la purificación de la PFO en cada paso de la purificación y en las fracciones con mayor actividad enzimática, fracciones con un volumen de elución de 160, 168 y 172 mL (agrupadas) pertenecientes al grupo dos (figura 4).

La actividad específica del extracto crudo fue mayor con respecto a la obtenida en el paso de precipitación con sulfato de amonio, en este paso disminuyó el rendimiento considerablemente hasta un 4.6%. Las mejores actividades de PFO se obtuvieron en las fracciones de cromatografía, en este paso se logró un aumento de 4.2 veces en la purificación y un rendimiento de 5.06% (tabla 2). Se puede observar que la elección de los porcentajes de 30-85% de sulfato de amonio para realizar la precipitación, no fue la indicada ya que afectó considerablemente en la pérdida de proteína, esto se ve reflejado en la concentración de proteína y la actividad de PFO, aunque esta última se recuperó después de HIC debido a la concentración de la proteína.

Tabla 2 Purificación parcial de la polifenol oxidasa del aguacate.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Actividad total (U/mL)	Proteína total (mg/mL)	Actividad específica (U/mg prot)	Veces de purificación (fold)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1000	957960	104.168	957.9	1	100
Sulfato de amonio	670	44530.9	0.19	66.46	0.069	4.6
Fenil sefarosa PFO 2	12	48465.4	0.1160	4038.7	4.2	5.06

Dizik (20) reportó que los valores de purificación que obtuvo fue en el extracto crudo 26 U/mg de proteína y 725 U/mg de proteína en su último paso que corresponde al uso de cromatografía por filtración de gel. En otro estudio Kahn (21) mostró una actividad específica de 13 y 20 U/mg de proteína en *P. americana* var. Lerman.

En un análisis reciente Moeini *et al.* (22) menciona que obtuvo valores de purificación de 659 U/mg y un rendimiento de 3.39% de proteína en su último paso para la columna sefarosa 4B, mientras que para la columna sefarosa 6B de 687 U/mg de proteína y un rendimiento de 1.38%.

Como puede observarse en la tabla 2, la actividad específica en este trabajo fue considerablemente mayor comparándolo con respecto a los estudios mencionados, al igual que se obtuvo un rendimiento similar a Moeini *et al.* (21). Estas variaciones en los valores de purificación pueden ser resultado de las diferencias en factores como el estado de maduración y la variedad del aguacate, así como las metodologías utilizadas en cada estudio.

ELECTROFORESIS Y DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR

A partir de las fracciones de proteínas hidrofóbicas que presentaron mayor actividad PFO eluidas en HIC (160, 168, 170, 172 y 180 mL) se realizó la estimación de los pesos moleculares de estas mediante un gel de electroforesis SDS-PAGE (figura 5).

Al analizar el gel pueden distinguirse 6 bandas constantes con pesos moleculares estimados de 23, 29, 39, 45, 58 y 82 kDa (figura 5). Puede observarse que en la fracción obtenida a 160 mL cuenta con una mayor cantidad de bandas con respecto a la fracción 180 mL, en esta última pueden apreciarse las bandas con pesos moleculares estimados de 23, 29, 45 y 82 kDa.

El motivo por el cual se van perdiendo bandas puede estar relacionado a que esta última fracción contenía proteínas que tuvieron mayor interacción con la columna 4 fenil sefarosa, es decir, que contenían una mayor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos en su superficie, logrando de esta manera su separación del resto.

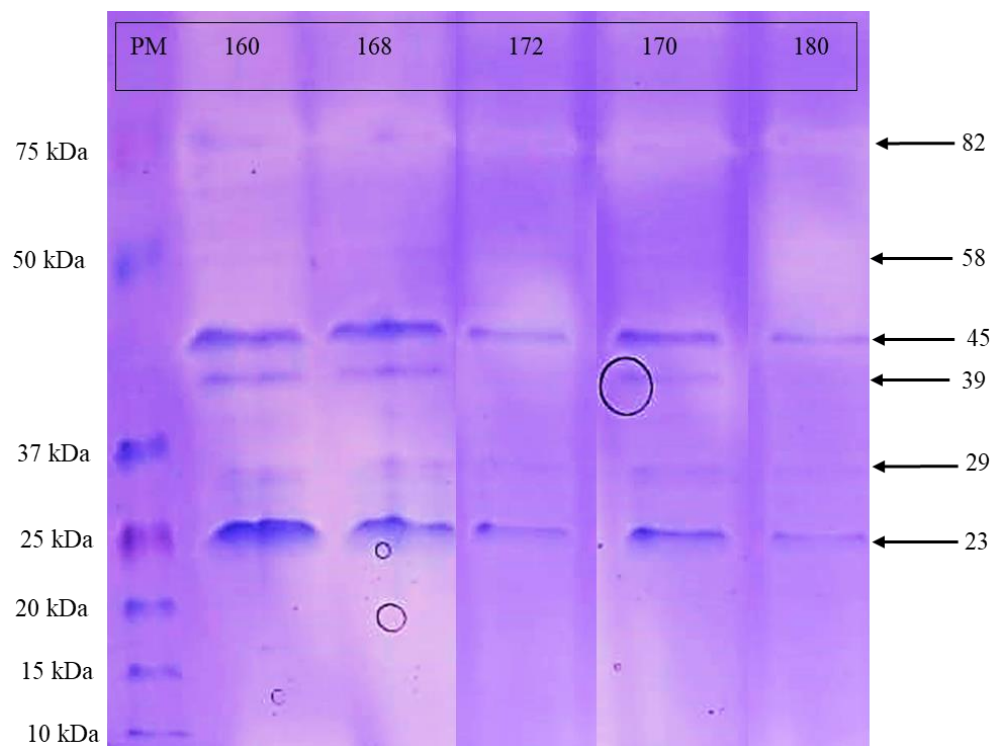


Figura 5. SDS PAGE de las fracciones 160, 168, 170, 172 y 180 de la HIC.

De acuerdo con estudios previos de PFO de aguacate, se ha reportado que cuenta con distintas isoformas con pesos moleculares de 14, 28, 35, 56, 112 y 400 kDa (20,21). En un análisis reciente, Moeini *et al.* (21) demostraron la presencia de al menos 4 isoformas con pesos moleculares de 35, 50, 70 y 100 kDa.

Esto podría sugerir que las bandas correspondientes a pesos moleculares de 29, 39, 58 y 82 kDa en cada una de las fracciones pueden corresponder a isoformas de PFO, ya que se encuentran cercanos a los reportados para el aguacate. Sin embargo, no se aprecia una clara relación entre los patrones e intensidades de las bandas de cada fracción con la actividad específica de cada una éstas (160 de 2,500 U/mg proteína, 168 de 2,700 U/mg proteína, 170 de 11,400 U/mg proteína, 172 de 6,700 U/mg proteína y 180 de 5,600 U/mg proteína). Por lo que este análisis no es concluyente sobre el peso molecular de la PFO hidrofóbica del aguacate.

Al haber realizado una purificación parcial en este estudio, se propone agregar al menos una cromatografía de exclusión molecular para el segundo grupo ya que esto permitirá separar adecuadamente la PFO oxidasa.

PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO

Se planteó realizar una serie de pruebas de precipitación diferencial con distintos porcentajes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ya que en los utilizados para la purificación se observó una disminución considerable en la concentración de proteína y actividad de PFO.

En la tabla 3 pueden observarse que en la columna del sobrenadante la mayor actividad específica y concentración de proteína se obtuvo a un 60% de precipitación con sulfato de amonio. Con lo que respecta a la columna del pellet, se observa que en dos concentraciones de sulfato de amonio (10 y 70%) se obtienen valores altos de actividad específica proteína. Estos resultados sugieren la presencia de al menos dos isoformas en el extracto crudo del aguacate con características hidrofóbicas distintas ya que precipitan con diferentes concentraciones de la sal.

Tabla 3. Actividad específica y concentración de proteína del sobrenadante y pellet obtenidos por la precipitación diferencial con sulfato de amonio del extracto crudo de aguacate.

Porcentaje de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Proteína (mg/mL) del sobrenadante	Actividad específica del sobrenadante	Proteína (mg/mL) del pellet	Actividad específica del pellet
10	0.64	210.16	0.1	1261.92
20	0.23	302.41	0.64	190.76
30	0.13	404.79	1.26	112.27
40	0.11	516.15	0.32	437.68
50	0.12	397.13	0.34	285.65
60	0.003	1546.55	0.18	470.60
70	0.03	91	0.18	1187.70
80	0.05	272.96	0.96	101.65
90	0.03	80.86	0.14	983.42

Este trabajo presenta ciertas similitudes con reportes previos en donde más de una fracción obtenidas por precipitación diferencial con sulfato de amonio presentan actividades PFO altas. En el reporte de Misrha *et al.* (28) se menciona que realizaron pruebas de precipitación diferencial con sulfato de amonio en donde se encontró la mayor actividad específica de PFO de berenjena en dos fracciones, la primera de 20-30% (40 U/mg de proteína) y la segunda de 50-70% (65 U/mg de proteína), esto puede deberse a la presencia de dos isoformas que

presentan una mayor o menor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos en su superficie. Este tipo de pruebas no sólo facilitan la precipitación para la purificación, sino que también funcionan para la detección de isoformas de PFO con distintas características.

En el estudio de Kahn (21) se muestran las afectaciones que tienen las diferentes concentraciones de sulfato de amonio en la purificación de la PFO. En los fraccionamientos de 40-75% de concentración se aumentó de 2 a 3 veces la actividad específica en las variedades Horeshim, Fuerte y Lerman. En esta última variedad se observó que la actividad aumentaba entre 10 y 20 veces la actividad específica al saturar con concentraciones de 40-55% y 55-70%. Estas precipitaciones diferenciales y el uso de distintos sustratos les permitieron identificar las isoformas en estas variedades.

7. GENERACIÓN DE MODELOS MOLECULARES A PARTIR DE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES DE LAS PFO

En los estudios bioinformáticos se utilizó el genoma del aguacate (912 Mb) que se encuentra en GENBANK con el código GCA_008087245.1.

