

SIMULACIÓN NUMÉRICA DEL PROCESAMIENTO INTEGRAL DE VEGETALES PRE-COCIDOS CONGELADOS ACOPLANDO LAS CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA DE PEROXIDASA Y LIPOXIGENASA EN LA ETAPA DE PRE-COCCIÓN

Pérez-Calderón, John (1), Califano, Alicia (1), Santos, Victoria (1-2), Zaritzky, Noemí (1-2)

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, CONICET, CIC-PBA, Argentina.

(2) Depto. de Ingeniería Química- Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Dirección postal: 47 y 116 (CP. 1900)

mvsantosd@gmail.com, zaritzkynoemi@gmail.com

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia de las Brassicacea conocidas comúnmente como crucíferas se encuentra una gran cantidad de especies; entre ellas los repollitos de Bruselas (*Brassica oleracea gemmifera*), estos vegetales poseen importantes beneficios para la salud ya que son alimentos ricos en fibra, compuestos antioxidantes como polifenoles, ácido ascórbico (Vitamina C) y anticancerígenos como glucosinolatos (Fahey y col., 2001). Estos compuestos ayudan a retrasar el envejecimiento celular, a prevenir ciertas enfermedades como el cáncer, además de reducir el colesterol sanguíneo. En la actualidad es frecuente encontrar alimentos listos para el consumo "Ready to eat" siendo los vegetales pre-cocidos congelados un segmento importante del mercado. Los vegetales congelados requieren en general de un proceso previo de cocción para que puedan ser conservados correctamente. Los repollitos de Bruselas contienen enzimas como lipoxigenasa (LOX) y peroxidasa (POD) responsables de su deterioro aun cuando son conservados congelados. POD es utilizada frecuentemente como indicadora del proceso dada su estabilidad térmica; por otro lado la presencia de LOX está asociada a modificaciones indeseables de olor y sabor. La completa inactivación de estas enzimas implica pérdida de atributos de calidad debido a una sobre-cocción. Para establecer tiempos adecuados de pre-cocción a nivel industrial, la simulación computacional aplicada a procesos de transferencia de energía es fundamental para la optimización del proceso. Las constantes cinéticas de inactivación enzimática y sus energías de activación son parámetros necesarios para determinar tiempos óptimos de tratamiento térmico. En este sentido los objetivos del trabajo son: a) determinar la cinética de inactivación de las enzimas POD y LOX, b) acoplar las cinéticas de inactivación a modelos numéricos de transferencia de energía para simular computacionalmente la etapa de pre-cocción, c) establecer los cambios en parámetros de calidad luego del almacenamiento congelado d) analizar la relación que existe entre los atributos de calidad y la actividad enzimática residual para optimizar el proceso.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Preparación del extracto enzimático e inactivación enzimática

Se preparó un extracto enzimático a partir del vegetal fresco, esto se llevó a cabo pesando 30 g para la determinación de LOX y 1.5 g para POD de la muestra vegetal, luego esta se homogeneizó en un buffer de fosfato de potasio (0.2 M pH 6.5 a 4°C), posteriormente 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 y una velocidad de 18000 x g usando centrifuga Beckman Avanti modelo J-25 (Beckman Instruments Inc., U.S.A) con un rotor JA-2550. El sobrenadante se dispuso en microtubos de plástico de 2 µL. Para el ensayo de la cinética de inactivación se sumergieron los microtubos en un baño termostático a diferentes temperaturas de calentamiento (70-90°C) extrayéndolos cada 10-20 segundos (tiempo máximo 400s); las muestras retiradas del calentamiento se enfriaron rápidamente en un baño hielo-agua (0°C), cada ensayo de

inactivación enzimática se realizó por duplicado. La Actividad Enzimática (AE) se determinó por espectrofotometría, mezclando 120 μL del extracto enzimático con 3.5 mL de sustrato específico de acuerdo a la enzima estudiada; para POD se analizó según Morales-Blancas y col., (2002) formulando el sustrato con 0.1 mL de peróxido de hidrogeno (30% m/v), 0.1 mL de guayacol (99 % m/v) y completando el volumen a 100 mL con buffer de fosfato de potasio 0.1 M pH 6,5. Para la LOX se utilizó el método descrito por Morales-Blancas y col., (2002) en el cual el sustrato fue preparado mezclando 78.6 μL de ácido linoleico (>98%), 78.6 μL de Tween-20 y 10 mL agua destilada. La solución es clarificada agregando 1 mL de NaOH 1M, se completó el volumen a 100 mL con buffer de fosfato de potasio 0.2 M pH 6.5. La AE se midió a través del cambio de la absorbancia a 470 nm para POD y 234 nm para LOX.

