

# INACTIVACIÓN DE POLIGALACTURONASA DE TOMATE CON CAMPO ELÉCTRICO

## POLYGALACTURONASE INACTIVATION FROM TOMATO WITH ELECTRIC FIELD

José Hugo Castorena-García<sup>1</sup>; Maribel Cano-Hernández<sup>1</sup>;  
Esperanza Fajardo-Herrera<sup>1</sup>; Raúl René Robles-de la Torre<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. km 7.5, Carretera Federal San Martín Texmelucan-Tlaxcala, San Diego Xocoyucan. Tlaxcala. C. P. 90122. MÉXICO. Correo-e: casmin@prodigy.net.mx (\*Autor para correspondencia)

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-IPN. km 1.5 Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla. Ex-Hacienda San Juan Molino. Tepetitla, Tlaxcala. C. P. 90700. MÉXICO

### RESUMEN

Los campos eléctricos (CE) son una tecnología no térmica, con mucho potencial para sustituir el tratamiento térmico en la conservación de alimentos. En este trabajo se aplicaron campos eléctricos para inactivar la enzima poligalacturonasa (PG) en jugo de tomate. Se aplicó un diseño factorial de 3<sup>2</sup>, teniendo como variables: la frecuencia (25, 45, 550 Hz) y el tiempo de exposición (5, 10 y 15 minutos), a 15 kV de potencial de campo eléctrico; todos los experimentos se realizaron por triplicado. El estudio fue comparado con su respectivo tratamiento térmico a 65 °C, a tiempos de 5, 10 y 15 minutos. El efecto CE fue evaluado a través de la actividad residual (AR) de la enzima poligalacturonasa. Hubo efecto significativo tanto en frecuencia como en tiempo, en tanto que la interacción entre factores fue no significativa. La frecuencia fue el factor que más contribuyó a la varianza. Se obtuvo mayor inactivación de PG a 45 Hz y en los primeros 10 minutos se registró una AR menor que la obtenida con el tratamiento térmico.

**PALABRAS CLAVE ADICIONALES:** *Lycopersicum esculentum* Mill., tecnologías no-térmicas, inactivación de enzimas, frecuencia, campos eléctricos.

### ABSTRACT

The electric field (EF) application is a non-thermal technology with great potential to replace the thermal treatment in food preservation. In this work electric field were applied to inactivate the polygalacturonase (PG) enzyme in tomato juice. A 3<sup>2</sup> factorial design was conducted, where the variation sources were frequency (25, 45 and 550 Hz) and exposure time (5, 10 and 15 minutes), at 15 kV of intensity electric field; all experiments were performed for triplicate. The study was compared with a thermal treatment at 65 °C for 5, 10, and 15 minutes. EF effect was evaluated through residual activity (RA) of polygalacturonase. Significant effects were found in both, frequency and exposure time, while their interaction was not significant; the frequency was the factor with more contribution to variance. The highest inactivation of PG was obtained at 45 Hz, and during the first 10 minutes the residual activity was lesser than with thermal treatment.

**ADDITIONAL KEYWORDS:** *Lycopersicum esculentum* Mill., non-thermal technology, enzymes inactivation, frequency, electric field



Recibido: 4 de octubre, 2012  
Aceptado: 1° de junio, 2013  
doi: 10.5154/r.inagbi.2012.10.010

La poligalacturonasa (PG) es una enzima hidrolasa (endo o exoglucanasa) asociada al ablandamiento de tejidos vegetales, involucrada en la hidrólisis de la pared celular del tomate que rompe los enlaces  $\alpha$ -1-4 glicosídicos a lo largo de la cadena del ácido poligalacturónico (Whitaker, 1994). Tanto la pectinmetilesterasa como la poligalacturonasa son enzimas causantes de la turbidez de algunos jugos y néctares, dentro de los que se encuentra el jugo de tomate; es por ello que los dos tipos de enzimas requieren residuos desesterificados para evitar la turbidez y el incremento de la viscosidad en los jugos (García *et al.*, 1996). Por lo tanto, para el procesamiento de tomate es fundamental la inhibición de la actividad de PG, con lo cual se puede incrementar la vida de anaquel.

