

Evaluación preliminar del efecto del pH y de la temperatura en la actividad de la polifenoloxidasas en papa amarilla (*Solanum phureja*)

*Preliminary assessment of the effect of pH and temperature on the polyphenoloxidase activity in yellow potato (*Solanum phureja*)*

Trujillo N. Yanine*¹, Urrutia O. Wilmer², Pabón B. John²

¹Facultad de Ingenierías y Arquitectura, Grupo de Investigación en Ingeniería y Tecnología de Alimentos (GINTAL), Universidad de Pamplona, Km 1 Vía Bucaramanga, Pamplona, Norte de Santander, Colombia

²Facultad de Ingenierías y Arquitectura, Programa Ingeniería de Alimentos, Universidad de Pamplona, Km 1 Vía Bucaramanga, Pamplona, Norte de Santander, Colombia

Recibido 10 de Abril 2011; aceptado 9 de Mayo 2011

RESUMEN

La polifenoloxidasas (PFO), es una enzima que cataliza reacciones de oxidación, y como resultado genera tonalidades oscuras-pardas que, en la transformación, procesado, conservación poscosecha de frutas y verduras, son indeseables. Este hecho resalta la importancia de conocer la actividad de esta enzima en los productos hortofrutícolas. En el caso particular de la papa amarilla, hoy día no existe en Colombia e internacionalmene, una metodología que explicita la evaluación de la enzima PFO, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del pH empleado en el buffer de reacción, así como el de dos temperaturas, en la actividad de esta enzima. Para ello, se trabajó con soluciones buffer fosfato pH 5.5, 6.0 y 6.5 y las temperaturas de 20 y 25°C, empleando extracto no purificado obtenido de papa amarilla. La determinación se llevó a cabo por espectrofotometria a 410 nm, Los resultados previos obtenidos indican, que al emplear buffer fosfato a pH 6.5 atemperado a 20°C, la enzima polifenoloxidasas desarrolla una mayor actividad en la papa amarilla.

*Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. E-mail: yaninetrujillo@unipamplona.edu.co

Palabras clave: papa amarilla, pardeamiento, PFO, pH.

ABSTRACT

The polyphenol oxidase (PPO) is an enzyme that catalyzes oxidation reactions, as a result generates a dark-brown tone that in the transformation, the processing, the post harvesting preservation of fruits and vegetables is undesirable. This fact highlights the importance of knowing the activity of this enzyme in fruit and vegetables products. In the particular case of the yellow potato, today does not exist in Colombia and internationally a method that explains the assessment of the PPO enzyme. So that the objective of this study was to evaluate the effect of the pH used in the reaction buffer, as well as the two temperatures in the activity of this enzyme. For doing this, we worked with phosphate buffer solution pH 5.5, 6.0 and 6.5 and temperatures of 20 and 25 ° C, using unpurified extract obtained from the yellow potatoes. The determination was carried out by spectrophotometry at 410 nm. Previous results obtained indicate that by using a phosphate buffer pH 6.5 at 20 ° C, the polyphenol oxidase enzyme develops a greater activity in the yellow potato.

Keywords: yellow potatoes, browning, PPO, pH.

INTRODUCCIÓN

La enzima polifenoloxidasas (PFO) denominada colectivamente como fenolasa, fenoloxidasas, monofenol-oxidasa, catecol-oxidasa, catecolasa, óxido-reductasa, *o*-difenol oxidasa, *o*-difenolasa, tirosinasa y cresolasa (Vamos-Vigayzó, 1981; Fennema, 2000) se encuentra principalmente en frutas y vegetales, tales como las semillas de girasol, café, manzana, pera, albaricoque, fresa, plátano, papa y tomate, entre otras; pero no está presente en frutos ácidos como la toronja, naranja, melón y otros (Whitaker, 1994).

