

# ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PEROXIDASA EN TOMATE DE ARBOL (*Solanum betaceum* Cav.)

## STANDARDIZATION OF PROTOCOL TO EVALUATE PEROXIDASE ACTIVITY IN TREE TOMATO (*Solanum betaceum* Cav.)

Margareth Santander M.<sup>1</sup>, Diego Mejía E.<sup>2</sup>, Oswaldo Osorio M.<sup>3</sup>

Recibido para publicación: Marzo 23 de 2013 - Aceptado para publicación: Diciembre 02 de 2013

### RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue obtener un protocolo de análisis de la actividad enzimática de Peroxidasa (POD) en pulpa de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). Se evaluaron variables en el proceso de extracción como: el porcentaje de pulpa (PP), de 20 a 50% y el tiempo de centrifugación (TC) de 10 a 30 minutos; mientras que en la medición se varió el volumen de extracto (VE), de 30 a 90 L. Se utilizó un diseño experimental de composición central 23 más puntos estrellas y puntos centrales con metodología de superficie de respuesta con dos repeticiones y un total de 32 unidades experimentales. Para la optimización, la mayor actividad enzimática se presentó empleando un PP de 60%, un TC de 34 min y un VE de 110 µl.

**Palabras clave:** Enzimas, actividad peroxidasa, frutales, pulpa, protocolo.

### ABSTRACT

The aim of this research was to obtain an analysis protocol of the enzymatic activity of Peroxidase (POD) in tree tomato pulp (*Solanum betaceum* Cav.). Variables were evaluated in the extraction process as the percentage of pulp (PP), of 20 to 50% and the centrifugation time (CT) of 10 to 30 min, while in the measurement was varied extract volume (EV) of 30 to 90 L. It was used an experimental central composite design 23 more star points and center points with response surface methodology replicated twice for a total of 32 experimental units. For optimization, the highest enzyme activity is presented using a PP of 60%, a CT of 34 min and a VE of 110 µl.

**Key words:** Enzymes, peroxidase activity, fruit, pulp, protocol

<sup>1</sup>Ingeniera Agroindustrial. Grupo de Investigación TEA. Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. marguis\_santander@hotmail.com

<sup>2</sup>Profesor asistente. Ingeniero Agroindustrial. M.Sc. Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. diegomejiaespana@gmail.com

<sup>3</sup>Profesor asociado. Ingeniero Agroindustrial. Ph. D. Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. osorio\_oswaldo@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

En Colombia el cultivo de tomate de árbol es importante, no solo por lo que representa para la seguridad alimentaria, sino por la generación de mano de obra para las labores del cultivo, transporte, comercialización y transformación agroindustrial, que se traduce en mejor calidad de vida para los actores vinculados de manera directa o indirecta a dichas actividades (Jaramillo 2003).

En el Departamento de Nariño el tomate de árbol es uno de los frutales andinos con mayor potencial de industrialización, debido a que se cuenta con la materia prima disponible para ello; es así como en el Consolidado Agropecuario de Nariño (2012) se reporta que el área sembrada fue 391,8 ha, con una producción de 2117,6 t., pero debido a su naturaleza perecedera, los frutos de tomate de árbol deben someterse a alguna forma de conservación con el fin de que estén disponibles para su consumo por tiempos prolongados.

Es así como el procesamiento agroindustrial es una alternativa para mantener las características deseables de un alimento por tiempos prolongados; además es un requisito previo para varios productos alimenticios a fin de mejorar su palatabilidad y digestibilidad (Zhao y Chang 2008). Sin embargo, aunque los tratamientos térmicos ayudan a preservar las características deseables de un alimento mediante la disminución de la velocidad de las reacciones enzimáticas, la senescencia y crecimiento microbiano, no detienen totalmente estos procesos (Bahçeci et al. 2005).

Es conocido el hecho que la presencia de

enzimas endógenas en frutas y vegetales crudos o procesados puede ocasionar pérdida de calidad durante el almacenamiento (Anthon y Barrett 2002), como resultado puede observarse el desarrollo de malos olores, pérdida de color, sabores desagradables, cambios en la textura y pérdida de nutrientes (Cruz et al. 2006).

Por lo tanto, es necesario monitorear el tratamiento térmico aplicado para determinar el grado de inactivación alcanzado tras el proceso; como indicador se utiliza comúnmente a POD (EC 1.11.1.7, donante: hidrógeno-peróxido oxidoreductasa) debido a su alta concentración en diversos tejidos vegetales y su alta termo resistencia (Hiner et al. 2002). Esta enzima es considerada la más termoestable en plantas y tras un mal proceso, puede ganar actividad nuevamente durante el almacenamiento (Lee et al. 1984).

Por ello, la inactivación de POD en pulpa de tomate de árbol, se podría utilizar como un indicador de la efectividad del tratamiento térmico debido a su termo resistencia (Civello et al. 1995; Anthon et al. 2002) y con su posible relación con la producción de sabores desagradables, colores indeseados y pérdidas de nutrientes en productos hortofrutícolas crudos, congelados y sin escaldar (Ercan y Soysal 2011). Si esta enzima se inactiva, otros sistemas enzimáticos responsables de la degradación de los tejidos también se desactivarán (Agüero et al. 2008).

