

CINETICA DE INACTIVACION TERMICA DE LA PEROXIDASA EN NABOS Y GUI SANTES

*Otoniel Corzo Delgado¹, José A. Barreiro Méndez² y
Carmen Irazábal de Guariguata²*

Universidad de Oriente, Núcleo de Nueva Esparta,
Guatamare, Venezuela, y
Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela

RESUMEN

Se determinó experimentalmente la cinética de inactivación térmica de la peroxidasa presente en nabos y en guisantes, a temperaturas comprendidas entre 60°C y 76°C para nabos, y entre 72°C y 82°C en el caso de guisantes. Se encontró que la cinética de inactivación térmica estaba compuesta por dos fases, cada una de primer orden, con un tiempo promedio para el cambio de fase de 22.5 seg. y 23.8 seg. para los nabos y guisantes, respectivamente. Las energías de activación para la primera y segunda fase de la inactivación fueron de 27.1 Kcal/mol y 43.5 Kcal/mol para nabos, y de 34.5 Kcal/mol y 28.9 Kcal/mol para guisantes.

INTRODUCCION

Frecuentemente se encuentra que la cinética de inactivación térmica de la peroxidasa en productos de origen vegetal está constituida por dos fases, cada una de las cuales se caracteriza por una cinética de primer orden (1-8).

La existencia de un cambio de pendiente en la curva de inactivación térmica de la peroxidasa se ha atribuido a la presencia de isoenzimas de diferente estabilidad térmica (1, 5, 9, 10), las cuales se clasifican básicamente en fracciones lábiles y resistentes al calor. Cada una de estas fracciones muestra una cinética de inactivación de primer orden, con distintos parámetros cinéticos.

Manuscrito modificado recibido: 18-1-84.

- 1 Profesor del Núcleo de Nueva Esparta, Universidad de Oriente, Guatamare, Edo. Nueva Esparta, Venezuela.
- 2 Miembros del Departamento de Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos, Universidad Simón Bolívar, Apartado 80659, Caracas 1030-A, Venezuela.

La cinética de inactivación bifásica ha sido determinada en los siguientes productos: maíz en mazorca (6); maíz dulce (1, 9); espinaca, frijol, zanahoria, mango y guayaba (4); rábano (5), y purés de frijol y espinaca (2). No se cuenta con datos referentes a la cinética de inactivación térmica de la peroxidasa contenida en vegetales cultivados en Venezuela, ni relativos a la energía de activación de dicha enzima en nabos y guisantes. Estos son los aspectos que constituyen los objetivos del presente trabajo. Los resultados de esta investigación revisten especial importancia para la determinación de tiempos de procesamiento térmico de vegetales por alta temperatura y tiempo corto (HTST), en los que la actividad enzimática juega un papel preponderante.

MATERIALES Y METODOS

Los nabos y guisantes cultivados en Venezuela se adquirieron recién cosechados en el mercado local. Estos procedían de cultivos realizados en la Colonia Tovar, sitio adyacente a la ciudad de Caracas.

Del material lavado, pelado y cortado se pesaron aproximadamente 100 g, que luego se homogeneizaron en una licuadora con 300 ml de solución reguladora de fosfato (pH de 6.0). Las muestras homogeneizadas se filtraron a través de tres capas de tela de queso y mediante una jeringa volumétrica, se colocaron 75 μ l del extracto en cada uno de 10 tubos capilares de 100 x 1.5 mm, sellados previamente por uno de los extremos.

Los tubos con el extracto se insertaron en un tapón de goma perforado y se sumergieron en un baño de agua a temperatura constante (\pm 0.2°C) marca Blue M. Magni Whirl, Modelo MW 1110 A-1. El tratamiento térmico se efectuó a temperaturas comprendidas entre 60°C y 76°C para nabos, y de 72°C a 82°C en el caso de los guisantes, por intervalos de tiempo comprendidos entre 10 y 180 segundos medidos con un cronómetro marca Heuer, Modelo 508 201, con apreciación de 0.2 seg. Se procesó un lote de 10 tubos capilares para cada una de las combinaciones de tiempo-temperatura a estudiar. Después del calentamiento se sacaron los tubos y de inmediato se pusieron en baño de agua con hielo (2°C) a fin de evitar una inactivación posterior. Este método es similar al seguido por Burnette y Flick (11).

