

## **Determinación de la actividad e inhibición de la polifenoloxidasa en el lulo (*Solanum quitoense lam*)**

### **Determination of the activity and inhibition of the polyphenoloxidase in the lulo (*Solanum quitoense lam*)**

**Victoria P, Lizarazo C, Quintero Y.**

*Facultad de Ingenierías y Arquitectura, Departamento d Aalimentos, Universidad de Pamplona, Pamplona, Norte de Santander, Colombia.*

*Recibido 19 de Enero 2010; aceptado 3 de Abril 2010*

#### **RESUMEN**

---

*El objetivo de la investigación fue determinar la influencia del uso de precipitantes fenólicos e inhibidores en la actividad de la enzima polifenoloxida (PFO), así como el determinar uée parte del fruto, piel o pulpa, presenta una mayor actividad esta enzima. Se trabajó sobre extractos crudos, tanto de pulpa como de piel del lulo, en cuya extracción se incluyó el uso de los precipitantes fenólicos TRITÓN y polivinilpirilidona (PVPP), con el fin de establecer si éstos permiten obtener una un extracto con mayor actividad enzimática. Así mismo, se evaluó el uso de los antioxidantes, ácido cítrico y metabisulfito de sodio en dos concentraciones (500 y 1000 ppm). Como resultado se obtuvo que la mejor condición para la extracción de la enzima polifenoloxidasa es la utilización del tritón al 3 %, obteniendo mayor presencia de dicha enzima en la pil,; en el que el metabisulfito de sodio (1000 ppm) logra inhibir su actividad en un 56,08%.*

\*Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. E-mail: vic14@hotmail.com

**Palabras clave:** *absorbancia, enzima, inhibición, lulo, polifenoloxidasa.*

## ABSTRACT

---

*The aim of the investigation was to determine the influence of the use of phenolic inhibitors and precipitants in the activity of the polyphenoloxidase enzyme (PPO), as well as to determine which part of the fruit, pulp or skin, has a higher polyphenoloxidase enzyme activity. It was worked on the raw extracts of both the pulp and the skin of the lulo, in which, the extraction was included the use of phenolic precipitants TRITON and Polyvinylpyrrolidone (PVPP), in order to establish if they allow to obtain an extract with higher enzymatic activity. It was also evaluated the use of antioxidants, citric acid and sodium metabisulfite at two concentrations (500 and 1000 ppm). As a result, it was obtained that the best condition for the extraction of the polyphenoloxidase enzyme is the use of the triton at 3%, obtaining greater presence of this enzyme in the skin, in which the sodium metabisulfite (1000 ppm) achieves to inhibit its activity in a 56.08%.*

**Keywords:** absorbance, inhibition enzyme, lulo, polyphenoloxidase

## INTRODUCCIÓN

---

La alteración del color de los productos hortofrutícolas está fundamentalmente relacionada con el pardeamiento enzimático (Sapers, 1993; Nicolas *et al.*, 1994). El pardeamiento enzimático de frutas se debe bien a procesos fisiológicos que tiene lugar durante la maduración, bien a procesos asociados a la recolección, o bien a tratamientos tecnológicos de post-recolección (Burns, 1995). Para que el fenómeno de pardeamiento enzimático tenga lugar se requiere de la presencia de cuatro diferentes compuestos: el oxígeno molecular, substratos apropiados, la polifenol oxidasa y la presencia de cobre en el centro activo de la enzima.

Estos factores determinan la velocidad de pardeamiento, que puede tener lugar muy rápidamente, incluso en 30 min (Laurila *et al.*, 1998). Esta velocidad dependerá de factores tales como la concentración y actividad de la enzima, la cantidad y naturaleza de los com-

puestos fenólicos, pH, temperatura, actividad del agua y de la cantidad de oxígeno disponible en el entorno del tejido vegetal (Mayer, 1987; Vámos-Vigyázó, 1981). Otros factores intrínsecos que influyen en la intensidad del pardeamiento son: la especie, la variedad y el estado fisiológico de los frutos (Amiot *et al.*, 1992).

El pardeamiento enzimático está asociado a las posibles vías bioquímicas de pardeamiento que comprenden la degradación de *o*-quinonas que dependen del pH, el fenol implicado, la concentración relativa de reactivos y la cantidad de oxígeno disponible (Richard-Forget *et al.*, 1992) con la acción de las polifenol oxidasas (PFO).