Es importante resaltar la necesidad de caracterizar las enzimas de cada fruta individualmente, ya que los resultados reportados en la literatura, tanto de cinética como de inactivación de diferentes fuentes de

extracto enzimático en frutas y hortalizas, son diferentes y por lo tanto no se puede asumir que el comportamiento de las enzimas sea igual en todas las matrices alimenticias (Durango et al. 2007).

Los estudios sobre la cinética enzimática, han demostrado que ésta es única para cada vegetal, especie y variedad (Agüero et al. 2008). Por tanto los protocolos de análisis de actividad enzimática varían para los diferentes productos hortofrutícolas. De esta manera, el objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo de extracción y medición de actividad POD en pulpa de tomate de árbol para poder aplicarlo en la evaluación de la eficiencia de tratamientos térmicos empleados para su conservación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización.** El presente trabajo se realizó en la Planta Piloto adscrita a la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Nariño, localizada a 1°14' 00" latitud norte y 77°18' 00" longitud oeste, a 2506m.s.n.m, con una temperatura promedio de 20°C y humedad relativa de 75% (software android GPS navigator 2.06).

**Materia Prima.** Se utilizó tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) variedad rojo común en grado óptimo de madurez comercial, proporcionado por la empresa INPADENA dedicada a la obtención de pulpas en el Municipio de Pasto.

**Obtención de pulpa.** Los frutos fueron seleccionados y clasificados conforme a la NTC 4105 (ICONTEC 1997) por su estado de madurez

comercial; se lavaron con agua potable y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio a 50 ppm (0,005%) durante 5 minutos. Posteriormente los frutos fueron enjuagados, troceados y homogenizados empleando una despulpadora industrial Comek 500. La pulpa obtenida fue almacenada bajo condiciones de congelación (-23°C) hasta su uso.

**Análisis fisicoquímico.** La caracterización del material fue realizada por el Laboratorio de Bromatología de la Universidad de Nariño, empleando métodos descritos para el análisis químico de alimentos basados en las técnicas de la AOAC (AOAC 1997). De esta manera, la pulpa de tomate de árbol fue utilizada en fresco y se determinó pH, sólidos solubles totales, acidez titulable, índice de madurez, humedad, cenizas, fibra cruda, proteína cruda, vitamina C y carbohidratos totales.

**Determinación de la actividad enzimática.** La metodología de análisis de actividad POD se divide en dos partes: en la primera se presenta la extracción y en la segunda la medición de actividad de la enzima. Durante la extracción se empleó un buffer con un pH y una concentración que contribuyen a mantener POD en sus condiciones óptimas y también se llevó a cabo un proceso de separación para aislar los sólidos del material de la enzima de interés, la cual se ubica en el sobrenadante y también con el fin de lisis de las células para liberar la enzima (Roe 2001). En la medición se monitoreó la evolución en el tiempo del cambio de absorbancia a 470 nm tras la oxidación del sustrato (Guayacol) catalizado por POD en presencia de peróxido de hidrógeno (Thongsook y Barrett 2005).

### **Metodología de extracción de la enzima.**

Las muestras se prepararon para el análisis mediante la mezcla en tubos de centrifuga de 15 mL de los volúmenes determinados en la matriz experimental que representaron la cantidad de pulpa y de buffer fosfato de sodio de concentración 0,05 M y pH 6,5, empleados en cada ensayo. Las muestras fueron centrifugadas en un equipo Universal 320 marca Hettich en un rango de tiempo de 10 a 30 minutos. El precipitado se descartó y el sobrenadante constituyó el extracto enzimático que fue utilizado inmediatamente para la determinación de la actividad POD.

Basándose en los trabajos de Roe (2001) y Gonzales et al. (2000) se mantuvieron algunos parámetros constantes como el buffer para la extracción y medición que correspondió a fosfato de sodio, debido a que no interfiere con la función enzimática y es uno de los más comúnmente empleados. Además de la concentración del buffer de extracción y medición, la cual se determinó en las utilizadas típicamente que según Roe (2001) están entre 10 a 50 mM,

Dado que el interior de las células vegetales comúnmente tienen un pH entre 6-8, rango empleado en varios estudios realizados en mora (*Rubus glaucus* Benth.) (González et al. 2000), sagu (*Cycas revoluta* Thunb.) (Onsa et al. 2004), marula (*Sclerocarya birrea* A. Rich. Hochst.) (Mdluli 2005), paprika (*Capsicum annuum* L.) (Schweiggert et al. 2005), hojas de siam (*Senna siamea* (Lam.) H.S.) (Rani y Abraham 2006), raíces de nabo (*Brassica rapa* L.) (Duarte et al. 2003), uvas (*Vitis vinífera* L.) (Fortea et al. 2009), brócoli (*Brassica oleracea* L.) (Thongsook y Barrett 2005), zanahorias (*Daucus carota* L.)

(Anthon y Barrett 2002), fresas (*Fragaria vesca* L.) (Martínez et al. 2001; Civello et al. 1995), se empleó un pH de extracción y medición de 6,5. La velocidad de centrifugación se estableció basándose en que la técnica de disrupción seleccionada no debe ser más vigorosa que la requerida para causar ruptura en las células, ya que puede causar la inactivación de las enzimas una vez liberadas (Roe 2001). Por tanto, se consideró que 10.000 rpm son suficientes para alcanzar una lisis que provocara la liberación de los contenidos celulares, la cual provee rendimientos más altos de POD.