Para identificar las regiones en las que se encuentra la polifenol oxidasa (PFO) dentro del genoma del aguacate se realizó un alineamiento utilizando la herramienta **tblastn**, la cual requiere que la secuencia de referencia sea de aminoácidos para así compararlo con los posibles marcos de lectura (37). En este caso utilizamos el ARNm de plátano como secuencia referencia debido a su relación filogenética con el aguacate. Esta se obtuvo de la base de datos UNIPROT, el código correspondiente a la secuencia es W5VXS2.

La razón por la que se eligió esta secuencia es debido a que en Rendón-Anaya se presentó un árbol filogenético que se basó en secuencias de proteínas de copia única y en el que se mostró que el plátano es una especie cercana al aguacate (35).

De igual forma se utilizaron las secuencias aminoácidos de las polifenol oxidasas que se encuentran cristalizadas para realizar de igual manera un alineamiento con el genoma de aguacate. Las especies que se usaron fueron: *M. domestica* (PDB: 6ELS), *J. regia* (PDB: 5CE9), *I. batatas* (PDB: 1BT3), *V. vinifera* (PDB: 2P3X), *C. grandiflora* (PDB: 4Z11) y *S. lycopersicum* (PDB: 6HQP).

Al finalizar los alineamientos se encontraron tres regiones dentro del genoma del aguacate que comparten un alto valor en la puntuación máxima con las secuencias de aminoácidos que se utilizaron como referencia. Estas regiones se encontraron en las posiciones 160177 a 161715 (0979), la segunda de 351412 a 353013 (0214) y la última de 28917 a 30455 (2162).

OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS.

Después de haber identificado las posibles regiones de la PFO dentro del genoma, se descargaron las secuencias de aminoácidos de **tblastn** de las regiones 0979, 0214 y 2162. Para la región 0979 se obtuvo una longitud de 513 aa, para 0214 una longitud de 534 aa y para 2162 una longitud de 513 aa (figura 6).

0979	-----GRPI-----APNLATCH-QSLSDAGRPFV	23
2162	-----GRPI-----APNLATCH-KSLSDAGRPFV	23
0214	AGEEKSASSKRIDRREVLGLGLGYGAAGLAGQALASPVGIPDRTACGDASSANIPGPLK	60
0979	CCPPKRESEESVIDFKFSPSTPKRIIRPAHLVDDDDYLAKYQRGVTLMKQLDTS DPRNFM	83
2162	CCPPKRESEESVIDFKFSPSTPKRIIRPAHLVDDDDYLAKYQRGVTLMKQLDTS DPRNFM	83
0214	CCPPEKVTTAPIVQWKAPSPG-PLRVRKPAHEMNKDEVAKFKKAVQAMKDLDPEDPWHYD	119
0979	RQANIHCIFCTGAYNQVNSSHLLNIHRSWFFFPWHRLMIYFHERILGKLI GDDTFALPYW	143
2162	RQANIHCIFCTGAYNQVNSSHLLNIHRSWFFFPWHRLMIYFHERILGKLI GDDTFALPYW	143
0214	QQAKIHCTYCNGAYKQAGFDVPLQVHFSWLFPLPWHRWLYFFERILGKLINDDSFALPFW	179
0979	NWDNPPGMIIPHYMHGSFV--DKDRDHAHLPPQVADISFDYVESGLGPE--EQIESNLH	199
2162	NWDNPPGMIIPHYMHGSFV--DKDRDHAHLPPQVADISFDYVESGLGPE--EQIESNLH	199
0214	NYDRPEGMFMPSIYVDPSSSLYNPRRNLDDL-EMLLDYNSYDVKGLTGTEKEVIQANLV	238
0979	FMYHQMVSGAKKVELFMGCKRTAGEEGECDGPGTVEVAPHNALHTWVGSNLQPE---REN	256
2162	FMYHQMVSGAKKVELFMGCKRTAGEEGECDGPGTVEVAPHNALHTWVGSNLQPE---REN	256
0214	DLRTMYDSGIPTPELFMGDPLSAGELTAEDNSSGALERFHNTVHMWVGRHKDATPDPIYID	298
0979	MGAFYSAARDPVFYAHHANIDRLWTVWRKLRGNVPEIVDPAWLDSYFYFHDENAQLVRIK	316
2162	MGAFYSAARDPVFYAHHANIDRLWTVWRKLRGNVPEIVDPAWLDSYFYFHDENAQLVRIK	316
0214	MGDFSTAACKDMLFYGHANVDRLWDIYRTARGKKVEFNNSDWLNAEFNFYDENKQVVKVN	358
0979	IRDALMDRLGYGYEDIDLFWLNARPKPSVPPKIAKAVLKLRELNQGLQSPAVFSPDFG	376
2162	IRDALMDKLGYYEDIDLFWLNARPKPSVPPKIAKAVLKLRELNQGLQSPALFSPDFG	376
0214	VKDTLSTQDLGYTYKDVPIPWMQRAPPKRPAKPRSGFSMV-----PVTEFG	406
0979	PEG-RILDSTIRAKVQRPKRYRSKKEKEEEEEVLVVYGIDIKRDMYVKFDVYVNVVDEKN	435
2162	PEG-RILDSTIRAKVQRPKRYRSKKEKEEEEEVLVVYGIDIKRDMYVKFDVYVNVVDEKN	435
0214	TEPKSLVEGPVRLVTRPKTGRSQEKEDENEVLVDGIEVLDEGPVRFVDFITPPFGTF	466
0979	TGPEGREFAGTFVNVRHGVTTVLNEGDSKMKMRSTLKLGI SELLEDLEADEDES VVWVTL	495
2162	TGPEGREFAGTFVNVRHGVTTVLNEGDSKMKMKSTLKLGI SELLEDLEADEDES VVWVTL	495
0214	AGPDYGLPAGSFVKLPHRHK-----EGHKHRKAKLKLGITRLLLEDLKAENAQKLVVTLV	520
0979	PRGGTGVNTTVDGIRIEY	513
2162	PRGGTGVNTTVDGIRIEY	513
0214	PRTGKV---NVGGIHVE-	534

Figura 6. Secuencias de aminoácidos de las secuencias obtenidas a partir del genoma del aguacate.

ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS

Después de obtener las tres secuencias de aminoácidos de la polifenol oxidasa del genoma aguacate se realizó un alineamiento contra las secuencias de PFO que se encuentran cristalizadas (figura 7). Este estudio permitió observar si las secuencias que se generaron presentaban similitudes con las de origen natural. Una de las características importantes que se obtuvieron son los sitios de unión a cobre CuA y CuB (marcados con líneas rojas) que contienen 3 histidinas conservadas cada uno de estos sitios (color amarillo), las cuales son particulares en las polifenol oxidasas ya que son las responsables de ligar las dos moléculas de cobre en el sitio activo (48) (figura 7).

		C	U	A	
0979	--SDPRNFM	Q	A	N	I H C I F C T G A Y N Q V -- N S S H - L L N I H R S W F F F P W H R L M I Y F H E R I L G K 131
2162	--SDPRNFM	Q	A	N	I H C I F C T G A Y T Q V -- N S S H - L L N I H R S W F F F P W H R L M I Y F H E R I L G K 131
0214	--EDPWHYD	Q	A	K	I H C T Y C N G A Y K Q A -- G F D - V P L Q V H F S W L F L P W H R W Y L Y F F E R I L G K 167
Vitis	--DDPRSFK	Q	A	N	V H C T Y C Q G A Y D Q V -- G Y T D L E L Q V H A S W L F L P F H R Y Y L Y F N E R I L A K 130
Solanum	QPDNPIG	F	K	Q	A N I H C A Y C N G G Y S I D -- G -- K V L Q V H N S W L F F F P F H R W Y L Y F Y E R I L G S 133
Juglans	--DDPRSFT	Q	A	N	V H C A Y C D G A Y T Q V -- G F P D L S L Q I H E C W L F F F P F H R Y Y V Y F F E K I L G K 130
Malus	--DDPRSFK	Q	A	A	V H C A Y C D G A Y D Q V -- G F P E L E L Q I H N S W L F F F P F H R Y Y L Y F F E K I L G K 131
Coreopsis	--DDPRS	F	V	S	Q A K I H C A Y C N G G Y T Q V D S G F P D I D I Q I H N S W L F F F P F H R W Y L Y F Y E R I L G S 138
Ipomoea	--DDPRN	F	Y	Q	A L V H C A Y C N G G Y D Q V -- N F P D Q E I Q V H N S W L F F F P F H R W Y L Y F Y E R I L G K 131

		C	U																																																			
0979	GLGPEEQ	I	E	S	N	L	H	F	M	Y	H	Q	M	V	S	G	A	K	V	E	L	F	M	G	C	K	R	T	A	G	E	E	G	E	---	C	D	G	P	G	T	V	E	V	A	P	H	N	A	L	H	243		
2162	GLGPEEQ	I	E	S	N	L	H	F	M	Y	H	Q	M	V	S	G	A	K	V	E	L	F	M	G	C	K	R	T	A	G	E	E	G	E	---	C	D	G	P	G	T	V	E	V	A	P	H	N	A	L	H	243		
0214	TGTEKEV	I	Q	A	N	L	V	D	L	R	T	M	Y	D	S	G	I	P	T	P	E	L	F	M	G	D	P	L	S	A	G	E	L	T	A	E	--	D	N	S	S	G	A	L	E	-	R	F	H	N	T	V	H	282
Vitis	TIPDDEL	K	T	D	N	L	A	I	M	Y	K	I	V	S	G	A	T	P	K	L	F	L	G	P	Y	R	A	G	D	A	I	---	D	P	G	A	G	T	L	E	H	A	P	H	N	I	V	H	243					
Solanum	ETTQLQ	L	M	T	N	N	L	T	L	M	Y	R	Q	L	V	T	N	S	P	C	P	L	M	F	F	G	P	Y	T	L	G	S	T	V	---	E	A	A	G	T	V	E	N	I	P	H	S	P	V	H	245			
Juglans	STTTTD	Q	V	P	S	N	L	K	I	M	Y	R	Q	M	V	S	G	A	K	N	P	T	L	F	F	G	S	P	Y	R	A	G	D	E	P	---	D	P	G	A	G	T	I	E	S	T	P	H	N	N	I	H	243	
Malus	NVSKETT	I	N	A	N	L	K	I	M	Y	R	Q	M	V	S	N	S	K	N	A	K	L	F	F	G	N	P	Y	R	A	G	D	E	P	---	D	P	G	G	S	I	E	G	T	P	H	A	P	V	H	244			
Coreopsis	DIPDQQ	V	A	C	N	L	S	T	V	R	D	L	V	R	N	G	V	D	P	T	S	F	F	G	K	Y	V	A	G	D	S	P	V	A	N	G	D	P	S	V	G	S	V	E	A	G	S	H	T	A	V	H	256	
Ipomoea	DVTDQQ	R	I	T	D	N	L	A	L	M	Y	K	Q	M	V	T	N	A	G	T	A	E	L	F	L	G	A	Y	R	A	G	D	A	P	---	S	P	G	A	S	I	E	T	S	P	H	I	P	H	244				

