

OBTENCIÓN DE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN TÉRMICA DE PEROXIDASA EN CRUCÍFERAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO INDUSTRIAL DE VEGETALES PRECOCIDOS CONGELADOS

J. Pérez^{1,2}, M. V. Santos^{1,2}, A. Califano¹, y N. E. Zaritzky^{1,2}

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos-Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, CONICET, 116 y 47, La Plata (CP 1900).

² Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UNLP, 47 y 115.
mvsantosd@gmail.com

Palabras claves: inactivación enzimática, vegetales pre-cocidos, crucíferas.

RESUMEN: Crucíferas como el brócoli (*Brassica oleracea itálica*) y repollito de Bruselas (*Brassica oleracea gemmifera*) poseen componentes nutritivos importantes para ser incluidos en la dieta diaria (e.g. vitamina C, di-indolimetano, glucorafanina). Por esta razón existe una tendencia en aumentar su utilización como vegetales pre-cocidos congelados, generando una alternativa práctica para la ingesta diaria. El sector industrial de alimentos congelados requiere la definición de parámetros que aseguren la calidad final del vegetal. Peroxidasa (POD) es una enzima importante en la conservación de vegetales ya que se utiliza como índice de calidad en alimentos pre-cocidos congelados. Su correcta inactivación permite incrementar la vida útil preservando características deseables. Los objetivos del presente trabajo fueron: a) determinar experimentalmente la composición centesimal de los vegetales estudiados y los parámetros cinéticos que definen la inactivación enzimática de POD, b) establecer si existen fracciones térmicamente lábiles o resistentes de la POD y su concentración inicial. Se analizó la actividad enzimática de POD en brócoli y repollitos de Bruselas a distintas temperaturas y tiempos de calentamiento. El extracto se obtuvo del vegetal fresco en buffer fosfato 0.2M (pH=6.5). Muestras de extracto enzimático contenidas en eppendorfs (1.5ml) se sumergieron en un baño termostático para el ensayo de inactivación térmica. A cada temperatura del baño se retiraron muestras a distintos tiempos de calentamiento, las que inmediatamente se enfriaban en un baño a 0°C. Las temperaturas de ensayo fueron 70, 80 y 90 °C, y los tiempos de inactivación variaron entre 0 y 300 segundos con extracciones cada 10-20 segundos. La actividad de la POD se midió en un espectrofotómetro UV-visible mezclando el extracto con un sustrato formulado con peróxido de hidrógeno (30%v/v) y guayacol (99.9%); la absorbancia del compuesto coloreado formado medido a 470 nm se monitoreaba durante 500 segundos. Se determinó la actividad enzimática (AE) definida como la cantidad de enzima capaz de provocar un cambio en absorbancia de 1/min, expresando los valores respecto al contenido de proteína total, volumen de extracto, o masa seca. A partir de las curvas de AE vs tiempo de calentamiento se observó la presencia de fracciones lábiles y resistentes de la POD calculando la actividad inicial de cada fracción. Estos resultados permitieron determinar la cinética de inactivación térmica obteniendo constantes de reacción y la energía de activación de cada isoenzima. El valor medio del porcentaje de la fracción resistente y la desviación estándar (d.e.) fueron 25.019% (d.e.=0.976) y 21.16% (d.e.=0.540) para repollitos de Bruselas y brócoli respectivamente. Las Energías de activación para repollitos de Bruselas y brócoli resultaron para las fracciones lábiles de las isoenzimas de 6.25×10^4 J/mol (d.e.= 1.87×10^3) y 7.18×10^4 J/mol (d.e.= 3.44×10^3) y para las fracciones resistentes de 5.63×10^4 J/mol (d.e.= 2.98×10^3) y 7.17×10^4 J/mol (d.e.= 2.46×10^3) respectivamente. La determinación de los parámetros cinéticos de POD en crucíferas es necesaria para el acoplamiento de la cinética de inactivación con los programas de simulación numérica que describen el fenómeno de transferencia de energía y permiten calcular los tiempos de procesamiento térmico.