Los factores evaluados fueron la relación entre la cantidad de Pulpa y Buffer fosfato de 1:1 a 1:4 (PP=20 a 50% de pulpa) y el TC de 10 a 30 minutos.

### **Metodología de medición de la actividad**

**POD.** Para el análisis de la actividad de POD se utilizó una solución sustrato que se preparó diariamente y se realizó con la mezcla de 0,1 mL de guayacol (99,5%), 0,1 mL de peróxido de hidrógeno (30%), y 99,8 mL de buffer fosfato de sodio 0,2 M y pH 6,5 (Morales et al. 2006). Los ensayos de actividad POD se llevaron a cabo haciendo variar el VE en un rango de 30 a 90 L. De esta forma se mezclaron los volúmenes de extracto enzimático y de la solución sustrato que se establecieron en la matriz experimental en cubetas del espectrofotómetro, manteniendo constante el volumen total en 2,5 mL. El blanco se preparó de la misma forma pero empleando agua destilada en lugar del extracto enzimático. La muestra y el blanco se agitaron y se colocaron en un espectrofotómetro Thermo Genesys con escaneo de 6 celdas. De acuerdo a la metodología de Rudra et al. (2008), se tomaron lecturas de absorbancia a

470 nm cada 30 segundos y durante un total de 30 minutos y los datos obtenidos fueron analizados empleando el programa Visual Lite. Además, la actividad enzimática se determinó a partir de la pendiente de la línea recta que se originó hasta los 10 minutos transcurridos de la curva de ajuste, por tanto, la unidad de actividad POD se define como el cambio de absorbancia por minuto ( $\Delta DO/min$ ).

**Diseño Experimental.** Se utilizó un diseño compuesto central (DCC) 23 más puntos estrella y puntos centrales con metodología de superficie de respuesta, para determinar el efecto de los factores, sobre la actividad enzimática de Peroxidasa. Resultaron 32 corridas, incluyendo 2 puntos centrales por bloque.

**Análisis de datos.** El análisis de resultados fue realizado empleando el programa Statgraphics Centurion© Plus versión XV.II. Se realizó un análisis de varianza empleando la Prueba de Rangos Múltiples, LSD de Fisher al 95% de confiabilidad; se obtuvo también

la óptima respuesta, el diagrama de Pareto, el gráfico de efectos principales, el gráfico de interacción y de superficie de respuesta.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación de las características fisicoquímicas y evaluación de la actividad enzimática residual de POD de la pulpa.

En el análisis fisicoquímico (Tabla 1), se observan valores similares a los reportados en estudios previos, así como también variaciones, las cuales según Franco (1998) son debidas posiblemente al manejo agronómico en el cultivo, clima, suelo, variedad del fruto, entre otras.

La Tabla 2 muestra los valores promedio de actividad enzimática de POD obtenidos en los diferentes tratamientos empleados para estandarizar el protocolo de extracción y medición de POD.

El análisis de varianza (Tabla 3), muestra que seis (6) efectos son significativos ( $P < 0.05$ )

**Tabla 1.** Análisis Fisicoquímico de la pulpa de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.)

| Parámetro                      | Valor<br>(Fuente: Esta investigación) | Valor<br>(Fuente: FAO 2006) | Valor<br>(Fuente: Tabares y Velásquez 2003) | Valor<br>(Fuente: Brito et al. 2008) |
|--------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|---|--------------------------------------|
| pH a 17°C                      | 3,69 ± 0,45                           | N.R                         | 3,7   | 3,76                                 |
| °Brix a 20°C                   | 10,33 ± 1,53                          | N.R                         | 12  | 12,70                                |
| Acidez (%Ácido cítrico)        | 2,50 ± 0,20                           |                             | 1,15  | 1,87                                 |
| Índice de madurez              | 4,10 ± 0,46                           | N.R                         | N.R   | N.R                                  |
| Humedad (g/100g)               | 89,13 ± 0,50                          | 87,9                        | 85,46                                       | 87,16                                |
| Materia seca(g/100g)           | 10,87 ± 0,64                          | 12,1                        | 14,54                                       | 12,84                                |
| Cenizas (g/100g)               | 0,77 ± 0,06                           | 0,7                         | 0,82  | 0,81                                 |
| Proteína (g/100g)              | 1,46 ± 0,53                           | 1,9                         | 1,86  | N.R                                  |
| Fibra cruda(g/100g)            | 0,93 ± 0,04                           | 1,1                         | 1,20  | N.R                                  |
| Carbohidratos totales (g/100g) | 4,71 ± 0,18                           | 7,0                         | 10,03                                       | 4,49                                 |
| Vitamina C(mg/100g)            | 19,72 ± 0,20                          | 25                          | 14  | 33                                   |

NR: No reporta; ± Desviación estándar.