2.2 Cinéticas de inactivación enzimática

Se adoptó el modelo de Ling y Lund (1978) para analizar las cinéticas de inactivación enzimáticas de las fracciones de isoenzimas con distinta estabilidad térmica (fracciones lábil y resistente) suponiendo que cada fracción sigue una reacción de primer orden. Este comportamiento se expresa matemáticamente como:

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

donde t es el tiempo (s) de calentamiento a temperatura constante, Co_L y Co_R son las concentraciones iniciales de la isoenzima termolábil y termoresistente en unidades de actividad enzimática (AE/g seco), y k_L y k_R son constantes de reacción de inactivación térmica (1/s). Según el método de Ling y 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 en la **Ec.1** el término $e^{-k_L t}$ tiende a cero, obteniendo la **Ec.2**.

$$\%AE = \frac{Co_R}{Co_R + Co_L} \cdot e^{-k_R t} \quad (2)$$

Se define la fracción de la isoenzima resistente α_R como:

$$\alpha_R = \frac{Co_R}{Co_R + Co_L} \quad (3)$$

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 ecuación:

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

donde α_L es la fracción porcentual de la isoenzima lábil. Al aplicar logaritmo natural a las **Ecs. 2 y 4** y regresionando utilizando ORIGIN 8.0 y SYSTAT12 se calculó α_R , k_R , k_L a cada temperatura (Yamamoto y col., 1961). Según la ley de Arrhenius las constantes pueden ser descriptas como:

$$k = k_{REF} \cdot e^{\frac{-E_a}{R} \left(\frac{T_{REF} - T}{T_{REF} \cdot T} \right)} \quad (5)$$

donde T es Temperatura (K), k_{REF} es la constante de reacción de referencia a una temperatura determinada (T_{REF}) la cual corresponde 353 K, R es la constante de los gases ($R=8.31 \text{ J/mol K}$), E_a es la energía de activación (J/mol) de la isoenzima lábil o resistente. Insertando la **Ec. 5** en la **Ec. 2 y 4**, luego aplicar logaritmo natural resulta:

$$\text{Ln}(\%AE) = \text{Ln}(\alpha_R) - t \cdot k_{R REF} - e^{\frac{-E_{aR}}{R \cdot T} \left(\frac{T_{REF} - T}{T_{REF} \cdot T} \right)} \quad (6)$$

$$\text{Ln}(\%AE - \alpha_R) = \text{Ln}(\alpha_L) - t \cdot k_{L REF} - e^{\frac{-E_{aL}}{R \cdot T} \left(\frac{T_{REF} - T}{T_{REF} \cdot T} \right)} \quad (7)$$

En las **Ecs. 6 y 7** $k_{R REF}$ y $k_{L REF}$ son las constantes reacción de referencia de la fracción resistente y lábil respectivamente. E_{aL} y E_{aR} son las Energías de activación de la isoenzima

lábil y resistente, respectivamente. Al aplicar una regresión no-lineal de las Ecs. 6 y 7 utilizando todos los valores de %AE, tiempos y temperaturas se incrementaron significativamente los grados de libertad obteniendo valores de E_a , y desviación estándar adecuados lo cual permitió calcular los correspondientes intervalos de confianza (Arabshahi y Lund, 1985).

2.3 Modelado matemático de transferencia de energía

Se desarrolló un código en elementos finitos para resolver la ecuación a derivadas parciales de conducción de calor en estado transiente (Ec.8) incorporando propiedades térmicas dependientes de la temperatura.

$$\rho(T) \cdot C_p(T) \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \cdot (k(T) \nabla T) \quad (8)$$

En base al modelo bifásico de Ling y Lund (1978) se definen las concentraciones de isoenzima lábil y resistente a $t=0$ y a un tiempo t durante el tratamiento térmico como:

$$C_0 = C_{0R} + C_{0L} \quad (9) \quad C = C_R + C_L \quad (10)$$

donde C_{0L} y C_{0R} son la concentración inicial de enzima lábil y resistente respectivamente.