En los alimentos, la PFO es la causante del pardeamiento enzimático, que puede ser deseable en productos como las uvas y ciruelas pasas, ciruelas deshidratadas, té, café, y la sidra de manzana. Sin embargo, en la mayoría

de las frutas y hortalizas, especialmente en productos de cuarta gama, el pardeamiento enzimático se asocia a la pérdida de la calidad del color, valor nutricional y poca aceptabilidad en el consumidor (Busch, 1999; Silva *et al.*, 2009; Vitti *et al.*, 2011).

Para medir de actividad de la enzima PFO, se hace necesario una etapa de extracción, proceso que involucra cantidad de material vegetal crudo (gr), homogenizado en una cantidad de solución buffer (buffer fosfato) a un pH específico y, en algunas ocasiones, sí se requiere evaluar la actividad específica, el uso de precipitantes fenólicos u otros, con el fin de purificar. La medida de la actividad enzimática se realiza por el incremento en los valores de absorbancia (Deutscher, 1990).

Los resultados se expresan en unidades de actividad enzimática (UE). Una unidad de actividad enzimática, se define como la cantidad de enzima que causa un cambio en los valores de absorbancia de 0,01 en la región lineal inicial de la curva (15 s) (Cornacchia *et al.*, 2011).

El pardeamiento enzimático (PE) está relacionado principalmente con la actividad de polifenoxidasas (PFO), las cuales catalizan la oxidación de compuestos fenólicos a quinonas, con la consecuente transformación a pigmentos oscuros no deseables. Este fenómeno causa deterioro en las características organolépticas de los productos, disminuye su valor proteico y afecta las propiedades benéficas asociadas a los compuestos fenólicos, causando grandes pérdidas económicas en la industria de frutas y vegetales (Suarez *et al.*, 2009).

La enzima PFO juega un importante papel en la resistencia de los tejidos vegetales a los ataques microbianos, infección viral y a las temperaturas adversas. Su acción oxidativa sobre diferentes sustratos origina compuestos secundarios que actúan como barrera en las vías de difusión de la infección; su actividad está directamente relacionada con el pardeamiento enzimático, debido a que cataliza la oxidación de compuestos fenólicos transformándolos en sus derivados quinólicos que originan productos de color pardo (Blach *et al.*, 2010).

La respiración y los cambios fisicoquímicos que ocurren en las frutas cosechadas están relacionados con el metabolismo oxidante. La tasa de respiración es un índice de longevidad del fruto después de cosechado, y se le considera como un indicador de la vida potencial de

almacenamiento del fruto Blach *et al.*, 2010). Los niveles de pH afectan la conformación de las proteínas, el camino de síntesis enzimática y los productos de metabolismo, así como el crecimiento microbiológico.

El valor de pH óptimo de actividad de PFO varía dependiendo la fuente de la enzima, así como también el sustrato en un intervalo relativamente amplio, en la mayoría de los casos va desde pH 4.0 a 7.0. Muchas preparaciones muestran un sólo pH óptimo de actividad, y en algunos casos se presenta un segundo pH óptimo que puede ser atribuido a una insuficiente purificación. En cuanto a la temperatura óptima de actividad que ha sido mucho menos investigada que el pH óptimo, los datos disponibles indican que depende de los mismos factores que depende el pH óptimo. La actividad en melocotones se incrementa de 3°C- 37°C y decrece arriba de 45°C. (Trejo *et al.*, 2008).

La determinación de la actividad enzimática, puede ser determinada midiendo (a) la velocidad de desaparición de sustrato o (b) la velocidad de formación de producto. La velocidad de formación de producto puede ser determinada espectrofotométricamente mediante la medida de la densidad óptica de compuestos coloreados formados por las quinonas. Este método es muy simple y se presta para análisis de rutina. La linealidad es mantenida por relativamente largos periodos (Trejo *et al.*, 2008).

El objetivo de esta investigación fue determinar en qué condición de pH y temperatura tiene mejor actividad la enzima, en extracto crudo no purificado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con papa amarilla, que se obtuvo en la plaza de mercado de la ciudad de Pamplona, Norte de Santander, Colombia.

