



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza



## **Trabajo Fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos**

# **Estrategias para la inactivación de enzimas**

# **Strategies for enzyme inactivation**

Autor/es

**Laura Capapé Campo**

Director/es:

**Santiago Condón Usón**

**Pascual López Buesa**

Facultad de Veterinaria

Curso 2015/2016

---

## **Agradecimientos:**

En primer lugar, me gustaría agradecer a los doctores Santiago Condón Usón y Pascual López Buesa, la confianza depositada en mí para realizar este proyecto. Su experiencia, dirección y enseñanza han enriquecido mi camino como investigadora formándome en muchos aspectos profesionales y personales.

A su vez, quería agradecer a Jorge Hidalgo Gracia por la ayuda prestada a lo largo del desarrollo del proyecto, en especial durante las primeras semanas y durante el proceso de purificación enzimática. También agradecer al Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos por hacer posible mi acceso a sus laboratorios para realizar las purificaciones de PME.

Por último, y de forma general, me gustaría agradecer a profesores y compañeros de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza por crear un ambiente siempre cercano y de confianza donde aprender y trabajar.

# 1. Índice:

1. Índice.....	4
2. Resumen.....	5
3. Introducción.....	7
3.1 Conservación de los alimentos.....	7
3.2 Métodos de inactivación y conservación alternativos.....	8
3.2.1 Manotermosonicación.....	8
3.2.2 Pulsos eléctricos.....	9
3.2.3. Enzimas proteolíticos.....	10
3.3 Problemática industrial por enzimas termorresistentes.....	10
3.4 Enzimas pécticos.....	11
3.5 Pectin-metilesterasa (PME).....	12
4. Justificación y objetivos.....	14
5. Metodología.....	15
5.1 Ensayos enzimáticos.....	15
5.1.1 Determinación de la actividad PME.....	15
5.2 Extracción del zumo de tomate.....	15
5.3 Purificación y análisis de fracciones.....	16
5.3.1 Extracción de los enzimas.....	16
5.3.2 Electroforesis SDS-PAGE.....	17
5.4 Tratamientos tecnológicos.....	19
5.4.1 Tratamientos por calor.....	19
5.4.1.1 Tratamiento isotérmico.....	19
5.4.1.2 Tratamiento anisotérmico.....	20
5.4.2 Otras tecnologías.....	21
5.4.2.1. Pulsos eléctricos de alto voltaje.....	21
5.4.2.2. Manotermosonicación.....	21
5.4.2.3. Proteasas.....	22
5.4.2.3.1 Determinación de actividad enzimática de proteasas.....	22
5.4.2.3.2 Determinación de grupos sulfhidrilo libres.....	22
5.5 Análisis estadístico.....	23
6. Resultados y discusión.....	24
6.1 Termorresistencia de la PME.....	24
6.2 Inactivación de la PME en condiciones anisotérmicas.....	26
6.3 Determinación de la termorresistencia en las fracciones de PME.....	27
6.3.1 Purificación y caracterización de fracciones.....	27
6.3.2 Determinación de termorresistencia de la fracción mayoritaria.....	29
6.3.3 Estudio de la resistencia de distintas fracciones de PME al calor y del efecto del medio de calentamiento en su termorresistencia.....	32
6.4 Inactivación del enzima PME por tecnologías diferentes al calor.....	34
6.4.1 Manotermosonicación.....	34
6.4.2 Pulsos eléctricos de alto voltaje.....	35
6.4.3 Proteasas.....	36
6.4.3.1 Determinación de la actividad proteasa.....	36
6.4.3.2 Determinación de condiciones térmicas para desplegar el enzima PME.....	37
6.4.3.3 Estudio de la resistencia de la fracción mayoritaria de PME al tratamiento con proteasa.....	39
7. Conclusiones.....	42
8. Referencias Bibliográficas.....	43

## **2. Resumen**

Las exigencias del consumidor por productos sanos, de alto valor nutricional y con características organolépticas naturales han aumentado durante los últimos años. Los tratamientos térmicos necesarios para obtener productos estables microbiológicamente y con ausencia de degradaciones por reacciones enzimáticas son elevados, afectando tanto al valor nutritivo como a las propiedades sensoriales del producto final.

La presencia de enzimas resistentes al calor se produce especialmente en frutas y vegetales, teniendo que recurrir al uso de nuevas tecnologías para cumplir la demanda del consumidor. Esta investigación se inició con el objetivo de explorar la eficacia de dos nuevas tecnologías, pulsos eléctricos de alto voltaje y ultrasonidos bajo presión, y también de la adición de proteasas, en la inactivación de enzimas termorresistentes.

Los resultados finalmente obtenidos permiten concluir que, a expensas de exploraciones en condiciones más cercanas a las de la industria, el tratamiento enzimático con proteasas puede resultar viable para hidrolizar enzimas termoestables, en este caso la PME. Las tecnologías basadas en pulsos eléctricos de alto voltaje y manotermosonicación resultaron ineficaces en la reducción de actividad de forma significativa. Por último, nuestros resultados sugieren que la existencia en el tomate de al menos dos isoformas de PME con distinta termorresistencia.

## **Abstract**

Consumer demands for healthy and high nutritional products with natural organoleptic characteristics have increased in recent years. Heat treatments need high temperatures to obtain stable products microbiologically and enzymatically. Those treatments affect in both the nutritional value and the sensory properties of the final product.

The presence of heat resistant enzymes occurs especially in fruits and vegetables which have led to the use of new technologies in order to satisfy consumer demands. This investigation was initiated to explore the efficacy of two new technologies, pulsed electric fields and ultrasonic under pressure, and also the addition of proteases to inactivate heat-resistant enzymes.

The results finally obtained indicate that, at the expense of a close exploration in the industry conditions, the protease treatment may be feasible for hydrolyze thermostable enzyme, in this case PME. Technologies based on pulsed electric fields and manothermosonication were ineffective in reducing the activity significantly. Finally, our results suggest the existence in the tomato of at least two isoforms of PME with different heat resistance.

### **3. Introducción**

#### **3.1 Conservación de los alimentos**

Los objetivos principales de los procesos de conservación de los alimentos son prolongar su vida útil, garantizar su salubridad y preservar sus propiedades sensoriales y nutritivas. Los principales agentes alterantes de la calidad de los alimentos son los microorganismos, los enzimas endógenos y las diversas reacciones químicas. La importancia relativa de estos agentes depende en gran medida de los alimentos individuales que pretendamos conservar. Normalmente el factor limitante para la conservación de los alimentos de origen animal es el crecimiento microbiano, pero en algunos de origen vegetal los enzimas pueden adquirir mayor relevancia.

El método de conservación basado en la inactivación de los agentes de alteración más utilizado es el calor. La intensidad, la temperatura y el tiempo de tratamiento de los tratamientos térmicos utilizados para la conservación de los alimentos es variable en función del objetivo perseguido –concentración y tipo de microorganismos y enzimas contaminantes- y de las características físico-químicas del alimento (pH, solutos, etc.) Es común expresar la resistencia de los agentes de alteración en función de su valor  $D_t$  (tiempo de reducción decimal a una determinada temperatura) y de su valor  $z$  (aumento de temperatura necesaria para reducir un ciclo logarítmico los tiempos de reducción decimal) (Sharma, 2003).

La principal desventaja de los tratamientos térmicos es el impacto negativo que producen sobre la calidad de los alimentos, afectando tanto a las propiedades organolépticas como a la riqueza y disponibilidad de algunos nutrientes. El color también puede resultar afectado por el calor debido a la destrucción de pigmentos o por favorecer las reacciones de pardeamiento. También se ven afectadas otras características sensoriales como el olor y el sabor. Además, se producen pérdidas de compuestos volátiles y degradación de nutrientes como la tiamina, el ácido ascórbico, el ácido fólico o los tocoferoles. (Fennema, 2002). Esta es la razón por la que la Tecnología de los Alimentos busca, en los últimos años, métodos alternativos de conservación de los alimentos que, en general, se denominan “métodos no térmicos de conservación”.