La principal catalizadora de la alteración del color en los alimentos, la polifenol oxidasa, (PFO) es una enzima ampliamente distribuida en la escala filogenética, encontrándose tanto

---

en organismos procariotas como eucariotas. Recibe distintos nombres según el material biológico del que proceda. Así, se denomina tirosinasa en animales y procariotas, y polifenol oxidasa en vegetales (Valero-Ruiz, 1993). La polifenoloxidasa se localiza siempre en orgánulos celulares, concretamente en cloroplastos y mitocondrias. Se puede hallar de dos formas distintas, bien unida a membranas, como a la membrana tilacoidal de los cloroplastos, o bien en forma soluble. Es de destacar el hecho de que la proporción de fracción soluble de PFO aumenta durante la maduración del fruto (Nicolas *et al.*, 1994).

### ***Factores que condicionan el proceso de pardeamiento***

Existe gran heterogeneidad en los resultados de las publicaciones referentes a parámetros que afectan a la actividad enzimática de la polifenol oxidasa (pH óptimo, latencia, especificidad por el substrato, etc.) entre especies y dentro de la misma especie, entre variedades y diferentes estados de desarrollo (la actividad enzimática es más elevada en frutos jóvenes que en los maduros), aunque la causa de estas diferencias pueda deberse exclusivamente a los diferentes resultados de la extracción y purificación de la polifenol oxidasa, cuya metodología no ha sido muy homogénea hasta la fecha (Robards *et al.*, 1999).

La reacción general sugiere que la enzima cataliza la formación de quinonas altamente reactivas que reaccionan con grupos amino o sulfhídrico de proteínas. Estas reacciones generan cambios en las características físicas, químicas y nutricionales del alimento. Las quinonas también pueden conducir a la polimerización y a reacciones de condensación entre proteínas y polifenoles, produciendo como consecuencia pigmentos de color café, proceso conocido como “pardeamiento enzimático” que va en detrimento del perfil nutricional del alimento (Vaughn, K., 1984). Dado el impacto negativo de esta reacción para la industria alimenticia, los PFO son ampliamente estudiados, sin embargo su función en muchos vegetales no ha sido totalmente resuelta. En las llamadas “frutas exóticas”, los trabajos de este tipo son bastante exigüos y, en muchos casos, se desconocen los procesos implicados en la variación de parámetros relacionados con el valor nutricional, debido a los cambios que tienen lugar en la post-cosecha y en el procesamiento. Por ello, el objetivo de esta investigación fue establecer las condiciones de extracción e inhibición de la enzima PFO en lulo, además de conocer si su actividad es mayoritaria en pulpa o en piel.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

Con el fin de lograr una adecuada extracción de la enzima polifenoloxidasa, a partir de fruta congelada, utilizando 100gr de corteza y pulpa del lulo (picada), se adicionó en una bolsa con 100ml de fosfato buffer a un pH de 6.0, bajo refrigeración a 4°C, se procedió a homogenizar (equipo homogenizador Blender) durante 2 minutos, luego se

filtró utilizando cuatro capas de gasa, dicho filtrado se agregó a seis tubos de ensayo, los cuales se centrifugaron por un tiempo de 30 minutos, después de centrifugadas las muestras se mantuvieron 4°C siendo esta la primera condición. Como segunda condición, se realizó el procedimiento anterior adicionando Tritón al 1 y 3%. En la tercera condición se

adicionó PVPP al 1 y 3%. Teniendo en cuenta que solo la condición 1 se trabajó con los dos tipos de muestra.

La medida de la actividad enzimática se realizó por monitoreo espectrofotométrico, empleando una longitud de onda de 410nm con cubetas de 1cm de recorrido óptico. Para determinar la actividad enzimática se empleó como sustrato el pirocatecol a una concentración de 50mM, atemperado a 30°C, inicialmente se dispuso en un tubo de vidrio 2.2ml de dicho sustrato para realizar la calibración en blanco del equipo.

A partir del extracto enzimático obtenido, se tomó una muestra de 0.4ml, el cual se adicionó a un tubo que contenía 1ml de buffer y 0.8ml de sustrato pirocatecol (30°C), inmediatamente se deja reaccionar por un lapso

de tiempo de 1 minuto. Seguido de esto, la mezcla reaccionada se virió en una cubeta de cuarzo para luego tomar lectura.