		B
0979	TWVGSNL	-----QPERENMGAFYSAARDPVFYAHHANIDRLWTVWRKLRGNV--PEI 293
2162	TWVGSNL	-----QPERENMGAFYSAARDPVFYAHHANIDRLWTVWRKLRGNV--PEI 293
0214	PMVGRHK	D-----TPDPYIDMGDFSTAAKDMLFYGHHANVDRLWDIYRTARGK--VEF 335
Vitis	KWTGLAD	-----KP-SEDMGNFYTAGRDPIFFGHANVDRPMNIWKTIGGKNR-KDF 293
Solanum	IWVGTRR	GSVLPDGKISNGEDMGNFYASAGLDPLFYCHHSNVDRPMNEWKATGGKR--TDL 303
Juglans	LWTGDDT	-----QPNINMGNFYSAGRDPDIFFAHHSNVDRPMTIWKTGGK-R-KDI 293
Malus	LWTGDNT	-----QPNFEDMGNFYASAGRDPDIFFAHHSNVDRPMSIWKTGGK-R-TDL 294
Coreopsis	RWVGDP	T-----QPNNEDMGNFYSAGYDPVFIHHSNVDRPMKWLKELRPLG-HVDI 307
Ipomoea	RWVGDP	R-----NTNNEGMNFYSAGRDIIFYCHHSNVDRPMTIWQQLAGKPRKRDY 296

Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de polifenol oxidasas cristalizadas vs. las secuencias generadas a partir del genoma del aguacate.

Otros rasgos importantes de las PFO es que en CuA se encuentra una cisteína (color azul) la cual forma un puente tioéter con la segunda histidina del mismo sitio para generar restricciones estructurales en CuA (49). En CuB se presenta una fenilalanina (color fucsia) denominado como residuo puerta debido a que bloquea parcialmente el acceso al sitio activo y que debe girar para permita la interacción del sustrato con la enzima (50), estos

aminoácidos conservados son de suma importancia para poder llevar a cabo la reacción de la enzima (5).

En el alineamiento de secuencia de las regiones 0214, 2162, 0979 y las polifenol oxidasas cristalizadas puede observarse que las secuencias generadas presentan las histidinas correspondientes a los sitios de unión CuA y CuB, al igual que se encuentran las cisteínas y fenilalaninas conservadas (figura 7).

En especies como *Taraxacum officinale*, *S. melongena* L., *M. domestica* Borkh. Cv. Red Fuji, *Cynara cardunculus* var. Scolymus L., *S. lycopersicum* han mostrado la presencia de histidinas pertenecientes a CuA y CuB, cisteínas y fenilalaninas (50–54), lo que sugiere que las secuencias obtenidas a partir del genoma del aguacate pertenecen a PFO.

Ya que la presencia de las particularidades que tienen las PFO se encontraron en las secuencias generadas, se decidió continuar con las siguientes pruebas bioinformáticas.

GENERACIÓN DE MODELOS DE LA PFO DEL AGUACATE

El modelador que se eligió fue **SWISS-MODEL**, debido a que los modelos que genera tienen un alto porcentaje de identidad comparado con estructuras cristalizadas, otra razón, es que la interfaz con la que cuenta resulta ser bastante amigable con el usuario.

Se generaron los modelos 0979, 0214 y 2162 mediante **SWISS-MODEL** en donde se utilizaron las secuencias de aminoácidos que se obtuvieron a partir del alineamiento del mRNA de plátano y el genoma del aguacate a partir de **tblastn**.

La forma en la que se generan los modelos a partir de **SWISS-MODEL** es en dos etapas. La primera etapa consiste en tener la secuencia de aminoácidos e insertarla, a partir de esto **SWISS-MODEL** genera un alineamiento con las bases de datos para identificar las secuencias con las que tiene mayor porcentaje de identidad. La segunda etapa consiste en generar distintos modelos con base en las secuencias que tuvo mayor porcentaje de identidad, es decir, utiliza como molde estos resultados para generar una posible estructura terciaria de la secuencia de aminoácidos.

La estructura de *M. domestica* sirvió como plantilla para todos los modelos generados mediante **SWISS-MODEL** debido a que su secuencia presentó un mayor porcentaje de identidad al ser comparada con las secuencias generadas en este trabajo. Existen distintos parámetros para determinar la calidad de los modelos. Por ejemplo, el Qualitative Model Energy ANalysis (Q-mean), tiene como función describir mediante una puntuación los principales aspectos geométricos de las estructuras de las proteínas, si el valor es más cercano a 0 el modelo puede ser considerado con una calidad buena (55).

En 0979 (figura 8A) el Q-mean obtenido fue de -3.66. Como control se decidió utilizar la secuencia de aminoácidos de la polifenol oxidasa cristalizada de *M. domestica* para generar un modelo y observar el Q-mean resultante de esta prueba. El valor obtenido fue de -2.98, siendo cercano a 0979. Se ha mencionado que los modelos que se encuentran en un rango ≤ -4 son considerados como de baja calidad. En un estudio en donde se modeló la ureasa se obtuvo un Qmean de -0.37 (56). Otro ejemplo es el estudio de usherina, en donde el rango de Qmean va de -2.52 hasta -7.44 (57). Cabe mencionar que se utilizó la herramienta bioinformática protparam para determinar el peso molecular de la estructura, el resultado para el modelo 0979 fue de 58.75 kDa.

Otros parámetros importantes que brinda **SWISS-MODEL** son la cobertura, la cual habla del porcentaje que se utilizó de la secuencia generada para realizar el modelado, en este modelo el valor de cobertura fue de 97%. Por último, otros parámetros importantes son el porcentaje de identidad, el cual fue de 44.58% y el RMSD, que en este caso se obtuvo un valor de 0.378 con respecto a *M. domestica*. Con lo que respecta al modelo 0979 generado por **AlphaFold** (figura 8D) el porcentaje de identidad obtenido fue de 46.41% con respecto a *M. domestica* y un RMSD de 1.134, el cual se encuentra en un rango apropiado para proteínas homólogas.

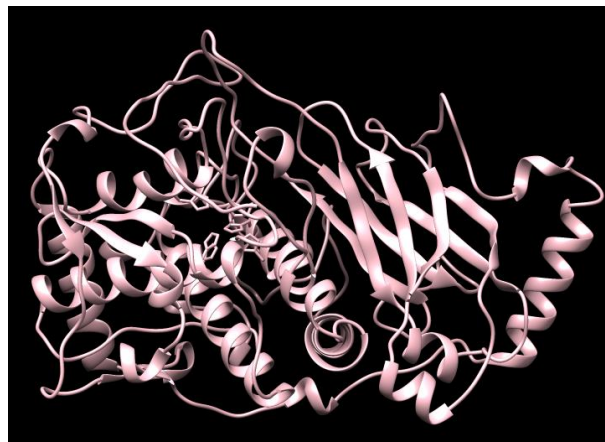
El modelo 0214 (figura 8B) cuenta con un PM de 59.93 kDa y un valor de Q-mean de -2.25, este representa un mejor resultado comparándolo con el modelo anterior. La cobertura fue de 91%, con un porcentaje de identidad de 42.24% con un RMSD de 0.429 para el modelo generado por **SWISS-MODEL**, tomando como referencia la PFO de *M. domestica*. El modelo generado por **AlphaFold** (figura 8E) fue de 41.18% con un RMSD de 1.3.

Para el modelo 2162 (figura 8C), se obtuvo un un PM de 58.67 kDa y un valor de Q-mean de -3.54, siendo este el segundo mejor obtenido. La cobertura en este modelo fue de 96% y con un porcentaje de identidad de 44.79%. y un RMSD de 0.327. El modelo generado por **AlphaFold** (figura 8F) dio como resultados un porcentaje de identidad de 46.19% y un RMSD de 1.133.