INTRODUCCIÓN

Los repollitos de Bruselas (*Brassica oleracea gemmifera*) y el brócoli (*Brassica oleracea itálica*) son vegetales crucíferos estacionales que contienen un alto contenido de vitamina C

y fibra alimentaria. Las crucíferas también contienen múltiples nutrientes con potentes propiedades anti-cancerígenas, como di-indolimetano, el cual es un modulador de la respuesta del sistema inmunitario innato con actividad anti-viral, anti-bacteriana y anti-cancerígena. A su vez estos vegetales contienen el compuesto glucorafanina, que puede ser convertido en el compuesto anti-cancerígeno sulforafano (Campas, 2009). El alto contenido de nutrientes benéficos para la salud que ayudan a la prevención de enfermedades provoca el incremento en la frecuencia de consumo de estos vegetales en la dieta diaria. Por estas razones para cumplir con la demanda continúa de vegetales crucíferas su comercialización se realiza en forma pre-cocida congelada. Las oxidasas, peroxidasas (POD), lipoxigenasas y catalasas son enzimas presentes en vegetales, siendo comúnmente la peroxidasa la más utilizada para monitorear la inactivación dada su gran resistencia térmica. Sin embargo la completa inactivación de peroxidasa puede implicar un excesivo tratamiento térmico y se ha demostrado que la calidad del producto congelado es mayor si existe cierta actividad residual de peroxidasa en el vegetal luego del calentamiento (Bottcher, 1975). Para un tratamiento térmico óptimo se recomienda una concentración residual de POD de 7.5-11% en repollitos de Bruselas (Williams y col., 1986). Esta enzima se encuentra en la mayoría de los vegetales y frutas (Burnette, 1977), y dada su gran estabilidad térmica se la emplea frecuentemente como parámetro indicador de la finalización del proceso de inactivación enzimática (IE). Por esta razón es de importancia encontrar las condiciones de su inactivación térmica. Se ha reportado en literatura que en brócoli esta enzima presenta una curva de inactivación bifásica (Morales et al, 2002), lo que demuestra la presencia de fracciones de isoenzimas termolábiles y termo resistentes de un mismo compuesto enzimático. En el caso de repollitos de Bruselas la presencia de datos cinéticos relacionados con la inactivación de POD es escasa en literatura.

El presente trabajo tiene como objetivo general determinar los vegetales repollitos de Bruselas y Brócoli: a) las constantes cinéticas de reacción de las isoenzimas peroxidasa (POD) termolábil y termoresistente cuantificando la fracción inicial de cada enzima, b) determinar la energía de activación de la reacción en ambas isoenzimas. Estos resultados permitirán ser acoplados a los modelos numéricos de transferencia de energía para simular numéricamente la etapa de pre-cocción de los vegetales que luego se sometan a congelación

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de los vegetales frescos con menos de dos días de recolección se adquirieron con productores locales de la zona rural de la ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires-Argentina. Las muestras de vegetales se analizaron teniendo la época de cosecha de cada vegetal; el repollito de Bruselas comienza su época de consumo en otoño-invierno y el brócoli se cultiva y cosecha a lo largo de todo el año, siendo el pico de cosecha en la temporada invierno. Las muestras vegetales fueron llevadas al CIDCA donde fueron seleccionados, limpiados y almacenados con un máximo de 1 día en cámara a 4 ° C antes de su análisis.

El análisis de la composición bioquímica proximal de los vegetales consistió en la determinación del contenido de humedad, proteína total, lípidos, carbohidratos y cenizas. El contenido de humedad se determina mediante el método indirecto de secado de la muestra en estufa a 70°C y presión reducida de 100 mmHg hasta alcanzar un peso seco constante (AOAC, 1990). El contenido de proteína cruda se determina por el método de Kjeldahl (AOAC, 1990), utilizando un factor de conversión adecuado para estos vegetales (6,25). Los lípidos se determinan utilizando el método Soxhlet empleando éter etílico (AOAC, 1990). El contenido de cenizas se obtuvo mediante la calcinación de las muestras en mufla a 550°C durante 8 horas (AOAC, 1990). El contenido de carbohidratos se asume como la diferencia entre el total (100%) y los demás componentes principales calculados.

Para el análisis de la AE de la POD se preparó un sustrato utilizando peróxido de hidrogeno (30% m/v), guayacol (99 % m/v) y buffer de fosfato de potasio 0,1 M pH 6,5. El sistema buffer se tomó en referencia de Chen and Whitaker (1986). La extracción de la enzima

previa al análisis de la AE se realizó con buffer de fosfato de potasio 0,2 M a pH 6,5. Estos buffer de fosfatos fueron preparados usando fosfato monopotásico y dipotásico.