Uno de los métodos tradicionales utilizados en la desactivación de la PG es el tratamiento térmico, en donde se utilizan rangos de temperaturas de 60 °C hasta 115 °C y tiempos que van desde algunos segundos hasta varios minutos u horas (Balsa-Canto *et al.*, 2007). Sin embargo, durante el tratamiento, una gran cantidad de energía es transferida al alimento y esto puede inducir reacciones que producen cambios indeseables en compuestos termo-sensibles, además de una pérdida generalizada en los atributos de calidad de los alimentos como son: textura, color, sabor y olor (Sitzmann, 1995).

Una de las alternativas para evitar cambios no deseados es constituida por los métodos de conservación con efectos sinérgicos como la combinación del tratamiento ultrasónico y el térmico (Terefe *et al.*, 2003), los de alta presión y térmicos (Fashina *et al.*, 2003; Verlent *et al.*, 2005; Boulekou *et al.*, 2011); o bien empleando procesos mínimos en los que se logre la conservación del alimento con el menor deterioro en su calidad (Alzamora *et al.*, 1998). Sin embargo, la presencia de calor en este tipo de tratamientos combinados llega a afectar algunas de las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas del alimento. Los campos eléctricos (CE) pueden ser una alternativa a este tipo de tratamientos ya que se caracterizan por no usar calor o bien por hacer un uso más eficiente de la energía. Algunos estudios sobre la inactivación enzimática de PG son: inactivación térmica de jugo de tomate expuesto a 70 y 85 °C (Anthon *et al.*, 2002), solución comercial de PG expuesta a CE de alta intensidad en rango de 5.18 a 19.39 kV·cm<sup>-1</sup> (Giner *et al.*, 2003) y desde 15 a 38 kV·cm<sup>-1</sup> (Giner-Seguí *et al.*, 2006), jugo de fresa expuesto a tratamiento con CE de 35 kV·cm<sup>-1</sup> y frecuencia de 100 Hz, tratamiento térmico 90 °C por 30 y 60 segundos (Aguiló-Aguayo *et al.*, 2009). El objetivo de este trabajo fue estudiar la inactivación de la poligalacturonasa presente en el jugo de tomate por medio de campos eléctricos y su comparación con un tratamiento térmico efectuado bajo los mismos tiempos de exposición.

### Material y extracción de poligalacturonasa

Como material experimental se emplearon frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) con madurez fisiológica relación °Brix/acidez-titulable equivalente a 10 y libre de daños mecánicos, comprados en un centro comercial local de Tlaxcala, México. Los frutos de tomate fueron molidos en licuadora (Braun®), el puré obtenido fue filtrado con papel filtro poro mediano para eliminar la fibra, el jugo obtenido 3,500 g fue centrifugado en una centrífuga (Solbat®) durante 5 minutos, el sobrenadante líquido fue recuperado y utilizado como extracto crudo de enzima PG.

### Evaluación de actividad de poligalacturonasa

Para encontrar la actividad máxima de la PG de tomate, el extracto fue evaluado en condiciones variables de pH (3, 4, 5, 6 y 7) y temperatura (20, 25, 30, 35 y 40 °C). La actividad de PG fue medida espectrofotométricamente por el método DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico), éste consiste en cuantificar los azúcares reductores y utiliza como sustrato 45 mL de ácido poligalacturónico (Sigma® P3889-100G) al 1 % + 5 mL de extracto crudo de PG, se mezcla y coloca en agitación continua a temperatura de evaluación en cámara (Environ Shaker®), de ahí se toman muestras de 0.5 mL cada 30 minutos, agregándole 0.5 mL de reactivo DNS (Aldrich® 128848-100G), la muestra se mezcla y coloca a ebullición en baño maría por 5 minutos, se enfría inmediatamente con hielo para detener la reacción, adicionando 5 mL de agua destilada, se deja en reposo 15 minutos, se agita en vórtex (Barnstead®), y se toma lectura de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en espectrofotómetro UV-Vis (Milton Roy®) (Rodrigo *et al.*, 2006).