La determinación del efecto inhibitor de la enzima polifenoloxidasas se realizó mediante el uso de ácido cítrico y metabisulfito de sodio a concentraciones de 1000-500 ppm, en un tubo de ensayo se adicionaron 0.4 ml del extracto enzimático teniendo en cuenta que éste a su vez contenía 1ml de buffer y 0.8 ml del sustrato; posteriormente, se procedió a agregar el inhibidor manteniendo una temperatura de 30°C durante ½ hora, realizando la lectura de la absorbancia a 410nm por intervalos de 5 minutos. Una unidad de PFO se definió como la variación de la absorbancia en 0,001, en el tramo lineal de la curva (O`beirne *et al.*, 2009).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, se representan los resultados promedios de la actividad enzimática en la cual se emplearon precipitantes. Se observa, que al usar triton al 3% y la polivinilpirrolidona (PVPP) al 1% en la extracción, se obtiene actividades significativamente mayores.

Tabla 1  
Actividad de la enzima polifenoloxidasas  
en pulpa de lulo

Método de extracción	Unidad de actividad enzimática (UI)
1. Triton 3%	551,67 ± 27,22 <sup>a,b,c,d</sup>
2. Triton 1%	456,00 ± 6,08 <sup>b,e,f,g</sup>
3. PVP 3%	356,00 ± 11,00 <sup>c,e,h,i</sup>
4. PVP 1%	520 ± 27,22 <sup>f,h,j</sup>
5. Buffer	123,5 ± 15,45 <sup>d,g,i,j</sup>
p- valor	0.000

n=5, X ± D.T, p- valor ≤ 0.05 existen diferencias significativas a,b, letras iguales entre columnas existen diferencias mínimas significativas.

Según el análisis ANOVA existen diferencias estadísticamente significativas entre los métodos de extracción empleados, cuya concentración difiere de acuerdo al tipo de precipitante a utilizar, en donde se presenta que el uso de los precipitantes es efectivo en la evaluación de la actividad de la enzima PFO. Al emplear precipitante se obtiene mayor extracción de la polifenoloxidasas en el extracto de lulo.

Según el análisis de diferencias mínimas significativas, existen diferencias entre todas las condiciones de extracción a emplear PVPP al 1% y tritón al 3%, en cuyos casos se obtuvo la mayor extracción de la polifenoloxidasas.

De acuerdo con la evaluación de la actividad de la enzima PFO en piel y en pulpa

(tabla 2), se tiene que la piel es el material que presenta una mayor actividad de esta enzima.

Tabla 2  
Diferencias de la polifenoloxidasas en los extractos de lulo.

Material vegetal	Unidad de actividad enzimática (UI)
Pulpa de lulo	123,5 ± 15,45 <sup>a,b</sup>
Piel de lulo	1333,83 ± 583,33 <sup>a,b</sup>
<i>p</i> - valor	0.000

n=2, X ± D.T, *p*- valor ≤ 0.05 existen diferencias significativas, a, b, letras iguales entre columnas existen diferencias mínimas significativas.

Según el análisis ANOVA, para los resultados de inhibición en la piel del lulo (tabla 3), existen diferencias estadísticamente significativas entre los precipitantes empleados, cuyas concentraciones difieren entre ellas.

Tabla 3  
Determinación de porcentajes de inhibición respecto a las concentraciones precipitantes en piel.

Precipitantes	% inhibición
1000ppm a.c	6.60 ± 9.42 <sup>a,b,c,d</sup>
500ppm a.c	0 ± 0 <sup>e,f,g,h</sup>
1000ppm m.b	56.08 ± 20.26 <sup>c,i,j,k</sup>
500ppm m.b	6.45 ± 8.19 <sup>a,b,c,d</sup>
Testigo	0 ± 0 <sup>e,f,g,h</sup>
<i>p</i> - valor	0.000

n=5, X ± D.T, *p*- valor ≤ 0.05 existen diferencias significativas, a, b, c, letras diferentes entre columnas existen diferencias mínimas significativas.

Para el caso de metabisulfito y ácido cítrico, la mayor inhibición se obtiene a 1000ppm, siendo el metabisulfito el más apto para efectos de inhibición de la polifenoloxidasas en la piel de lulo. El uso de precipitante

ácido cítrico a 500ppm, no produjo efectos de inhibición, por lo cual determinamos no es apta la utilización de dicho precipitante en la piel de lulo.