El extracto enzimático se preparó pesando 1,5 g de la muestra vegetal en balanza analítica, modelo AB204 (Mettler Toledo, Suiza) 0,1 mg de precisión la cual fue desintegrada y homogeneizada (Equipo La Moulinette, modelo Dp800, Moulinex, Colombia). Luego se mezcló con 100 mL de buffer de fosfato 0,1 M pH 6,5 a 4 °C y se llevó a un Stomacher Labblender modelo 400 (Seward Medical Ltda., Inglaterra) durante 5 minutos; pasado el tiempo se filtró usando un lienzo. El filtrado fue centrifugado por 30 minutos a 4 °C usando una centrifuga Beckman Avanti modelo J-25 (Beckman Instruments Inc., U.S.A) con un rotor JA-2550. El precipitado era descartado filtrando con papel filtro cuantitativo, El filtrado que correspondía al extracto enzimático se colocaba en tubos eppendorf de pequeño volumen (0,2 mL) los cuales se refrigeraban a 0°C. Las muestras preparadas para la evaluación de la actividad enzimática se criopreservaron inicialmente a -196°C y posteriormente se mantuvieron en cámara de -80°C hasta su análisis, estos no superaron las 48 horas almacenados en todos los casos.

Experimentos de inactivación enzimática

Los extractos contenidos en los tubos eppendorf se sumergieron en un baño termostático para el ensayo de inactivación térmica. Las temperaturas de ensayo fueron 75, 80 y 90°C, y los tiempos de extracción variaron entre 0 y 400 segundos con extracciones cada 10-20 segundos. A una temperatura fija del baño se retiraban las muestras a distintos tiempos de calentamiento. Inmediatamente se enfriaban en un baño a 0°C para frenar el proceso térmico. La utilización de tubos de bajo volumen (0,2 mL) y espesor de pared (<0,55 mm) permitieron lograr un calentamiento rápido y uniforme, Las velocidades de calentamiento y enfriamiento se monitoreaban mediante una termocupla tipo T dentro de los tubos, en el baño termostático y en el baño de enfriamiento. Estas termocuplas se conectaron a un adquisidor que registraba la temperatura cada 2 s. En todos los casos las muestras tardaron menos de 30s en alcanzar la temperatura del fluido externo. Luego de ser inactivado el extracto, se analizó la AE según Morales et al., (2002) con modificaciones; tomando 0,120 mL del extracto el cual fue y mezclado con 3,5 mL del sustrato. El sustrato se formuló con 0,1 mL de peróxido de hidrogeno (30% m/v), 0,1 mL de guayacol (99 % m/v) completando el volumen a 100 mL con buffer de fosfato de potasio 0,1 M pH 6,5. La actividad enzimática para los extractos enzimáticos inactivados se midió por duplicado en un espectrofotómetro Hitachi modelo U-1900 (Hitachi High-Technologies Corporation, Japón), también se midió la AE para los extractos frescos que no fueron sometidos a ningún tratamiento térmico. Las determinaciones se realizaron por sextuplicado; en todos los casos se usó como longitud de onda 470nm, monitoreando el cambio de la absorbancia durante 400 segundos. Debe tenerse en cuenta que una Unidad de Actividad Enzimática (U) es igual al cambio de la absorbancia por unidad de tiempo (minuto). La AE en % se obtiene al referir la actividad respecto a la actividad del vegetal fresco (U_0)x100.

Modelo Bifásico de inactivación térmica enzimática

Se tomó el modelo de Ling y Lund (1978) para analizar las cinéticas de inactivación enzimáticas de las dos fracciones de isoenzimas diferentes presentes en la POD (fracciones lábil y resistente); donde cada fracción sigue una cinética de reacción de primer orden. Este comportamiento se expresa matemáticamente como:

$$\% AE = \frac{Co_R \cdot e^{-k_R t} + Co_L \cdot e^{-k_L t}}{Co_R + Co_L} \quad (1)$$