Preparación de la muestra

Las papas fueron desinfectadas en solución de hipoclorito a 100 ppm durante 3 minutos, tras el cual se procedió a realizar el pelado manual y cortado (laminación).

Extracción

Posteriormente se tomaron 10 g de papa, y se agregaron a una bolsa que contenía 10 ml de solución buffer fosfato (5.5, 6.0, 6.5 por separado) y se mantuvo a una temperatura de 2 a 4°C; a continuación se llevó a cabo una homogenización durante 1 minuto en un blender y filtrado, empleando 4 capas de gazas. El filtrado se llevó a centrifugación durante 30 minutos a 15000 rpm; el sobrenadante obtenido se denominó extracto enzimático crudo.

Determinación de la influencia del pH del buffer y de la temperatura en la actividad de PFO

Para la determinación de la actividad enzimática se empleó el procedimiento de Oktay *et al.*, (1995). Se tomó 1 mL de buffer, estabilizado 25 y 30°C, se le adicionó 0.4 mL del extracto enzimático y 0.8 mL de sustrato (pirocatecol 50mM) y se procedió a realizar lectura en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 410 nm. Se usaron 2.2 mL del sustrato pirocatecol para realizar la calibración en blanco del equipo. El cambio de la absorbancia fue medido cada 5 segundos por un tiempo de 2 minutos, y la actividad fue determinada por la porción lineal de la curva (Wong *et al.*, 1971). Una unidad de actividad de la PFO fue definida como el cambio de la absorbancia en 0,001 por mililitro de enzima.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar la actividad de la enzima en el extracto crudo no purificado, se llevó a cabo una lectura por espectrofotometría a cada una de las soluciones (figura 1), durante 2 minutos.

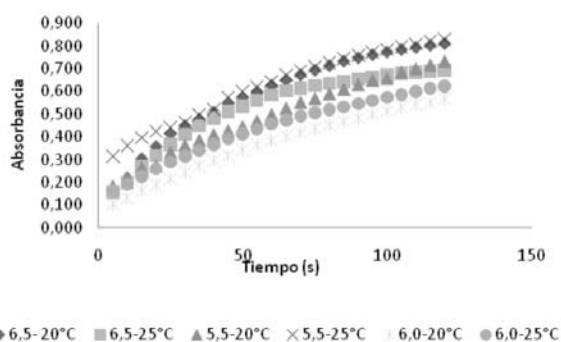


Figura 1. Absorbancia, durante 2 minutos, de las diferentes condiciones de pH y temperatura.

En la figura 1, se observa que la solución pH de 5.5 a 30°C y la solución buffer fosfato pH 6.5 a 25°C, tienen la mayor absorbancia, es decir que su activación es más rápida, en comparación con las demás soluciones; y también de ello podemos decir que estas condiciones son las mejores para la actividad de la enzima polifenoloxidasas.