**Tabla 2.** Actividad enzimática promedio de cada tratamiento de POD en pulpa de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.)

| Tiempo (min) | Cantidad Pulpa (%) | Cantidad Buffer (µL) | Actividad Enzimática ( DO/min) |
|--------------|--------------------|----------------------|--------------------------------|
| 3            | 35                 | 60                   | 0,6347 ± 0,01769               |
| 10           | 20                 | 30                   | 0,06044 ± 0,00146              |
| 10           | 20                 | 90                   | 0,09183 ± 0,06503              |
| 10           | 50                 | 30                   | 0,07688 ± 0,00279              |
| 10           | 50                 | 90                   | 0,29150 ± 0,08003              |
| 20           | 10                 | 60                   | 0,07422 ± 0,04829              |
| 20           | 35                 | 10                   | 0,03662 ± 0,05039              |
| 20           | 35                 | 60                   | 0,09592 ± 0,03383              |
| 20           | 35                 | 110                  | 0,24830 ± 0,10798              |
| 20           | 60                 | 60                   | 0,13690 ± 0,03115              |
| 30           | 20                 | 30                   | 0,10504 ± 0,09578              |
| 30           | 20                 | 90                   | 0,19867 ± 0,09301              |
| 30           | 50                 | 30                   | 0,11400 ± 0,04805              |
| 30           | 50                 | 90                   | 0,29295 ± 0,00649              |
| 37           | 35                 | 60                   | 0,21488 ± 0,02256              |

± Desviación estándar.

**Tabla 3.** Análisis de Varianza para Actividad POD en pulpa de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.)

| Fuente                     | Suma de Cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | Razón-F | Valor-P |
|----------------------------|-------------------|--------------------|----------------|---------|---------|
| A:Tiempo de Centrifugación | 0,0111936         | 1                  | 0,0111936      | 59,73   | 0,0163  |
| B:Cantidad de Pulpa        | 0,026421          | 1                  | 0,026421       | 140,98  | 0,0070  |
| C:Volumen de Extracto      | 0,112017          | 1                  | 0,112017       | 597,70  | 0,0017  |
| AA                         | 0,0216384         | 1                  | 0,0216384      | 115,46  | 0,0086  |
| AB                         | 0,00318519        | 1                  | 0,00318519     | 17,00   | 0,0541  |
| AC                         | 0,000176425       | 1                  | 0,000176425    | 0,94    | 0,4343  |
| BB                         | 0,000394033       | 1                  | 0,000394033    | 2,10    | 0,2841  |
| BC                         | 0,0180304         | 1                  | 0,0180304      | 96,21   | 0,0102  |
| CC                         | 0,00577636        | 1                  | 0,00577636     | 30,82   | 0,0309  |
| Bloques                    |                   |                    |                |         |         |
| Falta de ajuste            | 0,00054971        | 1                  | 0,00054971     | 2,93    |         |
|                            | 0,0577241         | 19                 | 0,00303811     | 16,21   | 0,2289  |
| Error puro                 | 0,000374827       | 2                  | 0,000187413    |         | 0,0596  |
| Total (corr.)              | 0,254401          | 31                 |                |         |         |

(P&lt;0.05)= significativo; R-cuadrado= (87,1625%); Estadístico Durbin-Watson= (2,09278; P=0,4423)

sobre la actividad enzimática POD. Entre ellos se encuentran el tiempo de centrifugación, la cantidad de pulpa, el volumen de extracto, el cuadrado del tiempo de centrifugación, la interacción entre la cantidad de pulpa y de extracto y el cuadrado del volumen de extracto.

Además, el estadístico R-Cuadrado indica que el modelo así ajustado, explica 87,163% de la variabilidad en actividad POD, con lo que se puede deducir que el diseño cuenta con un ajuste aceptable y permite hacer análisis confiables sobre los factores implicados en la

variable respuesta.

Puesto que el P-valor del estadístico Durbin-Watson (DW) es mayor que 5,0%, se garantiza que no se presentaron problemas de autocorrelación serial en los residuos, es decir, no se hizo omisión de ninguna variable importante y los errores estándar obtenidos no presentan sesgo alguno garantizando una buena aleatorización de los experimentos.

La ecuación del modelo ajustado según los resultados obtenidos tras cada ensayo, se indica a continuación:

$$\text{Actividad POD} = 0,190804 - 0,00901715 * \text{TC} - 0,00195593 * \text{PP} - 0,00305188 * \text{VE} + 0,00034174 * \text{TC}^2 - 0,0000940625 * \text{TC} * \text{PP} + 0,0000110688 * \text{TC} * \text{VE} + 0,0000204959 * \text{PP}^2 + 0,0000745986 * \text{PP} * \text{VE} + 0,0000196185 * \text{VE}^2$$

Con esta ecuación se pueden modelar posteriores experimentos con las mismas condiciones, es decir, es válida para los rangos estudiados de los factores.

La Tabla 4 muestra la combinación de los niveles de los factores que maximizan la actividad POD sobre la región indicada, con los cuales se obtuvo un valor óptimo de actividad enzimática correspondiente a 0,48192 ΔDO/min.

Varios estudios reportan haber empleado un tiempo de centrifugación similar (30 min) para la extracción de POD en zanahoria, brócoli (Morales et al. 2006), manzanas (Jangy Moon 2011), puré de fresa (Terefe et al. 2010), berros (Cruz et al. 2006), té de mate (Ceni et al. 2008) y tomillo (Doğan y Doğan 2004).

Así mismo, el porcentaje óptimo de pulpa que maximiza la actividad POD, es similar a los trabajos de investigación llevados a cabo en uchuva, lulo (Durango et al. 2007), zanahorias (Akyol et al. 2006) y puré de fresa (Terefe et al. 2010).