Según el análisis de diferencias mínimas significativas, solo existe discrepancia al emplear metabisulfito a 1000ppm, siendo éste el más efectivo para el control de la actividad de la enzima PFO en lulo.

Para el caso de la inhibición de los antioxidantes en la actividad de la PFO en pulpa (tabla 4), la mayor inhibición se obtiene a 500ppm de ácido cítrico y metabisulfito, siendo el ácido cítrico el más apto para efectos de inhibición de la polifenoloxidasas en la pulpa de lulo.

Tabla 4  
Determinación de porcentajes de inhibición respecto a las concentraciones precipitantes en pulpa.

Precipitantes	% inhibición
1000ppm a.c	45.41 ± 7.11 <sup>a,b,c,d</sup>
500ppm a.c	59.60 ± 29.47 <sup>e,f,g,h</sup>
1000ppm m.b	0 ± 0 <sup>i,j,k,l</sup>
500ppm m.b	9.67 ± 23.68 <sup>m,n,ñ,o</sup>
Testigo	0 ± 0 <sup>i,j,k,l</sup>
<i>p</i> - valor	0.000

*p*- valor ≤ 0.05 existen diferencias significativas a,b,c,d,e,f,g,h,m,n,ñ,o, letras diferentes entre columnas existen diferencias mínimas DMS significativas.

Según el análisis ANOVA existe diferencias estadísticamente significativas entre los precipitantes empleados cuyas concentraciones difieren entre ellas al emplear ácido cítrico a 1000ppm y a 500ppm.

## CONCLUSIONES

La condición de tritón al 3% es el que presenta la mayor eficiencia de la enzima polifenoloxidasas en el lulo. El mayor contenido de la enzima polifenoloxidasas se encuentra en piel del lulo, siendo esta la responsable del oscurecimiento de los productos hortofrutícolas.

El ácido cítrico genera mayor inhibición de la actividad de la enzima PFO en la piel del lulo, mientras que en la pulpa se obtiene con el metabisulfito.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amiot, M. J.; Tacchini, M.; Aubert, S.; Nicolas, J. (1992) Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *Journal of Food Science*, 57(4): 958-962.
- Bruns, J. K. (1995) Lightly processed fruits and vegetables: Introduction to the colloquium. *HortScience*, 30(1): 14-17.
- Laurila, E.; Kervinen, R.; Ahvenainen, R. (1998) The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. *Postharvest news and information*, 9(4): 53-66.
- Lee, C., Whitaker, J. Enzymatic browning and its prevention. ACS Symposium Series 600, American Chemical Society. Washington, D. C. 1995.
- Mayer, A. M.; Harel, E. Polyphenoloxidases and their significance in fruits and vegetables. In Food enzymology; Fox, P. F., Ed.; Elsevier Applied Science: London, U.K., 1991; pp 373-398.
- Mayer, A. M. (1987) Polyphenol oxidases in plants: recent progress *Phytochemistry*, 26(1): 11-20.
- Mayer, A. M.; Harel, E. (1979) Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, 26(11): 193.
- Monsalve-Gonzalez, A.; Barbosa-Cánovas, G.V. y Cavalieri R.P. Mass transfer and textural changes during processing of apples by combined methods. *J. Food Sci.* 58(5):1118-1124, 1993.
- Nicolas, J. J.; Richard-Forget, F. C.; Goupy, P. M.; Amiot, M. J.; Aubert, S. Y. (1994) Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(2): 109-157.
- Richard-Forget, F.C.; Goupy, P.M.; Nicolas, J.J. (1992) Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning 2. Kinetic studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 2108-2113.
- Robards, K.; Prenzler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitand, P.; Glover, G. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436.
- Sapers, G. M. (1993) Browning of foods: Control by sulfites, antioxidants, and other means. Scientific status summary. *Food Technology*, 47: 75-84.
- Valero-Ruiz, E. (1993) Caracterización cinética de la polifenol oxidasa de uva Airen. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Castilla-La Mancha.
- Vachon, C.; D'aprano, G.; Lacroix, M.; Letendre, M. (2003) Effect of edible coating process and irradiation treatment of strawberry on storage-keeping quality. *Journal of Food Science*, 68(2):608-612.
- Vaughn, K. C.; Duke, S. O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Planta*. 1984, 60, 106-112.