



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

EFFECTO DE LA ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA SOBRE ENZIMAS OXIDOREDUCTASAS

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.A. SONIA GABRIELA CARRILLO NUÑEZ

TUTOR

Dr. ALBERTO TECANTE CORONEL
FACULTAD DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO, JULIO DE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares	Facultad de Química, UNAM
Vocal:	M. en C. María de los Ángeles Valdivia López	Facultad de Química, UNAM
Vocal:	Dr. Arturo Navarro Ocaña	Facultad de Química, UNAM
Vocal:	Dr. Miquel Gimeno Seco	Facultad de Química, UNAM
Secretario:	Dra. María Guadalupe Sosa Herrera	FES-Cuautitlán, UNAM

Lugar donde se realizó la investigación:

Departamento de Alimentos y Biotecnología. Laboratorio 313. Conjunto E.

Facultad de Química, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química de la UNAM, por darme la oportunidad de seguir creciendo personal y profesionalmente dentro de sus instalaciones.

Al posgrado en Ciencias Químicas, por permitirme acceder nuevamente al maravilloso mundo de la química.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto, con CVU: 662504 y número de becario: 576708.

Al Dr. Alberto Tecante Coronel, por el apoyo y asesoría brindada durante la realización de esta investigación.

A la I. A. Mariana Ramírez Gilly, por el apoyo técnico y disposición para la realización de las pruebas de alta presión.

A los miembros del jurado, por los comentarios y observaciones realizadas para la mejora de esta tesis.

ÍNDICE

JURADO ASIGNADO.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	vii
RESUMEN	viii
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Enzimas en alimentos.....	1
1.2. Algunas enzimas en frutas y hortalizas	1
1.3. Control de la actividad enzimática en alimentos	2
1.4. Procesamiento ha altas presiones hidrostáticas.....	4
1.4.1. Efecto de la alta presión sobre la conformación de la enzima	4
1.5. Calorimetría de barrido diferencial.....	8
2. JUSTIFICACIÓN.....	10
3. HIPÓTESIS	10
4. OBJETIVO	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
5.1. Cuantificación de proteína soluble	11
5.3. Determinación de actividad enzimática.....	12
5.3.1 Actividad enzimática de la polifenoloxidasas	12
5.3.2 Actividad enzimática de la peroxidasa	12
5.3.2 Actividad enzimática de la catalasa.....	13
5.4. Análisis térmico	13
5.4.1 Tratamiento de datos.....	14

5.5. Aplicación de altas presiones hidrostáticas a enzimas oxidoreductasas	14
5.5.1 Preparación de las muestras	14
5.5.2 Establecimiento de las condiciones de aplicación de altas presiones hidrostáticas.....	15
5.5.3 Tratamiento de las muestras	15
5.5.4 Diagrama de bloques experimental	16
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
6.1. Cuantificación de la concentración de proteína soluble en enzimas oxidoreductasas	17
6.2. Determinación de la masa molecular de las enzimas oxidoreductasas.....	17
6.3. Efecto de pH y temperatura sobre la actividad enzimática de enzimas oxidoreductasas.....	18
6.4. Efecto de la aplicación de alta presión hidrostática y temperatura sobre actividad enzimática de enzimas oxidoreductasas.....	20
6.5. Efecto de la aplicación de alta presión hidrostática y temperatura sobre el perfil calorimétrico de enzimas oxidoreductasas.....	21
6.6. Análisis SDS-PAGE de enzimas oxidoreductasas tratadas con alta presión hidrostática y temperatura	26
7. CONCLUSIONES	28
8. RECOMENDACIONES	29
9. REFERENCIAS.....	30
ANEXOS	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Porcentaje de encuestados indicando las tecnologías con mayor actividad de investigación y desarrollo durante los últimos diez años (Jermann et al., 2015)	3
Figura 2.	Modelo propuesto para el efecto de la alta presión sobre la estructura conformacional de una enzima (Chakraborty et al., 2014)	7
Figura 3.	Termograma típico DSC que muestra (a) temperatura máxima del pico, (b) temperatura media, (c) cambio en la capacidad calorífica y (d) cambio entálpico (abarca toda el área bajo la curva).	8
Figura 4.	Diagrama esquemático seguido para el análisis del efecto la presión hidrostática sobre las enzimas oxidoreductasas.	16
Figura 5.	Determinación de la masa molecular de las enzimas oxidoreductasas por electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, 12.5 % T).	18
Figura 6.	Relación entre la actividad enzimática de la catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas y la actividad enzimática a pH 6.5 (control) a diferentes valores de pH, medidas a 25°C.	19
Figura 7.	Relación entre la actividad enzimática de la catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas y la actividad enzimática a 25°C (control) en función del tiempo de incubación a 60 °C.	20
Figura 8.	Termogramas de catalasa con tratamiento HHP a 600 MPa durante 30min (CAT30), 40 min (CAT40), 50 min (CAT50) y 60 min (CAT60) y una muestra tratada a 63°C/30min (CATT).	22
Figura 9.	Termogramas de polifenoloxidasas con tratamiento HHP a 600 MPa/30 min (PFO30) y tratada térmicamente a 63°C/30min (PFOT).	24
Figura 10.	Termogramas de peroxidasa con tratamiento HHP a 600 MPa durante 30 min (POD30) y 60 min (POD60) y una muestra tratada térmicamente a 63°C/30min (PODT). El control PODC no recibió ningún tratamiento.	25
Figura 11.	Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, 12.5 % T) de catalasa con tratamientos de HHP y temperatura.	26
Figura 12.	Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, 12.5 % T) de polifenoloxidasas tratamiento de HHP y temperatura.	27
Figura 13.	Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, 12.5 % T) de peroxidasa con tratamientos de HHP y temperatura.	28
Figura 14.	Termograma DSC de la enzima catalasa.	34

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Concentración de proteína de las enzimas catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas medida por el método de Lowry.	17
Tabla 2.	Porcentaje de actividad residual para catalasa, polifenoloxidasas y peroxidasa a diferentes tratamientos de HHP y a temperatura de 63°C/30 min.	21
Tabla 3.	Tratamientos y parámetros térmicos de la enzima catalasa.	23
Tabla 4.	Tratamientos y parámetros térmicos de la enzima polifenoloxidasas.	24
Tabla 5.	Tratamientos y parámetros térmicos de la enzima peroxidasa.	26
Tabla 6.	Cuantificación de proteína de la enzima catalasa después de ser sometida a tratamientos de HHP y temperatura. Medida por Lowry.	36

RESUMEN

Las enzimas oxidativas catalizan reacciones que afectan la calidad de frutas y hortalizas produciendo cambios físicos y químicos importantes por lo que para preservar la calidad de estos productos y sus derivados y alargar su vida de anaquel estas enzimas deben ser inactivadas. La tecnología de altas presiones hidrostáticas (HHP por sus siglas en inglés) ha venido ganando campo en la conservación de frutas y hortalizas; sin embargo, las implicaciones que este método tiene en la inactivación de las enzimas asociadas al deterioro de frutas y hortalizas han sido poco estudiadas. Es por eso que este estudio tiene el objetivo de analizar el efecto del tratamiento HHP sobre la estabilidad de las enzimas catalasa, polifenoloxidasas y peroxidasa, a través de la medición de su actividad y la determinación de los perfiles calorimétricos, para conocer las condiciones que conduzcan a su inactivación. Para lograr esto se realizaron estudios de cuantificación de proteína soluble, determinación del peso molecular, actividad enzimática, análisis térmico mediante calorimetría de barrido diferencial, así como análisis de geles de electroforesis SDS-PAGE. Los resultados obtenidos de actividad enzimática para la enzima catalasa (CAT) y peroxidasa (POD) muestran una disminución mayor al 50 % después de ser tratadas a 600 MPa de presión y tiempos de exposición de 30, 40, 50 y 60 min para catalasa y 30 y 60 min para peroxidasa, mientras que para la polifenoloxidasa (PFO) la actividad disminuye a casi el 20 % a un tratamiento de 600 MPa/30 min. Las muestras tratadas térmicamente a 63 °C disminuyeron su actividad al 90 % para las enzimas CAT y PFO, mientras que la POD se mantuvo igual que las muestras tratadas a presión al 50 %. Los datos calorimétricos obtenidos después de someter las muestras a presión fueron los siguientes: el valor de T_m fue de 60 ± 0.87 °C para CAT, 61.9 °C para PFO y 56.3 °C para POD. Hay una disminución de la entalpía de 30 y 50 % para CAT y POD, respectivamente, acompañada de una pérdida de la solubilidad de la proteína lo cual ocasiona un aumento en el valor de $T^{1/2}$ indicando pérdida de cooperatividad del proceso de desnaturalización, mostrando termogramas achatados y alargados, para el caso de la PFO su valor entálpico disminuye en un 37 % y el valor de $T^{1/2}$ también disminuye debido a la característica polar de la proteína hay aumento en la formación de puentes de hidrógeno disminuyendo la estructuración de la proteína, haciendo el proceso de despliegue de la proteína más cooperativo. Para las muestras tratadas térmicamente el valor de T_m para CAT y POD aumentó 24 y 19 %, respectivamente, con respecto al control, acompañado de una pérdida de la solubilidad de alrededor de 100 %. Esto indica una mayor estructuración en las moléculas, debida a la agregación de las proteínas, en cuanto a la PFO la señal térmica desapareció, debido a la completa desnaturalización de la enzima. En el análisis SDS-PAGE, se observa la formación de agregados, confirmando interacciones proteína-proteína. Estos resultados permiten concluir que el procesamiento por altas presiones hidrostáticas causa cambios conformacionales en las proteínas estudiadas, mostrando ser un tratamiento alternativo al tratamiento térmico para inactivar enzimas que deterioran los alimentos.

1. ANTECEDENTES

1.1. Enzimas en alimentos

Las enzimas son catalizadores bioquímicos presentes en todos los tejidos vivos, incluyendo frutas y hortalizas. Las enzimas catalizan reacciones que en ocasiones afectan la calidad de frutas y hortalizas produciendo cambios físicos y químicos importantes. Para conservar la calidad de frutas y sus derivados estas enzimas deben ser inactivadas (Ahmed, Lobo & Ozdali, 2012). Por ello un número de técnicas de conservación de alimentos desarrolladas a través de los años se han dirigido a controlar actividades enzimáticas indeseables, así como actividades microbianas para asegurar extender la vida de los productos alimentarios (Simpson, 2012).

1.2. Algunas enzimas en frutas y hortalizas

Las frutas y las hortalizas se encuentran entre los alimentos más perecederos en el comercio. Estos alimentos tienen un alto contenido de hidratos de carbono y un bajo contenido de proteínas, con valores de pH que van de 7 a ligeramente ácidos y tienen una alta actividad de agua. El deterioro de frutas y hortalizas se caracteriza por una coloración marrón, necrosis, pérdida de textura, exudación y producción de olores desagradables (Raventos Santamaría, 2003). La comprensión de los procesos que resultan en la degradación de la calidad es esencial para desarrollar tecnologías que amplíen la vida útil de las frutas y hortalizas mínimamente procesados y mantener la calidad durante su procesamiento y distribución (Ramos et al., 2013).

Algunas de las enzimas que afectan los atributos de calidad en frutas y hortalizas incluyen a la polifenoloxidasas (PFO), peroxidasa (POD), β -glucosidasa (BGL) y lipoxigenasa (LOX) las cuales son responsables del deterioro de color, sabor y valor nutricional. Mientras que las enzimas pectinmetilesterasa (PME) y poligalacturonasa (PG) tienen una influencia sobre la textura.