Se integraron las ecuaciones que describen el comportamiento bifásico de las dos isoenzimas térmicamente diferentes teniendo en cuenta la temperatura en función del tiempo y la posición dentro del alimento $T(r,z,t)$ obteniendo:

$$\frac{C_L}{C_{0L}} = \exp(-k_{LREF} \int_0^{tp} \exp\left(\frac{E_{aL}}{R} \left[\frac{1}{T(r,z,t)} - \frac{1}{T_{REF}}\right]\right) dt) \quad (11)$$

$$\frac{C_R}{C_{0R}} = \exp(-k_{RREF} \int_0^{tp} \exp\left(\frac{E_{aR}}{R} \left[\frac{1}{T(r,z,t)} - \frac{1}{T_{REF}}\right]\right) dt) \quad (12)$$

La concentración media de cada tipo de enzima a cada tiempo se calcula como:

$$\bar{C}_L = \frac{\int_V C_L(r,z,t) dV}{\int_V dV} \quad (13) \quad \bar{C}_R = \frac{\int_V C_R(r,z,t) dV}{\int_V dV} \quad (14)$$

Además se cumple que en promedio en todo el alimento la concentración media total es:

$$\bar{C} = \bar{C}_R + \bar{C}_L \quad (15)$$

De esta manera es posible estimar la concentración media de las enzimas en todo el vegetal, es decir de la fracción lábil, resistente y total en el alimento. Las integrales involucradas en cada etapa se evaluaron numéricamente; para integrar en el tiempo se utilizó la regla del trapecio y para la integral de volumen se utilizó la regla de cuadratura para triángulos.

2.4 Ensayo durante el almacenamiento congelado

Se realizó un ensayo de almacenamiento congelado de repollitos de Bruselas durante 4 meses, para este fin se seleccionaron muestras del vegetal con un tamaño uniforme. El peso promedio de los repollitos fue de 17.8 ± 0.9 g, y sus dimensiones promedio fueron: ancho de 30.1 ± 1.1 mm y 44.2 ± 1 mm de altura. La pre-cocción de los repollitos de Bruselas se llevó a cabo en un baño de agua termostático Techne Modelo FTE-10DDC (Bibby-científica Ltda, Stone Staffordshire, Reino Unido) a 90 °C. Las muestras se retiraron del baño a los 3, 6 y 10 minutos e inmediatamente se sumergieron en un baño de agua/hielo. Posteriormente se mantuvieron congelados durante 4 meses a -20 °C.

Se realizó la determinación de la actividad enzimática para POD y LOX, cantidad de ácido ascórbico (AA) y variación del color de las muestras de los repollitos después del tratamiento de pre-cocción (AAC) y al finalizar el almacenamiento congelado (DAC). Para los parámetros se obtuvo datos del interior del repollito (zona apical) como para de las hojas exteriores (zona exterior). Los cambios de color durante el almacenamiento congelado fueron determinados usando un colorímetro Konica Minolta CR-400 (Osaka, Japón) utilizando el espacio CIELab definido por tres coordenadas colorimétricas L^* , a^* , b^* . A partir

de estas coordenadas se calculó ángulo hue (h°) y el índice de pardeamiento (BI)

$$h^\circ = 180 + \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad BI = \frac{[100(x-0.31)]}{0.172} \quad \text{siendo } x = \frac{(a^*+1.75 L^*)}{(5.645 L^*+a^*-3.012 b^*)} \quad (16)$$

La determinación del contenido de AA en las muestras de repollito de Bruselas se llevó a cabo realizando extractos de la muestra vegetal en ácido metafosfórico al 5% p/v; la cuantificación se llevó a cabo en un equipo Waters de HPLC (Waters 1525 Binary HPLC Pump; Detector UV-Waters 2998). Las separaciones se llevaron a cabo con una columna RP-C18 columna 4.6x150 mm, 5 μ m (Waters, Milford, MA, USA), se usó un detector UV-Visible una longitud de onda de 245 nm. Se utilizó como fase móvil una solución isocrática de ácido metafosfórico al 0.5% (p/v) mezclada con acetonitrilo en una proporción de 93:7 respectivamente. Al finalizar el almacenamiento se realizó la evaluación de los atributos sensoriales. Esta prueba de aceptabilidad se llevó a cabo utilizando una escala hedónica de 9 puntos para determinar el nivel de agrado del producto final, este tipo de prueba se analiza mediante análisis de varianza y comparaciones de medias por parte de los atributos estudiados de las muestras (Lawless y Heymann, 2010).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Composición proximal y propiedades térmicas: Siguiendo la metodología descrita por la AOAC (2010) la composición proximal fue: humedad 83.54% \pm 0.58, proteína 3.20% \pm 0.06, lípidos 0.36 % \pm 0.02, cenizas 1.19 % \pm 0.02 y carbohidratos por diferencia 11.74% (valores corresponden al valor promedio con los correspondientes intervalos de confianza). La conductividad térmica y la densidad global determinadas fueron 0.614 W/m²K y 1.023x10³ Kg/m³ respectivamente según el modelo expuesto por Choi y Okos (1986).

3.2 Cinética de inactivación enzimática: Se obtuvieron las curvas experimentales del porcentaje de enzima residual (%AE) vs tiempo a distintas temperaturas de calentamiento (75-90°C), detectando la presencia de isoenzimas termo-lábiles y termo-resistentes para ambas enzimas (POD y LOX). En la **Fig.1a,b** se muestran las curvas de inactivación enzimática. Este comportamiento bifásico se ha observado en brócoli para ambas enzimas (Morales-Blancas y col., 2002), no existen datos reportados hasta el momento para repollitos de Bruselas. A partir de las curvas inactivación enzimática y mediante regresiones no lineales se obtuvieron las constantes de inactivación enzimática usando las **Ecs.2** y **4** a diferentes temperaturas para las dos enzimas estudiadas.

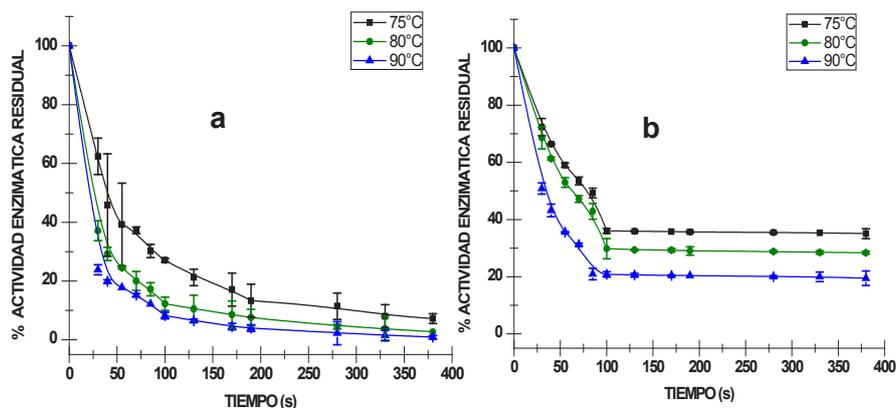


Figura 1. Curvas de inactivación enzimática de repollitos de Bruselas a diferentes temperaturas y tiempos para (a) Peroxidasa (b) Lipoxigenasa. Las barras de error muestran el intervalo de confianza ($p=0.05$) de los datos experimentales.

En la **Tabla 1** se pueden observar los valores obtenidos. Las energías de activación de cada una de las dos fracciones en el vegetal se determinaron en base a las **Ecs.6** y **7**.

Tabla 1. Constantes cinéticas de inactivación enzimática de POD y LOX en repollitos de Bruselas para cada fracción termoresistente y termolábil. Los datos reportados son el valor estimado de la regresión, su correspondiente desviación estándar en paréntesis y el coeficiente de correlación (R^2) obtenido de la regresión

T (°C)	POD					LOX			
	k_L ($\times 10^{-2} s^{-1}$) n= 10	R^2	k_R ($\times 10^{-3} s^{-1}$) n= 14	R^2		k_L ($\times 10^{-2} s^{-1}$) n= 8	R^2	k_R ($\times 10^{-4} s^{-1}$) n= 16	R^2
75	3.11 (0.21)	0.95	3.85 (0.36)	0.93		1.85 (0.02)	0.99	0.80 (0.04)	0.98
80	4.24 (0.42)	0.92	5.37 (0.15)	0.98		2.05 (0.02)	0.99	1.61 (0.16)	0.89
90	7.87 (0.18)	0.99	7.47 (0.24)	0.98		2.80 (0.06)	0.98	2.14 (0.18)	0.90

En la **Tabla 2** se muestran los resultados de las energías de activación y la fracción inicial de enzima resistente (α_R) para los dos enzimas.

Tabla 2. Energías de activación y fracción inicial de enzima resistente (α_R) para las dos enzimas. Los datos reportados son valor estimado de la regresión, su correspondiente desviación estándar en paréntesis y el coeficiente de correlación (R^2) obtenido de la regresión.

	E_{aL} (kJ/mol)	R^2	E_{aR} (kJ/mol)	R^2	$\alpha_R\%$
POD	62.5(1.9) n=30	0.97	56.3(3.0) n=38	0.92	25.02 (1.04)
LOX	65.8 (4.5) n=26	0.97	63.7 (2.8) n=20	0.96	30.97(1.03)

3.3. Modelado matemático del tratamiento térmico

La transferencia de energía durante el tratamiento térmico se simuló numéricamente, para esto se resolvió la **Ec.8** a derivadas parciales en estado no estacionario, mediante el método de los elementos finitos en Matlab acoplado la cinética de inactivación térmica de POD y LOX al programa principal. Los repollitos de Bruselas tienen una geometría irregular que puede asimilarse a un sólido de revolución. Se tomaron imágenes digitales de cada muestra a procesar para obtener el contorno irregular para luego generar la superficie de revolución y la estructura general de la malla en nodos y elementos triangulares. En la **Fig. 2** se puede observar la imagen digital, su contorno irregular y discretización en elementos triangulares. Las predicciones numéricas concordaron satisfactoriamente con los resultados experimentales para los procesos térmicos a los cuales fueron sometidos los vegetales. El desvío estándar promedio (root mean square error= RMSE) calculado mediante la ecuación: $RMSE = \sqrt{\frac{\sum (T_{exp} - T_{pred})^2}{N}}$, donde N es el número de datos, fue de 2.47°C. En la **Fig.**

2 se representan las temperaturas predichas por el modelo numérico y la temperaturas registradas con el adquisidor para uno de los experimentos realizados (temperatura baño termostático 85°C), como puede observarse existe una excelente concordancia. En la **Fig. 3 a** y **b** se muestran las predicciones numéricas del modelo desarrollado en el presente trabajo, que indican las variaciones de la concentración media de las enzimas POD y LOX en todo el vegetal y sus fracciones lábil y resistente en función del tiempo de calentamiento a 85°C.

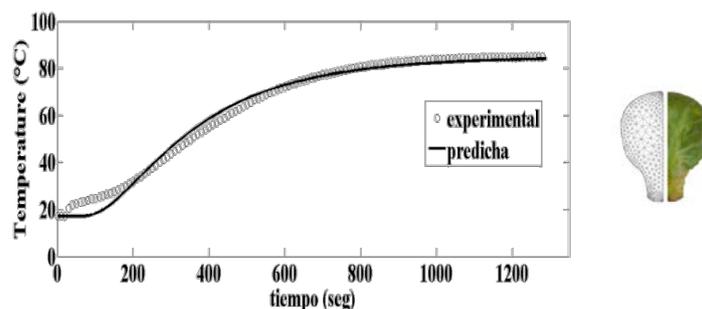


Figura 2. Temperaturas experimentales y predichas por el modelo durante el tratamiento térmico. Posición de la termocupla $r=0$, $z=25 \times 10^{-3}$ en metros. Temperatura del agua 85°C

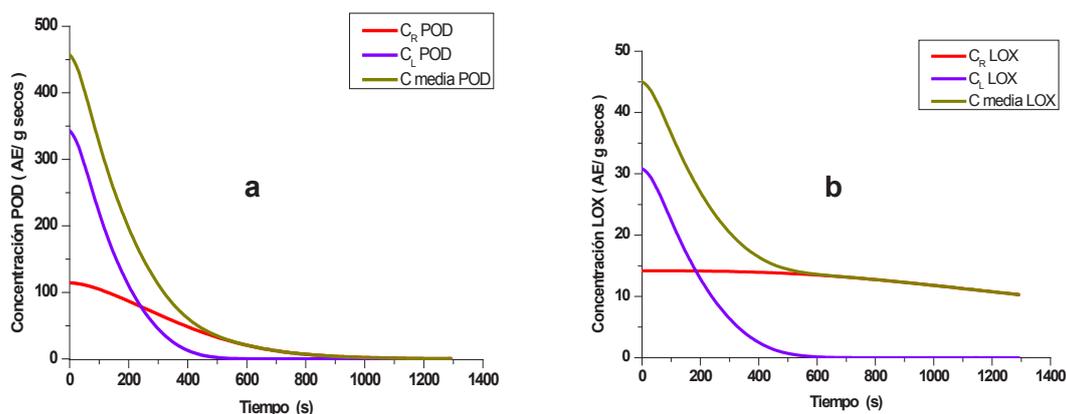


Figura 3. Inactivación de enzima total (curva verde), fracción lábil (curva azul) y resistente (curva roja) expresada como AE/g producto seco; (a) POD (b) LOX

3.4 Evaluación de atributos calidad posterior al almacenamiento congelado

Se evaluaron atributos de calidad luego de la pre-cocción y posterior al almacenamiento congelado a -20°C durante 4 meses. Se analizó el efecto del %AE en los cambios de color y el contenido de ácido ascórbico en la zona interna (apical) y en la capa exterior del vegetal. En el caso de tiempos cortos de pre-cocción a alta temperatura (3 minutos- 90°C) se observó una reactivación enzimática del POD después del almacenamiento que pudo ser relacionada directamente con un incremento en el pardeamiento del vegetal. Estas muestras fueron descartadas para el análisis sensorial debido a sus alteraciones enzimáticas luego del almacenamiento. De la prueba sensorial se obtuvo que para los atributos analizados (Aceptabilidad general, color interno, color externo, aroma y textura) los repollitos de Bruselas pre-cocidos congelados obtuvieron buena aceptabilidad sensorial. Los evaluadores no detectaron olores indeseables, cuyo origen puede atribuirse a la acción de la LOX que genera hidroperóxidos y compuestos volátiles. Esto permite afirmar que los repollitos pre-cocidos congelados y almacenados presentaron características óptimas de calidad.

4. CONCLUSIONES

Se determinaron experimentalmente los parámetros cinéticos de inactivación enzimática en repollitos de Bruselas para la POD y LOX detectando un comportamiento bifásico (fracción termolábil y termo-resistente). Se calcularon las constantes de inactivación de cada fracción en ambas enzimas y mediante regresiones no-lineales se obtuvieron las energías de activación y la fracción inicial de isoenzima termolábil y termoresistente. Se modeló matemáticamente el proceso de calentamiento en del vegetal acoplado las cinéticas de inactivación enzimática lo cual permitió el cálculo de la concentración media de las enzimas después de distintos tratamientos térmicos. Se observó reactivación enzimática después del

almacenamiento congelado a tiempos cortos de calentamiento. Mediante estudios sensoriales y de parámetros de calidad, se determinó que el tiempo óptimo de pre-cocción de 6 minutos a 90°C logra una inactivación enzimática adecuada para obtener un vegetal pre-cocido congelado de alta calidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Arabshahi, A y Lund, D. (1984). Considerations in calculating kinetic parameters from experimental data. *J of Food Pro Engineering*: 239-251.
- Choi, Y. y Okos, M. R. (1986). *Food Engineering and Process Applications*, Vol. 1. Transport Phenomena, L. Maguer and P. Jelen (eds.) Elsevier, New York: 93-101.
- Fahey, J.W, Zalcmann, T y Talalay, P. (2001). "The Chemical Diversity and Distribution of Glucosinolates and Isothiocyanates Among Plants." *Phytochemistry*: 5-51.
- 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*: 146-154.
- Lawless, H. T. y Heymann, H. (2010). Acceptance Testing. En *Sensory evaluation of food: principles and practices* (2nd ed., pp. 325-336). London: Springer Science y Business Media.
- 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*: 1307-1310.
- Yamamoto H.Y., Steinberg M.P. y Nelson A.I. (1962). Kinetic studies on the heat inactivation of peroxidase in sweet corn. *J Food Sci* :113-119.