El tapón de goma perforado se diseñó con el propósito de lograr mayor facilidad para sumergir simultáneamente los tubos capilares dentro del baño a temperatura constante y poder así sacarlos rápidamente del lugar de calentamiento; además, ello permitió cerrar con el tapón el extremo abierto del tubo capilar. El tapón se perforó solamente por un lado con un taladro provisto de mecha apropiada, de modo que el tubo capilar entrara y se sostuviera por el extremo abierto en el hueco formado según se indica.

Se utilizaron tubos capilares de 100 x 1.5 mm para asegurar que el extracto dentro de ellos adquiriera rápidamente la temperatura del medio de calentamiento y, de esta forma, el tiempo de inactivación correspondiera al medido a una temperatura constante, sin tener en cuenta factores de retraso. Mediante pruebas preliminares se comprobó que la temperatura del baño no se alteraba al colocar en él los tubos capilares sostenidos por el tapón.

La extracción de la enzima se efectuó con solución reguladora de fosfato de pH 6.0, por ser este valor cercano al de los extractos acuosos de los nabos (pH 5.8) y guisantes (pH 6.3).

La actividad residual de la peroxidasa se determinó individualmente para cada uno de los tubos por el método del guayacol (12). Para ello se mezclaron 2.8 ml de solución al 10/0 de H₂O₂ en solución reguladora de fosfato, 0.1 ml de solución de guayacol al 20/0 en alcohol metílico y 0.1 ml de extracto de enzima; la reacción se inició al agregar el extracto. La temperatura de la reacción se mantuvo constante a 22°C.

El aumento en la absorbancia de la solución se midió como función del tiempo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Coleman 54B a 420 nm conectado a un registrador X-Y. La actividad de la enzima se determinó como la pendiente inicial de la curva de absorbancia vs. tiempo, y la actividad residual fue calculada como la fracción de la actividad original de la peroxidasa presente en la muestra no tratada térmicamente, promediada para cada lote de 10 tubos. Para la medición de la actividad original se tomaron 10 muestras sin tratamiento térmico.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en relación a la medición de la actividad residual de la peroxidasa en los extractos de nabos y guisantes se dan a conocer en las Figuras 1 y 2. Mediante un ajuste de regresión lineal y de acuerdo a los valores del coeficiente de correlación presentados en la Tabla 1, se comprobó que la cinética de inactivación térmica de la peroxidasa era bifásica y de primer orden en cada una de las fases con diferentes parámetros cinéticos. Esto coincide con lo determinado previamente en otros productos alimenticios (1-9).

La ecuación general que representa la inactivación con cinética de primer orden es³:

$$\frac{dC}{dt} = -k C \quad (1)$$

Aplicando esta relación a cada una de las fases de la inactivación, e integrando para los intervalos de tiempo correspondientes se obtiene, al combinar las expresiones resultantes:

$$C = C_0 \exp(-t_1 (k_1 - k_2) - k_2 t) \quad (2)$$

Esta relación es válida para tiempos comprendidos entre t_1 y t , siendo $t > t_1$.

El tiempo de cambio de fase (t_1) de la inactivación térmica se obtiene de la ecuación (2). Al tomar logaritmo decimal se tiene que:

$$\log C/C_0 = \frac{-t_1 (k_1 - k_2) - k_2 t}{2.303} \quad (3)$$

3 El significado de los diferentes símbolos que se utilizan en este trabajo se describe en la lista de símbolos (página 692).

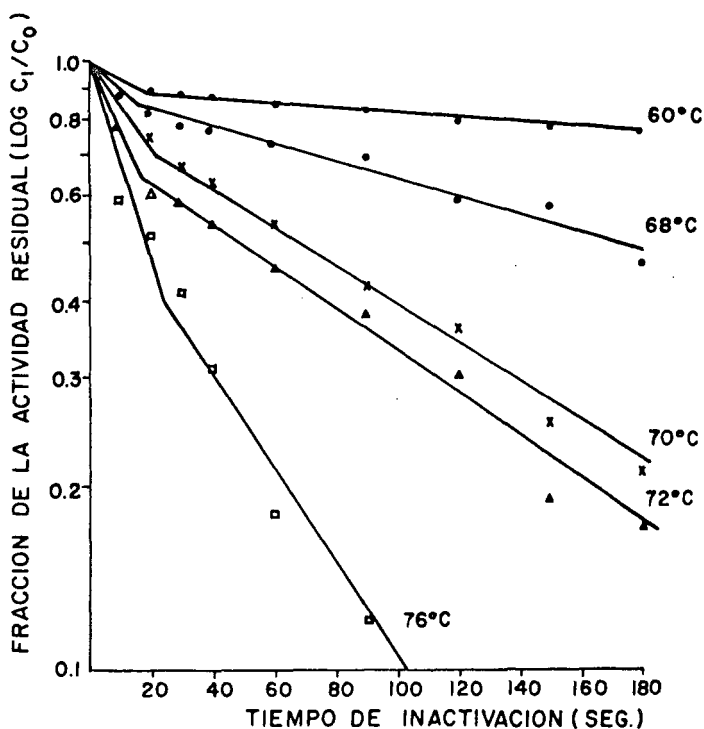


FIGURA 1

Curva de inactivación térmica de la peroxidasa en nabos, a diferentes temperaturas de escaldado y a un pH de 6.0

y para un tiempo de inactivación igual a cero se llega a:

$$t_1 = -2.303 \frac{\text{traza}}{(k_1 - k_2)} \quad (4)$$

El valor de la traza corresponde al punto de corte de la prolongación de la curva de inactivación en la segunda fase con el eje de ordenadas, y los valores de k_1 y k_2 resultan de multiplicar las pendientes de las curvas de inactivación en las dos fases por el factor 2.303 (Tablas 2 y 3).

Aplicando la ecuación (4) se obtuvo que el tiempo promedio de cambio de fase para la inactivación térmica de peroxidasa en nabos y guisantes era de 22.5 seg y 23.8 seg, respectivamente.

Para encontrar la variación de la constante de velocidad de inactivación con la temperatura, los valores de las Tablas 2 y 3 se ajustaron a la expresión de Arrhenius:

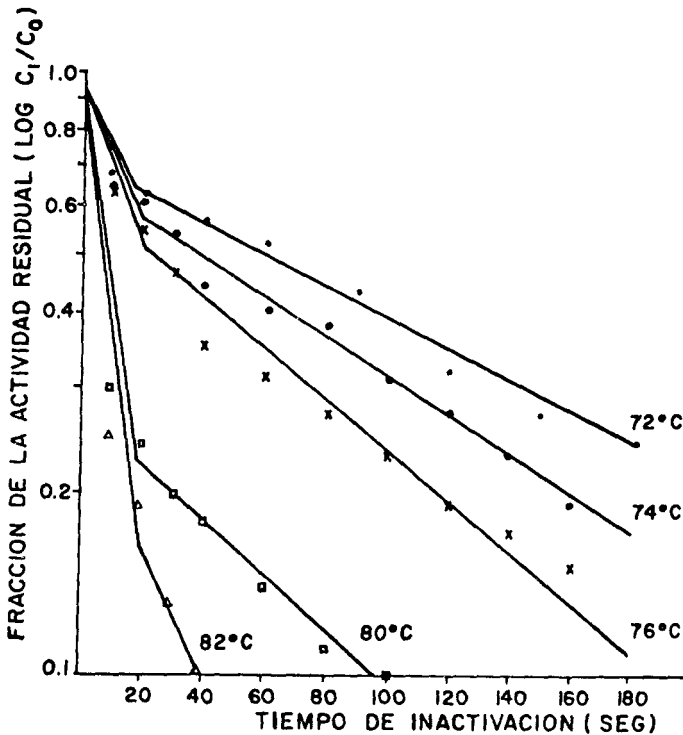


FIGURA 2

Curva de inactivación térmica de la peroxidasa en guisantes, a diferentes temperaturas de escaldado y a un pH de 6.0

$$\log k = \log k_0 - E_a/2.303 RT \quad (5)$$

donde k_0 es la constante de Arrhenius, E_a la energía de activación, R la constante de los gases (1.987 cal/mol^oK), y T la temperatura en ^oK.

Los resultados encontrados para las curvas de regresión se aprecian en la Tabla 4. Las energías de activación obtenidas para los nabos y guisantes están comprendidas entre 27.1 y 43.5 Kcal/mol. Estos valores son similares a los notificados por otros autores para diferentes vegetales y frutas: 25.1 Kcal/mol en preparaciones purificadas de peroxidasa de rábano (12); entre 10.579 y 40.720 Kcal/mol en "okra", vainitas, espinacas, zanahorias, mango y guayaba (4); y 34 y 21 Kcal/mol en las isoenzimas lábil y resistente de extractos purificados de peroxidasa de rábano, respectivamente (5). Cabe hacer notar que estos últimos valores señalados en la literatura son muy semejantes en magnitud y comportamiento a las energías de activación obtenidas en el trabajo aquí descrito, para la

TABLA 1

**COEFICIENTES DE CORRELACION DE LAS LINEAS DE REGRESION
PARA LA CINETICA DE INACTIVACION TERMICA DE LA PEROXIDASA
EN NABOS Y GUISANTES**

Vegetal	Temperatura de inactivación (°C)	Coeficientes de correlación	
		Primera fase	Segunda fase
Nabos	60.0	0.87	0.96
	68.0	0.99	0.98
	70.0	0.99	0.99
	72.0	0.99	0.99
	78.0	0.99	0.99
Guisantes	72.0	0.92	0.99
	74.0	0.93	0.99
	76.0	0.96	0.99
	80.0	0.93	0.99
	82.0	0.94	0.99

TABLA 2

**CONSTANTES DE VELOCIDAD DE INACTIVACION TERMICA DE LA
PEROXIDASA EN NABOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE
CALENTAMIENTO**

Fase	Temperatura (°C)	Constante de inactivación (seg ⁻¹) k x 10 ³	Coefficiente de correlación
Primera	60.0	5.6	0.87
	68.0	9.3	0.99
	70.0	15.3	0.99
	72.0	25.5	0.99
	76.0	33.8	0.99
Segunda	60.0	0.9	0.96
	68.0	3.5	0.98
	70.0	7.4	0.99
	72.0	8.3	0.99
	76.0	18.7	0.99

TABLA 3

CONSTANTES DE VELOCIDAD DE INACTIVACION TERMICA DE LA
PEROXIDASA EN GUI SANTES A DIFERENTES TEMPERATURAS DE
CALENTAMIENTO

Fase	Temperatura (°C)	Constante de inactivación (seg ⁻¹) k x 10 ³	Coefficiente de correlación
Primera	72.0	23.0	0.92
	74.0	25.3	0.93
	76.0	30.6	0.96
	80.0	71.4	0.93
	82.0	83.6	0.94
Segunda	72.0	5.8	0.99
	74.0	7.4	0.99
	76.0	8.3	0.99
	80.0	10.6	0.99
	82.0	23.3	0.99

TABLA 4

VALORES DE LAS CONSTANTES DE LA ECUACION DE ARRHENIUS PARA
LA INACTIVACION DE LA PEROXIDASA EN NABOS Y GUI SANTES

Vegetal	Fase de inactivación	Valor de log k ₀	Energía de activación (Kcal/mol)	Coefficiente de correlación
Nabos	Primera	15.5	27.1	0.96
	Segunda	25.6	43.5	0.99
Guisantes	Primera	20.2	34.5	0.97
	Segunda	16.1	28.9	0.92

primera y segunda fase de la inactivación en guisantes (34.5 y 28.9 Kcal/mol, respectivamente). Por otra parte, en los nabos se observa un comportamiento diferente, ya que la energía de activación para la primera fase (27.1 Kcal/mol) es menor que para la segunda (43.5 Kcal/mol), que corresponde a la fracción enzimática resistente. Estos resultados no pudieron ser comparados con otros datos de energía de activación para peroxidasa en este vegetal, dado que no se encontraron disponibles en la literatura consultada.