La PFO es una de las principales enzimas oxidativas involucrada en el pardeamiento enzimático de frutas y hortalizas. En presencia de oxígeno molecular, la PFO, que es una proteína de cobre, cataliza la hidroxilación de monofenoles a difenoles y la oxidación de difenoles en o-quinonas con el consecuente desarrollo de coloración (García et al., 2006; Mejía-Doria et al., 2014).

La POD es otra importante enzima oxidoreductasa, también involucrada en el deterioro de color y sabor. Esta enzima cataliza la reacción de oxidación de compuestos fenólicos en presencia de peróxido de hidrógeno, dando productos color marrón (Chakraborty et al., 2014).

Además, POD y catalasa (CAT) son dos de las enzimas más resistentes al tratamiento de alta temperatura y ampliamente distribuidas en los tejidos vegetales, es por esto que su actividad se utiliza para evaluar la eficacia del escaldado. El proceso de escaldado es un tratamiento térmico de corta duración (95 -100 °C de 1.5 – 4 min) aplicada a frutas y hortalizas, con la finalidad de inactivar enzimas. Aunque la peroxidasa es más estable a la alta temperatura que la catalasa, la actividad de ambas enzimas se ha utilizado para seguir el desarrollo del proceso de escaldado de muchas frutas y hortalizas. Si ambas enzimas están inactivas, entonces se puede suponer que otras enzimas que alteran el sabor y la textura, tales como la lipoxigenasa, también están inactivadas (Baquero, Castro & Narváez, 2005).

1.3. Control de la actividad enzimática en alimentos

La actividad enzimática en frutas y hortalizas es usualmente controlada mediante procesamiento térmico, refrigeración, reducción de pH y uso de agentes antipardeamiento o inhibidores enzimáticos (Junjie et al., 2014). El tratamiento térmico es ampliamente usado para la producción a escala comercial de productos de frutas y hortalizas logrando su estabilidad microbiana y bioquímica durante su almacenamiento. Sin embargo, cuando estos alimentos son conservados por tratamientos térmicos convencionales, la diferencia entre el producto fresco y el procesado es clara, ya que estos tratamientos interrumpen todos los procesos metabólicos (Denoya et al., 2016), causando

cambios significativos en el sabor, color y textura, aunque la magnitud del efecto depende del producto y de la intensidad del proceso (Terefe, Buckow & Versteeg, 2014).

El procesamiento de alimentos mediante alta presión hidrostática (HHP, por sus siglas en inglés) está ganando popularidad en la industria alimentaria por su capacidad de inactivar microorganismos patógenos y enzimas con tratamientos térmicos mínimos, resultando en la casi completa retención de características sensoriales y nutritivas de alimentos frescos sin afectar su vida de anaquel (Ramaswany & Mariotte, 2005; Da-Won, 2014; Suárez et al., 2011).

Durante los últimos quince años, el uso de la tecnología de altas presiones en la industria alimentaria ha ido incrementando y de acuerdo con la encuesta realizada por Jermann et al. (2015) alrededor del mundo las tecnologías con mayor desarrollo e investigación en los últimos diez años son procesamiento por altas presiones (HHP) con 95 %, calentamiento por microondas (MWH) con 94 %, luz ultravioleta (UV light) con 89 % y campos eléctricos pulsantes (PEF) con 88 % (Figura 1).

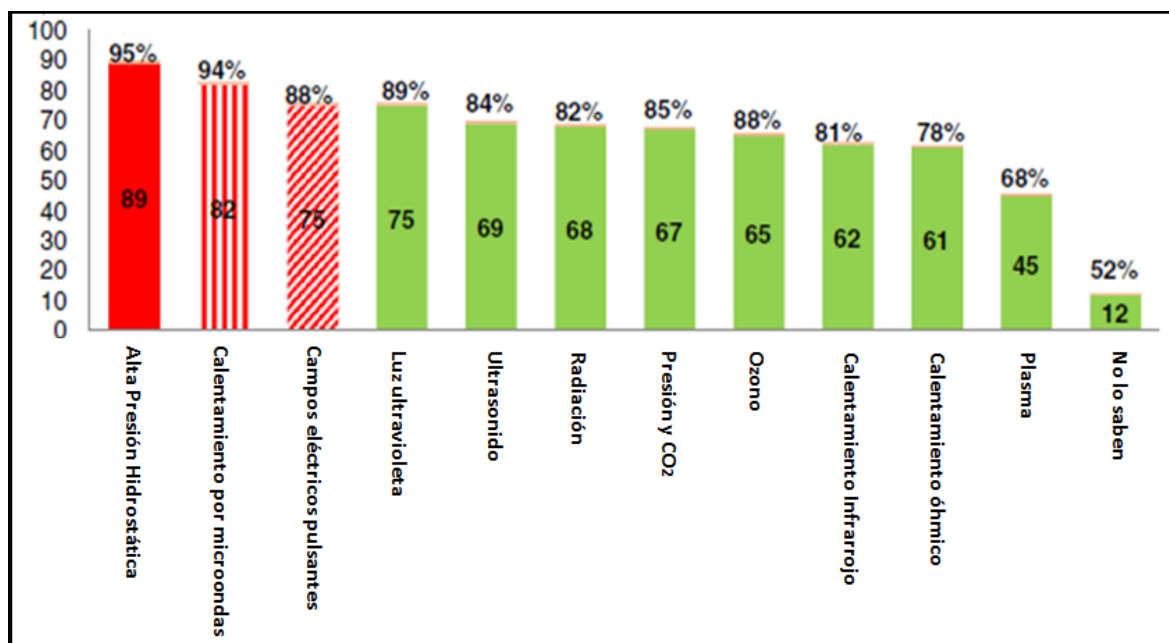


Figura 1. Porcentaje de encuestados indicando las tecnologías con mayor actividad de investigación y desarrollo durante los últimos diez años (Jermann et al., 2015).

En los últimos años, la HHP ha sido ampliamente utilizada en Japón y se han procesado una variedad de productos alimenticios como mermeladas y jugos de frutas. Ha habido entre diez y quince tipos de alimentos presurizados en el mercado japonés, pero varios han desaparecido, y los que quedan son tan específicos que tendrían poco interés para los mercados europeos o estadounidenses. Sin embargo, el interés en la HHP se deriva de su capacidad para suministrar alimentos sin adición de conservadores. Por ello es posible emplear las altas presiones como principal tratamiento estabilizador para un bloqueo total o una disminución significativa de la actividad enzimática responsable del deterioro en las características sensoriales y nutricionales de los alimentos (Teward & Juneja, 2007).

1.4. Procesamiento ha altas presiones hidrostáticas

La aplicación de alta presión estática se basa en someter a un producto a elevados niveles de presión hidrostática (100-1000 MPa) de forma continua durante varios minutos. A este tipo de tecnología se le denomina comúnmente altas presiones hidrostáticas (High Hydrostatic Pressure, HHP). La utilización de altas presiones hidrostáticas se rige, fundamentalmente por dos principios. El primero es el de Le Chatelier, el cual enuncia que cualquier fenómeno, e.g. reacciones químicas, cambios moleculares, entre otros, que va acompañado de una disminución de volumen sufre un incremento al aumentar la presión, y viceversa. El segundo es la ley de Pascal, según la cual una presión externa aplicada a un fluido confinado se transmite de forma uniforme e instantánea en todas las direcciones. De acuerdo con este último principio, esta tecnología puede aplicarse directamente a alimentos líquidos o a cualquier producto envasado sumergido en un fluido de presurización de baja compresibilidad. La presión aplicada al sistema permitiría un tratamiento isostático y uniforme independientemente del tamaño, forma y volumen del material procesado (Herrero & Romero de Avila, 2006; Calderón et al., 1998).

1.4.1. Efecto de la alta presión sobre la conformación de la enzima

En general el estado nativo de una enzima es estabilizado por diferentes tipos de interacciones tal como enlaces covalentes (incluyendo enlaces peptídicos y puentes disulfuro), puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, hidrofóbicas y

electrostáticas. La estructura primaria construida por interacciones covalentes permanece inalterada por las altas presiones (Fellows, 2000). En cuanto a la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las enzimas estas se ven modificadas por alteraciones en las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, y los puentes de hidrógeno. Bajo la influencia de la alta presión se induce la desnaturalización de la enzima por disrupción de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, con el consiguiente desdoblamiento de la cadena polipeptídica, lo que ocasiona que las regiones aromáticas e hidrófobas se expongan hacia el disolvente más polar durante el reordenamiento de su estructura. La magnitud de la desnaturalización depende de la hidrofobicidad o hidrofiliidad de las moléculas (Balasubramaniam, Barbosa-Cánovas & Lelieveld, 2016).

La estructura de la enzima también puede verse afectada a presiones más altas, superiores a 700 MPa, a través de un despliegue irreversible. Los cambios irreversibles pueden incluir la disociación de proteínas oligoméricas en sus subunidades, cambios conformacionales del sitio activo y agregación o gelificación de las proteínas debido a una disminución del volumen de disolución o la asociación de moléculas hidrófobas (Serment-Moreno et al., 2014).

Por otro lado, el desdoblamiento de la proteína durante el tratamiento por alta presión es seguido por la formación de agregados hidrofóbicos estabilizados por enlaces disulfuro después de la aplicación de presión. Por arriba de 300 MPa y en presencia de oxígeno, puede ocurrir una oxidación de los grupos sulfhidrilo, promoviendo la formación de puentes disulfuro intermoleculares por reacciones de intercambio -SH/S-S mediadas por el ataque nucleofílico de un enlace disulfuro por la forma ionizada S⁻ de un grupo -SH (Velazquez et al., 2005)

1.4.2. Mecanismo de inactivación de enzimas mediante alta presión hidrostática

La inactivación de algunas enzimas presurizadas a 100-300 MPa es irreversible. La reactivación después de la descompresión depende del grado de distorsión de la molécula. La posibilidad de reactivación disminuye con un aumento de la presión por encima de 300 MPa. Sin embargo, algunas enzimas pueden mostrar alta barorresistencia y

presiones mayores de 500 MPa se deben combinar con temperatura para producir la inactivación (Ravéntos Santamaría, 2003; Serment-Moreno et al., 2014). De acuerdo con Hendrickx et al. (1998) se pueden distinguir cuatro grupos de enzimas con base en la pérdida y la recuperación de la actividad por causa de la presión: 1) inactivadas completamente y de forma irreversible 2) inactivadas completamente y de forma reversible 3) inactivadas de forma incompleta e irreversible y 4) inactivadas de forma incompleta y reversible.

El mecanismo de inactivación enzimática inducida por alta presión es un fenómeno muy complejo y es hipotéticamente similar a la desnaturalización de las proteínas (Figura 2). La aplicación de presión puede inducir cambios reversibles como se muestra en B de la Figura 2, o irreversibles, según A en la Figura 2, y el despliegue parcial o completo de la enzima nativa. Esto eventualmente conduce a un cambio en la actividad enzimática ya que su actividad está relacionada con la estructura de su sitio activo (Chakraborty et al., 2014).

En los tejidos intactos, generalmente las enzimas y el sustrato se encuentran separados por compartimientos de la membrana celular, que pueden ser destruidos por la aplicación de presión. Los daños producidos en las membranas por presión y la consiguiente liberación de enzimas y sustrato producen el contacto entre ambos. A su vez, la reacción enzimática que resulta de este contacto se puede ver acelerada o desacelerada por la presión, en función de la reacción catalizada por la enzima. En lo que respecta a la presión de inactivación, parece que hay un mínimo por debajo del cual no se produce la inactivación de la enzima o, si ocurre, lo hace de forma muy débil. Cuando la inactivación excede el mínimo, la inactivación de la enzima para un intervalo de tiempo específico aumenta hasta que se completa a una presión determinada.