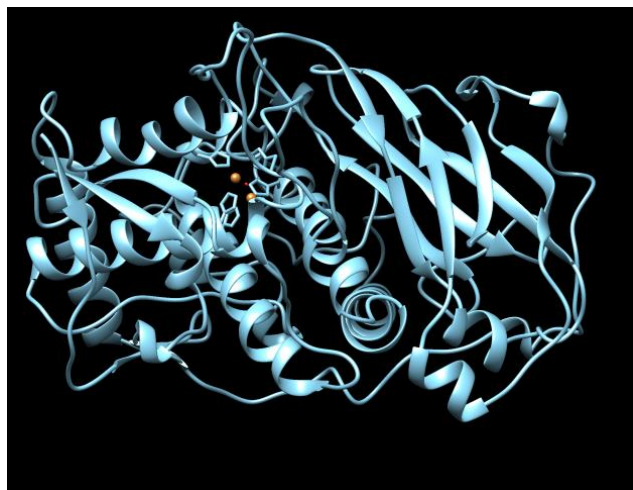
A) 0979



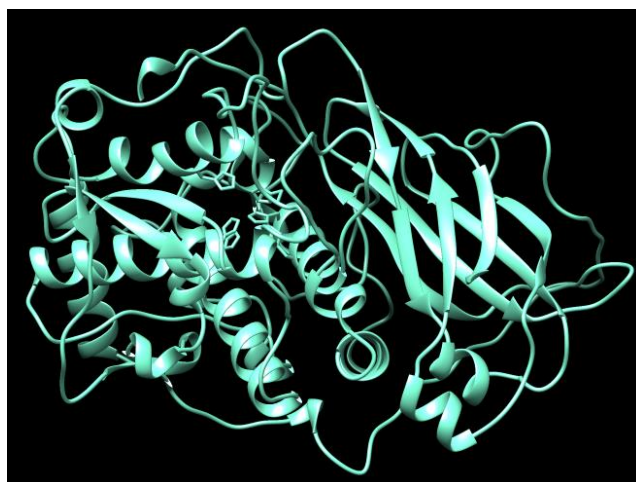
D) 0979-3



B) 0214



E) 0214-5



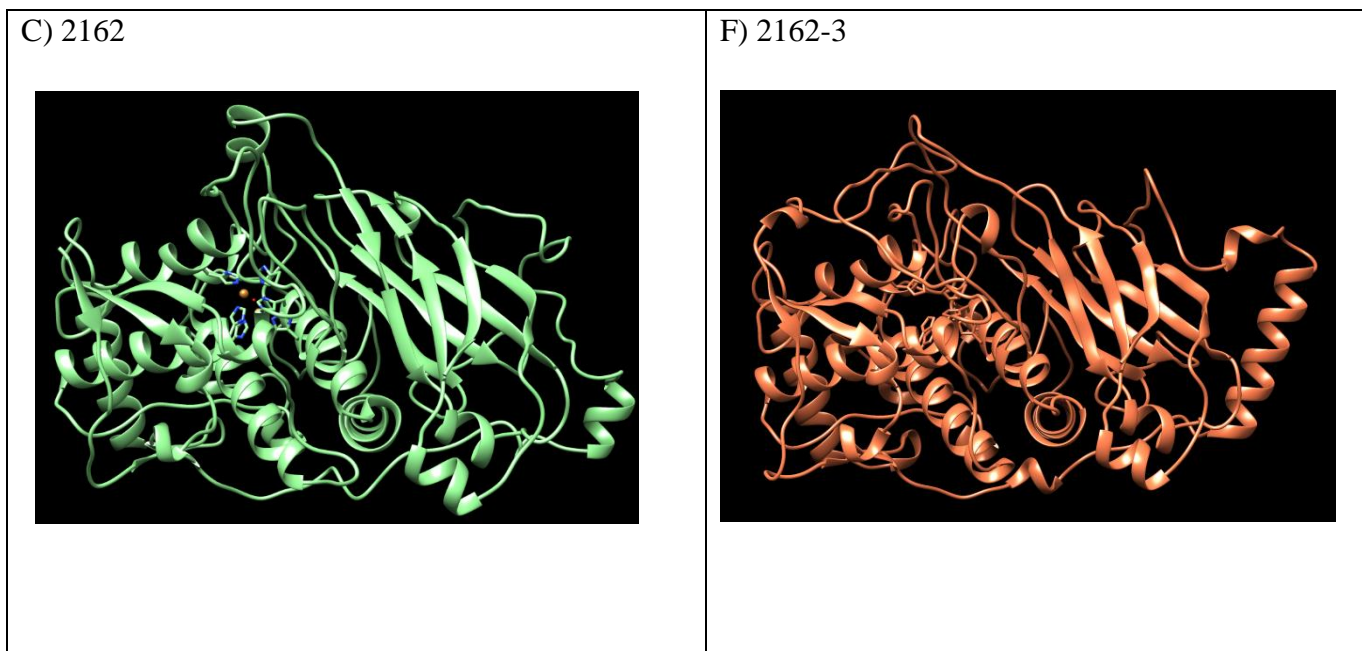


Figura 8. Modelos generados vistos desde el visualizador CHIMERA. El panel A) corresponde al modelo 0979 (ciruela), el panel B) al modelo 0214 (azul cielo) y el panel C) al modelo 2162 (verde claro), todos estos modelos fueron generados por SWISS MODEL.

El panel D) corresponde al modelo 0979-3 (rosa pastel), el panel E) al modelo 0214-5 (aguamarina) y el panel F) al modelo 2162 (coral), estos modelos fueron generados mediante **AlphaFold**.

Debido a que no hay reportes de modelos de la PFO generados mediante **SWISS-MODEL** se hizo la comparación de los valores (porcentaje de identidad, Q-mean y cobertura) obtenidos para la usherina. Para ésta, las coberturas obtenidas se encuentran en un rango de 60-90%, mientras que los porcentajes de identidad van de 11-30% (57). Los valores promedio para la identidad y el RMSD para los modelos obtenidos por **SWISS-MODEL** son de 43.87% y 0.378, mientras que para **AlphaFold** de 44.6% y 1.189. Como se puede observar, los porcentajes obtenidos en este trabajo fueron mayores a los de usherina y se encuentran dentro rangos considerados óptimos.

Los modelos con porcentajes de identidad mayores a 40% tienden a presentar una estructura terciaria parecida a la que se presenta en las PFO cristalizadas. Otro punto importante que apoya la robustez de estos modelos es el RMSD, en este trabajo se obtuvieron valores con un promedio de 0.378 para **SWISS-MODEL** y 1.189 para **AlphaFold**. Debido a que los valores obtenidos se mantuvieron por debajo de 3, estas predicciones sugieren que las estructuras terciarias generadas por ambos modeladores fue de buena calidad (58).

Los modelos pueden ser considerados de buena calidad debido a que no sobrepasan valores menores de -4, sumado a esto, se encuentran cercanos al Q-mean obtenido del modelado de la estructura de polifenol oxidasa cristalizada de *M. domestica*. Hasta este punto se pueden

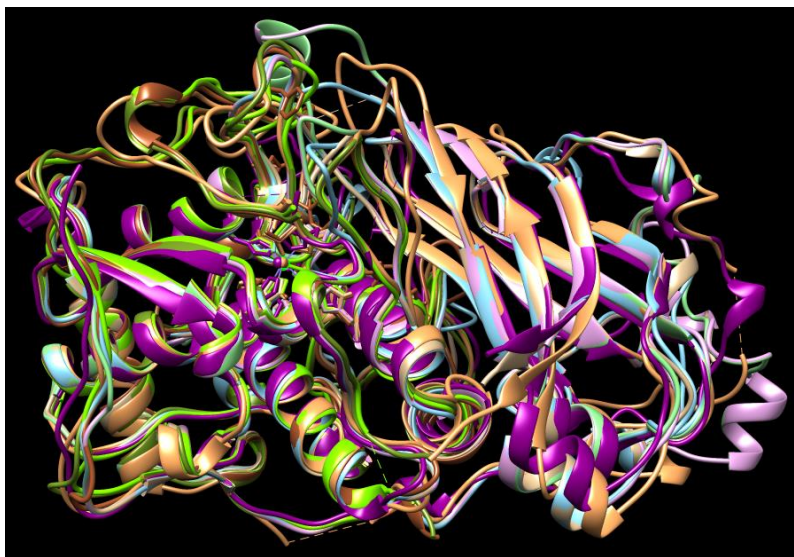
considerar como potenciales estructuras que pueden estar cercanas a la realidad. Antes de continuar con esta propuesta, se realizaron alineamientos estructurales para conocer las principales diferencias o similitudes entre las estructuras cristalizadas y los modelos.

ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL

Se realizó un alineamiento estructural de todas las estructuras cristalizadas que están disponibles en PDB (figura 9). En la figura 9 panel A, se tomó la PFO de *M. domestica* como referencia, los porcentajes de identidad y RMSD obtenidos fueron los siguientes: *C. grandiflora* (46.91% y RMSD 0.935), *I. batatas* (52.98% RMSD 0.781), *J. regia* (64.60% RMSD 0.686), *S. lycopersicum* (45.5 % RMSD 1.157), *V. vinifera* (57.52% RMSD 0.681), 0979 (44.58% RMSD 0.378), 0214 (42.24% RMSD 0.429) y 2162 (44.79% RMSD 0.327), estas últimas corresponden a los modelos generados por **SWISS-MODEL**.

En la figura 9 (panel B de igual forma se tomó *M. domestica* como referencia y se comparó su estructura contra las PFO cristalizadas y los modelos generados por **AlphaFold**. Los porcentajes de identidad y RMSD obtenidos fueron los siguientes: *C. grandiflora* (45.97% y RMSD 0.935), *I. batatas* (52.98% RMSD 0.781), *J. regia* (64.6% RMSD 0.686), *S. lycopersicum* (45.5 % RMSD 1.157), *V. vinifera* (57.52% RMSD 0.681), 0979 (46.41% RMSD 1.022), 0214 (41.18% RMSD 1.202) y 2162 (46.19% RMSD 1.017).

Panel A)



Panel B)



Figura 9. Alineamiento estructural de polifenol oxidasas cristalizadas vs. modelos. 8A) Alineamiento estructuras de PFO cristalizadas *C. grandiflora* (marrón arena), *I. batatas* (verde amarillo), *J. regia* (siena), *S. lycopersicum* (magenta oscuro) *V. vinifera* (gris olivo), *M. domestica* (bronce) vs. modelos generados por **SWISS-MODEL**, modelo 0214 (azul cielo), modelo 0979 (ciruela) y modelo 2162 (verde claro). 8B) Alineamiento estructuras de PFO cristalizadas vs. modelos generados por **AlphaFold**, 0979 (rosa pastel), 0214 (aguamarina) y 2162 (coral).

En el panel A de la figura 9, el promedio de porcentaje de identidad y RMSD fue de 49.89% y 0.67, respectivamente. Con lo que respecta al segundo alineamiento (panel B) el promedio de porcentaje de identidad y RMSD fue de 50.1% y 0.975. Como se mencionó anteriormente, los modelos que obtienen porcentajes de identidad mayores a 40% y con un RMSD por debajo de 3, tienden a presentar una estructura terciaria parecida a estructuras cristalizadas. Esto sugiere que los modelos generados mediante **SWISS-MODEL** y **AlphaFold** podrían corresponder a las estructuras y actividades de la PFO del aguacate.

Algo que se debe destacar de las estructuras de *J. regia* e *I. batatas* es que se encuentran en su forma activa, es decir, que no cuentan con el dominio C-terminal (hojas beta) por lo que su estructura es más pequeña, fuera de esto, el resto de las estructuras de PFO cristalizadas y los modelos presentan una conformación similar.

En la figura 10A se puede observar el alineamiento estructural entre la PFO de *M. domestica* y los modelos predichos por **SWISS-MODEL**. Tomando a *M. domestica* como referencia,

los porcentajes de identidad obtenidos fueron los siguientes: 0214 (42.24%), 0979 (44.58%) y 2162 (44.79%), mientras que los RMSD fueron de 0.43, 0.38 y 0.32, respectivamente. En la figura 10B se presenta el alineamiento estructural de PFO de *M. domestica* vs. los modelos generados mediante **AlphaFold**, 0214 (41.18% RMSD 1.202), 0979 (46.41% RMSD 1.022) y 2162 (46.19% RMSD 1.017).