### Tratamientos con campos eléctricos

Muestras de 10 mL de extracto crudo de PG ajustadas a pH 5, fueron colocadas en una caja petri de vidrio en condiciones constantes de campo eléctrico a 15 kV·cm<sup>-1</sup>. El experimento se realizó bajo un diseño factorial (3<sup>2</sup>), los factores de estudio fueron, la frecuencia y el tiempo de tratamiento. Los tres niveles para la frecuencia fueron 25, 45, 550 Hz y para el tiempo de exposición 5, 10 y 15 minutos. Los datos experimentales registrados como respuestas fueron el porcentaje de actividad residual (AR) de PG, definido como indica la Ecuación (1), donde  $A_t$  y  $A_o$  son la actividad enzimática de la muestra tratada y sin tratar, respectivamente (Aguiló-Aguayo *et al.*, 2009).

$$RA = \left( \frac{A_t}{A_o} \right) \times 100 \quad (1)$$

Los datos experimentales de actividad residual (AR) obtenidos en este experimento fueron sometidos a un aná-

lisis de varianza, realizado con el Statistical Analysis System, SAS® Ver. 9.1 para Windows (The SAS Institute Inc. Cary, NC., USA, 2002).

### Tratamiento térmico

El tratamiento térmico aplicado como método comparativo consistió en exponer igualmente 10 mL de extracto crudo de PG a pH 5 durante 5, 10 y 15 minutos a una temperatura de 65 °C y con choque térmico a 4 °C. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

### Sistema de campo eléctrico

Se utilizó el sistema generador de alto voltaje denominado IPNCEP-02 (diseñado y ensamblado en el Centro de Investigaciones en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional Unidad Tlaxcala, CIBA-IPN). La Figura 1 muestra un esquema del sistema utilizado compuesto por: a) fuente de alto voltaje desde 5 a 75 kV (Dielectric Test Set, MEGGER®), b) cámara estática de tratamiento con electrodos construidos en acero inoxidable, arreglo en paralelo, diámetro 9.6 cm, c) modulador de frecuencia de 5 a 250,000 Hz, d) osciloscopio (Tektronix TDS 1001B®) y e) tablero de control manual.

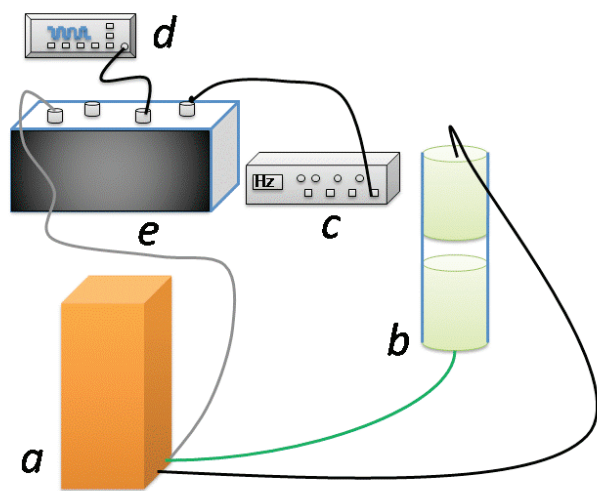


FIGURA 1. Esquema del sistema IPNCEP 02: a) fuente de alto voltaje, b) cámara de tratamiento, c) modulador de frecuencia, d) osciloscopio, e) tablero de control.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación del pH y temperatura sobre la actividad de PG en tomate

La Figura 2, muestra las condiciones de pH y temperatura a las cuales se obtuvo actividad máxima de PG en tomate (pH 5 y temperatura de 35 °C), condiciones utilizadas para evaluar la actividad enzimática en los tratamientos con CE. También se observó que la actividad de PG se encuentra 50 % activa con respecto a la actividad máxi-

ma en un rango amplio de pH desde 3 a 7. Al respecto, Rodríguez *et al.* (2006), encontraron la actividad máxima de PG a pH 5 y 40 °C en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*), en tanto que Prasanna *et al.* (2006) reportaron tres isoformas de PG en pulpa de mango con pH óptimo entre 3 y 4, y temperatura óptima de 40 °C.