El nivel de inactivación enzimática durante el tratamiento de presión es afectado por la intensidad del proceso (por ejemplo, nivel de presión, nivel de temperatura, nivel de mantenimiento presión-temperatura), concentración de la enzima, pureza de la enzima, complejidad del ambiente tal como condición de pH, concentración de sal, molaridad, tipo

de amortiguador, presencia de inhibidores/activadores composición del medio del alimento, matriz alimentaria, entre otros (Terefe et al., 2016).

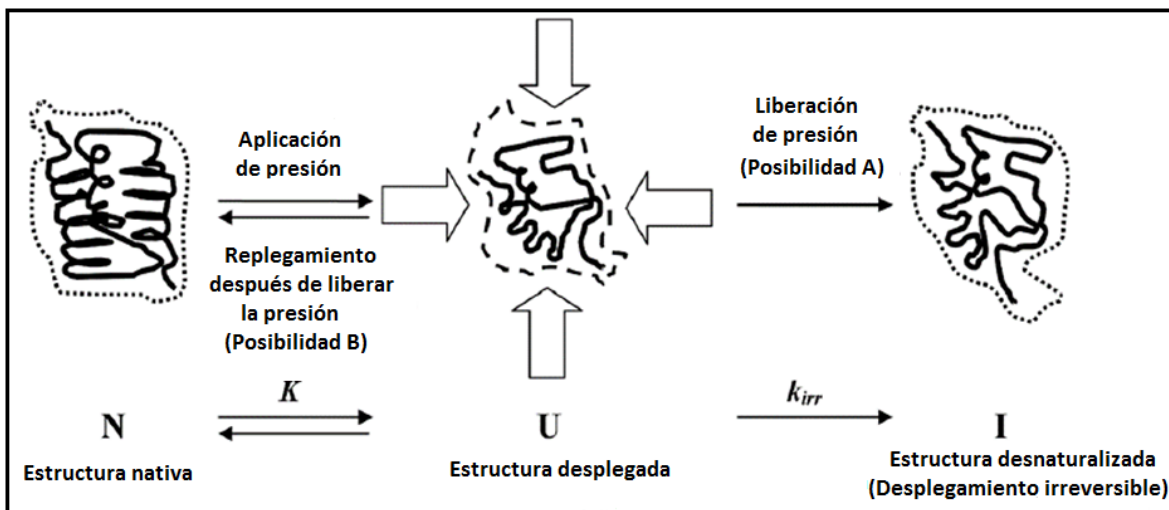


Figura 2. Modelo propuesto para el efecto de la alta presión sobre la estructura conformacional de una enzima (Chakraborty et al., 2014).

Para algunas enzimas parece que existe una presión máxima por encima de la cual no se produce una inactivación adicional tal es el caso de la polifenoloxidasas de aguacate la cual se sometió a 689 MPa de presión durante 4 ciclos de 5 min observando una reducción de la actividad de solo el 15 % (Velazquez et al., 2005). Esto se atribuye a que una porción de las enzimas se inactiva de forma irreversible, mientras que otra parte se convierte en una forma muy resistente a la presión. Cuando el sistema se despresuriza, la fracción barorresistente regresa al estado de equilibrio, mientras que la enzima inactivada de forma irreversible se mantiene igual. Se ha sugerido que la eficiencia de la alta presión en la inactivación de enzimas puede aumentar por la aplicación de ciclos de presión. Aplicaciones sucesivas de altas presiones pueden producir una inactivación superior de muchas enzimas y una actividad residual menor que después de la aplicación de un proceso continuo para el mismo tiempo total de tratamiento (Raventos Santamaría, 2003).

1.5. Calorimetría de barrido diferencial

La calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés) es una de las técnicas que se utiliza con mayor frecuencia en el estudio de la estabilidad térmica de las proteínas ya que es una de las más eficientes para determinar los parámetros termodinámicos del despliegue térmico de proteínas (Johnson, 2013; Beldarraín, 2001).

La conversión de una proteína del estado nativo al desnaturalizado mediante calor es un fenómeno cooperativo y se acompaña de una absorción significativa de calor, visto como un pico endotérmico en el termograma DSC. Los parámetros obtenidos del termograma DSC incluyen la entalpía de desnaturalización (ΔH), el pico o la temperatura de desnaturalización (T_m) y el ancho a la altura del pico medio, llamada temperatura media ($T^{1/2}$) (Figura 3). La ΔH es un estimado de la energía térmica requerida para desnaturalizar una proteína y es medida del área bajo la curva del pico del termograma. La T_m es una medida de la estabilidad térmica de las proteínas. Mientras que $T^{1/2}$ es un estimado de la cooperatividad del desdoblamiento de la proteína. Si la desnaturalización ocurre entre un intervalo estrecho de temperatura (valor bajo de $T^{1/2}$), la transición es considerada altamente cooperativa (Damodaran & Paraf, 1997; Wright, 1982).

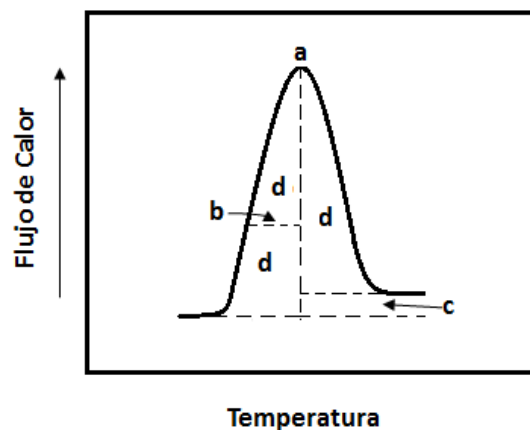


Figura 3. Termograma típico DSC que muestra (a) temperatura máxima del pico, (b) temperatura media, (c) cambio en la capacidad calorífica y (d) cambio entálpico (abarca toda el área bajo la curva).

El análisis por DSC puede verse afectado por varios factores como son: los instrumentales (geometría del porta muestras, atmósfera del horno, material del crisol) y los relacionados con las características de la muestra (tamaño de partícula, grado de empaquetamiento, masa de la muestra, conductividad térmica, capacidad calorífica).

2. JUSTIFICACIÓN

Las tecnologías térmicas convencionales para la conservación de alimentos como la pasteurización aseguran una completa inactivación de enzimas y microorganismos patógenos en los alimentos, sin embargo, se ha puesto en juicio la disminución del valor nutritivo de los alimentos ya que compuestos lábiles como las vitaminas, se pierden durante este proceso, además características sensoriales como color, sabor y textura también se ven afectados.

En comparación con estas tecnologías convencionales de conservación de alimentos, el procesamiento por alta presión a temperaturas de refrigeración, medio ambiente o con calentamiento moderado, inactiva los microorganismos patógenos y deterioradores de alimentos con un mínimo cambio en su textura, color y sabor. Este proceso ha llegado al consumidor en respuesta a una fuerte demanda en los mercados de países desarrollados por productos mínimamente procesados y conservados sin uso de aditivos químicos.

Es por eso que se requiere de mayor investigación de esta tecnología, para desarrollar las herramientas necesarias que permitan la formulación de productos y optimización de procesos. Para ello es necesario de un conocimiento más preciso del mecanismo de inactivación de las enzimas y microorganismos que deterioran los alimentos causado por la presurización.

3. HIPÓTESIS

El tratamiento ha HHP provocará cambios en la actividad enzimática de las enzimas catalasa, polifenoloxidasa y peroxidasa.

4. OBJETIVO

Analizar el efecto del tratamiento HHP sobre la estabilidad de las enzimas oxidoreductasas, a través de la medición de su actividad y la determinación de los perfiles calorimétricos, para conocer las condiciones que conducen a su inactivación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Las enzimas estudiadas fueron catalasa de hígado de bovino 2-5 kU/mg (EC 1.11.1.6; Sigma-Aldrich, EE.UU.), polifenoloxidasas de champiñón 50 kU/mg (EC 1.14.18.1; Sigma-Aldrich, EE.UU.) y peroxidasa de rábano 150 kU/mg (EC 1.11.1.7; Sigma-Aldrich, Suiza), adquiridas como polvos liofilizados. Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

5.1. Cuantificación de proteína soluble

Para este propósito se prepararon las siguientes disoluciones; 2.165 mg/mL de polifenoloxidasas, 5.6 mg/mL de catalasa y 5.2 mg/mL de peroxidasa. Las enzimas fueron disueltas en amortiguador de fosfatos 50 mmol/dm³, pH 6.5 (condición de pH óptimo, reportada por el proveedor).

La concentración de proteína soluble se determinó empleando el método de Lowry et al. (1951). A 0.1 mL de cada una de las disoluciones enzimáticas se les añadió 0.9 mL de agua destilada. Se adicionaron 5 mL del reactivo de Lowry el cual está compuesto de sulfato cúprico (J. K. Baker, México) al 1 % (m/v), tartrato de sodio y potasio (Mallinckrodt, Francia) al 2 % (m/v) y carbonato de sodio (J. K. Baker, EE.UU.) al 2 % (m/v) en NaOH 0.1 mol/dm³. La mezcla se agitó en un vórtex (Cole-Parmer, EE.UU.) durante 5 s y se dejó reposar a 25 °C durante 15 min. Posteriormente se añadieron 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, EE.UU.) diluido 1:1 con agua destilada y se dejó reposar durante 30 min a la misma temperatura. La absorbancia se leyó a 500 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10UV). Como blanco se utilizó agua destilada y se preparó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich, EE.UU.) como estándar, en concentraciones de 0 a 0.6 mg/mL, las cuales se trataron bajo las mismas condiciones.

5.2. Determinación de la masa molecular

La masa molecular de las enzimas fue determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La composición del gel fue 12.5 %

T, 2.6 % C y se montó un equipo mini-PROTEAN (Bio-Rad). A partir de las disoluciones preparadas como se describió en la sección 5.1 y las concentraciones experimentales se tomó una alícuota de 10 μL para PFO, 5 μL para CAT y 5 μL para POD y se inyectaron en los pocillos del gel. La prueba se corrió a 120 V durante 1.5 h. La composición del amortiguador de corrida, los procedimientos de teñido y desteñido se siguieron de acuerdo con lo descrito en el manual de Bio-Rad. Los marcadores moleculares utilizados fueron lisozima (14.4 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), albúmina sérica (66.2 kDa) y fosforilasa (97.4 kDa).

5.3. Determinación de actividad enzimática

5.3.1 Actividad enzimática de la polifenoloxidasas

Se usó el método de Yi et al. (2011). Se mezclaron 0.02 mL de disolución de enzima polifenoloxidasas con concentración de 1.0 mg/mL con 2.98 mL de la disolución de sustrato que contenía 0.120 mol/dm³ de catecol (Sigma-Aldrich, Japón) en amortiguador de fosfatos 0.05 mol/dm³ a pH 6.5. Para el blanco, se calentaron 0.02 mL de la disolución de polifenoloxidasas a 95 °C durante 2 min para inactivar completamente la enzima y se adicionaron 2.98 mL de disolución de sustrato. La absorbancia de la mezcla de reacción fue medida a 410 nm cada 10 s por 5 min a una temperatura de 25 °C en un espectrofotómetro (Genesys 10UV). La actividad enzimática fue calculada usando la pendiente de la parte lineal de la curva. Una unidad de actividad (UPFO) fue definida como el cambio de absorbancia por minuto. La actividad específica fue expresada en unidades de actividad por masa en mg de proteína (UPFO/mg).