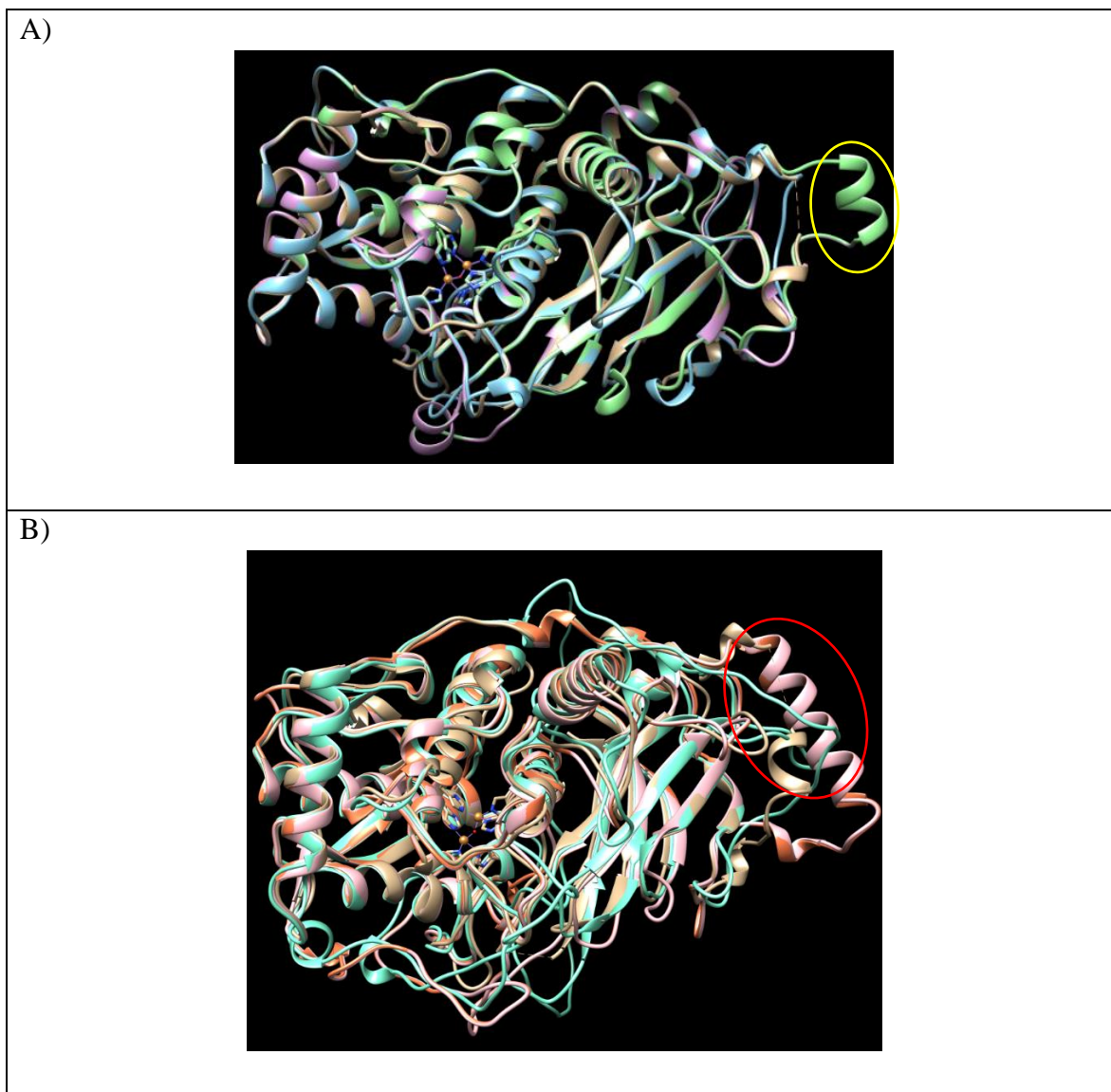


Figura 10. A) Alineamiento estructural de *M. domestica* (bronce) vs. los modelos generados por **SWISS-MODEL**, modelo 0214 (azul cielo), modelo 0979 (ciruela) y modelo 2162 (verde claro). B) Alineamiento estructural de *M. domestica* (bronce) vs. los modelos generados por **AlphaFold**, 0979 (rosa pastel), 0214 (aguamarina) y 2162 (coral).

Como se aprecia en la figura 10A, las estructuras de los modelos son bastante parecidas a la estructura de *M. domestica*, lo que apoya el uso de esta plantilla por **SWISS-MODEL** debido a que presentan porcentajes de identidad mayores a 40%. En el panel B se puede observar que los modelos 2162 y 0979 generados por **AlphaFold** presentan una diferencia de dos giros extra en una hélice (círculo rojo) con respecto a la figura 10A que solo presenta 2 (círculo amarillo) en el modelo 2162. Otros cambios observables son los ángulos en los que se posicionan las asas y las hélices α . A pesar de que los valores de RMSD aumentaron siguen encontrándose por debajo de 3, lo que indica que la predicción de la estructura fue de buena calidad.

ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL DE LOS MODELOS VS. ESTRUCTURAS DE LAS PFO CRISTALIZADAS

Se realizaron tres alineamientos estructurales utilizando como referencia cada uno de los modelos generados mediante **SWISS-MODEL** contra las estructuras cristalizadas para así conocer que tantas diferencias existen en las estructuras y si el modelo puede considerarse estar cercano a la realidad.

En la figura 11 A se muestra el alineamiento estructural del modelo 0979 vs. *C. grandiflora*, *I. batatas*, *J. regia*, *M. domestica*, *S. lycopersicum* y *V. vinifera*. En cuestión de porcentaje de identidad fueron los siguientes: *C. grandiflora* (35.83%), *I. batatas* (40.18%), *J. regia* (45.43%), *M. domestica* (46.84%), *S. lycopersicum* (34%) y *V. vinifera* (42.77%).

Para el modelo 0214 (Figura 11 B) los porcentajes de identidad fueron los siguientes: para *C. grandiflora* (35.34%), *I. batatas* (41.37%), *J. regia* 39.23%, *M. domestica* (42.70%), *S. lycopersicum* (36.26%) y *V. vinifera* (44.24%).

El modelo 2162 (Figura 11 C) los porcentajes de identidad fueron: *C. grandiflora* (36.25%), *I. batatas* (40.18%), *J. regia* (45.72%), *M. domestica* (46.84%), *S. lycopersicum* (34.46%) y *V. vinifera* (44.79%).

En los tres alineamientos se pueden observar que los porcentajes de identidad se encuentran entre un 34-47% y los valores de RMSD general se encuentran en un rango de 0.82-0.85. Esta información nos da pie a proponer que estos modelos son de buena calidad y que existe posibilidad de que la polifenol oxidasa del aguacate sea parecida a lo que se generó bioinformáticamente.

En los paneles 11 A, B y C se pueden observar que los modelos cuentan con la estructura general de una polifenol oxidasa, es decir, cuentan con un dominio N-terminal el cual consta de un conjunto (paquete) de hélices α (círculo rojo), en donde se encuentran ambos sitios de unión a cobre (CuA y CuB) y con un dominio C-terminal que está formado por hojas β (círculo azul).

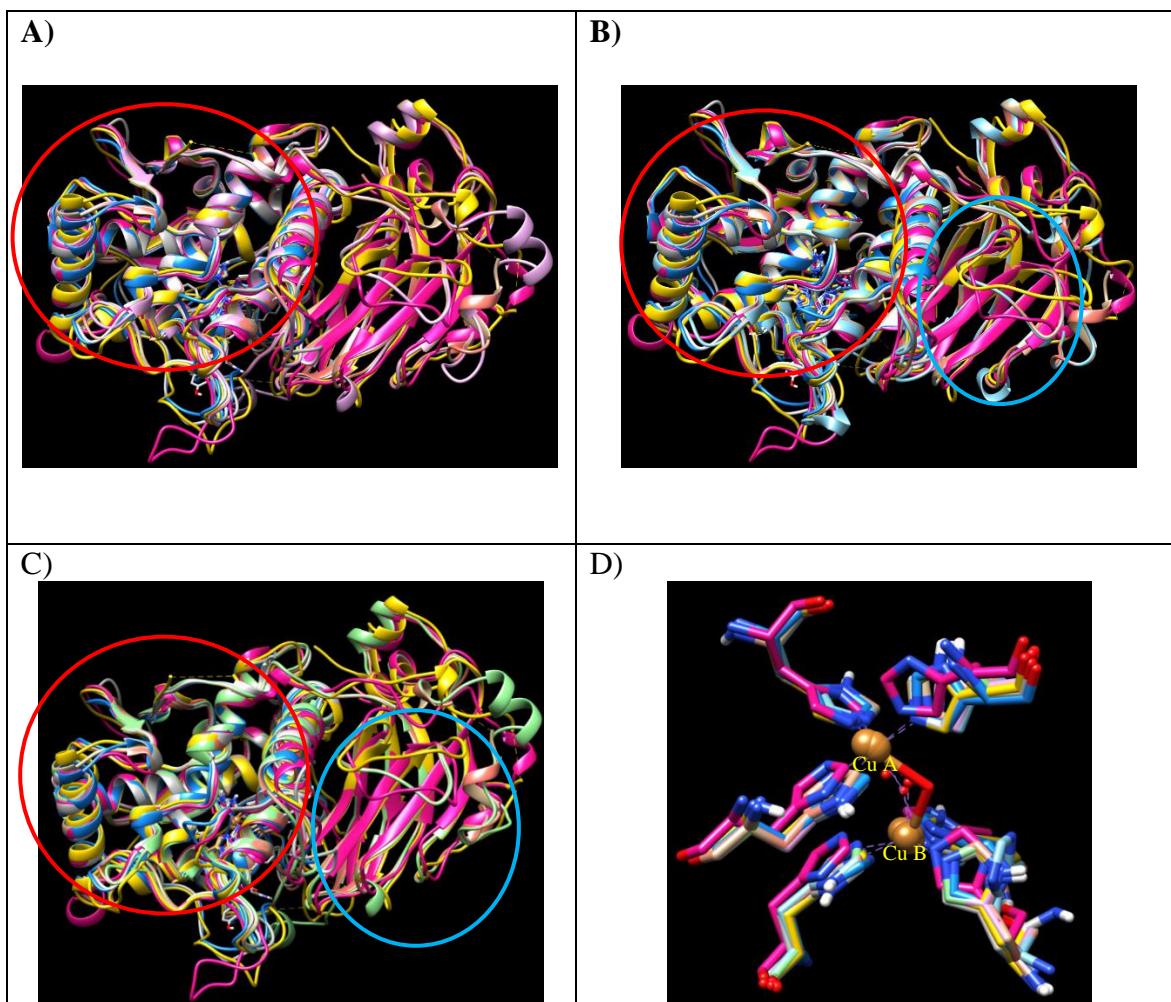


Figura 11. Alineamiento estructural obtenido mediante CHIMERA A) 0979 vs. *C. grandiflora*, *I. batatas*, *J. regia*, *M. domestica*, *S. lycopersicum* y *V. vinifera*. B) 0214 vs. estructuras cristalizadas. C) 2162 vs. estructuras cristalizadas. D) Histidinas de los modelos generados y PFO cristalizadas.