En la Ec.1 t es el tiempo de calentamiento a temperatura constante, Co_L y Co_R son las concentraciones iniciales de la isoenzima termo lábil y termo resistente y k_L y k_R son constantes de reacción de inactivación térmica. Según el método de Ling and Lund (1978) se realizaron dos simplificaciones; la primera consiste en que a tiempos largos de calentamiento toda la fracción lábil es inactivada (menos de un 1% de la isoenzima lábil

queda activa). Por lo tanto de la Ec. 1 el término $e^{-k_L t}$ tiende a cero, obteniendo la siguiente ecuación:

$$\% AE = \frac{C_{oR}}{C_{oR}+C_{oL}} e^{-k_R t} \quad (2)$$

donde se define la fracción porcentual de la isoenzima resistente α_R como:

$$\alpha_R = \frac{C_{oR}}{C_{oR}+C_{oL}} \quad (3)$$

Por otro lado a cortos tiempos de calentamiento, la fracción resistente inactivada se consideró despreciable por lo tanto en la Ec. 1 el término $e^{-k_R t}$ tiende a 1, obteniendo la expresión:

$$\% AE = \frac{C_{oR}+C_{oL} \cdot e^{-k_L t}}{C_{oR}+C_{oL}} = \alpha_R + \alpha_L \cdot e^{-k_L t} \quad (4)$$

Donde α_L es la fracción porcentual de la isoenzima lábil.

Energía de Activación

La energía de activación de las isoenzimas se calculó teniendo en cuenta las constantes de inactivación (k_R y k_L) determinada para cada una de las fracciones. Se asumió un comportamiento tipo Arrhenius:

$$k_R = k_{oR} \cdot e^{\frac{-E_{aR}}{R \cdot T}} \quad (5)$$

$$k_L = k_{oL} \cdot e^{\frac{-E_{aL}}{R \cdot T}} \quad (6)$$

Para obtener los datos de las energías de activación se regresionaron las Ecs. 2 y 4 considerando una k de referencia, que en este caso fue a 80°C de acuerdo con:

$$\ln(\% AE) = \ln(\alpha_R) - t \cdot k_{80^\circ C} \cdot e^{\frac{E_{aR}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{353} \right)} \quad (7)$$

$$\ln(\% AE - \alpha_R) = \ln(\alpha_L) - t \cdot k_{80^\circ C} \cdot e^{\frac{E_{aL}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{353} \right)} \quad (8)$$

Análisis estadístico

Las constantes de reacción a cada temperatura se obtuvieron regresionando en Origin 8.0 las Ecs. 1 y 2, utilizando las AE y los tiempos de inactivación. Las energías de activación se determinaron usando SYSTAT 12 en base a las Ecs. 7 y 8 utilizando los datos de AE a todos los tiempos y temperaturas de trabajo según las recomendaciones de Arabshahi y Lund (1984) con el objeto de obtener un intervalo de confianza y error estándar adecuados. Todos los parámetros obtenidos mediante regresión no lineal se presentan en su valor medio junto con desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis de la composición bioquímica proximal de los vegetales crucíferos se muestran en la Tabla 1. Estos se compararon con valores obtenidos por la USDA (2014) obteniendo que los resultados conseguidos experimentalmente son similares en los dos casos. La actividad enzimática inicial del brócoli y Repollito de Bruselas fue de **358,919 ± 2,4** y **567,939 ± 8,4 × 10⁻¹**, respectivamente y expresado por unidad de masa de materia seca presente en el alimento.

Cinéticas de inactivación térmica

Estudios de la cinética de inactivación térmica en crucíferas han demostrado que la POD en el rango de 70 a 100 °C muestra curvas bifásicas de inactivación, las cuales se deben a la presencia de isoenzimas con distinta estabilidad térmica (Wang y Luh, 1983, Powers et al., 1984, Günes y Bayindirh 1993).

Tabla 1. Resultados composición proximal

COMPONENTE	BROCOLI	REPOLLITOS DE BRUSELA
Humedad	87,54%± 0,015	83,54% ± 0,051
Proteína	3,16 %± 0,014	3,20%± 0,064
Lípidos	1,27 %± 0,050	0,36 %± 0,024
Cenizas	0,94 %± 0,023	1,19 %± 0,020
Carbohidratos	7,09%	11,76%

En el caso de repollitos de Bruselas y Brócoli los resultados presentaron comportamientos claramente bifásicos, en la Fig1. Se muestran las curvas de inactivación enzimática para los dos vegetales.

