



Universidad Austral de Chile

---

Escuela de Ingeniería en Alimentos

**Estudio Experimental de la Desactivación de la  
Enzima Peroxidasa Durante el Proceso de  
Escaldado de Papas (*Solanum tuberosum*) y el  
Almacenamiento a -18°C.**

Tesis presentada como parte de los  
requisitos para optar al grado de  
Licenciado en Ciencia de los Alimentos

**Carolina A. Ramírez Becerra**

Valdivia – Chile

2009

**PROFESOR PATROCINANTE:**

FERNANDO FIGUEROLA RIVAS

Ingeniero Agrónomo

M.S. Food Science

Instituto de Ciencia y tecnología de los Alimentos\_\_\_\_\_

**PROFESORES INFORMANTES:**

MARCIA COSTA LOBO

Ingeniero Civil Bioquímico

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos\_\_\_\_\_

OCIEL MUÑOZ FARIÑA

Bioquímico, Dr. en Ciencias Químicas

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos\_\_\_\_\_

**INDICE DE MATERIAS**

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
	RESUMEN	1
	SUMMARY	2
1	INTRODUCCIÓN	3
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1	La papa como materia prima	5
2.2	Escaldado	5
2.2.1	Definición y objetivos del escaldado	5
2.2.2	Métodos de escaldado	7
2.2.2.1	Escaldadores a base de vapor	7
2.2.2.2	Escaldadores de agua caliente	8
2.3	Enzimas	9
2.3.1	Definición de enzimas	9
2.3.2	Enzima en los alimentos	9
2.3.3	Peroxidasa	9
2.3.3.1	Mecanismo de reacción	9
2.3.3.2	Peroxidasa como enzima indicadora	10
2.3.3.3	Capacidad de regeneración	10
3	MATERIAL y MÉTODOS	12
3.1	Lugar de ejecución	12
3.2	Materia prima	12
3.3	Reactivos	12

3.4	Equipos e instrumentos	13
3.5	Material de laboratorio	13
3.6	Método	13
3.6.1	Curva de calibración de la Peroxidasa	13
3.6.2	Procedimientos seguidos	14
3.6.3	Procedimiento experimental	20
3.6.3.1	Obtención de muestras	20
3.6.3.2	Pruebas preliminares	20
3.6.4	Diseño experimental	23
3.6.5	Análisis estadístico	24
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	25
4.1	Actividad enzimática de la materia prima en estado fresco	25
4.2	Desactivación enzimática durante el proceso escaldado – hidroenfriado en papas.	26
4.3	Actividad enzimática de la peroxidasa en el almacenamiento	28
5	CONCLUSIONES	29
6	BIBLIOGRAFÍA	30
	ANEXOS	34

**INDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Características escaldador utilizado en Agrícola Frutos del Maipo Ltda.	16
2	Actividad enzimática inicial de la materia prima	25
3	Actividad POD en papas procesadas a 94,8°C por 1 minuto y 40 segundos y almacenadas por 0, 21, 42, 63, 84 y 365 días.	26

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Muestra de papas en cubos	12
2	Curva de calibración de peroxidasa	14
3	Equipo Escaldador utilizado en Agrícola Frutos del Maipo Ltda.	16
4	Sistema de enfriado	17
5	Almacenamiento del producto en bins.	18
6	Diagrama de flujo	19
7	Diagrama de obtención de muestras	20
8	Tiempo de reacción de enzima comercial	21
9	Obtención del extracto	22
10	Espectrofotómetro utilizado para las lecturas	23
11	Actividades enzimáticas residuales (%) de peroxidasa para las diferentes muestras escaldadas y almacenadas en ambos turnos.	27

**INDICE DE ANEXOS**

<b>Anexo</b>		<b>Página</b>
1	Datos de curva de calibración con estándares comerciales	34
2	Tiempo de reacción de enzimas comerciales	35
3	Pruebas preliminares de dilución de producto en buffer	36
4	Valores de absorbancia obtenidos para cada muestra	37
5	Ejemplo de cálculo de conversión de absorbancia en actividad enzimática (U/g)	38
6	Análisis de varianza (ANDEVA) para las muestras (1-8) v/s actividad enzimática.	40
7	Test de comparación múltiple de Tukey para las muestras (1-8) v/s actividad enzimática.	41
8	Análisis de varianza (ANDEVA) para las muestras (2-8) v/s actividad enzimática	43
9	Test de comparación múltiple de Tukey para las muestras (2-8) v/s Actividad enzimática	44
10	Análisis de varianza (ANDEVA) para las muestras (2-9) v/s Actividad enzimática, turno día.	46
11	Test de comparación múltiple de Tukey para las muestras (2-9) v/s Actividad enzimática, turno día.	47
12	Análisis de varianza (ANDEVA) para las muestras almacenadas (4-8) v/s actividad enzimática.	49
13	Test de comparación múltiple de Tukey para Turno día y turno noche v/s Actividad enzimática inicial	50
14	Análisis de varianza (ANDEVA) para muestras almacenadas (4-9) v/s Actividad enzimática, turno día.	51
15	Test de comparación múltiple de Tukey para las muestras almacenadas v/s Actividad enzimática. Turno día.	52
16	Análisis de varianza (ANDEVA) para actividad enzimática inicial v/s	53

turno día y turno noche.

- 17 Test de comparación múltiple de Tukey para turno día y turno noche v/s actividad enzimática inicial. 54



## RESUMEN

Los objetivos del siguiente estudio fueron determinar la actividad enzimática de peroxidasa soluble (POD) en papas sometidas a un proceso de escaldado a 94,8°C por 1 minuto y 40 segundos y evaluar el comportamiento de la actividad residual en el producto almacenado en cámaras a -18°C. Los ensayos fueron realizados en la Industria Frutos del Maipo Ltda. durante un periodo de tres meses. La actividad enzimática se determinó en el turno día y turno noche en la materia prima fresca, proceso de escaldado, proceso de hidrogenfriado antes de entrar a la cámara IQF, a los 0, 21, 48, 63, 84 y 365 días de almacenamiento.

La determinación de la actividad enzimática inicial de peroxidada y residual de la papa se llevó a cabo mediante ensayos espectrofotométricos haciendo reaccionar un volumen de extracto enzimático con el sustrato correspondiente a 470 nm.

Se elaboró una curva de calibración con la Peroxidasa comercial y así a través de ésta obtener la actividad enzimática (U) de cada muestra. Seguido de esto se determinó el tiempo de reacción de la enzima comercial con el sustrato y así obtener la variación de absorbancia por unidad de tiempo ( $\Delta A/\text{min}$ ).

Los resultados indicaron que ambos turnos trabajaron en iguales condiciones ya que no se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ).

Con respecto a la actividad enzimática residual hubo diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) de la muestra sin escaldar (Muestra 1) con respecto a las que fueron escaldadas y almacenadas por 21, 48, 63, 84 y 365 días. Esto explica que el proceso de escaldado inactivó la peroxidasa y enzimas mas termorresistentes presentes en la materia prima.

Al evaluar la actividad enzimática residual de las muestras escaldadas y posteriormente almacenadas no se presentó diferencias significativas entre ellas ( $P > 0,05$ ). No hubo un aumento significativo de la actividad enzimática residual de las muestras almacenadas por 21, 48, 63, 84 y 365 días.

La actividad residual de la peroxidasa fue de 0,64% para el primer día de almacenamiento y llegó a los 1,22% de actividad enzimática residual con 1 año de almacenamiento a -18°C.

## SUMMARY

The objectives of this study were to determine the enzymatic activity of soluble peroxidase (POD) in potatoes that were blanched at 94,8 °C for 1 min and 40 seconds, and to evaluate the residual activity behavior during storage at -18 °C. The experiment was carried out in the production plant of Frutos del Maipo Ltda. during a three months term. The enzymatic activity was determined in the two shifts of production, day and night, in raw material, after blanching, after cooling before entering to the IQF tunnel and in storage a time 0, 21, 48, 63, 84 and 365 days.

Determination of initial and residual enzymatic activity of potatoes was carried out by spectrophotometry at 470 nm.

A calibration curve was prepared with standard peroxidase and the enzymatic activity (U) was obtained of each sample. Afterwards, the reaction time for standard peroxidase with substrate was determined and the absorbance variation per unit time ( $\Delta A/min$ ) was obtained.

Results showed that both shifts had the same working conditions and there were no statistical differences ( $P > 0,05$ ).

In relation to the residual enzymatic activity statistical differences were found ( $P < 0,05$ ) in samples without blanching (sample 1) respect to those that were blanched and stored for 21, 48, 63, 84 and 365 days. This explains that blanching inactivated peroxidase and other more resistant enzymes present in raw material.

When the residual enzymatic activity of blanched samples was evaluated and stored there were no significant statistical differences ( $P > 0,05$ ) between them. There was no significant increase on residual enzymatic activity in samples stored at 21, 48, 63, 84 and 365 days.

The residual activity of peroxidase was 0,64% for the first day of storage and 1,22 % for samples stored for 1 year at -18 °C.

## 1 INTRODUCCIÓN

En frutas y hortalizas la actividad de diversas enzimas tales como lipoxigenasa, peroxidasa, polifenol oxidasa, lipasa, celulasa, tiaminasa, entre otras, ha sido relacionada con la aparición de efectos no deseados, tales como las modificaciones en color, sabor y textura así como en la producción de olores. Los productos vegetales normalmente requieren de un tratamiento térmico con la finalidad de inactivar enzimas que causen efectos negativos y de esta manera evitar o minimizar los cambios de calidad en el producto durante el almacenamiento o procesamiento posterior.

El escaldado es un proceso de tratamiento térmico que por lo general se aplica a frutas y hortalizas principalmente para inactivar enzimas antes de la congelación. Los alimentos congelados sin escaldar experimentan cambios relativamente rápidos en las propiedades de calidad debida a la continua actividad de las enzimas

En la industria de alimentos, la enzima peroxidasa es utilizada como enzima indicadora para comprobar la eficiencia de un proceso de escaldado, ya que al ser desactivada durante el tratamiento térmico demuestra que éste se ha realizado en forma eficiente, asumiendo que también ha ocurrido la inactivación de otras enzimas deteriorativas mejorando la estabilidad del producto. Esto se debe a que la peroxidasa presenta mayor resistencia térmica que el resto de las enzimas presentes.

Sin embargo, en muchos casos se ha observado que la peroxidasa es capaz de regenerar su actividad después del escaldado con la consecuente aparición de modificaciones en la calidad de los vegetales durante el almacenamiento. Estas modificaciones dan como resultado pérdidas económicas para la industria de vegetales congelados, ya que disminuye la vida útil del producto así como su valor comercial.

### **Hipótesis**

El proceso de escaldado utilizado en la empresa permite inactivar la enzima peroxidasa presente en la papa que posteriormente va a ser congelada y evitar así colores, sabores y olores no deseados, producto de la acción de las enzimas presente.

Con el objeto de cumplir la hipótesis planteada se formularon los siguientes objetivos

### **Objetivo general**

- Investigar experimentalmente la actividad inicial de peroxidasa (POD) en la papa y evaluar las cinéticas de desactivación enzimática durante el proceso combinado escaldado hidrogenofriado, congelación y almacenamiento del vegetal

### **Objetivos específicos**

- Determinar la actividad enzimática inicial del producto.
- Calcular los valores de actividad enzimática residual para el producto evaluado en las condiciones de tiempo y temperatura utilizados en la Empresa Frutos del Maipo Ltda. y definir la actividad enzimática residual obtenida.
- Comparar los resultados obtenidos de actividad enzimática para cada proceso.
- Evaluar la resistencia térmica de la enzima peroxidada (POD).

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 La papa como materia prima

La papa, *Solanum tuberosum*, es un cultivo originario de América. En Chile se encuentra en estado silvestre en la Cordillera de los Andes, Nahuelbuta, en Chiloé y otras áreas.

Pese a la gran diversidad de variedades existentes en el mundo, en Chile no se producen comercialmente más de diez. De hecho, tres de ellas, la Desirée, la Yagana y la Cardinal abarcan el 90% de la producción. Lejos la más difundida es la Desirée, con más del 50%. De origen holandés, esta papa fue introducida en el país por el INIA en 1968 y se cultiva para guarda desde la Región Metropolitana al sur. De piel roja y pulpa amarilla, se destina fundamentalmente para consumo fresco, aún cuando, debido a la escasa especificidad predominante en el país, también se la utiliza para chips o papas fritas artesanales de consumo inmediato (URRUTIA, 2002).