Se ha mencionado que la función del dominio C-terminal es proteger al dominio que contiene el centro activo (N-terminal) y para permitir un plegamiento preciso. Otro aspecto importante de este dominio, es que se escinde para que la polifenol oxidasa se active, normalmente se utilizan detergentes para llevar a cabo la escisión para llevar a cabo cambios estructurales en la enzima, lo que permite que el centro activo sea más accesible a los sustratos (13).

Ejemplo de las estructuras activas son las polifenol oxidasas cristalizadas de *J. regia* (6) e *I. batatas* (49). Los modelos que generamos contienen los dominios N-terminal y C-terminal como en las PFO cristalizadas de *C. grandiflora* (6), *M. domestica* (13), *S. lycopersicum* (59) y *V. vinifera* (54).

En el panel D pueden observarse las 6 histidinas necesarias para poder coordinar el cobre que son características de la polifenol oxidasa, para poder coordinar el cobre (60). En todos los casos las histidinas se encuentran en la misma orientación, pero en el modelo 0214 resalta la histidina 278 (círculo amarillo) debido a que tiene una orientación distinta a las del resto. Se desconoce el efecto que este cambio tenga a nivel de catálisis, por lo que estudios de docking nos permitirían conocer que afectaciones conlleva este cambio.

Cabe destacar la información obtenida experimentalmente, ya que se ha sugerido que los pesos moleculares 29, 39, 58 y 75 kDa pueden corresponder a PFO debido a que son similares a los reportados por otros autores (20,21). En segunda instancia se tienen los modelos generados y validados a partir de distintas herramientas bioinformáticas en donde se obtuvieron los modelos 0979 (58 kDa), 2162 (58 kDa) y 0214 (59 kDa).

El caso más particular de estos pesos es el de 58 kDa dado que se obtuvo tanto experimentalmente como bioinformáticamente, lo que podría indicar que se identificó al menos una de las isoformas de PFO de aguacate y que además de eso se logró identificar su secuencia de aminoácidos y generar su estructura.

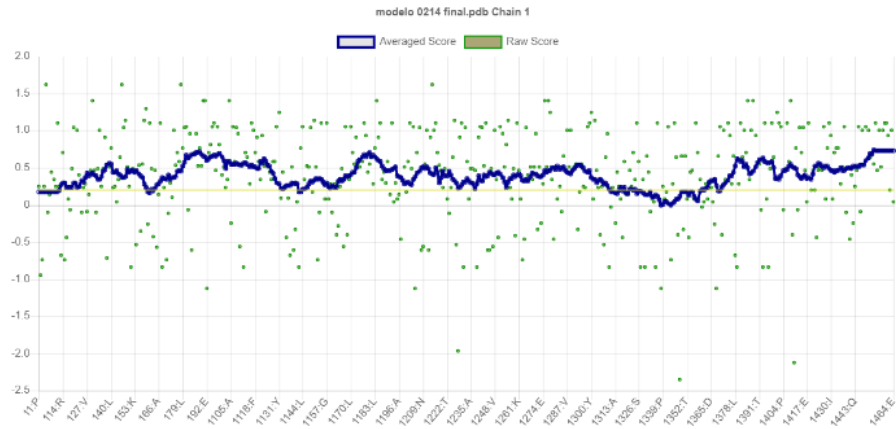
Los datos obtenidos nos permitirán proponer un protocolo de purificación con mejores condiciones para lograr aislarla homogéneamente y así poder realizar más estudios de la PFO de aguacate. Lo que refuerza que el combinar la parte experimental y bioinformática puede ayudar a complementar los estudios que se estén realizando.

VALIDACIÓN DE LOS MODELOS

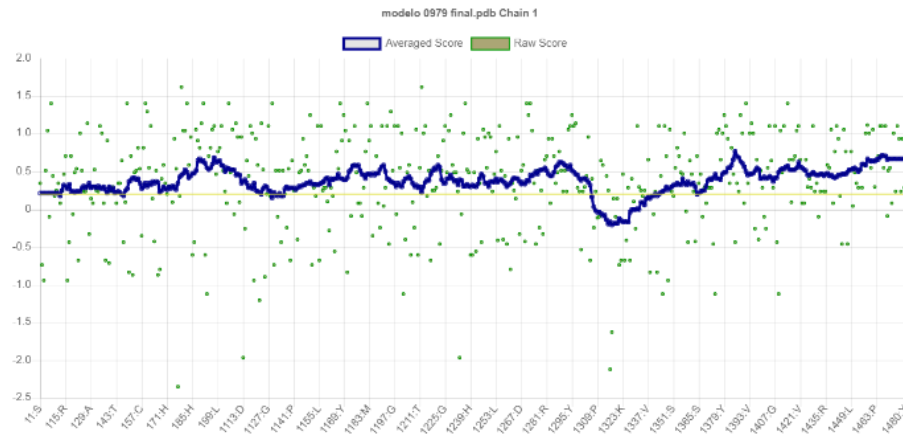
Se utilizó **VERIFY 3D** y **PROCHECK** para validar la calidad de las estructuras. **VERIFY** determina la compatibilidad de un modelo 3D con su propia secuencia de aminoácidos (1D) asignando una clase estructural basada en su ubicación y entorno (alfa, beta, bucle, polar, no polar) (<https://saves.mbi.ucla.edu/>). Se obtuvieron los siguientes valores en **VERIFY 3D**: 0214 (87.07%), 0979 (91.04%) y 2162 (91.25%) (figura 12 A, B y C, respectivamente). Todos los modelos fueron aprobados por el servidor, siendo 2162 el modelo con un mejor porcentaje de compatibilidad.

VERIFY 3D

A) 0214



B) 0979



C) 2162

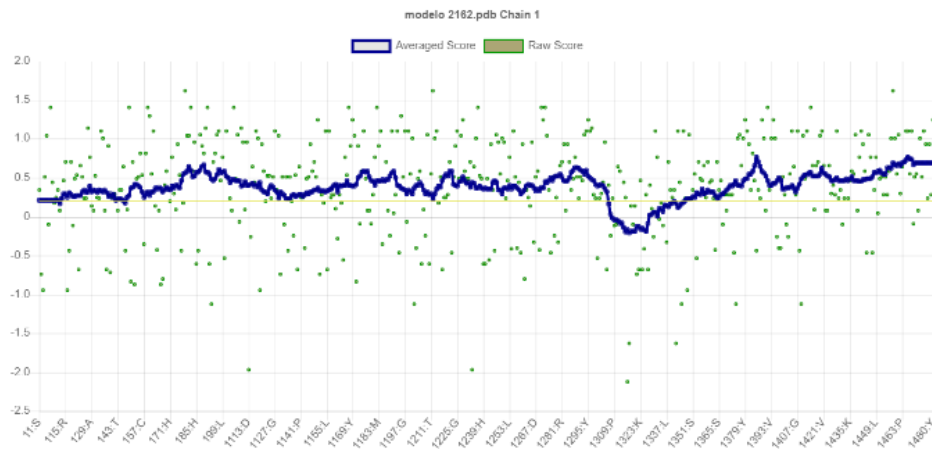
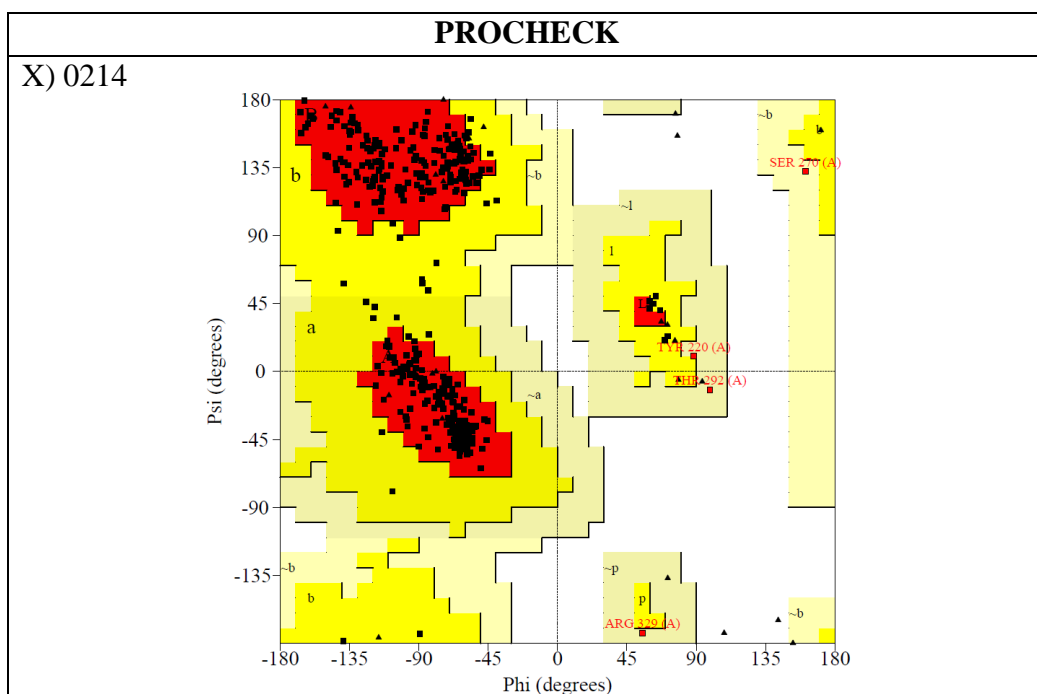


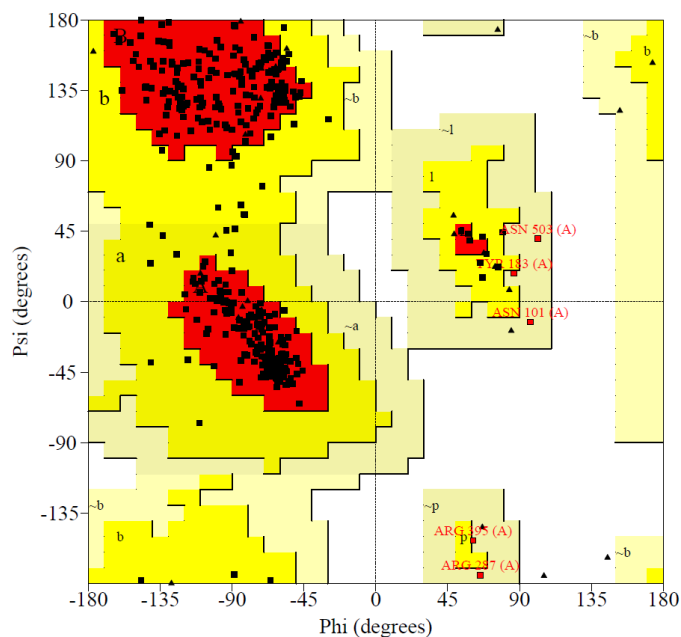
Figura 12. Gráficos obtenidos en la determinación de la calidad de los modelos mediante VERIFY 3D.

PROCHECK se utilizó para comprobar la calidad estereoquímica de la estructura, este servidor analiza residuo por residuo y la geometría global de la estructura (39). En 0214 (Figura 13 X) el 92.9% de los aminoácidos se encontraron en las regiones más favorecidas (A, B y L), un 6% se encontró en regiones adicionales permitidas (a,b,l y p) y un 1% de los aminoácidos se encontraron en regiones generosamente autorizadas (~a,~b,~l,~p). El modelo 0979 (figura 13 Y) obtuvo un 89.6% en regiones más favorecidas, un 9.2% en regiones adicionales permitidas y 1.2% en regiones generosamente autorizadas. Por último, el modelo 2162 (figura 13 Z) presentó un 89.6% en regiones favorecidas, 9.4% en regiones adicionales permitidas y 1% en regiones generosamente permitidas.

Como control interno se hizo esta misma evaluación para las estructuras cristalizadas de *V. vinifera* y *M. domestica* en donde se obtuvieron 87.9% y 93.4% de los aminoácidos en regiones más favorecidas. Estos valores se encuentran muy cercanos a los que se generaron en los modelos.



Y) 0979



Z) 2162

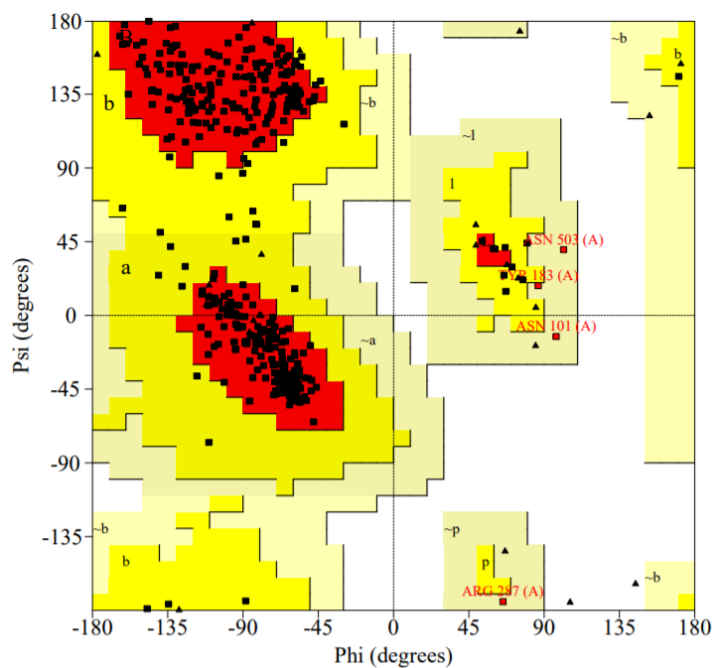


Figura 13. Gráficos obtenidos en la determinación de la calidad de los modelos mediante PROCHECK.

En *Nelumbo nucifera* Gaertn mostró que un 95.5% de los aminoácidos se encontraban en las regiones más favorecidas (61). Los modelos de *M. domestica* Borkh. cv. Red Fuji, *Taraxacum officinale* y *S. melongena* presentaron un 83.9%, 93% y 68.7-85.8% de los aminoácidos en regiones más favorecidas. Al hacer la comparativa de los porcentajes de

aminoácidos en regiones más favorecidas de los modelos 0214 (92.9%), 0979 (89.6%) y 2162 (89.6%) con los reportados en otros estudios en donde validan sus modelos, se infiere que la calidad de las estructuras generadas es buena y los modelos son confiables.

De esta manera fue posible determinar la calidad de los modelos generados por **SWISS-MODEL**, lo que permitió continuar con las siguientes pruebas.

Algunas de las PFO que se han modelado utilizando **SWISS-MODEL** han sido: *Nelumbo nucifera* Gaertn en el que se usó como plantilla la estructura de *J. regia* (67.75% identidad), esta estructura presentó 8 hélices α , 10 láminas β y asas en la estructura. El sitio Cu A se encontró coordinado por His 175, 196 y 205 mientras que el sitio Cu B por His 327, 331 y 361 (61). En los modelos generados de *Theobroma cacao* L. se utilizó la plantilla de *V. vinifera*, en donde los pesos moleculares de estas estructuras fueron de 68.9 kDa y 67.4 kDa con una longitud de 618 y 605 aminoácidos, respectivamente (62). De igual manera se determinaron los pesos moleculares de los modelos 0979 (58.75 kDa), 0214 (59.93 kDa) y 2162 (58.67 kDa). Los valores de estos pesos moleculares son similares al de la PFO de *V. vinifera* (67 kDa) los cuales entran dentro del rango en el que se ha reportado para esta enzima.

En *S. melongena* se generó un modelo con 15 hélices α , 15 hojas β , 50 giros y un Q-mean de 5.2 (63). Los modelos generados para *Taraxacum officinale* utilizaron como referencia la estructura de *I. batatas* como plantilla. Estos modelos mostraron contar con 4 hélices α que son comunes en las PFO y 6 histidinas que coordinan los cobres en el sitio activo (34). Cabe destacar que los modelos de *S. melongena* y *Taraxacum officinale* fueron desarrollados a partir de otros modeladores. El uso de servidores de modelado permite predecir las estructuras de las proteínas basándose en plantillas que se conocen, como en el caso de las PFO cristalizadas lo que permite conocer ciertas características como PM, si cuenta con la estructura general de las PFO, las similitudes que tiene con respecto a otras PFO y también pueden ser utilizadas para comprender un poco más acerca de su mecanismo de unión a ligando.

8. CONCLUSIONES

Los modelos 0214, 0979 y 2162 generados a partir del genoma del aguacate presentan los dos sitios de unión a cobre, cisteínas y fenilalaninas reportados previamente en estructuras de PFO cristalizadas. De igual forma presentan las 4 hélices α que se encuentran comúnmente en las estructuras de las PFO y los dominios central y C-terminal. Todo esto sugiere que las secuencias estudiadas pertenecen a las PFO.

El uso de herramientas bioinformáticas nos permitió identificar posibles estructuras de la polifenol oxidasa del aguacate, además de conocer sus pesos moleculares y porcentaje de

identidad con respecto a las de otras especies. Al complementar la información obtenida experimental y bioinformáticamente puede inferirse que en el aguacate están presentes isoformas de la polifenol oxidasa.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar pruebas de acoplamiento molecular (docking) entre las estructuras generadas e inhibidores de PFO.
- Caracterizar estructuralmente por fluorescencia y dicroísmo circular la polifenol oxidasa del aguacate.
- Probar distintos inhibidores físicos y químicos para inactivar la PFO.

10. REFERENCIAS

1. Pesquera S de IA y. Boletín mensual de avance de la producción de aguacate [Internet]. gov.mx. (2020). Disponible en: <http://www.gob.mx/siap/documentos/boletin-mensual-de-avances-de-la-produccion-de-aguacate-103935>
2. Tinello F, Lante A. Recent advances in controlling polyphenol oxidase activity of fruit and vegetable products. *Innov Food Sci Emerg Technol.* (2018);50:73-83.
3. Mayer AM. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry.* (2006);67(21):2318-31.
4. Toledo L, Aguirre C. Enzymatic browning in avocado (*Persea americana*) revisited: History, advances, and future perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr.* (2017);57(18):3860-72.
5. Kaintz C, Mayer RL, Jirsa F, Halbwirth H, Rompel A. Site-directed mutagenesis around the CuA site of a polyphenol oxidase from *Coreopsis grandiflora* (cgAUS1). *FEBS Lett.* (2015);589(7):789-97.
6. Molitor C, Mauracher SG, Rompel A. Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases. *Proc Natl Acad Sci U A.* (2016);113(13):E1806-15.
7. Zhang J, Sun X. Recent advances in polyphenol oxidase-mediated plant stress responses. *Phytochemistry.* (2021);181:112588.
8. Huang C, Zhang J, Zhang X, Yu Y, Bian W, Zeng Z, et al. Two new polyphenol oxidase genes of tea plant (*Camellia sinensis*) respond differentially to the regurgitant of tea geometrid, *ectopis obliqua*. *Int J Mol Sci* [Internet]. (2018);19(8).

9. Liao Y, Yu Z, Liu X, Zeng L, Cheng S, Li J, et al. Effect of major tea insect attack on formation of quality-related nonvolatile specialized metabolites in tea (*Camellia sinensis*) leaves. *J Agric Food Chem.* (2019);67(24):6716-24.
10. Batista KA, Batista GLA, Alves GL, Fernandes KF. Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from *Solanum lycocarpum* fruits. *J Mol Catal B Enzym.* (2014);102:211-7.
11. Selvarajan E, Veena R, Manoj Kumar N. Polyphenol oxidase, beyond enzyme browning. en: Singh J, Sharma D, Kumar G, Sharma Nr, editores. *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development [Internet]*. Singapore: Springer Singapore; (2018). p. 203-22. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0_10
12. Kaintz C, Mauracher SG, Rompel A. Chapter one - type-3 copper proteins: recent advances on polyphenol oxidases. Christov CZ, editor. *Advances in protein chemistry and structural biology.* Academic Press; (2014). p. 1-35.
13. Kampatsikas I, Bijelic A, Pretzler M, Rompel A. A peptide-induced self-cleavage reaction initiates the activation of tyrosinase. *Angew Chem Int Ed Engl.* (2019);58(22):7475-9.
14. Kaplan No. Nature of multiple molecular forms of enzymes. *Ann N Y Acad Sci.* (1968);151(1):382-99.
15. Latner AL. The nature of isoenzymes. *J Clin Pathol suppl (assoc clin pathol).* 1970;4:8-13.
16. Vámos-Vigyázó L, Haard NF. Polyphenol oxidases and peroxidases in fruits and vegetables. *C R C Crit Rev Food Sci Nutr.* (1981);15(1):49-127.
17. Pelley Jw. 4 - Enzymes and energetics. Pelley JW, editor. *Elsevier's Integrated Review Biochemistry (Second Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; (2012). p. 29-37.
18. Gooding PS, Bird C, Robinson SP. Molecular cloning and characterisation of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta.* (2001);213(5):748-57.
19. Samisch RM. Contribution to the knowledge of plant phenolases. *Plant physiol.* (1937);12(2):499-508.
20. Dizik Ns, Knapp Fw. Avocado polyphenol oxidase: purification, and fractionation on sephadex thin layers. *J Food Sci.* (1970);35(3):282-5.
21. Kahn V. Polyphenol oxidase isoenzymes in avocado. *Phytochemistry.* (1976);15(2):267-72.
22. Moeini Alishah M, Yıldız S, Bilen Ç, Karakuş E. Purification and characterization of avocado (*Persea americana*) polyphenol oxidase by affinity chromatography. *Prep Biochem Biotechnol.* (2022);1-14.

23. Pavani P, Kumar K, Rani A, Venkatesu P, Lee MJ. The influence of sodium phosphate buffer on the stability of various proteins: Insights into protein-buffer interactions. *J Mol Liq.* (2021);331:115753.
24. Duong-Ly KC, Gabelli SB. Chapter seven - salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. Lorsch J, editor. *Methods in Enzymology.* Academic Press; (2014). p. 85-94.
25. Palma-Orozco G, Marrufo-Hernandez NA, Sampedro JG, Najera H. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mango (*Mangifera indica* cv. Manila). *J Agric Food Chem.* (2014);62(40):9832-40.
26. Marrufo-Hernández NA, Palma-Orozco G, Beltrán HI, Nájera H. Purification, partial biochemical characterization and inactivation of polyphenol oxidase from Mexican Golden Delicious apple (*Malus domestica*). *J Food Biochem.* (2017);41(3):e12356.
27. Palma-Orozco G, Ortiz-Moreno A, Dorantes-Alvarez L, Sampedro JG, Nájera H. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*). *Phytochemistry.* (2011);72(1):82-8.
28. Palma-Orozco G, Marrufo-Hernández NA, Tobias I, Nájera H. Purification and biochemical characterization of polyphenol oxidase from soursop (*Annona muricata* L.) and its inactivation by microwave and ultrasound treatments. *J Food Biochem.* (2019);43(3):e12770.
29. Mishra BB, Gautam S, Sharma A. Purification and characterisation of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant (*Solanum melongena*). *Food Chem.* (2012);134(4):1855-61.
30. O'Connor BF, Cummins PM. Hydrophobic interaction chromatography. en: walls d, loughran st, editores. *protein chromatography: methods and protocols.* New York, NY: Springer New York; 2017. p. 355-63.
31. Wissemann KW, Montgomery MW. Purification of d'Anjou pear (*Pyrus communis* L.) polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* (1985);78(2):256-62.
32. Sun Y, Shi QH, Zhang L, Zhao GF, Liu FF. 2.47 - Adsorption and chromatography. Moo-young m, editor. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition).* Burlington: Academic Press; (2011); p. 665-79.
33. Cummins PM, Rochfort KD, O'Connor BF. Ion-exchange chromatography: basic principles and application. Walls D, Loughran ST, editores. *Protein chromatography: methods and protocols.* New York, NY: Springer New York; (2017); p. 209-23.
34. Dirks-Hofmeister ME, Singh R, Leufken CM, Inlow JK, Moerschbacher BM. Structural Diversity in the Dandelion (*Taraxacum officinale*) Polyphenol Oxidase Family Results in Different Responses to Model Substrates. *PLOS ONE.* (2014);9(6):e99759.

35. Rendon-Anaya M, Ibarra-Laclette E, Mendez-Bravo A, Lan T, Zheng C, Carretero-Paulet L, et al. The avocado genome informs deep angiosperm phylogeny, highlights introgressive hybridization, and reveals pathogen-influenced gene space adaptation. *Proc Natl Acad Sci U A.* (2019);116(34):17081-9.
36. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2016/11/29 ed. (2017);45(D1):D158-69.
37. Gertz EM, Yu YK, Agarwala R, Schaffer AA, Altschul SF. Composition-based statistics and translated nucleotide searches: improving the TBLASTN module of BLAST. *BMC Biol.* (2006);4:41.
38. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* (2018);46(W1):W296-303.
39. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr.* (1993);26(2):283-91.
40. Eisenberg D, Lüthy R, Bowie JU. [20] VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in enzymology.* Academic press; (1997); p. 396-404.
41. Panadare D, Rathod VK. Extraction and purification of polyphenol oxidase: A review. *Biocatal Agric Biotechnol.* (2018);14:431-7.
42. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* (1970);227(5259):680-5.
43. Oktay M, Küfreviölu I, Kocaçalışkan I, Şakırolu H. Polyphenol oxidase from Amasya Apple. *J Food Sci.* (1995);60(3):494-6.
44. Campion EM, Loughran ST, Walls D. Protein quantitation and analysis of purity. Walls D, Loughran ST, editores. *Protein Chromatography: Methods and Protocols.* New York, NY: Springer New York; (2017) p. 225-55.
45. Bollag DM, Edelstein SJ, Rozycki MD. Proteins methods. Protein concentration determination. (1996); 3 57-81.
46. Altschul SF, Gish W. Local alignment statistics. *Methods enzymol.* (1996);266:460-80.
47. Flurkey Wh, Jen JJ. Purification of peach polyphenol oxidase in the presence of added protease inhibitors. *J Food Biochem.* (1980);4(1):29-41.
48. Taranto F, Pasqualone A, Mangini G, Tripodi P, Miazzi MM, Pavan S, et al. Polyphenol oxidases in crops: biochemical, physiological and genetic aspects. *Int J Mol Sci.* (2017);18(2):377.

49. Klabunde T, Eicken C, Sacchettini JC, Krebs B. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat Struct Biol.* (1998);5(12):1084-90.
50. Marusek CM, Trobaugh NM, Flurkey WH, Inlow JK. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J Inorg Biochem.* (2006);100(1):108-23.
51. Dirks-Hofmeister ME, Inlow JK, Moerschbacher BM. Site-directed mutagenesis of a tetrameric dandelion polyphenol oxidase (PPO-6) reveals the site of subunit interaction. *Plant Mol Biol.* (2012);80(2):203-17.
52. Jukanti AK, Bhatt R. Eggplant (*Solanum melongena* L.) polyphenol oxidase multi-gene family: a phylogenetic evaluation. *Biotech.* (2015);5(1):93-9.
53. Quarta A, Mita G, Durante M, Arlorio M, De Paolis A. Isolation of a polyphenol oxidase (PPO) cDNA from artichoke and expression analysis in wounded artichoke heads. *Plant Physiol Biochem.* (2013);68:52-60.
54. Virador VM, Reyes Grajeda JP, Blanco-Labra A, Mendiola-Olaya E, Smith GM, Moreno A, et al. Cloning, sequencing, purification, and crystal structure of Grenache (*Vitis vinifera*) polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem.* (2010);58(2):1189-201.
55. Benkert P, Tosatto SC, Schomburg D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins.* (2008);71(1):261-77.
56. Zhang Z, Li M, Zhang X, Zheng N, Zhao S, Wang J. A Novel urease inhibitor of ruminal microbiota screened through molecular docking. *Int J Mol Sci.* (2020);21(17):6006.
57. Yu D, Zou J, Chen Q, Zhu T, Sui R, Yang J. Structural modeling, mutation analysis, and in vitro expression of usherin, a major protein in inherited retinal degeneration and hearing loss. *Comput Struct Biotechnol J.* (2020);18:1363-82.
58. Reva BA, Finkelstein AV, Skolnick J. What is the probability of a chance prediction of a protein structure with an rmsd of 6 Å? *Fold Des.* (1998);3(2):141-7.
59. Kampatsikas I, Bijelic A, Rompel A. Biochemical and structural characterization of tomato polyphenol oxidases provide novel insights into their substrate specificity. *Sci Rep.* (2019);9(1):4022.
60. Bijelic A, Pretzler M, Molitor C, Zekiri F, Rompel A. The structure of a plant tyrosinase from walnut leaves reveals the importance of «substrate-guiding residues» for enzymatic specificity. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2015;54(49):14677-80.
61. Li J, Deng Z yuan, He Y, Fan Y, Dong H, Chen R, et al. Differential specificities of polyphenol oxidase from lotus seeds (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) toward stereoisomers, (-)-epicatechin and (+)-catechin: Insights from comparative molecular docking studies. *LWT.* (2021);148:111728.

62. Sanni D, Fatoki T, Omotoyinbo O. Comparative evaluation of computational and experimental analysis of polyphenol oxidase from cocoa (*Theobroma cacao* L.). J Microbiol Biotechnol Res. (2017);7:18.
63. Mallick M, Mukherjee K, Udayakumar NA. Homology modelling of polyphenol oxidase from *Solanum melongena*: Sequence analysis and structural validation studies - In silico. Int J Pharma Bio Sci. (2011);2:319-28.