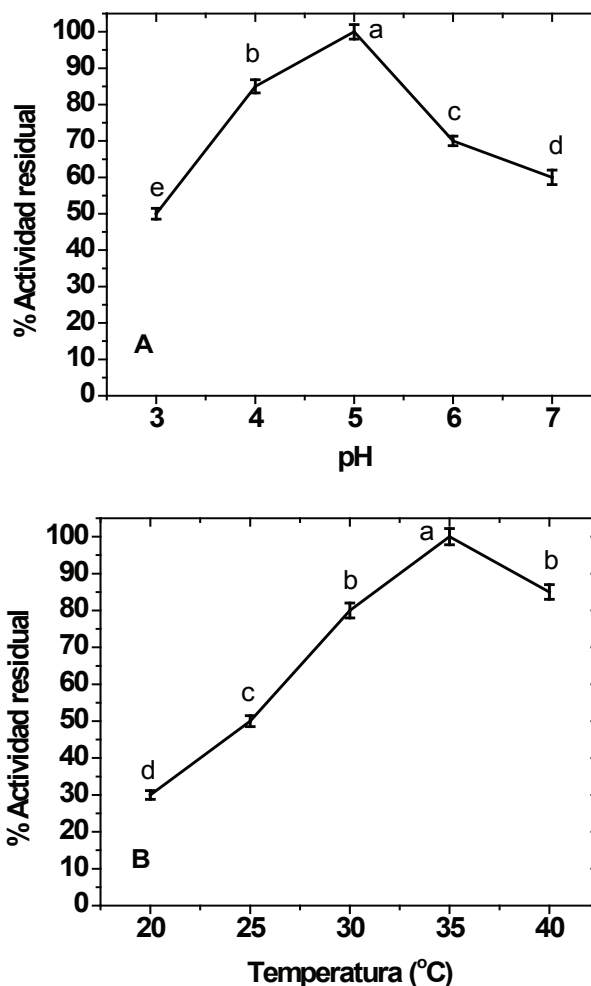


FIGURA 2. Actividad de poligalacturonasa a condiciones de: A) pH y B) temperatura (°C). Letras diferentes indican diferencia estadística según prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05$ .

### Inactivación de PG en tomate con aplicación de campo eléctrico

En la Figura 3, se muestra la actividad residual de PG obtenida después de aplicar  $15 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  a diferentes combinaciones de frecuencia y tiempo, de acuerdo al diseño experimental  $3^2$  planteado. Se resalta el mayor efecto que produce la frecuencia de 45 Hz sobre el material de prueba, el efecto CE se hace más evidente en la Figura 4 donde se presenta la AR media para cada frecuencia con prueba de Tukey ( $P = 0.05$ , letras iguales indican efectos estadísticamente iguales). Venkatesh y Raghavan (2005), mencionan que la capacidad de respuesta a la frecuencia es una característica eléctrica de todos los materiales biológicos, la cual depende de su composición y su medio. En

el rango de frecuencias ensayadas se observa que el efecto producido no describe una tendencia constante, pero sí un comportamiento senoidal, al respecto Fabregat *et al.* (1999), mencionan que factores sinusoidales producen respuestas sinusoidales.

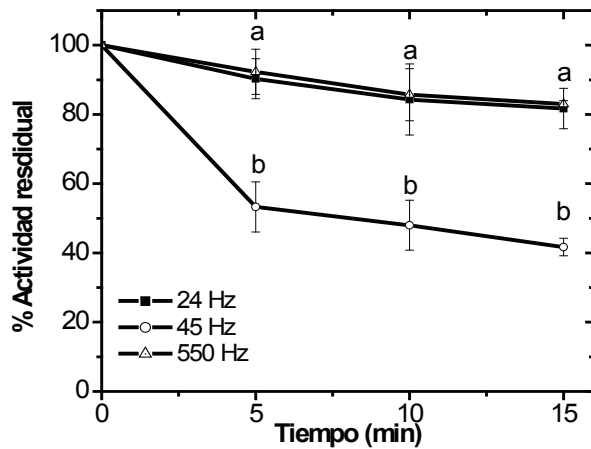


FIGURA 3. Actividad residual de PG a diferentes frecuencias y tiempo de tratamiento. Letras diferentes indican diferencia de acuerdo con la prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05$ .

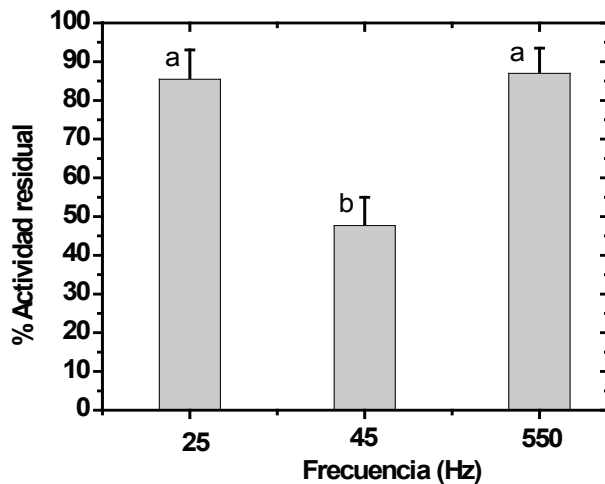


FIGURA 4. Actividad residual media para cada frecuencia. Letras diferentes indican diferencia de acuerdo con la prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05$ .

El análisis de varianza (ANOVA) de la AR registrada, muestra la existencia de efectos significativos para las variables frecuencia y tiempo ( $P \leq 0.05$ ) y de efectos no significativos ( $P > 0.05$ ) en la interacción frecuencia x tiempo (Cuadro 1). Bajo las condiciones de ensayo se encontró que la mayor contribución a la varianza la aportó el factor frecuencia. Los resultados coinciden con los reportados por Zhong *et al.* (2007) en donde mencionan que la intensidad del campo eléctrico, tiempo de tratamiento y frecuencia, son los factores de la tecnología CE que más influyen en la inactivación de microorganismos y enzimas. La combinación de ellos hace más significativo los resultados de los experimentos.

#### Inactivación térmica de PG en tomate

La combinación de temperatura-tiempo del tratamiento térmico seleccionado fue de 65 °C, a 5, 10 y 15 minutos, estas condiciones fueron comparadas con el tratamiento CE a 45 Hz. La comparación de la tecnología CE y tratamiento térmico sobre la inactivación de PG en tomate se muestra en las Figura 5, donde se observa que los CE pueden ser más eficientes que la inactivación térmica de la PG, al utilizar un tiempo menor (10 min), y de reducir los efectos negativos que conllevan los tratamientos térmicos en la calidad de los alimentos. Sin embargo, con tiempos mayores a 10 min el tratamiento térmico resulta más eficaz en la reducción de la actividad de PG.

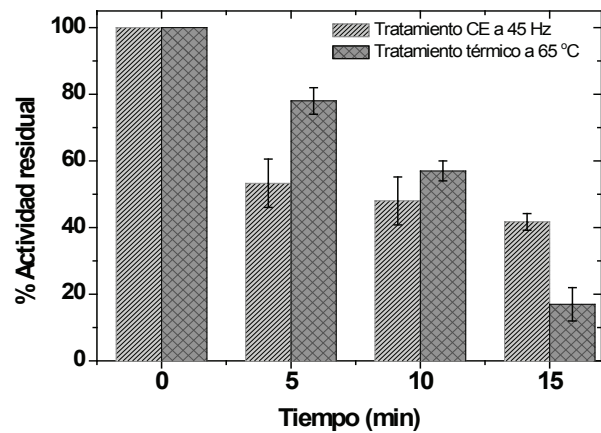


FIGURA 5. Efecto comparativo de los tratamientos con campo eléctrico (CE) y temperatura sobre la actividad de la enzima poligalacturonasa de tomate

CUADRO 1. Análisis de varianza de la actividad residual de poligalacturonasa con tratamiento campo eléctrico.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Prueba de Fisher	Probabilidad
Modelo	8	9391	1173	27	<0.0001
Tiempo (min)	2	446	223	5.24	0.0160
Frecuencia (Hz)	2	8930	4465	104.83	<0.0001
Tiempo x Frecuencia	4	14.81	3.70	0.09	0.9854
Error	18	766	42		
Total corregido	26	10158			
Coefficiente de determinación	R <sup>2</sup>	0.92			

Se resalta que el tratamiento térmico es el método de inactivación comercial más utilizado en la industria alimentaria, es importante mencionar que se registró AR inferior al 20 % para 15 min tratamiento térmico a 65 °C. Al respecto, Anthon *et al.*, (2002) registraron 15 % de AR al inactivar térmicamente PG de jugo de tomate expuesto a 85 °C.

## CONCLUSIONES

La mayor actividad enzimática de PG en tomate fue obtenida a pH 5 y temperatura de 35 °C. Es posible disminuir la actividad de PG de tomate con el equipo generador de CE utilizado. De las condiciones ensayadas con CE se obtuvo una mínima AR=39 % a condiciones de 15 kV·cm<sup>-1</sup>, 45 Hz y 5 minutos de tratamiento, con estas condiciones de tratamiento no fue posible superar el efecto de tratamiento térmico.

## LITERATURA CITADA

- Aguiló-Aguayo I.; Oms-Oliu G.; Soliva-Fortuny R.; Martín-Belloso O. 2009. Changes in quality attributes throughout storage of strawberry juice processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *LWT - Food Science and Technology* 42: 813–818.
- Alzamora S.; Tapia M.; Welti-Chanes J. 1998. New strategies for minimal processing of foods: the role of multi-target preservation. *Food Science and Technology International* 4: 353-361.
- Anthon G. E.; Sekine Y.; Watanabe N.; Barrett D. 2002. Thermal inactivation of pectin methylesterase, polygalacturonase, and peroxidase in tomato juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6153-6159.
- Balsa-Canto E.; Rodríguez-Fernández M.; Banga J. 2007. Optimal design of dynamic experiments for improved estimation of kinetic parameters of thermal degradation. *Journal of Food Engineering* 82: 178–188.
- Boulekou S.; Mallidis C.; Taoukisc S. P.; Stoforos G. N. 2011. Quality evaluation of slightly concentrated tomato juice produced under high pressure conditions. *Procedia Food Science* 1:800–804.
- Fabregat S.; García-Belmonte; Bisquert J; Morell I. 1999. Estudios en la zona no saturada del suelo: Estudio de los diferentes estados energéticos del agua del suelo en función de los fenómenos de relajación dieléctrica. Vol 4. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A.), Tenerife.
- Fachina D; Van Loeyb A. M; Nguyenb B. L.; Verlentb I.; Indrawatib and Hendrickxb M. E.; 2003. Inactivation kinetics of polygalacturonase in tomato juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 4: 135–142.
- García G.; Quintero R.; López M. 1996. *Biocología Alimentaria*. 1ª Edición. Limusa, México. 159-187.
- Giner J.; Gimeno V.; Palomes M. Barbosa-Cánovas G. Martín-Belloso O. 2003. Lessening polygalacturonase activity in a commercial enzyme preparation by exposure to pulsed electric fields. *European Food Research and Technology* 217(1): 43-48.
- Giner-Seguí J, Bailo-Ballarín E., Gorinstein S., Martín-Belloso O. 2006. New kinetic approach to the evolution of polygalacturonase (Ec 3.2.1.15) activity in a commercial enzyme preparation under pulsed electric fields. *Journal of Food Science* 71(6): E262 – E269.
- Prasanna V.; Prabha T. N. Tharanathan R. N. 2006. Multiple Forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* L. cv Alphonso) fruit. *Food Chemistry* 95(1): 30-36.
- Rodrigo D.; Cortés C.; Clynen E.; Schoofs L.; Van L.; Hendrickx M. 2006. Thermal and high-pressure stability of purified polygalacturonase and pectinmethylesterase from four different tomato processing varieties. *Food Research International* 39 (1): 440–448.
- Rodríguez C. J.; Narváez C. C.; Restrepo S. L. 2006. Estudio de la actividad enzimática de poligalacturonasa en la corteza de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). *Acta biológica colombiana* 11 (1).
- Sitzmann W. 1995. High-voltage pulse techniques for food preservation, IN Gould GW, Editor. *New Methods of Food Preservation*, Blackie Academic and Professional, USA. 236-251.
- Terefe N. S.; Gamage M; Vilkuh K.; Simons L.; Mawson R; Versteeg C. 2003. The kinetics of inactivation of pectin methylesterase and polygalacturonase in tomato juice by thermosonication. The kinetics of inactivation of pectin methylesterase and polygalacturonase in tomato juice by thermosonication. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 4: 135–142.
- Venkatesh M.; Raghavan G. 2005. An overview of dielectric properties measuring techniques. *Canadian Biosystems Engineering, Le génie des biosystèmes au Canada* 47: 7.15 - 7.30.
- Verlent I.; Smout C.; Duvetter T.; Hendrickx M. E.; Van Loey A. 2005. Effect of temperature and pressure on the activity of purified tomato polygalacturonase in the presence of pectins with different patterns of methyl esterification. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 6: 293-303.
- Whitaker J. R. 1994. *Principles of enzymology for the food sciences*. Dekker, New York, pp 425-436
- Zhong K.; Wu J.; Wang Z.; Chen F.; Liao X.; Hu X.; Zhang Z. 2007. Inactivation kinetic and secondary structural change of PEF-treated POD and PPO. *Food Chemistry* 100: 115-123.