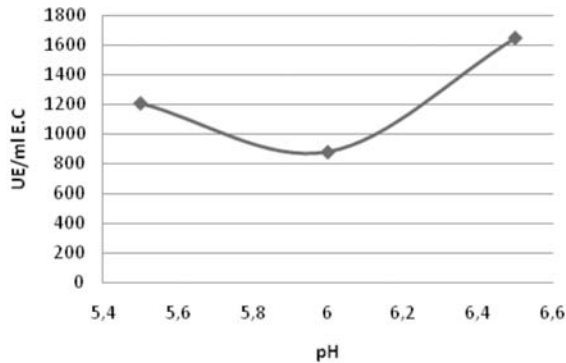


Figura 2: Unidades Enzimáticas por ml en diferentes pH; a temperatura de 25°C

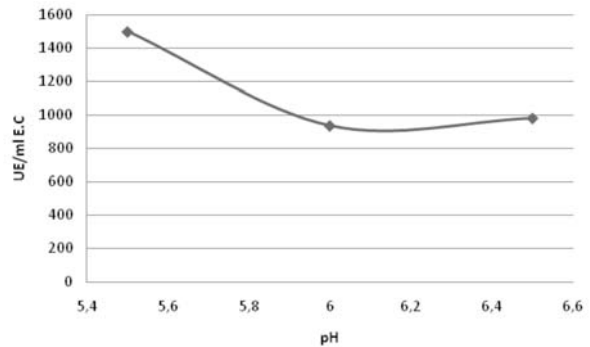


Figura 3: Unidades Enzimáticas por ml en diferentes pH; a temperatura de 30°C

De acuerdo con los resultados de la actividad enzimática, en las figuras 2 y 3, se observa que la mejor condición para la actividad de esta enzima en papa amarilla, es la de pH 6.5 y 25°C, ya que es una condición en la cual la enzima se activa con mayor rapidez, presentado mayor actividad.

CONCLUSIONES

La mejor condición de pH y temperatura al evaluar la actividad de la enzima polifenoloxidasas en la papa amarilla, es la de pH 6.5 y a una temperatura de 25°C.

La mejor condición de pH y temperatura al evaluar la actividad de la enzima polifenoloxidasas en la papa amarilla, es la de pH 6.5 y a una temperatura de 25°C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Batistuti JP, Lourenco EJ. (1985). Isolation and purification of polyphenol oxidase from a new variety of potato. *Food Chem.* 18:251-263
- Blach, Diana Johanna Donado, Magda I. Pinzón. (2010). Actividad de la peroxidasa y polifenoloxidasas en Rodajas de carambolo (averrhoa carambola l.) Fresco Cortado durante su almacenamiento en Atmosfera modificada. Disponible en: <http://www.acta.org.co/pdf/Revista20/Cuarto/Cuarto.pdf>. Consultado: 13/11/2011.
- Busch J.M. (1999). Enzymic browning in potatoes: a simple assay for a polyphenol oxidase catalysed reaction. *Biochemical Education*, 27(3):171-173.
- Cornacchia R., Cabezas-Serrano A.B., Amodio M.L., Colelli G. (2011). Suitability of 4 potato cultivars (*Solanum tuberosum L.*) to be processed as fresh-cut product. *Early Cultivars. American Journal of Potato Research*, 88(5):403-412.
- Fennema O. (2000). *Química de los alimentos*. 2ª Ed., Acribia.
- Suárez P.A., Andreu A.B., S.L. Colman, A. M. Clausen, S.E. Feingold. Pardeamiento enzimático: caracterización fenotípica, bioquímica y molecular en variedades de papa nativas de la Argentina (2009). Disponible en: <http://www.papaslatinas.org/v15n1p66.pdf>. Consultado: 13/11/2011.

-
- Márquez Andrea Trejo I.A. Selene Pascual Bustamante. Practica 3. Determinación de enzimas relacionadas con la maduración de productos vegetales (2008). *Taller multidisciplinario de procesos tecnológicos de frutos y hortalizas, Universidad Nacional Autónoma de México*. Disponible en: <http://www.actiweb.es/postcosecha/archivo8.pdf>. Consultado: 11/10/2011.
- Deutscher Murray P. (1990). Guide to Protein Purification. Volume 182: 1-894
- Silva J. Ribeiro, Queiroz Christiane, Mendes L. María, Fialho Eliane, Valente-Mesquita Lucia. (2011). Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew Apple (*Anacardium occidentale L.*) after processing. *Food Chemistry*, 125(1):128-132.
- Vamos-Gigayzo L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15:49-127.
- Vitti Dario Maria Carolina, Fumi Sasaki Fabiana, Miguel Patricia, Kluge Ricardo Alfredo, Moretti Celso Luiz. (1994). Activity of Enzymes Associated with the Enzymatic Browning of Minimally Processed Potatoes Brazilian Archives of Biology And Technology, 54(5):983-990.
- Whitaker J. (1994). Principles of enzymology for the food Sciences. 2 nd. Ed. Marcel Dekker, New York.
- Wong TC. Luh BS & Whitaker JR. (1971). Isolation and characterization of polyphenol oxidase isoenzyme of Clingstone peach. *Plant Physiology* 48:19-23.