Se estima que los resultados de este trabajo son de importancia para

el cálculo adecuado de tiempos de procesamiento térmico de los vegetales estudiados por alta temperatura y tiempo corto.

SUMMARY

KINETICS OF THE HEAT INACTIVATION OF PEROXIDASE IN GREEN PEAS AND TURNIPS

The heat inactivation of peroxidase in green peas and turnips grown in Venezuela was determined experimentally at temperatures ranging from 60°C to 76°C for turnips, and between 72°C and 82°C for green peas. The thermal destruction curves obtained were found to be biphasic, following first-order kinetics of inactivation, and with average times for the change of phase of 22.5 sec and 23.8 sec for the turnips and peas, respectively. The activation energies, as calculated by the Arrhenius equation for the first and second inactivation intervals, were 27.1 kcal/mole and 43.5 kcal/mole for turnips, and 34.5 kcal/mole and 28.9 kcal/mole for green peas.

LISTA DE SIMBOLOS

Caracteres latinos:

C, C_1	= Actividad de la enzima en el producto a un cierto tiempo.
C_0	= Actividad inicial de la enzima en el producto, constante.
E_a	= Energía de activación (Kcal/mol).
k_0	= Constante de la ecuación de Arrhenius (seg^{-1}).
k	= Constante de velocidad de inactivación térmica (seg^{-1}).
k_1	= Constante de velocidad de inactivación térmica en la primera fase de la inactivación (seg^{-1}).
k_2	= Constante de velocidad de inactivación térmica en la segunda fase de la inactivación (seg^{-1}).
R	= Constante universal de los gases (cal/mol °K).
T	= Temperatura (°K).
t	= Tiempo de inactivación (seg).
t_1	= Tiempo de cambio de fase (seg).

BIBLIOGRAFIA

1. Yamamoto, H. Y., M. P. Steinberg & A. I. Nelson. Kinetic studies on the heat inactivation of peroxidase in sweet corn. *J. Food Sci.*, 27:113-119, 1962.
2. Resende, R., F. J. Francis & C. R. Stumbo. Thermal destruction and regeneration of enzymes in green bean and spinach purée. *Food Technol.*, 23:63-66, 1969.
3. Lu, A. T. & J. R. Whitaker. Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase. *J. Food Sci.*, 39:1173-1178, 1974.
4. Gíbríel, A. Y., A. F. El-Sahrigi, H. A. H. El-Mansy & S. H. Kandil. Heat resistance parameters of peroxidase from some vegetables and fruits. *Egypt J. Food Sci.*, 5: 31-39, 1977.
5. Ling, A. C. & D. B. Lund. Determining kinetics parameters for thermal inactivation of heat resistant and heat labile isoenzymes from thermal destruction curves. *J. Food Sci.*, 43:1307-1310, 1978.

6. Lee, Y. C. & J. K. Hammes. Heat inactivation of peroxidase in corn-on-the-cob. *J. Food Sci.*, **44**:785-787, 1979.
7. Vámos-Vigyázó, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critic. Rev. Food Sci. Nutr.*, **15**(1):49-127, 1981.
8. Varda, K., S. Goldschmidt, J. Amir & R. Granit. Some biochemical properties of soluble and bound potato tuber peroxidase. *J. Food Sci.*, **46**:756-764, 1981.
9. Chenchin, E. E. & H. Y. Yamamoto. Distribution and heat inactivation of peroxidase isoenzymes in sweet corn. *J. Food Sci.*, **38**:40-42, 1973.
10. Tamura, Y. & Y. Morita. Thermal denaturation and regeneration of Japanese radish peroxidase. *J. Biochem.*, **78**:561-565, 1975.
11. Burnette, F. S. & G. J. Flick, Jr. Activity and resistance to thermal inactivation of peroxidase in the blue crab (*Callinectes sapidus*). *J. Food Sci.*, **43**:31-34, 1978.
12. Joffe, F. M. & C. O. Ball. Kinetics and energetics of thermal inactivation and the regeneration rates of a peroxidase system. *J. Food Sci.*, **27**(6):587-592, 1962.