### 2.2 Escaldado

**2.2.1 Definición y objetivos del escaldado.** El escaldado es un proceso de tratamiento térmico de corta duración y a temperatura moderada. Generalmente consiste en mantener el producto algunos minutos (1,5 a 4 min) a una temperatura próxima a 95-100°C (CASP y ABRIL, 1999), que por lo general se aplica a frutas y hortalizas antes de la congelación, el secado o enlatado. El escaldado se lleva a cabo principalmente para inactivar enzimas antes de la congelación o la deshidratación. Los alimentos congelados o deshidratados sin escaldar experimentan cambios relativamente rápidos en las propiedades de calidad como color, sabor, textura y valor nutricional debido a la continua actividad de las enzimas (SHARMA *et al.*, 2003).

Los objetivos del escaldado son los siguientes:

- Limpieza del producto (SHAMS y THOMPSON, 1987; RESS y BETTISON, 1993).
- Inhibir las reacciones enzimáticas indeseables, por destrucción térmica de las enzimas responsables presentes en los vegetales que en otro caso darían lugar a aromas, sabores o coloraciones extrañas y causarían la pérdida de vitamina C; provocando un efecto adverso en la calidad y valor nutritivo del producto (RESS y BETTISON, 1993; BARRET y THEERAKULRAIT, 1995; CASP y ABRIL, 1999; SHARMA *et al.*, 2003; BARREIRO y SANDOVAL, 2001).
- Posibilitar un mejor aprovechamiento de los recipientes al disminuir el tamaño de la materia prima como consecuencia de la coagulación forzada de las proteínas y contracción por la liberación de agua (POULSEN, 1986).
- Remover el aire atrapado en los tejidos que puede causar reacciones de oxidación durante el almacenamiento en frío (RESS y BETTISON, 1993; LUH y KEAN, 1988; BARRET y THEERAKULRAIT, 1995; BARREIRO y SANDOVAL, 2001)

- Mejorar el sabor y estabilizar el color verde de los vegetales por activación de las clorofilas en sus respectivos clorofílicos (FENNEMA, 2000).
- Reducir la carga microbiana viable, ya sean células vegetativas, levaduras y/o hongos (POULSEN, 1986; BARRET y THEERAKULRAIT, 1995).
- Disminución del tiempo de cocimiento del producto final (POULSEN, 1986).
- Incremento de la flexibilidad de los productos, lo que permite su manipulación más segura en el momento del envasado, reduciéndose las roturas y consiguiéndose un mejor aprovechamiento del volumen del envase (CASP y ABRIL, 1999).

WOODROOF (1988) señala que muchos vegetales congelados, así como los deshidratados y enlatados, requieren del escaldado si han de ser almacenados por periodos de tiempo prolongados. Con el tiempo, los vegetales sin escaldar gradualmente llegan a ser más fibrosos, menos dulces e insípidos y sin sabor ni aroma atractivos; cualidades que siguen deteriorándose, perdiendo, en muchos casos, la frescura después de 6 meses. Después de un año o más el sabor y el aroma llegan a ser desagradables al cocerlos, con una pronunciada cualidad similar al heno. El sobreescaldado produce una excesiva lixiviación de minerales, pigmentos, vitaminas, pérdida de sabor y valor nutricional.

El escaldado tiene un efecto fijador del color verde en algunos vegetales, especialmente cuando se efectúa en agua caliente. Se cree que ello se debe a la extracción acuosa de ácidos en los vegetales durante el escaldado, con lo cual existe menos hidrólisis de las clorofilas a feofitinas en el calentamiento. A su vez, el escaldado tiende a reducir el volumen de los alimentos, lo cual trae ventajas en el empacado (SHARMA *et al.*, 2003).

La presencia de agua dura en el escaldado, o agua a la cual se le han agregado sales de calcio o magnesio, tiende a producir endurecimiento del producto. Ello se origina al reaccionar estos cationes con las sustancias pécticas presentes, lo cual crea una estructura de malla originada por los puentes entre moléculas constituidos por estos iones, lo que vuelve más rígida la estructura (FENNEMA, 2000).

Si bien es cierto el escaldado es un proceso que nos entrega beneficios que se citaron anteriormente, también debemos conocer algunas desventajas como pérdida de textura, de color, sabor y calidad nutritiva por el proceso de calentamiento; formación de sabor a cocido, cierta pérdida de sólidos solubles (especialmente en escaldado acuoso) e impacto ambiental por los requerimientos de grandes cantidades de agua y energía (MATHEIS, 1990). Otros efectos adversos del escaldado son la modificación irreversible de la estructura celular, la solubilización y/o destrucción de alguna vitamina y nutrientes, y la conversión de la clorofila verde a feofitinas verde-amarillas (Bald y Katsaboxakis, citados por RODRIGUEZ – SAONA *et al.*, 1995).

El proceso de escaldado conlleva a una pérdida de nutrientes termolábiles, generalmente pequeña y de materiales hidrosolubles. Las pérdidas de ácido ascórbico suelen ser apreciables (5-50%), más con el escaldado en agua que en vapor. Igualmente existe, por el mismo concepto, una pérdida de la materia seca original (3-9%), la cual se incrementa al cortar o reducir el tamaño de partículas del producto a ser escaldado (8-26%); al igual que en el caso anterior, el escaldado con vapor reduce

estas pérdidas. Entre los compuestos hidrosolubles que más tienden a perderse en el proceso están los azúcares, las sales minerales, las proteínas y vitaminas hidrosolubles. Al disminuir la temperatura de escaldado se tienden a reducir las pérdidas por lixiviación. El proceso también induce a una pérdida de humedad del producto y por ende de peso y de rendimiento en el proceso. Las pérdidas de peso oscilan usualmente entre 0,2 y 5% (BARREIRO y SANDOVAL, 2001).

El calor aplicado durante el escaldado, generalmente ocasiona un ablandamiento de los tejidos. MANZINI *et al.*(1969) y Brown (1970) citado por NOE *et al.*, (1999) demostraron estas alteraciones (ablandamiento) en la calidad de los vegetales, mediante técnicas histológicas. Además, el efecto del calor durante el escaldado, permite que exista una filtración de micronutrientes por solubilización, remoción de aire y alteraciones en el color del producto terminado. Para disminuir los efectos negativos de este tratamiento se han modificado las técnicas de escaldado. En pruebas de resistencia al corte, en rebanadas de papa, se han demostrado que ésta es mayor cuando la temperatura de escaldado disminuye.

**2.2.2 Métodos de escaldado.** Los dos métodos de escaldado comercialmente mas empleados son mantener durante un tiempo el alimento en una atmósfera de vapor saturado, o sumergirlo en un baño de agua caliente. En los últimos años se han introducido importantes mejoras en las instalaciones con objeto de reducir el consumo energético y la pérdida de los componentes solubles. Esto último, reduce los contaminantes de los efluentes e incrementa el rendimiento del producto (SÁNCHEZ, 2003).

**2.2.2.1 Escaldadores a base de vapor.** Consiste en un simple túnel de unos 15 metros de longitud, donde se introduce el producto sobre un transportador de cinta, generalmente de acero inoxidable. La calefacción se consigue por medio de vapor de agua saturado, a una presión próxima a la atmosférica, que se inyecta en el interior del túnel por unas series de boquillas distribuidas en toda su longitud (SHARMA *et al.*, 2003).

El rendimiento energético de estos equipos es muy bajo, ya que las pérdidas de vapor que se producen, principalmente en la entrada y salida de producto túnel, son muy elevadas y apreciables a simple vista. Para evitar estos escapes de vapor se han propuesto varias soluciones, que dan lugar a diseños diferentes del escaldador (CASP y ABRIL, 1999).

Desde 1940, el vapor se ha convertido en una alternativa frente al agua caliente para el escaldado de muchos vegetales excepto verduras, porque estas últimas tienden a adherirse resultando en un escaldado desigual (WOODROOF, 1988). Los escaldadores de vapor continuo son mecánicamente más complejos; en ellos el producto se mueve por un tanque que contiene vapor de agua.

El vapor es rápido y causa menos pérdidas por lixiviación de nutrientes (LAZAR *et al.*, 1971; LUND *et al.*, 1972; RESS y BETTISON, 1993). Sin embargo, los beneficios ganados por el vapor pueden perderse por la excesiva cantidad de agua usada para el enfriamiento; por lo tanto, nutricionalmente hay pocas ventajas del vapor sobre el agua para escaldar (DIETRICH *et al.*, 1970). Asimismo, aunque el vapor permite obtener menores tiempos de escaldado, su costo de implementación es bastante elevado

(WOODROOF, 1988). Además, debe considerarse que el escaldado con vapor consume una gran cantidad de energía, en un escaldador de vapor convencional, al que no se le hayan aplicado medidas correctoras, se puede perder cerca del 95% del vapor consumido (CASP y ABRIL, 1999). Desde el punto de vista de la limpieza del alimento esta es limitada y se requieren limpiadores adicionales (FELLOWS, 1988).

**2.2.2.2 Escaldadores de agua caliente.** La inmersión en agua a temperaturas entre 80 y 100°C seguido por inmersión en agua fría, es el más común de los métodos de escaldado (WOODROOF, 1988; HOLDSWORTH, 1993). Generalmente se utilizan dos tipos de equipos para este propósito; el más importante es el escaldador giratorio de inmersión continua en el cual los productos son transportados a través de un tanque o tambor estático con agua caliente utilizando un transportador en espiral con lo que el producto es sumergido constantemente en el agua caliente (HERSON y HULLAND, 1984; HOLDSWORTH, 1993).

La calefacción del agua se consigue por inyección directa de vapor, y es necesario mantener su nivel, por adición continua de agua fresca, ya que una parte del agua de tratamiento es absorbida y arrastrada por el producto. Este sistema de calentamiento de agua tiene una eficacia térmica muy baja, ya que una parte del vapor inyectado se pierde antes de haberse condensado. Por lo tanto, y con el fin limitar el consumo energético, se han desarrollado sistemas de calentamiento por intercambiador de calor en los que se consigue la completa condensación del vapor empleado (CASP y ABRIL, 1999).

El otro equipo es el escaldador hidráulico de tipo tubo en el que el producto se bombea con agua caliente a lo largo de una tubería, de cuyas paredes salen chorros de vapor que se utilizan para calentar el agua y facilitar el flujo del producto (HERMSON y HULLAND, 1984).

Los métodos de escaldado por inmersión de los productos en agua presentan la objeción de necesitar grandes volúmenes de agua. Cuando se emplea agua caliente es fácil de imaginar que el escaldador actuará como un extractor sólido-líquido, dando lugar en el producto a pérdidas de materias solubles: proteínas, azúcares, sustancias minerales, vitaminas, etc. que disminuirán su valor nutritivo, pasando al agua e incrementando la carga contaminante de los vertidos de la industria (CASP y ABRIL, 1999).

La doble pérdida de nutrientes puede ser reducida mediante un escaldado serial, esto es, usando la misma agua de escaldado y enfriado en varias oportunidades. Ya que la pérdida de compuestos hidrosolubles es estabilizada después de tener una acumulación de nutrientes lixiviados en el agua de escaldado, la adición de ciertos minerales al agua de escaldado ayuda a estabilizar el proceso de lixiviación (WOODROOF, 1988). El escaldado convencional, constituye una gran fuente de contaminación; sobre el 50% de la producción de DBO es debido al escaldado durante el proceso de enlatado de productos vegetales (Weckel *et al.*, citado por HURT, 1979). Al respecto, diversos estudios han sido desarrollados por la National Cannery Association (ahora National Food Processors Association), citado por HURT (1979), con el objetivo de reducir esta fuente de contaminación y potencial fuente de nutrientes.