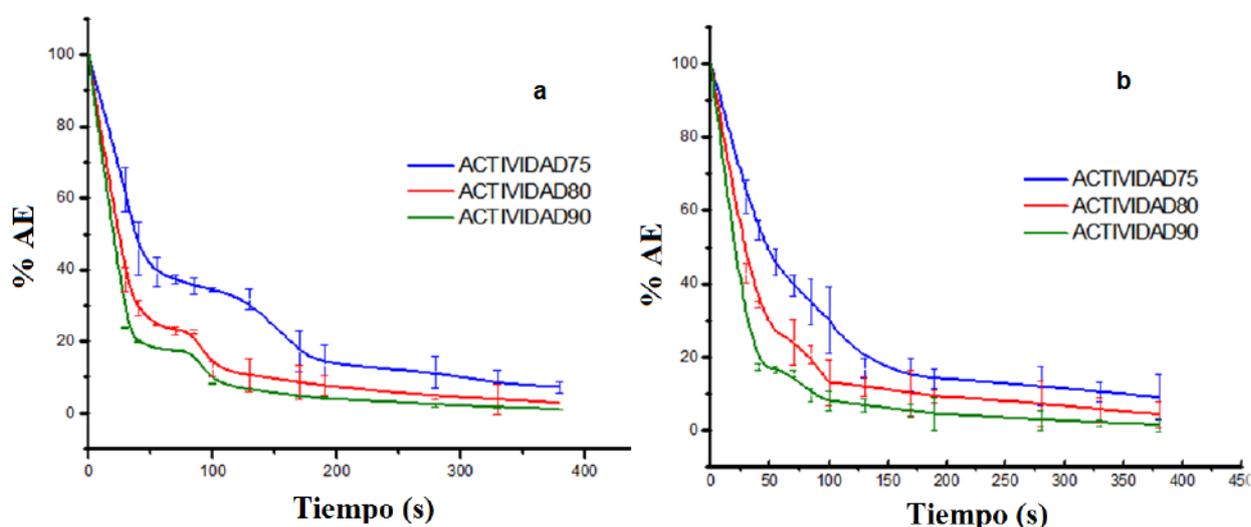


Figura 1. Curvas de inactivación enzimática para a) el repollito de Bruselas y b) brócoli.

Parámetros cinéticos y energías de activación

Los resultados muestran claramente que el porcentaje de enzima inactivada se incrementa al aumentar la temperatura de inactivación y el tiempo de tratamiento. Los parámetros cinéticos se determinaron para los dos vegetales, definiendo las constantes de reacción (k_R y k_L) para las dos fracciones térmicamente diferentes (resistentes y lábiles). En la Tabla 3 se puede observar que los valores de la constante de inactivación enzimática aumentan con el incremento de la temperatura.

Tabla 3. Constantes cinéticas de inactivación enzimática de POD en repollitos de Bruselas y Brócoli para cada fracción termo-resistente y termolábil.

TEMPERATURA (°C)	REPOLLITO BRUSELAS		BRÓCOLI	
	k_R (s ⁻¹) (DE)	k_L (s ⁻¹) (DE)	k_R (s ⁻¹) (DE)	k_L (s ⁻¹) (DE)
75	$3,85 \times 10^{-3}$ ($3,64 \times 10^{-4}$)	$3,11 \times 10^{-2}$ ($2,04 \times 10^{-3}$)	$2,41 \times 10^{-3}$ ($1,32 \times 10^{-4}$)	$2,38 \times 10^{-2}$ ($8,96 \times 10^{-4}$)
80	$5,37 \times 10^{-3}$ ($1,52 \times 10^{-4}$)	$4,24 \times 10^{-2}$ ($4,21 \times 10^{-3}$)	$3,83 \times 10^{-3}$ ($1,94 \times 10^{-4}$)	$4,83 \times 10^{-2}$ ($4,57 \times 10^{-4}$)
90	$7,47 \times 10^{-3}$ ($2,43 \times 10^{-4}$)	$7,87 \times 10^{-2}$ ($1,792 \times 10^{-3}$)	$6,15 \times 10^{-3}$ ($1,79 \times 10^{-4}$)	$5,55 \times 10^{-2}$ ($9,30 \times 10^{-4}$)

Las energías de activación de cada una de las dos fracciones en los dos vegetales se determinaron en base a las Ecs.7 y 8. En la Tabla 4 se muestran los resultados de las energías de activación y la fracción inicial de enzima resistente (α_R) para los dos vegetales. Los resultados encontrados para el brócoli son similares a los reportados Morales, et al.