5.3.2 Actividad enzimática de la peroxidasa

Se usó el procedimiento de Baquero, Castro & Narváez (2005). La actividad de la peroxidasa fue estimada midiendo el incremento de la absorbancia a 470 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10UV) cada 5 s durante 2 min. En la celda de medida, para un volumen final de 2 mL, se colocaron 100 μL de disolución enzimática (3-5 μg de proteína), 100 μL una mezcla de guayacol (Sigma, China) y H₂O₂ en una concentración de 20 y 10 mmol/dm³, respectivamente, disueltas en amortiguador de fosfatos 50 mmol/dm³, pH 6.5

y 1.8 mL de amortiguador de fosfatos 50 mmol/dm³, pH 6.5; esta mezcla se mantuvo a 25 °C. Para el blanco la disolución enzimática fue previamente llevada a ebullición en un baño maría a 92 °C durante 10 min para asegurar la desnaturalización de la enzima y, en consecuencia, la no reacción con el sustrato. Una unidad de actividad (UPOD) fue definida como el cambio en una unidad de absorbancia por minuto. La actividad específica fue expresada en unidades de actividad por masa en mg de proteína (UPOD/mg).

5.3.2 Actividad enzimática de la catalasa

Para la medida de actividad de la catalasa se empleó el método permanganométrico (Baquero et al., 2005). La mezcla de reacción tuvo un volumen final de 1 mL, y estuvo formada por 100 µL de disolución enzimática (10 a 20 µg de proteína), H₂O₂ 500 mmol/dm³ preparado en amortiguador fosfatos 50 mmol/dm³, pH 6.5; esta mezcla se mantuvo a 40 °C. Luego de 5 min de reacción se adicionaron 250 µL de H₂SO₄ (1:3) para desnaturalizar la enzima y detener la descomposición del H₂O₂. Al final, se tituló el H₂O₂ no descompuesto con 10 mmol/dm³ de KMnO₄ (Merck, México) estandarizado. Una unidad de actividad (UCAT) fue definida como la cantidad en µmol H₂O₂ descompuesto/min. La actividad específica fue expresada en unidades de actividad por masa en mg de proteína (UCAT/mg).

El efecto del pH y la temperatura, dos variables que se sabe afectan la actividad enzimática, fueron medidos de la misma manera. Para el pH se manejó un intervalo de 2 a 8 y una temperatura de 60 °C para diferentes tiempos de exposición de 0.5 a 15 min. Las pruebas se realizaron por duplicado (n = 2).

5.4. Análisis térmico

El análisis térmico se realizó a partir de la técnica de DSC en un equipo MICRODSC7 EVO (Setaram, Francia). Las enzimas fueron disueltas en amortiguador de fosfatos 50 mmol/dm³, pH 6.5 a una concentración de 4 % de proteína soluble calculado con base en los resultados obtenidos con el método de Lowry (Sección 5.1). En la celda de ensayo se pesaron 0.800 ± 0.01 g de cada una de las disoluciones enzimáticas y en la celda de referencia se colocó el regulador de fosfatos 50 mmol/dm³. Las endotermas se obtuvieron

a una velocidad de barrido de 0.5 °C/min con una rampa de temperatura de 25 a 90 °C. Se hicieron ensayos regulador - regulador bajo las mismas condiciones que las disoluciones enzimáticas para restarlas de las endotermas de la muestra y calcular los valores térmicos de entalpía, temperatura de desnaturalización, temperatura media y cambio en la capacidad calorífica. Las pruebas se realizaron por duplicado para catalasa, mientras que para polifenoloxidasa y peroxidasa solo se sometió una prueba por tratamiento.

5.4.1 Tratamiento de datos

Los termogramas de flujo de calor en función de la temperatura obtenidos experimentalmente se evaluaron con el software OriginPro 9.1. Después de la corrección de la línea base, es posible obtener el cambio entálpico (ΔH) y la temperatura máxima (T_m), para cada análisis (Jie, 2012). La capacidad calorífica puede determinarse dividiendo el flujo de calor de la velocidad de calentamiento de la muestra (Moríntale, 2013). Otro parámetro medido directamente de la transición del pico es el ancho a la altura del pico medio, llamada temperatura media ($T^{1/2}$). Los cálculos se detallan en el Anexo A.

5.5. Aplicación de altas presiones hidrostáticas a enzimas oxidoreductasas

Para el procesamiento de las muestras se utilizó el sistema de aplicación de altas presiones hidrostáticas (Elmhurst Systems Engineering, EE.UU.) ubicado en el departamento de alimentos y biotecnología, edificio E, laboratorio 313, UNAM. El equipo HHP tiene un tiempo máximo de tratamiento de 10 min. Por ello, se realizaron ciclos de presión, es decir, la muestra fue presurizada durante 10 min, se despresurizó y se volvió a presurizar hasta obtener el tiempo de exposición señalado en la sección 5.5.2.

5.5.1 Preparación de las muestras

Las muestras se disolvieron en amortiguador de fosfatos 50 mmol/dm³, pH 6.5, a una concentración de proteína 4 % y 0.01 % para catalasa, 4 % y 0.003 % para peroxidasa y 4 % y 0.1 % para polifenoloxidasa. Se tomó 1 mL de cada una de las disoluciones enzimáticas y se colocaron en una bolsa de polietileno de 15 cm de largo y 3 cm de ancho y se selló al vacío (mini Jumbo DS, Henkelman, Países Bajos). La bolsa de polietileno con la muestra se colocó en hielo antes del tratamiento por HHP. Las muestras de concentración 4 % fueron

usadas para el análisis calorimétrico, mientras que las de concentración 0.01 %, 0.003 % y 0.1 % de catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasa se utilizaron para la determinación de la actividad enzimática residual. Adicionalmente al procesamiento HHP, las enzimas fueron sometidas a un tratamiento térmico de pasteurización de 63 °C/30 min, con el fin de comparar ambos tratamientos.

5.5.2 Establecimiento de las condiciones de aplicación de altas presiones hidrostáticas

El tratamiento por altas presiones hidrostáticas aplicado a cada una de las enzimas oxidoreductasas se describe a continuación, para todos los casos la presión fue de 600 MPa, variando el tiempo de exposición. Para la catalasa la presión se mantuvo a 30, 40, 50 y 60 min, para la peroxidasa se mantuvo a 30 y 60 min y para la polifenoloxidasa se mantuvo a 30 min. El hecho de que se escogieran tratamientos puntuales para las enzimas POD y PFO, fue debido a que la cantidad de enzima fue la limitante.

El equipo de altas presiones tiene un tiempo máximo de tratamiento de 10 min. Por ello, se realizaron ciclos de presión, es decir, la muestra fue presurizada durante 10 min, se despresurizó y se volvió a presurizar hasta obtener el tiempo de exposición para cada tratamiento, descrito anteriormente.

5.5.3 Tratamiento de las muestras

Después del tratamiento por HHP las disoluciones enzimáticas fueron recuperadas de la bolsa de polietileno y almacenada en tubos Eppendorf a 4 °C. Dentro de las primeras 2 h se midió su actividad enzimática residual y se sometió a análisis térmico. Cada tratamiento se llevó a cabo por duplicado para el caso de catalasa, para peroxidasa y polifenoloxidasa solo se realizó una prueba por lo mencionado anteriormente. Muestras no tratadas a altas presiones fueron usadas como control. El remanente de las muestras presurizadas con concentración 4 % se guardó en congelación para electroforesis SDS-PAGE. La metodología que se llevó a cabo fue la misma que describió en la Sección 5.2.

Los datos se procesaron estadísticamente empleando la metodología de análisis de varianza de una vía para un valor de $p < 0.05$. Cuando se encontró alguna diferencia estadística la prueba del rango múltiple de Duncan con $\alpha = 0.05$.

5.5.4 Diagrama de bloques experimental

La Figura 4 muestra el protocolo experimental seguido para la determinación del efecto que tiene el tratamiento de altas presiones hidrostáticas sobre las enzimas catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasa descrita en la Sección 5.5.

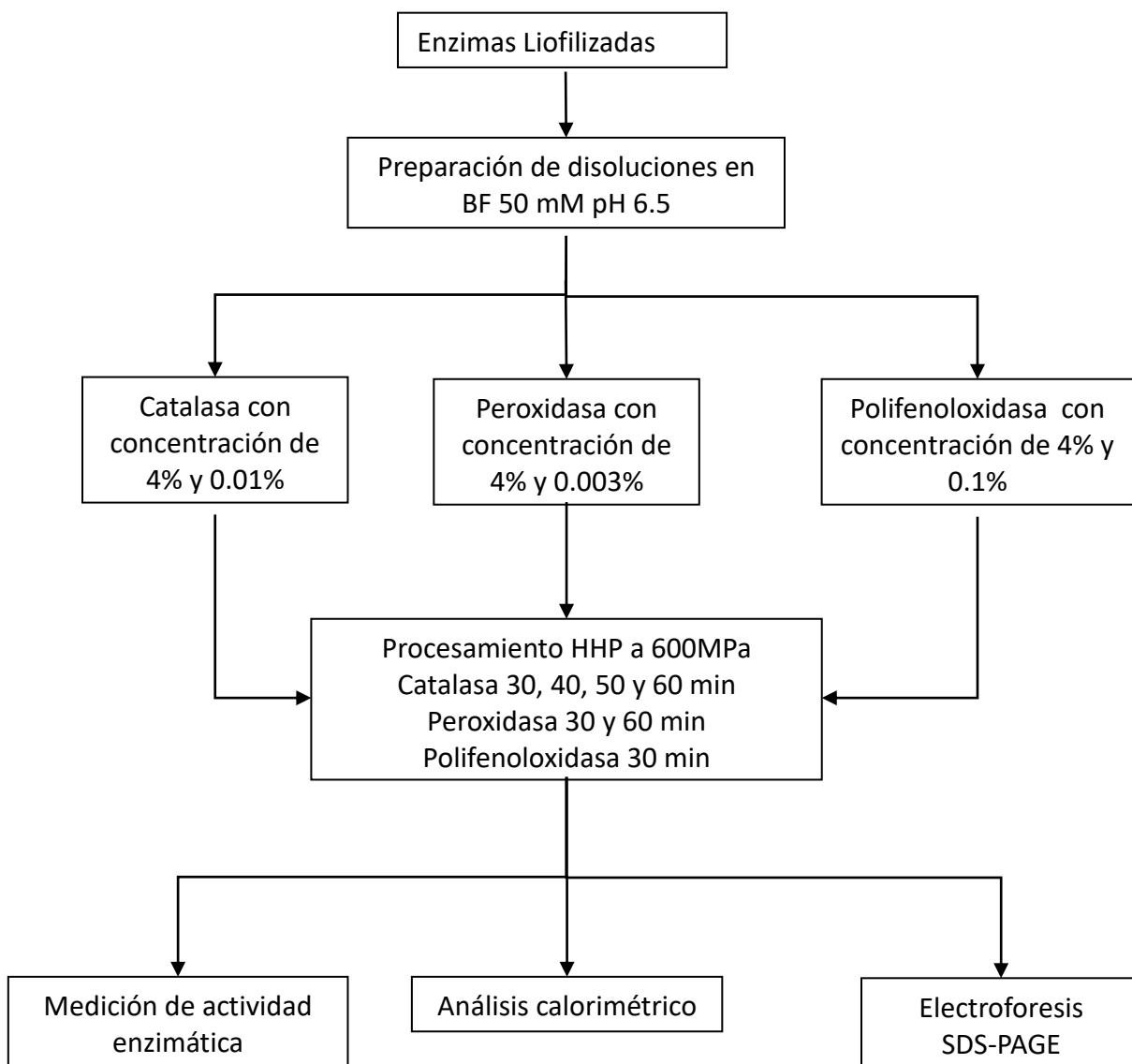


Figura 4. Diagrama esquemático seguido para el análisis del efecto la presión hidrostática sobre las enzimas oxidoreductasas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cuantificación de la concentración de proteína soluble en enzimas oxidoreductasas

La concentración de proteína soluble en las tres enzimas se muestra en la Tabla 1. Es de gran importancia considerar la concentración de proteína para las siguientes determinaciones. Se puede observar que las enzimas que tienen mayor concentración de proteína soluble son la peroxidasa y la catalasa.

Tabla 1. Concentración de proteína de las enzimas catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas medida por el método de Lowry.

	Concentración teórica (mg/mL)	Concentración experimental (mg/mL)	Proteína soluble (%)
Catalasa	5.60 ± 0.02	5.52 ± 0.05	99
Peroxidasa	5.20 ± 0.03	5.13 ± 0.09	99
Polifenoloxidasas	2.16 ± 0.01	1.34 ± 0.05	62

6.2. Determinación de la masa molecular de las enzimas oxidoreductasas

En la Figura 5 se muestra la masa molecular de las enzimas de trabajo, éste análisis se realizó con la finalidad de observar si había cambios en la masa molecular de las enzimas antes y después de ser tratadas mediante HHP y temperatura. Para la catalasa se observa una masa molecular de 58.6 kDa. Esta enzima tiene cuatro subunidades de la misma masa molecular, lo que produce un total de 234.4 kDa. Las peroxidasas tienen una masa molecular de 40-94 kDa, en este estudio la masa molecular fue 64.3 kDa. Para la polifenoloxidasas se observan dos bandas una con masa molecular de 43.6 kDa y la otra de 14.4 kDa. Se sabe que tiene dos subunidades de 43 kDa y dos subunidades de 14 kDa, lo cual da un total de 116 kDa. En todos los casos la masa molecular coincide con la especificación de su proveedor (Sigma-Aldrich). Sin embargo, a pesar de mostrar bandas bien definidas se observa que las enzimas no son totalmente puras ya que se muestran bandas a lo largo de los carriles b, c y d; correspondientes a otras proteínas que no especifica el proveedor.

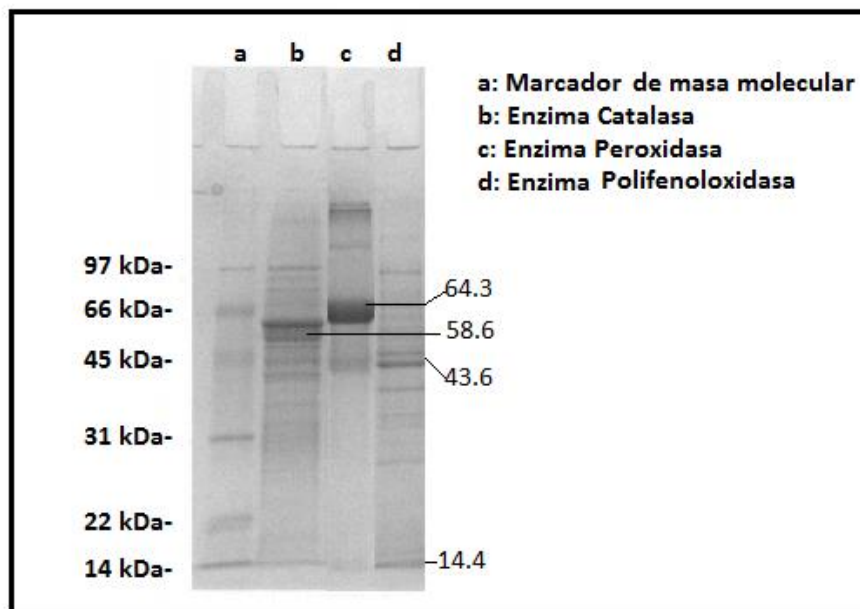


Figura 5. Determinación de la masa molecular de las enzimas oxidoreductasas por electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, 12.5 % T).

6.3. Efecto de pH y temperatura sobre la actividad enzimática de enzimas oxidoreductasas

En la Figura 6 se muestran los datos de actividad enzimática normalizada, calculada como el cociente de actividad enzimática a cualquier pH entre aquella a pH óptimo de 6.5, el cual fue usado como control. Los datos muestran una disminución gradual de la actividad enzimática de las tres enzimas a pH de 2 y 4 en comparación con el control, este comportamiento es debido a un incremento en la repulsión electrostática de los residuos de aminoácidos de las proteínas el cual determina su desplegamiento.

El máximo de actividad ocurre en un intervalo de pH entre 6.5-8 a temperatura de 25 °C para las tres enzimas. Sin embargo, a pesar de que a un pH de 8 se dieran los valores más altos de actividad, el pH de 6.5 fue tomado como control, debido a que los datos de absorbancia a pH 6.5 fueron más homogéneos ya que su valor de correlación fue de 0.99 comparado con la correlación de 0.90 para pH 8. Además de que a valores extremos de pH alcalino la proteína puede sufrir desnaturalización, por lo que para no adicionar factores externos al procesamiento HHP, se decidió usar como control el valor de pH 6.5.

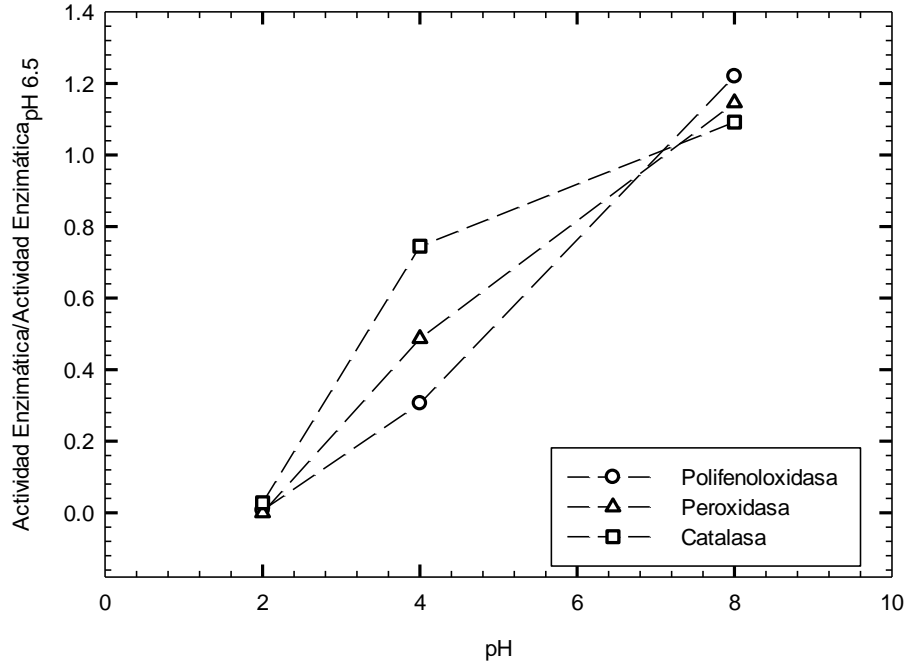


Figura 6. Relación entre la actividad enzimática de la catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas y la actividad enzimática a pH 6.5 (control) a diferentes valores de pH, medidas a 25 °C.

En la Figura 7 se observa el efecto del tratamiento térmico a 60 °C, teniendo como control una temperatura de 25 °C. A los 3 min de exposición a 60 °C para las enzimas catalasa y polifenoloxidasas la actividad disminuye a menos de 50 % y llegan hasta menos del 5 % a 15 min y 6 min de tratamiento, respectivamente. Sin embargo, para la peroxidasa la actividad permanece estable a 60 °C durante todo el tiempo de exposición. Se concluye que la peroxidasa es sensible a valores de pH menores de 4 pero es estable a 60 °C por 10 min. De acuerdo con los resultados obtenidos se trabajarán disoluciones enzimáticas a pH de 6.5 y temperatura de 25 °C.

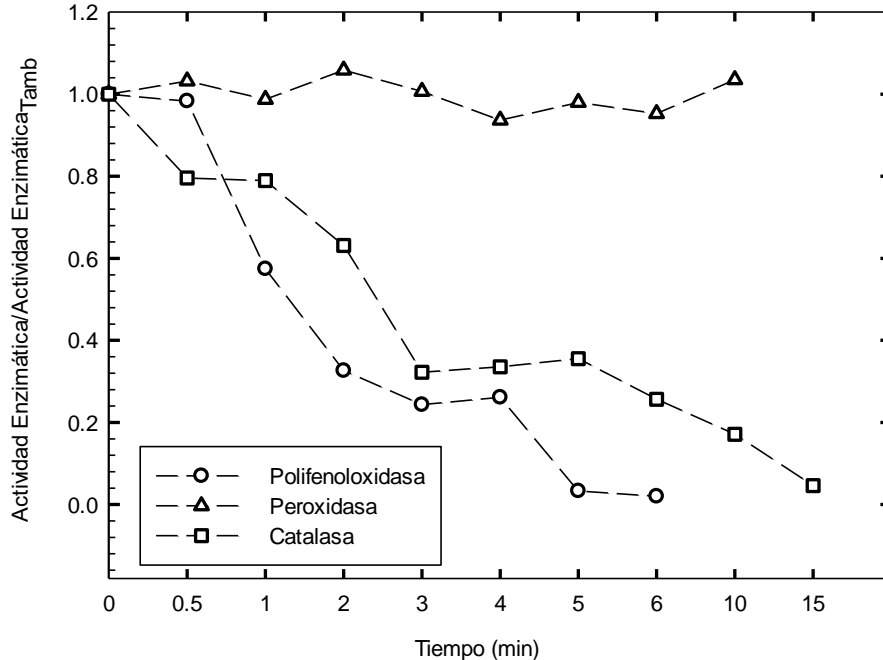


Figura 7. Relación entre la actividad enzimática de la catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasa y la actividad enzimática a 25°C (control) en función del tiempo de incubación a 60 °C.

6.4. Efecto de la aplicación de HHP y temperatura sobre actividad enzimática de enzimas oxidoreductasas

El efecto del procesamiento HHP y temperatura sobre el porcentaje de actividad residual de las enzimas catalasa, polifenoloxidasa y peroxidasa se muestran en la Tabla 2. Para el caso de la catalasa se observa una tendencia decreciente de la actividad enzimática mayor al 50 % para 30, 40, y 50 min después de aplicar la alta presión. Para el caso de la muestra presurizada durante 60 min, se observa un ligero incremento de actividad residual hasta 52 %, sin embargo, no hay diferencia significativa con los demás tratamientos de presión. También se observa que para el caso de la muestra de catalasa tratada térmicamente la actividad disminuye en un 90 %. Para la polifenoloxidasa se muestra una disminución de la actividad de casi un 20 % a 30 min de exposición a altas presiones y una disminución de más del 90 % cuando es tratada térmicamente. Para la enzima peroxidasa se observa un

decremento de la actividad de aproximadamente el 50 % para un tratamiento de presión durante 30 y 60 min al igual que para la muestra tratada por calor.

La actividad alta de las enzimas tratadas por HHP era de esperarse ya que se ha reportado, que peroxidasa, catalasa, fosfatasa y polifenoloxidasas son resistentes a presiones de 600 - 700 MPa y 25 °C (Palou et al., 1999; López-Malo et al., 1998). También se observa que los tratamientos de alta presión para las enzimas catalasa y polifenoloxidasas muestran diferencias significativas con las muestras tratada térmicamente, mientras que para la enzima peroxidasa no se presenta esta diferencia. Estos datos deben corroborarse con los datos de entalpía generados a través de DSC, mostrados en la siguiente sección.

Tabla 2. Porcentaje de actividad residual para catalasa, polifenoloxidasas y peroxidasa a diferentes tratamientos de HHP y a temperatura de 63 °C/30 min.

Tratamiento	Tiempo (min)	Catalasa	Polifenoloxidasas	Peroxidasas
Ninguno	0	100 ± 5.52 ^a	100 ± 14.69 ^a	100 ± 9.96 ^a
600 MPa	30	47.3 ± 9.22 ^b	83.95 ± 1.94 ^b	42.53 ± 0.31 ^b
600 MPa	40	39.64 ± 3.89 ^b	ND	ND
600 MPa	50	32.71 ± 7.34 ^b	ND	ND
600 MPa	60	51.72 ± 7.56 ^b	ND	58.51 ± 7.05 ^b
63 °C	30	8.92 ± 2.72 ^c	3.19 ± 2.72 ^c	49.58 ± 9.16 ^b

ND: No determinados. Las medias con letras diferentes indican una diferencia estadística con $\alpha = 0.05$ de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan (por columna) y $n = 3$.

6.5. Efecto de la aplicación de HHP y temperatura sobre el perfil calorimétrico de enzimas oxidoreductasas

Los termogramas observados en la Figura 8 corresponden a la catalasa de hígado de bovino en su forma nativa y después de ser tratada con HHP y térmicamente a 63 °C durante 30 min. Las muestras CAT30, CAT40, CAT50 y CAT60 presentaron una T_m de 59.9 ± 0.84 °C, 60.9 ± 0.83 °C, 60.8 ± 0.42 °C y 59.1 ± 0.96 °C respectivamente, correspondientes a su temperatura de desnaturalización. Estos valores de temperatura no presentan diferencia significativa con la muestra control (CATC) con valor de T_m de 58.1 ± 0.04 °C este dato concuerda con lo obtenido por Bartoszek & Kściuczyk (2005). Sin embargo, para la muestra que recibió tratamiento térmico (CATT) se observa que aparece una endoterma en el intervalo de 64-78 °C con un valor de T_m de 71.8 ± 0.15 °C

presentando evidente diferencia significativa con la muestra control y las muestras tratadas con HHP.

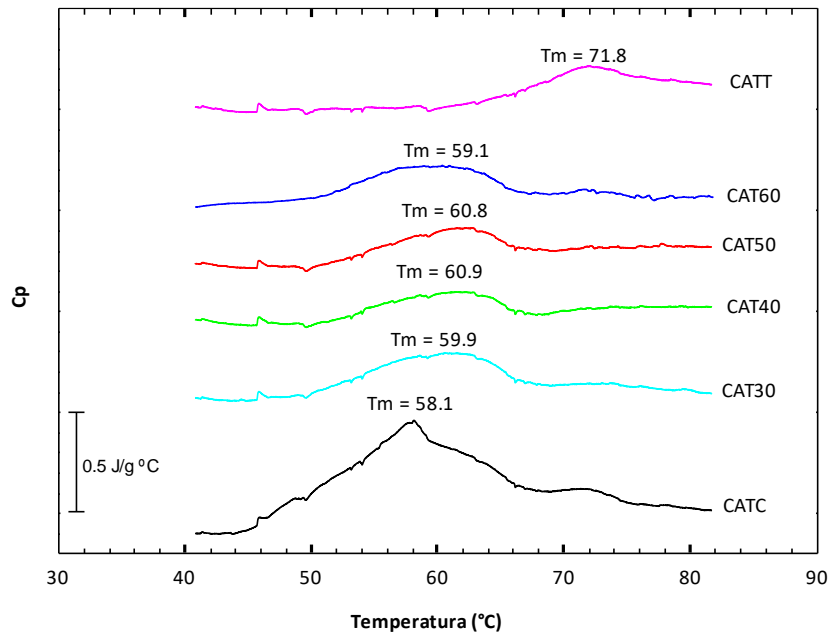


Figura 8. Termogramas de catalasa con tratamiento HHP a 600 MPa durante 30min (CAT30), 40 min (CAT40), 50 min (CAT50) y 60 min (CAT60) y una muestra tratada a 63°C/30min (CATT).

Debido a las diferencias de inicio y término de los termogramas, ocasionado por los diferentes tratamientos realizados, la variación de los datos del cambio de capacidad calorífica no muestra una tendencia clara, por lo cual el análisis se centrará en los valores de T_m , ΔH y $T^{1/2}$. En la Tabla 3 se observa una disminución de la entalpía hasta en un 30 % para las muestras CAT30, CAT40 Y CAT50, mientras que para la muestra CAT60 y CATT fue de 50 % y 25 %, respectivamente. Esto es debido a que las interacciones hidrofóbicas se vieron favorecidas, incrementando las interacciones proteína-proteína, formando agregados. Este resultado se comprueba por la pérdida de solubilidad en un 78 % para las muestras tratadas con HHP (Anexo B) y para la muestra tratada con calor la solubilidad se pierde casi totalmente. De esta manera la concentración de proteína fue disminuyendo limitando la cantidad de proteína que sufre desnaturalización y por lo tanto se refleja en una disminución en la entalpía.

El aumento de T_m de 24 %, respecto al control, para la muestra tratada térmicamente confirma que las interacciones hidrofóbicas se vieron favorecidas formando proteínas más estructuradas que requieren alta temperatura para su desnaturalización. Estos cambios resultan en el aumento del valor de $T^{1/2}$, demostrando una pérdida de la agudeza del pico de la transición y mostrando formas achatadas y alargadas para el caso de las muestras tratadas con HHP, mientras que para la muestra tratada con calor al ser un tratamiento más severo el valor de $T^{1/2}$ y entalpía son más pequeños estableciendo que estas modificaciones se dan con mayor rapidez.

Tabla 3. Tratamientos y parámetros térmicos de la enzima catalasa.

Muestra	Tratamiento	Tiempo (min)	T_m (°C)	$T^{1/2}$ (°C)	ΔH (J/g)	ΔC_p (J/g °C)
CATC	NINGUNO	0	58.1 ± 0.04^a	6.04 ± 0.02^a	4.75 ± 0.47^a	0.182 ± 0.03^a
CAT30	600 MPa	30	59.9 ± 0.84^a	6.48 ± 0.21^a	1.83 ± 0.13^b	0.072 ± 0.02^b
CAT40	600 MPa	40	60.9 ± 0.83^a	6.83 ± 0.17^a	1.54 ± 0.36^b	0.015 ± 0.01^b
CAT50	600 MPa	50	60.8 ± 0.42^a	6.84 ± 0.02^a	1.48 ± 0.14^b	0.083 ± 0.01^b
CAT60	600 MPa	60	59.1 ± 0.96^a	6.32 ± 0.28^a	2.52 ± 0.23^c	0.066 ± 0.05^b
CATT	63 °C	30	71.8 ± 0.15^b	3.95 ± 0.21^b	1.21 ± 0.31^b	0.073 ± 0.02^b

Las medias con letras diferentes indican una diferencia estadística con $\alpha = 0.05$ de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan (por columna).

En la Figura 9 se presentan los termogramas de la enzima polifenoloxidasa su forma nativa y después de ser tratada a 600 MPa/30 min y térmicamente a 60°C/ 30 min. Las muestras POFC Y PFO30 presentaron una T_m de 61.5 y 61.9 °C, respectivamente, mientras que la muestra PFOT no presentó señal durante la transición, como resultado de la completa desnaturalización de la enzima.

La Tabla 4 muestra los parámetros termodinámicos de la polifenoloxidasa en donde se observa que los valores de entalpía disminuyen al 38 % para la muestra tratada con HHP y al 100 % para la muestra tratada térmicamente, lo cual se explica por el carácter polar de la proteína ya que al contener residuos más polares se incrementa el efecto de hidratación de la proteína, incrementando las interacciones dipolo-dipolo, ion-dipolo y dipolo-dipolo inducido. Esto resultó en un reordenamiento molecular motivado por el agua disminuyendo la estructuración de la proteína y favoreciendo su transición durante el

calentamiento como se muestra en los termogramas. El valor de $T^{1/2}$ disminuye y favorece la cooperatividad del proceso.

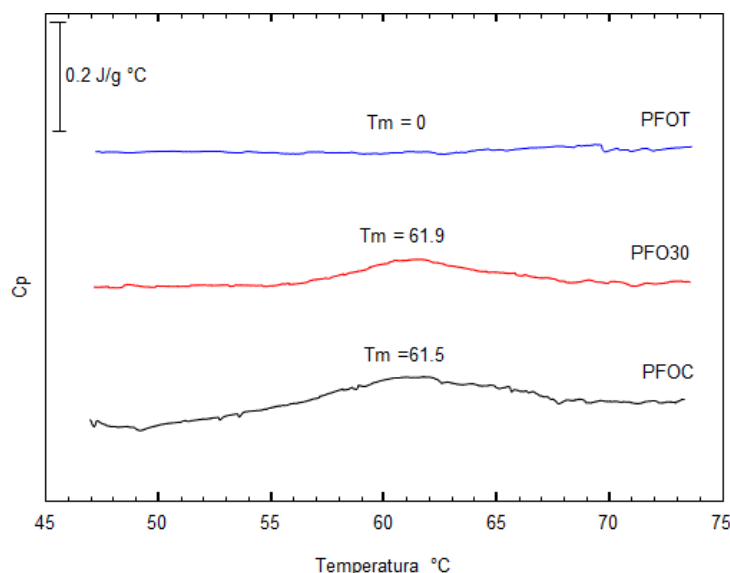


Figura 9. Termogramas de polifenoloxidasa con tratamiento HHP a 600 MPa/30 min (PFO30) y tratada térmicamente a 63°C/30min (PFOT).

Tabla 4. Tratamientos y parámetros térmicos de la enzima polifenoloxidasa.

Muestra	Tratamiento	Tiempo (min)	T _m (°C)	T ^{1/2} (°C)	ΔH (J/g)	ΔC _p (J/g °C)
PFOC	NINGUNO	0	61.49	5.05	1.98	0.004
PFO30	600 MPa	30	61.89	3.34	0.75	0.041
PFOT	63 °C	30	0	0	0	0

La Figura 10 corresponde a los termogramas de la enzima peroxidasa después de ser tratada con HHP y térmicamente, teniendo como control la enzima sin ningún tratamiento. Estas pruebas muestran dobles transiciones debido a diferencias en la estabilidad estructural de los dos dominios de la proteína, para fines prácticos se calcularon los parámetros termodinámicos del primer pico. Las muestras PODC, POD30 y POD60 presentaron una T_m de 60.3, 56.3, 56.3 °C respectivamente, como se muestra en la Tabla 5. El valor de T_m de la muestra PODT fue de 71.5 °C. El valor de entalpía para las muestras tratadas con HHP a 30 y 60 min disminuye al 50 %, esto es ocasionado al igual

que con la catalasa, por el aumento en las interacciones hidrofóbicas, disminuyendo la solubilidad de la proteína, traducido en un aumento en el valor de $T^{1/2}$ para ambos casos.

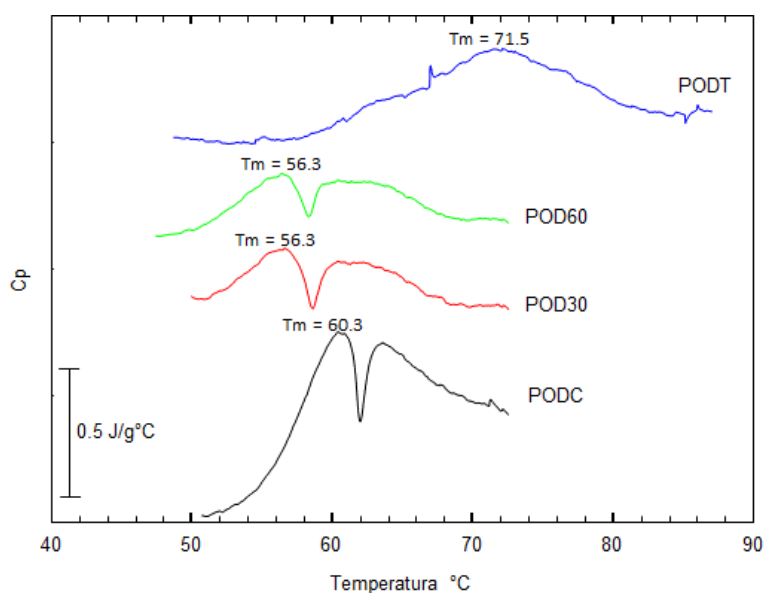


Figura 10. Termogramas de peroxidasa con tratamiento HHP a 600 MPa durante 30 min (POD30) y 60 min (POD60) y una muestra tratada térmicamente a 63°C/30min (PODT).

Mientras que para el caso de la muestra tratada térmicamente su solubilidad se ve disminuida al 100 %, esto ocasionado por el incremento de las interacciones proteína-proteína, formando moléculas más estructuradas y por lo tanto hay un incremento del 19 % en el valor de T_m , en cuanto al valor de entalpía esté se ve incrementado ya que los dominios de la proteína que se asocian por las interacciones proteína-proteína aumentando la energía necesaria para que se lleve a cabo la transición y por lo tanto incrementando el valor de $T^{1/2}$. Además, se observa que la enzima peroxidasa es estable en un intervalo de 30 a 60 min de presión a 600 MPa.

Tabla 5. Tratamientos y parámetros térmicos de la enzima peroxidasa.

Muestra	Tratamiento	Tiempo (min)	T _m (°C)	T ^{1/2} (°C)	ΔH (J/g)	ΔC _p (J/g °C)
PODC	NINGUNO	0	60.27	0.84	1.70	0.329
POD30	600 MPa	30	56.33	2.08	0.85	0.027
POD60	600 MPa	60	56.32	2.32	0.86	0.049
PODT	63 °C	30	71.51	6	2.76	0.056

6.6. Análisis SDS-PAGE de enzimas oxidoreductasas tratadas con HHP y temperatura

Los resultados de la técnica SDS-PAGE para la enzima catalasa se muestran en la Figura 11 en la cual se observa que las bandas en cada línea tienen el mismo valor de masa molecular (58.2 kDa) lo que indica que no hubo cambios en la masa molecular de las muestras de catalasa tratadas a presión y temperatura.

Por otro lado, para el caso de la muestra tratada térmicamente, se confirma nuevamente la formación de agregados de alto peso molecular, debido a las interacciones proteína-proteína, los cuales no penetran la red del gel y se quedan estancados en el pozo en donde se coloca la muestra como se observa en la columna (g). Este cambio no sucede con las muestras tratadas a presión (columnas c-f).

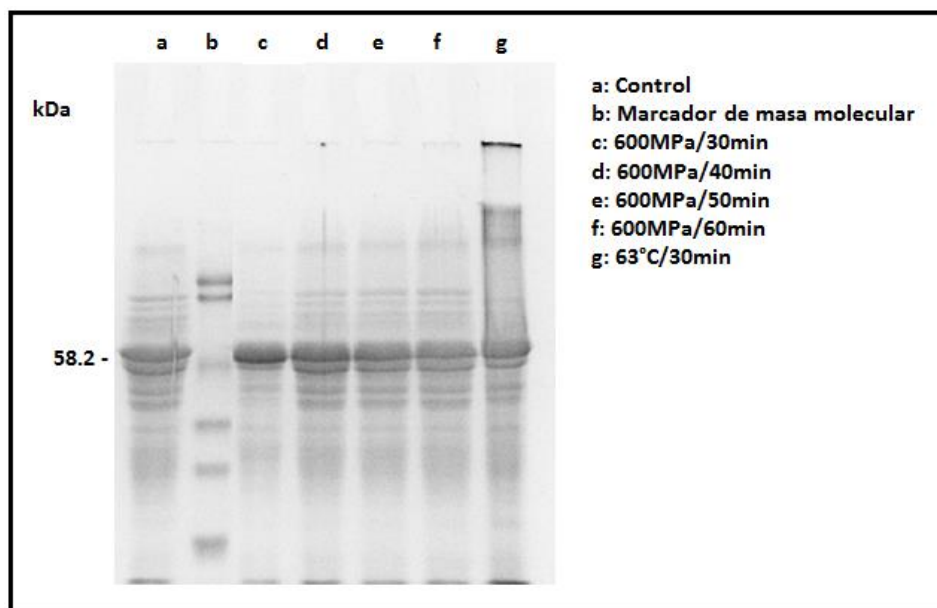


Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, 12.5% T) de catalasa con tratamientos de HHP y temperatura.

Los resultados del análisis de electroforesis SDS-PAGE para la enzima polifenoloxidasasa se muestran la Figura 12 en la cual se observa que las bandas en cada línea tienen el mismo valor de masa molecular (43.6 y 14.4 kDa) lo que indica que no hubo cambios en la masa molecular de esta enzima.

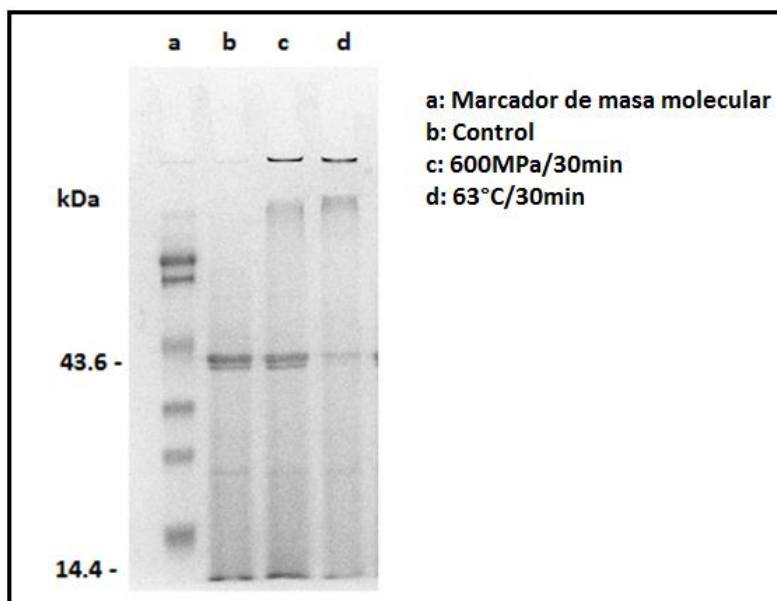


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, 12.5 % T) de polifenoloxidasasa tratamiento de HHP y temperatura.

Se observa formación de agregados en los carriles c y d, lo cual pudo deberse a la formación de agregados durante los tratamientos de presión y temperatura, ya que esta característica no se observa para el carril correspondiente a la muestra control.

La Figura 13 muestra los resultados de la técnica SDS-PAGE para la enzima peroxidasa en la cual se observa que no hay cambios en la masa molecular (64.3 kDa) de las muestras tratadas a presión y térmicamente. Se observan agregados en los carriles d y e, correspondientes a los tratamientos más severos de presión y temperatura, siendo más evidente para la muestra tratada por calor.

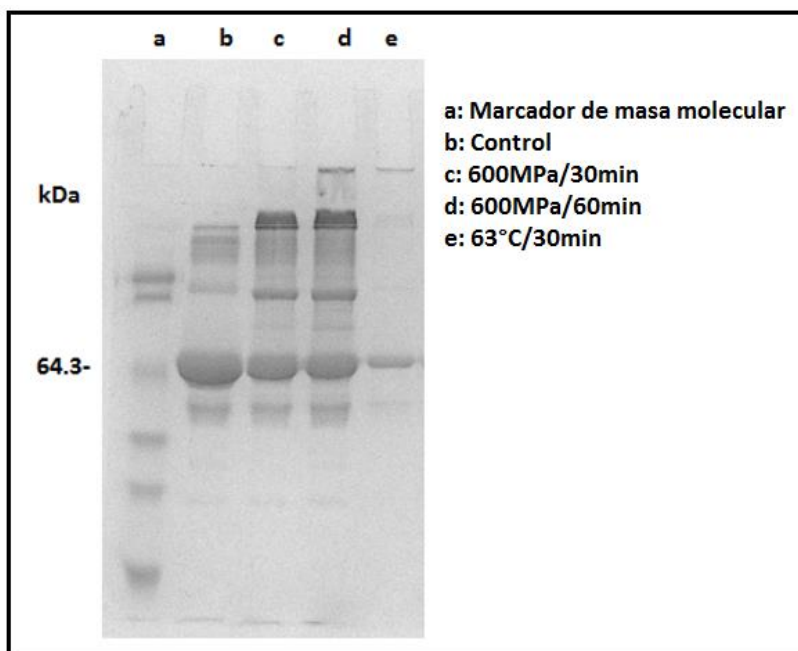


Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, 12.5 % T) de peroxidasa con tratamientos de HHP y temperatura.

7. CONCLUSIONES

- Con la medición de la actividad enzimática y la obtención de parámetros calorimétricos, se lograron identificar cambios conformacionales en las enzimas polifenoloxidasas, catalasa, y peroxidasa sometidas a tratamientos de presión y temperatura.
- Para las enzimas catalasa y peroxidasa la pérdida de la solubilidad inducida por temperatura fue mayor que por el tratamiento a altas presiones debido que las interacciones hidrofóbicas se vieron favorecidas.
- Un aumento en el valor de T_m para muestras de peroxidasa y catalasa tratadas térmicamente indicaron un cambio en las propiedades térmicas de las enzimas.
- La enzima peroxidasa demostró ser una proteína estable a tratamientos de presión y temperatura con una disminución del 50 % de su actividad para ambos casos.

- De las tres enzimas estudiadas, se encontró que la enzima polifenoloxidasas es la menos sensible a un tratamiento de presión de 600 MPa/30 min disminuyendo su actividad en un 20 %.
- De acuerdo con los resultados obtenidos es posible llevar a cabo una pasteurización en frío de enzimas peroxidasa de rábano y catalasa de hígado de bovino aplicando la tecnología de altas presiones hidrostáticas.

8. RECOMENDACIONES

El uso de técnicas como dicroísmo circular y fluorescencia de proteínas podrían complementar los resultados obtenidos por calorimetría de barrido diferencial, para determinar cambios estructurales de las proteínas en estudio.

Realizar combinaciones de presión y temperatura para reducir tiempos e intensidad de ambos tratamientos y observar si se logra una mayor disminución de la actividad.

Aplicar los tratamientos de presión a otras enzimas implicadas en el deterioro de la calidad de las frutas y hortalizas para permitir la optimización del procesamiento ha HHP.

9. REFERENCIAS

Ahmed, J., Lobo, M. & Ozdali, F. (2012). Tropical and Subtropical Fruits: Postharvest Physiology, Processing and Packing. India. pp. 35, 44.

Baquero, L., Castro, R. & Narváez, C. (2005). Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*): maduración y senescencia. *Acta Biológica Colombiana* 10(2):49-59.

Barbosa-Cánovas, G.V., Pothakamury, U., Palou, E. & Swanson, B. (1998). Nonthermal preservations of foods. Editorial MARCEL DEKKER, INC. USA. pp. 37-41.

Bartoszek, M. & Kściuczyk, M. (2005). Study of the temperature influence on catalase using spin labelling method. *Journal of Molecular Structure* 744, 733–736.

Beldarraín, A. (2001). Aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido al estudio de la estabilidad térmica de las proteínas. *Biotecnología Aplicada* 18, 10-16.

Balasubramaniam, V., Barbosa-Cánovas, G. & Lelieveld, H. (2016). High Pressure Processing of Food. Principles, Technology and Applications. Springer. USA pp. 391-394.

Calderón, M., San Martín, M., Barbosa-Cánovas, G.V. & Swanson, B. (1998). Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: Variables e inactivación microbiana. *Brazilian Journal of Food Technology* 1(1,2), 3-11.