### **3.2 Métodos no térmicos de conservación**

La creciente demanda de alimentos con las características originales de la materia prima de la que proceden, con garantías sanitarias suficientes y con una vida útil prolongada ha conducido al uso de métodos de inactivación y conservación alternativos al calor. Son diversas las nuevas tecnologías de inactivación física de los agentes de alteración que podrían sustituir a los actuales tratamientos térmicos: altas presiones, pulsos eléctricos, ultrasonidos, radiación ultravioleta, pulsos de luz, plasma frío, etcétera. Existen muchos trabajos sobre la eficacia bactericida de estas tecnologías pero sus efectos sobre los enzimas han sido menos estudiados. Cuando la caducidad de un alimento está limitada por la actividad enzimática podrían quizás utilizarse nuevas tecnologías de procesado, pero también existe un enfoque diferente que se sugirió hace años pero que ha sido muy poco estudiado: el uso de proteasas. A continuación se resume la información básica sobre las tecnologías no térmicas utilizadas en este trabajo, así como sobre el uso de proteasas para la conservación de alimentos.

#### **3.2.1 Manotermosonicación**

Este tratamiento combina los efectos de los ultrasonidos, de las temperaturas moderadas y de la presión. El aumento de la temperatura modifica el estado físico-químico de las estructuras celulares y de los enzimas, que podrían así sensibilizarse a las ondas ultrasónicas; sin embargo, al aumentar la temperatura disminuye la tensión superficial de los alimentos líquidos lo que conlleva una disminución de la intensidad de la cavitación y por tanto de los efectos de los ultrasonidos. La presión contrarresta los efectos del aumento de la temperatura y por tanto aumenta la intensidad de la cavitación (Burgos et al., 1994) por lo que este tratamiento combinado es más eficaz que la mera aplicación de ultrasonidos en condiciones ambientales.

La manotermosonicación es eficaz para destruir la mayoría de especies microbianas vegetativas, pero es poco eficaz para la inactivación de esporos. Los efectos sobre los enzimas dependen de factores relacionados con la estructura y la naturaleza de éstos, así como con otros como la intensidad del campo acústico. Algunas enzimas tratadas pueden sufrir cambios en su función catalítica mientras que otras pierden su actividad. (Vercet, 1998)

Existen investigaciones en las que se describen resultados sinérgicos de inactivación enzimática debido a los efectos de las temperaturas moderadas y las ondas ultrasónicas. (López et., al 1994). Así, se ha demostrado que la dependencia de la velocidad de inactivación de la peroxidasa con la temperatura y el pH, al igual que el patrón de reactivación, sigue una cinética semejante al de la inactivación térmica, lo que implicaría que sigue el mismo mecanismo de inactivación, mientras que en otros, como la lipooxigenasa siguen una cinética diferente (López y Burgos, 1995). En cualquier caso, los datos publicados son escasos y la mayoría se han obtenido en medios de laboratorio en los que el comportamiento del enzima puede ser muy diferente, dada la física del proceso, al existente en los propios alimentos.

### **3.2.2 Pulsos eléctricos**

La tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje consiste en la aplicación de voltajes de alta intensidad (kV) en forma de pulsos de corta duración ( $\mu$ s) sobre un alimento situado entre dos electrodos. Los campos eléctricos de alto voltaje tienen su efecto sobre las envolturas celulares, provocando la aparición de poros en la membrana citoplasmática (Wouters et al., 2001). Este fenómeno, conocido como electroporación, provoca un aumento de la permeabilidad de las membranas y la pérdida de la viabilidad celular, si es suficientemente intensa. De este modo, una de las aplicaciones más prometedoras de la tecnología de PEAV es la inactivación microbiana a temperaturas menores a las usadas en los procesos tradicionales de conservación de los alimentos, como la pasteurización térmica. Existen numerosas publicaciones que han estudiado la aplicación de los PEAV para la higienización de zumos de frutas y otras bebidas (McDonald et al., 2000; Heinz et al., 2003; Mosqueda-Melgar et al., 2007; Reina et al., 1998; Evrendilek y Zhang, 2005; Floury et al., 2006). Saldaña et al. (2011) establecieron que un tratamiento de 25 kV/cm y 63  $\mu$ s sería suficiente para reducir 5 ciclos logarítmicos la población de *E. coli* O157:H7, criterio utilizado por la FDA (Food and Drugs Administration) para la pasteurización de zumos de frutas (FDA, 2001).

Algunos autores han descrito el efecto de los PEAV sobre macromoléculas, como por ejemplo, las enzimas (Soliva-Fortuny et al., 2009). El mecanismo de inactivación enzimática mediante la aplicación de PEAV no está claro; de hecho existen notables contradicciones entre las conclusiones extraídas por distintos investigadores trabajando con los mismos enzimas en sustratos similares. Por ejemplo, las investigaciones llevadas a cabo por Soliva-Fortuny y colaboradores concluye que los pulsos eléctricos son eficaces para la



inactivación de diversas enzimas, mientras que el grupo del Dr. Hendrickx opina que los pulsos eléctricos son poco eficaces para la inactivación enzimática que, cuando se produce, es debida al calentamiento de la muestra como consecuencia del paso de la corriente eléctrica (Hendrickx et al. 2001)

### **3.2.3. Enzimas proteolíticos**

Los enzimas proteolíticos hidrolizan los enlaces peptídicos de proteínas dando como resultado péptidos o aminoácidos libres. Pueden participar en procesos diferentes como su biosíntesis, el control de su destino y su activación o degradación. (Avilés, et al, 1994)

Estos enzimas presentan una gran importancia en la industria agroalimentaria. Se utilizan mucho en la fabricación de bebidas, panificaciones, fabricación de galletas, síntesis de aspartamo, clarificación de la cerveza o en la fabricación de productos fermentados de soja y pescado, así como en la elaboración de quesos y concentrados proteicos. Al margen de estas aplicaciones, bien conocidas, se ha sugerido que la adición de proteasas a los productos de origen vegetal podría reducir la actividad de los enzimas alterantes de estos alimentos lo que permitiría prolongar su vida útil (Puski, G. 1975). Esta hipótesis apenas se ha contrastado y a día de hoy es imposible concluir si podría tener aplicación industrial.

### **3.3 Problemática industrial por enzimas termorresistentes**

De forma general, los tratamientos térmicos que se aplican en las industrias alimentarias se calculan en función de la termorresistencia de la flora microbiana que contamina la materia prima, dado que estos tratamientos suelen ser suficientes para inactivar a sus enzimas endógenos. Sin embargo, existen ocasiones en las que la destrucción enzimática cobra mayor importancia debido a que su termorresistencia limita la vida útil del producto. Las industrias de procesado de zumos son probablemente las más afectadas por este problema.

Los zumos presentan partículas en suspensión compuestas por pectina, celulosa, hemicelulosa, proteínas y lípidos, lo cual se considera una característica deseable afectando favorablemente al sabor, al color característico y especialmente al aspecto. La clarificación por acción enzimática se considera un defecto caracterizado por separación de fases, pérdida de turbidez, modificación de la textura, reducción de la viscosidad, pérdida de color y menor retención del sabor. Esta acción se atribuye principalmente a la enzima PME, por lo que el control de su actividad resulta un punto de interés para obtener productos de alta aceptación en el mercado (Jolie, 2009).

El zumo de fruta se comercializa actualmente pasteurizado, necesitando refrigeración tras su tratamiento térmico hasta el consumo, o esterilizado. Numerosos estudios, así como la FDA en 2010 (FDA) establecen necesario al menos una pasterización de alrededor de 70°C durante 14 segundos para reducir 5 unidades logarítmicas los microorganismos patógenos presentes en matrices de pH 3.3-4.1 como *E.coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* o *Salmonella*. Estos tratamientos de pasteurización son relativamente suaves y aunque garantizan la calidad sanitaria del producto son poco eficaces para prolongar su vida útil del producto porque no inactivan suficientemente las enzimas PME y PG, permitiendo que hidrolicen las pectinas, reduciendo por tanto la viscosidad del jugo, lo que afecta al procesado (bombeo y evaporación) y disminuye la aceptación del consumidor (Anthon y Barret, 2002)

Diversos autores coinciden en que la actividad residual PME en los zumos tratados térmicamente debe ser inferior al 10% del inicial para garantizar una estabilidad razonable (Carbonell et al., 2005; Osorio et al., 2008). Desafortunadamente este nivel de inactivación solo se consigue con tratamientos más severos que la pasteurización antes descrita que son a su vez la causa de notables cambios en las propiedades sensoriales de los productos.

### **3.4 Enzimas pécticos**

Los enzimas pécticos, que tienen como sustrato las pectinas, se encuentran en todas las plantas superiores y son producidos por algunos microorganismos y hongos.

Las pectinas son un grupo heterogéneo de polisacáridos que constituye el 30% del peso seco de la pared celular primaria de las células vegetales. Se componen de un esqueleto formado por tres dominios principales, homogalacturonanos, compuesto de unidades de ácido D-galacturónico unidos por enlaces glicosídico  $\alpha(1-4)$ ; Ramnogalacturonano I, donde restos de L-ramnosa se unen mediante enlaces  $\alpha(1-2)$  al carbono 4 del ácido galacturónico y otros azúcares mayoritarios como la D-galactosa y la L-arabinosa forman cadenas laterales; y Ramnogalacturonano II, donde se encuentran en menor frecuencia los azúcares D-xilosa, D-glucosa, D-manosa, L-fructosa y ácido D-glucurónico (Coll, 1996). Una gran parte de los grupos carboxílicos del ácido D-galacturónico se encuentra metilada, influyendo de esa forma en la susceptibilidad a ser hidrolizada por pectin-metilesterasa

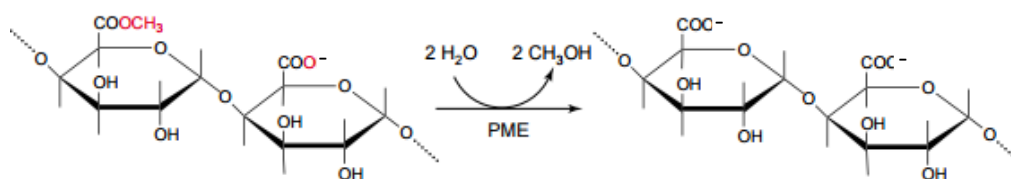
### 3.5 Pectin-metilesterasa (PME)

La enzima pectin-metilesterasa es una enzima hidrolítica que se encuentra de forma natural en la mayoría de las frutas, especialmente en cítricos. Se encuentra ligada a la pared celular y es liberada en el momento de la extracción del zumo (Polydera et al., 2004). Su concentración aumenta con la maduración del fruto jugando un papel importante en su desarrollo, en la formación de semillas, en la germinación del polen y como mecanismo de defensa frente a patógenos (Johansson, 2002).

Cataliza la hidrólisis de grupos metilo de los monómeros de ácido galacturónico provocando la liberación de metanol, pectinas de bajo metoxilo y ácidos pécticos por unión a moléculas de calcio (Menéndez-Aguirre, 2006).

La reacción tiene lugar por el ataque nucleofílico del enzima sobre el enlace éster, dando lugar al acil-enzima y a la liberación de metanol. Posteriormente, la hidrólisis del intermediario libera el enzima y la pectina con un grupo carboxílico libre (Wong, 1995). La estructura del centro activo de la PME no es bien conocida, sin embargo se cree que contiene un resto de tirosina y otro de histidina (Versteeg, 1979).

La actividad del enzima sobre la pectina, su sustrato, puede seguirse de forma continua mediante titración a pH 7.0, ya que la hidrólisis del enlace éster libera un protón. Para ello las pectin-metilesterasas han de iniciar el ataque en una posición de la pectina adyacente a un grupo carboxílico libre, ya que el ácido poligalacturónico completamente metilado no es susceptible de ser atacado (Whitaker, 1994).



**Figura 1.** Desmetilación de pectinas por acción de PME (Micheli, 2001)

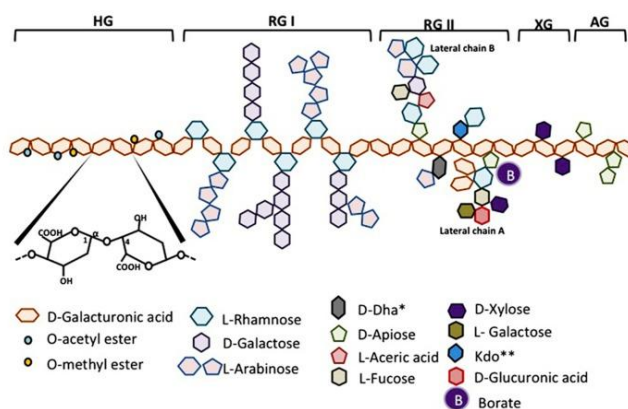
La enzima extraída de la pared celular no contiene una pre-secuencia, por lo que su escisión de la molécula de PME madura ocurre antes o después de que ésta sea excretada en el apoplasto. La función de esta región pre-pro no está claramente definida; no obstante, hay indicios de que podría tener una función biológica en la PME, actuar como inhibidor de la actividad enzimática, orientar a la PME hacia la pared celular, o, incluso,

actuar como una chaperona intracelular, permitiendo de esta forma un plegamiento correcto de la proteína.

Aunque no existe evidencia experimental para apoyar estas hipótesis, se cree que la opción más razonable sería que actuara como inhibidor del enzima activo durante su secreción al apoplasto evitando una desmetilación prematura de las pectinas antes de ser insertadas a la pared celular.

Por otra parte, el modo de actuación de la enzima PME madura resulta diferente cuando actúa sobre uno de los principales dominios de la pectina, los homogalacturonanos, de forma aleatoria, como en los hongos, o de forma lineal, como en las plantas. La desmetilación libera protones que promueven la acción de endopoligalacturonasas contribuyendo en la pérdida de turgencia de la pared celular.

Además puede dar lugar a bloques de grupos carboxílicos libres que interaccionan con calcio creando un gel de pectato. Debido a que la acción de las endopoligalacturonasas en el gel es limitada, la acción de la PME contribuye a la rigidización de la pared celular. Sin embargo, esto supone una desventaja cuando se produce en zumo ya que la red insoluble formada precipita, y por tanto el zumo se clarifica, cualidad valorada negativamente por los consumidores.



**Figura.2.** Estructura de la pectina (Leclere, 2013)

La actividad PME depende tanto del pH, del grado inicial de metilación de las pectinas y, además, se ha observado que las isoformas del enzima pueden ser más o menos efectivas dependiendo del pH y de la estructura de los cationes bivalentes a los que se unen (mono, di o trivalentes, siendo mayor la actividad cuantos más moléculas están enlazadas) (Leclere, 2013).

Son varios los isoenzimas de PME que se han aislado, aunque existen diferencias entre variedades de cultivares. Las isoenzimas presentes en el tomate parecen sugerir que las funciones de las PME son muy complejas y no pueden explicarse tomando como modelo un isoenzima de un tejido (Gaffe et al., 1994).

#### **4. Justificación y objetivos**

El consumidor actual exige alimentos estables, saludables, con gran valor nutricional y con características organolépticas próximas a las de la materia prima de la que proceden. Dado que el calor a alta intensidad degrada la calidad de los alimentos, la industria agroalimentaria intenta reducir en lo posible los tiempos y temperaturas de calentamiento. Los procesos de pasteurización suelen afectar poco al valor nutritivo y a las propiedades sensoriales de los alimentos y son capaces de inactivar la mayoría de las especies bacterianas vegetativas patógenas, aunque no inactivan esporos bacterianos. Este último problema puede paliarse conservando los alimentos pasteurizados en refrigeración. Esta estrategia suele ser suficiente para conservar muchos alimentos de origen animal, en los que el principal problema para su conservación es microbiológico, pero suele ser insuficiente para los de origen vegetal cuyo principal agente alterante tras el tratamiento suelen ser los enzimas termorresistentes.

Las tecnologías alternativas al calor se han estudiado ampliamente por lo que respecta a su eficacia bactericida, pero muy poco sobre su capacidad para inactivar enzimas. Por otra parte, hace 40 años aproximadamente se sugirió la posibilidad de prolongar la vida útil de los alimentos vegetales pasteurizados mediante la adición de proteasas que, se suponía, atacarían a los enzimas endógenos de los vegetales prolongando su vida útil. Esta idea que podría constituir una brillante solución al problema, apenas ha sido investigada para este tipo de productos.

El objetivo de este trabajo fue explorar la eficacia de dos nuevas tecnologías: pulsos eléctricos de alto voltaje y ultrasonidos bajo presión, y también de la adición de proteasas para la inactivación de enzimas pectinolíticos. Para la consecución de este objetivo se consideró necesario realizar las siguientes actividades.

- 1.- Caracterizar la resistencia al calor del enzima utilizado como referencia.
- 2.- Estudiar la eficacia de las dos nuevas tecnologías para la inactivación del enzima.
- 3.- Explorar la posibilidad de añadir proteasas como método de inactivación del enzima de referencia.

Para este trabajo decidimos utilizar como alimento de referencia el tomate, y como enzima de referencia la pectin-metilesterasa.

## **5. Metodología**

### **5.1 Ensayos enzimáticos**

#### **5.1.1 Determinación de la actividad PME**

El ensayo se basa en la medición del cambio de acidez debido a los protones que se obtienen por hidrólisis de la pectina.

El análisis se realizó a temperatura ambiente mediante una titración ácido-base utilizando como sustrato 10mL de pectina 1% (Sigma, St.Louis, MO) en 0,15M de NaCl. La solución de enzima se añadió al sustrato y se adicionó NaOH (0,01N) para mantener el pH a 7, en el cuál la actividad del enzima es máxima. Para conseguir una mayor homogeneidad en los resultados, se decidió que el volumen mínimo gastado para dar por finalizada la valoración sería de 1mL de NaOH.

Además, se realizaron controles negativos mediante la desnaturalización del enzima a 100°C durante 5 minutos, comprobando que los demás componentes de la matriz no presentaban actividad. En el presente trabajo, se define como Unidad de Actividad al volumen necesario en mL de NaOH (0,01N) por minuto y mL de muestra para neutralizar el pH a 7.

### **5.2 Extracción del zumo de tomate**

Los tomates maduros fueron despetitados y pelados. La pasta resultante se homogeneizó a 200bares de presión para evitar grumos de pulpa y se almacenó en congelación a -18°C en recipientes de 500mL. El rendimiento obtenido mediante este método de extracción fue del 81%. Para comprobar que las diferentes etapas del proceso no alteraban el enzima de interés, se realizó un análisis de la actividad PME, observándose mediante

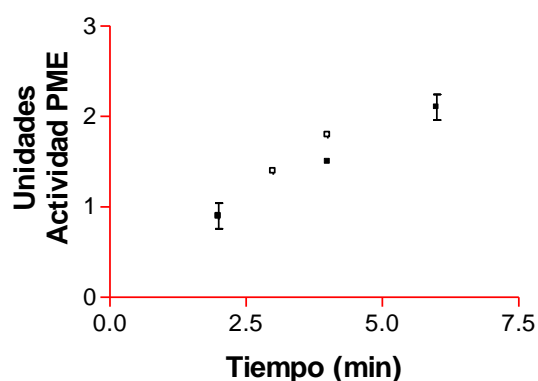


Figura 3. Actividad en función del procesado de tomate: Triturado (■) o triturado y homogenizado (□)

t de *Student* que la diferencia no era significativa ya que  $p > 0,05$ . Por tanto y, para facilitar la obtención, las siguientes preparaciones de tomate se llevaron a cabo solamente mediante triturado.

### 5.3 Purificación y análisis de fracciones

#### 5.3.1 Extracción de los enzimas

Para la obtención de los enzimas de interés, primero se extrajo el zumo del mesocarpo y endocarpo carnoso del tomate, eliminando el lóculo con pulpa, el epicarpo y las pepitas.

La pasta obtenida se mezcló 1:1 con tampón citrato 10mM pH 4.0 con la finalidad de separar las proteínas solubles del tomate mediante centrifugación a 7440 g (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter, California, EE.UU) durante 40 minutos. Tras realizar dos lavados en dicho tampón, el pellet se redisolvió 3:1 en el tampón citrato con NaCl 1,7M, provocando con esto la liberación de las enzimas ligados a las paredes y restos celulares al aumentar la fuerza iónica.

La separación de las distintas proteínas que contenía la muestra se realizó mediante una columna de filtración en gel (Hiload™ 26/600 Superdex 200pg, GE Healthcare, Reino Unido) y un equipo AKTÄ MiniPrep (GE Healthcare, UK).

El tampón utilizado para eluir la muestra fue citrato 10mM con NaCl 150mM a pH 4. La muestra se cargó en un Superloop y se inyectó en la columna a una velocidad de 2 ml/min. La columna separa a las proteínas en función de su tamaño, siendo las de mayor tamaño las primeras que eluyen. Seguidamente es medida mediante luz UV que detecta si la muestra contiene proteína midiendo a 280nm recogién dose en el colector. Si ésta no presenta señal, la válvula cambia y la alícuota es eliminada.

El tampón con el que se calibró la columna se filtró mediante un disco de membrana de

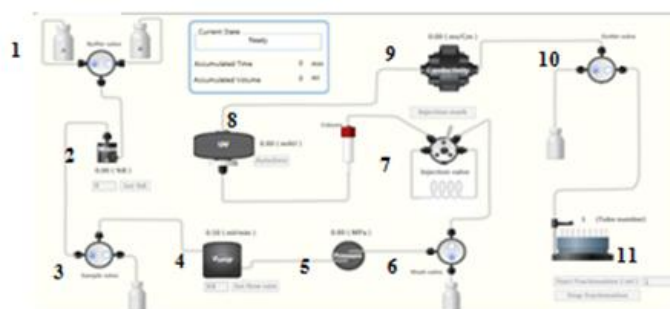


Figura 4. Procedimiento para la purificación de proteínas de zumo de tomate. [1-Tampón de elución. 2-Mezclador de tampón. 3-Válvula de muestra. 4-Bomba. 5- Presión. 6-Válvula de lavado. 7- Válvula de inyección. 8-Espectrofotómetro de Ultravioleta 280nm. 9- Conductivímetro. 10-Válvula de salida. 10-Colector.]

nitrocelulosa de 0,22µm para evitar obturaciones. Por la misma razón y para inyectar un volumen pequeño, la muestra una vez extraída, se filtró con un disco de 0,45 µm y se concentró 1/100 mediante ultrafiltración a 7440 g 15 minutos en

Centricones de 30KDa (Amicón<sup>®</sup> Ultra-30; Cork, Irlanda).

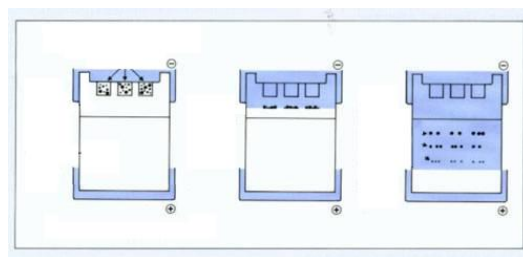
### 5.3.2 Electroforésis SDS-PAGE

La electroforesis desnaturizante somete a las proteínas a una migración bajo la influencia de un campo eléctrico, asegurando la completa desnaturalización, es decir, la pérdida de la estructura tridimensional. Para ello, se aplica sobre las muestras calor en presencia del detergente dodecilsulfato sódico (SDS) y del compuesto reductor mercaptoetanol.

Los geles utilizados se componen de dos partes: stacking 4% acrilamida y running 12% de acrilamida. El porcentaje de acrilamida se encuentra inversamente relacionado con el tamaño de poro, el cual depende del rango de tamaños de las proteínas a analizar.

De forma general, la capa stacking es de mayor poro y tiene un pH más ácido debido al tampón Tris (pH 6,8). Por el contrario, la capa running tiene un pH mayor (pH 8,8) y contiene mayor contenido de acrilamida ya que es la que separa las proteínas según su peso molecular.

Este sistema tampón discontinuo permite que las proteínas de cada pocillo cargado migren juntas al frente de migración acumulándose antes de comenzar su separación a través de la capa running. Debido a que el detergente SDS se une a las cadenas polipeptídicas desnaturalizadas bloqueando su carga y confiriéndole al complejo una carga neta negativa proporcionales a su carga, la migración hacia el ánodo resulta proporcional a la carga y al tamaño de la molécula, pero no a su forma.



**Figura 5.** Procedimiento para la separación de proteínas por electroforesis mediante sistema tampón discontinuo.[1-Carga de pocillos. 2-Migración al frente. 3-Migración en running] (Montero, 1955)



La composición de ambas capas se presenta en la siguiente tabla

Running gel 12%		Stacking gel 4%	
Reactivo	Volumen	Reactivo	Volumen
H <sub>2</sub> O	1,67 mL	H <sub>2</sub> O	3,13 mL
Acrilamida 30%	2 mL	Acrilamida 30%	666 µL
Tris 1,5M pH 8,8	1,5 mL	Tris 1M pH 6,8	625 µL
SDS 20%	25 µL	SDS 20%	25 µL
Persulfato amónico 10%	50 µL	Persulfato amónico 10%	50 µL
TEMED	5 µL	TEMED	5 µL

Para preparar el gel de SDS-PAGE se mezclan los reactivos a excepción del persulfato amónico (catalizador) y el TEMED (iniciador) ya que permiten la polimerización. Se añade primero el running gel y unos 300 µL de isobutanol saturado en agua para igualar el frente y, tras su polimerización se retira el isobutanol y se añade el stacking gel y el peine para hacer los pocillos de carga.

Las muestras se diluyen en relación 1:1 en un tampón que contiene 62,5mM de Tris pH 6,8 20mM DTT, glicerol 10%, SDS 2% y azul de bromofenol 0,03%; después se desnaturaliza a 100°C durante 5 minutos.

La electroforesis se lleva a cabo en tampón Tris 25mM pH 8,3; glicina 192mM y SDS 0,1% cargando 20 µL de la muestra y 4 µL de marcador de peso molecular (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), Es importante tener en cuenta para ello que el peso mínimo de muestra aconsejada en Protein Methods (1996) está entre 0,1 y 1 µg.

La migración se realiza a 180V, 400A durante 50 minutos. Por último, para evidenciar las bandas es necesario realizar una tinción con una disolución de agua: metanol: ácido acético (4,5:4,5:1) y azul de Coomassie R-250 g/L durante 5 minutos en agitación y una disolución de agua, metanol y ácido acético glacial (8:1:1) para desteñir el gel.

## **5.4 Tratamientos tecnológicos**

### **5.4.1 Tratamientos por calor**

Para determinar la termorresistencia de un microorganismo o un enzima, habitualmente suelen buscarse métodos de tratamiento que minimicen la contribución de la fase de calentamiento al efecto letal total lo que se consigue inoculando la muestra objeto de estudio en el medio de tratamiento precalentado, o utilizando capilares, con una gran relación superficie/volumen y un pequeño tamaño de muestra. Estos tratamientos suelen denominarse isotérmicos y tienen la ventaja de que los datos obtenidos son fácilmente interpretables. Sin embargo, en la industria suelen utilizarse calentamientos anisotérmicos en los que el calor aportado por la fase de calentamiento puede contribuir de forma importante al efecto letal global observado. Las curvas de inactivación en estos tratamientos son más difíciles de interpretar pero, como hemos mencionado, se aproximan más a la realidad industrial. En esta investigación se han utilizado ambos tipos de calentamiento en función de los objetivos perseguidos en cada experimento.

#### **5.4.1.1 Tratamiento isotérmico**

- **Capilares:** Esta técnica, aunque en sentido estricto realmente no permite aplicar tratamientos isotérmicos, permite reducir al máximo la fase de calentamiento anisotérmico por la elevada relación superficie/volumen que facilita mucho la transferencia del calor. El inconveniente principal que presenta es que su preparación es delicada y laboriosa. Presenta la ventaja de que exige un volumen de muestra pequeño.

Para aplicar los tratamientos, la muestra (100  $\mu$ L) se introdujo en capilares del mismo volumen y posteriormente se cerraron a la llama. Los tratamientos térmicos se aplicaron en un baño termostático de agua (Unitronic 200, Grupo P. Selecta, Barcelona, España) previamente estabilizado a la temperatura deseada. Las muestras se sacaban cada 5 minutos, se enfriaban inmediatamente en un baño de agua con hielo y, tras extraer el contenido, se determinaba la actividad residual.

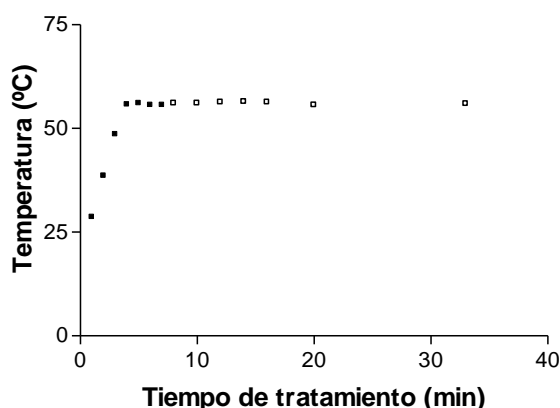
- **Termoblock (FX incubator, Zeu Inmunotec, España):** Este equipo es una pequeña estufa de calentamiento por aire. Los tratamientos se aplicaron introduciendo en la cámara de tratamiento un eppendorf con 0,9 mL de tampón McIlvaine a pH 4,3, tomate crudo o tomate tratado térmicamente, dependiendo del experimento, y, una vez alcanzada la temperatura de régimen, inoculando 0,1mL de la fracción proteica a analizar. Las

muestras se sacaban a diferentes tiempos y se mantenían en hielo hasta la determinación de actividad residual.

#### 5.4.1.2 Tratamiento anisotérmico

**Termorresistómetro TR-SC:** Este equipo es un pequeño autoclave con un sistema eléctrico de termostatación y rampas de calentamiento regulables. La homogeneidad de la temperatura y la distribución del inóculo se garantizan por la acción de una hélice unida a un rotor. El equipo está conectado a un circuito de presión ( $N_2$ ) que evita la ebullición del medio de tratamiento y dispone de sistemas de inoculación y toma de muestras.

En estos experimentos se utilizaron como medio de tratamiento 400mL de zumo de tomate triturado. Las muestras de 2,5mL se tomaron a periodos predeterminados de tiempo utilizando una presión relativa de  $1 \text{ kg/cm}^2$  y se mantuvieron en hielo hasta la determinación de la actividad residual. La figura ilustra la evolución de la temperatura del medio con una rampa de calentamiento de  $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$ . y la estabilidad térmica conseguida una vez alcanzada la temperatura de régimen.



**Figura 6.** Estabilidad de la temperatura al aplicar un tratamiento isotérmico en termorresistómetro con una rampa de calentamiento de  $10^\circ\text{C/min}$

Salvo que se indique lo contrario se utilizó una rampa de calentamiento de  $2^\circ\text{C/minuto}$ , una temperatura inicial de  $30^\circ\text{C}$  y una temperatura de régimen de  $80^\circ\text{C}$ . Las muestras se tomaban cada minuto al alcanzar los  $45^\circ\text{C}$  (15minutos). El ajuste de los resultados para determinar los valores cinéticos  $D_t$  y  $Z$  se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Log} N_t = \text{Log} N_0 - ((Z/rc * D_{ref} * \ln 10) \times (10^{(-T_{ref}/z)}) \times ((10^{(T/Z)}) - (10^{(T_0/Z)})))$$

Siendo  $\text{Log} N_0$  el logaritmo de la actividad PME inicial,  $rc$  el ritmo de calentamiento,  $D_{ref}$  el valor  $D$  a calcular,  $T_{ref}$  la temperatura a la que se desea obtener el valor  $D$ ,  $T_0$  la

temperatura inicial del tratamiento y T la temperatura en el momento del muestreo. (López et al, 1994)

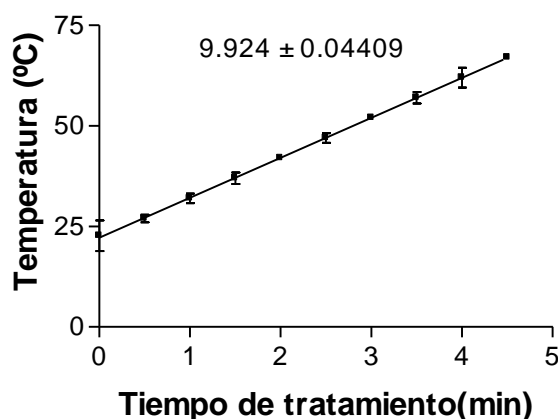
## **5.4.2 Otras tecnologías**

### **5.4.2.1 Pulsos eléctricos de alto voltaje**

Se aplicó en un equipo de onda cuadrada (Epulsus-FPM1-10, Energy Pulse Systems, Lisboa, Portugal) siguiendo el método descrito por el Dr. Puértolas (2007). Se aplicaron 50 pulsos de 3  $\mu$ segundos a 22KV a temperatura ambiente (24°C) en una cámara de electrodos paralelos con una distancia entre los electrodos de 0,25cm. Este tratamiento se consideró el de mayor intensidad que podría tener viabilidad industrial.

### **5.4.2.2 Manotermosonicación**

Se realizó en un manotermosonicador diseñado en nuestro laboratorio (Pat. 92-00686, PCT93/00021). El equipo consta de una cámara de tratamiento de acero inoxidable de 100mL de capacidad conectada a un circuito de vacío, para absorber el medio de tratamiento, y a uno de presión de ( $N_2$ ) para extraer la muestra y regular la intensidad de cavitación. En la base de la cámara de tratamiento se halla ubicado un cuerno de sonicación (Branson Digital Sonifier, Emerson Electric, Misouri, EE.UU.). La intensidad de la cavitación se ajustó para conseguir un ritmo de calentamiento de 10°C/min, utilizando una amplitud de 102  $\mu$ M y una presión relativa de 215 kPa. El medio de tratamiento fue zumo de tomate triturado y las muestras se extrajeron cada medio minuto. La figura 7 muestra el ritmo de calentamiento del medio de tratamiento en las condiciones seleccionadas.



**Figura 7.** Ritmo de calentamiento de zumo de tomate al aplicar un tratamiento de manotermosonicación con una amplitud de 102 $\mu$ M y presión de 215 kPa.

### **5.4.2.3 Proteasas**

#### **5.4.2.3.1 Determinación de actividad enzimática de proteasas**

Para conocer la actividad que presentaban los preparados enzimáticos objeto de estudio, se utilizó un sustrato artificial cromogénico derivado de la caseína, la azocaseína.

El sustrato se preparó al 0.50% (p/v) en tampón McIlvaine de pH 8.3, 7 y/o 4 en función de las pruebas experimentales realizadas. La azocaseína se mezcló con el mismo tampón en el pH correspondiente y con el enzima a medir (10mg/mL) en proporción 2.50:1.50:1. La disolución se incubó durante 2 horas a 30°C, tras lo cual se adicionaron 4 mL de ácido tricloroacético para detener la reacción y precipitar las proteínas no hidrolizadas. Posteriormente la centrifugación de las muestras a 9724 g (MiniSpin plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), permitió separar los péptidos hidrolizados, que se localizan en el sobrenadante, de las proteínas intactas, que precipitan en el pellet. Finalmente se adicionaron 0.6mL del sobrenadante en 1.5mL de NaOH 0.5M y se midió la absorbancia a 440nm.

Para cada experimento se realizó un blanco de cada muestra con las mismas cantidades de reactivos, a excepción de las enzimas.

#### **5.4.2.3.2 Determinación de grupos sulfhidrilo libres**

La presencia de grupos -SH debido a la ruptura de puentes disulfuro de la PME tratada térmicamente a 50, 60, 70 y 80°C durante 10 minutos se determinó mediante el procedimiento colorimétrico de Ellman (1959). Este método consiste en añadir 50 µL de solución 20mM de 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) en tampón fosfato potásico 0,1M pH 7,4 a 1mL de solución proteica (0,42mg/mL) en tampón citrato y determinar la evolución de la absorbancia a 412nm. Para ello se utilizó un espectrofotómetro (UNICAM 500, UNICAM Analytical Systems, Reino Unido) realizando las medidas cada 10 minutos hasta que el valor se estabilizó.

Este ensayo se realizó de forma habitual a pH 8,3, el recomendado por el fabricante para la azocaseína, pero se realizaron también pruebas al pH del tomate (4.3) y superiores. A pHs bajos se producía la desnaturalización de la proteína que solamente se disolvía por completo a pHs superiores a 5,15, que fue por ello el más bajo utilizado en los experimentos.

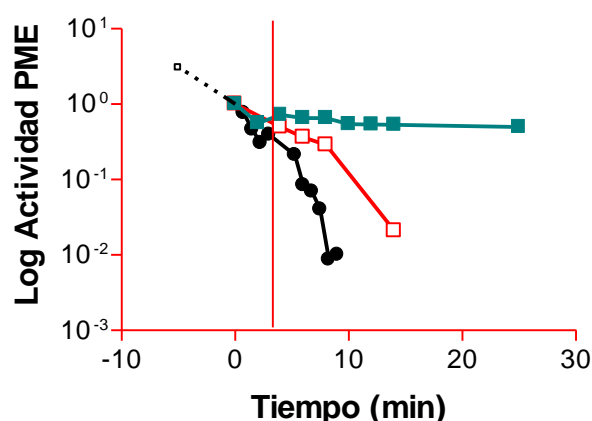
### 5.5 **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el software Microsoft® Office Excel y GraphPad Prism 3.03. Para detectar diferencias estadísticamente significativas se realizaron test *t de Student* siendo no significativo un valor  $p > 0,05$ .

## 6 Resultados y discusión

### 6.1 Termorresistencia de la PME.

Como se ha indicado previamente el objetivo de los tratamientos térmicos es garantizar la salubridad y estabilidad de los alimentos. En el tomate y productos semejantes la consecución de estos objetivos exige la inactivación, entre otros agentes de alteración, de la pectinmetilesterasa. Los enzimas pécticos pueden tener una termorresistencia elevada lo que obliga a aplicar tratamientos de alta intensidad: 90°C-1minuto (Basak, 1997) que pueden afectar notablemente a la calidad sensorial y nutricional del producto. Los datos de termorresistencia de este enzima varían muy ampliamente lo que puede ser debido a la diversidad de metodologías utilizadas para su estudio, pero también a la existencia de diversas isoformas con distinta tolerancia al calor. Por este motivo, y como primera actividad decidimos determinar la resistencia al calor la pectinmetilesterasa del tomate que utilizamos para el resto de la investigación.



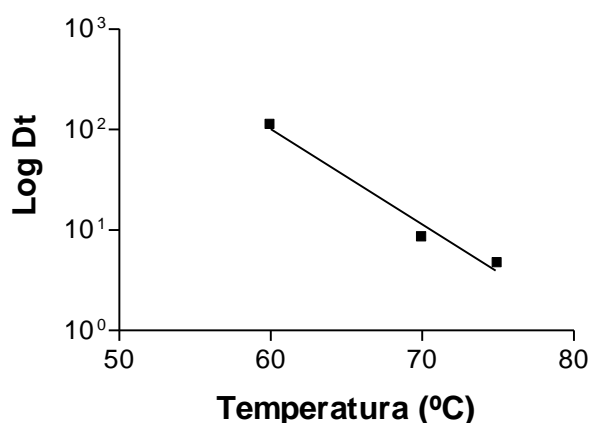
T <sup>a</sup> (°C)	Dt (min)
60	111,11
70	8,42
75	4,67

**Figura 8.** Gráfica de inactivación por tratamiento isotérmico de PME en tomate a pH 4,4 a 60° (■) 70°C (□) y 75°C (●) y valores Dt. Actividad inicial (□)

Las figuras 8 y 9 muestran las curvas de inactivación y de termodestrucción del enzima en condiciones isotérmicas. Dado que este tratamiento se aplicó en el termorresistómetro fue imposible eliminar totalmente la fase de calentamiento por lo que se aceleró en lo posible hasta alcanzar la temperatura de régimen y se consideró tiempo 0 al momento en el que se alcanzaba esa temperatura. Este tiempo no aparece indicado en la gráfica.

Como era esperable, la velocidad de inactivación del enzima aumentó con la temperatura de tratamiento resultando imposible cuantificarla a 80 °C. Como se desprende de la figura el enzima comienza a inactivarse, a un ritmo apreciable, a partir de los 60°C donde muestra unos valores D de 111.11 minutos. Este valor debe tomarse con precaución dado que la inactivación a partir de la cual se ha calculado es escasa. Las curvas obtenidas a 70 y 75 °C son mucho más fiables porque atraviesan prácticamente dos ciclos logarítmicos. El estudio de estas curvas muestra una cinética no estrictamente exponencial, observándose la aparición de pequeños hombros seguidos de un cambio de pendiente cuando se ha inactivado un ciclo logarítmico de actividad PME aproximadamente. Este fenómeno podría deberse a la presencia de isoenzimas que difieren en termorresistencia y grado de glicosilación como describen diversos autores (Laratta et al. 1995, Tucker et al., 1982). En cualquier caso, dado que las desviaciones eran moderadas y que la mayoría de los autores utilizan el modelo cinético tradicional de las reacciones de primer orden, decidimos expresar la termorresistencia en valores Dt.

La figura 9 Muestra la línea de termodestrucción construida a partir de los valores Dt deducidos de los datos anteriores. Pese a las limitaciones antes mencionadas la línea obtenida mostró un coeficiente de determinación elevado ( $R^2= 0,975$ ) por lo que procedimos a calcular el valor z del enzima que resultó ser de  $z= 10.5^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 9.** Gráfica de termodestrucción de PME en tratamiento isotérmico en tomate a pH 4,4 (■)

Existen relativamente pocos parámetros cinéticos de termoinactivación de la PME de la variedad de tomate escogida. La Tabla 1 resume alguno de los valores Dt y z publicados (Autores: Laratta et al. 1995, Nath et al., 1983 y Sekine et al., 2002)



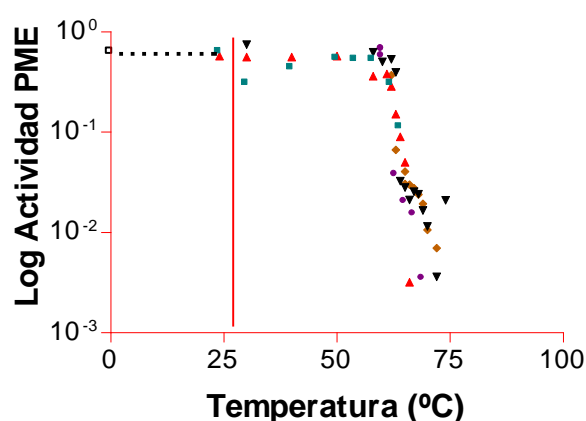
**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de inactivación por el calor de PME de homogeneizado de tomate.

Referencia	Enzima	Parámetro de termorresistencia	pH
Nath et al., 1983	PME var. pusa ruby	$D_{80^{\circ}\text{C}} = 1,93 \text{ min}$ $z=9^{\circ}\text{C}$	4,5
Laratta et al., 1995	PME isoenzima 3	$D_{70^{\circ}\text{C}} = 0,97 \text{ min}$ $z=24^{\circ}\text{C}$	4,5
Sekine et al., 2002	PME var. NDM 1	$D_{70^{\circ}\text{C}} = 5,8-9,6 \text{ min}$ $z=5,9-6,8^{\circ}\text{C}$	5,0
Sekine et al., 2002	PME var. NDM 2.	$D_{70^{\circ}\text{C}} = 10,1-13,9 \text{ min}$ $z=6,2-7,6^{\circ}\text{C}$	5,0
Sekine et al., 2002	PME var. Roma	$D_{70^{\circ}\text{C}} = 13,6 \text{ min}$ $z= 6,3^{\circ}\text{C}$	5,0

Como se desprende de la tabla, la termorresistencia del enzima PME de nuestra variedad de tomate se encuentra aproximadamente en la media de los valores publicados que, por otra parte, difieren ampliamente.

## 6.2 Inactivación de la PME en condiciones anisotérmicas.

Aunque los datos de termorresistencia utilizados para el cálculo de los tratamientos térmicos suelen obtenerse por procedimientos semejantes a los descritos en el apartado anterior, lo cierto es que los procesos industriales suelen presentar una prolongada fase anisotérmica de calentamiento y existen dudas sobre si este lento calentamiento podría producir cambios estructurales en el enzima, y por tanto cambios en su termorresistencia. Por este motivo decidimos simular un proceso industrial aplicando un calentamiento anisotérmico a un ritmo de calentamiento constante de  $2^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ . La figura 10 muestra las curvas de inactivación de la PME de distintas muestras del triturado de tomate.



**Figura 10.** Gráfica de inactivación por tratamiento anisotérmico de la PME en tomate.

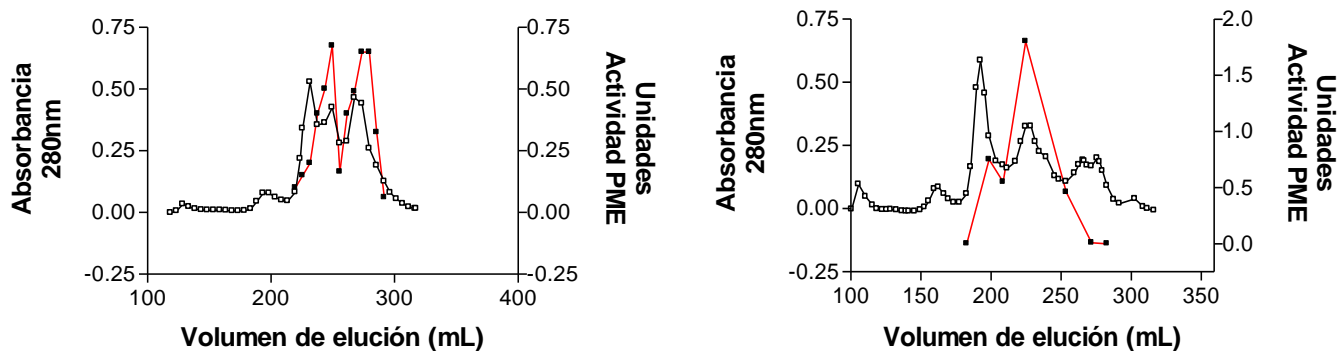
Como se puede observar en la figura la actividad PME se mantiene prácticamente constante hasta los  $60^{\circ}\text{C}$ , punto en el cual comienza la inactivación enzimática que

lógicamente se acelera al aumentar el tiempo, y por tanto la temperatura, de tratamiento. A partir de la ecuación descrita en la sección de material y métodos dedujimos de estas curvas un valor  $D_{60}$  de  $8,09 \pm 0,01$  minutos y un valor  $z$  de  $5,8 \pm 0,02^{\circ}\text{C}$ . Tanto los valores  $D_t$  como  $z$  obtenidos en estas condiciones de tratamiento resultaron ser muy inferiores a los obtenidos en condiciones isotérmicas. Un estudio detallado de las curvas muestra la aparición de un pequeño hombro y cambios de pendiente cuando la temperatura alcanza  $65^{\circ}\text{C}$ , aproximadamente, y se ha inactivado 1 ciclo logarítmico de actividad PME. Este resultado coincide en cierta medida con los hombros descritos en condiciones isotérmicas, reforzando la idea de que podría tratarse de dos isoformas de PME con diferente termorresistencia. Esto explicaría la falta de coincidencia de los parámetros de termorresistencia deducidos, aunque no puede descartarse que los mecanismos de inactivación sean diferentes. En vista de los resultados obtenidos, el siguiente paso lógico era la extracción y purificación de los enzimas PME con el fin de comprobar esta hipótesis.