Además, la cantidad óptima de extracto para medición de POD obtenida en esta investigación es similar a la reportada en calabaza (Agüero et al. 2008), (Cruz et al. 2006), brócoli, espárragos verdes (Morales et al. 2006), zanahoria (Lemmens et al. 2009), sagú (Onsa et al. 2004); guayaba (Ganjloo et al. 2009), judías verdes (Akyol et al. 2006; Soysal et al. 2004), guisantes (Akyol et al. 2006), piña (Zhou et al. 2003), berro (Cruz et al. 2006), kiwi (Fang et al. 2008), rábano (Zhong et al. 2007), hojas de menta (Rudra et al. 2008) y fresa (Chisari et al. 2007).

**Tabla 4.** Optimización de actividad Peroxidasa en pulpa de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.)

| Factor                         | Bajo  | Alto    | Óptimo  |
|--------------------------------|-------|---------|---------|
| Tiempo de Centrifugación (min) | 3,182 | 36,818  | 33,860  |
| Cantidad de Pulpa (%)          | 9,773 | 60,227  | 60,227  |
| Volumen de Extracto ( L)       | 9,546 | 110,454 | 110,454 |

En el diagrama de Pareto (Figura 1) se muestran claramente los efectos tanto significativos como no significativos de los factores, como de sus interacciones sobre la actividad enzimática.

Así mismo, indica que con un nivel de confianza del 95%, el volumen de extracto, de pulpa, el cuadrado del tiempo de centrifugación, la interacción entre la cantidad de pulpa y extracto, el tiempo de centrifugación y el cuadrado del volumen de extracto, ejercen un efecto significativamente positivo sobre la actividad enzimática, es decir que la aumentan; un leve cambio en el

volumen de extracto, causaría mayor efecto que un cambio en el tiempo de centrifugación o en la cantidad de pulpa.

Lo anterior posiblemente, debido a que al emplear casi la misma cantidad de pulpa y de buffer en la extracción, se provee de mayor cantidad de enzima a la matriz, lo cual se complementa con el uso de un volumen de extracto enzimático considerable al realizar la medición de la actividad POD. Similares resultados se obtuvieron en el estudio de Ceni et al. (2008), en el cual con el incremento de la masa del material vegetal se aumentó la



actividad enzimática. Por otra parte, en el rango de tiempo de centrifugación óptimo, hay una mayor separación entre los sólidos totales y la fase líquida de la pulpa, por tanto los primeros se precipitan y la enzima se ubica en el sobrenadante porque el pH al que se encuentra es el óptimo para permanecer en solución, facilitando la determinación de su actividad (Roe 2001).

En la Figura 2 se muestra un marcado efecto de las variables: TC, CP y VE sobre la actividad POD. Se observa claramente el efecto positivo sobre la variable de respuesta del incremento en la cantidad de pulpa, de extracto y el tiempo de centrifugación a partir de los 20 minutos, notándose que leves aumentos en estos, causan un incremento importante en la actividad POD.

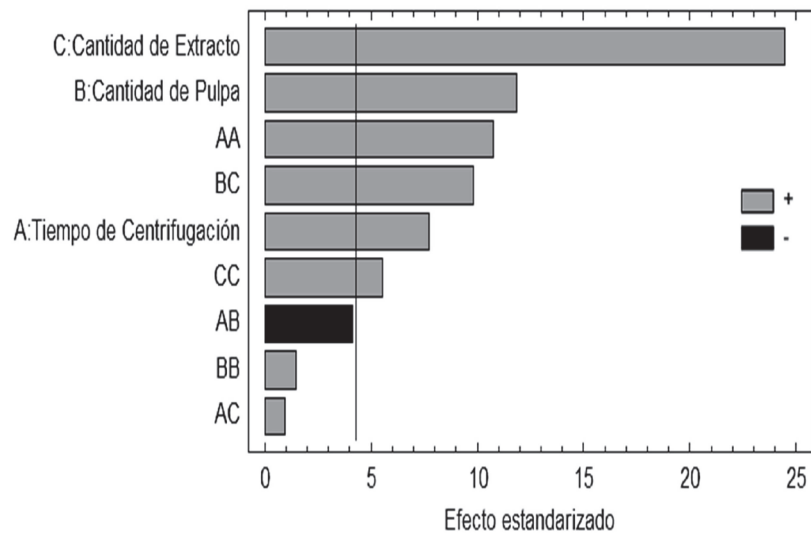


Figura 1. Diagrama de Pareto estandarizado para Actividad Enzimática de Peroxidasa en pulpa de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.).

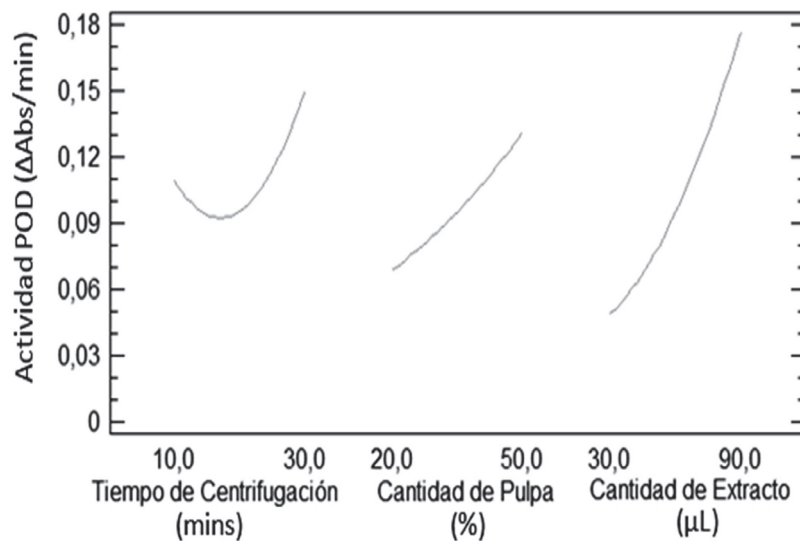


Figura 2. Efectos principales del tiempo de centrifugación, la cantidad de pulpa y el volumen de extracto sobre la actividad peroxidasa en pulpa de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.).