(2002); se debe resaltar que hasta el momento según las revisiones bibliográficas realizadas no existen valores de estos parámetros cinéticos para el repollito de Bruselas.

Tabla 4. Energías de activación y fracción inicial de enzima resistente (α_R) para los vegetales

	E_{aR} (J/mol) (DE)	E_{aL} (J/mol) (DE)	α_R % (DE)
Repollito Bruselas	$5,63 \times 10^4$ ($2,98 \times 10^3$)	$6,25 \times 10^4$ ($1,87 \times 10^3$)	25,019 (0.976)
Brócoli	$7,17 \times 10^4$ ($2,46 \times 10^3$)	$7,18 \times 10^4$ ($3,44 \times 10^3$)	21,160(0.540)

CONCLUSIONES

Se midieron experimentalmente las curvas de inactivación enzimática en repollitos de Bruselas y brócoli detectando un comportamiento bifásico con presencia de dos fracciones, una termolábil y otra termoresistente.

A partir de estos resultados se calcularon las constantes de inactivación de cada fracción en ambos vegetales y mediante regresiones no-lineales se pudieron calcular las energías de activación. Asimismo se determinó la fracción inicial de cada isoenzima en ambos vegetales y la composición proximal.

La determinación de la cinética de inactivación enzimática de POD en crucíferas es de importancia ya que estas permiten su acoplamiento a ecuaciones diferenciales de transferencia de energía para el cálculo de tiempos de procesamiento térmico industrial. Estos modelos de simulación ayudan a la optimización de cada etapa del proceso, calentamiento y congelación, generando un producto alimenticio que cumpla con las condiciones mínimas de inactivación enzimática conservando los beneficios nutricionales y sensoriales para el consumo humano.

Bibliografía

- AOAC (1990). Official methods of analysis of association of official analytical chemists (15th ed. p. 74 (976.06)). K. Helrich (Ed.). Arlington, VA, USA.
- Arabshahi, A y Lund, D. (1984). Considerations in calculating kinetic parameters from experimental data. *Journal of Food Process Engineering* (7) 239-251.
- Bottcher, H. (1975). Enzyme activity and quality of frozen vegetables. Part I. The residual activity of peroxidase. *Die Nahrung* 19, 173.
- Burnette, F. (1977). Peroxidase And Its Relationship To Food Flavor And Quality: A Review. *Issue Journal of Food Science*, 42, 1-6.
- Campas, O. (2009). Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano). *Archivos Latinoamericanos De Nutricion*, 1(59), 95-100.
- Chen AO, Whitaker JR. (1986). Purification and characterization of a lipoxigenase from immature English peas. *J Agric Food Chem* 34(2): 203-211.
- Ling A, Lund D. (1978). Determining kinetic parameter for thermal inactivation of heat-resistant and heat-labile isozymes from thermal destruction curves. *J Food Sci* 43(4): 1307-1310.
- Morales-Blancas E.F., Chandia V.E., y Cisneros-Zevallos L., (2002). Thermal Inactivation Kinetics of Peroxidase and Lipoxigenase from Broccoli, Green Asparagus and Carrots. *Journal of Food Science*, Vol. 67, Nr. 1, 146-154.
- Powers JR, Costello MJ, Leung HK. (1984). Peroxidase fractions from asparagus of varying heat stabilities. *J Food Sci* 49(6):1618-1619
- USDA-Agricultural Research Service. (2014). http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/nut_search_new.pl
- Wang Z, Luh BS. (1983). Characterization of soluble and bound peroxidases in green asparagus. *J Food Sci* 48(5):1412-1417, 1421.
- Williams, D. C., Lim, M. H., Chen, A. O., Pangborn, R. M., y Whitaker, J. R. (1986). Blanching of vegetables for freezing – which indicator enzyme to choose. *Food Technology*, 40(6), 130–140.

AGRADECIMIENTOS: Los autores agradecen la contribución a este trabajo de las siguientes Instituciones: Universidad Nacional de La Plata, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT)