

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



CBS

**EFFECTO DE UNA ATMÓSFERA RICA EN CO<sub>2</sub> EN LA  
ACUMULACIÓN DE ETANOL Y ACTIVIDAD DE LA  
POLIFENOLOXIDASA MEDIANTE LA FORMACIÓN DE  
PIGMENTOS EN PAPA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

ROSA MARÍA GALICIA CABRERA

MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE, 2001

**U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA**

“El posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el padrón de Posgrados de excelencia del CONACYT, y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo con el convenio 471-0/maestría en biotecnología”

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó  
la comunicación de los resultados que presentó:

**ING. ROSA MARÍA GALICIA CABRERA**

El día 19 de noviembre del 2001

Comité tutorial:

Directora: Dra. Isabel Guerrero Legarreta

Universidad Autónoma Metropolitana



Asesor: Dra. Edith Ponce Alquicira

Universidad Autónoma Metropolitana



Asesor: Dr. Crescenciano Saucedo Veloz

Colegio de Postgraduados



Sinodal: Dr. Francisco Cruz Sosa

Universidad Autónoma Metropolitana



Sinodal: Dra. María Eugenia Jaramillo Flores

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas  
Instituto Politécnico Nacional



**U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA**

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL  
LABORATORIO DEL ÁREA DE BIOQUÍMICA DE  
MACROMOLÉCULAS DEL DEPARTAMENTO DE  
BIOTECNOLOGÍA

Fr: 67762

## RESUMEN

La papa Alpha es el principal cultivar que se comercializa en México tanto para su consumo en fresco como para el procesamiento. Este tubérculo es susceptible a reacciones de oscurecimiento enzimático que afectan la calidad y aceptación por el consumidor. Por otra parte, su almacenamiento a bajas temperaturas inducen la síntesis de azúcares reductores y alteran el sabor y textura. Considerando que el almacenamiento de ciertas frutas y hortalizas en atmósferas controladas pueden inhibir la actividad de la polifenoloxidasas (PPO) y por tanto reducir el oscurecimiento enzimático, se aplicó una atmósfera rica en CO<sub>2</sub> (30% balance aire) a papas cv. Alpha procedentes de Los Mochis, Sin. a 7°C durante 120 horas; también se aplicaron estas condiciones de almacenamiento a un sistema modelo de extracto crudo de papa a dos niveles de pH (4.5 y 6.5).

Tanto las papas enteras como el sistema modelo del extracto sometido a la atmósfera rica en CO<sub>2</sub>, presentaron una reducción en la actividad de la PPO sin afectar realmente la concentración de proteína. Mientras que la concentración de azúcares reductores solubles fue menor en las papas sometidas a la atmósfera en estudio que en el tratamiento control (aire). Sin embargo, en el sistema modelo del extracto crudo, la concentración de azúcares reductores fue en ascenso durante las horas de almacenamiento a los dos niveles de pH. Otros parámetros de calidad que se evaluaron fueron el pH, acidez titulable, sólidos solubles totales, pérdida de peso, índice de oscurecimiento en pulpa y cáscara, textura y acumulación de etanol. A excepción de la textura, en general los otros parámetros presentaron valores menores en la atmósfera en estudio, respecto al control. Por lo que se puede considerar que esta atmósfera rica en CO<sub>2</sub> se puede aplicar a las papas cv. Alpha por periodos cortos de tiempo inhibiendo la actividad de la polifenoloxidasas y disminuyendo la conversión de azúcares reductores sin afectar significativamente la calidad del producto.

**PALABRAS CLAVE:** polifenoloxidasa, papa, azúcares reductores, atmósfera controlada.

## ABSTRACT

Alpha cultivar is the main potato crop merchandized in Mexico for direct consumption and processing. This tuber is susceptible to enzymatic browning, affecting its quality and consumer's acceptability. On the other hand, low-temperature storage induce reducing sugar synthesis, hence altering potato flavor and texture. Storage of several fruits and vegetables under controlled atmospheres inhibit polyphenoloxidase (PPO) activity resulting in less enzymatic browning. A CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere (30% air balance) was used to store potatoes cv. Alpha. Samples were harvested in Los Mochis, State of Sinaloa, Mexico, and stored at 7°C during 120 hours. A model system, consisting in a potato crude extract, pH 4.5 and 6.5, was also stored under the same atmosphere.

Both systems, potatoes and extract, stored under the CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere showed a reduction in PPO activity without affecting protein concentration. Reducing sugar concentration was lower in potatoes stored in CO<sub>2</sub> atmospheres than in samples stored in air. However, reducing sugars in the model system at pH 4.5 and 6.5 increased throughout the storage time. Other quality parameters evaluated in this study were: pH, titrable acidity, total soluble solids, weight loss, browning index in the pulp and skin, texture and ethanol accumulation. With the exception of texture, these parameters had lower values in samples stored under CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres as compared to samples stored under air. It can be concluded that CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres can be applied to potatoes cv. Alpha during short time periods without considerably affecting the quality, but inhibiting PPO activity and decreasing reducing sugar formation.

**KEY WORDS:** polyphenoloxidase, potato, reducing sugars, controlled atmosphere

## INDICE GENERAL

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	viii
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	xvii
<b>INDICE DE ANEXOS</b> .....	xviii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
2.1 Producción e importancia comercial.....	4
2.2 Características morfológicas y anatómicas.....	5
2.3 Composición química y valor nutritivo.....	8
2.3.1 Carbohidratos .....	8
2.3.2 Proteínas.....	8
2.3.3 Vitaminas y minerales.....	10
2.3.4 Lípidos y ácidos orgánicos.....	10
2.3.5 Enzimas y pigmentos.....	10
2.3.6 Factores antinutricionales.....	11

2.3.7 Valor nutritivo.....	11
2.4 Manejo poscosecha y almacenamiento.....	12
2.4.1 Cosecha.....	12
2.4.2 Manejo poscosecha.....	12
2.4.3 Curado.....	12
2.4.4 Almacenamiento.....	14
2.5 Factores que afectan la calidad del tubérculo.....	15
2.5.1 Azúcares en las papas durante el almacenamiento.....	16
2.5.2 Almidón.....	18
2.5.3 Síntesis del almidón.....	19
2.5.4 Degradación del almidón.....	20
2.5.5 Reacciones de oscurecimiento.....	20
2.5.5.1 Oscurecimiento no enzimático.....	21
a) Caramelización.....	21
b) Reacción de Maillard.....	22
2.5.5.2 Oscurecimiento enzimático.....	26
a) Participación de la polifenoloxidasa (PPO).....	27
b) Acciones preventivas.....	30
2.6 La polifenoloxidasa en los vegetales.....	31
2.6.1 Localización.....	32
2.6.2 Papel biológico.....	34
2.6.3 Aislamiento.....	35
2.6.4 Purificación.....	39
2.6.5 Métodos de determinación de actividad.....	40
2.6.6 Heterogeneidad y estructura molecular.....	41
2.6.7 Pesos moleculares.....	42
2.6.8 Especificidad del sustrato.....	43
2.6.9 Inhibidores de la PPO.....	44
2.6.10 pH óptimo y estabilidad térmica.....	45
2.7 Respiración.....	45

2.7.1 Síntesis de la sacarosa.....	48
2.8 AM/AC como método de conservación .....	49
2.8.1 Atmósfera modificada y atmósfera controlada.....	51
2.8.2 Atmósferas ricas en CO <sub>2</sub> .....	54
2.8.3 Efecto de altas concentraciones de CO <sub>2</sub> en el metabolismo de frutas y hortalizas.....	56
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>62</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>63</b>
4.1 Objetivo general.....	63
4.2 Objetivos específicos .....	63
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>64</b>
5.1 Materiales.....	64
5.1.1 Material biológico.....	64
5.1.2 Recipientes herméticos.....	64
5.2 Métodos.....	64
5.2.1 Estudios en papas enteras.....	65
5.2.1.1 Preparación de muestras.....	65
5.2.1.2 Almacenamiento de las papas enteras en el sistema.....	65
5.2.1.3 Métodos analíticos.....	68
a) Determinación de pH, acidez titulable (AT), sólidos solubles totales (SST) y pérdida de peso (PP).....	68
b) Determinación del índice de oscurecimiento (IO).....	69
c) Determinación de textura.....	69
d) Determinación de acumulación de etanol.....	69
e) Determinación de actividad enzimática .....	70

f) Determinación de concentración de proteína .....	71
g) Determinación de concentración de azúcares reductores solubles.....	71
5.2.2 Estudios en un sistema modelo.....	71
5.2.2.1 Preparación de muestras.....	71
a) Extracto crudo de PPO a pH 6.5 .....	71
b) Extracto crudo de PPO a pH 4.5 .....	72
5.2.2.2 Almacenamiento del sistema modelo de extracto crudo de papa... .....	72
a) Almacenamiento en aire del extracto crudo .....	72
b) Almacenamiento en atmósfera rica en CO <sub>2</sub> al 30% balance aire del extracto crudo .....	72
5.2.2.3 Métodos analíticos .....	74
a) Determinación de actividad enzimática .....	75
b) Determinación de la concentración de proteína .....	76
c) Medición de la concentración de azúcares reductores solubles .....	76
5.2.3 Análisis estadístico.....	76
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>77</b>
6.1 Papas enteras .....	77
6.1.1 pH .....	77
6.1.2 Acidez titulable .....	79
6.1.3 Sólidos solubles totales.....	81
6.1.4 Pérdida de peso .....	82
6.1.5 Índice de oscurecimiento en pulpa .....	84
6.1.6 Índice de oscurecimiento en cáscara .....	86
6.1.7 Textura .....	87
6.1.8 Acumulación de etanol .....	89

---

---

6.1.9 Actividad enzimática de la PPO .....	91
6.1.10 Concentración de proteína .....	93
6.1.11 Concentración de azúcares reductores solubles .....	95
6.2 Sistema modelo a partir de extracto crudo de papa .....	97
6.2.1 Actividad enzimática de la PPO .....	97
6.2.2 Concentración de proteína .....	99
6.2.3 Concentración de azúcares reductores solubles .....	101
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>105</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>107</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>121</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Morfología del tubérculo (Macrae y col., 1993).....	6
FIGURA 2. Morfología de una sección longitudinal del tubérculo (Macrae y col., 1993).....	7
FIGURA 3. Manejo postcosecha para papa (Kasmire y Cantwell, 1992).....	13
FIGURA 4. Algunos posibles vías responsables del control del catabolismo del almidón en los tejidos de las plantas (Haard, 1993).....	17
FIGURA 5. Fase inicial de la reacción de Maillard: formación de una glucosilamina... .....	23
FIGURA 6. Transposición de Amadori a partir de una glucosilamina.....	24
FIGURA 7. Vía de descomposición de los compuestos de Amadori para formar melanoidinas.....	25
FIGURA 8. Formación de melanina como resultado de la actividad de la PPO: las dos primeras etapas son catalizadas por PPO y las subsecuentes reacciones son no enzimáticas (Richardson y Hyslop, 1993).....	28
FIGURA 9. La glucólisis: fermentaciones alcohólica y homoláctica (Voet y Voet, 1993).....	47

---

FIGURA 10. Almacenamiento de papas enteras en una atmósfera rica en CO <sub>2</sub> al 30% balance aire.....	65
FIGURA 11. Diagrama de flujo para el almacenamiento de papas enteras .....	67
FIGURA 12. Almacenamiento del extracto crudo de papa en una atmósfera de CO <sub>2</sub> al 30% balance aire.....	73
FIGURA 13. Diagrama de flujo para el almacenamiento del sistema modelo del extracto crudo de papa .....	75
FIGURA 14. Comportamiento del pH con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en CO <sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.....	78
FIGURA 15. Comportamiento de la acidez titulable con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en CO <sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.....	80
FIGURA 16. Comportamiento de los sólidos solubles totales con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en CO <sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.....	81
FIGURA 17. Comportamiento de la pérdida de peso con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en CO <sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.....	83
FIGURA 18. Comportamiento del índice de oscurecimiento en pulpa con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en CO <sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.....	84

FIGURA 19. Comportamiento del índice de oscurecimiento en la cáscara con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en CO <sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.....	86
FIGURA 20. Comportamiento de la textura con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en CO <sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.....	88
FIGURA 21. Comportamiento de la acumulación de etanol con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en CO <sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.....	89
FIGURA 22. Comportamiento de la actividad de la PPO con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en CO <sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.....	91
FIGURA 23. Comportamiento de la concentración de proteína con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en CO <sub>2</sub> (30%) balance-aire a 7°C.....	93
FIGURA 24. Comportamiento de la concentración de azúcares reductores solubles con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en CO <sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.....	95
FIGURA 25. Comportamiento de la actividad enzimática de PPO con respecto al tiempo en el extracto crudo de papa a pH de 6.5 y 4.5 almacenado en aire (control) y en CO <sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.....	98

- FIGURA 26. Comportamiento de la concentración de proteína con respecto al tiempo en el extracto crudo de papa a pH de 6.5 y 4.5 almacenado en aire (control) y en CO<sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.....100
- FIGURA 27. Comportamiento de la concentración de azúcares reductores solubles con respecto al tiempo en el extracto crudo de papa a pH de 6.5 y 4.5 almacenado en aire (control) y en CO<sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.....102

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1. Superficie cosechada y producción de papa fresca en 1999 (SAGARPA, 1994 y 2000).....	5
TABLA 2. Composición química de la materia seca (22.5%) del tubérculo de papa (Macrae y col., 1993).....	9
TABLA 3. Efecto de la temperatura sobre el proceso de curado de las papas (Kasmire y Cantwell, 1992).....	14
TABLA 4. Fuentes de variación y variables de respuesta para las papas enteras almacenadas en el tratamiento en estudio.....	66
TABLA 5. Fuentes de variación y variables respuesta para el extracto crudo de papa almacenado en el tratamiento en estudio.....	74

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1. Determinación del pH, acidez titulable (AT), sólidos solubles totales (SST) y pérdida de peso (PP).....	121
ANEXO 2. Formulación de Buffer de fosfatos y de citratos.....	122
ANEXO 3. Determinación de concentración de proteína (Reacción de Biuret).....	124
ANEXO 4. Determinación de concentración de azúcares reductores solubles (Método de Nelson-Somoyi) .....	127
ANEXO 5. Medias de las variables respuesta en papas enteras almacenadas en el tratamiento en estudio.....	131
ANEXO 6. Análisis de varianza para las variables respuesta en papas enteras almacenadas en el tratamiento en estudio.....	132
ANEXO 7. Parámetros de color para el índice de oscurecimiento en papas enteras almacenadas en el tratamiento en estudio.....	133
ANEXO 8. Medias de las variables respuesta en el sistema modelo del extracto crudo de papa almacenado en el tratamiento en estudio.....	134
ANEXO 9. Análisis de varianza para las variables respuesta en el sistema modelo del extracto crudo almacenado en el tratamiento en estudio.....	135

# **1. INTRODUCCIÓN**

La papa es uno de los principales productos hortícolas que se cultivan y comercializan en México y los principales problemas que presenta el cultivo de la papa son el poco uso de semilla de calidad genética y sanitaria adecuada, la presencia excesiva de plagas y de enfermedades, causadas por bacterias, hongos y virus, las prácticas agronómicas deficientes en el proceso de producción, la falta de variedades para uso industrial y el manejo inadecuado tanto de la semilla como del tubérculo durante su manejo postcosecha (en fresco y procesada), almacenamiento y distribución (SAGARPA, 1994).

Cuando las condiciones de almacenamiento no son adecuadas para las papas, hay una excesiva brotación, desarrollo de raíces, pérdida de humedad, acumulación de azúcar y daño por frío, lo anterior afecta la calidad del producto y disminuye su valor comercial. Si los tubérculos son expuestos a la luz sintetizan glucoalcaloides tóxicos como  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina, las cuales se considera que son una parte de un mecanismo de resistencia a la enfermedad. Estas sustancias están más concentradas en la cáscara, en brotes y alrededor de los "ojos". Los tubérculos desarrollan amargor y pérdida del sabor cuando el contenido de alcaloide es de 25-80 mg/100g además a estas concentraciones causan intoxicación (Snowdon, 1991; Macrae y col., 1993).

Si la temperatura de almacenamiento es inferior a los 6°C, hay formación de azúcares reductores los cuales son indeseables para el procesamiento industrial y aun cuando los tubérculos se transfieran posteriormente a temperaturas mayores, el "dulzor" ya desarrollado no se elimina completamente. Los sistemas amilasa y fosforilasa son consideradas las responsables de la formación de azúcares (Bidwell, 1990; Haard, 1993).

Por otra parte, el oscurecimiento enzimático causado por la polifenoloxidasas (PPO) sobre la superficie de las frutas y hortalizas, ha sido de gran interés para la industria procesadora de alimentos a causa de la oxidación enzimática de fenoles a

ortoquinonas. Estas últimas rápidamente polimerizan para formar pigmentos oscuros o melaninas (Langdon, 1987). Este oscurecimiento enzimático en los productos hortofrutícolas reduce su aceptación por el consumidor. Por lo anterior, se ha convertido en un desafío en la investigación en alimentos encontrar soluciones para inhibir y prevenir el oscurecimiento en productos hortícolas. Se han estudiado varios compuestos químicos que inhiben la actividad de la polifenoloxidasas (PPO) pero debido a problemas relacionados con la pérdida de sabor, olor, toxicidad y viabilidad económica se dificulta su aplicación, como es el caso de los sulfitos.

También se han realizado estudios de inactivación de polifenoloxidasas por aplicación de dióxido de carbono a alta presión y temperaturas altas a camarón, langosta y papa, los resultados mostraron que el tratamiento del CO<sub>2</sub> causó cambios de conformación en la estructura secundaria ( $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -hoja plegada y espiral al azar). La PPO del camarón y de la langosta presentaron alteraciones más notables en la composición  $\alpha$ -hélice y espiral al azar. Mientras que solamente una alteración menor se presentó en la estructura secundaria de la PPO de la papa. Estos resultados indican que la efectividad del tratamiento depende del alimento, patrones proteicos, perfiles isoeléctricos y estructuras secundarias (Chen y col., 1992).

Con respecto a las atmósferas controladas (AC) y modificadas (AM) se han realizado estudios en los últimos años para aplicarlas en la conservación de la calidad de productos hortícolas. Estos sistemas sobre todo la AM ha logrado la conservación de algunos productos como manzanas por largos periodos de tiempo y en varias frutas y hortalizas ha aumentado su vida postcosecha (Kader, 1992a). Sin embargo, otros productos hortícolas a bajas concentraciones de O<sub>2</sub> y/o altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, presentan acumulación de etanol, lo que indica que se induce una respiración anaeróbica con el consecuente deterioro del producto (Kader, 1986; Zagory y Kader, 1989).

Las AC/AM son técnicas complementarias a la refrigeración y se han obtenido los mejores resultados a temperaturas de 0-15°C y humedades relativas por arriba de 85%, y concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> de 0-5% y 5-15% respectivamente (González-Aguilar y col., 1999). También se encontró que a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> (mayores del 15%) hay una reducción de la actividad de la polifenoloxidasas en lechuga, lo que sugirió que el CO<sub>2</sub> fue un inhibidor competitivo de la PPO (Siriphanich y Kader, 1985; Aquino-Bolaños, 2000). Otras enzimas que también reducen su actividad por altas concentraciones de CO<sub>2</sub> son la amilasa, la fosfatasa y la poligalacturonasa entre otras, dependiendo de la fruta u hortaliza que se trate. En el caso de la amilasa, la conversión de almidón a azúcar fue más lenta, lo que inhibió el desarrollo de sabores dulces (Zagory y Kader, 1989).

En el presente estudio se aplicó una atmósfera rica en CO<sub>2</sub> (30%) balance aire a papas cultivar Alpha por 120 horas a 7°C, con el propósito de reducir la actividad de la polifenoloxidasas y concentración de azúcares reductores, así como cuantificar la acumulación de etanol. Se evaluaron los parámetros de calidad como pH, acidez titulable (AT), sólidos solubles totales (SST), pérdida de peso, índice de oscurecimiento en pulpa y cáscara, textura, acumulación de etanol, actividad de la PPO, concentración de proteína y concentración de azúcares reductores solubles.

Asimismo, se aplicó esta atmósfera a un sistema modelo de extracto crudo de papa a pH de 4.5 y 6.5 por 120 horas a 7°C, con el objeto de determinar los cambios en la actividad de la polifenoloxidasas, concentración de proteína y de azúcares reductores solubles.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 2.1 Producción e importancia comercial

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es originaria de América del Sur (Perú, Ecuador y Bolivia), pero se ha distribuido alrededor del mundo y cuenta con el reconocimiento de ser un alimento nutritivo y barato. Actualmente está entre los principales diez cultivos alimenticios del mundo y se cultiva en 140 países, destacando los países europeos, la Federación Rusa, Canadá, Estados Unidos de América, Australia y los países andinos de Latinoamérica.

En México, la papa es un tubérculo importante por la superficie que anualmente se destina a su cultivo, por el consumo en fresco y volumen exigido por las industrias procesadoras-exportadoras de esta hortaliza. La producción de este tubérculo únicamente es superado por el maíz, frijol, trigo y arroz; entre las hortalizas solo los cultivos del jitomate y el chile verde ocupan una superficie mayor (SAGARPA, 1999). Los principales estados productores son Sinaloa, México, Michoacán, Chihuahua, Sonora, Nuevo León y Guanajuato, que en conjunto aportan el 74.2% de la producción nacional (Tabla 1). De esta producción alrededor del 73% se destina al consumo en fresco, el 14% se procesa (congelados, deshidratados, almidones, etc.) y el restante 13% se utiliza como semilla para siembra para los siguientes ciclos (SAGARPA, 1994; 2000).

Los principales cultivares que se explotan a nivel nacional son Alpha, López, Tollocan, Atlantic, Atzimba, Greta, Murca, Rosita, Puebla, White Rose y Criolla, entre otras. Los cultivares que se utilizan en la producción de semilla son principalmente Alpha y Atlantic, la primera aporta el 80% de la producción, 15% la segunda y 5% las variedades como Michoacán, Greta, Tollocán, entre otras. El consumo per cápita en México es alrededor de 14 kilogramos por año, inferior al de países desarrollados en donde la papa es básica en la alimentación (SAGARPA, 1994; 2000).

**Tabla 1.** Superficie cosechada y producción de papa fresca en 1999 (SAGARPA, 2000).

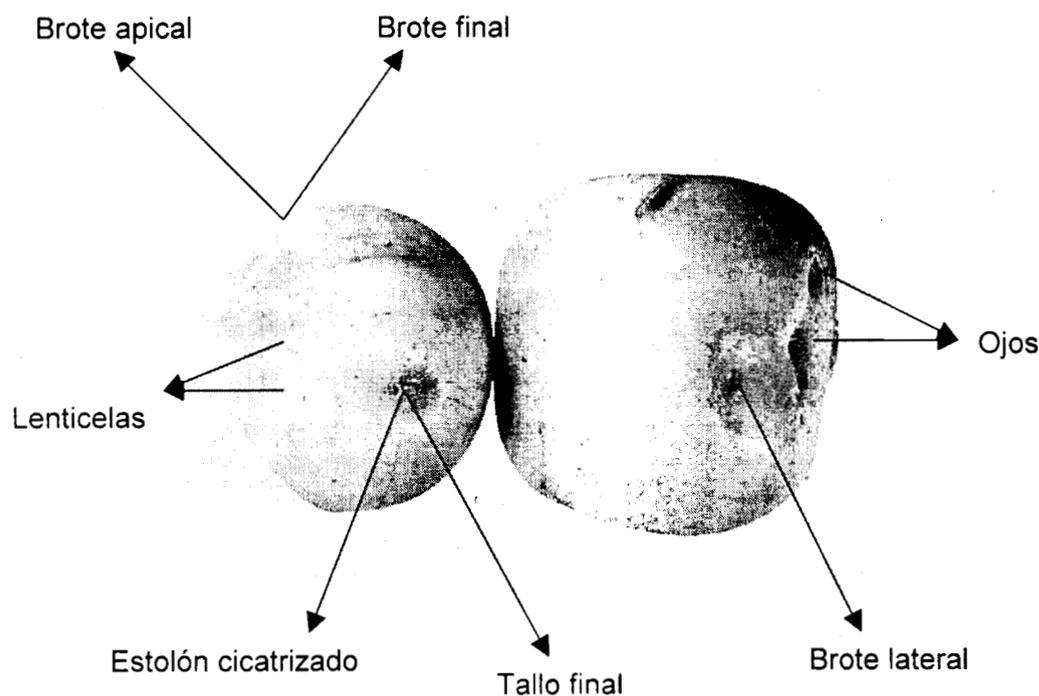
Estado	Superficie cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Participación (%)
Sinaloa	9 108	228 823	15.4
México	8 410	165 902	11.2
Michoacán	5 068	159 989	10.8
Chihuahua	6 905	155 044	10.5
Sonora	3 771	140 580	9.5
Nuevo León	2 732	126 679	8.6
Guanajuato	4 406	120 485	6.2
Otros	22 096	381 611	25.8
TOTAL	62 496	1 479 113	100.0

## 2.2 Características morfológicas y anatómicas

La papa es una planta herbácea anual y perenne por su reproducción, debido a la propagación vegetativa. Los tallos son de dos tipos: 1) aéreos, angulosos, de color verde, semierectos y/o rastreros, y 2) subterráneos, que están compuestos por rizomas (llamados también estolones) y tubérculos (parte comestible), este corresponde al engrosamiento entre el penúltimo nudo del rizoma y su yema terminal. Cada tubérculo tiene varios "ojos", grupos de yemas que corresponden a los nudos de un tallo. Debido a la dominancia apical, la yema u "ojo" terminal, tiende a inhibir a las otras, pero cuando se cortan para formar pedazos de semillas, cada yema crecerá y se desarrollará igualmente. Los tubérculos pueden tener forma

redonda, oval u oblonga; el tamaño, forma, color y profundidad del “ojo” del tubérculo determina su uso final (Gordon y Barden, 1992).

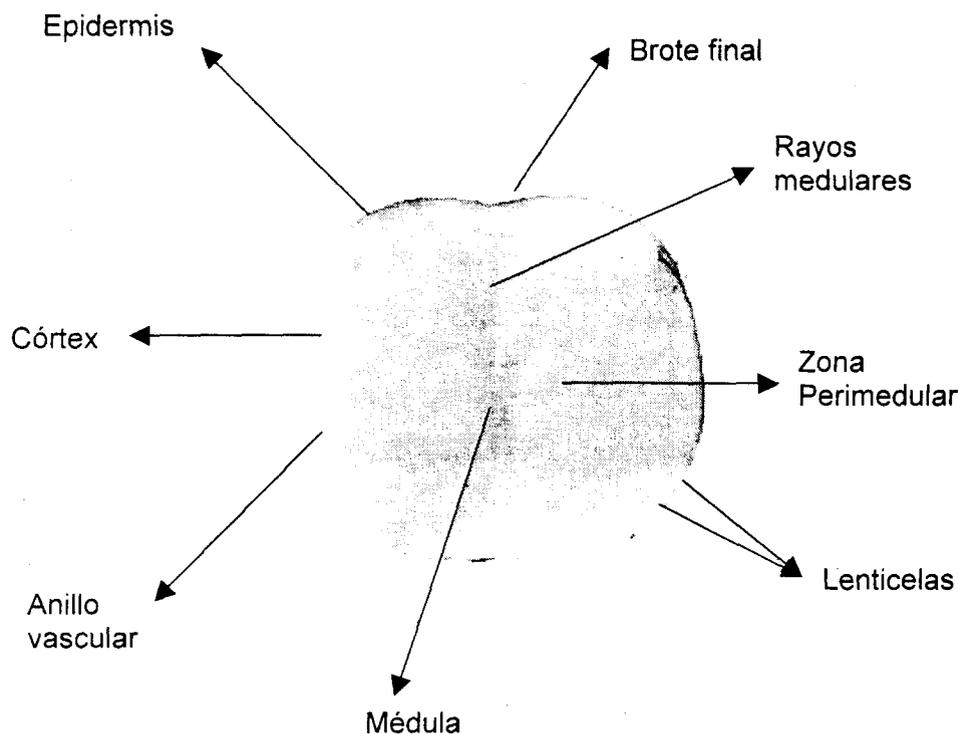
El tubérculo de la papa esta protegido por la cáscara o peridermo, consistente de seis a diez capas de células suberizadas. El color de la piel varia de amarillo pálido a púrpura oscuro dependiendo de la concentración de antocianinas en el peridermo y corteza periférica. El peridermo de un tubérculo joven puede ser removido y reemplazado por una nueva capa corchosa formada desde el interior, ésta es más impermeable que la piel normal. Un número de lenticelas se encuentran en el peridermo, estos poros facilitan el intercambio de gases (difusión gaseosa: entrada de O<sub>2</sub> y salida de CO<sub>2</sub>) y la entrada de patógenos (Figura 1)(Burton, 1979).



**Figura 1.** Morfología del tubérculo (Macrae y col., 1993).

Los tejidos corticales debajo del peridermo contienen parénquima con el material alimenticio que son los gránulos de almidón, también se encuentran taninos, proteínas y pigmentos.

La zona perimedular parenquimatosa se localiza entre el anillo vascular y el rayo medular. El xilema es visible como un anillo, mientras que el floema forma muchos haces en la corteza y zonas perimedulares. Los rayos perimedulares (haces vasculares) corren desde el tallo final a los "ojos". La médula que esta en el centro del tubérculo tiene menos almidón y es translúcida (Figura 2)(Macrae y col., 1993).



**Figura 2.** Morfología de una sección longitudinal del tubérculo (Macrae y col., 1993)

## 2.3 Composición química y valor nutritivo

La composición química de la papa varía con el cultivar, tipo de suelo, prácticas de cultivo, estado de madurez y condiciones de almacenamiento. Los datos en la Tabla 2 muestran que la papa puede ser una buena fuente de carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales.

### 2.3.1 Carbohidratos

El almidón es el principal carbohidrato de la papa (16 –20 % en peso fresco) constituyendo el 60-80% de la materia seca y esta compuesta de amilosa y amilopectina en una relación de 3:1. El almidón de la papa gelatiniza arriba de 70°C. El contenido total de azúcar está en un intervalo de 0.1 a 0.7% (p.f.), y está relacionado con la madurez, senescencia y brotación. Los principales azúcares de la papa son la glucosa, fructosa y sacarosa, y trazas de melobiosa, rafinosa, estaquiosa, glicerol, galactinol y glucilatos (Macrae y col., 1993).

Los tubérculos que contienen más del 2% (p.f.) de azúcares reductores dan un color oscuro a las hojuelas debido a las reacciones de Maillard, las cuales no son adecuadas para el procesamiento. Los polisacáridos que no son almidonosos tales como la celulosa, hemicelulosa y sustancias pécticas constituyen alrededor del 1-2% (p.f.), están presentes en las paredes celulares y lamina media; contribuyen a la textura final de la papa cocida y son una fuente de fibra dietética (Macrae y col., 1993).

### 2.3.2 Proteína

La papa es baja en proteína (2% p.f.) pero es rica en lisina comparada con las proteínas de los cereales (4.78 y 3.55 g/100 g de proteína respectivamente),

mientras que la concentración de aminoácidos azufrados es menor. La proteína está concentrada en la médula y córtex .

**Tabla 2.** Composición química de la materia seca (22.5%) del tubérculo de la papa (Macrae y col., 1993).

Contenido (%)		Contenido (%)	
Fibra cruda	2.1	Minerales	
Almidón	74.2	Calcio	0.02
Azúcar total	1.3	Magnesio	0.08
Azúcares reductores	0.6	Potasio	1.47
Grasa	1.0	Sodio	0.02
Nitrógeno total (N)	1.2	Hierro (ppm)	15.70
Proteína (N)	1.0		
Fracciones proteicas (% de N proteico total )		Vitaminas (mg/100 g)	
Albúmina	48.9	Tiamina	0.73
Globulina	25.9	Acido ascórbico	92.08
Prolamina	4.3	Acido nicotínico	10.08
Glutelina	8.3	Riboflavina	0.12

Los niveles de proteína como albúmina, globulina, prolamina y glutelina son de 48.9%, 25.9%, 4.3% y 8.3% de la proteína total, respectivamente. Dos tercios de la fracción de nitrógeno no proteico esta compuesto de aminoácidos libres (21) y han sido identificados. La brotación, almacenamiento, enfermedades y tratamientos de fertilización influyen en la concentración de los aminoácidos libres en el tubérculo (Burton, 1974; Salunkhe y Desai, 1984; Macrae y col., 1993).

### 2.3.3 Vitaminas y minerales

Los tubérculos contienen cantidades importantes de vitamina B y C (Tabla 2). La vitamina C está presente en formas reducida y oxidada. Los tubérculos recién cosechados pueden contener 20 mg de ácido ascórbico por 100 g; se presentan pérdidas de vitamina C por un almacenamiento prolongado y durante la cocción. La vitamina B (tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina y ácido fólico) y el ácido pantoténico están presentes en la papa. El contenido de cenizas es de alrededor de 1% (p.f.), el cual es equivalente al 4-6% del contenido de la materia seca. Los principales elementos son fósforo, potasio y calcio. El boro, cobre, zinc, yodo, aluminio, arsénico, níquel y molibdeno se encuentran en trazas (Macrae y col., 1993).

### 2.3.4 Lípidos y ácidos orgánicos

El tubérculo tiene aproximadamente el 0.1% de lípidos (p.f.) y se localizan en el peridermo; los principales ácidos grasos presentes son palmítico, linoleico y linolénico. También están presentes ácidos orgánicos en cantidades variables que contribuyen al sabor de la papa. Los principales ácidos orgánicos son cítrico, oxálico, fumárico y málico. Los ácidos clorogénico, nicotínico y fítico también han sido reportados. El ácido clorogénico reacciona con el ión hierro formando un complejo, el cual causa oscurecimiento después de la cocción. El oscurecimiento enzimático en tejido de papa cortada y homogeneizada es causada por la oxidación de la tirosina. Otros compuestos fenólicos encontrados en papa son las flavonas, antocianinas y taninos (Gray y Hughes, 1978; Macrae y col., 1993).

### 2.3.5 Enzimas y pigmentos

Los sistemas de enzimas presentes en papa incluyen amilasa, glioxalasa, fósforilasa, tirosinasa, catalasa, aldohidrasa, peroxidasa, polifenoloxidasa, dehidrogenasa, fosfatasa, sistoamilasa y zimohexasa. La amilasa y fosforilasa

forman azúcares a bajas temperaturas (Patil y Zucker, 1965; Davies y col., 1973; Zawistowski y col., 1991).

El color amarillo de la pulpa de papa es atribuible a los carotenoides como violaxantina, luteína, 5,6-epóxido luteína y neoxantina. La clorofila esta presente en tubérculos expuestos a la luz y estos tubérculos verdes pierden su valor comercial (Banks, 1985; Macrae y col., 1993).

### **2.3.6 Factores antinutricionales**

La síntesis de glicoalcaloides tóxicos como  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina, tiene lugar en tubérculos expuestos a la luz y dañados; un tubérculo normal contiene una cantidad insignificante (5-10 mg por 100 g) de estos alcaloides. Estos están localizados en la cáscara, brotes y alrededor de los "ojos". Los tubérculos desarrollan amargor y pérdida del sabor cuando el contenido del alcaloide es de 25-80 mg/100 g. El consumo de tubérculos con más de 20 mg de glucoalcaloides por 100 g pueden provocar la muerte (Snowdon, 1991; Macrae y col., 1993).

### **2.3.7 Valor nutritivo**

La papa es una de las fuentes más ricas de energía. Se ha calculado que 100 g de papa pueden suministrar de 5-7% de energía y de 10 a 12 % de proteína por día. La proteína de la papa tiene un valor biológico igual a la proteína de la soya y un tamaño promedio de papa proporciona 15 mg de vitamina C, que es alrededor del 20% de la ingesta recomendada (75 mg) por persona por día. El consumo de tubérculos con la piel incrementa la ingestión de fibra diaria. La grasa de la papa es baja para tener importancia nutricional, pero contribuye a la palatabilidad. El tubérculo también provee trazas de elementos necesarios para mantener una buena salud y aunque la papa no es una fuente primaria de hierro, 10 gramos de papa

cocida pueden abastecer 6% y 12% de los requisitos de hierro diario para niños y adultos, respectivamente (Macrae y col., 1993).

## **2.4 Manejo postcosecha y almacenamiento**

### **2.4.1 Cosecha**

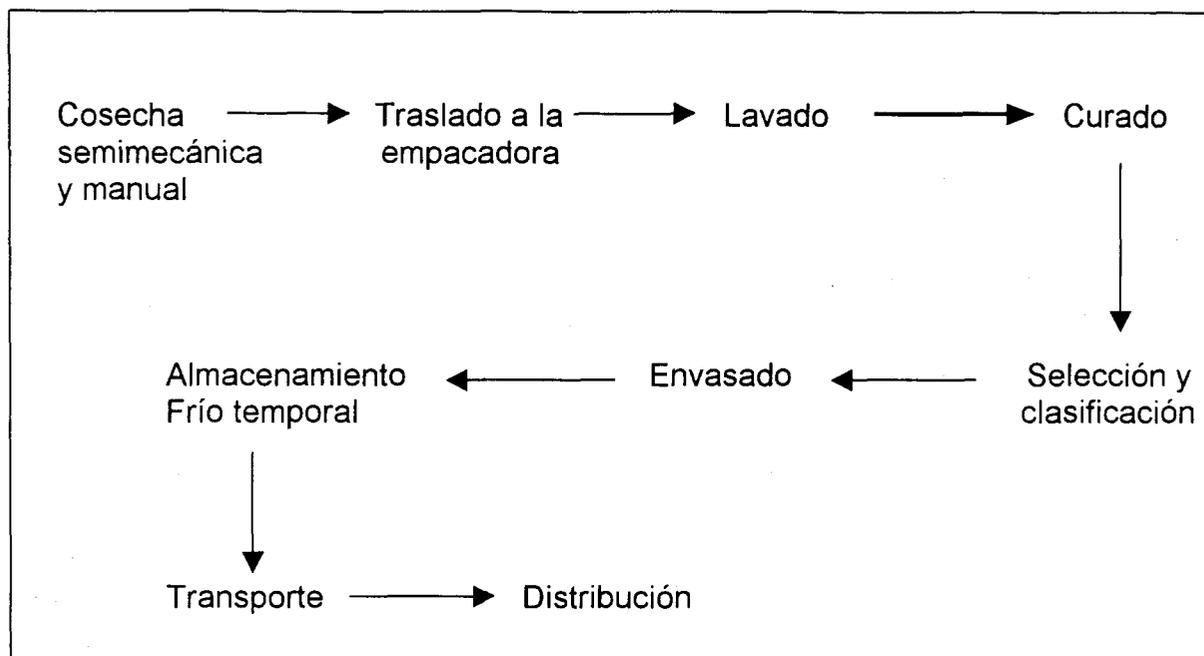
La cosecha de esta hortaliza se realiza en forma semimecánica y manual; los indicadores de cosecha son el tiempo y la apariencia del follaje; cuando este último empieza a presentar una coloración amarilla, es síntoma de madurez de los tubérculos. Cuando se inicia el amarillamiento o incluso antes se recomienda la aplicación de defoliantes y después de dejar transcurrir de una a dos semanas se recogen los tubérculos. El periodo desde siembra hasta cosecha dura de 110 a 120 días (León, 1987; Valadez, 1989).

### **2.4.2 Manejo postcosecha**

Las papas después de la cosecha pasan al lavado y etapa de curado, éste último consiste en someter los tubérculos a temperaturas de 15-20°C y una humedad relativa de 90°C por una semana como mínimo. Después se realiza la selección y clasificación por tamaño y calidad y finalmente el envasado. Este último se realiza en sacos de plástico perforados (arpillas) o en bolsas de plástico de color oscuro para evitar enverdecimiento por exposición al sol (Garza, 1992). Las papas ya empacadas se almacenan temporalmente antes de su transporte y distribución (Figura 3).

### **2.4.3 Curado**

El curado es una de las maneras más efectivas y simples para reducir la pérdida de agua y pudrición durante el almacenamiento postcosecha de la papa.



**Figura 3.** Manejo postcosecha para papa (Kasmire y Cantwell, 1992).

El curado se refiere al proceso de cicatrización de las heridas con el desarrollo y suberización (formación de suberina) de nuevo tejido epidérmico llamado peridermo, el cual forma una barrera protectora contra la pérdida de agua e invasión por microorganismos (Sommer y col., 1992). A temperaturas más elevadas el proceso de curado es más corto (Tabla 3). El tipo de herida también afecta la formación del peridermo; las abrasiones forman un peridermo profundo e irregular, las cortadas forman un peridermo delgado, y los compresiones e impactos pueden evitar la formación de peridermo (Kasmire y Cantwell, 1992).

**Tabla 3.** Efecto de la temperatura sobre el proceso de curado de las papas (Kasmire y Cantwell, 1992).

Temperatura °C	Tiempo de formación de suberina (días)	Tiempo de formación de peridermo (días)
25	1	2
15	2	3
10	3	6
5	5-8	10
2	7-8	no se forma

#### 2.4.4 Almacenamiento

Las condiciones adecuadas de almacenamiento impiden la brotación excesiva, desarrollo de raíces, pérdida de humedad, acumulación de azúcar y daño por temperatura. El almacenamiento a largo plazo con mínima pérdida de humedad es posible a 4-5°C, pero las temperaturas por abajo de 6°C inducen a la formación de azúcares reductores, los cuales no son deseables para el procesamiento industrial. Los tubérculos pueden ser reacondicionados al transferirlos a altas temperaturas, pero el "dulzor" ("dulzor senescente") desarrollado por el almacenamiento prolongado a baja temperatura, no se puede eliminar completamente. Las temperaturas recomendadas para los tubérculos según el propósito a que se destinen son las siguientes:

- Papa para semilla, 2 – 4°C
- Consumo en fresco, 4 –5°C
- Hojuelas, 7 –10°C

- Papas freídas a la francesa, 5 –8°C
- Granulación, 5 –7°C

El ataque fungal y de bacterias en la papas se evita cuando éstas se secan y almacenan en frío. Es posible también combatir enfermedades fungales por la adición de compuestos derivados del bencimidazol. También es conveniente una ventilación eficiente en cualquier almacenamiento para eliminar excesos de humedad, que puedan fomentar la podredumbre (Hardenburg y col., 1986; Sommer y col., 1992).

## **2.5 Factores que afectan la calidad del tubérculo**

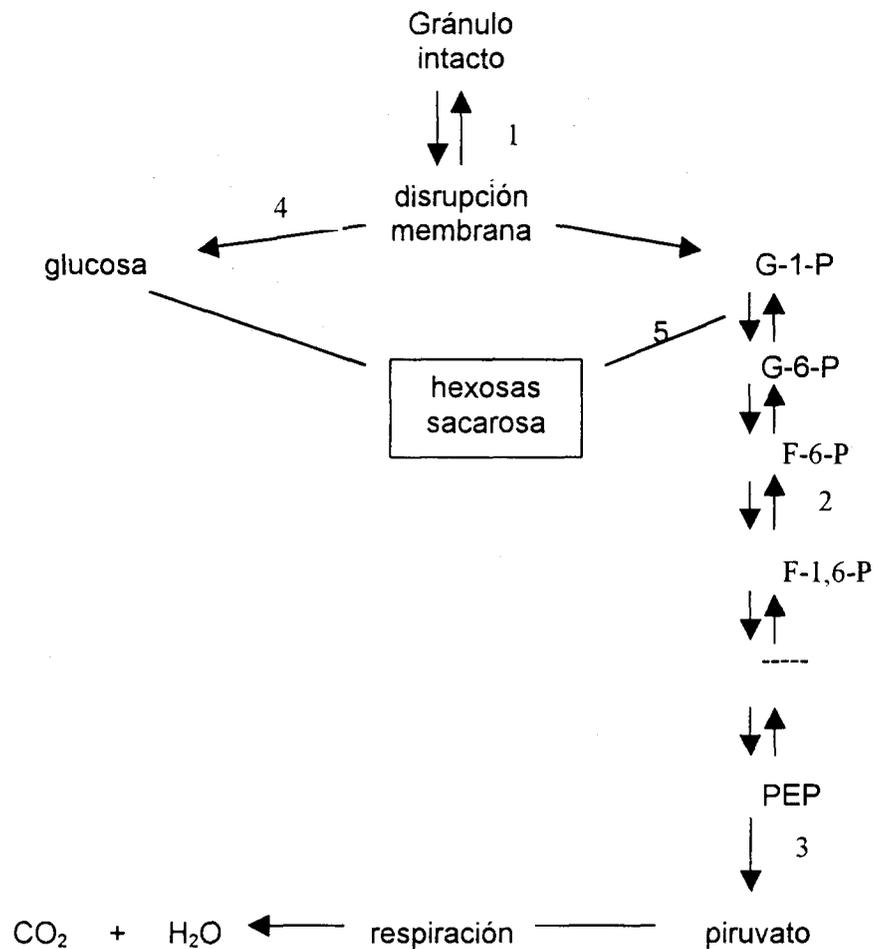
En países que tienen climas tropicales y subtropicales es práctica común almacenar las papas a bajas temperaturas para evitar la brotación, pérdida de peso y el ablandamiento de los tejidos del tubérculo y consecuentemente disminución de la calidad y rechazo del consumidor (Kader y col., 1989; Kader, 1992b). Cuando el manejo postcosecha y las condiciones de almacenamiento en refrigeración no son adecuadas, se presentan reacciones de oscurecimiento, las cuales pueden ser enzimáticas o no enzimáticas. Las reacciones de oscurecimiento enzimático se deben a daños mecánicos (abrasiones, raspaduras y cortadas) ocasionados en el manejo postcosecha y en la reducción de tamaño durante el procesamiento, siendo la polifenoloxidasas la enzima responsable. Mientras que las reacciones de oscurecimiento no enzimático se deben a una elevada conversión de azúcares reductores durante el almacenamiento a bajas temperaturas, ocasionando un sabor dulce al tubérculo y oscurecimiento del mismo durante su procesamiento (cocción) (Macrae y col., 1993; Haard; 1993).

### 2.5.1 Azúcares en las papas durante el almacenamiento

La presencia de azúcares en las papas es perjudicial, ya que los tubérculos con un contenido excesivo de azúcares deteriora la textura y poseen un sabor dulzón desagradable después de la cocción y se doran excesivamente durante la fritura. El almacenamiento de cultivares de papa a temperaturas de refrigeración inferiores a 5°C provocan la transformación de almidón en sacarosa y azúcares reductores. Se desconoce el motivo por el que la refrigeración estimula en papa el catabolismo del almidón y tampoco se ha aclarado qué enzimas intervienen en el mismo (Haard, 1993).

En la Figura 4 se resumen las vías que se supone controlan esta transformación metabólica. La acumulación de sacarosa desviaría rápidamente la hexosa-6-fosfato ya que de lo contrario frenaría las primeras reacciones de la glucólisis. Las amilasas, importantes en el catabolismo del almidón durante la germinación, no parecen estar muy activas en el tubérculo en estado de latencia. Algunos investigadores han comprobado que la actividad de la fosforilasa aumenta durante el almacenamiento en refrigeración (Haard, 1993), pero otros han comprobado que durante la misma no se producen cambios importantes ni en la cantidad ni en la proporción de enzimas presentes (Haard, 1993). Este es un punto que permanece en controversia ya que son diversos los mecanismos por los que las enzimas se activan *in situ* como consecuencia del estrés por frío. El tubérculo contiene un inhibidor de la invertasa, de naturaleza proteica que a temperaturas ligeramente superiores a las de congelación se activa (estrés por frío). Según un mecanismo de activación, la sacarosa o quizás el fosfato de sacarosa, limitaría la hidrólisis del almidón controlando la fosforilasa por retroalimentación, o activando la síntesis del almidón vía la ATP glucosa almidón glucosiltransferasa. Aunque la fosforilasa cataliza la síntesis de los enlaces  $\alpha$  1,4-glicosídicos *in vivo*, participa en los mecanismos de hidrólisis del almidón. Se ha sugerido que la causa principal de la acumulación de carbohidratos en papa almacenada a temperaturas próximas a las

de congelación es la sensibilidad a las bajas temperaturas de la fosfofructoquinasa y probablemente también de la piruvato-quinasa (Haard, 1993).



**Figura 4.** Algunas posibles vías responsables del control del catabolismo del almidón en los tejidos de las plantas: (1) ruptura de la membrana de los plástidos por temperaturas excesivamente bajas u otros factores. (2) Control por retroalimentación de la fosforilasa. (3) Control de la piruvatoquinasa por retroalimentación e ingreso del piruvato en el ciclo del ácido tricarboxílico. (4) Acción de la amilasa en la formación de dextrinas y glucosa. (5) Activación de las hexosa-fosfatasas e interconversión de las hexosas en sacarosa bajo la influencia del inhibidor de la invertasa (Haard, 1993).

La acumulación de carbohidratos durante el almacenamiento a bajas temperaturas en la papa constituye un problema real en el almacenamiento comercial. En la práctica este problema se soluciona "por reacondicionamiento". Este consiste en mantener las papas varios días a temperaturas elevadas para reducir el contenido en carbohidratos favoreciendo el catabolismo de éstos y su conversión a almidón. Otra manera, es eliminando el exceso de azúcar lavando las papas troceadas con agua (Macrae y col., 1993).

El mecanismo de la síntesis de almidón en los vegetales tras su recolección no se conoce todavía con detalle. La disminución del contenido de carbohidratos puede producirse también como consecuencia de las reacciones de oxidación que tienen lugar en las mitocondrias. Por otra parte, condiciones ácidas o un incremento de la temperatura puede provocar la hidrólisis de la sacarosa, liberando D-glucosa y D-fructosa, ambos azúcares reductores (Haard, 1993).

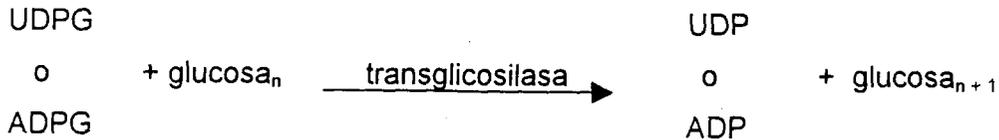
### 2.5.2 Almidón

El principal carbohidrato de los tejidos vegetales no asociado a la pared celular es el almidón, un polímero lineal ( $\alpha$ -1,4) o ramificado ( $\alpha$ -1,4: $\alpha$ -1,6) de la D-glucosa. El almidón se localiza en los plástidos intracelulares cuya forma, tamaño y propiedades ópticas dependen de la especie vegetal (Haard, 1993).

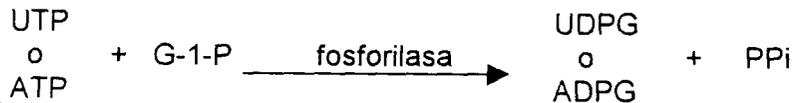
Alrededor del 70-75% de la materia seca del tubérculo de la papa consiste de almidón sintetizado a partir de la sacarosa localizada en el tubérculo durante el desarrollo y potencialmente sujeto a ser degradado nuevamente a sacarosa y azúcares reductores. La concentración de éstos es baja en el tubérculo maduro durante la época de cosecha; la relación de almidón a azúcar total es del orden de 30-50:1 (Haard, 1993).

### 2.5.3 Síntesis del almidón

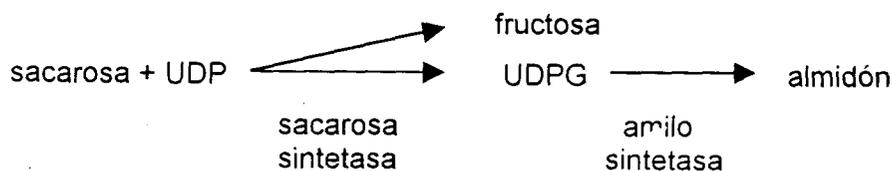
La síntesis del almidón se lleva a cabo por la transglucosilasa del uridín-difosfato de glucosa (UDPG) o el adeníndifosfato de glucosa (ADPG)



El ADPG parece ser uno de los donadores más efectivos. Esta reacción es estimulada alostéricamente por el producto primario de la fotosíntesis, el ácido fosfoglicérico (PGA), controlándose por retroacción que asegura la formación de almidón en presencia de luz. La síntesis de UDPG o ADPG se efectúa por la reacción:



La G-1-P puede derivarse de la F-6-P producida en la fotosíntesis o de la sacarosa, el medio más usual de transporte del carbohidrato. También la sacarosa puede transferir residuos glucosil al almidón más directamente, por medio de la sacarosa sintetasa en la forma siguiente:



UDP = uridín-difosfato

UDPG = uridín-difosfato de glucosa

Esta enzima sintetizadora de almidón (a veces llamada amilosintetasa) requiere un aceptor primario de por lo menos dos glucosas (residuales), es decir, maltosa o un oligosacárido de maltosa. Lo mismo se cree que pasa con la fosforilasa. Se sugiere que la fosforilasa podría participar en la iniciación de la síntesis de almidón. Otra enzima que transfiere grupos es la enzima-D de la papa, que puede transferir grupos de dos o más unidades de glucosa de una cadena con ligaduras  $\alpha$ -(1:4) a otra. Todas estas enzimas adicionan residuos de glucosa nuevos al extremo no reductor de la molécula aceptora (Bidwell, 1990; Kays, 1991; Haard, 1993). Sin embargo, el mecanismo de la síntesis de almidón *in vivo* no se conoce completamente.

#### 2.5.4 Degradación del almidón

El almidón es el mayor sustrato respiratorio y generalmente es degradado por reacción con la fosforilasa dando glucosa-1-fosfato (G-1-P), ésta puede ser convertida en G-6-P por la enzima fosfoglucomutasa y entrar a la secuencia glucolítica. Pero la amilofosforilasa puede atacar solamente dos enlaces  $\alpha$ -1:4-glucósido, y los enlaces  $\alpha$ -1:6 de la amilopectina deben ser rotos por la llamada enzima-R (amilo-1,6-glucosidasa) que rinde moléculas de glucosa libre. Otros sistemas para la degradación del almidón son la  $\alpha$ -amilasa y  $\beta$ -amilasa, ambas producen el disacárido maltosa; ésta es hidrolizada a glucosa por la enzima maltosa, de amplia distribución (Haard, 1993). En la papas la degradación del almidón es generalmente por reacción con la fosforilasa.

#### 2.5.5 Reacciones de oscurecimiento

En general, hay cuatro tipos de reacciones de oscurecimiento en los alimentos: la de Maillard, la caramelización, la oxidación del ácido ascórbico y el pardeamiento por la fenolasa o polifenoloxidasa.

Estas reacciones de oscurecimiento en los alimentos son reacciones oxidativas o no oxidativas. Las oxidativas o de oscurecimiento enzimático, son reacciones entre el oxígeno y un sustrato fenólico y están catalizadas por polifenoloxidasas (PPO). Este tipo de oscurecimiento lo presentan frutas y hortalizas como la manzana, plátanos, peras, papas, lechugas así como los champiñones, una vez cortados y no está relacionado con los carbohidratos (Langdon, 1987).

El oscurecimiento no oxidativo o no enzimático puede tener un efecto benéfico o no en los alimentos e incluyen los fenómenos de caramelización y/o la interacción de proteínas o aminas con carbohidratos, esta última reacción es conocida como reacción de Maillard.

### **2.5.5.1 Oscurecimiento no enzimático**

#### **a) Caramelización**

La caramelización es un conjunto de reacciones complejas que se generan por el calentamiento directo de los carbohidratos (temperaturas superiores del punto de fusión), particularmente de azúcares y jarabes. La reacción se favorece por pequeñas cantidades de ácidos y ciertas sales. La termólisis inicial provoca cambios anoméricos (interconversión de los anómeros alfa y beta del carbohidrato), alteraciones del anillo y ruptura de los enlaces glucosídicos nuevos. En general, la termólisis provoca deshidrataciones con formación de anillos anhidro, como en el levoglucosano, o la introducción de dobles enlaces en los anillos. Estos últimos constituyen formas intermedias en la formación de anillos insaturados como los furanos. Los dobles enlaces conjugados absorben luz y poseen por tanto color. A menudo, en los sistemas de anillos insaturados se producen condensaciones que dan lugar a sistemas poliméricos, los cuales poseen color y aroma (Whistler y Daniel, 1993).

Dentro del oscurecimiento no oxidativo o no enzimático destaca el uso de la sacarosa en la elaboración de colores y aromas de caramelo. En este proceso, el carbohidrato es calentado en solución con ácidos o sales ácidas de amonio y se obtiene una gran variedad de productos que se emplean en la industria alimentaria. En el caso del caramelo se obtiene por pirolisis directa de la sacarosa hasta obtener el color típico de azúcar quemado. Los pigmentos de caramelo contienen grupos hidroxílicos de acidez variable, carbonílicos, carboxílicos, enólicos y fenólicos (Whistler y Daniel, 1993).

### **b) Reacción de Maillard**

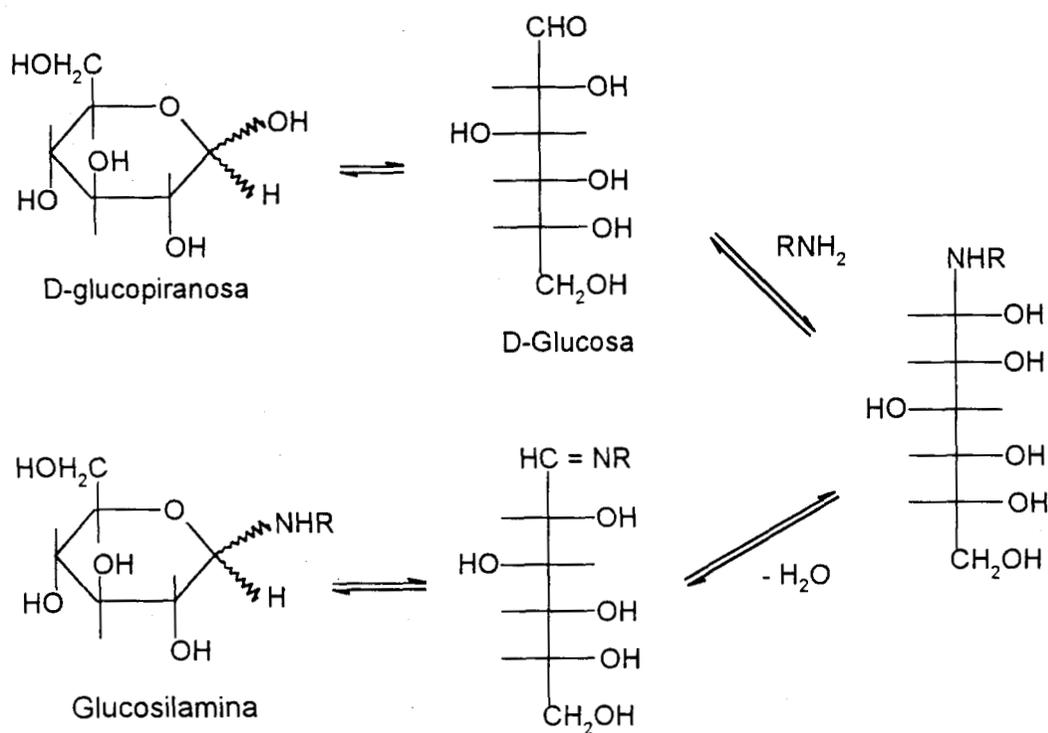
El otro oscurecimiento no oxidativo es la reacción de Maillard, la cual aún no está bien definida. Los sustratos que participan en esta reacción de oscurecimiento son un compuesto amínico, normalmente una proteína, un azúcar reductor y una cantidad mínima de agua (Eskin, 1990; Whistler y Daniel, 1993).

La detección de los productos de la reacción incluyen la formación de color amarillo a pardo por seguimiento colorimétrico a 420 o 490 nm, la separación cromatográfica, la medida de la evolución del dióxido de carbono y el análisis de los espectros en el ultravioleta (UV) y el infrarrojo (Whistler y Daniel, 1993).

La fase inicial de la reacción de Maillard se caracteriza por la formación de una solución que no absorbe ni en el visible ni en el UV pero posee elevado poder reductor. Conforme progresa la reacción la solución va adquiriendo un color amarillento y una creciente absorción en el UV cercano, simultáneamente hay una cierta deshidratación del azúcar a 5-hidroximetil-2-furaldehído (HMF), ruptura de cadenas, formación de compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos y una incipiente producción de pigmentos. En muchos casos se observa también la aparición de amino-azúcares al tiempo que aumenta el poder reductor. En las fases finales de la reacción de Maillard el producto obtenido posee un color de pardo-rojizo a pardo-oscuro, en el que el

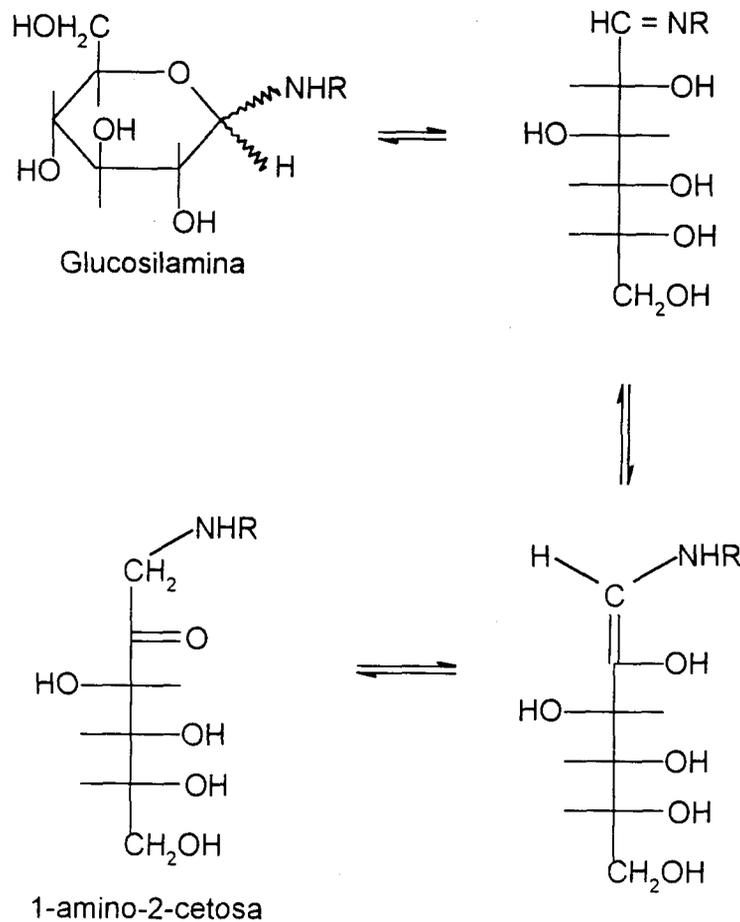
sulfito añadido no es capaz de eliminar este color. En este estadio el aroma tostado es muy evidente, se encuentran presentes melanoidinas coloidales e insolubles como resultado de condensaciones aldólicas y polimerizaciones complejas. Adicionalmente se producen variaciones en los niveles de dióxido de carbono (Whistler y Daniel, 1993).

Las reacciones implicadas en las fases iniciales de la reacción de Maillard se muestran en la Figura 5: el grupo carbonilo del azúcar reductor, en su forma abierta, sufre un ataque nucleofílico por los electrones del par libre del nitrógeno amínico. Después hay una pérdida de agua y ciclación para formar una glucosilamina.



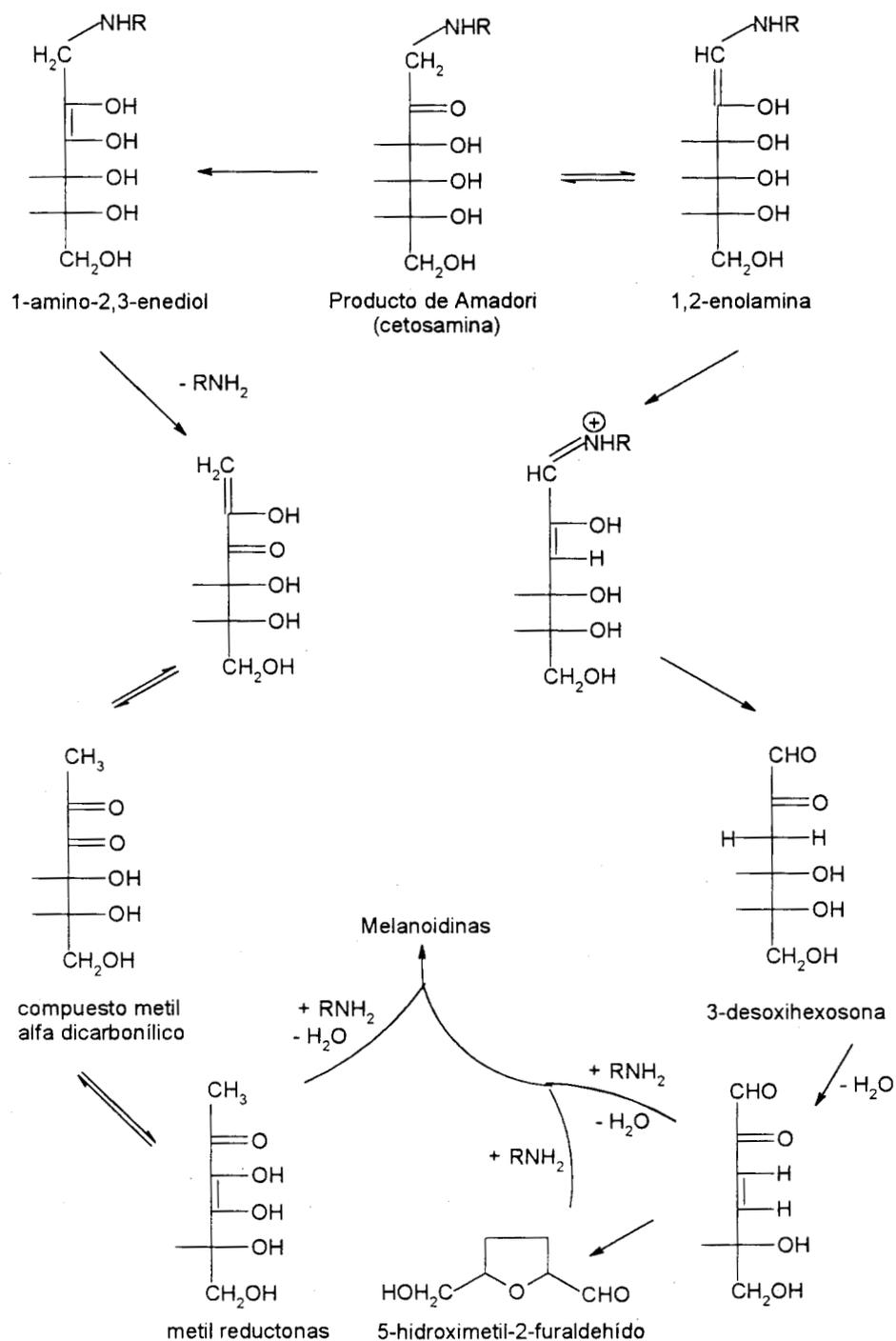
**Figura 5.** Fase inicial de la reacción de Maillard: formación de una glucosilamina.

En presencia de un exceso de azúcar reductor puede formarse también una diglucosilamina, la cual sufre una transposición de Amadori para producir un 1-amino-2-ceto-azúcar (Figura 6).



**Figura 6.** Transposición de Amadori a partir de una glucosilamina.

El compuesto de Amadori formado puede degradarse por dos vías, una a través de 3-desoxiosona intermediaria, y la otra por medio de metil- $\alpha$ -dicarbonílico (Figura 7). Ambas vías producen al final pigmentos melanoídicos.



**Figura 7.** Vías de descomposición de los compuestos de Amadori para formar melanoidinas (Whistler y Daniel, 1993).

Cuando un aminoácido o parte de una cadena proteica reacciona en este proceso y se produce una pérdida de esas moléculas desde el punto de vista nutricional. Lo anterior es importante en los aminoácidos esenciales, de los cuales la lisina, con su grupo  $\epsilon$ -amino libre, es el más susceptible de reaccionar (Whistler y Daniel, 1993).

Cualquier alimento que contenga proteínas y azúcares reductores, cuando se calienta, aún a temperaturas bajas y por cortos períodos de tiempo, sufrirá una pérdida de aminoácidos, sobre todo los básicos. Las variables que se deben tomar en cuenta en la reacción son la temperatura, pH, humedad, presencia o ausencia de cationes metálicos y la propia estructura del azúcar (Eskin, 1990). El efecto del pH sobre el oscurecimiento de Maillard es fundamental, el oscurecimiento es insignificante en soluciones fuertemente ácidas puesto que en esas condiciones el grupo amino se encuentra protonado y es inhibida, por tanto, la formación de glucosilamina. El cobre y el hierro favorecen el oscurecimiento, siendo el Fe (III) el más efectivo. La catálisis del oscurecimiento por iones metálicos sugiere que la última fase de la reacción de Maillard, en particular de pigmentos son reacciones de oxidación-reducción.

El grado de formación de pigmentos a partir de un azúcar determinado es directamente proporcional a la cantidad de forma abierta del azúcar (carbonilo libre) en la solución de equilibrio, es decir, la amina reacciona con la forma abierta (Whistler y Daniel, 1993). El compuesto químico más utilizado para la inhibición del oscurecimiento es el dióxido de azufre o los sulfitos (Langdon, 1987).

#### **2.5.5.2 Oscurecimiento enzimático**

El oscurecimiento enzimático es una reacción oxidativa catalizada por la polifenoloxidasas. En el tejido intacto de las frutas y hortalizas, los sustratos fenólicos se encuentran separados de la polifenoloxidasas, por lo que no se produce

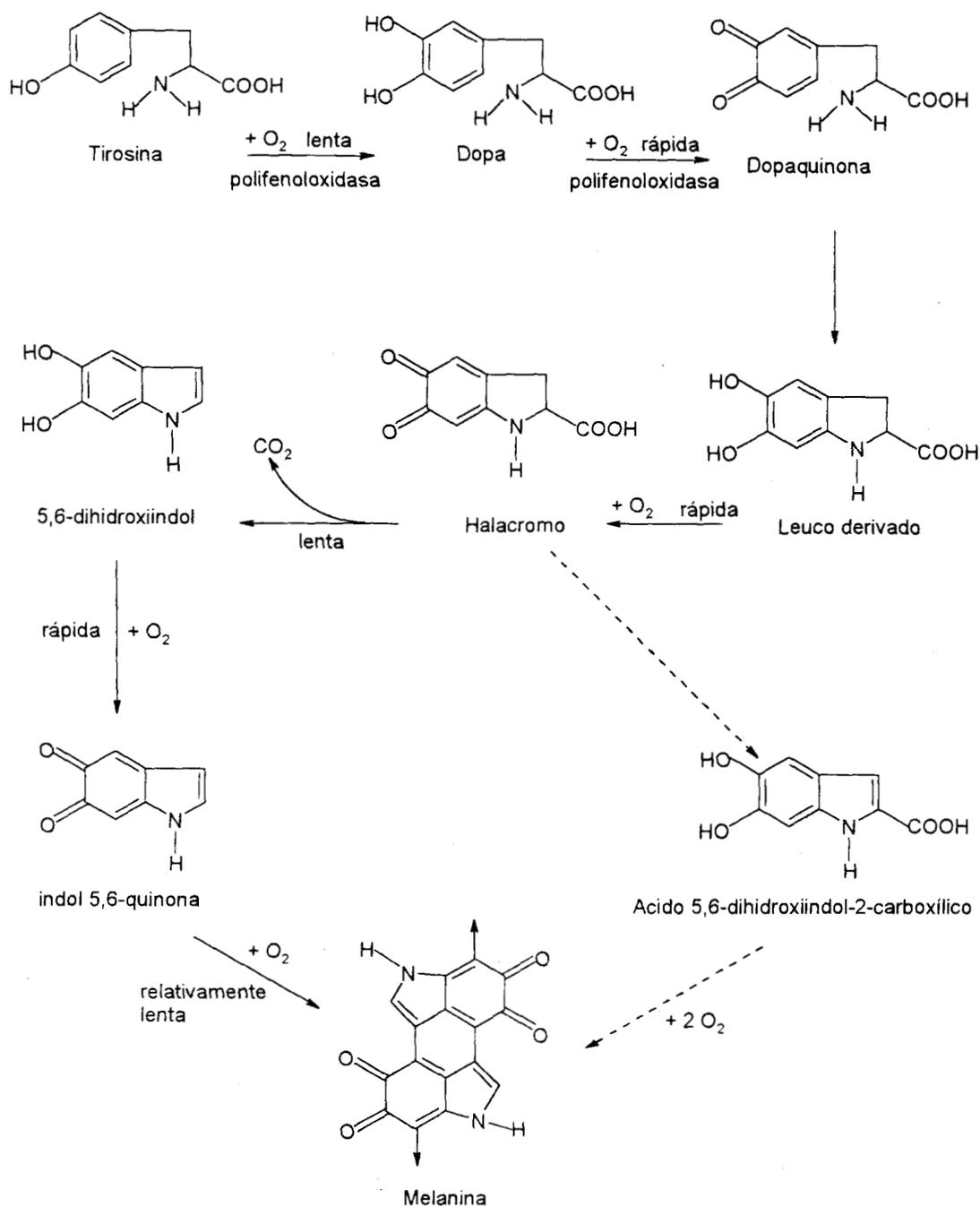
oscurecimiento. Se observa éste en tejidos dañados o cortados y expuestos al aire, debido a la oxidación enzimática de los fenoles a ortoquinonas, que a su vez se polimerizan rápidamente para formar melaninas y pigmentos de color pardo (Klein, 1992; Richardson y Hyslop, 1993).

#### **a) Participación de la polifenoloxidasas (PPO)**

La polifenoloxidasas (PPO) ha sido detectada en la mayoría de las frutas y hortalizas y su actividad generalmente es asociada con el oscurecimiento enzimático de estos productos, el cual tiene efectos económicos adversos. A causa de las implicaciones económicas de la reacción de la PPO, se han realizado amplias investigaciones sobre esta enzima.

La Unión Internacional de Bioquímica (IUB) clasifica a la PPO como EC 1.14.18.1 monofenol monooxigenasa y EC 1.10.3.1 catecol oxidasa. Los nombres comunes para monofenol monooxigenasa son tirosinasa, fenolasa, monofenol oxidasa, y cresolasa. Para la catecol oxidasa son difenol oxidasa, o-difenolasa, fenolasa y polifenoloxidasas (Hammer, 1993). La PPO está ampliamente distribuida en la naturaleza y difiere entre cultivares y especies. La localización de la enzima en los vegetales varía con la especie, edad y madurez del vegetal (Vámos-Vigyázó, 1981).

La PPO es una enzima que contiene un grupo prostético de cobre por subunidad. Esta enzima cataliza dos reacciones diferentes: (A) la hidroxilación de monofenoles a los correspondientes o-hidroxi fenoles (actividad fenol hidrolasa o cresolasa) y (B) la oxidación de o-dihidroxi fenoles a o-quinonas (actividad polifenoloxidasas o catecolasa). El oxígeno molecular es necesario para ambas reacciones (Figura 8). Las dos actividades están presentes en diferente grado en enzimas de varias fuentes (Klein, 1992; Richardson y Hyslop, 1993).



**Figura 8.** Formación de melanina como resultado de la actividad de la PPO. Las dos primeras etapas son catalizadas por PPO y las subsecuentes reacciones son no enzimáticas (Klein, 1992; Richardson y Hyslop, 1993).

La PPO ha sido purificada a partir de numerosas frutas y hortalizas. Las papas, hongos y manzanas son fuentes relativamente concentradas de la enzima con ambas actividades pero en mangos, plátanos y peras, solamente la segunda reacción parece ser catalizada. Los compuestos fenólicos que sirven como sustratos para la PPO están presentes en muchas frutas y hortalizas. Los más importantes son 3,4-dihidroxi fenilalanina (DOPA), tirosina, catequinas y ésteres del ácido cinámico. El ácido clorogénico, un éster del ácido cinámico, es uno de los sustratos más comunes. La tirosina y su producto hidroxilado (DOPA, dihidroxifenilalanina), sirven como sustratos. Sin embargo, DOPA es mucho mejor sustrato para el análisis in vitro (Jen y Kahler, 1974), aunque no necesariamente se presenta en el tejido del vegetal.

Con tirosina como sustrato, la PPO cataliza su hidroxilación a DOPA y, en una segunda etapa, la oxidación de la DOPA a DOPAquinona. Las restantes fases de la secuencia de la reacción incluyen oxidaciones no enzimáticas y, finalmente la polimerización de la indol-5,6-quinona a pigmentos melánicos de color pardo.

El oscurecimiento enzimático tiene lugar cuando las o-quinonas polimerizan, formando compuestos de alto peso molecular, o forman complejos con aminoácidos o proteínas (Figura 8). Cuando la tirosina es el principal sustrato, el pigmento resultante es melanina, el cual puede reaccionar con otros constituyentes del vegetal como se indicó antes. El intervalo de colores resultantes va del rosa a azul, tostado a café y púrpura a negro, pero la acción de la PPO es perjudicial al color. El oscurecimiento enzimático está relacionado con la actividad de la PPO y con la concentración de sustratos fenólicos en papas, plátanos, camotes, aguacates (Mondy y col., 1967; Weaver y Charley, 1974; Walter y Purcell, 1980 y Sharon-Raber y Kahn, 1983 respectivamente, citados por Klein, 1992) y durazno (Lee y col., 1990). En productos como el té negro, café y chocolate este proceso es benéfico.

## b) Acciones preventivas

Se han desarrollado diversos métodos para inhibir el oscurecimiento enzimático basados en la eliminación de uno o más de sus componentes esenciales, es decir, el oxígeno, la enzima, el cobre o el sustrato.

Para la inactivación de la PPO, suelen utilizarse tratamientos térmicos o la aplicación de dióxido de azufre o sulfitos. También puede ser inhibida su actividad por la adición de una cantidad suficiente de un acidulante como ácido cítrico, málico o fosfórico para llevar el pH a un valor de 3. Estos agentes son también quelantes del cobre. El oxígeno puede ser excluido del sistema por envasado a vacío o sumergiendo los tejidos vegetales en una salmuera o en un jarabe azucarado (Richardson y Hyslop, 1993).

El escaldado de frutas y hortalizas, a menudo resulta en deterioro de la textura, un ejemplo son las papas. Otra forma de inhibir el oscurecimiento es hacer reaccionar las o-quinonas con otros compuestos para formar productos incoloros. Los agentes reductores, como el ácido ascórbico, regeneran los o-dihidroxi fenoles pero estos mismos se oxidan, entonces su efecto es temporal. El sulfito y metabisulfito de potasio también sirven como inhibidores debido a la formación de productos incoloros. Aplicar el ácido ascórbico y el sulfito juntos es más benéfico que adicionarlos individualmente (Richardson y Hyslop, 1993).

Los sulfitos han sido utilizados por siglos en los alimentos para el control del oscurecimiento enzimático y no enzimático, como antimicrobianos, antioxidantes y agentes blanqueadores. Debido a que los sulfitos han sido ligados a 13 muertes y muchas enfermedades, principalmente de asmáticos, la Food and Drug Administration prohibió el uso de sulfitos como conservadores en frutas y hortalizas frescas (FDA, 1986). Por lo anterior, varios investigadores se han dado a la tarea de

buscar otras alternativas para la inhibición del oscurecimiento enzimático en estos productos hortícolas (Langdon, 1987).

## 2.6 La polifenoloxidasas en los vegetales

El papel de la polifenoloxidasas en plantas superiores es poco entendida. Es una enzima plastídica que es codificada en el núcleo pero no es activa hasta incorporarse en el plástido (pequeños órganos en el citoplasma que almacenan grasa y pigmentos solubles en grasa o almidón). Aparentemente, también existe libre en el citoplasma en tejidos senescentes o deformados. Las técnicas citoquímicas han demostrado que la polifenoloxidasas se encuentra en plástidos de raíces, amiloplastos de papa, plástidos de cultivos de tejido de zanahoria, cromoplastos y cloroplastos de diferentes especies. El sitio plastídico de la enzima puede ser necesario para proveer un fuerte ambiente reductor para prevenir la oxidación de o-difenoles a o-diquinonas (Vaughn y Duke, 1984). La polifenoloxidasas plastídica también puede ser necesaria para proporcionar un electrón donador para la actividad de la monofenol oxigenasa. Esta enzima forma o-quinonas en tejidos de vegetales dañados. Las ortoquinonas son conocidas por reaccionar con los grupos amino y sulfhídrido de las proteínas y aminoácidos. Esta interacción afecta la solubilidad, digestibilidad e infectabilidad de algunos virus patógenos (Hammer, 1993).

El análisis de la PPO es muy común realizarlo por la medición de la formación de quinonas y polímeros de quinona en un espectrofotómetro de 470 a 500 nm. Otro método es la disminución de O<sub>2</sub> por métodos polarográficos (Hammer, 1993).

La tirosinasa de papa fue la primera enzima en ser purificada por cromatografía de afinidad. También esta enzima fue la primera en ser reconocida por incorporar oxígeno molecular en una molécula orgánica (fenólica)(Mason y col., 1955).

225565

### 2.6.1 Localización

La distribución de la PPO en productos vegetales comestibles ha sido estudiada en los últimos años por diversos investigadores, también ha sido aislada de un gran número de frutas y hortalizas, entre ellas destacan las uvas (Ruiz-Hernández, 1983; Sapis y col., 1984; Valero y col., 1988, citado por Zawistowski y col., 1991); manzanas (Janovitz-Klapp y col., 1989; Sapers y col., 1989; Zemel y col., 1990) y papa (Batistuti y Lourenco, 1985, citado por Zawistowski y col., 1991; Sapers y col., 1989).

El nivel de la PPO en vegetales es dependiente de las especies, cultivar, madurez y edad (Vámos-Vigyázó, 1981). Se han encontrado diferencias en el contenido de PPO entre cultivares de manzana (Janovitz-Klapp y col., 1990b), aguacate (Sharon-Raber y Kahn, 1983) y papa (Sapers y col., 1989). El nivel de esta enzima en algunos cultivares de papa, como Atlantic, se ha reportado por ser cuatro veces más bajo que para Russet Burbank (Saper y col., 1989). Recientemente se ha prohibido la aplicación de sulfitos para inhibir el oscurecimiento enzimático, por lo que ahora los procesadores están interesados en variedades con más bajo contenido de PPO, y por tanto, sean menos susceptibles a este cambio de color (Zawistowski y col., 1991).

La actividad de la PPO es muy baja en vegetales inmaduros, a menudo indetectable. Esto es a causa de que la PPO existe como una enzima particulada estrechamente enlazada a una membrana. En las hojas del betabel, la PPO está en los cloroplastos y ligada en varios puntos a alguna estructura de la membrana a través de enlaces peptídicos de aminoácidos no aromáticos (Mayer, 1987). Se ha demostrado, que es necesario el rompimiento de esta estructura para liberar la PPO. En manzanas recién cosechadas, la PPO existe casi exclusivamente como dos fracciones particuladas en los cloroplastos y mitocondria (Harel y col., 1964, citado por Zawistowski y col., 1991 y Estabrook, 1967). La máxima actividad de las formas

particuladas de la PPO de manzana ocurre previo a que la fruta alcance su completa maduración y disminuye en las manzanas maduras con un constante incremento en la forma soluble de la PPO (Zawistowski y col., 1991).

Los niveles de formas solubles de la PPO se incrementan con el inicio de la senescencia de los vegetales, envejecimiento en champiñones y también en heridas. Los mecanismos bioquímicos asociados con este fenómeno aún no son aclarados, aunque varios investigadores sugieren que los cambios en la actividad total de la PPO durante el envejecimiento o después del daño puede ser correlacionado con nueva síntesis de proteína. Goodenough (1978) (citado por Zawistowski y col., 1991) demostró que el incremento de la actividad de la PPO durante el almacenamiento post-cosecha de champiñones puede ser prevenida por inhibidores de síntesis de proteínas. El incremento del nivel de la PPO después de cortar los tubérculos de alcachofa Jerusalem puede prevenirse por inhibición de la síntesis de RNA, necesaria para la producción de esta enzima. Evidencias contradictorias provistas por Meyer y Biehl (1980) (citado por Zawistowski y col., 1991) sugieren que el incremento de actividad de PPO en hojas de espinacas no es por la nueva síntesis sino por la liberación de la actividad de la enzima desde la forma latente del enlacetilacoide causado por la vejez y por tanto, pérdida de la integridad de la membrana.

Aunque la PPO no está restringida a alguna parte en particular del vegetal, el análisis de la alcachofa Jerusalem se encontró que las pieles externas contenían la principal actividad de la PPO mientras que la médula intermedia presentó solamente el 10% de la actividad total. En la piel de uvas, pepinos y algunos cultivares de manzana se ha encontrado la máxima actividad de la PPO (Zawistowski y col., 1991).

La PPO es una enzima intracelular que se localiza en cloroplastos, mitocondrias, microsomas, peroxisomas y plasma celular. Sin embargo, como se dijo anteriormente, con apoyo de las técnicas citoquímicas se ha demostrado que la

polifenoloxidasa se encuentra en plástidos de raíces, amiloplastos de papa, cromoplastos y cloroplastos de diferentes especies (Vámos-Vigyázó, 1981; Mayer, 1987).

### 2.6.2 Papel biológico

El papel de la PPO en vegetales es ambiguo, porque en los tejidos verdes sanos esta enzima existe en forma latente, lo cual obstaculiza el estudio *in vivo*. Sin embargo, varias hipótesis han sido establecidas con respecto a las funciones de la PPO. Los estudios iniciales sugirieron que la PPO era una oxidasa terminal en la respiración. Esta hipótesis fue sostenida por los hallazgos de que la PPO latente estaba enlazada a la membrana del tilacoide (estructura plana localizada en el cloroplasto) donde la fotosíntesis tiene lugar. Más tarde se postuló que la PPO tenía un papel en la fosforilación pseudocíclica o "reacción Mehler" un sistema no cíclico de transporte de electrón que involucraba oxígeno en lugar de NADP<sup>+</sup> como el aceptor terminal (Tolber, 1973, citado por Zawistowski y col., 1991).

Un incremento en la emisión fotosintética del oxígeno se presentó cuando la PPO fue inhibida por KCN. También Meyer y Biehl (1980)(citado por Zawistowski y col., 1991) señalaron un incremento en la emisión del oxígeno cuando la PPO latente fue activada durante la vejez de los cloroplastos de espinaca aislados. Estos estudios correlacionados a la pérdida de la reacción Mehler con activación de PPO. La activación de la PPO se presentó durante la infección o daño mecánico resultando en la formación de quinonas y consecuentemente polímeros insolubles. Los tejidos del vegetal "impregnados" con estos polímeros proveen una barrera para prevenir la dispersión de la infección en el vegetal. De esta manera, la enzima le proporciona resistencia al vegetal a infecciones por virus, bacterias, hongos así como al daño mecánico. Algunos de los intermediarios formados durante la polimerización de compuestos fenólicos puede también inactivar o ligar virus de vegetales y limitar su potencia en su infestación en vegetales. Pierpoint y col., (1977)(citado por

Zawistowski y col., 1991) encontraron que las melaninas y quinonas eran bacteriostáticas y adecuadas parcialmente para inactivar un virus en la papa. La producción de quinonas se ha reportado que es esencial para la resistencia de las manzanas a la infección por *Venturia inequalis* y que ayuda a prevenir la dispersión de la infección por *Botrytis cinerea* sobre el frijol (Zawistowski, 1991).

Robb (1984) reportó que la PPO participa en la biosíntesis de fenólicos vegetales, particularmente fenilpropanoides e indirectamente en la formación de lignina. Sin embargo, los resultados no son del todo concluyentes para fundamentar esta teoría (Zawistowski, 1991).

### 2.6.3 Aislamiento

El aislamiento de la PPO de los alimentos de origen vegetal esta asociado con muchos problemas, haciendo la separación extremadamente difícil. La PPO esta localizada exclusivamente en los plástidos de tejidos de vegetales sanos y aparentemente no está activada hasta cruzar la envoltura del plástido. En contraste, la mayoría de los compuestos fenólicos en las plantas superiores están localizadas en la vacuola distinto de los plástidos. Una vez que los contenidos del plástido y vacuola se mezclan, debido a la rotura celular, la organización interna se daña. Como consecuencia, los compuestos fenólicos endógenos son oxidados enzimáticamente a quinonas las cuales polimerizan a polifenoles, responsables del oscurecimiento enzimático. Los polifenoles son productos multidentados y se unen a través de moléculas de proteína incluyendo la PPO vía interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno para producir agregados y/o precipitados. Por otra parte, los fenoles transformados a quinonas, pueden reaccionar con grupos nucleofílicos (SH y NH<sub>2</sub>) sobre las proteínas para formar productos covalentes. También se ha reportado que los compuestos fenólicos pueden inactivar la PPO o reaccionar con proteínas y producir formas múltiples adicionales que no están presentes en el tejido intacto (Smith y Montgomery, 1985, citado por Zawistowski, 1991). Por tanto, es importante

cuidar la selección de los métodos de aislamiento y separación de PPO para minimizar o eliminar cualquier cambio en la estructura y actividad de la enzima durante su purificación.

Se han realizado muchos intentos para minimizar las interacciones proteína-compuesto fenólico incluyendo trituración y homogeneización en nitrógeno líquido o en nitrógeno atmosférico. El aislamiento por etapas se ha llevado a cabo de -20 a -30°C (Vámos-Vygyázó, 1981). También se ha utilizado pirrolidona de polivinil (PVP) para eliminar los fenoles durante la separación de las fracciones subcelulares y en las etapas iniciales de la purificación de la enzima del tejido vegetal. Sin embargo, esta técnica tiene desventajas, entre ellas requerir una gran cantidad de PVP, pH ácido durante el aislamiento (la máxima afinidad para los fenoles se presenta a pH 3.5) y un tiempo de pretratamiento previo al aislamiento. En resumen, la PVP puede también inhibir la actividad de la enzima PPO, con alguna intensidad (Anderson y Sowers, 1968; Smith y Montgomery, 1985, citado por Zawistowski, 1991). Se han utilizado exitosamente otros polímeros para la eliminación de fenoles, por ejemplo resinas de intercambio iónico, policaprolactama y polietilén glicol. El polietilén glicol (PEG) debido a su solubilidad en acetona, es a menudo utilizado en la preparación del polvo de acetona. La precipitación de la acetona seguida de la extracción con buffer, es uno de los métodos más utilizados en la etapa inicial de aislamiento de la PPO (DiziK y Knapp, 1970; Satjawatcharaphong y col., 1983; Oda y col., 1989, citado por Zawistowski, 1991). Este método ofrece ciertas ventajas en la obtención de una preparación enzimática cruda con una alta producción de actividad y libre de residuos. A fin de prevenir la inactivación durante la extracción con buffer, se han incluido en el método agentes reductores o acopladoras de quinonas tal como el ácido ascórbico (Janovitz-Klapp y col., 1989), cisteína (Batistuti y Lourenco, 1985, citado por Zawistowski, 1991), metabisulfito de sodio, dietil ditiocarbamato, tetratiolato de sodio o tiourea (Zawistowski, 1991).

Además de las dificultades discutidas, otros problemas que se deben superar durante la extracción de la PPO, se refiere a que la enzima soluble esta presente en cantidades relativamente pequeñas así que las pérdidas que se reportan son de menos del 1% de la proteína total (Robb, 1984).

La PPO se presenta en su forma activa en la mayoría de los alimentos (Vámos-Vigyázó, 1981) pero también existen formas latentes de esta enzima en plátanos, espinacas, aguacates y champiñones. La PPO puede ser liberada de su latencia por varios tratamientos incluyendo choques con ácidos y bases, detergentes aniónicos, enzimas proteolíticas, urea, ácidos grasos, glucoproteínas fungales, lipopolisacaridos bacteriales y  $\beta$ -1,3-glucanos (Zawistowski, 1991).

La naturaleza de la PPO latente aún no ha sido aclarada, pero se ha sugerido que la activación se puede lograr al eliminar un inhibidor de la enzima en el complejo PPO-inhibidor. La latencia de la PPO del cloroplasto de la espinaca fue atribuida, en parte a la formación de un complejo inactivo entre la proteína activa (PPO) y un polipéptido de bajo peso molecular. La disociación de este complejo inactivo por varios detergentes (como dioxicolato de sodio, dodecil sulfato de sodio (SDS) y digitonina) activó a la enzima. Otros investigadores (Robb y col., 1984), estudiaron la latencia de la PPO de las habas y reportaron que los tratamientos desnaturalizantes suaves como las exposiciones a ácidos y bases o exposiciones a soluciones de detergentes diluidos (Manoxal OT) activaron la enzima con cambios en su comportamiento fisicoquímico (por ejemplo, aumentó la movilidad electroforética y la afinidad por agentes quelantes (cobre). Estos estudios demostraron que la activación de la PPO latente involucró rearrreglo de la estructura terciaria de la proteína haciendo al sitio activo más accesible a los sustratos, más que la disociación del complejo enzima-inhibidor. Los estudios de Moore y Furkey (1990)(citado por Zawistowski, 1991) argumentaron contra la teoría de Kenten (1958) e indicaron solo unos cambios conformacionales limitados en la proteína de la activación de la PPO latente de las habas con SDS. Un mecanismo similar fue propuesto antes por

iónico, Tritón X-114 (Zawistowski y col., 1991). El método tiene la ventaja adicional de eliminar los compuestos fenólicos paralelamente con la clorofila.

#### 2.6.4 Purificación

Numerosas publicaciones han abordado la purificación de la PPO; sin embargo, por razones discutidas en párrafos anteriores, solo pocas PPO han sido purificadas con aparente homogeneidad. Estas incluyen PPO de trigo, uvas, papas, hojas de té, espinacas, peras, durazno, alcachofa (Zawistowski, 1991) y camote (Lourenco y col., 1992).

Los procedimientos publicados sobre la purificación de la PPO han variado de acuerdo a la fuente de la enzima y grado de pureza alcanzado (Vámos-Vigyázó, 1981). La primera etapa más común de la purificación es la eliminación de la proteína inactiva por precipitación con sulfato de protamina, sulfato de calcio (Patil y Zucker, 1965) o fraccionamiento con sulfato de amonio (la más comúnmente utilizada), seguida de una diálisis o cromatografía sobre Sephadex G-25 (Vámos-Vigyázó, 1981). La purificación frecuentemente incluye adsorción, intercambio iónico y cromatografía de filtración por gel o una combinación de algunos de estos métodos. La cromatografía hidrofóbica (Mayer, 1987) y el enfoque isoeléctrico también se han utilizado.

La cromatografía de adsorción con celita es selectiva para la PPO, ya que este adsorbente es relativamente específico para proteínas que contienen cobre. La adsorción sobre fosfato de calcio se ha aplicado a la PPO de manzana y trigo, mientras que la cromatografía con hidroxapatita, la elusión con carboximetil celulosa (CM) o columnas de dietilaminoetil celulosa (DEAE) se emplearon para la purificación de PPO en espinaca, pera y durazno (Oda y col., 1989; Flurkey y Jen, 1980 y Rivas y Whitaker, 1973, respectivamente, citado por Zawistowski y col., 1991).

El DEAE-celulosa es un intercambiador iónico común en la purificación de varias PPO, aunque otras matrices de gel en combinación con DEAE celulosa, Sephadex, Sepharosa, Toyopearl (cuentas de polivinil), también se han empleado. La cromatografía de intercambio iónico se ha convertido en el método más empleado, especialmente en combinación con columnas de cromatografía de filtración por gel o Sephadex o sobre Sepharosa, Sephacril S-200 y Ultrigel AcA 34 (Kahn, 1985; Zawistowski y col., 1991).

La baja capacidad de los absorbentes y la oxidación de ligandos (sustratos fenólicos) durante la operación de la columna excluye su uso (Robb, 1984). Por ejemplo, cuando se trató de purificar la PPO de la alcachofa por cromatografía de afinidad utilizando una columna L-DOPA-Sepharosa 4B-CL no se tuvo éxito debido al rápido oscurecimiento del gel causado por autooxidación de DOPA (Zawistowski y col., 1991).

La purificación de la PPO por cromatografía hidrofóbica sobre Sepharosa CL-4B fue reportado como un método adecuado (Mayer, 1987) porque el sitio activo de la PPO que tiene un carácter hidrofóbico que enlaza bien el medio hidrofóbico tal como fenil Sepharosa, en una fuerza altamente iónica (Robb, 1984). Es difícil evaluar la eficiencia de este método por las pocas aplicaciones de sistemas PPO publicadas (Janovitz-Klapp y col., 1989).

### **2.6.5 Métodos de determinación de actividad**

La determinación exacta de la actividad de la PPO sigue siendo un reto a pesar de los numerosos métodos descritos en la literatura (Vámos-Vigyázó, 1981; Robb, 1984). Esto es a causa de que las quinonas formadas durante el curso de la reacción enzimática experimentan reacciones secundarias con ellas mismas, con sustratos que no han reaccionado, oxígeno, otros constituyentes y con la enzima.

Estas reacciones conducen a la formación de moléculas poliméricas complejas interfiriendo con la exactitud del análisis.

La existencia de otras enzimas con propiedades moleculares similares, tal como lacasa y peroxidasa en tejidos vegetales, pueden interferir en la actividad de la PPO durante su determinación. Las enzimas muestran sustratos específicos traslapados ya que están disponibles para convertir los fenoles a quinonas (Mayer y Harel, 1979; Robb, 1984). Es por tanto, muy importante diferenciar entre PPO y otras enzimas para evitar confusión. Sin embargo, hay diversos métodos para distinguir entre estas enzimas (Mayer y Harel, 1979; Mayer, 1987).

#### **2.6.6 Heterogeneidad y estructura molecular**

No obstante las dificultades inherentes asociadas con el aislamiento y purificación de la PPO debido a la presencia de fenólicos endógenos y proteasas, se han realizado intentos para caracterizar la enzima de varias fuentes. Los trabajos realizados a la fecha se relacionan con propiedades moleculares, sustratos específicos e inhibidores (Vámos-Vigyázó, 1981; Robb, 1984; Mayer, 1987). Pocos estudios existen sobre la purificación de la PPO con aparente homogeneidad. Los trabajos sobre heterogeneidad de la enzima, composición de aminoácidos y contenido de cobre deben ser tratados con precaución ya que reflejan diferentes condiciones de aislamiento y varían en el grado de pureza.

225565

La electroforesis por gel, el enfoque isoeléctrico, el análisis inmunológico y la filtración por gel de preparaciones de PPO indican que la enzima existe en múltiples formas. La multiplicidad enzimática es atribuida a fenómenos de asociación-disociación de similar y/o diferentes subunidades, polimerización con compuestos fenólicos, acción proteolítica durante la separación/purificación de la enzima e interacción entre proteínas no enzimáticas y enzima (Vámos-Vigyázó, 1981; Robb, 1984; Flurkey e Ingebrigtsen, 1989; Kupper y col., 1989). Estas formas pueden ser

interconvertibles (dependiendo de la fuerza iónica, pH, concentración enzimática y presencia de agentes de disociación, etc.) y difieren en la especificidad de su sustrato, pH óptimo, estabilidad térmica y respuesta a reactivos químicos e inhibidores.

### 2.6.7 Pesos moleculares

Los pesos moleculares de formas múltiples de PPO, determinados por electroforesis-SDS o filtración por gel, alcanza un intervalo entre 12 y 400 kDa (Robb, 1984; Vámos-Vigyázó, 1981); la aparente multiplicidad de la enzima a menudo refleja fenómenos de asociación-disociación, proteólisis, además pueden ser el resultado de las técnicas empleadas y condiciones del solvente empleado para la determinación de los pesos moleculares. Por otra parte, se encontró que los patrones de las formas múltiples varían en las mismas especies o aún en cultivares dependiendo de la época de cosecha, de condiciones de almacenamiento, etc. Mayer y Harel (1979), observaron tres formas de catecol oxidasa en manzana (30-40, 60-70 y 120-130 kDa), mientras que Janovitz-Klapp y col. (1989) encontraron un componente simple de la PPO (peso molecular 46 kDa) para otro cultivar de manzana. Varios pesos moleculares se han encontrado para la PPO del aguacate: 14, 28, 56, 112 y 400 kDa (Dizik y Knapp, 1970), para tubérculos de papa: una subunidad de 36 kDa (Balasingam y Ferdinand, 1970, citado por Zawistowski y col., 1991) analizado por cromatografía de filtración por gel; para las uvas se reporta 80 kDa por sedimentación (Kidron y col., 1977) utilizando filtración por gel; espinacas 43 kDa (Lieberei y col., 1981) por electroforesis SDS-PAGE. Por los resultados publicados, se considera que el peso molecular de la subunidad básica de la PPO de los vegetales y otras fuentes está en un rango de 30-45 kDa. (Zawistowski y col., 1991).

La degradación proteolítica de la enzima lleva a pesos moleculares más pequeños, los cuales retienen la actividad (Flurkey e Ingebrigtsen, 1989).

### 2.6.8 Especificidad del sustrato

La afinidad de la PPO a un sustrato puede variar entre las formas múltiples de una preparación particular. Matheis y Belitz (1977) observaron que solo las formas de alto peso molecular de la PPO de papa son capaces de oxidar monofenoles (Zawistowski y col., 1991).

Los sustratos fenólicos naturales más importantes de la PPO encontrados en frutas y hortalizas son catequinas, ésteres de ácido cinámico (por ejemplo, ácido clorogénico), 3,4-dihidroxi fenilalanina (DOPA) y tirosina. El tipo y posición de los sustituyentes presentes sobre fenoles mono y o-dihidroxi fenoles son también determinantes importantes de la reactividad del sustrato. Los monofenoles son hidroxilados solamente si ellos tienen un grupo  $-CH_3$  en la posición *para* (Zawistowski y col., 1991).

Estudios cinéticos de Janovitz-Klapp y col. (1990b), sobre PPO en manzana purificada, y donde se utilizó 4-metilcatecol y ácido benzoico como sustrato e inhibidor respectivamente, sugirieron que la PPO se combina primero con el oxígeno y después se une con el sustrato fenólico. Por otra parte, estudios de Robb (1975) y, Lerner y Mayer (1976) señalan que el oxígeno no se enlaza primero. La razón para tal discrepancia puede ser debido a una serie de factores que reducen la exactitud de obtener datos cinéticos "verdaderos". Estas son: inactivación de la PPO durante su catálisis (Golan-Goldhirsh y Whitaker, 1984); consumo de oxígeno por procesos no enzimáticos que involucran productos secundarios durante la reacción; la presencia de actividades de mono y difenolasa (por ejemplo, el o-difenol tiene que ser considerado como un sustrato y un producto) y las complicaciones asociadas con mediciones espectrofotométricas de la actividad de la PPO (Janovitz-Klapp y col. 1990b). Estos mismos investigadores, también realizaron estudios cinéticos con sistemas que contenían dos compuestos fenólicos y derivaron una ecuación para predecir el consumo de oxígeno desde las concentraciones relativas y parámetros

cinéticos de cada sustrato fenólico individual. Esta aproximación es importante en el estudio del oscurecimiento enzimático de fenólicos en mezclas como realmente se encuentran en frutas y hortalizas (Zawistowski y col., 1991).

### 2.6.9 Inhibidores de la PPO

Los inhibidores de la PPO y por tanto el control del oscurecimiento enzimático es objeto de constante interés y un reto para los procesadores de alimentos. El oscurecimiento enzimático afecta la apariencia, calidad sensorial y nutricional y, ocasionalmente, la seguridad del producto (Friedman y Molnar-Perl, 1990; Janovitz-Lourenco y col., 1990; Klapp y col. 1990a). Diversos compuestos inhiben la PPO, aunque su eficiencia en el control de las reacciones de oscurecimiento depende de la naturaleza y concentración del inhibidor, fuente de la PPO, sustrato disponible ( $O_2$ , compuestos fenólicos), pH y temperatura (Vámos-Vigyázó, 1981; Kahn y Andrawis, 1985). La forma de acción de los inhibidores varía; por ejemplo, hay inhibidores que actúan simultáneamente sobre la enzima, sustrato y algunos productos. Sin embargo, además del aspecto económico, el uso de inhibidores del oscurecimiento en alimentos procesados está restringido debido a problemas de toxicidad, efectos sobre el sabor, textura y sanidad del producto alimenticio (Moon y Kim, 1985; Zawistowski y col., 1991).

El ácido benzoico y algunos ácidos cinámicos sustituidos son comúnmente utilizados como inhibidores competitivos de PPOs de cerezas, manzanas, peras, chabacanos y papas (Vámos-Vigyázó, 1981). Por otra parte, los sulfitos (sulfito de sodio, bisulfito de sodio y metabisulfito de sodio y potasio) a pesar de ser los inhibidores más efectivos de la PPO, están en estudio a causa de problemas de salud pública, ya que personas asmáticas presentaron alergia a estos agentes. Estos sulfitos inactivan la PPO de la papa pero dependen del pH y tiempo de exposición (Muneta y Wang, 1977; Fan y Book, 1987, citados por Zawistowski y col., 1991).

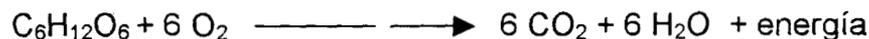
### 2.6.10 pH óptimo y estabilidad térmica

El pH óptimo de la PPO de muchos vegetales como manzana, pera, durazno, uva, plátano, aguacate, papa y champiñones, es entre 5.0 y 7.0 con excepción de la PPO de cereza dulce cuyo pH óptimo es entre 4.0 y 4.5 (Vámos-Vigyázó, 1981). El kiwi con pH óptimo de 6.8 a 7.3, berenjena pH 4.0 (Park y Luh, 1985; Fujita y Tono, 1988, citados por Zawistowski y col., 1991) entre otros. Por otra parte, se reporta que la PPO se inactiva a pH por abajo de 4, por lo tanto, se puede manejar este parámetro como un control del oscurecimiento (McCord y Kilara, 1983; Zemel y col., 1990). Los perfiles de pH-actividad varían con el cultivar y etapa de madurez, pureza de la enzima, naturaleza del sustrato fenólico y forma de la isoenzima.

En general, la PPO es considerada una enzima de baja estabilidad térmica. Los tratamientos térmicos a 70-90°C son suficientes para reducir o inactivar completamente la PPO en productos de origen vegetal. En contraste, la enzima es relativamente estable a temperaturas de almacenamiento abajo de cero grados (Vámos-Vigyázó, 1981).

## 2.7 Respiración

El proceso primario de la respiración es la movilización de compuestos orgánicos y su oxidación controlada para liberar energía para el mantenimiento y desarrollo de la planta, considerándose primero las reacciones del carbono resumidas en la ecuación:



que representa la oxidación de una molécula de hexosa. Las reacciones del carbono en la respiración involucran dos procesos distintos. El primero, la glucólisis o

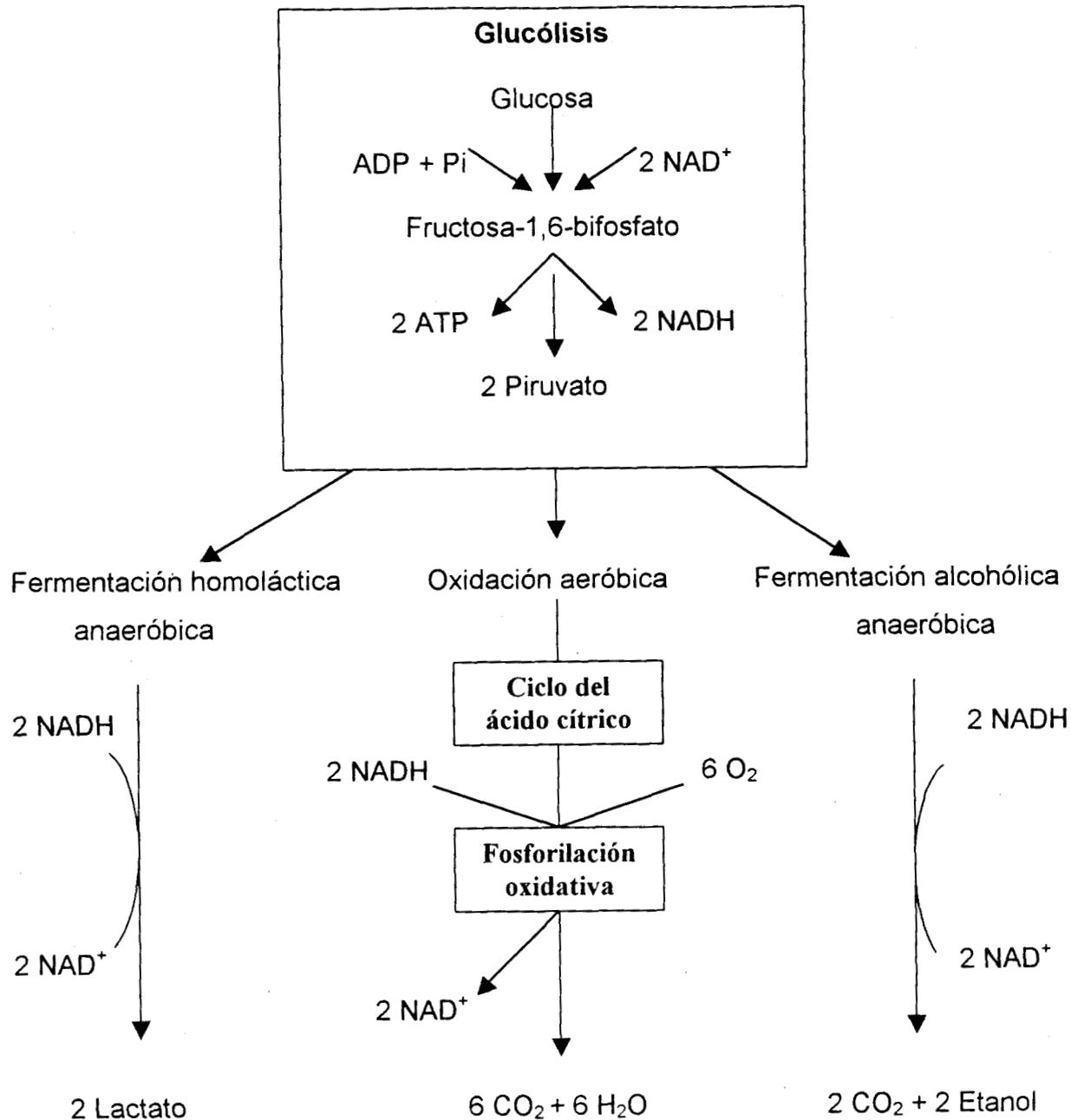
vía Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), además es la base de la respiración anaerobia o fermentación. La vía EMP convierte una molécula de hexosa en dos moléculas de ácido pirúvico. Éstas son luego descarboxiladas, y el fragmento remanente de dos carbonos se oxida totalmente en el segundo de los dos procesos principales, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs (Bidwell, 1990).

La glucólisis es la vía metabólica por la que la mayoría de las formas de vida degradan la glucosa a dos moléculas de piruvato con producción neta de dos moléculas de ATP. La reacción global es:



Consta de diez reacciones enzimáticas, en las cinco primeras reacciones de la glucólisis, la glucosa reacciona con dos ATP para formar fructosa 1,6-difosfato, que se convierte posteriormente a dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato. En las cinco últimas reacciones gliceraldehído-3-fosfato reacciona con  $\text{NAD}^+$  y Pi para formar el compuesto 1,3-difosfoglicerato. Este compuesto reacciona en las últimas cuatro reacciones de la vía con dos ADP, formando piruvato y 2 ATPs por molécula (Figura 9).

Para que la glucólisis pueda continuar, el  $\text{NAD}^+$  que se consume en la formación de 1,3 difosfoglicerato debe ser regenerado. El  $\text{NAD}^+$  se regenera a través de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias, en presencia de  $\text{O}_2$ . En ausencia de oxígeno, las reacciones de oxidación del ciclo de Krebs no pueden ocurrir y el NADH que se forma durante la oxidación de 3-fosfogliceraldehído (GAP) no puede reoxidarse por el oxígeno, de aquí que se necesite otro sistema para producir la continua provisión de NAD requerida para la operación de la glucólisis.



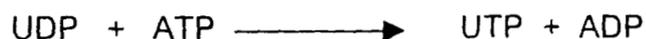
**Figura 9.** La glucólisis transforma la glucosa en piruvato, produciendo dos ATPs. En condiciones anaeróbicas tienen lugar las fermentaciones alcohólica y la homoláctica. En condiciones aeróbicas, el piruvato es oxidado a H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub> en el ciclo del ácido cítrico y de la fosforilación oxidativa (Voet y Voet, 1992).

Este problema se ha solucionado de dos maneras importantes: en algunos sistemas vegetales, es la reducción de piruvato a lactato, catalizada por la lactato deshidrogenasa que convierte el NADH a NAD en el proceso, siendo la fermentación homoláctica la principal fuente de energía (Bidwell, 1990; Voet y Voet, 1992).

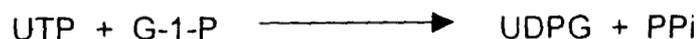
La segunda alternativa es la descarboxilación del piruvato a acetaldehído, catalizada por la alcohol-deshidrogenasa con la reoxidación del NADH. El NAD<sup>+</sup> se regenera a través de la fermentación alcohólica en dos reacciones. Primero el piruvato se descarboxila a acetaldehído por acción de la piruvato descarboxilasa, esta enzima requiere de pirofosfato de tiamina como cofactor. A continuación, el acetaldehído es reducido por el NADH para formar etanol y NAD<sup>+</sup>, en una reacción catalizada por la alcohol deshidrogenasa. Es probable que los organismos masivos como los tubérculos de papa, que puedan estar faltos de oxígeno en su centro, dado el largo camino de difusión, puedan llevar a cabo fermentación alcohólica (Bidwell, 1990; Voet y Voet, 1992).

### 2.7.1 Síntesis de la sacarosa

La síntesis de la sacarosa en las plantas superiores ocurre por una secuencia de transferencia de grupo que incluye a los nucleótidos UDP, UTP, y un nucleótido glucosil-sustituido, el difosfato de uridina glucosa (UDPG) en la secuencia siguiente:



El ATP es resintetizado por las reacciones de transporte de electrones en otra parte cualquiera de la célula. El UTP reacciona con la glucosa-1-fosfato (G-1-P) para generar la molécula donde se transfiere el glucosil UDPG ; pirofosfato (PPi).





Alternativamente, UDPG puede reaccionar con la fructosa-6-fosfato (F-6-P) para dar sacarosa-fosfato



La hidrólisis de la sacarosa-fosfato rinde aún más energía, lo que permite la acumulación de altas concentraciones de sacarosa. Estas reacciones de transferencia de grupo como reacciones exergónicas, permite la síntesis y concentraciones elevadas de sacarosa como las que se encuentran en la caña de azúcar y en las células de las plantas fotosintéticas (Bidwell, 1990).

La entrada de sacarosa en el metabolismo respiratorio se produce probablemente por medio de la enzima hidrolítica invertasa que esta casi universalmente distribuida en los tejidos vegetales. La invertasa hidroliza a la sacarosa directamente dando una mezcla equimolar de glucosa + fructosa , ambos azúcares reductores (Bidwell, 1990).

## 2.8 AM/AC como método de conservación

La conservación de alimentos es todo tratamiento de los mismos que prolonga su duración de tal manera que mantenga en grado aceptable su calidad incluyendo color, textura y aroma. Dentro de los métodos de conservación se encuentra la refrigeración, refrigeración con AC (Herrero y Guardia, 1992), tratamientos químicos de superficie (ceras), almacenamiento con gases inertes como nitrógeno y dióxido de carbono, conservación con azúcar, fermentación con salmuera (productos

fermentados), tratamiento con ácidos (encurtidos), sulfitado, congelación, irradiación, tratamiento térmico, etc. (Holdsworth, 1988).

Los productos hortícolas normalmente requieren de cierto almacenamiento con el fin de equilibrar su oferta y su demanda. Algunas frutas y hortalizas tienen una vida de almacenamiento prolongada que puede ser desde unos meses hasta más de un año, como es el caso de manzanas, peras, papas y cebollas. Mientras que las fresas, ejotes y champiñones tienen una vida de almacenamiento muy corta que va desde unos cuantos días hasta una semana (Kader, 1992a).

La vida de almacenamiento potencial de un producto hortícola se encuentra predeterminada en gran medida por sus características genéticas, pero además influyen también prácticas de cultivo que se aplican en precosecha, técnicas de cosecha, manejo y los tratamientos poscosecha y, finalmente las condiciones de almacenamiento.

Existen diferentes métodos o sistemas de almacenamiento para los productos hortícolas, cuyo objetivo es conservar la calidad de éstos o para protegerlos contra pérdidas significativas durante su almacenamiento.

Las condiciones más importantes de almacenamiento son la temperatura, humedad relativa y la atmósfera. Estos factores pueden variar drásticamente de una especie a otra y aun entre un cultivar y otro. Si se mantienen las condiciones óptimas de almacenamiento para un producto hortícola se logra maximizar su vida útil (Liu, 1992).

El almacenamiento a bajas temperaturas reduce la velocidad de respiración, la producción de etileno, el proceso de maduración, la senescencia y otros cambios conducentes al deterioro de la calidad. También se reduce: el gradiente de presión de vapor entre el producto y la atmósfera de almacenamiento, la velocidad de pérdida de agua por transpiración, el crecimiento microbiano, y por tanto, el deterioro ocasionado por él (Liu, 1992).

La vida de los productos hortícolas puede extenderse reduciendo la concentración de oxígeno, aumentando la concentración de dióxido de carbono, o combinando ambos gases. Se han desarrollado sistemas de almacenamiento en atmósferas controladas (AC) o en atmósferas modificadas (AM) para estos productos. Sin embargo, tanto las AC como las AM no son necesariamente benéficas para todos los productos. Algunos son susceptibles al daño por bajos niveles de O<sub>2</sub> y altos niveles de CO<sub>2</sub>, pero esto varía considerablemente de producto a producto (Liu, 1992).

La AC se aplica ampliamente en el almacenamiento de manzanas y peras en diversos países del mundo. Sin embargo, la aplicación comercial de las AC en otros productos hortofrutícolas aún se encuentra muy restringida a pesar de que este método de conservación tiene un gran potencial para diversas frutas y hortalizas.

### 2.8.1 Atmósfera modificada y atmósfera controlada

225565

La atmósfera modificada es cualquier alteración de la composición normal de la atmósfera (78.08% N<sub>2</sub>, 20.95% O<sub>2</sub> y 0.03% CO<sub>2</sub>) mientras que la atmósfera controlada es una variación de la AM, la cual consiste en el control estricto de la composición gaseosa con una mínima variación, la cual se logra con un monitoreo continuo de los gases. Otros métodos de AM son el envasado del producto en

materiales poliméricos, encerado y las cubiertas comestibles (González-Aguilar y col., 1999).

Las AM son técnicas complementarias a la refrigeración, por consiguiente están relacionadas con rangos de temperatura de 0-15°C y humedades relativas de 85-95% para conservar la calidad de los productos almacenados.

El beneficio o daño al utilizar una AC depende del producto hortícola, cultivar, edad fisiológica, composición atmosférica, temperatura y duración del almacenamiento. Esto ayuda a explicar la amplia variabilidad en resultados entre reportes publicados para un producto dado (Zagory y Kader, 1989; Kader, 1992a).

El desarrollo de las tecnologías de AC y AM ha permitido su aplicación durante el transporte, almacenamiento temporal o almacenamiento a largo plazo de productos hortícolas destinados al mercado en fresco o procesamiento. Lo anterior conlleva a extender la vida poscosecha y mantener la calidad de diversas frutas y hortalizas.

El uso adecuado de una AM o AC como complemento a la temperatura apropiada y humedad relativa de manejo resulta en uno o más de los siguientes beneficios que se traducen en una reducción cuantitativa y cualitativa de pérdidas durante el manejo poscosecha y almacenamiento de algunos productos hortícolas (Kader, 1992b).

1. Retarda la senescencia y está asociado a cambios bioquímicos y fisiológicos, reduce la tasa de respiración y producción de etileno, ablandamiento y cambios de composición.
2. Reduce la sensibilidad de la fruta a la acción del etileno cuando el nivel de oxígeno es inferior del 8% y del dióxido de carbono superior del 1%.

3. Reduce ciertos desordenes fisiológicos como daño por frío de varios productos, como algunos desordenes en manzana durante el almacenamiento.
4. Las AM pueden directa o indirectamente afectar los patógenos postcosecha y consecuentemente la incidencia de deterioro. Por ejemplo, elevados niveles de CO<sub>2</sub> (10% a 15%) inhiben significativamente el desarrollo de *Botrytis cinerea* (moho gris) en fresas, cerezas y otras frutas.
5. Las AM pueden ser una herramienta útil para el control de insectos en algunos productos hortícolas (Kader, 1992b; Yahia, 1993).

En los últimos 50 años, el uso de las AM/AC se ha incrementado rápidamente y ha contribuido significativamente para alargar la vida postcosecha y conservación de la calidad de diversas frutas y hortalizas. También en los últimos años, se ha incrementado el uso de las AM durante el transporte y distribución, incluyendo películas comestibles o poliméricas para crear una AM en el producto (Kader, 1992b; González-Aguilar y col., 1999).

Las frutas y hortalizas varían ampliamente en su tolerancia relativa a bajas concentraciones de O<sub>2</sub> y elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub>. Hay niveles inferiores o superiores más allá de los cuales el daño fisiológico se puede presentar. Estos límites de tolerancia pueden ser diferentes a temperaturas superiores o inferiores de las temperaturas recomendadas para cada fruta u hortaliza. También un producto puede tolerar breves exposiciones a altos niveles de CO<sub>2</sub> o bajos niveles de O<sub>2</sub> que los recomendados. El límite de tolerancia para bajas concentraciones de O<sub>2</sub> puede ser más elevado a temperatura de almacenamiento bajas porque los requerimientos de O<sub>2</sub> para respiración aeróbica del tejido vegetal se incrementa con temperaturas más altas. Dependiendo del producto, el daño asociado con CO<sub>2</sub> puede incrementarse o decrecer con un incremento en la temperatura. La producción de CO<sub>2</sub> se incrementa con la temperatura pero su solubilidad disminuye; entonces, el

CO<sub>2</sub> en el tejido vegetal puede aumentar o disminuir por un incremento en la temperatura. Además, el efecto fisiológico del CO<sub>2</sub> puede ser dependiente de la temperatura (Kader, 1992b; Yahia, 1993).

La aplicación de algunos fungicidas e insecticidas puede ser reducida o eliminada cuando la AM/AC proporciona un adecuado control postcosecha de patógenos e insectos. Además los efectos residuales de las AM/AC en las frutas y hortalizas frescas después de transferirlos al aire (durante su comercialización) puede incluir la reducción de la tasa de respiración y producción de etileno, manteniendo el color y firmeza y por tanto, retardando el deterioro (Kader, 1992b).

Kader (1992a) indica que otro uso potencial de las AM/AC es la conservación y seguridad de las frutas y hortalizas ligeramente procesadas.

### **2.8.2 Atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>**

La atmósfera rica en CO<sub>2</sub> es la modificación de la atmósfera ambiental en cuanto al nivel de CO<sub>2</sub> por arriba del normal (0.03%) y generalmente va acompañada de una reducción del nivel de O<sub>2</sub>. El CO<sub>2</sub> es un producto de la respiración que puede disminuir la velocidad del proceso metabólico a medida que su concentración aumenta, además no deja residuos tóxicos en los productos almacenados (Kubo y col., 1990). Las atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> se pueden generar de forma pasiva o activa (Kader, 1992b).

Se ha visto que las atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> reducen la velocidad de respiración de los productos hortícolas, no obstante a una concentración de 20% o mayor dependiendo del cultivar, la concentración de oxígeno y la duración de exposición, pueden resultar en la acumulación de etanol (EtOH) y acetaldehído (ACh) dentro de los tejidos (Young y Biale, 1968, Kader, 1986). Dicho efecto del CO<sub>2</sub> ha sido llamado "Cimasis por dióxido de carbono". El etanol y acetaldehído se derivan

del metabolismo anaeróbico; sin embargo, se pueden encontrar en bajas concentraciones aún en tejidos vegetales normales, sanos y sus niveles aumentan a medida que la planta madura. Los cambios en la composición química también se pueden ver positiva o negativamente afectados por las atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>, así como la retención del color, la firmeza, sabor y valor nutritivo (Herner, 1987).

Cuando la fruta u hortaliza en una AC rica en CO<sub>2</sub>, presenta elevadas concentraciones de etanol y acetaldehído, es manifiesto que el vegetal presenta un metabolismo anaeróbico y por consiguiente, un efecto adverso a la calidad del producto. Por lo tanto, el etanol acumulado en el producto es un indicador de la sensibilidad del mismo a altas concentraciones de CO<sub>2</sub>.

En muchas plantas, el crecimiento y desarrollo no se ven adversamente afectados por períodos cortos de anoxia o altas concentraciones de CO<sub>2</sub> en su atmósfera, así que estas plantas no muestran un aumento en la concentración de etanol (Chang y col., 1983). Carrillo y Yahia (1990) reportaron que el aguacate variedad Hass sometido a niveles insecticidas de O<sub>2</sub> (<1%) y/o de CO<sub>2</sub> (> 60 %) a 20°C, disminuyó la velocidad de respiración, presentó cambios en las reacciones metabólicas, entre ellas, disminución en la velocidad de biosíntesis de proteínas debido al ambiente anaeróbico de la AM, menor concentración de las enzimas ADH (alcohol deshidrogenasa) y LDH (lactatodeshidrogenasa), ambas de la respiración anaerobia y por lo tanto, menor actividad específica (Yahia, 1993).

Se han realizado diferentes estudios con la finalidad de aplicar las AM/AC como tratamientos cuarentenarios en aquellos productos hortofrutícolas que lo requieren, sin embargo, algunas de las limitaciones han sido que las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> o bajas de O<sub>2</sub> empleadas para eliminar insectos, son superiores o inferiores a las usadas para el almacenamiento del fruto u hortaliza (Proap y Forsyth, 1973; Soderstorm y col., 1984). Actualmente varios investigadores estudian la eficacia de la aplicación de la AM/AC en frutos infestados con diferentes

larvas y su efecto en la calidad del fruto. Ya que ocurren una serie de cambios químicos en los frutos sometidos a AM/AC, como el aumento en los niveles de los productos de la ruta de anaerobiosis tales como etanol, etilacetato y acetaldehído (Nisperos-Carriedo y col., 1990; Wang, 1990), los cuales son tóxicos y pueden contribuir a la mortalidad de los insectos.

### **2.8.3 Efecto de altas concentraciones de CO<sub>2</sub> en el metabolismo de frutas y hortalizas**

Durante el manejo poscosecha de frutas y hortalizas, uno de los propósitos es mantener productos de alta calidad y prolongar su vida útil, tanto en fresco como producto procesado, de ahí el uso de bajas temperaturas, AC y AM. Sin embargo, durante este manejo de productos hortofrutícolas también se presenta el oscurecimiento enzimático, que desde el punto de vista comercial es indeseable (Vamos-Vigiazó, 1981).

A la fecha, se ha convertido en un reto para los científicos encontrar soluciones para inhibir y prevenir el oscurecimiento indeseable. Muchos productos químicos han sido intensamente estudiados por su efectividad en la inhibición de la actividad de la PPO. Sin embargo, la pérdida de sabor, olor y toxicidad y costo económico afectan la aplicación de estos compuestos (Chen, 1992).

El conocimiento del oscurecimiento enzimático en frutas y hortalizas es esencial para un mejor entendimiento de la relación entre el grado de oscurecimiento de una magulladura (abrasión) o tejidos cortados, el contenido total y relativo de fenoles y actividades de la PPO.

Solamente pocos estudios se han llevado a cabo con extractos más o menos purificados de ciruela, uva, pera, papa y espinaca dando resultados contradictorios. Gregory y Bendall (1966) (citado por Janovitz-Klapp y col., 1990b) utilizaron las representaciones de Lineweaver-Burk para el estudio del efecto de las concentraciones de oxígeno y compuestos fenólicos; estos autores obtuvieron correlaciones en líneas paralelas con todos los sustratos fenólicos con excepción del ácido clorogénico. Con respecto a las oxidaciones enzimáticas de mezclas fenólicas en soluciones modelo, se ha trabajado poco, por lo que es escaso el conocimiento sobre el efecto mutal de diferentes fenoles sobre sus cinéticas de oxidación por PPO.

Janovitz-Klapp y col., (1990b) reportaron un estudio que realizaron con respecto a investigaciones cinéticas de PPO en manzana, en el que el oxígeno es el primer sustrato que se enlaza a la PPO (E-O<sub>2</sub>) y posteriormente el compuesto fenólico (E-O<sub>2</sub>-Ph). Lo anterior, lo demostró utilizando el 4- metilcatecol como sustrato y el ácido benzoíco como inhibidor, éste último es competitivo con el compuesto fenólico pero no con el oxígeno. Por tanto, el ácido benzoíco puede unir solamente las formas enzimáticas de la PPO de la manzana las cuales estén libres de compuestos fenólicos (Ph), por ejemplo, E o E-O<sub>2</sub>.

También se observó que el 4 metil-catecol es el mejor sustrato para la PPO de la manzana (Janovitz-Klapp y col., 1990b). Y que durante el análisis rutinario de actividad, la PPO esta aproximadamente la mitad saturada por el oxígeno. Con respecto a los valores de la  $K_{mO_2}$ , los cuales representan los intervalos de las velocidades de formación de quinonas para el complejo de disociación E-O<sub>2</sub>, éstos son muy diferentes de un fenol a otro. La velocidad de formación de quinona es dos veces más bajo con ácido clorogénico que con 4-metilcatecol (Janovitz-Klapp y col., 1990b).

Siriphanish y Kader (1985) encontraron que en una atmósfera de aire+15% de CO<sub>2</sub> bajo el pH (6.7 a 6.3), disminuyó el oscurecimiento en los tejidos y la actividad de la PPO así como, que el contenido total fenólico fue menor en lechuga almacenada a 0°C en esta AC. Estos autores sugirieron que el CO<sub>2</sub> es un inhibidor competitivo de la PPO como lo demostraron Murr y Morris (1974), y que también puede influir en varias etapas del metabolismo fenólico.

Mateos y col. (1993) concluyeron que con concentraciones de CO<sub>2</sub> < 20% , la actividad de PAL (fenilalanina amoníaco-liasa, la cual actúa sobre la desaminación de la fenilalanina a ácido cinámico, secuencialmente hidroxilado a varios compuestos fenólicos) en lechuga, fue reducida como resultado de la disminución del pH citoplasmático. Considerando que el pH óptimo de la actividad de PAL es de 8.5, una reducción en pH podría resultar en una reducción en el rango de la síntesis de fenólicos. Lo anterior explica la ausencia de oscurecimiento (daño por frío u oscurecimiento enzimático) en rebanadas de jícama almacenadas en CO<sub>2</sub> al 10% a 5°C y la disminución del cambio de color en rebanadas de jícama almacenadas a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> (20%) y a 10°C (Aquino-Bolaños y col., 2000).

Uno de los riesgos de la modificación de la atmósfera es la inducción de la respiración anaeróbica y la consecuente producción de acetaldehído y etanol. En el caso de las rebanadas de jícama almacenadas en la AC con 3% de O<sub>2</sub> y 20% de CO<sub>2</sub> y durante ocho días, se encontró un incremento en la cantidad de acetaldehído 10 veces mayor comparada con la cantidad de este volátil en el producto almacenado en aire a 5°C (Aquino-Bolaños y col., 2000).

Chang y col. (1983), en estudios realizados con camote en una atmósfera controlada saturada de CO<sub>2</sub>, encontraron mayores concentraciones de CO<sub>2</sub> interno en los tejidos que en la atmósfera de CO<sub>2</sub> ambiental, lo cual fue debido a que los

tejidos de las plantas estaban menos aireadas que en un ambiente aeróbico normal. Paralelamente a las altas concentraciones de etanol (5.5-31.76  $\mu\text{mol/g}$  a 48 horas de exposición), también se encontró mayor actividad de la enzima piruvato descarboxilasa (PDC), la cual puede estar regulando el flujo de carbono hacia etanol bajo condiciones anaeróbicas. El pH óptimo de la enzima en camote es de 6.1- 6.6 con una caída rápida de la actividad a pH de 7. Además las tasas altas de conversión de NADH a NAD estimulan a la enzima. Un cambio de un ambiente aeróbico a uno anaeróbico puede favorecer una concentración alta de piruvato, aumentando la relación de NADH a NAD y bajando el pH del citoplasma debido a una acumulación inicial de ácidos orgánicos. Las concentraciones elevadas de  $\text{CO}_2$  pueden cambiar también el pH del citoplasma a un intervalo más ácido. Estos factores pueden contribuir a una actividad alta de la piruvato descarboxilasa *in situ* en condiciones de anaerobiosis. Estos mismos investigadores, sugirieron que la mayor actividad de la PDC en el camote en anaerobiosis es debido a la presencia de mayor concentración de la enzima en el tejido o a una modificación permanente de la molécula de la enzima a una forma más activa.

Las concentraciones bajas de  $\text{O}_2$  y concentraciones elevadas de  $\text{CO}_2$  disminuyen la conversión de almidón a azúcar, por lo que también disminuye el desarrollo de sabores dulces. En plátanos la actividad de la fosfatasa fue reducida y la sacarosa, fructosa y glucosa se acumularon más lentamente cuando el producto se almacenó en  $\text{O}_2$  al 2.5% comparado con plátanos en aire. El almacenamiento de papas en  $\text{O}_2$  al 2.5% inhibió incrementos en fructosa, glucosa y sacarosa (Zagory y Kader, 1989).

Por otra parte, se han realizado estudios utilizando fluidos supercríticos (SC), los cuales tienen propiedades intermedias entre aquellos de los líquidos y de los gases y se ha reportado que inactivan la peroxidasa, polifenoloxidasas y pectinesterasa (Cristianson y col., 1984; Zemel, 1989 y Arreola, 1990, citados por Chen y col., 1992), cuando se utiliza el  $\text{CO}_2$  como un fluido supercrítico. Las ventajas

de utilizar CO<sub>2</sub> como un fluido SC, son: no es tóxico, no flamable, barato y disponible y además también tiene baja temperatura y presión crítica.

Taniguchi y col. (1987) estudiaron la retención de las actividades para la  $\alpha$ -amilasa, glucosa oxidasa, lipasa y catalasa al aplicar altas presiones de CO<sub>2</sub>. Se ha demostrado que la aplicación de CO<sub>2</sub> a altas presiones inactiva la PPO, pero a la fecha no hay información del efecto inhibitorio sobre esta enzima.

Chen y col. (1992) investigaron el efecto de la aplicación de CO<sub>2</sub> a altas presiones (58 atm o 850 psi) y temperatura de 43°C en la PPO purificada de papa, camarón y langosta. Los resultados mostraron que el tratamiento del CO<sub>2</sub> causó cambios de conformación en la estructura secundaria ( $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -hoja plegada y espiral al azar). La PPO del camarón y la langosta presentaron alteraciones más notables en la composición  $\alpha$ -hélice y espiral al azar. Mientras que solamente una alteración menor se presentó en la estructura secundaria de la PPO de la papa. Es decir, la PPO de la papa fue mas resistente a este tratamiento que las PPO de camarón y langosta.

Cuando las PPO de camarón y langosta se sometieron a altas presiones de CO<sub>2</sub> por 10 y 15 minutos respectivamente se causó precipitación de proteínas, es decir hubo una desnaturalización proteica de las moléculas de PPO, lo anterior no sucedió con la PPO de papa, por lo que se concluyó que fue efecto del CO<sub>2</sub> y no de las altas presiones ya que otros autores han reportado que la desnaturalización de las proteínas ocurre a presiones arriba de 1000-3000 atm (Suzuki y Taniguchi, 1972). Los análisis espectropolarimétricos señalaron una alteración menor en la estructura secundaria en la PPO de la papa al ser sometidas a presiones altas de CO<sub>2</sub> y 43°C, de ahí que únicamente presentó una pérdida del 5% en su actividad (Chen y col., 1992).

También en este estudio se reportó que el tratamiento a altas presiones de CO<sub>2</sub> y temperatura de 43°C, el pH de la PPO de la papa cv. Rosset bajó de 6.1 a 4.2; el punto isoeléctrico (pI) fue de 6.0 para las papas no tratadas y de 6.2 para los tubérculos tratados con atmósferas con elevado CO<sub>2</sub>. Estos resultados indican que la efectividad del tratamiento depende del alimento, patrones proteicos, perfiles isoeléctricos y estructuras secundarias (Chen y col., 1992).

Weder y col., (1992), propusieron que la papa a altas presiones de CO<sub>2</sub> en condiciones normales, la caída del pH provoca un cambio en la estructura de la enzima exponiendo el residuo de la arginina, por lo que se facilita la formación de un complejo de carbamato; además de la reducción del pH, el CO<sub>2</sub> enlaza las moléculas de enzima, las desnaturaliza y causa la pérdida de la función catalítica.

**225565**

### **3. HIPÓTESIS**

La atmósfera rica en CO<sub>2</sub> al 30% balance aire, reduce la actividad de la polifenoloxidasa y la conversión del almidón a azúcares reductores en papa cv. Alpha, favoreciendo la disminución del oscurecimiento enzimático y no enzimático en este tubérculo, sin elevada acumulación de etanol.

## **4. OBJETIVOS**

## 4.1 Objetivo general

Determinar el efecto de una atmósfera rica en CO<sub>2</sub> al 30% balance aire en la calidad de papa (*Solanum tuberosum* L. ) cv. Alpha, almacenada a 7°C durante 120 horas.

## 4.2 Objetivos específicos

- 4.2.1 Evaluar los cambios que se presentan en los parámetros fisicoquímicos en papa cv. Alpha, como pH, acidez titulable, sólidos solubles totales, pérdida de peso, color y textura, en respuesta a su almacenamiento en una atmósfera rica en CO<sub>2</sub> al 30% balance aire a 7°C durante 120 horas.
- 4.2.2 Determinar la acumulación de etanol, cambios en la actividad de la polifenoloxidasa, concentración de proteína y de azúcares reductores solubles en papa cv. Alpha, en respuesta a su almacenamiento en una atmósfera rica en CO<sub>2</sub> al 30% balance aire a 7°C durante 120 horas.
- 4.2.3 Establecer los cambios que se presentan en la actividad de la polifenoloxidasa mediante la formación de pigmentos, concentración de proteína y de azúcares reductores solubles en un sistema modelo, en función del pH a 4.5 y 6.5, y atmósfera rica en CO<sub>2</sub> al 30% balance aire a 7°C durante 120 horas.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 5.1 MATERIALES

### 5.1.1 Material biológico

El material biológico estuvo constituido por papas cv. Alpha, procedentes de Los Mochis, Sin. Los tubérculos se adquirieron en las bodegas mayoristas de la Central de Abasto "Hank González" de la Ciudad de México, se seleccionaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para papa en estado fresco (*Solanum tuberosum*, L.) NMX-FF-022-1995-SCFI, con base a la uniformidad de tamaño (240 – 250 g), forma, color y libres de daños y defectos.

### 5.1.2 Recipientes herméticos

Los recipientes herméticos utilizados para los experimentos fueron de acrílico con un diámetro externo de 23.0 cm y altura de 30.6 cm para las papas enteras y para el extracto crudo de 15.4 cm de diámetro externo y 20.2 cm de altura.

## 5.2 MÉTODOS

El tratamiento consistió en una atmósfera rica en CO<sub>2</sub> al 30% balance aire, éste se generó en recipientes cerrados herméticamente a una temperatura de 7°C. Esta atmósfera en estudio, se aplicó a papas enteras y a un extracto crudo de papa como sistema modelo (ver sección 5.2.2) en ambos casos durante 120 horas. El tratamiento control consistió en el almacenamiento en aire de papas y del extracto (Figuras 10 y 12).

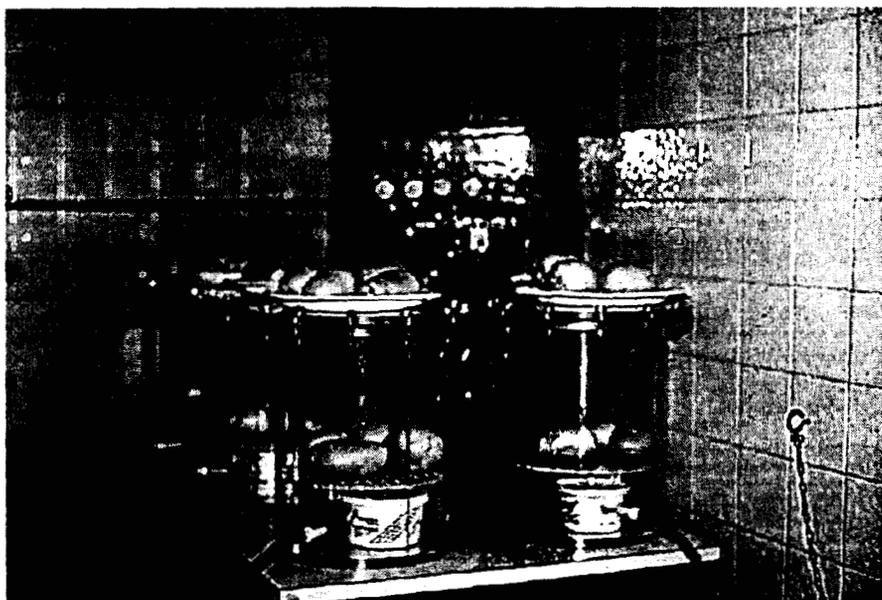
## 5.2.1 ESTUDIOS EN PAPAS ENTERAS.

### 5.2.1.1 Preparación de muestras

Una vez uniformizado el producto se formaron grupos de manera aleatoria para conformar cada unidad experimental y aplicarle el tratamiento en estudio.

### 5.2.1.2 Almacenamiento de las papas enteras en el sistema

A las unidades experimentales se les asignaron aleatoriamente los tratamientos que consistieron en CO<sub>2</sub> al 30 % balance aire (60 mL/min, Pal y Buescher, 1993) y aire (control); se almacenaron durante 120 h a 7±1°C (Figura 10). Se tomaron muestras para la determinación de las variables respuesta a las 0, 24, 72 y 120 h.



**Figura 10.** Almacenamiento de papas enteras en una atmósfera rica en CO<sub>2</sub> al 30% balance aire.

Las fuentes de variación durante el estudio para las papas enteras fueron: atmósfera (aire y CO<sub>2</sub> al 30% balance aire) y el tiempo de exposición a la atmósfera (0, 24, 72 y 120 h); las variables de respuesta fueron: concentración de etanol, pH, acidez titulable, sólidos solubles totales, pérdida de peso, índice de oscurecimiento (IO), textura, actividad de la polifenoloxidasasa (PPO), concentración de proteína y concentración de azúcares reductores solubles (Tabla 4 y Figura 11). La temperatura se mantuvo constante a 7°C.

**Tabla 4.** Fuentes de variación y variables de respuesta para las papas enteras almacenadas en el tratamiento en estudio.

Almacenamiento de papas enteras	
Temperatura	Constante: 7°C
Fuentes de variación	Nivel
Atmósfera	CO <sub>2</sub> 30% balance aire, aire
Tiempo	0, 24, 72 y 120 h
Variables respuesta	
Etanol	
pH	
Acidez titulable	
Sólidos solubles totales	
Pérdida de peso	
Índice de oscurecimiento (IO)	
Textura	
Actividad enzimática de PPO	
Concentración de proteína	
Concentración de azúcares reductores solubles	

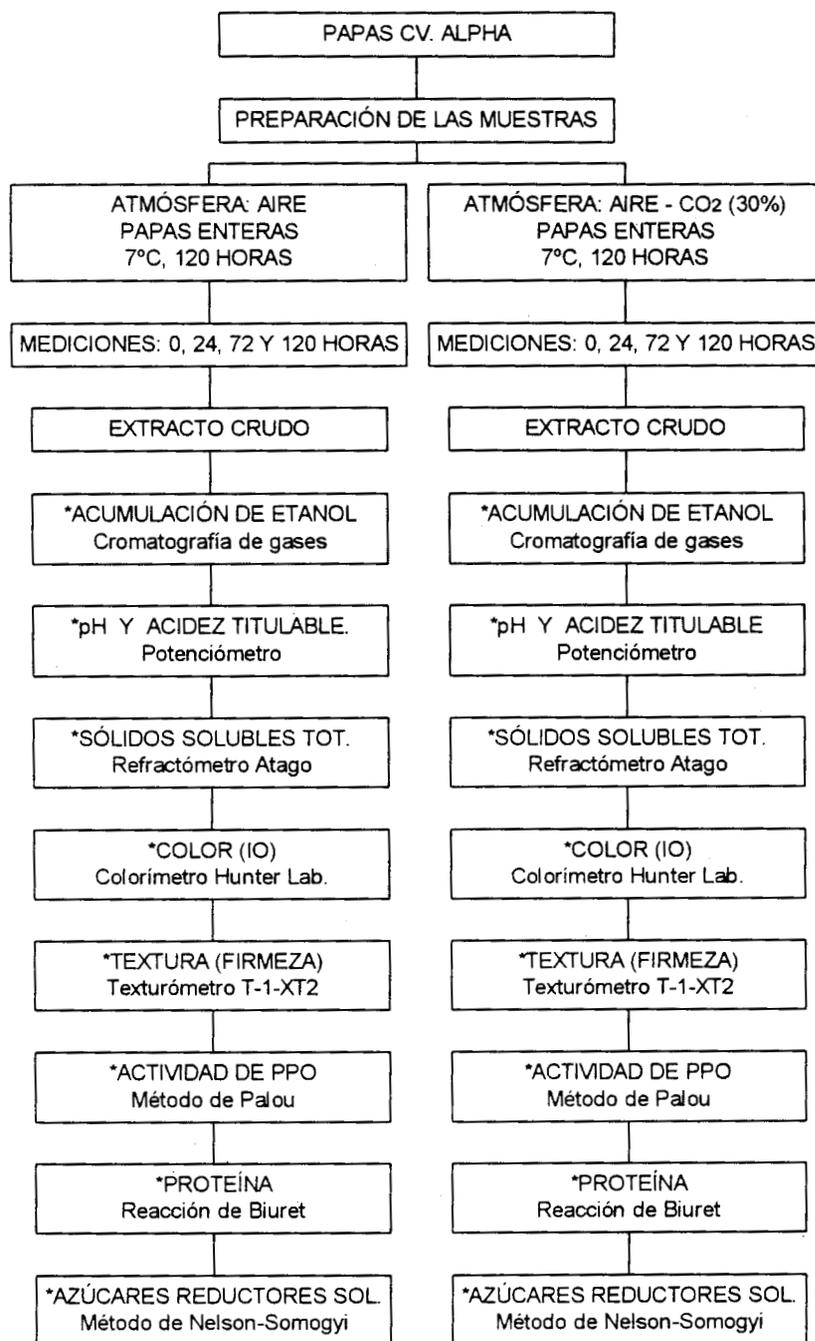


Figura 11. Diagrama de flujo para el almacenamiento de papas enteras.

### 5.2.1.3 Métodos analíticos

#### a) Determinación de pH, acidez titulable (AT), sólidos solubles totales (SST) y pérdida de peso (PP)

Se llevaron a cabo según las técnicas descritas en el Anexo 1.

#### b) Determinación del índice de oscurecimiento (IO)

Las papas tratadas, se pelaron y cortaron transversalmente en rebanadas de 1 cm de espesor y se rociaron con una solución de ácido ascórbico al 1% p/v con el propósito de evitar oxidaciones posteriores. El color se determinó por el sistema CIE-LAB (Pomeranz y Meloan, 1994). Los parámetros L, a, b se cuantificaron con un colorímetro Hunter Lab, CM-2002 (Hunter Associates Laboratory Inc. Reston, VA., EUA). El instrumento fue estandarizado con una placa de cerámica blanca con las coordenadas  $a = -1.07$ ,  $b = 0.35$  y  $L = 93.20$ .

El tono o matiz (H), cromaticidad o saturación o pureza (c) y el índice de oscurecimiento (IO), se calcularon de las siguientes ecuaciones:

$$H = \tan^{-1}(b/a) \quad C = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

$$IO = \{ 100 (x - 0.31) \} / 0.172$$

Donde:

$$X = (a + 1.75 L) / (5.645 L + a - 3.012 b)$$

L = luminosidad (intervalo de 0% de oscuridad a 100% blanco)

a = rojos a verdes

b = amarillos a azules.

El índice de oscurecimiento representa la pureza del color café y es reportado como un parámetro importante en los procesos en donde el oscurecimiento enzimático y no enzimático tienen lugar (Buera y col., 1986; Guerrero y col., 1996; Castañón y col., 1999).

### **c) Determinación de textura**

Se determinó la resistencia al corte del tejido vegetal de cubos de papa de 1 cm de longitud, utilizando una cuchilla Warner Bratzler en un Texturómetro T-1-XT2 Texture Analyser (Texture Technologies Corp., Scarsdale, N.Y., EUA). Esta prueba de corte está diseñada para imitar la incisión de los dientes al cortar el alimento (Edwards, 1999; Pedreschi, 2001). Se eligió este método de medición de la firmeza de las papas ya que la prueba de penetración presentó mucha variabilidad en los datos.

La distancia recorrida por la cuchilla fue de 15 mm y la velocidad de prueba fue de 1.0 mm/seg. Los resultados se expresaron en Newtons (N).

### **d) Determinación de acumulación de etanol**

A porciones de 10 g de papa pelada y picada se le adicionaron 10 mL de solución de cloruro de sodio 3M; se homogeneizaron en un homogeneizador de tejidos (M 133/1281-O Biospec Products Inc., Bartlesville, OK, EUA) durante 10 seg a una temperatura de 4°C y se almacenaron en frascos viales; el análisis se llevó a cabo por triplicado. El motivo para utilizar la solución de NaCl 3M fue evitar que las diferencias entre las fuerzas iónicas de las muestras pudiesen influir sobre la de presión de vapor de los gases ( Buescher y Brown, 1979).

Las muestras se centrifugaron a 23 700 g durante 15 min a 4°C en una centrifuga Beckman (J2-MI U94 8885 Beckman Inc., Palo Alto, Cal., EUA).

Se inyectaron volúmenes de 0.2  $\mu$ L del sobrenadante en un Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard Serie II 5890 (Hewlett-Packard Co., Wilmington, EUA) con las siguientes condiciones: detector de ionización de flama, nitrógeno como gas portador a 3.5 mL/min; hidrógeno a 30 mL/min, aire a 300 mL/min, temperatura del inyector 130°C, temperatura del horno 120°C, temperatura del detector 150°C. Empleando una columna megaboro AT-1000 (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, EUA) de 10 m de longitud, 0.54 mm de diámetro interno, 0.2  $\mu$ m de diámetro de la película de la columna, en condiciones isotérmicas. Los resultados se expresaron como  $\mu$ L de etanol/L de muestra

#### **e) Determinación de actividad enzimática**

La papa pelada y picada se homogenizó en un equipo homogeneizador de tejidos M 133/1281-O (Biospec Products Inc., Bartlesville, OK, EUA) durante 10 seg a una temperatura de 0 a 4°C.

Se mezclaron porciones de 10 g de extracto por 60 seg con 10 mL de buffer de fosfatos, pH 6.5 (Anexo 2), utilizando un mezclador vortex "Super-Mix" modelo 1290 (Lab-line Inst., EUA). El homogeneizado se centrifugó a 11,500 g y 4°C por 30 min en una centrífuga Beckman J2-MI Centrifuge Serial No. U94 8885 (Beckman Inc., Palo Alto, Cal., EUA). El sobrenadante se filtro con papel Whatman No.1, se analizó la actividad de la PPO a 420 nm y 25°C como lo describe Pizzocaro y col. (1993).

Se adicionó 0.5 mL de solución de catecol 0.175 M y 1.0 mL de buffer de fosfatos pH 6.5 en una celda del espectrofotómetro, ya colocada la celda en el equipo se adicionó 0.5 mL de extracto de PPO de la muestra. La reacción enzimática fue seguida por espectrofotometría a 420 nm durante 2.5 min.

La actividad de la PPO se calculó sobre la base de la pendiente de la porción lineal de la curva  $\Delta A_{420}$  vs tiempo hasta 2.5 min. Una unidad de actividad de PPO es definida como  $\Delta A_{420} 0.001 \text{min}^{-1} (\text{mL de extracto})^{-1}$ . La actividad de la PPO residual se expresó como la relación entre el extracto de papa control y el extracto de papa tratado con  $\text{CO}_2$  (Palou y col., 1999).

#### **f) Determinación de concentración de proteína**

Se llevó a cabo de acuerdo a la reacción de Biuret, descrita en el Anexo 3.

#### **g) Determinación de concentración de azúcares reductores solubles**

Se siguió el método descrito por Nelson-Somogyi (1944), reportado en el Anexo 4.

### **5.2.2 ESTUDIOS EN UN SISTEMA MODELO**

#### **5.2.2.1 Preparación de muestras**

Una vez uniformizado el producto se formaron dos grupos de manera aleatoria para preparar los extractos de papa a pH 4.5 y 6.5 y conformar las unidades experimentales y aplicarles el tratamiento en estudio.

#### **a) Extracto crudo de PPO a pH 6.5**

Se molieron porciones de 500 g de papa pelada y picada, en un extractor convencional Brown, a una temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente 350 g se homogeneizaron con 350 mL de buffer de fosfatos, pH 6.5, por 30 seg a  $4^\circ\text{C}$ ; se centrifugó a 11,500 g por 30 min a  $4^\circ\text{C}$  en un equipo Beckman (J2-MI Centrifuge

Serial No. U94 8885, Beckman Inc. Palo Alto, Cal., EUA). A una parte del sobrenadante se le determinó actividad enzimática, concentración de proteína y de azúcares reductores solubles según la metodología reportada en la sección 5.2.1.3.

#### **b) Extracto crudo de PPO a pH 4.5**

Para el extracto crudo a pH 4.5 se siguió el procedimiento anterior pero utilizando buffer de citratos pH 4.5, preparado como se describe en el Anexo 2.

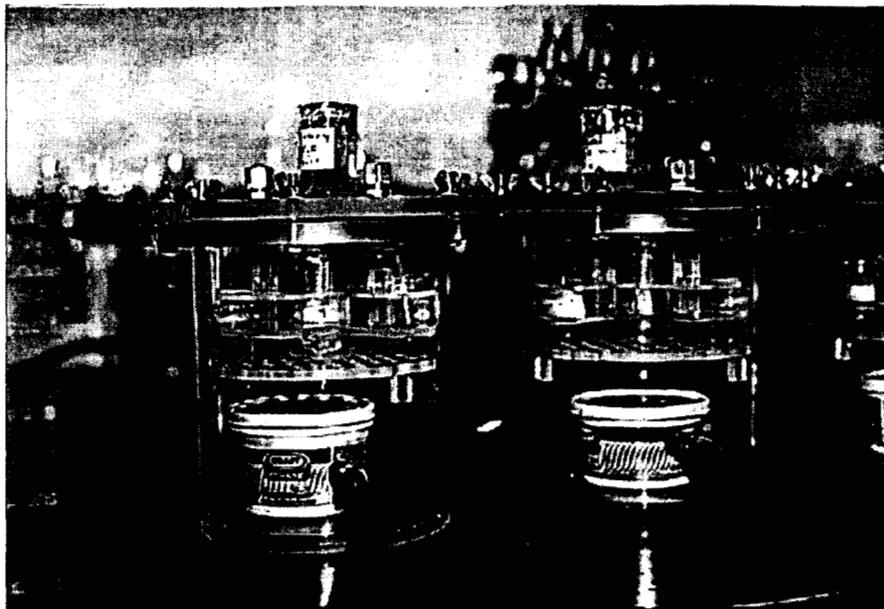
#### **5.2.2.2 Almacenamiento del sistema modelo de extracto crudo de papa**

##### **a) Almacenamiento en aire del extracto crudo**

El extracto crudo (muestra de 10 mL para cada tiempo de análisis) se sometió a una atmósfera de aire en una cámara de refrigeración a  $7\pm 1^\circ\text{C}$  (Figura 12), posteriormente se hicieron mediciones de actividad enzimática, concentración de proteína y de azúcares reductores solubles a las 0, 24, 72 y 120 h, según la metodología descrita en la sección 5.2.1.3.

##### **b) Almacenamiento en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 30% balance aire del extracto crudo**

El extracto crudo (muestras de 3 mL en cada celda y para cada tiempo de análisis) se sometió a una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 30% balance - aire durante 24, 72 y 120 h a  $7\pm 1^\circ\text{C}$ . El dispositivo utilizado se muestra en la Figura 12.



**Figura 12.** Almacenamiento del extracto crudo de papa en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 30% balance aire.

En el caso del extracto de papa, las fuentes de variación fueron: pH (4.5 y 6.5), atmósfera ( $\text{CO}_2$  al 30% balance aire (60 mL/min), y aire), y el tiempo de exposición a la atmósfera de 120 h, el parámetro constante fue temperatura de almacenamiento ( $7^\circ\text{C}$ ); las variables de respuesta fueron: actividad de la polifenoloxidasasa (PPO), concentración de proteína y concentración de azúcares reductores solubles (Tabla 5).

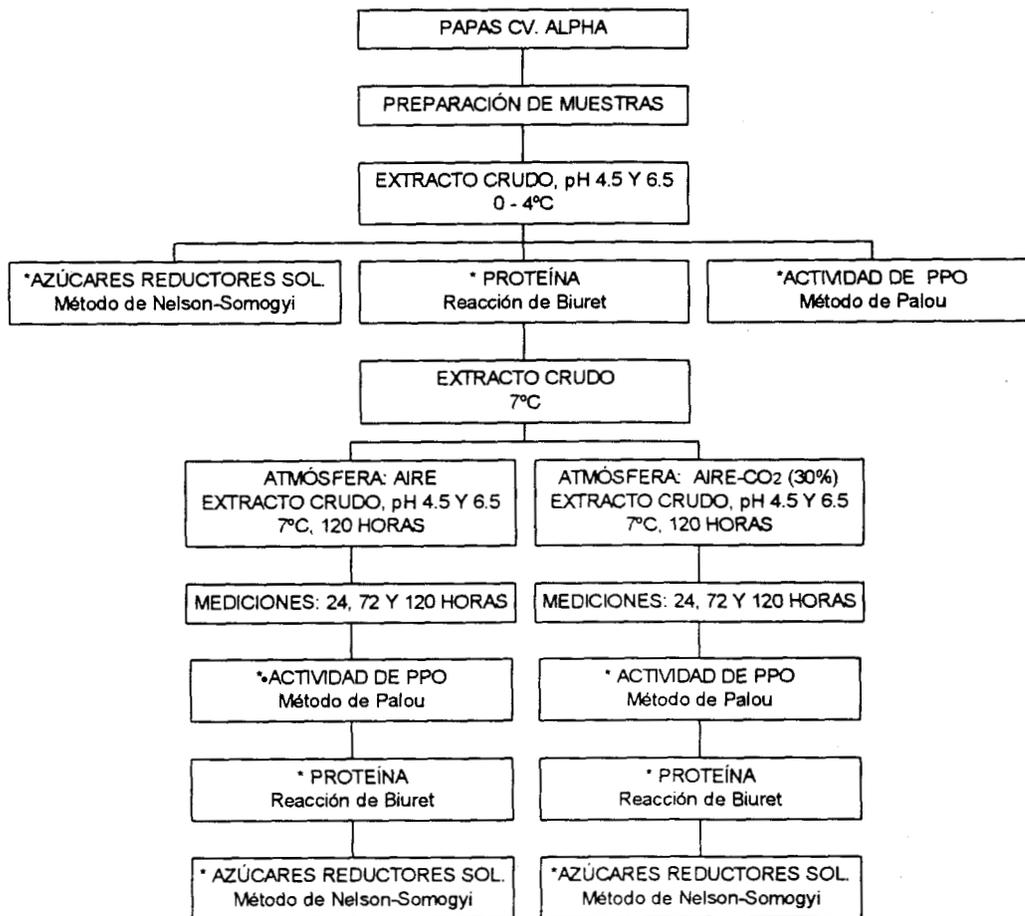
**Tabla 5.** Fuentes de variación y variables de respuesta para el extracto crudo de papa almacenado en el tratamiento en estudio.

almacenamiento del extracto crudo	
Temperatura	Constante: 7°C
Fuentes de variación	Nivel
pH	4.5, 6.5
Atmósfera	CO <sub>2</sub> al 30% balance aire, aire
Tiempo	0, 24, 72 y 120
Variabes respuesta	
	Actividad enzimática de PPO
	Concentración de azúcares reductores solubles
	Concentración de proteína

### 5.2.2.3 Métodos analíticos

Se determinó actividad enzimática, concentración de proteína y de azúcares reductores solubles en los extractos crudos a pH de 6.5 y 4.5 en la atmósfera control (aire) y la atmósfera en estudio (CO<sub>2</sub> al 30% balance aire), a cuatro tiempos de almacenamiento (Figura 13).

225565



**Figura 13.** Diagrama de flujo para el almacenamiento del sistema modelo de extracto crudo de papa.

#### a) Determinación de actividad enzimática

Al tiempo de análisis determinado, se colocó en celdas de espectrofotómetro aceite mineral para evitar la incorporación de oxígeno a las muestras. Se analizó la actividad de la PPO como se describe en la sección 5.2.1.3

**b) Medición de la concentración de proteína**

Se determinó de acuerdo a la metodología descrita en el Anexo 3.

**c) Medición de la concentración de azúcares reductores solubles**

Se determinó de acuerdo a la metodología descrita en el Anexo 4.

**5.2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Tanto para los estudios en papa entera como en los realizados en extractos, las muestras fueron distribuidas en un diseño totalmente al azar, donde las fuentes de variación y las variables de respuesta se muestran en las Tablas 4 y 5. Los datos se sujetaron a un modelo lineal de covarianza con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ .

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

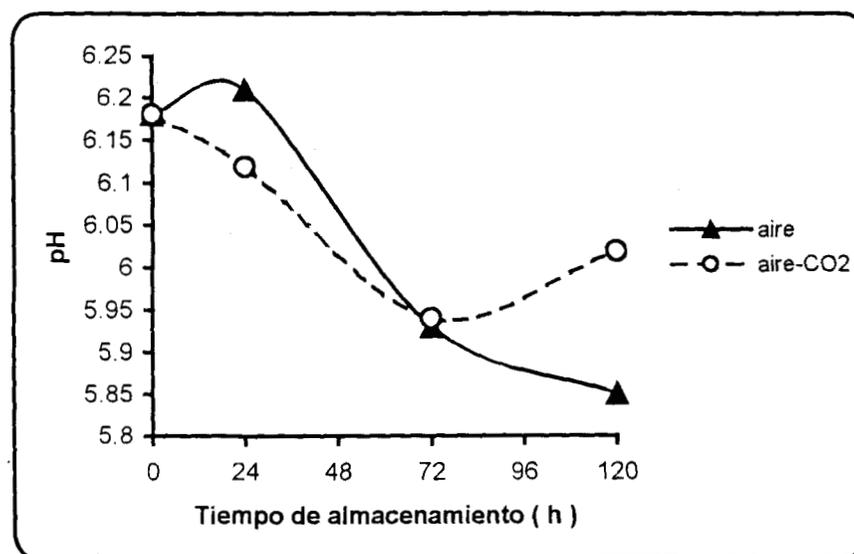
Con relación a las medias de las variables respuesta en las papas enteras sometidas a la atmósfera rica en CO<sub>2</sub> (anexo 5), se observó que la acidez total titulable, el índice de oscurecimiento en pulpa y cáscara, actividad enzimática y azúcares reductores solubles fueron menores comparando con las medias de estos mismos parámetros en las papas del tratamiento control (aire); lo cual resulta favorable para mantener la calidad de los tubérculos ya sea para su consumo en fresco o para el procesamiento (freído), en el cual una elevada concentración de azúcares reductores es perjudicial desde el punto de vista de la calidad así como del económico. En el caso de las medias de la pérdida de peso y acumulación de etanol en las papas puestas bajo la atmósfera en estudio resultaron mayores que las del tratamiento control, por lo que sí se afecta la calidad de los tubérculos con el CO<sub>2</sub>. Con respecto a las medias del pH y sólidos solubles realmente no hubo variación. En el caso de la firmeza (textura), el valor de la media en las papas bajo la atmósfera en estudio fue mayor, es decir, los tubérculos presentaron un ablandamiento con lo cual se asume que por este factor si se afecta la calidad del producto. En el caso de la proteína, la media en las papas sometidas al tratamiento en estudio fue menor que en la atmósfera control, lo cual puede ser por una disminución en la velocidad de síntesis de proteínas.

## 6.1 PAPAS ENTERAS

### 6.1.1 pH

La Figura 14 muestra que el pH de las papas del tratamiento control, presentó una ligera elevación a las 24 h y después un descenso del mismo a las 72 y 120 h. Para la atmósfera rica en CO<sub>2</sub> (30%), el pH fue menor a las 24 y 72 h comparado con el tratamiento control pero a las 120 h presentó un ligero ascenso. Es decir, la atmósfera en estudio disminuyó el pH hasta las 72 h. La media del pH para las papas

almacenadas en la atmósfera en estudio fue de 6.06 y para la atmósfera control fue de 6.05.



**Figura 14.** Comportamiento del pH con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en CO<sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.

Davis y Davis (1972), reportaron que bajo condiciones anaeróbicas la producción de lactato desde glucosa puede bajar el pH y estimular la producción de etanol. La continua producción de lactato puede llevar a un descenso mayor del pH y ocasionar un nivel peligroso para los tejidos vegetales. Por otra parte, estos autores observaron que la lactato deshidrogenasa de tejidos de papa fue inhibida por el ATP y esta inhibición fue ligeramente alcalina, es decir, el pH presentó decrementos e incrementos, ocasionados por la baja del pH del citoplasma, la actividad de la lactato deshidrogenasa declina mientras que la actividad de la piruvato descarboxilasa se incrementa; la consecuente remoción del piruvato ocasiona que el pH aumente y se restablezca la producción de lactato desde la glucosa. Con respecto al

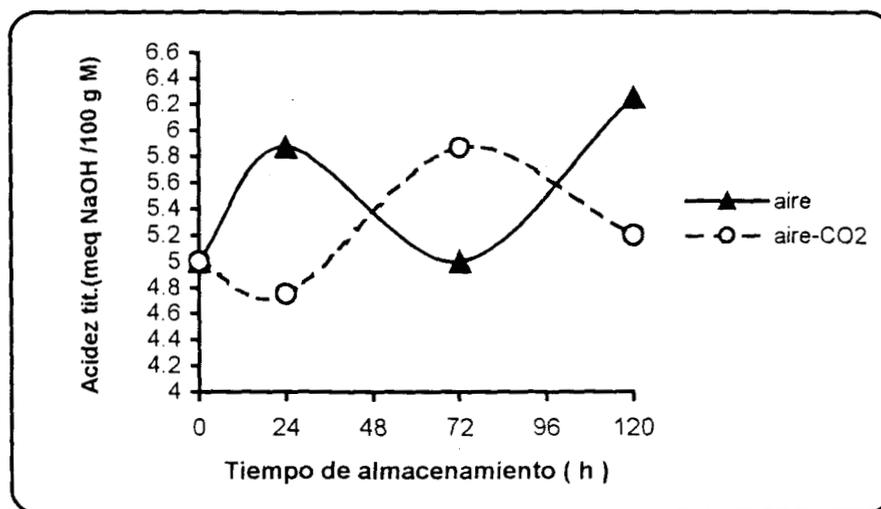
comportamiento del pH en las papas en la atmósfera rica en CO<sub>2</sub> se observó que presenta este comportamiento. Siriphanish y Kader (1985), reportaron una disminución en el pH citoplasmático (6.7 en aire y 6.3 en CO<sub>2</sub>) y un incremento en la acidez en lechuga en atmósferas con 5 - 15% de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, después se presentó una tendencia opuesta para ambos parámetros. Este mismo comportamiento se presentó en jícama a 5°C y CO<sub>2</sub> al 10% o más altas (Aquino-Bolaños y col., 2000). No se conoce si este incremento de pH es una consecuencia de los efectos del CO<sub>2</sub> sobre el metabolismo normal o es una reacción directa del tejido vegetal para contrarrestar los efectos ácidos del CO<sub>2</sub>. También Chan y col. (1983), encontraron una disminución del pH citoplasmático (ácido) y un incremento de la actividad de la piruvato descarboxilasa (PDC) en camotes sometidos a una atmósfera saturada de CO<sub>2</sub> durante 48 h. Es de señalar que el tratamiento en estudio no tuvo efecto significativo en el pH.

Con respecto al análisis de varianza (Anexo 6), el tratamiento y la interacción tratamiento\*tiempo no fueron significativos mientras, que el tiempo de almacenamiento si lo fue ( $Pr > 0.0001$ ), lo que indica que la atmósfera rica en CO<sub>2</sub> no tuvo un efecto significativo en el pH de las papas, pero exposiciones de esta atmósfera rica en CO<sub>2</sub> durante tiempos prolongados si tendría un efecto negativo en la calidad de los tubérculos.

### 6.1.2 Acidez titulable

Los resultados de la acidez titulable se presentan en la Figura 15; a las 72 h en el tratamiento en estudio se presentó un ligero ascenso de la acidez y posteriormente un descenso a las 120 h, este comportamiento coincide con la disminución y elevación del pH a estos dos tiempos de muestreo. En general la acidez fue menor en las papas almacenadas en el tratamiento de la atmósfera rica en CO<sub>2</sub> respecto a las del aire, aunque las diferencias no fueron significativas. La

media de la AT fue de 5.15 meq de NaOH/100g de muestra, mientras que para la atmósfera control fue de 5.46 meq NaOH/100g de muestra.



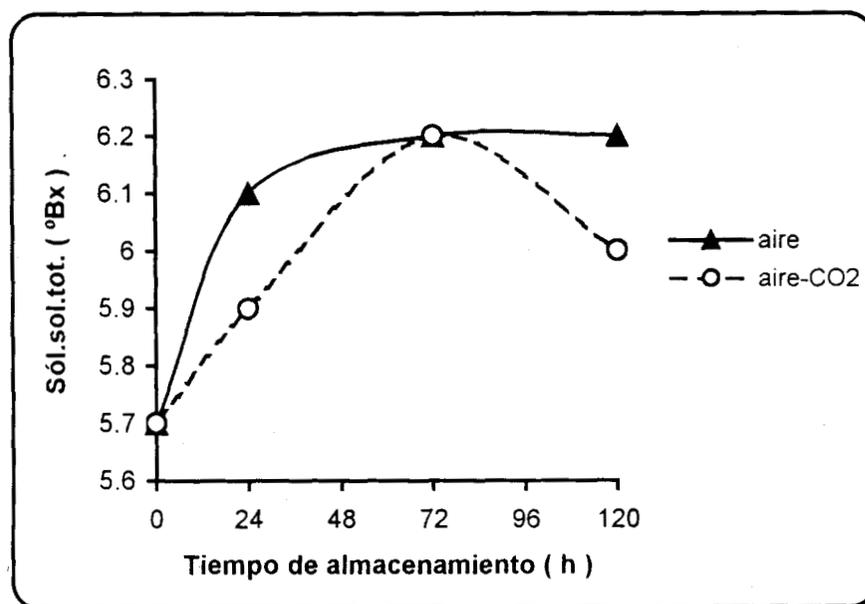
**Figura 15.** Comportamiento de la acidez titulable con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en CO<sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.

El incremento de la acidez y disminución en el pH como se indicó en 6.1.1 fue reportado por Siriphanish y Kader (1985), en lechuga en atmósferas con 5 - 15% de CO<sub>2</sub>, pero después se presentó una tendencia opuesta para ambos parámetros. Este mismo comportamiento fue reportado en jícama a 5°C y 10% de CO<sub>2</sub> o más (Aquino-Bolaños, 2000).

En el análisis de varianza (Anexo 6), el tratamiento no fue significativo, pero el tiempo de almacenamiento y la interacción tratamiento\*tiempo sí presentaron efecto significativo ( $P > 0.0001$ ) para este parámetro, lo que significa que a exposiciones prolongadas de las papas a la atmósfera en estudio sí tendría un efecto adverso en la calidad de los tubérculos.

### 6.1.3 Sólidos solubles totales

En la Figura 16 se presenta el comportamiento de los sólidos solubles totales en ambos tratamientos. Los resultados revelan que los SST fueron menores en la atmósfera rica en  $\text{CO}_2$  en relación al control y solamente a las 72 h se presentó un valor igual. A las 120 h, los SST de las papas en la atmósfera en estudio presentó una tendencia a disminuir, en tanto que los SST en la atmósfera control fueron en aumento hasta las 72 h y, a las 120 h se mantuvo constante.



**Figura 16.** Comportamiento de los sólidos solubles totales con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en  $\text{CO}_2$  (30%) balance aire a  $7^\circ\text{C}$ .

La media de los SST en ambas atmósferas fue de  $6.0^\circ\text{Bx}$ . Es decir, no hubo diferencia marcada en la concentración de sólidos solubles totales. Lo anterior puede ser a que altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  inhiben la conversión de almidón a azúcares

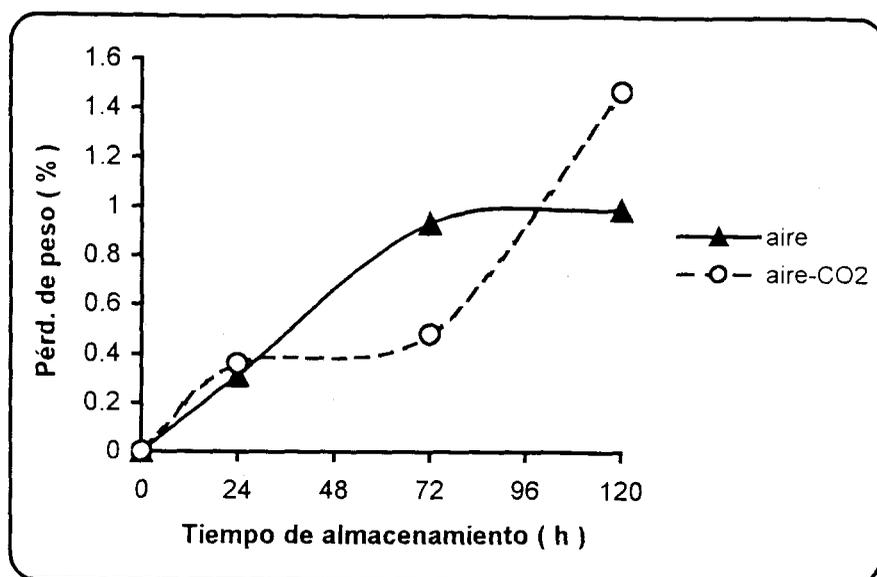
y el metabolismo de la sacarosa mediante la inactivación de la sacarosa sintetasa (SUS) (Geigenberger y Stitt, 1993); Zagory y Kader (1989), Kader (1992a), reportaron que a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> y bajas concentraciones de O<sub>2</sub> la conversión de almidón a azúcares se redujo en plátanos (fosforilasa) y papa (amilasa e invertasa). Este comportamiento es congruente con la determinación de la concentración de los azúcares reductores solubles que fue menor a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> (30%).

El tratamiento y la interacción tratamiento\*tiempo no fueron significativos para los sólidos solubles totales pero el tiempo de almacenamiento si fue significativo (Pr> 0.0001) (Anexo 6).

#### 6.1.4 Pérdida de peso

La pérdida de agua puede ser una de las principales causas del deterioro donde no solamente resulta en pérdidas cuantitativas directas (pérdida de peso) sino también en pérdidas de apariencia (marchitamiento), textura (suavización, flacidez, pérdida de dureza o crujiente y jugosidad) y calidad nutricional.

A las 24 h la pérdida de peso (Figura 17) fue similar en las papas de ambos tratamientos pero, a las 72 h la pérdida de peso fue menor en la atmósfera en estudio, esta diferencia puede ser explicada por una tasa de transpiración mas baja debido a la AC; sin embargo a las 120 h la pérdida fue mayor, posiblemente a este tiempo de almacenamiento en el tratamiento en estudio aumento la transpiración y pérdida de agua con la consecuente pérdida de peso, es decir es una reacción de estrés. Estos resultados son coincidentes con los encontrados por Makhlof y col., (1989) en Brócoli en una AC de CO<sub>2</sub> al 10-15%



**Figura 17.** Comportamiento de la pérdida de peso con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en CO<sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.

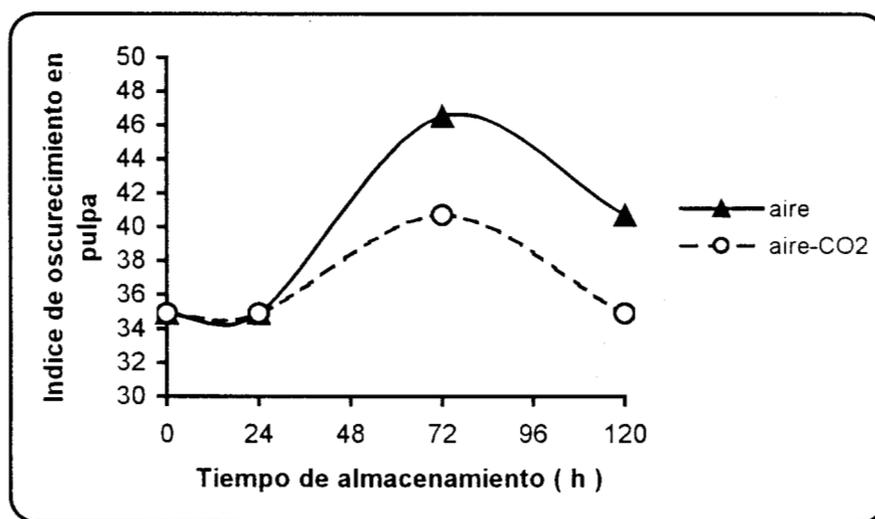
Por otra parte, Pal y Buescher (1993), encontraron que las papas cv. Russet presentaron una aceleración en la transpiración y la producción de etileno se incrementó como respuesta a una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 30% a una temperatura de  $14 \pm 1^\circ\text{C}$ . La media de la PP para las papas en el tratamiento en estudio fue de 0.66% y para la atmósfera control fue de 0.49%. La composición de la AC no influye directamente en la tasa de pérdida de agua, pero posibles efectos sobre la reducción de formación de peridermo deja este tubérculo más susceptible a pérdidas de agua (Kader, 1986).

En el análisis de varianza (Anexo 6) el tratamiento no fue significativo, mientras que el tiempo y la interacción tratamiento\*tiempo si tuvieron efecto significativo ( $P_r > 0.0001$ ) en la pérdida de peso en las papas. Los tubérculos

sometidos al tratamiento en estudio no presentaron síntomas de daño físico alguno al ser observados visualmente.

### 6.1.5 Índice de oscurecimiento en pulpa

El índice de oscurecimiento (Figura 18) en las rebanadas de las papas almacenadas en el tratamiento en estudio fue menor que el presentado en el tratamiento control durante las 120 h de almacenamiento. La media del índice de oscurecimiento para las papas sometidas al tratamiento en estudio fue de 36.54 y para el tratamiento control fue de 38.76



**Figura 18.** Comportamiento del índice de oscurecimiento en pulpa con respecto al tiempo en papas almacenadas en aire (control) y en CO<sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.

Con respecto a la tabla de ANOVA, el índice de oscurecimiento en las papas presentó diferencia significativa con respecto al tratamiento, tiempo de almacenamiento y la interacción tratamiento\*tiempo ( $P > 0.0001$ ).

El índice de oscurecimiento representa la pureza del color café y esta relacionado con los procesos donde el oscurecimiento enzimático y no enzimático tienen lugar (Buera y col., 1986; Guerrero y col., 1996; Castañón y col., 1999).

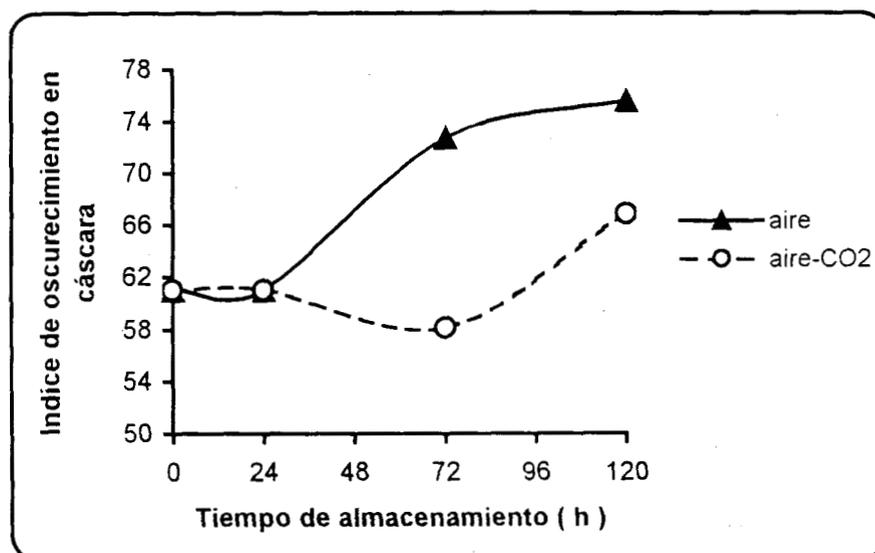
Los azúcares en las papas constituyen una pequeña fracción (2-3%) de la materia seca pero son particularmente importantes, ya que aún a estas concentraciones causan oscurecimiento de las tiras de papa durante el proceso de freído (Macrae y col., 1993). Hodge, 1953, describió dos tipos de reacciones de oscurecimiento: caramelización y aquellas basadas en las reacciones de carbonil-amino o reacción de Maillard. Durante el proceso de freído (165-170°C), el oscurecimiento solo se lleva a cabo rápidamente en presencia de aminoácidos. El desarrollo de las melanoidinas desde los compuestos carbonilo insaturados, tiene lugar a través de una serie de reacciones complejas que involucran conjugación seguida por la polimerización. La intensidad del color producido depende de la cantidad de azúcares (reductores) y aminoácidos (proteínas) presentes pero también de las reacciones químicas que desarrolla el cromóforo, el cual está afectado por el pH y temperatura (Gray y Hughes, 1978; Eskin, 1990; Whistler y Daniel, 1993).

En la papa fresca la causa del oscurecimiento enzimático es debida a la oxidación de compuestos fenólicos por la PPO. Para que se lleve a cabo ésta, deben estar presentes cuatro componentes: enzima, sustrato, oxígeno y cobre. Al estar en una AC rica en CO<sub>2</sub> se observa que hay una disminución del oscurecimiento por CO<sub>2</sub> que puede estar relacionado con la reducción de la actividad de la PPO, donde el CO<sub>2</sub> es un inhibidor competitivo de la PPO como lo demostraron Murr y Morris (1974) y puede influir en varias etapas del metabolismo fenólico (Siriphanish y Kader, 1985; Chen y col., 1992).

Se puede considerar que el oscurecimiento del tubérculo es principalmente por la oxidación de los compuestos fenólicos por la PPO, por lo que al inhibir ésta, el oscurecimiento es menor como lo indican los valores del índice de oscurecimiento. Además considerando que el pH óptimo de PAL (fenilalanina amoníaco liasa) es de 8.5, una reducción de pH podría resultar en una reducción de su actividad y por tanto una reducción en la biosíntesis de compuestos fenólicos y así contribuir a la disminución del oscurecimiento en la papa (Aquino-Bolaños, 2000).

### 6.1.6 Índice de oscurecimiento en cáscara

El índice de oscurecimiento en cáscara (Figura 19), a las 72 y 120 horas de almacenamiento los valores fueron menores para la atmósfera en estudio comparando con la atmósfera control.



**Figura 19.** Comportamiento del índice de oscurecimiento en cáscara con respecto al tiempo en las papas almacenadas en aire (control) y en CO<sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.

La media del índice de oscurecimiento para la cáscara en la atmósfera rica en CO<sub>2</sub> fue de 62.28 y para la atmósfera control fue de 66.53.

Como se indicó en 6.1.5 el oscurecimiento de la cáscara del tubérculo es principalmente por la oxidación de los compuestos fenólicos por la PPO, por lo que al inhibir ésta, el oscurecimiento es menor como lo indican los valores del índice de oscurecimiento. Por otra parte, comparando la media del índice de oscurecimiento en pulpa y cáscara, se observaron valores mas altos de oscurecimiento en cáscara, lo cual es normal ya que Patil y Zucker (1965), encontraron que la mayor concentración de PPO se localiza en las cáscara más que en pulpa.

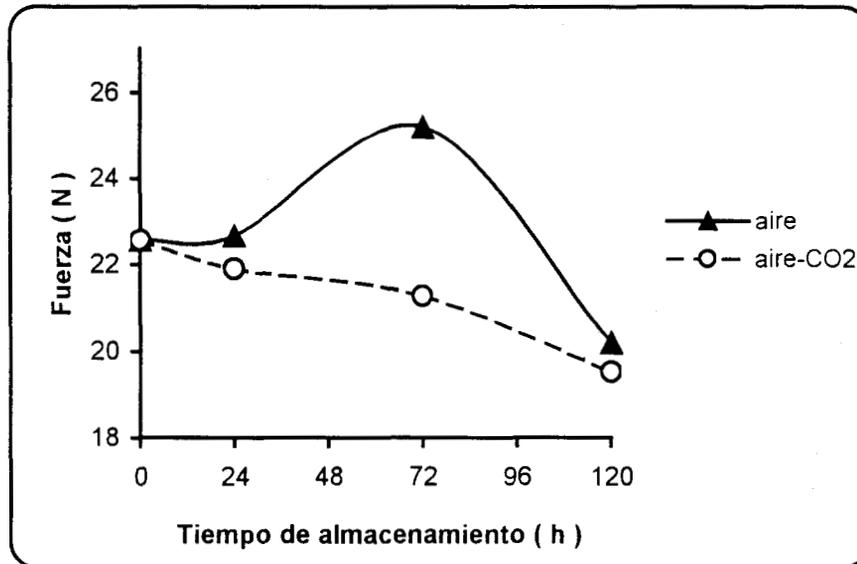
En el análisis de varianza (Anexo 6), el tratamiento, tiempo de almacenamiento y la interacción tratamiento\*tiempo no fueron significativos en el índice de oscurecimiento de la cáscara.

### 6.1.7 Textura

El ablandamiento del tejido vegetal generalmente está acompañado de la descomposición y solubilización de materiales pécticos y por el catabolismo de los polisacáridos de la pared celular (Martens y Bardseth, 1987 citado por Zagory y Kader, 1989). Las poligalacturonasas (PG) específicamente hidrolizan los enlaces  $\beta$ -D-(1,4) entre residuos galacturónicos. Estos residuos constituyen una porción estructural importante de la lamina media y su hidrólisis es ampliamente responsable del ablandamiento de las frutas y hortalizas durante su maduración y almacenamiento (Huber, 1983 citado por Zagory y Kader, 1989).

En la Figura 20 se indica el comportamiento de la textura con respecto al tiempo de almacenamiento en los dos tratamientos. La fuerza necesaria para el rompimiento de las células fue mayor para la atmósfera control que para la atmósfera

en estudio durante los cinco días, lo que significa que si hay un efecto del tratamiento en estudio a la textura de las papas almacenadas.



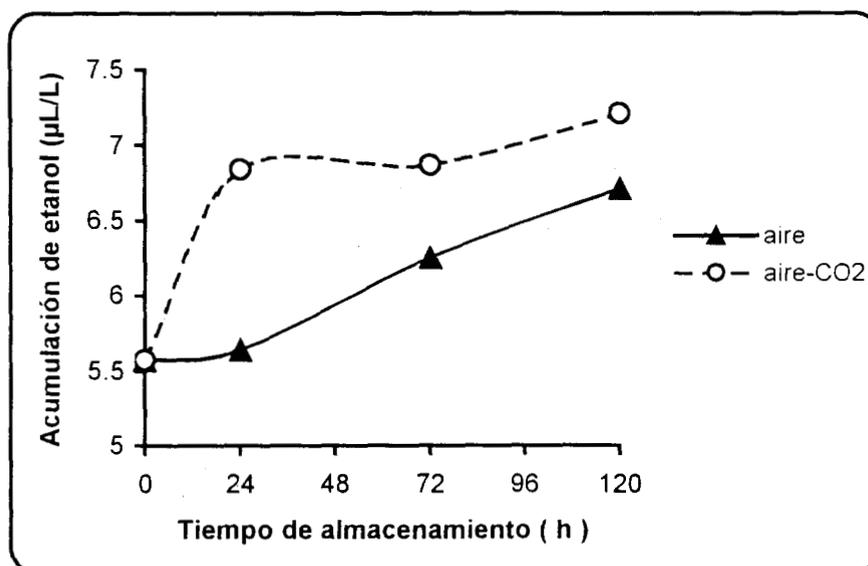
**Figura 20.** Comportamiento de la textura con respecto al tiempo en las papas almacenadas en aire (control) y en CO<sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.

La media de la fuerza para el tratamiento en estudio fue de 21.13 N, mientras que para la atmósfera control fue de 22.63 N. Lo anterior puede ser el resultado de la degradación de las sustancias pécticas en la lamina media por exposición de los tubérculos a alta concentración de CO<sub>2</sub>. Lipton y Harris, 1974, encontraron que brócoli almacenado a 5°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 10% presentó mayor ablandamiento que brócoli conservado en aire. Este ablandamiento parece estar relacionado con incrementos de CO<sub>2</sub> en el pH del tejido. Hay poca información sobre el mecanismo de los efectos del CO<sub>2</sub> sobre la textura en hortalizas (Kader, 1986; Zagory y Kader, 1989).

El análisis de varianza (Anexo 6) mostró que el tratamiento, tiempo de almacenamiento y la interacción tratamiento\*tiempo presentaron efecto significativo ( $P > 0.0001$ ) con respecto a la textura.

### 6.1.8 Acumulación de etanol

Elevadas concentraciones de  $\text{CO}_2$  reducen la tasa de respiración de frutas y hortalizas frescas, pero según el producto hortícola y la concentración de  $\text{O}_2$ . A concentraciones de  $\text{CO}_2$  superiores al 20% puede dar lugar a la respiración anaerobia con la consiguiente acumulación de acetaldehído y etanol y, finalmente el desarrollo de sabores extraños y descomposición del tejido (Kader, 1986).



**Figura 21.** Comportamiento de la acumulación de etanol con respecto al tiempo en las papas almacenadas en aire (control) y en  $\text{CO}_2$  (30%) balance aire a  $7^\circ\text{C}$ .

Como se observa en la gráfica (Figura 21), la acumulación de etanol a las 24, 72 y 120 h fue mayor para las papas almacenadas en la atmósfera en estudio que en aquéllas del tratamiento control, siendo el intervalo de valores de 5.57 a 7.21  $\mu\text{L/L}$  y, de 5.57 a 6.71  $\mu\text{L/L}$  respectivamente.

Con respecto al análisis de varianza (Anexo 6) se observa que para la acumulación de etanol, el tratamiento no presentó efecto significativo, pero si lo fue para el tiempo ( $P > 0.0001$ ) y no lo fue para la interacción del tratamiento con respecto al tiempo. La media de la acumulación de etanol para el almacenamiento de las papas en aire fue de 6.047  $\mu\text{L/L}$  y de 6.588  $\mu\text{L/L}$  para el almacenamiento de las papas en  $\text{CO}_2$  al 30% balance aire.

Este aumento de etanol puede ser por una mayor actividad de la enzima piruvato descarboxilasa (PDC) bajo condiciones anaeróbicas y puede estar regulando el flujo de carbono hacia etanol y a un pH óptimo de la enzima de 6.1- 6.6; y además bajo estas condiciones se presenta un incremento de NAD que ocasiona una baja en el pH del citoplasma debido a una acumulación inicial de ácidos orgánicos. Estos resultados coinciden con los estudios realizados por Chan y col. (1983), con camote en una atmósfera saturada de  $\text{CO}_2$  durante 48 horas. Este aumento de etanol se confirma con la baja de sólidos solubles totales (azúcares), los cuales son sustrato tanto de la respiración aeróbica como anaeróbica (Figura 16).

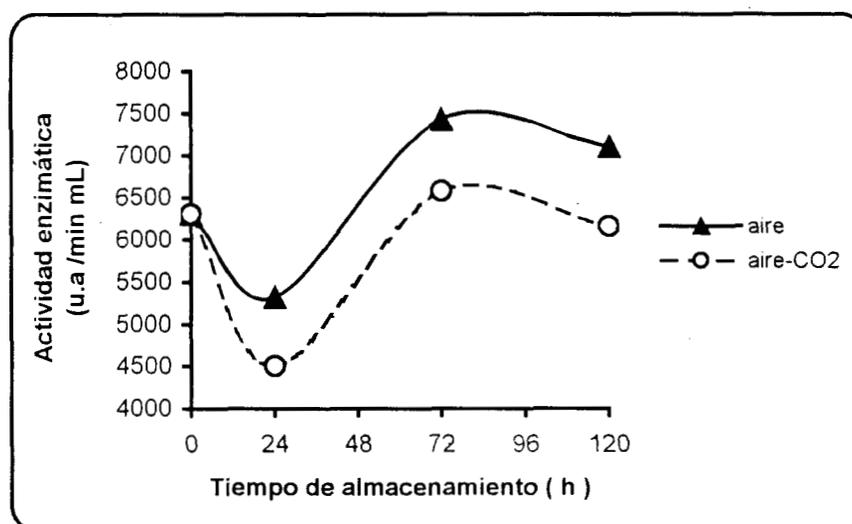
Por otra parte, la mayoría de las frutas y hortalizas sintetizan diversos y variados volátiles de bajo peso molecular (inferior a 250) a temperatura ambiente, éstos son los responsables de las características aromáticas de las frutas y en menor grado de las hortalizas. Estos compuestos son generalmente estéres, alcoholes y sustancias provistas de grupos carbonilo (aldehídos y cetonas). Muchos de ellos como el etanol, son comunes en todas las frutas y hortalizas (Wills y col, 1992). Por lo anterior, es normal que se hayan encontrado cantidades mínimas de etanol en las papas almacenadas en aire y en las papas almacenadas en la atmósfera rica en

CO<sub>2</sub>, a temperatura de 7°C±1°C; además la apariencia externa e interna no presentó síntomas de alteración.

Niveles tóxicos de etanol, aunque sujetos a controversia, son de 2 800 μL/L en semillas de chícharo y > 4600 μL/L en una gran variedad de tejidos (Jackson y col., 1982). Altos niveles de etanol en el producto, indican una respiración anaeróbica con la consecuente disminución de la calidad y rechazo del consumidor.

### 6.1.9 Actividad enzimática de la PPO

En la Figura 22, se observa que a las 24, 72 y 120 h, la actividad de la PPO en las papas almacenadas en la AC fue menor que aquella presentada en el tratamiento control. Es decir, la alta concentración de CO<sub>2</sub> ocasionó una disminución de la actividad de la polifenoloxidasas.



**Figura 22.** Comportamiento de la actividad de PPO con respecto al tiempo en las papas almacenadas en aire (control) y en CO<sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C

Buescher y Henderson (1977), encontraron que  $\text{CO}_2$  al 10-30 % retardó el oscurecimiento del tejido con daño mecánico en ejotes por reducción del contenido fenólico, actividad de la fenolasa y oxidación de fenólicos. El efecto de elevado  $\text{CO}_2$  sobre la inhibición de la producción de fenólicos y actividad de la polifenoloxidasas también se observó en el tejido de lechuga y de jícama (Siriphanich y Kader, 1985; Aquino-Bolaños y col., 2000).

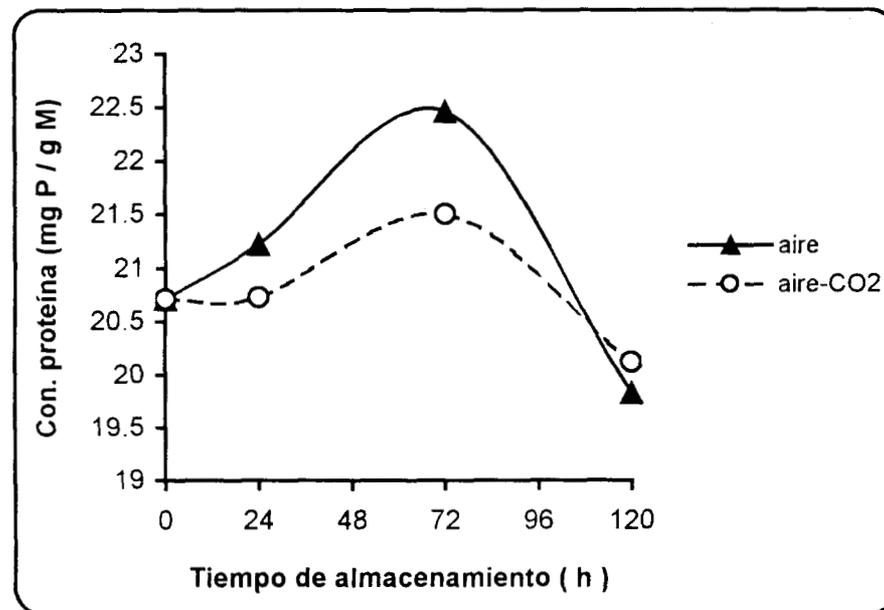
Weder y col. (1992), propusieron que la papa a altas presiones de  $\text{CO}_2$  en condiciones normales, la caída de pH provoca un cambio en la estructura de la enzima, exponiendo el residuo de arginina, por lo que se facilita la formación de un complejo de carbamato. En adición al efecto de la reducción del pH, el  $\text{CO}_2$  al unirse a las moléculas de enzima las desnaturaliza y causa la pérdida de la función catalítica; complementario a lo anterior, sería de acuerdo a los estudios cinéticos de Janovitz-Klapp (1990) que la PPO se une primero con el  $\text{O}_2$  y después con el compuesto fenólico como sustrato (E- $\text{O}_2$ -Ph), en este caso al tener un ambiente de  $\text{CO}_2$ , ausencia de  $\text{O}_2$ , caída de pH; la enzima se enlaza con el  $\text{CO}_2$  y cambia su estructura, formando el carbamato, entonces el  $\text{CO}_2$  es un inhibidor competitivo del compuesto fenólico. Por otra parte, considerando las figura 17 y 18, que indican el índice de oscurecimiento en pulpa y cáscara respectivamente, se observa que hay una disminución del oscurecimiento por  $\text{CO}_2$  que puede estar relacionado con la reducción de la actividad de la PPO, donde el  $\text{CO}_2$  es un inhibidor competitivo de la PPO como lo demostró Murr y Morris (1974). Además a bajas temperaturas de 0-4°C, el  $\text{CO}_2$  es más soluble en agua que a temperaturas de 20-22°C, por lo que su efecto inhibitorio sobre la PPO es mayor (Knoche, 1980) y por tanto, el oscurecimiento enzimático es menor.

En el análisis de varianza para la actividad de la PPO (Anexo 6), se observó que el tratamiento y el tiempo presentaron efecto significativo ( $P > 0.0001$ ), mientras que la interacción tratamiento\*tiempo no lo fue. La media de la actividad enzimática para las papas almacenadas en aire fue de 6555.3 u.a. y la media para las papas

almacenadas en la atmósfera rica en  $\text{CO}_2$  fue de 5887.2 u.a. Como se observa la media de la actividad de la PPO fue mayor para las papas almacenadas en aire (control), lo que confirma que el  $\text{CO}_2$  tiene un efecto inhibitorio en la actividad de la PPO.

### 6.1.10 Concentración de proteína

El comportamiento de la concentración de proteína en los tubérculos sometidos al tratamiento-control y a la atmósfera en estudio almacenados durante 120 h a  $7^\circ\text{C}$ , se observa en la Figura 23.



**Figura 23.** Comportamiento de la concentración de proteína con respecto al tiempo en las papas almacenadas en aire (control) y en  $\text{CO}_2$  (30%) balance aire a  $7^\circ\text{C}$ .

En ella se puede analizar que la concentración de proteína a las 24 y 72 h fue menor en las papas almacenadas en la AC en estudio comparadas con las papas almacenadas en el tratamiento control, mientras a las 120 h, las papas almacenadas en la AC presentaron una concentración de proteína ligeramente mayor que la concentración de proteína en las papas del tratamiento-control.

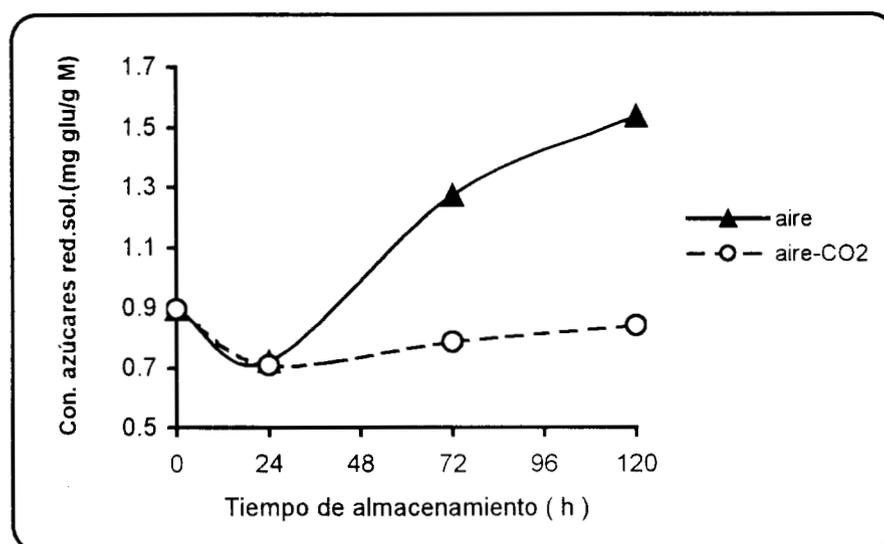
Kerbel y col. (1988, citado por Zagory y Kader, 1989), encontraron que  $\text{CO}_2$  al 10% disminuyó el contenido de proteína y fructosa 1,6-bi-fosfato y las actividades de ATP-fosfofructoquinasa y PPI-fosfofructoquinasa mientras que los niveles de fructosa 6-fosfato y fructosa 2,6 bi-fosfato se incrementaron, por lo que concluyeron que hubo una reducción de la respiración debido al efecto inhibitorio de alta concentración de  $\text{CO}_2$ . Por otra parte, Carrillo y Yahia (1990), reportaron que el aguacate var. Hass sometido a una atmósfera insecticida de  $\text{CO}_2$  (60%), presentó una disminución de la velocidad de biosíntesis de proteínas, a causa de los bajos niveles de ATP debido a las condiciones anaeróbicas de la atmósfera modificada (AM).

Con respecto al análisis de varianza (Anexo 6) para la concentración de proteínas, el tratamiento no fue significativo, el tiempo presentó efecto significativo ( $\text{Pr} > 0.0001$ ) y la interacción tratamiento\*tiempo no lo fue. La media de la concentración de proteína para las papas en el tratamiento-control fue de 21.059 mg prot/g M (2.10%), mientras que para los tubérculos en la AC en estudio fue de 20.771 mg prot/g M (2.07%). Se observa que la media de la concentración de proteína fue ligeramente mayor para las papas almacenadas en aire (control).

Por lo anterior, se puede considerar que las papas sometidas a una atmósfera rica en  $\text{CO}_2$  (30%) realmente no presentaron reducción en la biosíntesis de proteína por efecto del  $\text{CO}_2$  o cambio de temperatura (de temperatura ambiente a  $7^\circ\text{C}$ ). Lo anterior se confirma con el análisis de varianza.

### 6.1.11 Concentración de azúcares reductores solubles

Cuando las papas se refrigeran para su conservación o para evitar su germinación, se induce la formación de sacarosa, glucosa y fructosa; estos azúcares confieren un sabor dulce y una textura defectuosa, lo que trae como consecuencia que las papas no puedan emplearse para el freído o la deshidratación debido a que favorecen las reacciones de oscurecimiento, propio de las reacciones de Maillard (Macrae y col., 1993; Haard, 1993).



**Figura 24.** Comportamiento de la concentración de azúcares reductores solubles con respecto al tiempo en las papas almacenadas en aire (control) y en CO<sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.

La concentración de azúcares en papa varía con el tiempo y condiciones de almacenamiento y cultivar. En general, el peso del tubérculo y contenido de almidón

disminuyen, mientras el contenido de sacarosa se incrementa (Takahata y col., 1995).

Se ha reportado que bajas concentraciones de O<sub>2</sub> y altas concentraciones de CO<sub>2</sub> disminuye la conversión de almidón a azúcares consecuentemente, inhibe el desarrollo de sabores dulces que no son deseables en papas, chícharos y maíz tierno (Zagory y Kader, 1989).

En la Figura 24, se observa la concentración de azúcares reductores solubles en las papas sometidas al tratamiento control (aire) y al tratamiento de la atmósfera rica en CO<sub>2</sub> (30%) almacenadas a 7°C durante 120 h. A las 24 h, las papas en ambos tratamientos presentaron la misma concentración de azúcares reductores solubles, pero a las 72 h y 120 h la concentración de azúcares reductores solubles en los tubérculos fue menor en la AC que en el tratamiento control. Es decir, la composición de la AC ocasionó una disminución en la formación de azúcares reductores.

En el análisis de varianza (Anexo 6) para la concentración de azúcares reductores solubles, el tratamiento, el tiempo y la interacción tratamiento\*tiempo presentaron efecto significativo ( $P < 0.0001$ ). La media de los azúcares reductores solubles para las papas almacenadas en aire fue de 1.1074 mg glucosa/g M y la media para las papas almacenadas en la atmósfera rica en CO<sub>2</sub> fue de 0.8081 mg glucosa/g M. Como se observa la media de los azúcares reductores solubles fue mayor para las papas almacenadas en aire (control). Esta reducción de azúcares reductores solubles posiblemente sea porque altas concentraciones de CO<sub>2</sub> disminuyeron el metabolismo de la sacarosa. La reducción de almidón a dextrinas y del metabolismo de la sacarosa, posiblemente es por que hay una inhibición de la  $\alpha$  amilasa, glucoamilasa y de la sacarosa sintetasa (SUS), ésta última cataliza una reacción reversible *in vivo* en tubérculos de papa (Bidwell, 1990; Geigenberger y Stitt, 1993)

El mecanismo *in vivo* de la conversión de almidón a sacarosa en los tejidos de los vegetales aún no ha sido conocido con detalle (Beck y Ziegler, 1989).

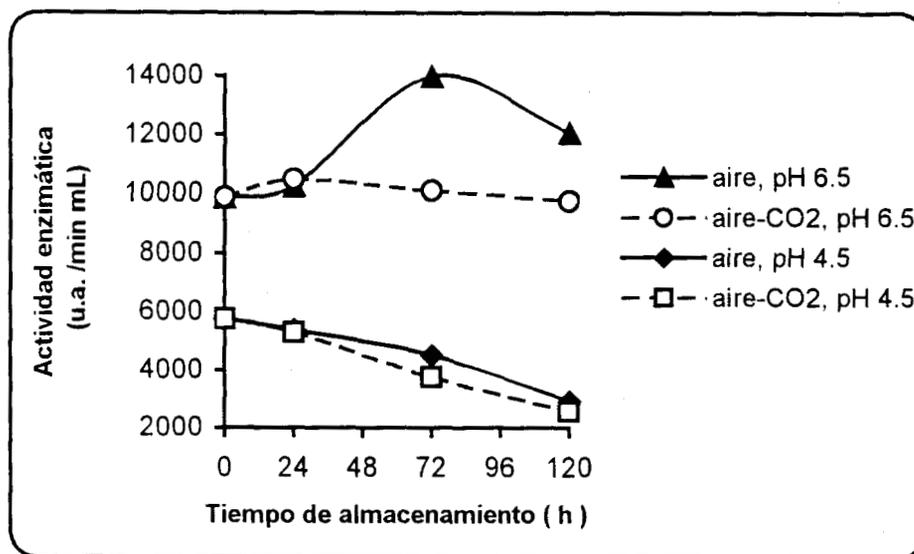
## 6.2 SISTEMA MODELO A PARTIR DE EXTRACTO CRUDO DE PAPA.

Con relación a las medias de la actividad enzimática de la PPO, concentración de proteína y de azúcares reductores solubles en el sistema modelo del extracto de papa para los niveles de pH de 6.5 y 4.5 confundiendo el tratamiento, se observó que los valores más bajos para estos tres parámetros fue para el nivel de 4.5, es decir, a este pH las características no son las adecuadas para la actividad de la PPO (pH de 5.9, valor en el cual la enzima presentó su máxima actividad), concentración de proteína y conversión de almidón a azúcares reductores. Los niveles de pH se seleccionaron considerando que el pH óptimo de la enzima esta en el intervalo de 5 a 7 según el cultivar y prácticas de cultivo y a pH de 4 la enzima pierde su actividad catalítica.

### 6.2.1 Actividad enzimática de la PPO

En la Figura 25, se observa que para el pH de 6.5, la PPO presentó su máxima actividad en el tratamiento control a las 72 horas de almacenamiento a 7°C y posteriormente a las 120 h disminuyó la actividad. por otra parte en el tratamiento en estudio a este mismo pH, la atmósfera rica en CO<sub>2</sub> (30%) tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad de la PPO. Ésta presentó un ligero aumento a las 24 h y posteriormente disminuyó por lo que hubo un efecto significativo del tratamiento en estudio. Debido a la atmósfera rica en CO<sub>2</sub>, hubo una reducción del pH, entonces la arginina de la proteína interaccionó con el CO<sub>2</sub>, formando un carbamato. Consecuentemente, en adición a su efecto de reducción de pH, el CO<sub>2</sub> pudo

directamente enlazar moléculas de la enzima, desnaturalizarlas y causar pérdida de la función catalítica (Weder y col., 1992).



**Figuras 25.** Comportamiento de la actividad enzimática de PPO con respecto al tiempo en el extracto crudo de papa a pH de 6.5 y 4.5 almacenado en aire (control) y en CO<sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.

En el extracto con pH 4.5, la actividad de la PPO tanto para la atmósfera control como para la atmósfera en estudio fue disminuyendo durante las 120 h de almacenamiento. En la atmósfera control los valores de actividad fueron ligeramente mayores a los obtenidos en la atmósfera en estudio, es decir aún a pH 4.5 que no es el adecuado de la enzima (Langdon, 1987; Zawistowski y col., 1991), altas concentraciones de CO<sub>2</sub> tuvieron un efecto inhibitorio sobre la actividad de la PPO. Sin embargo, el efecto inhibitorio más importante fue a pH 4.5, debido a que este valor está alejado del pH óptimo de la actividad para esta enzima.

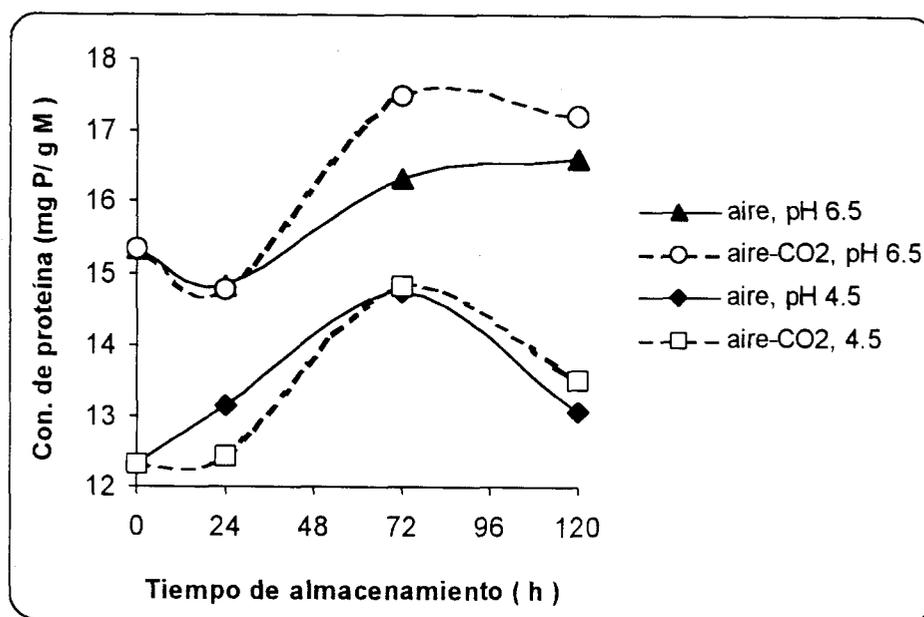
El análisis de varianza (Anexo 9), el tratamiento, tiempo de almacenamiento, pH y la interacción tratamiento\*tiempo\*pH tuvieron efecto significativo ( $Pr > 0.0001$ ) sobre la actividad enzimática. El efecto del  $CO_2$  fue más drástico en el sistema modelo del extracto crudo de papa, lo cual puede ser debido a que la enzima en el extracto crudo está expuesta directamente a la atmósfera en estudio durante el almacenamiento mientras, que la PPO en las papas enteras almacenadas en el  $CO_2$  están en los amiloplastos, por lo que su comportamiento es diferente, ya que el intercambio de gases es únicamente a través de las lenticelas (Burton, 1978; Zagory y Kader, 1988; Macrae y col., 1993). Además el pH óptimo de la PPO en papa Russet fue de 6.1 (Chen y col., 1992). En este estudio, la mayor actividad de la PPO, fue a las 72 h con un pH 5.93 en las papas cv. Alpha no tratadas y de 5.94 para las papas tratadas con la atmósfera de elevado  $CO_2$  (estos valores son las medias del pH de los extractos de papa para las 72 horas).

La actividad de la PPO fue menor en las papas almacenadas en la atmósfera rica en  $CO_2$ , que la actividad de la PPO en el sistema modelo. Es de señalar que algunas veces los resultados obtenidos en los sistemas modelo no predicen completamente el comportamiento en cuestión dentro del tejido vegetal, ya que este es un sistema biológico muy complejo (Lacroix y Castaigne, 1984). Y en el caso de las papas enteras el tratamiento en estudio se realizó *in vivo* y en el sistema modelo *in vitro*.

### 6.2.2 Concentración de proteína

Muchas de las propiedades funcionales y fisicoquímicas de macromoléculas, entre ellas las proteínas son estudiadas en sistemas modelo, donde las condiciones estructurales y experimentales son diferentes a aquéllas presentes en los tejidos vegetales, las cuales están incorporadas a sistemas complejos.

En comportamiento de la concentración de proteína a pH 6.5 y 4.5 en la atmósfera control y la atmósfera rica en CO<sub>2</sub> (30%) en el sistema modelo del extracto crudo almacenado a 7°C durante 120 h; se presentó (Figura 26), que la concentración de proteína fue mayor en el extracto crudo a pH 6.5 tanto para el tratamiento control como para la atmósfera en estudio comparando con la concentración de proteína en el extracto crudo a pH 4.5 en ambos tratamientos.



**Figura 26.** Comportamiento de la concentración de proteína con respecto al tiempo en el extracto crudo de papa a pH de 6.5 y 4.5 almacenado en aire (control) y en CO<sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.

Con respecto a la concentración de proteína en el extracto crudo a pH 6.5 en el tratamiento en estudio no presentó diferencia significativa con respecto a la concentración presentada en el control.

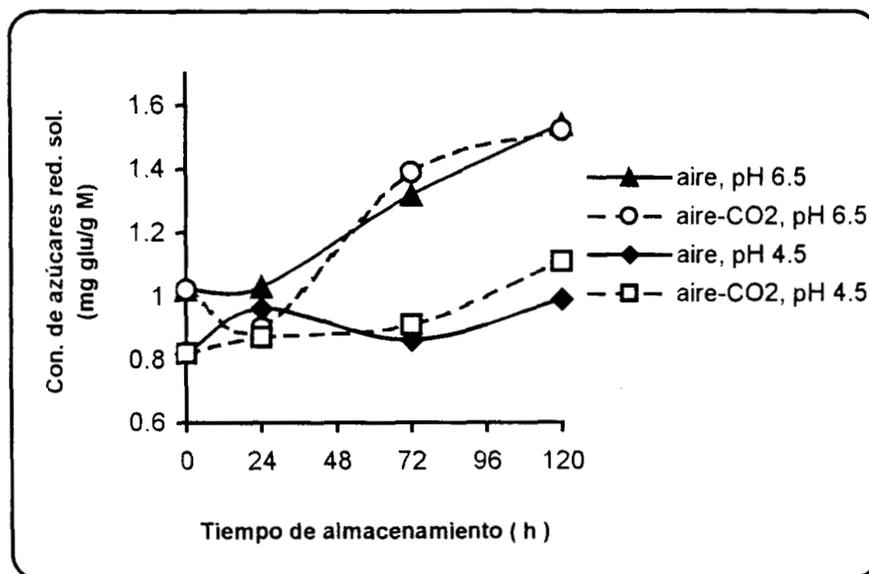
La concentración de proteína en el extracto crudo con pH 4.5 no presentó gran diferencia con respecto al tratamiento en estudio y el tratamiento control. La baja concentración de proteína en el extracto crudo a pH 4.5 presentada en ambos tratamientos, posiblemente se deba a la desnaturalización de las proteínas debido al pH adverso y sobre todo a que los resultados obtenidos en los sistemas modelo (*in vitro*) a menudo no predicen adecuadamente el comportamiento en productos hortícolas reales preparados bajo condiciones de proceso industrial (Smith, 1991).

Por otra parte, las concentraciones de proteína en las papas frescas almacenadas en la atmósfera en estudio fueron ligeramente mayores que las concentraciones encontradas en el sistema modelo. Estos últimos son de composición simple en comparación con los sistemas biológicos (*in vivo*) que son de naturaleza muy compleja, donde muchos factores afectan las relaciones entre las diferentes propiedades funcionales (Lacroix y Castaigne, 1984, Jiménez –Colmenero y Borderías, 1983).

Con respecto al análisis de varianza (Anexo 9), El tratamiento no fue significativo para el extracto crudo, pero el pH y el tiempo de almacenamiento presentaron efecto significativo ( $Pr > 0.0001$ ) y la interacción tratamiento-tiempo-pH no lo fue.

### 6.2.3 Concentración de azúcares reductores solubles

En la Figura 27, se observa el comportamiento de la concentración de azúcares reductores solubles en el extracto crudo de papa sometido al tratamiento control (aire) y al tratamiento de la atmósfera rica en  $CO_2$  (30%) almacenado a  $7^\circ C$  durante 120 h.



**Figura 27.** Comportamiento de la concentración de azúcares reductores solubles con respecto al tiempo en el extracto crudo de papa a pH de 6.5 y 4.5 almacenado en aire (control) y en CO<sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C.

Durante las 120 h de almacenamiento la concentración de azúcares reductores solubles fue en aumento para ambos niveles de pH y tanto para el tratamiento control como el tratamiento en estudio. Es decir, la atmósfera en estudio no tuvo un efecto inhibitorio en la formación de azúcares reductores solubles para ambos niveles de pH.

A las 24 h, el extracto crudo sometido a pH 6.5 y 4.5 en el tratamiento control presentó valores muy cercanos y más elevados que los valores presentados en la atmósfera en estudio. A las 72 h, la concentración de azúcares reductores solubles fue mayor para la atmósfera en estudio a pH 6.5 que para el tratamiento control y también fue mayor para el tratamiento en estudio a pH 4.5. A las 120 h, la concentración de azúcares reductores solubles fue mayor para el tratamiento control

y en estudio a pH 6.5 que a pH 4.5. La AC no tuvo efecto sobre la formación de azúcares reductores solubles en el sistema modelo del extracto crudo de papa como lo fue en el caso de las papas enteras, en el cual hubo una reducción de la concentración de azúcares reductores durante las 120 h de almacenamiento. Con respecto al pH, si hubo diferencia significativa en la concentración azúcares reductores solubles, siendo mayores los valores a pH 6.5 durante las 120 h de almacenamiento.

En el análisis de varianza (Anexo 9), para la concentración de azúcares reductores solubles en el sistema modelo de extracto crudo; el tratamiento no fue significativo, mientras que el pH, el tiempo de almacenamiento y la interacción tratamiento-tiempo-pH si fueron significativos ( $P > 0.0001$ ).

En el tratamiento en estudio a pH 6.5, se observó que independientemente de la alta concentración de  $CO_2$ , se continuó con la conversión de almidón a azúcares entre ellos la formación de azúcares reductores, es decir el tratamiento no fue significativo en este sistema modelo. lo que pudo deberse a que el  $CO_2$  se aplicó a extractos de papa, es decir *in vitro* y, por lo tanto, éstos no tienen el mismo comportamiento que las papas que son organismos vivos con sistemas biológicos complejos, mientras que el pH 4.5 pudo haber favorecido la hidrólisis ácida de la sacarosa.

Se ha visto que en los Sistemas Modelo, la velocidad de oscurecimiento en las tiras de papa durante el freído, es dependiente del N- $\alpha$  Amino (aminoácidos endógenos) y no de los azúcares, no obstante en la práctica N- $\alpha$  Amino es raramente limitante y generalmente no determina la velocidad de reacción o el color desarrollado. Como resultado la cantidad de color es ampliamente dependiente sobre la cantidad de azúcares reductores presentes (Schallenberger y col., 1959, citado por Gray y Hughes, 1978; Barichelo y Yada, 1991) excepto a altas temperaturas cuando la hidrólisis de la sacarosa se presenta y el contenido de disacáridos es entonces

importante. Sin embargo, la correlación entre oscurecimiento y contenido de azúcares reductores varía considerablemente. Otros investigadores atribuyen estas variaciones al N amino sin tomar en cuenta los cambios en el contenido de azúcares reductores solubles.

Se ha reportado que con pequeñas cantidades de ácido o el incremento de la temperatura pueden provocar la hidrólisis de la sacarosa y liberar D-glucosa y D-fructosa participando la invertasa o sacarosa sintetasa, esta última cataliza una reacción reversible *in vivo* en tubérculos de papa (Bidwell, 1990; Geigenberger y Stitt, 1993). Estos azúcares reductores interaccionan con las proteínas (aminas) presentes dando lugar a las reacciones de Maillard las cuales son las que se presentan en el freído de las papas (Haard, 1993; Macrae y col, 1993).

En este caso la hidrólisis de la sacarosa puede estar influenciada por el pH ácido (4.5) del tratamiento y CO<sub>2</sub>.

## **7. CONCLUSIONES**

pH, acidez titulable, sólidos solubles totales, pérdida de peso en las papas almacenadas en la atmósfera rica en CO<sub>2</sub> no presentaron diferencia significativa con respecto a la atmósfera control, en cambio el tiempo si afectó significativamente a estas variables. Lo anterior se debe al proceso normal de deterioro (senescencia) de este producto hortícola.

Por tanto, las papas cv. Alpha pueden almacenarse durante 120 horas en una atmósfera rica en CO<sub>2</sub> sin afectar la calidad en forma significativa.

Con respecto a la acumulación de etanol, la composición de la AC no afectó significativamente, pero si el tiempo. La acumulación de etanol promedio en las papas almacenadas en la AC rica en CO<sub>2</sub> estuvo dentro de los intervalos normales que presentan las frutas y hortalizas como componentes aromáticos. En el caso de la firmeza (textura) presentada en las papas almacenadas en la AC, el tratamiento y tiempo fueron significativos.

Las papas almacenadas durante 120 horas en una atmósfera rica en CO<sub>2</sub> a 7°C presentaron una reducción en la actividad de la PPO, formación de azúcares reductores solubles y en el índice de oscurecimiento. Por lo que la AC rica en CO<sub>2</sub> puede ser una alternativa para inhibir el oscurecimiento enzimático y formación de azúcares reductores solubles, manteniendo la calidad comercial de este tubérculo.

En el sistema modelo de extracto crudo de papa variedad Alpha almacenado durante 120 horas en la atmósfera rica en CO<sub>2</sub>, presentó una reducción en la actividad de la PPO, sin afectar la concentración de la proteína, tanto a pH 6.5 como 4.5, es decir, el CO<sub>2</sub> (30%) tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad de la PPO a los dos niveles de pH estudiados. Sin embargo, la formación de azúcares reductores fue en aumento durante las 120 horas de almacenamiento a 7°C, para ambos niveles de pH, lo que pudo deberse a que el CO<sub>2</sub> se aplicó a extractos de papa, es decir *in vitro* y, por lo tanto, éstos no tienen el mismo comportamiento que las papas que son

organismos vivos con sistemas biológicos complejos. Por otra parte, el pH 4.5 y la difusión del CO<sub>2</sub> (baja el pH) pudieron haber favorecido la hidrólisis ácida de la sacarosa.

A pH 6.5, se obtuvo la mayor concentración de proteína y actividad enzimática, por lo que se concluye que, éste sería el pH óptimo de la PPO para papa cv. Alpha procedente de Los Mochis, Sin. El pH 4.5 tuvo efecto inhibitorio en la actividad de la PPO, aunque no del todo.

La atmósfera rica en CO<sub>2</sub> (30%) no tuvo un efecto inhibitorio sobre la formación de azúcares reductores en el sistema modelo de extracto crudo de papa como sucedió con las papas enteras almacenadas en esta AC durante los 120 horas de almacenamiento a 7°C.

El extracto crudo de papa a pH 6.5 almacenado en una AC rica en CO<sub>2</sub>, presentó un efecto inhibitorio en la actividad de la PPO sin afectar la concentración de proteína, por lo cual la AC rica en CO<sub>2</sub> puede ser una alternativa para inhibir el oscurecimiento enzimático en extractos de papa a pH 6.5.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

- Aquino-Bolaños, E. N., Cantwell, M. I., Peiser, G. y Mercado-Silva, E. 2000. Changes in the quality of fresh-cut jicama in relation to storage temperatures and controlled atmospheres. *J. Food Sci.* (65) 7: 1238-1243.
- Banks, N.H. 1985. Coating and modified atmosphere effects on potato tuber greening. *J. Agric. Sci.* 105; 59-62.
- Barichello, V. y Yada, R. Y. 1991. Starch properties of various potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars susceptible and resistant to low -temperature sweetening. *J. Sci. Food Agric.* 56: 385-397.
- Beck, E. y Ziegler, P. 1989. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40: 95-117.
- Bidwell, R. G. 1990. Respiración. En: *Fisiología vegetal*, AGT Editor, S. A., México. 117-120, 129 -131, 245-246.
- Buera, M. P., Lozano, R. D. y Petriella, C. 1986. Definition of color in the non enzymatic browning process, *Die Farbe* 32/33: 318-322.
- Buescher, R. W. y Brown, H. 1979. Regulation of frozen snap bean quality by postharvest holding in carbon-dioxide enriched atmospheres. *J. Food Sci.* 44: 1494-1497.
- Buescher, R. W. y Henderson, J. 1977. Reducing discoloration and quality deterioration in snap beans (*Pasheolus vulgaris*) by atmospheres enriched with CO<sub>2</sub>. *Acta Hort.*, 62: 55.
- Burton, W. G. 1978. The physics and physiology, En: *The potato crop*, Harris, P.M., Chapman & Hall Ltd., Londres, Inglaterra, 544-603.

- Carrillo, L. A. y Yahia, E. M. 1990. Tolerancia del aguacate var. Hass a niveles insecticidas de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> y el efecto sobre la respiración anaerobia. *Tec. Aliment.*, 26, 13-18.
- Castañón, X., Lopez-Malo, A. , y Argaiiz, A., 1999. Effect of storage temperature on the microbial and color stability of banana purees prepared with the addition of vanillin or potassium sorbate. *Food Sci. Technol. Int.*, 5(8): 51-58.
- Chang, L. A., Hammet, L. K. y Pharr, D. M. 1983. Carbon dioxide effects on ethanol production, pyruvate decarboxylase, and alcohol dehydrogenase activities in anaerobic sweet potato roots. *Plant Physiol.* 71: 59-62.
- Chen, J. S., Balaban, M. O., Wei, Ch., Marshall, M. R. y Hsu, W. Y. 1992. Inactivation of polyphenol oxidase by high-pressure carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.*, 40 : 2345-2349.
- Davies, D. D., Davies, S. 1972. Purification and properties of L (+) Lactato dehydrogenase from potato tubers. *Biochem. J.* 129: 831-839.
- Davies, D. D., Patil, K. D. Ugochukwu, E. N., Towers, G. H. N. 1973. Aliphatic alcohol dehydrogenases from potato tubers. *Phytochem.* 12: 523-530.
- Edwards, M. 1999. Vegetables and Fruit. En: *Food texture, measurement and perception*, A. J. Rosenthal, Aspen Publishers, Inc., Maryland, EUA. 259-278.
- Eskin, N. A. M. 1990. Biochemical changes in raw foods: fruits and vegetables. En: *Biochemistry of foods*. Academic Press, Nueva York, EUA. 69 -79.
- Estabrook , R. W. 1967. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP-O ratios. *Methods in Enzymology*, 10: 41-47.

- FDA. 1986. Chemical preservatives. Food and drug admin. code of fed. regulation, title 21, part 182, part 101.
- Flurkey, W. H. e Ingebrigtsen, J. 1989. polyphenol oxidase and enzymatic browning in mushrooms. En: *Quality factors of fruits and vegetables, chemistry and technology*. Jen, J. J. American Chemical Society, Washington, D.C., EUA, 44-54.
- Garza, O. S.1992. Manejo postcosecha de hortalizas de hoja, raíz y tallo. En : *Fisiología y tecnología postcosecha de productos hortícolas*, Yahia, E. y Higuera, I. Ed. Limusa, México. 229-237.
- Geigenberger, P., Stitt, M. 1993. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta*, **189**: 329 -339.
- Golan-Goldhirsh, A. y Whitaker, J. R. 1984. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite, and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **32**: (5) 1003-1009.
- González-Aguilar, G. A., Fortiz, J., Cruz, R. y Báez, R. 1999. Atmósferas modificadas y controladas. Una alternativa como tratamiento cuarentenario en frutas tropicales y subtropicales. En: *Requerimientos de tratamientos cuarentenarios en frutas tropicales y subtropicales*, Saucedo, V. C. y Baez, S. R., (CYTED-CONACYT), México. 1-9.
- Gordon, H. R. y Barden, J. A. 1992. Horticultura propiamente dicha, En: *Horticultura*, AGT Editor, S.A. México. 520-524.

- Gornall, A.G., Bardawill, Ch.J. y David, M.M. 1948. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 751-767.
- Gray, D. y Hughes, J.C. 1978. Tuber quality, En: *The potato crop*, Harris, P.M., Chapman & Hall Ltd., Londres, Inglaterra, 505-544.
- Guerrero, S. , Alzamora, S. M. y Gerschenson, L. N. 1996. Optimization of a combined factors technology for preserving banana puree to minimize colour changes using response surface methodology. *J. Food Eng.* **28**: 307-322.
- Haard, N. F. 1993. Características de los tejidos vegetales. En: *Química de alimentos*, Fennema, O. R. , Editorial Acribia, S. A. , Zaragoza, España, 961-967, 994-996.
- Hammer, F.E. 1993. Oxidoreductases. En: *Enzymes in food processing*, Nagodawithana T., Academic Press, Inc. , California, EUA. 221-233.
- Hardenburg, R.E. Watada, A. E. y Wang, C.Y. 1986. The commercial storage on fruits, vegetables, and florist y nursery stocks. En: *United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Agricultural Handbook No. 66*, 26-30, 64, 80 y 104.
- Harper, W.J. 1984. Model food system approaches for evaluating whey protein functionality, *J. Dairy Sci.* **67**: 2745-2748.
- Herner, R. C. 1987. High carbon dioxide effects on plant organs. En: *Postharvest physiology of vegetables*, Weichmann J., Marcel Dekker Inc., EUA. 239-253.
- Herrero, A. Y Guardia, J. 1992. Métodos y sistemas de conservación. En: *Conservación de frutos*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 161-214.

- Holdsworth, S. D. 1988. Principales métodos de conservación. En: *Conservación de frutas y hortalizas*, Holdsworth, S. D. Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, España. 1-3.
- Hsu, A. F., Thomas, C. E. , y Brauer, D. 1988. Evaluation of several methods for the stimulation of the total activity of potato polyphenol oxidase. *J. Food Sci.* **53**: 1743 - 1745.
- Jackson, M. B., Herman, y Goodenough, A. 1982. An examination of the importance in causing injury to flooded plants. *Plant, Cell and Env.* **5**: 163 -172.
- Janovitz-Klapp, A., Richard, F. , Goupy, P., Nicolas, J. 1990a. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **38**: (4) 926-931.
- Janovitz-Klapp, A., Richard, F. , Nicolas, J. 1989. Polyphenol oxidase from apple. Partial purification and some properties. *Phytochemistry*, **28**: 2903-2907.
- Janovitz-Klapp, A., Richard, F. , Goupy, P., Nicolas, J. 1990b. Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **38**: (7) 1438-1441.
- Jiménez –Colmenero y Borderías, 1983. A study of the effect of frozen storage on certain functional properties of meat and fish protein , *J. Food Technol.* **18**: 731-737.
- Kader, A. A. , Zagory, D., y Kerbel, E. L. 1989. Modified atmosphere packing of fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Sci. And Nutrition* **28** (1): 1-30.
- Kader, A. A. 1986. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Tech.* **40** (5): 99-100, 102-104.

- Kader, A.A.1992a. Necesidades actuales y futuras investigaciones en biología y tecnología postcosecha de frutas y hortalizas. En: *Fisiología y tecnología postcosecha de productos hortícolas*, Yahia, E. y Higuera, I. Ed. Limusa, México. 289-298.
- Kader, A.A. 1992b. Modified atmospheres during transport and storage. En: *Postharvest technology of horticultural crops*, Kader, A. A. Division of Agriculture and Natural Resources, University of California, EUA. 85-92.
- Khan, V. 1985. Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of poliphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J. Food Sci.* **50**: 111-115.
- Kahn, V., y Andrawis, A. 1985. Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone. *Phytochem.* **24**: 905-908.
- Kasmire, R. F. and Cantwell, M. 1992. Postharvest Handling Systems; Underground Vegetables (Roots, Tubers, and Bulbs). En: *Postharvest technology of horticultural crops*, Kader, A. A. Division of Agriculture and Natural Resources, University of California, EUA. 271-275.
- Kays, S.J. 1991. Secondary metabolic processes and products. En: *Postharvest physiology of perishable plant products*. An Avi Book, Nueva York, EUA. 143-152.
- Klein, B. P. 1992. Fruit and vegetables. En: *Food, Theory and applications*. Bowers, J., Macmillan Publishing Co. , Nueva York, EUA. 698-705.
- Knoche, W. 1980. Chemical reaction of CO<sub>2</sub> in water . En *Biophysics and physiology of carbon dioxide*, Springer-Verlag, Berlin, Alemania. 3-11.

- Kubo, Y., Inaba, A., y Nakamura, R. 1990. Respiration and C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> production in various harvested crops held in CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **115**(6): 974-978.
- Lacroix, C. y Castaigne, F. 1984. Émulsifications des viandes, *Sci. aliments proteines* **4**(4): 505-521.
- Langdon, T. 1987. Preventing of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfiting agents, *Food Tech.*, **41**(5): 64-67.
- Lee, Ch. Y., Kagan, V., Jaworski, A. W. y Brown, K. S. 1990. Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenoloxidase activity among various peach cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **38**: 99-101.
- León, J. 1987. Solanáceas, En: *Botánica de los cultivos tropicales*, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), San José, Costa Rica, 175-176.
- Liu, F. W. 1992. Sistemas de almacenamiento para productos hortícolas. En: *Fisiología y tecnología postcosecha de productos hortícolas*, Yahia, E. y Higuera, I. Ed. Limusa, México. 103-117.
- Lourenço, E. J. , Neves, V. A. y Da Silva, M. A. 1992. Polyphenol Oxidase from sweet potato: purification and properties. *J. Agric. Food Chem.* , **40**: 2369-2373.
- Lourenço, E .J., Leáo, J. S., y Neves, V. A. 1990. Heat inactivation and kinetics of polyphenoloxidase from palmito (*Euterpe edulis*). *J. Sci. Food Agric.*, **52**: 249-259.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.F., Farr, y A. L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-276.
- Macrae, R., Robinson, R.K. y Sadler, M.J. 1993. Potatoes and related crops. En: *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*, vol. 6, Academic Press, Londres , Inglaterra. 3672-3677.
- Makhlouf, J., Castaigne, F., Arul, J. , Willemot, C. y Gosselin, A. 1989. Long-term storage of broccoli under controlled atmosphere. *Hort. Sci.* **24**:(4) 637-639.
- Mason, H. S., Fowlks, W.L. y Peterson, E. 1955. Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**: 2914-15.
- Mateos, M., Ke, D., Cantwell, M., Kader, A. 1993. Phenolic metabolism and ethanolic fermentation of intact and cut lettuce exposed to CO<sub>2</sub> enriched atmospheres. *Postharvest Biol. Tech.* **3**: 225-233.
- Mayer, A. M. y Harel, E. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, **18**: 193-215.
- Mayer, A. M. 1987. Polyphenol oxidases in plants- recent progress. *Phytochemistry*, **26**: 11-20.
- Mc Cord, J. D. y Kilara, A. 1983. Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*), *J. Food Sci.*, **48**: 1479-1483.
- Moon, Y. S. Y Kim, M. S. L. 1985. Inhibiting patterns of dopacrome formation as influenced by sodium benzoate in raw potato tubers. *Korean J. Food Sci. Tech.* **17**: 232-236.

- Murr, D. P., Morris, L. L. 1974. Influence of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> on O-diphenol oxidase activity in mushrooms. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **99** (2): 155-158.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153** (2): 375-380.
- Nisperos-Carriedo, M. O., P. E. Shaw y E. A. Baldwin. 1990. Changes in volatile flavor components of pineapple orange juice as influenced by the application of lipid and composite film. *J. Agr. Food Chem.* **38**: 1382-1387.
- Pal, R. K. y Buescher, R. W. 1993. Respiration and ethylene evolution of certain fruits and vegetables in response to carbon dioxide in controlled atmosphere storage. *J. Food Sci. Technol.* **30**(1): 29-32.
- Palou, E., Lopez-Malo, A., Barbosa-Canovas, G.V., Welti-Chanes, J. y Swanson, B. G. 1999. Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. *J. Food Sci.* **64** (1): 42-45.
- Patil, S. S. y Zucker, M. 1965. Potato phenolases, purification and properties. *J. Biol. Chem.* **240**(10): 3938-3943.
- Pedreschi, F., Aguilera, J. M. y Pyle, L. 2001. Textural characterizazation and kinetics of potato strips during frying. *J. Food Sci.* **66** (2): 314-318.
- Pizzocaro, F., Torregiani, D., y Gilardi, G. 1993. Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium choride. *J. Food Proc. Preserv.* **17**: 21-30.
- Pomeranz, Y., and Meloan, C. E. 1994. Measurement of color. En: *Food Analysis: Theory and Practice*, Chapman & Hall, Nueva York, EUA. 87-98.

- Pour-El , A., 1981. Protein functionality : clasification, definition and methodology. En: *Protein Functionality in Foods* , J. P. Cherry (Ed.) ACS Symposium Series 147, Nueva York, EUA.
- Proap, P. A. y F. R. Forsyth. 1973. The role of internally produced carbon dioxide in the prevention of greening in potato tubers. *Acta Hort.*, **38**: 277-290.
- Richardson, T. y Hyslop, D. B. 1993. Enzimas. En: *Química de alimentos*, Fennema, O. R. , Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, España. 501-503.
- Rivas, N. J., y Whitaker, J. R. 1973. Purification and some properties of two polyphenol oxidases from Bartlett pears. *Plant. Physiol.* 52: 501-507.
- Robb, D. A. 1984. Tyrosinase, II, copper proteins and copper enzymes. Tyrosinases "copper proteins and coppers enzymes" (R. Lontie, ed.) Vol. II, CRC Press, Boca Ratón, Florida. 207-234
- SAGARPA. 1994. Sistema-producto papa, datos básicos, Hortícolas y ornamentales, núm. 5, Dirección General de Agricultura, México.
- SAGARPA. 1999. Fichas Técnicas por sistema producto—1998. Dirección General de Agricultura, México. 44 p.
- SAGARPA. 2000. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos, 1999, tomo I. Centro de Estadística Agropecuaria, México. 656 p.
- Salunkhe, D. K. y Desai, B. B. 1984. Potato and sweet potato. En: *Postharvest biotechnology of vegetables*. CRC Press. Inc. Florida, EUA. Vol. I, 83-111.

- Sapers, G. M., Douglas, F. W., Bilyk, A., Hsu, A. F., Dower, H.W., Garzarella, L., y Kozempe, M. 1989. Enzymatic browning in Atlantic potatoes and related cultivars. *J. Food Sci.* **54**: 362-365.
- Siriphanich, J., Kader, A. A. 1985. Effect of CO<sub>2</sub> on total phenolics, phenylalanine ammonia lyase, and polyphenol oxidase in lettuce tissue. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **110** (2): 249 -253.
- SECOFI. 1998. Norma oficial mexicana para papa en estado fresco (*Solanum tuberosum*, L.), NMX-FF-022-1995-SCFI, Dirección General de Normas. México. 8 p.
- Smith, D. M. 1991. Factors influencing heat - induced gelation of muscle proteins. Cap. 17, En: *Interactions in food proteins*, N. Parrisy R. Barford (Ed.), ACS Symposium Series 454, Nueva York, EUA.
- Snowdon, L. A. 1991. Potatoes. En: *A color atlas of post-harvest diseases & disorders of fruits & vegetables*, vol. 2, Wolfe Scientific, Ltd. Londres, Inglaterra. 296-335.
- Soderstorm, E. L., P.D. Gander, J.L. Baritelle, K. N., Lozano, y D. Brandl. 1984. Economic cost evaluation of a generated low oxygen atmosphere as alternative fumigant in the bulk storage of raisins. *J. Econ. Entomol.* **77**: 457-461.
- Sommer, N. F., Fortlage, R. J., Edwards, D. C. 1992. Postharvest diseases of selected commodities. En: *Postharvest technology of horticultural crops*, Kader, A. A. Division of Agriculture and Natural Resources, University of California. 117-119 y 155.

- Stoll, V. S. y Blanchard, J. S. 1990. Buffers: Principles and practice. En: *Guide to protein purification. Methods in enzymology*, Deutscher, M. P., vol. **182**. Academic Press, San Diego, EUA. 29-35.
- Susuki, K. y Taniguchi, Y. 1972. Effect of pressure on biopolymers. En: *The effects of pressure on organisms*, Sleight, M. A., Mac Donald, A. G., Eds. Academic Press, Nueva York, 103-124.
- Takahata, Y., Noda, T. Y Sato, T. 1995. Changes in carbohydrates and enzyme activities of sweetpotato lines during storage. *J. Agric. Food Chem*, **43**: 1923-1928.
- Taniguchi, M., Kamihira, M., Kobayashi, T. 1987. Effect of treatment with supercritical carbon dioxide on enzymatic activity. *Agric. Biol. Chem.*, **51**(2): 593-594.
- Valadez, L. A. 1989. Solanáceas. En: *Producción de hortalizas*, Ed. Limusa, México, 212-222.
- Vámos-Vigyazó, 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critic. Rev. Food Sci. Nutr.*, **15**: 49-127.
- Vaughn, K.C. y Duke, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants *Plant. Physiol.* 60, 106.
- Voet, D. y Voet, J. 1992. Glucólisis. En: *Bioquímica*, Ediciones Omega, S. A., Barcelona, España. 456-461, 478-480 y 491.
- Weder, J. K. P., Bokor, M. V., Hegarty, M. P. 1992. Effect of supercritical carbon dioxide on arginine. *Food Chem.* **44**: 287-290.

- Whistler, R. L. y Daniel, J. R. 1993. Carbohidratos. En: *Química de alimentos*, Fennema, O. R., Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, España, 85-7, 106, 111-119.
- Wills, R.H., Lee, T.H., Graham, D., McGlasson, W.B. y Hall, E.G. 1992. Estructura y composición. En: *Fisiología y manipulación de frutas y hortalizas, post-recolección*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 2-17.
- Yahia, E. M. 1993. Response of some tropical fruits to insecticidal atmospheres. *Acta Horticulturae* 343: 371-376.
- Yañez-López, M. L. 1995. Ethanol accumulation in horticultural commodities in response to CO<sub>2</sub> enriched atmospheres. MS thesis. University of Arkansas. 110p.
- Young, R. E. y Biale, J. B. 1968. The fixation of C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> in lemon in an atmosphere enriched with carbon dioxide En: *Carbon dioxide effects on fruits*. *Planta (Berl)* **81**, 253- 263.
- Zagory, D. y Kader, A. 1988. Modified atmosphere packaging of fresh produce. *Food Technol.* **42** (9): 70-77.
- Zagory, D. y Kader, A. 1989. Quality maintenance in fresh fruit and vegetables by controlled atmospheres. En: *Quality factors of fruits and vegetables, chemistry and technology*. Jen, J. J. American Chemical Society, Washington, D.C., EUA, 174-188.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C. G. y Eskin, N.A.M. 1991. Polyphenol oxidases. En: *Oxidative enzymes in foods*. Robinson, D. S. y Eskin, N. A. M. Elsevier Applied Science, Londres, Inglaterra, 217-273.

Zemel, G. P., Sims, C.A., Marshall, M. R. y Balaban, M. 1990. Low pH inactivation of polyphenol oxidase from high L-DOPA containing velvet bean. *J. Food Sci.* **43**: 646-647.

## 9. ANEXOS

## ANEXO 1. DETERMINACIÓN DE pH, ACIDEZ TITULABLE (AT), SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES (SST) Y PÉRDIDA DE PESO (PP).

### a) Determinación del pH.

A 100 g de homogeneizado de tejido vegetal se le determinó por triplicado el pH mediante un potenciómetro Beckman  $\phi$  50 pH Meter (Beckman, Fullerton, EUA), previamente calibrado a pH de 4.0 y de 7.0.

### b) Determinación de acidez titulable.

Porciones de 5 g de homogeneizado con 50 mL de agua destilada se titularon con una solución de NaOH 0.1N hasta un pH de 8.2 con ayuda de un potenciómetro Beckman  $\phi$  50 pH Meter (Beckman, Fullerton, EUA), previamente calibrado a pH de 4.0 y de 7.0. Los resultados se expresaron como miliequivalentes de NaOH/100 g de muestra.

### c) Determinación de sólidos solubles totales.

Los sólidos solubles totales del homogeneizado se determinaron directamente con un refractómetro Atago (Atago, Tokio, Japón), previamente calibrado con agua destilada a 20°C. Los resultados se expresaron como grados Brix.

### d) Determinación de pérdida de peso.

Los tubérculos se pesaron desde las cero horas hasta el día en que se llevó a cabo la evaluación de las variables respuesta. La pérdida de peso se determinó por la diferencia en peso de los tubérculos entre el tiempo en estudio y al tiempo cero. Los resultados se expresaron como por ciento de pérdida de peso.

**ANEXO 2. FORMULACIÓN DE BUFFER DE FOSFATOS Y DE CITRATOS.**

## a) Buffer de fosfatos pH 6.5

Soluciones Stock :

A: Solución de fosfato de sodio monobásico 0.2M (27.8 g en 1000 mL)

B: Solución de fosfato de sodio dibásico 0.2M (53.65 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  o 71.7 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en 1000 mL)

x mL de A + y mL de B, diluido a un total de 200 mL

En la tabla de Métodos generales para el manejo de enzimas y proteínas (Stoll y Blanchard, 1990).

x	y	pH
68.5	31.5	6.5

Para dos litros:

x	y	pH
685	315	6.5

## b) Buffer de citratos pH 4.5

Soluciones Stock :

A: Solución de ácido cítrico 0.1M (21.01 g en 1000 mL)

B: Solución de citrato de sodio 0.1M (29.41 g de  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 1000 mL)

x mL de A + y mL de B, diluido a un total de 100 mL

En la tabla de Métodos generales para el manejo de enzimas y proteínas (Stoll y Blanchard, 1990).

x	y	pH
28.0	22.0	4.4
26.75	23.25	4.5
25.5	24.5	4.6

Para dos litros:

x	y	pH
535	465	4.5

### **ANEXO 3. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (REACCIÓN DE BIURET).**

La determinación de concentración de proteína se llevo a cabo por la reacción de Biuret. (Gornall y col. 1948).

Las sustancias que contienen dos o más enlaces peptídicos forman un complejo púrpura-violeta con sales de cobre en soluciones alcalinas. El color se desarrolla por la formación de un ión coordinado tetracúprico con dos grupos  $-\text{CO}-\text{NH}-$  adyacentes. La intensidad del color es determinada espectroscópicamente a 540 nm con una curva patrón, utilizando albúmina de suero bovino como estándar (0–10 mg/mL).

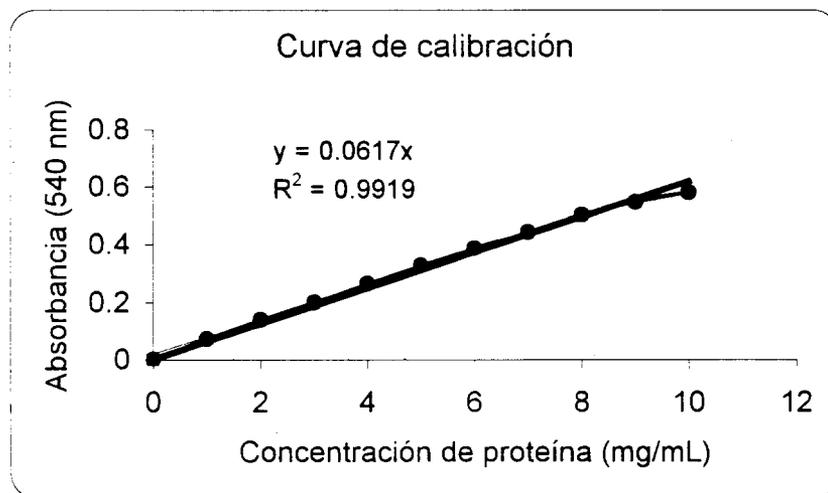
En un tubo de ensaye se adicionó 1 mL de la muestra más, 3 mL del reactivo de Biuret y se agitó en un vortex "Super-Mix" modelo 1290 (Lab-line, EUA) por 7 seg y se dejó en reposo por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se leyó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman (DU-600 Beckman, Fullerton, EUA).

#### **Reactivo de Biuret**

En 500 mL de agua destilada se disolvieron 1.5 g de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 6 g de tartrato de sodio y potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), 300 mL de hidróxido de sodio al 10% ( $\text{NaOH}$ ) y se aforó a un litro.

Concentración de proteína y absorbancia (curva de calibración).

Con. proteína mg/mL	Absorbancia 540 nm
0	0
1	0.0717
2	0.1388
3	0.1992
4	0.2649
5	0.3268
6	0.3865
7	0.4406
8	0.5021
9	0.5461
10	0.5795



Curva de calibración de la variación de la absorbancia con respecto a la concentración de proteína (albúmina de suero bovino).

$$Y = 0.0617 X$$

$$Ab = 0.0617 C \text{ (mg/mL)}$$

$$C \text{ (mg/mL)} = Ab / 0.0617$$

Los resultados se expresaron como mg de proteína/g de muestra.

#### **ANEXO 4. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES SOLUBLES (MÉTODO DE NELSON-SOMOGYI).**

La determinación de azúcares reductores se llevo a cabo por el método de Nelson-Somogyi (1944).

Este método es colorimétrico, mide los azúcares reductores utilizando el reactivo cobre/arsenomolibdato. El cobre es inicialmente reducido a la forma cuprosa por calentamiento con la solución de azúcar y el  $\text{Cu}^+$  además reduce el arsenomolibdato a molibdeno (azul). La intensidad del color azul es relacionado con la concentración del azúcar y, por comparación con un estándar producido simultáneamente con la solución problema, la concentración de los azúcares reductores en la solución problema es determinada.

En un tubo de ensaye se coloco 1 mL de muestra más 1 mL de reactivo I. Se incubó 20 min en baño de agua hirviendo, se enfrió, se adicionó 1 mL de reactivo II, se agitó vigorosamente en un vortex "Super-Mix" modelo 1290 (Lab-line, EUA), se adicionó 17 mL de agua destilada, se agitó y se midió la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-600 ( Beckman, Fullerton, EUA).

Los datos obtenidos se correlacionaron en una curva patrón de glucosa de concentración de 0-600  $\mu\text{g}$  /mL en agua y lectura a 520 nm.

##### **Reactivo I**

##### **Disolución A**

En 700 mL de agua destilada se disolvió 25 g de carbonato de sodio anhidro ( $\text{NaCO}_3$ ), 25 g de tartrato de sodio y potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), 20 g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y 200 g de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se aforó a un litro.

### Disolución B

En 200 mL de agua destilada se adicionaron 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y se disolvieron 30 g de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).

El reactivo I, se preparó mezclando 1 mL de la disolución B y 25 mL de la disolución A.

### Reactivo II

#### Disolución A

En 450 mL de agua destilada se disolvieron 21 mL de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y 25 g de molibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )

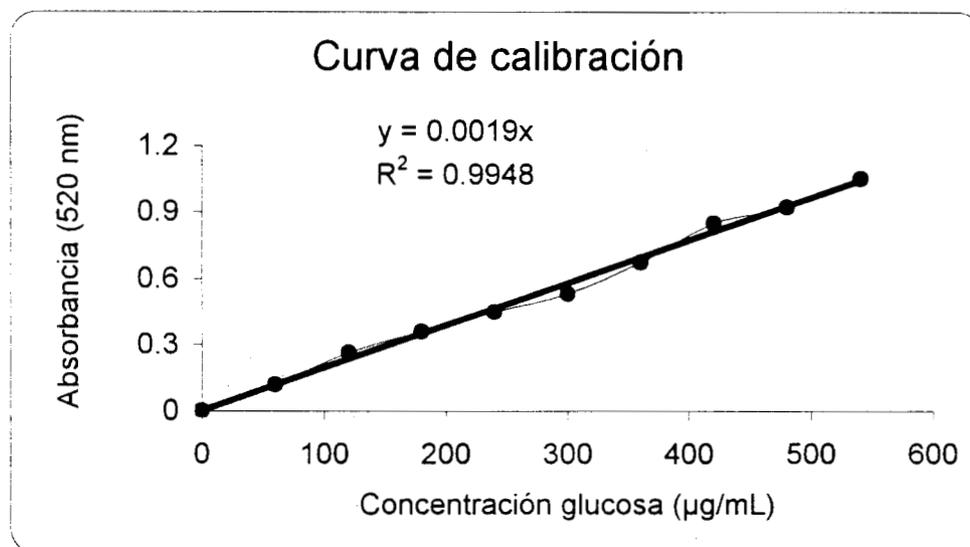
#### Disolución B

Se disolvieron 3 g de arsenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) en 25 mL de agua destilada.

El reactivo II, se preparó mezclando lentamente y con agitación las disoluciones A y B, se aforó a 500 mL y se calentó a  $55^\circ\text{C}$  por 30 min.

Valores de la concentración de azúcares reductores solubles y absorbancia (curva de calibración).

Con. glucosa $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia 520 nm
0	0
60	0.1174
120	0.2620
180	0.3583
240	0.4475
300	0.5301
360	0.6724
420	0.8481
480	0.9223
540	1.0518



Curva de calibración de la variación de la absorbancia con respecto a la concentración de azúcares reductores solubles (glucosa).

$$Y = 0.0019 X$$

$$Ab = 0.0019 C (\mu\text{g/mL})$$

$$C (\mu\text{g/mL}) = Ab / 0.0019$$

Los resultados se expresaron como mg de glucosa/g de muestra.

### ANEXO 5. MEDIAS DE LAS VARIABLES RESPUESTA EN PAPAS ENTERAS ALMACENADAS EN EL TRATAMIENTO EN ESTUDIO.

Medias de pH, acidez total titulable, sólidos solubles totales, pérdida de peso, índice de oscurecimiento en pulpa y cáscara, textura, acumulación de etanol, actividad de PPO, concentración de proteína y azúcares reductores solubles en las papas enteras almacenadas en el tratamiento en estudio.

Tratamiento	pH	Acidez titulable meq NaOH/100 gM	Sólidos solubles °Bx	Pérdida peso %	I.O. pulpa	I.O. cáscara	Textura N	Acumulación de etanol µL/L	Actividad enzimática u.a /min mL	Proteína mg prot /g M	Azúcares reductores mg glu/g M
Aire	6.05	5.46	6.0	0.49	38.76	66.53	22.65	6.04	6555.3	21.059	1.1074
Aire-CO <sub>2</sub>	6.06	5.15	6.0	0.66	36.54	62.28	21.31	6.58	5887.2	20.771	0.8081

## ANEXO 6. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LAS VARIABLES RESPUESTA EN LAS PAPAS ENTERAS ALMACENADAS EN EL TRATAMIENTO EN ESTUDIO.

Análisis de varianza para las variables respuesta en las papas enteras sometidas a la atmósfera control y atmósfera en estudio.

Fuente de Variación	Pr > F										
	Variables respuesta										
	pH	Acidez titulable	Sólidos T. solubles	Pérdida de peso	I.O. pulpa	I.O. cáscara	Textura	Acumulación de etanol	Actividad enzimática	Proteína	Azúcares reductores
Tratamiento	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.0001	n.s.	0.0001	n.s.	0.0001	n.s.	0.0001
Tiempo	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	n.s.	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Ttrat*Tiempo	n.s.	0.0001	n.s.	0.0001	0.0001	n.s.	0.0001	n.s.	n.s.	n.s.	0.0001

## ANEXO 7. PARÁMETROS DE COLOR PARA EL ÍNDICE DE OSCURECIMIENTO EN PAPAS ENTERAS ALMACENADAS EN EL TRATAMIENTO EN ESTUDIO.

Valores de los parámetros de color para las rebanadas de papas almacenadas en aire y en CO<sub>2</sub> (30%) balance aire a 7°C

Tratamiento	Tiempo alm h	L	a	b	II	c	IO
<b>Pulpa:</b>							
Aire	0	70.13	-0.83	23.44	-88.02	23.45	34.83
	24	71.99	0.34	23.09	89.15	23.09	34.88
	72	69.09	-0.12	26.89	89.73	26.89	46.51
	120	72.1	0.2	25.91	89.55	25.91	40.69
<b>Cáscara:</b>							
Aire	0	65.25	5.05	28.72	79.91	29.17	61.04
	24	62.41	4.29	29.02	81.58	29.34	61.04
	72	63.16	5.57	33.17	80.43	33.64	72.67
	120	61.51	5.18	32.42	80.92	32.85	75.57
<b>Pulpa:</b>							
Aire	0	70.13	-0.83	23.44	-88.02	23.45	34.83
Aire-CO <sub>2</sub>	24	72.66	-0.26	24.28	89.38	24.28	34.88
	72	69	0.38	25.09	89.12	25.09	40.69
	120	72.92	-0.59	23.86	-88.58	23.86	34.88
<b>Cáscara:</b>							
Aire	0	65.25	5.05	28.72	79.91	29.17	61.04
Aire-CO <sub>2</sub>	24	66.12	4.1	30.37	82.3	30.64	61.04
	72	63.25	3.02	27.43	83.75	27.59	58.13
	120	64.87	5.3	31.83	80.58	32.28	66.85

**ANEXO 8. MEDIAS DE LAS VARIABLES RESPUESTA EN EL SISTEMA MODELO DEL EXTRACTO CRUDO DE PAPA ALMACENADO EN EL TRATAMIENTO EN ESTUDIO.**

Medias de actividad enzimática, concentración de proteína y azúcares reductores solubles en el extracto crudo de acuerdo al pH, confundiendo el efecto del tratamiento.

Tratamiento	Act. enzimática u.a / min mL	Conc. proteína mg prot / g M	Conc. az.red.sol. mg glu/ g M
pH 6.5	10684.4	15.98	1.22
pH 4.5	4491.0	13.28	0.92

**ANEXO 9. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LAS VARIABLES RESPUESTA EN SISTEMA MODELO DEL EXTRACTO CRUDO DE PAPA ALMACENADO EN EL TRATAMIENTO EN ESTUDIO.**

Análisis de varianza para las variables respuesta en el sistema modelo del extracto crudo sometido a la atmósfera control y atmósfera en estudio, a pH 6.5 y 4.5.

Fuente de Variación	Pr > F Variables respuesta		
	Actividad enzimática	Proteína	Azúcares reductores solubles
Tratamiento	0.0001	n.s.	n.s.
Tiempo	0.0001	0.0001	0.0001
pH	0.0001	0.0001	0.0001
Trat*Tiem*pH	0.0001	n.s.	0.0001