## 2.3 Enzimas.

**2.3.1 Definición de las enzimas.** Las enzimas son proteínas que se comportan como catalizadores, es decir, aceleran la velocidad con la que las reacciones se llevan a cabo sin alterar el equilibrio y son responsables de las transformaciones metabólicas en los seres vivos. Desde el punto de vista fisicoquímico, y como consecuencia de su estructura proteica, la actividad catalítica de las enzimas depende del pH y de la temperatura de reacción, característica que resulta de fundamental importancia en una aplicación industrial (GARCÍA *et al.*, 2002).

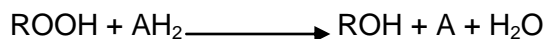
Las enzimas están constituidas por proteínas globulares que, a temperaturas cercanas a los 37°C, aceleran la velocidad de las reacciones químicas y biológicas por un factor de  $10^{12}$  a  $10^{20}$  en relación a las reacciones no catalizadas. La actividad de una enzima, se expresa en términos de la reacción que ella cataliza como la transformación de un micromol de sustrato en producto por unidad de tiempo. Mientras que las Unidades son una medida de una cantidad de enzima activa (FENNEMA, 2000).

**2.3.2 Enzimas en los Alimentos.** En los tejidos vegetales, enzimas como la lipoxigenasa, la polifenoloxidasas, la poligalacturonasa y la clorofenolasa causan pérdidas en el valor nutritivo, el sabor y la textura que canalizan las reacciones de deterioro en el interior de la célula (endógenas), afectando la calidad de los vegetales congelados. Estas enzimas difieren en su resistencia térmica, lo que implica que la velocidad de desactivación enzimática variará dependiendo del tipo de enzima, variedad del vegetal, etc. (MATHEIS, 1990).

Además, la peroxidasa (POD) y la catalasa son dos de las enzimas más resistentes al calor y de más amplia distribución. Aunque a estas enzimas no se les consideran como causantes del deterioro durante el almacenamiento, su actividad se utiliza para evaluar la eficacia del escaldado (SHARMA *et al.*, 2003).

### 2.3.3 Peroxidasa

**2.3.3.1 Mecanismo de reacción.** La peroxidasa es una oxidorreductasa que cataliza reacciones usando oxígeno o peróxido como aceptor de hidrógeno. BEN - AZIZ *et al.* (1970) y HEMEDA y KLEIN (1990), señalan que los mecanismos de acción de la peroxidasa están basados en la formación de un complejo enzima - donante de hidrógeno, como se observa en la siguiente reacción:



Cataliza la reacción de ciertos compuestos dadores de hidrógeno, como fenoles (guayacol, pirogalol) y aminas aromáticas (o-fenilendiamina) por medio de peróxidos ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). El sustrato oxidable más usado es el guayacol, que es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol en presencia de peróxido (WHITAKER, 1972). La velocidad de formación del color rojo ladrillo puede ser utilizada como medida de la actividad enzimática por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias con relación al tiempo (FENNEMA, 2000).

**2.3.3.2 Peroxidasa como Enzima Indicadora.** La peroxidasa ha sido ampliamente usada como indicadora de efectividad del escaldado por su alta tolerancia a tratamientos térmicos. Se espera que si la POD ha sido inactivada, las otras enzimas también. Además, es importante inactivar la POD debido a su vinculación con cambios en la coloración de frutas y hortalizas, degradación de compuestos fenólicos con importante valor antioxidante y pérdida de aroma. Cuando se usa esta enzima como indicadora, se espera que a un mayor grado de inactivación, la calidad se mantenga por un mayor tiempo (MATHEIS, 1990; BARREIRO y SANDOVAL, 2001).

Diversos investigadores han informado que la peroxidasa puede estar involucrada en el deterioro de la calidad sensorial de los vegetales procesados, y principalmente en el desarrollo de sabores extraños. KAMPIS *et al.* (1984), le asignan responsabilidad en la biosíntesis de lignina; CHANG *et al.* (1984) señalan que esta enzima está relacionada con cambios de sabor y color debido a la oxidación de compuestos fenólicos en quinonas (en presencia de peróxido de hidrógeno), y afectaría el valor nutritivo por reacción de éstas con aminoácidos y vitamina C en los vegetales no escaldados. Walter citado por KAMPIS *et al.* (1984), reporta que sería causante de degradación de clorofila.

Por el contrario, Böttcher citado por HALPIN *et al.* (1989) informan que la peroxidasa no es directamente responsable de las pérdidas de calidad de vegetales durante sus almacenamientos en congelación y Lim citado por BARRET y THEERAKULKAIT (1995) indica que con excepción de la formación de lignina en espárragos, no existe evidencia que relacione la peroxidasa con el deterioro de calidad. WILLIAMS *et al.* (1986), informaron que la peroxidasa no es la enzima involucrada en el desarrollo del sabor, y que la lipoxigenasa sería causante de este defecto en los vegetales congelados.

Los autores mencionados anteriormente proponen el uso de lipoxigenasa como enzima indicadora de la eficiencia del escaldado de frijoles y arvejas verdes. Esta última requiere menor tiempo de tratamiento (debido a que la lipoxigenasa es más sensible al calor que la peroxidasa) y podría contribuir a mantener la calidad nutritiva y sensorial del producto durante el almacenamiento en congelación.

**2.3.3.3 Capacidad de regeneración.** El fenómeno de regeneración consiste en la recuperación de actividad transcurrido un tiempo después del tratamiento térmico (HEMEDA y KLEIN, 1990). Esto ha sido explicado asumiendo que la fracción proteica de la proteína sufre una desnaturalización parcial, con pérdida de estructura terciaria, produciendo luego una reversión a su estado normal por la recombinación de grupos hidrógenos o sulfhidrúlicos (SCHMIDT - HEBBEL y PENNACCHIOTTI, 1982).

Se cree que el proceso de regeneración enzimática después del tratamiento térmico se deriva de la regeneración de la estructura terciaria de la parte proteica de la enzima, cuando ésta no ha sido inactivada o desnaturalizada en forma total por el tratamiento térmico (SHARMA *et al.*, 2003).

Si el tratamiento térmico es incompleto la peroxidasa tiende a regenerarse, al menos parcialmente, después del tratamiento. Las temperaturas muy altas por tiempos cortos de inactivación tienden a producir mayor regeneración que procesos equivalentes a menor temperatura y tiempos más largos. La regeneración de la actividad residual

depende del almacenamiento, habiéndose encontrado que a menor temperatura de almacenamiento más largo es el tiempo para la regeneración. (BARREIRO y SANDOVAL, 2001).

Burnette citado por CHANG *et al.* (1984) señala que la reactivación de la peroxidasa puede ocurrir cuando no es totalmente inactivada por calor; resultados similares fueron encontrados por CHEU y CHEN (1991). Sin embargo, APARICIO - CUESTA *et al.* (1992) demuestran que aún con desactivación total de la enzima durante el escaldado, se produce regeneración durante el almacenamiento en congelación a  $-18^{\circ}\text{C}$ , aún cuando esta actividad regenerada no supera el 1,23% de la actividad inicial de la enzima en el vegetal.

Aunque durante el almacenamiento de porotos verdes y arvejas en estado congelado, con escaldado previo, no se ha visto regeneración de la actividad de POD en ensayos de escaldado efectuados a extractos de esta enzima obtenidos de arveja se ha visto que ésta puede renaturalizarse, por lo tanto si la renaturalización se presenta, no se logrará el efecto deseado tras la aplicación del tratamiento térmico aplicado (NARVÁEZ, 2008).

En la práctica industrial se ha encontrado que las verduras congeladas retienen entre 1 y 10% de actividad peroxidásica residual. Estudios recientes han indicado que cierto grado de actividad residual de peroxidasa es permisible en los productos congelados y que ello afecta menos la calidad que procesos de escaldado más severos por tiempo largos a menor temperatura. En general, los niveles de actividad residual entre 1 y 7% no parecen afectar en forma apreciable la calidad de vegetales tales como los arvejas, judías, porotos verdes, espinacas y zanahorias, durante lapsos de almacenamiento congelado de hasta nueve meses (RAVENTÓS, 2005).

Cuando la cinética de inactivación térmica de la peroxidasa o de cualquier otra enzima es conocida, es posible predecir la fracción residual de la enzima en función de la temperatura y tiempo de escaldado y de la geometría y dimensiones del producto. Barreiro (1985) desarrolló un modelo matemático para productos cortados en geometría esférica, cilíndrica y de paralelepípedo recto-rectángulo. Este modelo resuelve en forma analítica la ecuación del calor, con las condiciones iniciales y de borde imperantes en el proceso de escaldado y permite predecir tiempos de escaldado para diversas condiciones del proceso (BARREIRO y SANDOVAL, 2001).

### 3 MATERIAL Y MÉTODO

#### 3.1 Lugar de ejecución

El presente estudio se llevó a cabo en Agrícola Frutos del Maipo Ltda., entre los meses de Febrero y Agosto del 2006. Los análisis correspondientes a la materia prima, al producto escaldado y almacenamiento se realizaron en el Laboratorio de Desarrollo de Producto del Departamento de Agroindustrias y Enología de la Universidad de Chile, Santiago.

#### 3.2 Materia prima

Para la realización de las pruebas experimentales se utilizó papa variedad Desirée, trozada en cubitos, provenientes de Santa Luisa Isabel Ltda. de la provincia de Paine entregados a Agrícola Frutos del Maipo Ltda.



**FIGURA 1** Muestra de papas en cubos.

#### 3.3 Reactivos

Los siguientes reactivos fueron utilizados en la obtención del extracto, preparación del sustrato y elaboración de curvas de calibración:

- Obtención del Extracto. Buffer fosfato de potasio (Monofosfato de potasio, WINKLER LTDA; Difosfato de potasio, WINKLER LTDA; HCl; NaOH 1N).
- Sustrato Peroxidasa. Guayacol (100%), MERCK; Peróxido de Hidrógeno (30%), MERCK; Buffer fosfato de potasio pH 6.5, 0.2 M y agua destilada.

- Curva de Calibración. Estándares de actividad enzimática conocida de peroxidasa (Type X; P6140; 250 U/mg proteína), BIOSONDA S.A.; y sus respectivos sustratos.

### 3.4 Equipos e instrumentos

- Registrador de temperaturas, Monitor Termocrón, Solsis Ltda.
- Cronómetro digital, CASIO 705, Japón.
- Balanza analítica Sartorius.
- Balanza analítica electrónica, CHYO BALANCE JK-200, precisión 0,1 mg, Japón.
- Termómetros patrones de calibración y convencionales de medición; DBGm, Alemania.
- Espectrofotómetro Spectronic Genesys 5, 50/60 hertz, UV/vis, USA.

### 3.5 Material de laboratorio

Los siguientes materiales fueron utilizados en la preparación del extracto enzimático y sus respectivos sustratos, y en las lecturas de absorbancia en espectrofotómetro.

- Matraces, pipetas totales y volumétricas, vasos precipitados, embudos, frascos de plásticos.
- Cubetas de cuarzo, 10 mm; Equilab Ltda.
- Minipimer Braun
- Papel filtro Wathman N° 4 (Tamaño de poro 20-25  $\mu\text{m}$ ).
- Micropipetas (1-5 ml, 10-100  $\mu\text{l}$ , BOECO), Alemania.
- Cooler 48QT (45,4 Lt.)
- Hielo seco, Praxair Inc.

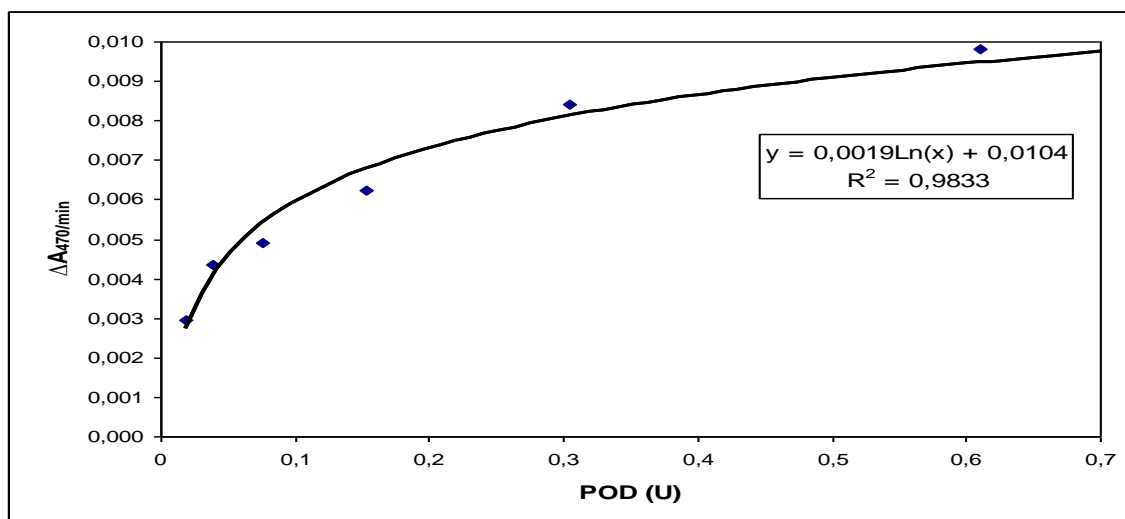
### 3.6 Método

**3.6.1 Curva de Calibración de la Peroxidasa.** A fin de obtener una ecuación que relacione las lecturas de Absorbancia con la Actividad enzimática estándar (U/g) del producto fresco y procesado, se elaboró una curva de calibración para peroxidasa.

La actividad de peroxidasa fue medida espectrofotométricamente a 470 nm usando guayacol y peróxido de hidrógeno como dador de hidrógeno y sustrato según el método descrito por HEMEDA y KLEIN (1990), SHEU Y CHEN (1991), WENG *et al.* (1991) y SARAIVA *et al.* (1996) con algunas modificaciones.

**Peroxidasa.** Se prepararon diferentes soluciones de concentración conocida de peroxidasa comercial y se determinó la actividad enzimática mediante lecturas de absorbancia en espectrofotómetro. Las concentraciones variaron desde 0,02 U/ml de solución hasta 1,2 U/ml de solución. La dilución se realizó con buffer fosfato de potasio 0,2 M, pH 6,5. La longitud de onda, el tiempo y temperatura de reacción, así como el sustrato utilizado fue igual al utilizado en las determinaciones de actividad del vegetal

analizado. En la FIGURA 2 se presenta un gráfico que relaciona las lecturas de absorbancia con la actividad enzimática. Mediante regresión lineal, se obtuvo una ecuación que fue utilizada para transformar las lecturas de absorbancia de los extractos enzimáticos crudos y procesados en actividad enzimática (U) de peroxidasa. En ANEXO 1 se presentan los datos que dan origen a la figura mencionada. La actividad enzimática (U) se definió como la variación de la absorbancia ( $\Delta A$ ) a 470nm por minuto (la reacción se registró por 20 minutos).



**FIGURA 2** Curva de calibración de peroxidasa.

### 3.6.2 Procedimientos seguidos

#### Descripción del Proceso de papas congeladas en Agrícola Frutos del Maipo Ltda.

A continuación se detalla el diagrama de flujo para la papa en cubo. En la FIGURA 6 se presenta un diagrama de flujo, y se detalla cada etapa realizada.

**a) Recepción de la Materia Prima.** Se realiza para un previo control de conformidad, así como establecer un sistema de organización que permita una localización rápida y fácil, así como un máximo aprovechamiento del espacio respetando las condiciones de conservación.

El producto llega a la planta en tolva o bins, se recibe la guía de despacho del productor y se emite la de recepción en planta. El producto se pesa en la romana y es analizado según una especificación técnica establecida por Control de Calidad de Materias primas. De acuerdo a la capacidad productiva de la línea el producto es procesado de inmediato, vaciado en bins y almacenado por un tiempo no superior a 24 horas de lo contrario es trasladado a su guarda en frío.

**b) Limpieza.** El producto es vaciado a la línea en la cual por medio de operarios se retiran los elementos fácilmente visibles como ramas, piedras, pudrición, daño de insecto, fuera de color, daño mecánico, deformes, bajo calibre.

**c) Lavado.** El producto es lavado por inmersión con cloro (80 p.p.m.) para el retiro de tierra y materia vegetal extraña adherida.

**d) Pelado.** El producto pasa por rodillos de fricción por aproximadamente 3 minutos, los que retiran la piel del producto.

**e) Repase.** Se repasa manualmente las unidades con resto de piel y manchas.

**f) Corte.** El producto es vaciado a una máquina cortadora la que realiza un corte 10x10x10 mm.

**g) Inspección.** Se realiza inspección y extracción en cinta de restos vegetales, materias extrañas y defectos.

**h) Escaldado.** El producto es sometido a un tratamiento térmico por inmersión, éste es un proceso térmico en relación de tiempo de escaldado de un 1'20'' y temperatura entre 90 y 98°C cuyos objetivos es inactivar enzimas, disminuir carga microbiana y fijar color (Ver FIGURA 3).

Dentro de la estructura del escaldador hay un eje con un sin fin que cumple la labor de transmitir y trasladar el vapor inyectado por todo el equipo.

Además, posee un nivel de agua en su interior, que determina la cantidad de líquido faltante para la inmersión del producto.

El motor posee un variador de frecuencia que controla el tiempo de residencia de la materia prima dentro del sistema.

Al iniciar el trabajo en la línea, lo correcto es esperar que el agua en el interior del equipo alcance una temperatura de 95°C, si es inferior a ello se debe esperar hasta alcanzar los grados celsius requeridos. El tiempo en alcanzar lo exigido oscila entre 10-15 min dependiendo de la temperatura del agua, la inyección de vapor y el nivel del agua.

Posee un sistema automático de temperatura con sensor PT 100 y una válvula moduladora, por tanto dentro de un óptimo desempeño, es esencial contar con un manipulador que este controlando el ingreso y el egreso de agua al estanque para mantener una temperatura de 95°C.

Para un buen funcionamiento del equipo, lo ideal es tener siempre un flujo constante de alimentación pues si la alimentación disminuye la válvula de inyección de vapor se va cerrar y viceversa.

Una vez inspeccionado el producto es vaciado al escaldador rotativo mediante el calibrador. El tiempo de residencia lo va a dar el variador de frecuencia incorporado en el equipo que oscila entre 1,08 min-1,50 min, dependiendo del flujo de alimentación. A continuación en el CUADRO 1 se detallan características del equipo escaldador.

**CUADRO 1 Características escaldador utilizado en Agrícola Frutos del Maipo Ltda.**

Material de la estructura	Fierro
Material del tambor	Acero inoxidable
Material del sin fin	Acero inoxidable
Caudal de agua (Capacidad Descarga)	60 L/s (pozo profundo)
Caudal de agua (Capacidad Descarga)	49 L/s (estanque acumulador)
Largo tambor	2280 mm
Diámetro del tambor	1080 mm
Diámetro malla	3x12 mm
Velocidad giro sin fin	8,4 rpm
Frecuencia escaldador	60 hertz
Voltaje de alimentación	380 volt
Potencia	1,5 kW



**FIGURA 3 Equipo Escaldador utilizado en Agrícola Frutos del Maipo Ltda.**



**i) Enfriado.** Etapa mediante la cual se enfría el producto que sale del escaldador a una temperatura menor a 95°C. El enfriado se realiza a través de challas que lanzan el agua en forma pulverizada de manera que el líquido cubra gran parte de la superficie del producto y se pierde más cantidad de vapor en el producto. Su función principal es bajar los grados para que la papa ingrese lo más frío posible al IQF con una temperatura alrededor de 9,8°C. Esta operación se realiza dos veces para que el producto pueda alcanzar la temperatura necesaria para que pueda ingresar al IQF.

Todo ello va a estar en directa proporción con el flujo de alimentación y la temperatura del agua. El tiempo de exposición al agua va a estar dado por la velocidad de la cinta de traspaso.

Mientras más baja sea la temperatura de ingreso al IQF más eficiente va a ser el enfriado del producto. A diferencia de una temperatura de ingreso mayor, el equipo baja su rendimiento y eficiencia.

Al salir el producto del escaldador el manipulador de alimentos a través de un rastrillo de acero inoxidable, distribuye los cubos de papa lo más homogéneo posible en la superficie de la cinta para facilitar el enfriado.



**FIGURA 4 Sistema de enfriado.**

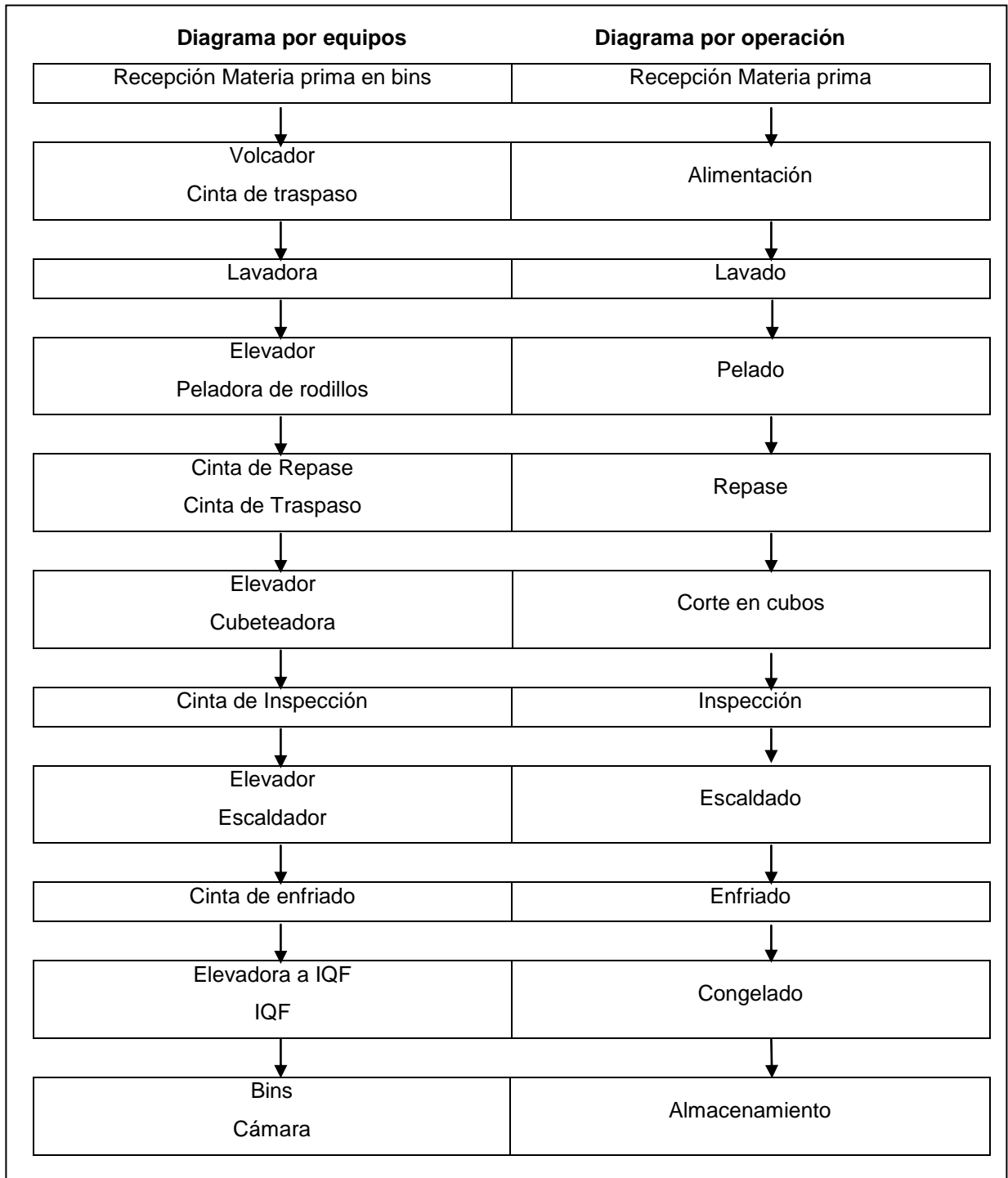
**j) Congelado.** El producto se traslada de un elevador a una cinta transportadora del túnel continuo de congelación IQF. El producto tiene una permanencia en el túnel de aproximadamente 10 a 15 minutos obteniéndose una temperatura de producto de acuerdo a las condiciones de alimentación y flujo de aproximadamente -18°C a la salida de éste.

**k) Almacenamiento.** Una vez congelado el producto es recibido en bins de madera o plástico, cubiertos con una bolsa de polietileno de forma tal de evitar el contacto del

producto con el material del bins. El bins es trasladado y guardado en cámara previo pesado y marcado para registro, las cámaras deben tener una temperatura máxima de  $-18^{\circ}\text{C}$  (ver FIGURA 5).



**FIGURA 5 Almacenamiento del producto en bins.**

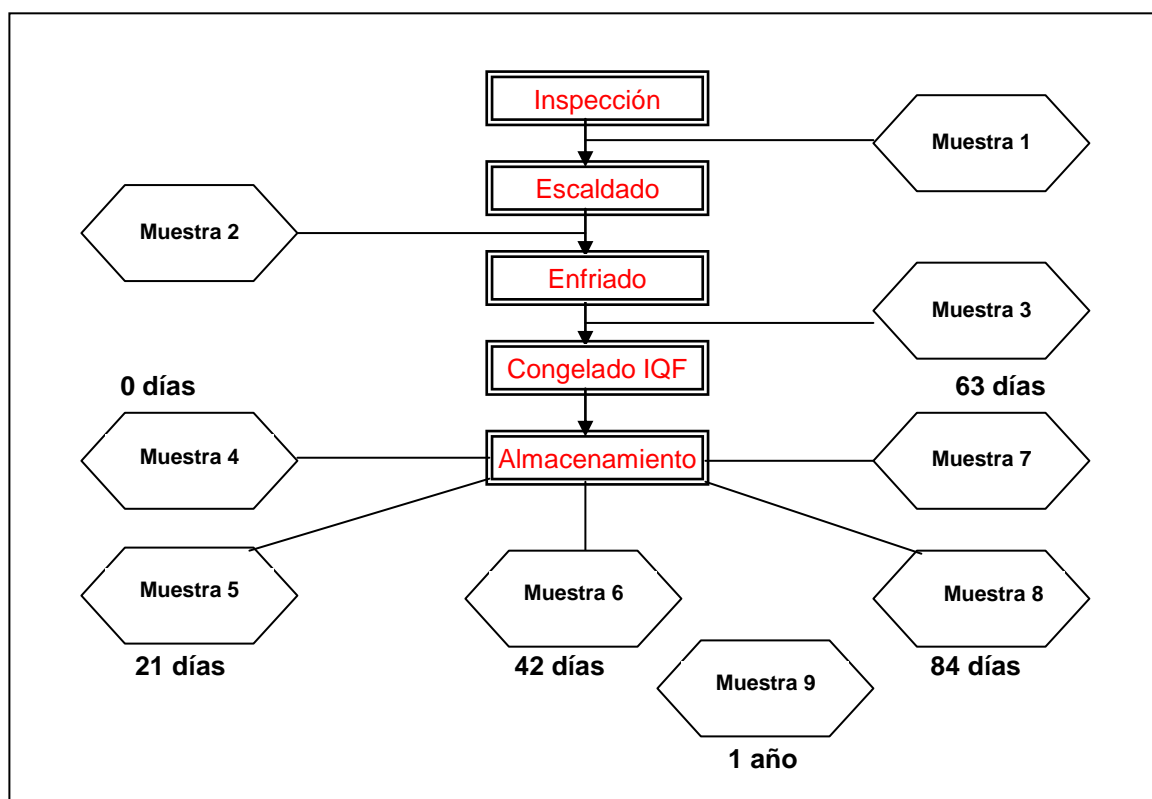


**FIGURA 6** Diagrama de flujo.

### 3.6.3 Procedimiento experimental

**3.6.3.1 Obtención de muestras.** Se tomaron 8 muestras de papas en triplicado en dos turnos, turno día y turno noche en el siguiente orden:

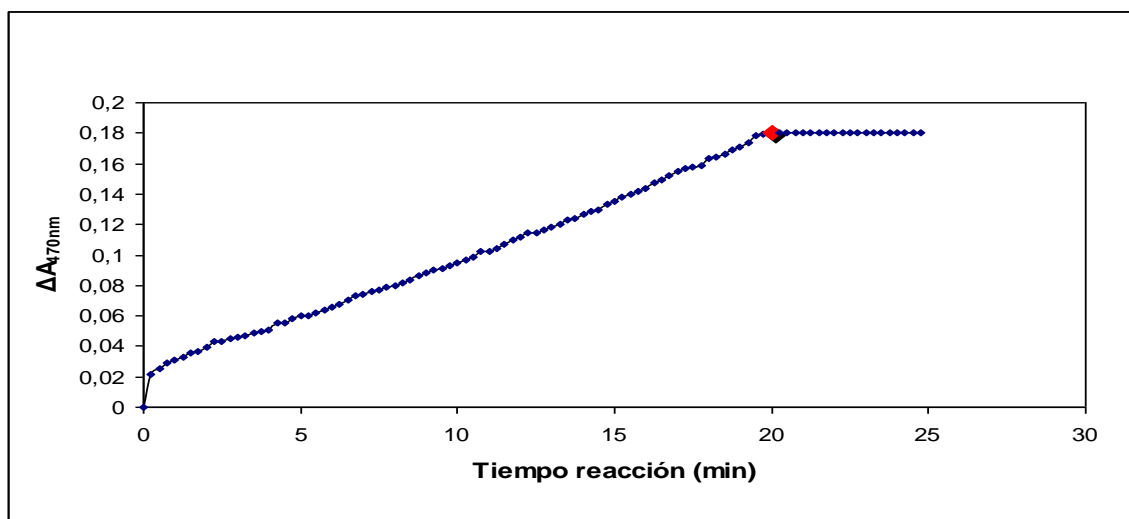
- Muestra 1: Papa cruda, antes de entrar al escaldador.
- Muestra 2: A la salida del escaldador.
- Muestra 3: A la entrada del congelador IQF
- Muestra 4: Almacenamiento en bins a los 0 días
- Muestra 5: Almacenamiento en bins a los 21 días
- Muestra 6: Almacenamiento en bins a los 42 días.
- Muestra 7: Almacenamiento en bins a los 63 días.
- Muestra 8: Almacenamiento en bins a los 84 días.
- Muestra 9: Se tomó ésta muestra de un bin distinto que estaba almacenado por un tiempo de 1 año. (Ver FIGURA 7).



**FIGURA 7** Diagrama de obtención de muestras.

**3.6.3.2 Pruebas preliminares.** Las pruebas preliminares consisten principalmente en ensayos de métodos de obtención del extracto, medición de tiempos y temperaturas de escaldado y análisis enzimático.

- **Tiempo de reacción.** Se determinó experimentalmente utilizando peroxidasa comercial. Se midió la absorbancia iniciada la reacción enzimática, con el sustrato correspondiente, cada 15 segundos a la longitud de onda respectiva, hasta lectura constante. Así se obtiene la máxima lectura para la peroxidasa. Los perfiles de lectura de absorbancia versus tiempo de reacción de Peroxidasa, se presentan en la FIGURA 8, de ésta forma se determinó que el tiempo de reacción correspondió a 20 minutos para Peroxidasa. La temperatura de reacción se mantuvo constante a lo largo de las experiencias prácticas en 20°C. En ANEXO 2 se presentan los datos que dan origen a la figura mencionada.



**FIGURA 8** Tiempo de reacción de enzima comercial.

- **Obtención del extracto.** Se realizaron diluciones del producto en buffer a fin de obtener lecturas de absorbancia dentro del rango 0,000-1,000 donde existe una relación directa entre las lecturas y la actividad enzimática.

*Extracto enzimático de papas.* Se evaluaron diferentes diluciones de producto en buffer fosfato de potasio 0,2M, pH 6,5, y de esta forma se obtuvo la dilución óptima para este producto. Las diluciones propuestas y los valores de absorbancia obtenidos se presentan en el ANEXO 3. Es necesario destacar que con el método de extracción mencionado, sólo se obtiene la fracción soluble de peroxidasa, por lo que en adelante, la referencia de actividad enzimática total de peroxidasa en el vegetal analizado, sólo considera las isoenzimas solubles de peroxidasa.

- **Escaldado – Hidroenfriado.** Se midió las temperaturas y tiempos del proceso empleado en el escaldado y enfriamiento para comprobar si se cumple con lo exigido para desactivar las enzimas causantes del deterioro del producto. Los resultados fueron los siguientes:

Temperatura de la papa antes de que ingrese al escaldado: 13,6°C

Tiempo de residencia del producto en el escaldador: 1 minuto con 40 segundos

Temperatura del producto a la salida del escaldado: 94,8°C

Temperatura del producto luego del hidrogenfriado: 32°C

Temperatura del producto luego del segundo hidrogenfriado y antes de entrar a la cámara de IQF: 9,5°C

- **Análisis enzimático.** Los análisis enzimáticos se realizaron en los vegetales crudos, procesados y almacenados destinados a determinar la actividad inicial y residual de los vegetales. Para ello se preparó un sustrato para la enzima analizada y un extracto del producto que contenía la enzima.

*Preparación del sustrato.* El sustrato para la reacción de la enzima analizada fue preparado según método SHEU y CHEN (1991), de la siguiente forma:

Se mezclaron 0,1 ml de guayacol (100%) y 0,1 ml de peróxido de hidrógeno (30%) con 49,9 ml de buffer fosfato de potasio 0,2 M pH 6,5 y 49,9 ml de agua destilada, dando una concentración final de 8,94 mM de guayacol.

Las soluciones sustratos fueron preparadas el día de cada análisis agitando la mezcla para luego dejarlas reposar en oscuridad.

*Preparación del extracto.* Basándose en los resultados de las pruebas preliminares se pesaron 5 g de papas crudas y procesadas y se trituraron por 2 minutos a alta velocidad en la Minipimer Braun, luego se mezclaron con 20 ml de buffer fosfato de potasio 0,2 M pH 6,5. Finalmente se filtró con papel Wathman N°4. El filtrado fue utilizado como extracto enzimático.



**Figura 9 Obtención del extracto.**

*Reacción.* La actividad enzimática se determinó haciendo reaccionar un volumen de extracto enzimático con el sustrato correspondiente. La peroxidasa es una enzima

oxidorreductora capaz de oxidar guayacol en presencia de peróxido de hidrógeno originando un producto de color pardo-café. La actividad enzimática se expresó como variación de absorbancia por unidad de tiempo ( $\Delta A/\text{min}$ ), y se determinó de la siguiente forma:

Se mezcló 0,12 ml de extracto con 3,48 ml de sustrato. La mezcla fue agitada y la lectura a 470 nm se realizó a los 20 minutos de iniciada la reacción.

Las lecturas espectrofotométricas se realizaron en cubetas de cuarzo, y comparándolas con un blanco compuesto por 3,48 ml del sustrato más 0,12 ml de agua destilada. De esta forma, a través de color, se detectó la reacción de la enzima y su sustrato. Los resultados de absorbancia obtenidos se muestran en el ANEXO 4.



**Figura 10** Espectrofotómetro utilizado para las lecturas.

- **Expresión de los resultados.** Utilizando la curva de calibración elaborada en 3.6.1 y considerando la dilución de producto en el medio de reacción, los valores se expresan como Unidad de enzima por gramo de sólido del producto (U/g sólido). Las lecturas de absorbancia (A) fueron divididas por el tiempo de reacción, 20 minutos para peroxidasa. Utilizando las curvas de calibración elaboradas en 3.6.1, la medida del extracto utilizado (ml) en la reacción y la cantidad de muestra de papas y dilución (g/ml) empleada para la preparación del extracto, se obtuvo los valores expresados como Unidad de enzima por gramo de producto (U/g). Para transformar los valores de ( $\Delta A/\text{min}$ ) a las unidades (U/g) se utilizaron los factores del ANEXO 5.

**3.6.4 Diseño experimental.** Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado en bloques con 8 tratamientos y tres repeticiones, es decir 24 ensayos donde el factor a evaluar fue la actividad enzimática residual de Peroxidasa (POD) determinadas experimentalmente. En ellas se consideraron como variables:

- Variable Independiente (x) Muestras: Papas crudas, escaldadas, sometidas a enfriamiento y almacenadas por 21, 42, 63, 84 y 365 días.

- Variable Dependiente (y) Actividad enzimática residual de Peroxidasa (POD).

**3.6.5 Análisis estadísticos.** Con la finalidad de evaluar los resultados obtenidos en la investigación, se utilizaron los Software Statgraphics Plus 5.1 y Microsoft Excel 2002:

- Análisis de regresión para obtener una ecuación y por medio de ésta llegar a los valores expresados como Unidad de enzima (U).
- Análisis de varianza (ANDEVA), por comparación múltiple para determinar si hubo diferencias significativas entre las muestras.



## 4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1 Actividad enzimática de la materia prima en estado fresco

La materia prima fue caracterizada enzimáticamente determinando la actividad inicial de peroxidasa (POD). En el CUADRO 2 se presentan los promedios de actividad enzimática inicial de la papa analizada.

**CUADRO 2 Actividad enzimática inicial de la materia prima.**

	PEROXIDASA [ $\Delta A/\text{min g}$ ]	PEROXIDASA (U/g)
TURNO DIA	0,322	22,660
TURNO NOCHE	0,333	26,769

Las actividades enzimáticas del CUADRO 2 se presentan en dos unidades, U/g y ( $\Delta A/\text{min g}$ ). Los valores presentados como U/g fueron calculados según se indica en el ANEXO 5 y corresponden a Unidades estándar de actividad enzimática referidas a las enzimas comerciales. Los valores presentados como ( $\Delta A/\text{min g}$ ) corresponden al promedio de la actividad enzimática inicial y son válidos para comparar los resultados obtenidos con los informados por otros autores en las mismas unidades. Estos valores fueron calculados con el uso de los factores de conversión presentados en el ANEXO 5.

En el CUADRO 2 se observa que las actividades iniciales son similares entre cada turno, lo que comprueba con los resultados del análisis estadístico presentado en la tabla del ANEXO 16 y 17, para ambos turnos, no existen diferencias significativas.

La actividad de peroxidasa en la papa fresca fue de 0,322  $\Delta A/\text{min g}$  para el turno día y 0,333  $\Delta A/\text{min g}$  para el turno noche. Estos valores fueron inferiores a los informados por MUFTUGIL (1985), en su investigación en la resistencia térmica de peroxidasa en cubos de un centímetro de lado (4,02  $\Delta A/\text{min g}$ ) y que el valor obtenido por ACOSTA (1993) (5,6  $\Delta A/\text{min g}$ ). Una de las razones puede deberse a que se trabajó con una variedad de papa distinta a la que se está estudiando.

#### 4.2 Desactivación enzimática durante el proceso escaldado – hidrogenfriado en papas

Se determinó la actividad enzimática de los vegetales sometidos a tratamiento térmico a las condiciones descritas en 3.6.3.2, referidas a las combinaciones tiempo - temperatura de escaldado e hidrogenfriado. La actividad enzimática obtenida se transformó en porcentaje de Actividad Residual mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ ACTIVIDAD RESIDUAL} = \frac{(U/g)_t}{(U/g)_1} \times 100$$

Para peroxidasa, la cinética de desactivación enzimática se representó como la evolución de actividad enzimática en función del tiempo de almacenamiento. En el CUADRO 3 se presentan las actividades enzimáticas (U/g) y residual (% actividad residual).

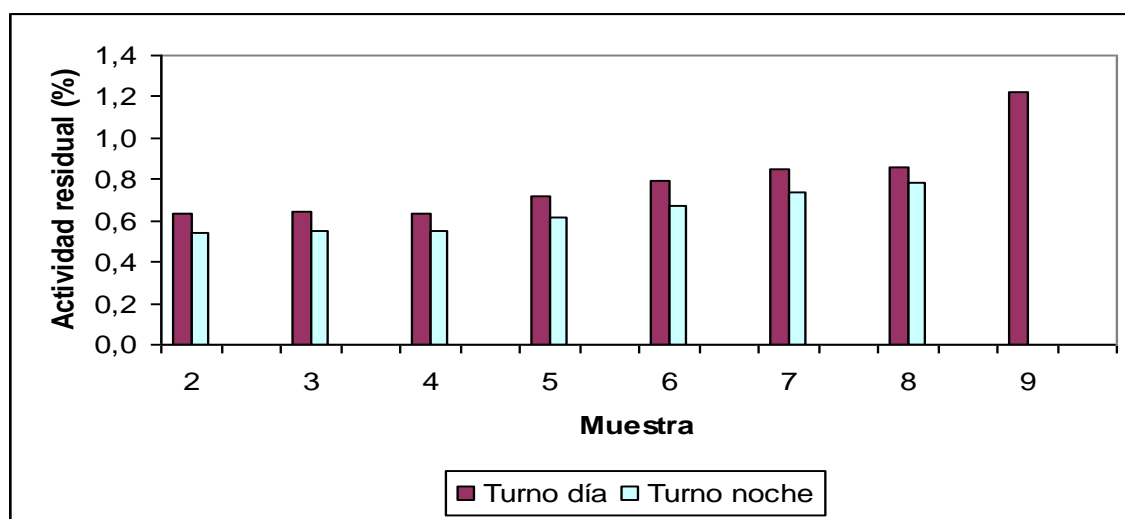
**CUADRO 3 Actividad POD en papas procesadas a 94,8°C por 1 minuto y 40 segundos almacenadas por 0, 21, 42, 63, 84 y 365 días.**

	TURNO DÍA		TURNO NOCHE	
	Actividad enzimática	Actividad residual	Actividad enzimática	Actividad residual
	POD (U/g)	POD (%)	POD (U/g)	POD (%)
Muestra 2	0,145	0,639	0,145	0,541
Muestra 3	0,146	0,645	0,146	0,546
Muestra 4	0,145	0,639	0,146	0,546
Muestra 5	0,162	0,716	0,164	0,612
Muestra 6	0,179	0,789	0,180	0,674
Muestra 7	0,192	0,846	0,197	0,736
Muestra 8	0,195	0,861	0,209	0,782
Muestra 9	0,277	1,223		

**Peroxidasa.** La gráfica de actividad enzimática residual se presenta para el turno día y turno noche. En las FIGURA11 se muestra la actividad residual obtenida del tratamiento térmico y almacenamiento, y se puede observar que la actividad enzimática fue afectada por la temperatura, tiempo del proceso y temperatura de almacenamiento.

Como se observa en el CUADRO 3, los resultados obtenidos para cada turno son similares. Si se analizan las muestras (1 a la 8) de ambos turnos con respecto a la actividad enzimática se puede observar que existen diferencias significativas. Esto se explica ya que la muestra 1 no ha presentado tratamiento térmico (ver ANEXO 6 y 7). Al realizar un análisis estadístico excluyendo la muestra 1 y sólo evaluar las muestras (2 a la 8) que si fueron escaldadas y luego almacenadas, se observa que no existen diferencias significativas (ver ANEXO 8 y 9). Lo que explica que la variación de actividad enzimática luego que las muestras fueron escaldadas y almacenadas fue mínima.

Al comparar estadísticamente las muestras (2-9) del turno día se observa que las muestras presentan diferencia significativa con la muestra 9. De esto se concluye que ésta muestra presentó una actividad enzimática mayor con respecto a las otras muestras, por lo que al almacenar papas por un periodo de 1 año se observa una reactivación de la peroxidasa (ver ANEXO 10 y 11).



**FIGURA 11** Actividades enzimáticas residuales (%) de peroxidasa para las diferentes muestras escaldadas y almacenadas en ambos turnos.

En el caso de las muestras sometidas a 94,8°C, se puede observar que al final del proceso de escaldado – hidrogenfriado (muestras 2, 3 y 4) se mantiene una actividad relativa de 0,64% para turno día y 0,54% para turno noche, como se muestra en el CUADRO 3, lo que indica que el proceso escaldado – hidrogenfriado logra reducir sobre un 98% la actividad enzimática inicial, esto se traduce en disminuciones significativas de peroxidasa residual con respecto a la no escaldada (fresca). Para la papa

congelada BÔTTCHER (1975) recomendó un proceso de escaldado de hasta un 0,7-3% de actividad residual. En general se requiere el 90% o más de reducción enzimática para obtener una óptima calidad de vegetales congelados.

Estos resultados no presentaron similitud al compararlos con los resultados reportados por GARROTE *et al.* (1988), ya que se obtuvo un 18% de actividad residual, a 90°C por 150 segundos; MUFTUGIL (1985), obtuvo un 3,76% de actividad enzimática a 180 segundos. Si con ACOSTA (1993) se logró una cierta similitud ya que su resultado fue de 0,95% de actividad residual a 95°C por 90 segundos.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede decir que la temperatura y el tiempo de escaldado utilizados en la Empresa Agrícolas Frutos del Maipo Ltda. es adecuada ya que según ACOSTA (1993) a los 65°C se observó que a 20 minutos no se logró una buena inactivación de ésta enzima, ya que se obtuvo un 24,91% de la actividad residual. SARIKAYA y OZILGEN (1991) en su trabajo de investigación con papa entera pequeña (4 cm de diámetro) y peladas encontraron que a los 65°C y 20 minutos la actividad residual fue de 25%, y a los 60 minutos de escaldado logró un 10% de actividad residual. MUFTUGIL (1985) estudio la actividad de peroxidasa residual en cubos de papas de 1 cm logrando a 75°C y 20 minutos una actividad residual de 41,10%. GARROTE *et al.* (1988) estudiaron la actividad residual de la papa a 80°C y 150 segundos logrando un 38% de actividad residual. SARIKAYA y OLZIGEN (1991) lograron un 7% de actividad a los 40 minutos y a 80°C, lo mismo con MUFTUGIL (1985) que obtuvo a los 4 minutos un 13,18% y a los 15 minutos un 3,4% de actividad residual.

### **4.3 Actividad enzimática de la peroxidasa en el almacenamiento**

Con respecto a la actividad enzimática en las muestras almacenadas (4 a la 8), se puede observar que hubo una variación de 0,64% a 0,86% para turno día y de 0,54% a 0,78% para turno noche. Esto quiere decir que la muestra almacenada por 84 días mostró una pequeña variación con respecto a la actividad enzimática residual de la muestra 4 (0 días de almacenamiento), lo que estadísticamente muestra que no existe diferencias significativas entre las muestras almacenadas por 0 a 84 días (ver ANEXO 12 y 13)

La muestra 9 que corresponde a un periodo de almacenamiento de 1 año llegó a un 1,22% de actividad residual, el aumento de actividad enzimática presenta diferencias significativas con respecto a las otras muestra almacenadas (ver ANEXO 14 y 15). Esto muestra que la temperatura de almacenamiento de -18°C usada en la Empresa Agrícola Frutos del Maipo LTDA. es la adecuada ya que el porcentaje que aumentó no es un valor considerable para el tiempo que lleva congelada y coincidiría con lo señalado por BARREIRO y SANDOVAL (2001) quienes señalan que la regeneración de la actividad residual depende de almacenamiento, habiéndose encontrado que a menor temperatura de almacenamiento más largo es el tiempo requerido para la reactivación. Sin embargo, APARICIO - CUESTA *et al.* (1992) demuestran que aún con desactivación total de la enzima durante el escaldado, se produce regeneración durante el almacenamiento en congelación a -18°C, aún cuando esta actividad regenerada no supera el 1,23% de la actividad inicial del vegetal.

## 5 CONCLUSIONES

- La actividad inicial de la papa no presenta diferencias significativas entre el turno día y turno noche.
- Un proceso de escaldado – hidrogenfriado a 94,8°C por 1 minuto y 40 segundos, logra reducir significativamente la actividad de la enzima peroxidasa (POD).
- Las muestras almacenadas no presentan diferencias significativas entre ellas. Esto quiere decir que el tiempo de almacenamiento no influyó en la actividad residual de la enzima peroxidasa, hubo reactivación al año y una tendencia antes. No se puede decir lo mismo con la muestra 9, que estaba almacenada por 1 año, ésta muestra presentó diferencias significativas con respecto a las demás muestras.
- Por los resultados se puede observar que el proceso de escaldado – hidrogenfriado a la temperatura y tiempo antes mencionada logró reducir por sobre un 90% la actividad enzimática de la peroxidasa del producto inicial, por lo que se puede concluir que el proceso utilizado en Agrícola Frutos del Maipo Ltda. es óptimo y eficaz.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, S. 1993. Lixiviación de Azúcares Reductores y Resistencia Térmica de la Enzima Peroxidasa en Papa (*Tuberosum Solanum*) durante un escaldado en agua. Tesis como requisito para obtener el Título de Ingeniero Químico. Universidad de Sonora, México. 52 p.

APARICIO-CUESTA M., MATEOS-NOTARIO M. y RIVAS-GONZALO J. 1992. Sensory evaluations and changes in peroxidase activity during storage of frozen green beans. *J. Food Sci.* 57(5): 1129-1131

BARREIRO, J. y SANDOVAL, A. 2001. Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Editorial Equinoccio. 359 p.

BARRET, D.M y THEERAKULRAIT, C. 1995. Quality indicators in blanched, frozen, stored vegetables. *Food Tech.* 49 (1): 62-65.

BEN-AZIZ, A., GROSSMAN, S., ASCARELLI, I. y BUDOWSKI, P. 1970. Linoleate oxidation induced by Lipoxygenase and heme proteins: A direct spectrophotometric assay. *Analytical Biochemistry.* Vol 34: 88-100

CASP, A. y ABRIL, J. 1999. Procesos de conservación de alimentos. Ediciones Mundi=Prensa. Madrid, España. 494 p.

CHANG, Y., PENNESI, A. y DICKSON, M. 1984. Characterization of Cauliflower Peroxidase Isoenzyme. *Journal Agric. Food Chem.* 32(1):18-21

SHEU, S. y CHEN, A. 1991. Lipoxygenase as Blanching Index for Frozen Vegetable Soybeans. *J. Food Sci.* 56(2): 448-451

COCCIO, CLAUDIA E. (2006). "Estudio de la distribución del aceite en rodajas de papa frita. Memoria para optar al título de Ingeniero de Alimentos. Facultad Tecnológica, departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Santiago de Chile. 65 P.

DIETRICH, W.C., HUXSOLL, C.C y GUADAGNI, D.G. 1970. Comparison of microwave convectional and combination blanching of brussels sprouts for frozen storage. *Food Tech.* 24(6): 613-617

FELLOWS, P. 1988. Food processing technology: principles and practice. Ellis Horwood. Chichester, USA. 505 p.

FENNEMA, O. 2000. Química de los Alimentos. 2ª ed. Zaragoza. España. Acribia. 1258 p.

- GARCÍA, M.; QUINTERO, R. y LÓPEZ, A. 2002. *Biología Alimentaria*. Editorial Limusa. 636 p.
- GARROTE, R., SILVA, E. y BERTONE, R. 1988. Effect of Surface Freezing on Ascorbic Acid Retention in Water Blanching Potato Strips. *Journal of Food Science*. 1090 – 1091
- HALPIN, B., PRESSEY, R., JEN, J y MONDY, N 1989. Purification and characterization of peroxidase isoenzyme from Green Peas (*pisum sativum*). *J. Food Sci.* 54(3): 644-649
- HEMEDA, H. y KLEIN, B. 1990. Inactivation and Regeneration of Peroxidase Activity in Vegetable Extracts Treated with Antioxidants. *J. Food Sci.* 56(1): 68-71
- HERMSOM, A.C. y HULLAND, E.D. 1984. *Conservas alimenticias*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 451 p.
- HOLDSWORTH, S.D. 1993. Congelación y refrigeración. En: *Manual de industrias de los alimentos*. Raken, M.D. (ed). Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp.475-498.
- HURT, H.D. 1979. Effect of canning on the nutritive value of vegetables. *Food Tech.* 3(2) : 84-86.
- KAMPIS, A., BARTUCZ-KOVÁCS, O., HOSCHKE, A. y VAMOS-VIGYÁZÓ 1984. Changes in peroxidase Activity of Brócoli during Processing and Frozen Storage. *Lebensm – Wiss u – Technology*. 17(5): 293-295
- LARRAZÁBAL, M. 2000. Estudio Experimental de la desactivación de las enzimas Peroxidasa y Lipoxigenasa Durante el Proceso combinado Escaldado – Hidroenfriado de Zanahorias (*Daucus carota L.*), Espárragos Verdes (*Asparagus officinalis L.*) y Arvejas Verdes (*Pisum sativum L.*). Tesis para optar al grado de licenciado en Ingeniería en Alimentos Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 98 p.
- LAZAR, LUND, D.B. y DIETRICH, W. 1971. IQB: A new concept in blanching. *Food Tech.* 25 (7): 24-26.
- LUH, B.S. y KEAN, C.E. 1988. Canning of vegetables. In: *Commercial vegetable processing*. Luh, B.S. and woodroof, J.G. (eds). Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 195-285.
- LUND, D.B. 1977. Design of thermal process for maximizing nutrient retention. *Food Tech.* 31(2): 71-78.
- MATHEIS, G. 1990. La lipoxigenasa como enzima indicador en el blanqueado de verduras. *Dragoco Report. Información sobre sabores*. 2/1990: 52 – 59

MUFTUGIL, N. 1985. The peroxidase Enzyme Activity of some Vegetable an its Resistence to heat. J. Sci. Food Agric. 36: 877 – 880.

NARVÁEZ, C. 2008. Extracción y medida de peroxidasa en pulpa de Arazá. Departamento de Química. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Ciudad Universitaria, Bogotá-Colombia. 31(8):2047-2051.

NOÉ, C., REYES, M., DE LA GARZA, H. y CONTRERAS, J. 1999. Aspectos bioquímicos de la relación entre el escaldado TB-TL y la textura de vegetales procesados. Journal of the Mexican chemical society. 43 (002): 54-62.

POULSEN, K.P. 1986. Optimization of vegetables blanching. Food tech. (6): 122-129.

RATERA, E. 1945. El cultivo de la papa. Editorial Sudamerica. Buenos Aires. Argentina. 158 p.

RAVENTÓS M. 2005. Industria alimentaria, tecnologías emergentes. ediciones UPC. 210 p.

REES, J.A.G y BETTISON, J. 1993. Enlatado. En: Manual de industrias de los alimentos. Ranken, M.D. (ed). Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 242-292.

SÁNCHEZ, M.T. 2003. Procesos de elaboración de alimentos y bebidas. Ediciones Mundi-Prensa Madrid, España. 518 p.

SARICAYA, A. y OLZIGEN, M. 1991. Kinetics of Peroxidase Inactivation During Thermal Processing of Whole Potatoes. Lebensn wiss U. Technol. 159 – 163 p.

SCHMIDT-HEBBEL, H. y PENNACCHIOTTI, I. 1982. Las enzimas en los alimentos. Editado por Fundación Chile. Santiago. Chile. 93p.

SHAMS, M.A. y THOMPSON, D.R. 1987. Quantitative determination of pea losses as affected by convectional water blanching. J. Food Sc. 52: 1006-1009.

SHARMA, S.; MULVANEY, S. y RIZVI, S. 2003. Operaciones unitaria y práctica de laboratorio. Editorial Limusa S.A. Mexico, D.F. 348 p.

URRUTIA, JUAN. 2001. Papas nativas de la isla Grande de Chiloé y sus perspectivas decomercialización en el Mercado Gastronómico de Valdivia. Tesis (Ingeniero Agrónomo).Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 2001. 119 p.

WENG, Z., HENDRICKX, M., MAESMANS, G. y TOBBACK, P. 1991. Immobilized Peroxidase: Apotential bioindicator for evaluation of thermal processes. Journal of Food Science, 56(2): 567 – 570.

WHITAKER, J. 1972. Principles of enzymology for the Food Sciences. Editorial Marcel Dekker In. New York. Vol 2: 592-615.



WILLIAMS, DC., LIM, MH., CHEN, AO., PANGBORN, RM. y WHITAKER, JR. 1986. Blanching of Vegetables for Freezing Which Indicator Enzyme to Choose. Food Technology. 40(69): 130-139.

WOODROOF, J.G. 1988. Preparing vegetables for processing. In: Commercial vegetables processing. AVI Book, Van Nostrand Reinhold. New York. pp: 175-192.

**ANEXOS****ANEXO 1 Datos de curva de calibración con estándares comerciales.**

<b>POD (U)</b>	<b>[<math>\Delta</math>A470]</b>	<b>[<math>\Delta</math>A470/min]</b>
1,2195	0,2150	0,0108
0,6098	0,1960	0,0098
0,3049	0,1680	0,0084
0,1524	0,1250	0,0063
0,0762	0,0980	0,0049
0,0381	0,0870	0,0044
0,0191	0,0590	0,0030

\* Los resultados corresponden al promedio de 3 repeticiones.

**ANEXO 2 Tiempo de reacción de enzimas comerciales.**

<b>Tiempo (s)</b>	<b><math>\Delta A_{470}</math></b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b><math>\Delta A_{470}</math></b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b><math>\Delta A_{470}</math></b>
0	0	495	0,082	990	0,149
15	0,022	510	0,084	1005	0,152
30	0,025	525	0,086	1020	0,155
45	0,029	540	0,088	1035	0,157
60	0,031	555	0,09	1050	0,158
75	0,033	570	0,091	1065	0,159
90	0,036	585	0,093	1080	0,163
105	0,037	600	0,095	1095	0,164
120	0,039	615	0,097	1110	0,166
135	0,043	630	0,099	1125	0,169
150	0,043	645	0,102	1140	0,171
165	0,045	660	0,102	1155	0,174
180	0,046	675	0,104	1170	0,178
195	0,047	690	0,107	1185	0,179
210	0,049	705	0,11	1200	0,18
225	0,05	720	0,112	1215	0,18
240	0,051	735	0,115	1230	0,18
255	0,055	750	0,115	1245	0,18
270	0,055	765	0,116	1260	0,18
285	0,058	780	0,118	1275	0,18
300	0,06	795	0,12	1290	0,18
315	0,06	810	0,123	1305	0,18
330	0,062	825	0,124	1320	0,18
345	0,064	840	0,127	1335	0,18
360	0,066	855	0,129	1350	0,18
375	0,068	870	0,13	1365	0,18
390	0,07	885	0,133	1380	0,18
405	0,073	900	0,135	1395	0,18
420	0,074	915	0,138	1410	0,18
435	0,076	930	0,14	1425	0,18
450	0,077	945	0,142	1440	0,18
465	0,079	960	0,144	1455	0,18
480	0,08	975	0,147	1470	0,18

**ANEXO 3 Pruebas preliminares de dilución de producto en buffer.**

<b>Tratamientos</b>	<b>Peroxidasa <math>\Delta A_{470}</math></b>
A: 3 g/5 ml	>1,5
B: 4 g/10 ml	>1,5
C: 3g/50 ml	1,35
<b>D: 5 g/20ml</b>	<b>0,311</b>

#### ANEXO 4 Valores de absorbancia obtenidos para cada muestra.

##### Turno día

Muestra	[Absorbancia] <sub>1</sub>	[Absorbancia] <sub>2</sub>	[Absorbancia] <sub>3</sub>	[Absorbancia] <sub>prom.</sub>	D.S
1	0,188	0,192	0,200	0,193	0,006
2	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001
3	0,002	0,002	0,001	0,002	0,001
4	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001
5	0,005	0,005	0,007	0,006	0,001
6	0,009	0,010	0,009	0,009	0,001
7	0,011	0,012	0,013	0,012	0,001
8	0,013	0,012	0,013	0,013	0,001
9	0,025	0,026	0,027	0,026	0,001

##### Turno Noche

Muestra	[Absorbancia] <sub>1</sub>	[Absorbancia] <sub>2</sub>	[Absorbancia] <sub>3</sub>	[Absorbancia] <sub>prom.</sub>	D.S
1	0,199	0,200	0,200	0,200	0,001
2	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001
3	0,002	0,001	0,002	0,002	0,001
4	0,002	0,002	0,001	0,002	0,001
5	0,006	0,005	0,007	0,006	0,001
6	0,010	0,010	0,009	0,010	0,001
7	0,012	0,013	0,014	0,013	0,001
8	0,014	0,016	0,016	0,015	0,001

Muestra 1: Antes de entrar al proceso de escaldado.

Muestra 2: Salida del escaldador

Muestra 3: Luego del enfriado y antes de entrar a la cámara IQF.

Muestra 4: Salida de la cámara IQF, día 0 de almacenamiento.

Muestra 5: 21 días de almacenamiento en cámara de frío.

Muestra 6: 42 días de almacenamiento en cámara de frío.

Muestra 7: 63 días de almacenamiento en cámara de frío.

Muestra 8: 84 días de almacenamiento en cámara de frío.

Muestra 9: Muestra obtenida de bins almacenado por un tiempo de 1 año.

**ANEXO 5 Ejemplo de cálculo de conversión de absorbancia en actividad enzimática (U/g).**

**Turno día**

Muestra	[Absorbancia] <sub>prom</sub>	[ $\Delta A/\text{min}$ ] ( $\text{min}^{-1}$ )	A. Enzimática (U)	A. Enzimática (U/g)
<b>1</b>	<b>0,193</b>	<b>0,010</b>	<b>0,680</b>	<b>22,660</b>
2	0,001	0,000	0,004	0,145
3	0,002	0,000	0,004	0,146
4	0,001	0,000	0,004	0,145
5	0,006	0,000	0,005	0,162
6	0,009	0,000	0,005	0,179
7	0,012	0,001	0,006	0,192
8	0,013	0,001	0,006	0,195
9	0,026	0,001	0,008	0,277

**Turno Noche**

Muestra	[Absorbancia] <sub>prom</sub>	[ $\Delta A/\text{min}$ ] ( $\text{min}^{-1}$ )	A. Enzimática (U)	A. Enzimática (U/g)
1	0,200	0,010	0,803	26,769
2	0,001	0,000	0,004	0,145
3	0,002	0,000	0,004	0,146
4	0,002	0,000	0,004	0,146
5	0,006	0,000	0,005	0,164
6	0,010	0,000	0,005	0,180
7	0,013	0,001	0,006	0,197
8	0,015	0,001	0,006	0,209

Ejemplo de cálculo de la actividad enzimática en muestra 1, turno día. Las lecturas de absorbancia se convierten a  $\Delta A/\text{min}$  dividiendo por el tiempo de reacción, en éste caso 20 minutos:

i)  $\Delta A/t = 0,200/20 \text{ min.} = 0,010 \text{ min}^{-1}$

Luego utilizando la ecuación de la curva de calibración de peroxidasa comercial de la FIGURA 2, se obtiene la actividad enzimática (U).

ii)  $y = 0,0019 \ln(x) + 0,0104$ , donde Y corresponde a  $\Delta A/\text{min}$  y X a la actividad enzimática (U).

Despejamos,

$$U = e^{(\Delta A - 0,0104 / 0,0019)}$$

$$U = e^{(0,010 - 0,0104 / 0,0019)}$$

$$\text{Actividad enzimática} = 0,680 \text{ U}$$

Posteriormente, utilizando la dilución del extracto de papa más el extracto de la reacción, se obtiene la actividad de peroxidasa por gramo de papa.

$$\text{iii) } 5\text{g}/20\text{ml} = 0,25 \text{ g/ml}$$

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{0,680\text{U}}{0,12\text{ml}} \times \frac{1\text{ml}}{0,25\text{g}} = 22,660 \text{ U/g}$$

**ANEXO 6 Análisis de varianza (ANDEVA) para las muestras (1-8) v/s actividad enzimática.**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3271,54	7	467,362	426,63	0,0000
Within groups	43,8191	40	1,09548		
Total (Corr.)	3315,35	47			

\* Con un 95% de confianza, P-Valor < 0,05 existen diferencias significativas.



**ANEXO 7 Test de comparación múltiple de Tukey para las muestras (1-8) v/s  
Actividad enzimática.**

Muestras	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	6	25,1493	A
2	6	0,140833	B
3	6	0,141833	B
4	6	0,141333	B
5	6	0,158667	B
6	6	0,1745	B
7	6	0,356	B
8	6	0,197167	B

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*25,0085	1,93173
1 - 3	*25,0075	1,93172
1 - 4	*25,008	1,93172
1 - 5	*24,9907	1,93172
1 - 6	*24,9748	1,93172
1 - 7	*24,7933	1,93172
1 - 8	*24,9522	1,93172
2 - 3	-0,001	1,93172
2 - 4	-0,0005	1,93172
2 - 5	-0,0178333	1,93172
2 - 6	-0,0336667	1,93172
2 - 7	-0,215167	1,93172
2 - 8	-0,0563333	1,93172
3 - 4	0,0005	1,93172
3 - 5	-0,0168333	1,93172

3 - 6	-0,0326667	1,93172
3 - 7	-0,214167	1,93172
3 - 8	-0,0553333	1,93172
4 - 5	-0,0173333	1,93172
4 - 6	-0,0331667	1,93172
4 - 7	-0,214667	1,93172
4 - 8	-0,0558333	1,93172
5 - 6	-0,0158333	1,93172
5 - 7	-0,197333	1,93172
5 - 8	-0,0385	1,93172
6 - 7	-0,1815	1,93172
6 - 8	-0,0226667	1,93172
7 - 8	0,158833	1,93172

---

\* denotes a statistically significant difference.

**ANEXO 8 Análisis de varianza (ANDEVA) para las muestras (2-8) v/s actividad enzimática.**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,21528	6	0,03588	1,60	0,1752
Within groups	0,782673	35	0,0223621		
Total (Corr.)	0,997952	41			

\*Con un 95% de confianza, P-Valor > 0,05 no existen diferencias significativas.

**ANEXO 9 Test de comparación múltiple de Tukey para las muestras (2-8) v/s actividad enzimática.**

Muestras	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	6	0,140833	A
3	6	0,141833	A
4	6	0,141333	A
5	6	0,158667	A
6	6	0,1745	A
7	6	0,356	A
8	6	0,197167	A

Contrast	Difference	+/- Limits
2 - 3	-0,001	0,26991
2 - 4	-0,0005	0,26991
2 - 5	-0,0178333	0,26991
2 - 6	-0,0336667	0,26991
2 - 7	-0,215167	0,26991
2 - 8	-0,0563333	0,26991
3 - 4	0,0005	0,26991
3 - 5	-0,0168333	0,26991
3 - 6	-0,0326667	0,26991
3 - 7	-0,214167	0,26991
3 - 8	-0,0553333	0,26991
4 - 5	-0,0173333	0,26991
4 - 6	-0,0331667	0,26991
4 - 7	-0,214667	0,26991
4 - 8	-0,0558333	0,26991
5 - 6	-0,0158333	0,26991
5 - 7	-0,197333	0,26991

5 - 8	-0,0385	0,26991
6 - 7	-0,1815	0,26991
6 - 8	-0,0226667	0,26991
7 - 8	0,158833	0,26991

---

\* denotes a statistically significant difference.

**ANEXO 10 Análisis de varianza (ANDEVA) para las muestras (2-9) v/s Actividad enzimática, turno día.**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,038228	7	0,00546114	17,27	0,0000
Within groups	0,00506	16	0,00031625		
Total (Corr.)	0,043288	23			

\*Con un 95% de confianza, P-Valor < 0,05 existen diferencias significativas.

**ANEXO 11 Test de comparación múltiple de Tukey para las muestras (2-9) v/s actividad enzimática, turno día.**

Muestras	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	3	0,136667	A
3	3	0,137667	A
4	3	0,136667	A
5	3	0,153333	A
6	3	0,168667	A
7	3	0,181667	A
8	3	0,185	A
9	3	0,264	B

Contrast	Difference	+/- Limits
2 - 3	-0,001	0,0503395
2 - 4	0,0	0,0503395
2 - 5	-0,0166667	0,0503395
2 - 6	-0,032	0,0503395
2 - 7	-0,045	0,0503395
2 - 8	-0,0483333	0,0503395
2 - 9	*-0,127333	0,0503395
3 - 4	0,001	0,0503395
3 - 5	-0,0156667	0,0503395
3 - 6	-0,031	0,0503395
3 - 7	-0,044	0,0503395
3 - 8	-0,0473333	0,0503395
3 - 9	*-0,126333	0,0503395
4 - 5	-0,0166667	0,0503395
4 - 6	-0,032	0,0503395

4 - 7	-0,045	0,0503395
4 - 8	-0,0483333	0,0503395
4 - 9	*-0,127333	0,0503395
5 - 6	-0,0153333	0,0503395
5 - 7	-0,0283333	0,0503395
5 - 8	-0,0316667	0,0503395
5 - 9	*-0,110667	0,0503395
6 - 7	-0,013	0,0503395
6 - 8	-0,0163333	0,0503395
6 - 9	*-0,0953333	0,0503395
7 - 8	-0,00333333	0,0503395
7 - 9	*-0,0823333	0,0503395
8 - 9	*-0,079	0,0503395

---

\* denotes a statistically significant difference.



**ANEXO 12 Análisis de varianza (ANDEVA) para las muestras almacenadas (4-8)  
v/s Actividad enzimática.**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,179948	4	0,0449871	1,44	0,2506
Within groups	0,781757	25	0,0312703		
Total (Corr.)	0,961705	29			

\* Con un 95% de confianza, P-Valor > 0,05 no existen diferencias significativas.

**ANEXO 13 Test de comparación múltiple de Tukey para las muestras almacenadas v/s Actividad enzimática.**

Tiempo	Count	Mean	Homogeneous Groups
4	6	0,141333	A
5	6	0,158667	A
6	6	0,1745	A
7	6	0,356	A
8	6	0,197167	A

Contrast	Difference	+/- Limits
4 - 5	-0,0173333	0,299905
4 - 6	-0,0331667	0,299905
4 - 7	-0,214667	0,299905
4 - 8	-0,0558333	0,299905
5 - 6	-0,0158333	0,299905
5 - 7	-0,197333	0,299905
5 - 8	-0,0385	0,299905
6 - 7	-0,1815	0,299905
6 - 8	-0,0226667	0,299905
7 - 8	0,158833	0,299905

\* denotes a statistically significant difference.

**ANEXO 14 Análisis de varianza (ANDEVA) para las muestras almacenadas (4-9)  
v/s Actividad enzimática, Turno día.**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0293598	5	0,00587196	16,14	0,0001
Within groups	0,00436467	12	0,000363722		
Total (Corr.)	0,0337244	17			

\* Con un 95% de confianza, P-Valor < 0,05 existen diferencias significativas.

**ANEXO 15 Test de comparación múltiple de Tukey para las muestras almacenadas (4-9) v/s Actividad enzimática, turno día.**

Tiempo	Count	Mean	Homogeneous Groups
4	3	0,136667	A
5	3	0,153333	A
6	3	0,168667	A
7	3	0,181667	A
8	3	0,185	A
9	3	0,264	B

Contrast	Difference	+/- Limits
4 - 5	-0,0166667	0,0523116
4 - 6	-0,032	0,0523116
4 - 7	-0,045	0,0523116
4 - 8	-0,0483333	0,0523116
4 - 9	* -0,127333	0,0523116
5 - 6	-0,0153333	0,0523116
5 - 7	-0,0283333	0,0523116
5 - 8	-0,0316667	0,0523116
5 - 9	* -0,110667	0,0523116
6 - 7	-0,013	0,0523116
6 - 8	-0,0163333	0,0523116
6 - 9	* -0,0953333	0,0523116
7 - 8	-0,00333333	0,0523116
7 - 9	* -0,0823333	0,0523116
8 - 9	* -0,079	0,0523116

\* denotes a statistically significant difference.

**ANEXO 16 Análisis de varianza (ANDEVA) para Actividad enzimática inicial v/s Turno día y Turno noche.**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	15,7853	1	15,7853	2,32	0,2026
Within groups	27,2511	4	6,81277		
Total (Corr.)	43,0364	5			

\* Con un 95% de confianza, P-Valor > 0,05 no existen diferencias significativas.

**ANEXO 17 Test de comparación múltiple de Tukey para Turno día y turno noche v/s Actividad enzimática inicial.**

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	3	23,5273	A
2	3	26,7713	A
-----			
Contrast		Difference	+/- Limits
-----			
1 - 2		-3,244	5,91707
-----			
* denotes a statistically significant difference.			