En el rango de tiempo de centrifugación comprendido entre los 10 y 20 min se evidenció un cambio en su comportamiento de positivo a negativo. Según Roe (2001), esto pudo ser causado porque no se logró una liberación completa de la enzima y por tanto POD no pudo expresar toda su actividad; también debido a que se pudieron haber generado reacciones como acidificación y la oxidación durante la extracción enzimática por presencia de sustratos fenólicos. Estos sustratos al oxidarse causan su inactivación parcial y se forman pigmentos oscuros que pueden interferir con el proceso de extracción, ligándose a la enzima e inactivándola, por tanto, estos deben sustraerse de la matriz antes del ensayo con aditivos como Polivinilpolipirrolidona (PVP) insoluble (Ceni et al. 2008) o un detergente Triton X-100 junto con PVP insoluble, lo cual mejora la extracción.

Las interacciones que se muestran en la Figura 3 al igual que el Análisis de Varianza (Tabla 3),

permiten identificar que la única interacción relevante sobre el rendimiento es la interacción BC (Cantidad de pulpa-Volumen de extracto) con un P-valor de 0,0102. Además, muestra que el mejor efecto de la interacción frente a la actividad enzimática, se presenta cuando la cantidad de pulpa y el volumen de extracto se encuentran cercanos a su nivel superior. Esto se presenta posiblemente, debido a que el material de inicio tuvo la cantidad suficiente de POD y así después de la remoción de sólidos se presentó una recuperación eficiente de la enzima, dado que las condiciones de pH y temperatura fueron las óptimas, obteniendo un sobrenadante clarificado que contuvo la enzima activa (Roe 2011).

La superficie de respuesta (Figura 4), representa un modelo de segundo orden y muestra la tendencia que exhibe la actividad enzimática al hacer variar los factores en estudio, por tanto a medida que se incrementan los valores de la cantidad de pulpa y de volumen de extracto, la actividad enzimática se aumenta.

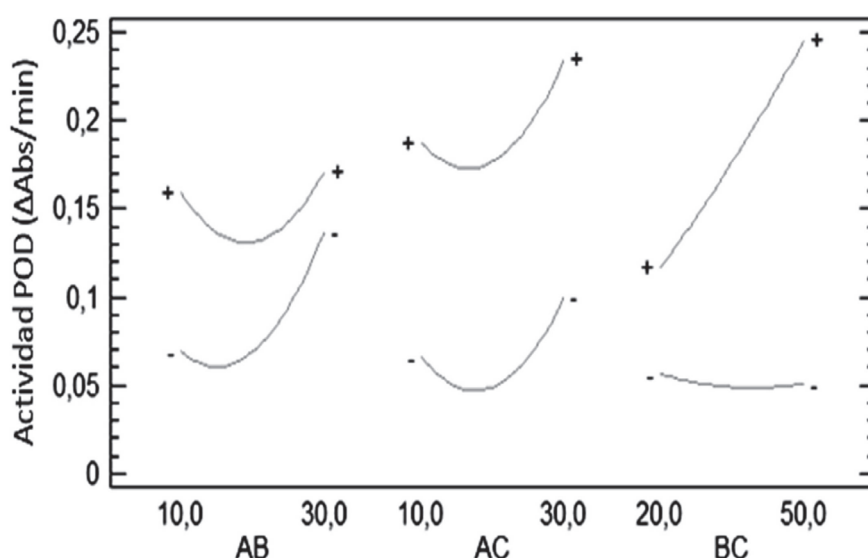


Figura 3. Gráfico de interacción del Tiempo de Centrifugación, la Cantidad de Pulpa y el Volumen de Extracto sobre la Actividad POD en pulpa de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.)

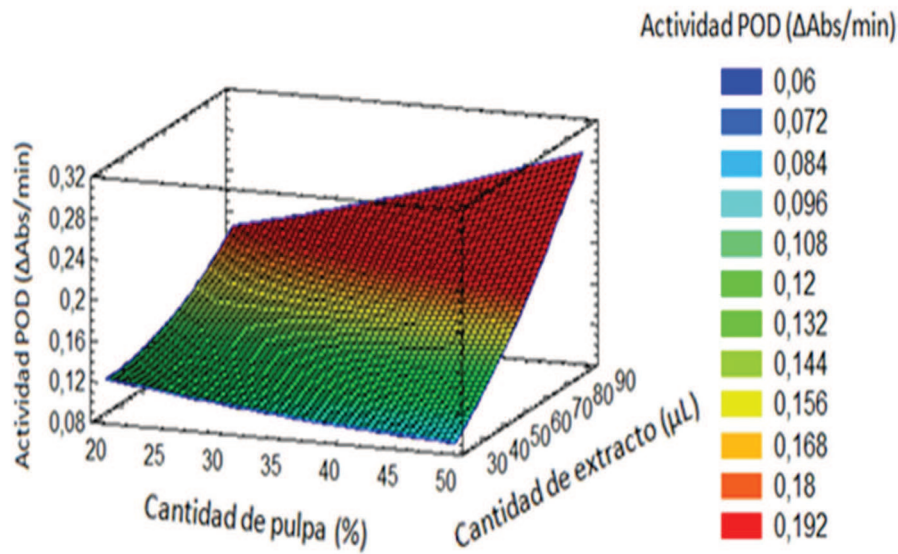


Figura 4. Superficie de respuesta estimada en un tiempo de centrifugación de 30 minutos para Actividad Peroxidasa en pulpa de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.)

## CONCLUSIONES

El tiempo de centrifugación, la cantidad de pulpa y el volumen de extracto enzimático, ejercieron una influencia significativa sobre la actividad POD, la cual se incrementó a medida que aumentaron los valores de estas variables. Es así, como la optimización mostró que la mayor actividad enzimática se obtuvo al mezclar durante la extracción 6 mL de pulpa con 4 mL de buffer fosfato 0,2 M y pH 6,5, en un tiempo de centrifugación de 34 minutos, y un volumen de extracto de 110 l con 2,390 mL de solución sustrato, en la medición.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Vicerrectoría de investigaciones postgrados y relaciones internacionales-VIPRI de la Universidad de Nariño a través de la convocatoria de Tesis y Alberto Quijano.

## REFERENCIAS

- Agüero, M., Ansorena, M., Roura, S. and Del Valle, C. 2008. Thermal inactivation of peroxidase during blanching of butternut squash. *Food Science and Technology*.4: 401 - 407.
- Akyol, Ç., Alpas, H. and Bayindirli, A. 2006. Inactivation of peroxidase and lipoxygenase in carrots, green beans, and green peas by combination of high hydrostatic pressure and mild heat treatment. *European Food Research and Technology*. 224(2):171 -176.
- Anthon, G. and Barrett, D. 2002. Kinetic parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(14):4119 - 25.
- Anthon, G., Sekine, Y., Watanabe, N. and Barrett, D. 2002. Thermal

Inactivation of Pectin Methylesterase, Polygalacturonase, and Peroxidase in Tomato Juice. *Journal of agricultural and food chemistry*.50:6153-6159.

**Association Of Official Analytical Chemist International (AOAC).1997.**

Official methods of analysis of AOAC International. 16th Edition. Gaithersburg, USA. 340 p.

**Bahçeci, K., Serpen, A., Gökmen, V. and**

**Acar, J. 2005.** Study of lipoxygenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *Journal of Food Engineering*. 66(2):187-192.

**Brito, B., Espín, S., Villacrés, E. and Vallant, F. 2008.**

Tomate de árbol: Características físicas y nutricionales de la fruta importantes en la investigación y desarrollo de pulpas y chips. Disponible en: [http://www.iniap.gob.ec/sitio/index.php?option=com\\_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=2&sobi2Id=221&Itemid=](http://www.iniap.gob.ec/sitio/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=2&sobi2Id=221&Itemid=) p.2.; consulta: Marzo, 2013.

**Ceni, G., Baldissera, E., Antunes, O.,**

**Oliveira, J., Dariva, C. and Oliveira, D. 2008.** Oxidases from mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): extraction optimization and stability at low and high temperatures. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 31(6):541 - 550.

**Chisari, M., Barbagallo, R. and Spagna, G.**

**2007.** Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence

on browning of cold stored strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(9):3469 - 76.

**Civello, P., Martinez, G., Chaves, A. and Anon, M. 1995.**

Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of Some Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43(10):2596 - 2601.

**Cruz, R., Vieira, M. And Silva, C. 2006.**

Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium officinale*). *Journal of Food Engineering*.72:8 - 15.

**Doan, S. and Doan, M. 2004.**

Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus logicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*). *Food Chemistry*. 88:69-77.

**Duarte, M., Whitaker, J., Rojo, A., García, B. and Regalado, C. 2003.**

Isolation and thermal characterization of an acidic isoperoxidase from turnip roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(17):5096 - 5102.

**Durango, K., Muñoz, K., Ocampo, P. y Londoño, J. 2007.**

Caracterización preliminar del enzima polifenol oxidasa en frutas tropicales: implicaciones en su proceso de industrialización. *Scientia Et Technica*. 13(33):161-164.

**Ercan, S. y Soysal, Ç. 2011.**

Effect of ultrasound and temperature on tomato

- peroxidase. *Ultrasonics Sonochemistry*. 18:689 - 695
- Fang, L., Jiang, B. and Zhang, T. 2008.** Effect of combined high pressure and thermal treatment on kiwifruit peroxidase. *Food Chemistry*. 109(4):802 - 807.
- FAO, 2006.** Ficha técnica del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). Disponible en: [http://www.fao.org/inpho\\_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/TOMATEDEARBOL.HTM](http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/TOMATEDEARBOL.HTM). 1p.; consulta: Marzo, 2013.
- Fortea, M., López, S., Serrano, A., Carreño, J. and Núñez, E. 2009.** Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson seedless). *Food Chemistry*. 113(4):1008 - 1014.
- Franco, G. 1998.** Industrialización del tomate de árbol. p. 3-7. En: Memorias II seminario Frutales de Clima Frio moderado. Manizales. Colombia.
- Ganjloo, A., Rahman, R., Bakar, J., Osman, A. and Bimkr, M. 2009.** Modelling the Kinetics of Peroxidase Inactivation and Colour Changes of Seedless Guava (*Psidium guajava* L.) during Thermal Treatments. *World Applied Sciences Journal*. 7(1):105 - 112.
- González, E., De Ancos, B. and Cano, M. 2000.** Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase activities in blackberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(11):5459 - 64.
- Hiner, A., Hernández, J., Rodríguez, J., García, F., Brisset, N., Smith, A. and Arnao, M. 2002.** Reactions of the class II peroxidases, lignin peroxidase and arthromyces ramosus peroxidase, with hydrogen peroxide. Catalase-like activity, compound III formation, and enzyme inactivation. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (30): 26879-26885.
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS y CERTIFICACIÓN (ICONTEC). 1997.** Frutas frescas. Tomate de árbol. Especificaciones. NTC 4105. Bogotá. 15 p.
- Jang, J. and Moon, K. 2011.** Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh cut Apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food Chemistry*. 124(2):444 -449.
- Jaramillo, S. 2003.** Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Monografía. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia. 5p.
- Lee, C., Pennesi, A. and Dickson, M. 1984.** Characterization of the cauliflower peroxidase isoenzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 32(1):18 - 21.
- Lemmens, L., Tibäck, E., Svelander, C.,**

- Smout, C., Ahrné, L., Langton, M. and Alminger, M. 2009.** Thermal pretreatments of carrot pieces using different heating techniques: Effect on quality related aspects. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*. 10(4):522 - 529.
- Martínez, G., Civello, P., Chaves, A. and Añón, M. 2001.** Characterization of peroxidase-mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit. *Phytochemistry*. 58(3):379 -87.
- Mdluli, K. 2005.** Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (subsp. Caffra). *Food Chemistry*. 92(2):311- 323.
- Morales, E., Chandia, V. and Cisneros, L. 2006.** Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxygenase from broccoli, green asparagus and carrots. *Journal of Food Science*. 67(1):146 - 154.
- Onsa, G., Bin Saari, N., Selamat, J. and Bakar, J. 2004.** Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from *Metroxylon sagu*. *Food Chemistry*. 85(3):365 - 376.
- Raimbault, A., Marie, P., Horry, J., Francois, M.; Romuald, K. and Soler, A. 2011.** Polyphenol oxidase and peroxidase expression in four pineapple varieties (*Ananas comosus* L.) after a chilling injury. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(1):342 - 348.
- Rani, D. and Abraham, T. 2006.** Kinetic study of a purified anionic peroxidase isolated from *Eupatorium odoratum* and its novel application as time temperature indicator for food materials. *Journal of Food Engineering*. 77(3):594 - 600.
- Roe, Simon. 2001.** *Protein Purification Techniques*. Second Edition. Oxford University Press. Oxford. 240 p.
- Rudra, G., Shivhare, U. and Basu, S. 2008.** Thermal inactivation kinetics of Peroxidase in mint leaves. *Journal of Food Engineering*. 85(1):147 - 153.
- SECRETARIA DE AGRICULTURA Y MEDIO AMBIENTE DE NARIÑO. 2012.** Consolidado agropecuario, San Juan de Pasto. 115p.
- Schweiggert, U., Schieber, A. and Carle, R. 2005.** Inactivation of peroxidase, polyphenoloxidase, and lipoxygenase in paprika and chili powder after immediate thermal treatment of the plant material. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*. 6(4): 403 - 411.
- Soysal, Ç., Söylemez, Z. and Bozoglu, F. 2004.** Effect of high hydrostatic pressure and temperature on carrot peroxidase inactivation. *European Food Research and Technology*. 218(2):152 - 156.
- Tabares, C. y Velásquez, J. 2003.** Estudio de la vida de anaquel del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) osmodeshidratado empacado en atmósferas modificadas. Trabajo de Grado de Ingeniero Químico.

- Universidad Nacional de Colombia.  
Colombia. Manizales. 114p.
- Terefe, N., Yang, Y., Knoerzer, K., Buckow, R. and Versteeg, C. 2010.** High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 11(1):52 - 60.
- Thongsook, T. and Barrett, D. 2005.** Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(8):3206 - 3214.
- Tijksens, L., Rodis, P., Hertog, M., Waldron, K., Ingham, L., Proxenia, N. and Van Dijk, C. 1997.** Activity of peroxidase during blanching of peaches, carrots and potatoes. *Journal of Food Engineering*. 34(4):355 - 370.
- Zhao, B. and Chang, K. 2008.** Evaluation of effects of soaking and precooking conditions on the quality of precooked dehydrated Pea, Lentil and chickpea products. *Journal of Food Processing and Preservation*. 32(3):517-532.
- Zhong, K., Wu, J., Wang, Z., Chen, F., Liao, X., Hu, X. and Zhang, Z. 2007.** Inactivation kinetics and secondary structural change of PEF-treated POD and PPO. *Food Chemistry*. 100(1):115 - 123.
- Zhou, Y., Dahler, J., Underhill, S. and Wills, R. 2003.** Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit. *Food Chemistry*. 80(4):565 - 572.