Chakraborty S., Kaushik N., Srinivasa P. & Mishra H., (2014). High-Pressure inactivation of enzymes: A Review on its recent applications on fruit purees and juices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13, 578-596.

Damodaran S. & Paraf A. (1997). Food proteins and their applications. Marcel Dekker. USA. pp 1-47, 473-499.

Da-Wen, S. (2014). Emerging Technologies for Food processing. 2a ed. Academic Press. USA. pp. 3-14.

Denoya, G., Nanni, M., Apóstolob, N., Vaudagna, S., y Polenta, G. (2016). Biochemical and microstructural assessment of minimally processed peaches subjected to high-pressure

processing: Implications on the freshness condition. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 36, 212–220.

Fellows, P. (2000). *Food Processing Technology, Principles and Practice*. 2a. Ed. CRC Press. USA. pp 221-222.

García, C., Giraldo, G., Hurtado, H., & Mendivil, C. (2006). Cinética enzimática de la polifenoloxidasas del banano Gros Michel en diferentes estados de maduración. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 13 (2), 13-19.

Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I. & Weemaes C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology* 9, 197-203.

Herrero, M. & Romero de Avila, M. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista Medica de la Universidad de Navarra* 4 (50), 71-74.

Jermann, C., Koutchma, T., Margas, E., Leadley, C. & Ros-Polski, V. (2015). Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2015.06.007>

Jie, W., Kelly, A., Chemmalil, L., Muzammil, S., Gabrielson, J. & Jiang, Y. (2012). Applications of differential scanning calorimetry for thermal stability analysis of proteins: Qualification of DSC. *Journal of Pharmaceutical Science* 101, 955-964.

Johnson, C. M. (2013). Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. A Review. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 531, 100–109.

Junjie, Y., Jianyoung, Y., Peng, D., Xiaojun, L., Xiaosong, H. & Yan, Z. (2015). Effect of high-hydrostatic-pressure on molecular microstructure of mushroom (*Agaricus bisporus*) polyphenoloxidase. *Food Science and Technology* 60, 890-898.

López-Malo, A., Palou, E., Barbosa-Cánovas G., Welti-Chanes, J. & Swanson, B. (1998). Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree. *Food Research International* 8 (31), 549-556.

Mejía-Doria, C., Gavira-Arias, D., Bru-Martínez R., Rengifo-Ramos, L., Alegría-Soto, A. & Aguilar-Fernández, E. (2014). Caracterización cinética de la enzima polifenoloxidasas en

seis estados de maduración en lulo (*Solanum quitoense* Lam) var. Castilla. *Actualidades Biológicas* 36 (101): 107-117.

Morîntale, E., Harabor, A., Constantinescu, C. & Rotaru, P. (2013). Use of heat flows from DSC curve for calculation of specific heat of the solid materials. *Physics AUC*, 23, 89-94.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folinphenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 (1), 265-275.

Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G.V. Welte-Chanes, J. & Swanson, B. (1999). Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. *Journal of Food Science* 64 (1), 42-45.

Ramaswamy H. & Mariotte M. (2005). *Food Processing: Principles and Applications*. Editorial Taylor & Francia Group. USA. pp 167, 168.

Ramos, B., Miller, F., Brandão, P. & Silva, C. (2013). Fresh fruits and vegetables—An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 20, 1–15.

Ravéntos Santamaría, M. (2003). *Industria Alimentaria. Tecnologías Emergentes*. Ediciones UPC. Barcelona, España. pp 17-75.

Simpson B., (2012). *Food Biochemistry and Food Processing*. 2a Ed. Editorial WILEY-BLACKWELL. USA. pp 51, 52, 199-202.

Serment-Moreno, V., Barbosa-Cánovas, G., Torres, A. & Welte-Chanes, J. (2014). High-pressure processing: Kinetic models for microbial and enzyme inactivation. *Food Engineering Reviews* 6, 56–88.

Suárez, A., Rufer, C., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Saguès, A. & Saldo, J. (2011). Influence of ultra-high pressure homogenisation on antioxidant capacity, polyphenol and vitamin content of clear apple juice. *Food Chemistry* 127, 447-454.

Terefe, N., Buckow, R. & Versteeg, C. (2014). Quality related enzymes in fruit and vegetable products: Effects of novel food processing technologies, part 1: High-pressure processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(1), 24–63.

Terefe, N., Tepper, F., Ullman, A., Knoerzer, K. & Juliano, P. (2016) High pressure thermal processing of pears: Effect on endogenous enzyme activity and related quality attributes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 33, 56–66.

Teward, G. & Juneja, V. (2007). *Advances in Thermal and Nonthermal Food Preservation*. Blackwell Publishing. USA. pp 215-218.

Velazquez, G., Vázquez, P., Vázquez, M. & Torres, J. (2005). Avances en el procesado de alimentos por alta presión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(5), 353-367.

Wright, D. J. (1982). Application of scanning calorimetry to the study of protein behaviour in foods. En B. J. F. Hudson (Ed.), *Developments in food proteins*. England: Applied Science Publishers.

Yi, J., Jiang, B., Zhang, Z., Liao, X., Zhang, Y. & Hu, X. (2012). Effect of ultrahigh hydrostatic pressure on the activity and structure of mushroom (*Agaricus bisporus*) polyphenoloxidase. *Agricultural Food Chemistry* 60, 593-599.

ANEXOS

Anexo A. Determinación de parámetros termodinámicos a partir de DSC

En la Figura 14 se presenta la curva DSC típica obtenida del equipo, para la muestra control, procesada mediante el software OriginPro 9.1. A partir de la cual se obtuvo el valor de la temperatura al flujo de calor máximo T_m que fue de $58.1\text{ }^{\circ}\text{C}$, el valor del área bajo la curva que fue $1.259\text{ mJ}\cdot^{\circ}\text{C}/\text{s}$, así como el intervalo de temperatura de la transición de despliegue de la proteína T_i y T_f que fue de $46\text{--}66\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

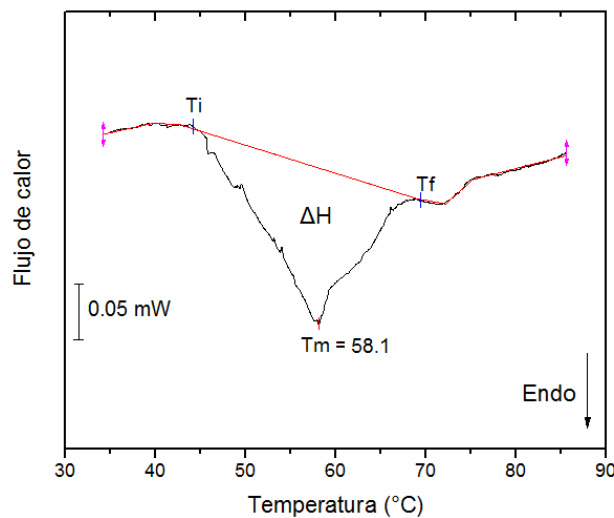


Figura 14. Termograma DSC de la enzima catalasa.

Para la determinación de la entalpía por g de proteína ($\Delta H\text{ J/g Proteína}$) se realizaron los siguientes cálculos.

Teniendo los siguientes datos:

Área bajo la curva = $1.259\text{ mJ }^{\circ}\text{C} / \text{s}$

Velocidad de calentamiento: $0.05\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min} = 0.00833\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{s}$

Cantidad de muestra en la celda: 0.8038 g de disolución

Concentración de la disolución: 4%

Proteína soluble en la muestra: 99% .

Primero se divide el área bajo la curva entre la velocidad de calentamiento.

$$\frac{1.259 \text{ mJ } ^\circ\text{C} / \text{s}}{0.00833 \text{ } ^\circ\text{C} / \text{s}} = 151.14 \text{ mJ}$$

Después se divide entre la cantidad de muestra

$$151.14 \text{ mJ} \left[\frac{1 \text{ J}}{1000 \text{ mJ}} \right] \times \left[\frac{1}{0.8038 \text{ g}_{\text{disl'n}}} \right] \times \left[\frac{1 \text{ gc}}{0.04 \text{ g}_{\text{enzima}}} \right] \times \left[\frac{100 \text{ g}_{\text{enzima}}}{99 \text{ g}_{\text{proteína}}} \right] = \frac{4.75 \text{ J}}{\text{g}_{\text{proteína}}}$$

Capacidad calorífica

La capacidad calorífica se determinó dividiendo el flujo de calor (q/t) de la velocidad de calentamiento de la muestra ($\Delta T/t$) como muestra la ecuación (4):

$$\frac{\frac{\Delta q}{t}}{\frac{\Delta T}{t}} = \frac{\Delta q}{\Delta T} = Cp \quad (4)$$

Y la capacidad calorífica específica se determinó como muestra la siguiente ecuación:

$$Cp = \frac{\delta Q}{\Delta T} = \frac{1}{m} \frac{(\delta Q/dt)}{(dT/dt)} \quad (5)$$

En donde:

$(\delta Q/dt)$ = es el flujo de calor dado por la curva DSC

(dT/dt) = es la velocidad de calentamiento de la muestra

m = es la masa de la muestra.

Obteniendo así curvas de Cp para las muestras analizadas en función de la temperatura como se muestra a continuación.

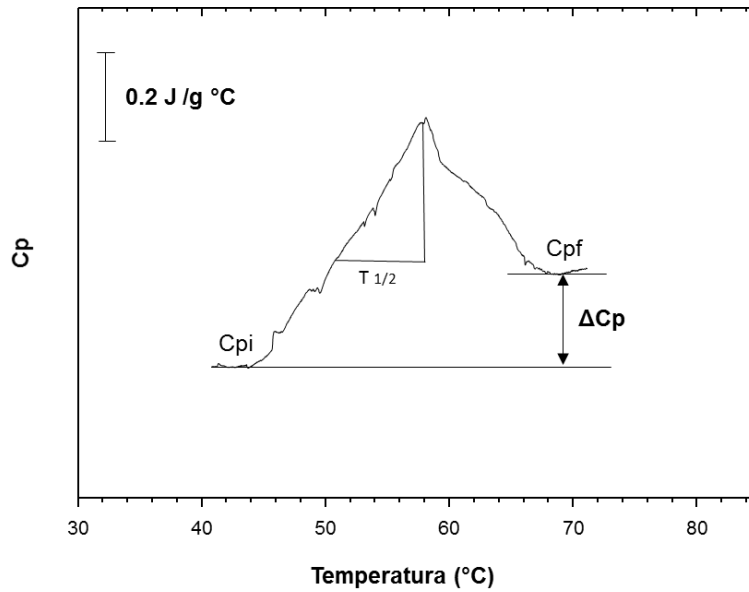


Figura 12. Termograma de Cp en función de la temperatura para catalasa al 4 %.

El valor ΔC_p proviene de sustraer la C_{pi} en el estado nativo al valor de C_{pf} correspondiente al estado desnaturalizado.

El valor de $T^{1/2}$, fue calculado midiendo el ancho a la altura del pico medio, con ayuda de una regla.

Anexo B. Cuantificación de proteína de la enzima catalasa después de ser sometida a tratamientos de HHP y temperatura. Medida por Lowry.

Tabla 6. Cuantificación de proteína de la enzima catalasa después de ser sometida a tratamientos de HHP y temperatura. Medida por Lowry.

Muestra	Tratamiento	Tiempo (min)	Concentración (mg/mL)	Proteína soluble (%)
CATC	NINGUNO	0	40 ± 0.05	100
CAT30	600 MPa	30	7.52 ± 0.13	19
CAT40	600 MPa	40	9.68 ± 0.15	24
CAT50	600 MPa	50	8.96 ± 0.16	22
CAT60	600 MPa	60	8.23 ± 0.19	20
CATT	63 °C	30	1.66 ± 0.08	4