### **6.3 Determinación de la termorresistencia en las fracciones de PME**

#### **6.3.1. Purificación y caracterización de fracciones**

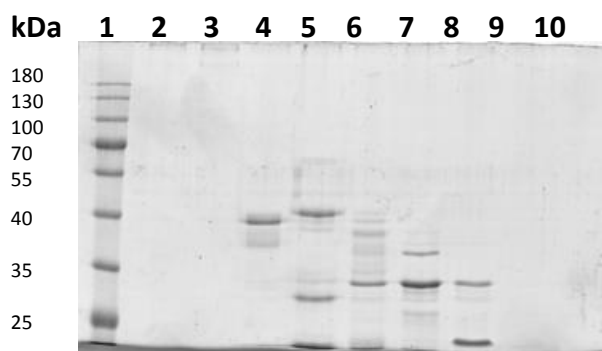
A lo largo de la investigación fue necesario realizar dos purificaciones con el fin de obtener la suficiente cantidad de proteína con la que trabajar. Aunque las condiciones de elución en ambas ocasiones fueron las mismas, las muestras se recogieron de una manera distinta. En la primera purificación se unió el volumen obtenido en cada pico de elución; sin embargo y con objeto de obtener una mejor separación, durante la segunda purificación se juntaron las fracciones de dos en dos en cada uno de los picos obtenidos. La siguiente figura muestra el perfil de elución de las dos cromatografías de filtración en gel en la columna HiloLoad™ 26/600 Superdex 200pg.



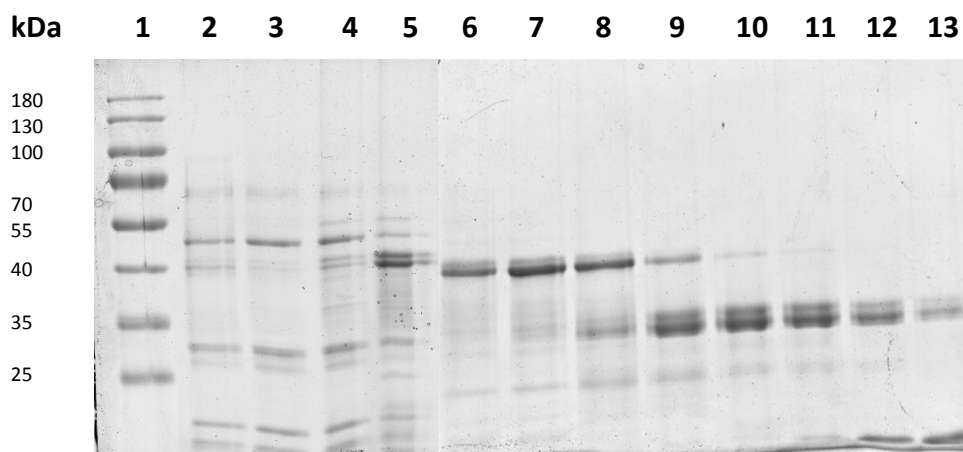
**Figura 11.** Perfil de elución de tomate medido por absorbancia a 280 nm en tampón Citrato 10mM pH 4,3 con NaCl 150mM y velocidad de flujo 2mL/min (□) y Unidades de actividad PME (■). Primera purificación a la izquierda y segunda purificación a la derecha.

Los picos de ambas eluciones se obtuvieron en un total de 112 minutos con un volumen final de elución de 320mL. En los perfiles obtenidos se observan dos primeros picos pequeños y tres picos principales de mayor absorbancia de proteína. La actividad PME se presenta principalmente en dos de ellos, aunque no de forma aislada uno del otro.

Los puntos máximos en la primera purificación se corresponden con la fracción 4 (1,8mL NaOH/min) y 6 (0,75mL NaOH/min) a 200 y 225 mL de elución respectivamente; mientras que en la segunda purificación con la fracción 30-36 (máximo: 0,67mL NaOH/min) y 37-50(máximo: 0,65mL NaOH/min) a 250 y 275 mL de elución respectivamente. La existencia de al menos dos isoenzimas diferentes de PME en tomate coincide con lo descrito por algunos autores como Laratta et al. (1995) y De Sio et al. (1995). La composición de las diversas fracciones se analizó mediante SDS-PAGE (figuras 12 y 13)



**Figura 12.** Electroforesis en gel de poliacrilamida 12%, pH 4,3 de las fracciones recogidas durante la primera purificación teñida con Azul de Coomasie. [1-Patrón de pesos moleculares. 2-Fracción 1(100mL de elución). 3-Fracción 2(120mL). 4-Fracción 3(160mL). 5-Fracción 4(200mL). 6-Fracción 5(210mL). 7-Fracción 6(225mL). 8-Fracción 7(250mL). 9-Fracción 8(270mL)]



**Figura 13.** Electroforesis en gel de poliacrilamida 12%, pH 4,3 de las fracciones recogidas durante la segunda purificación teñida con Azul de Coomasie.[1-Patrón de pesos moleculares.2-Fracción 25/26(219-222mL de elución).3-Fracción 27/28(225-228mL).4-Fracción 29/30(231-234mL).5-Fracción 31/32(237-240mL).6-Fracción 33/34(243-246 mL).7-Fracción 35/36(249-252 mL).8- Fracción 37/38(255-258. mL).9- Fracción 39/40(261-264 mL).10- Fracción 41/42(267-270 mL).11- Fracción 43/44(273-276 mL).12- Fracción 45/46(279-282 mL).13- Fracción 47/48(285-288mL)]

La escasa bibliografía sobre la purificación de isoenzimas de PME hace dificultosa la tarea de caracterizar los resultados obtenidos en las electroforesis.

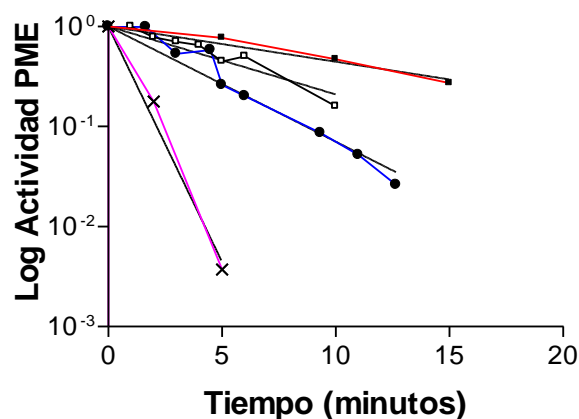
Se puede observar en la primera purificación que los picos de actividad PME (fracción 4 y 6) coinciden con unas bandas de mayor intensidad a 35 y 40 kDa. Este peso molecular se asemeja al obtenido por el grupo del Dr. Fachin para la PME, 33,5 kDa. La razón de que no coincida puede ser debida a que la variedad de tomate es diferente a la utilizada en este trabajo (Fachin et al. 2002).

En la segunda purificación se observan fracciones poco puras de diferentes proteínas (25-32) Sin embargo, la mayor actividad específica PME coincide con fracciones más puras de proteínas cuyos pesos moleculares son de 40 KDa para la fracción 33-34 y de 35 KDa para las fracciones 41-50. Estos pesos moleculares coinciden con los de la primera purificación.

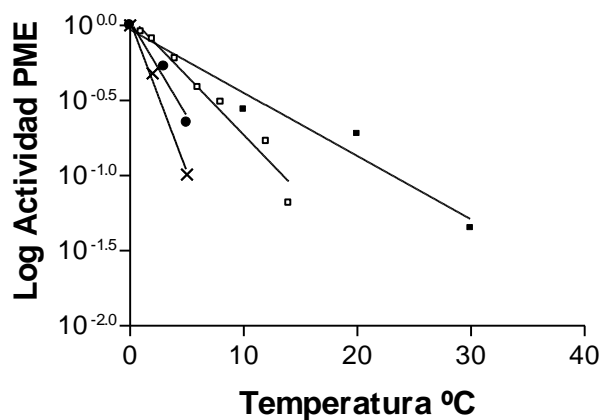
### **6.3.2. Determinación de termorresistencia de la fracción mayoritaria.**

Para comprobar la diferencia de termorresistencia entre la fracción obtenida con la actividad específica PME más alta (fracción 6) se realizaron tratamientos isotérmicos a distintas temperaturas en el termoblok, utilizando como medio de calentamiento tampón McIlvaine, tal como se indica en el apartado de Material y Métodos. Este método minimiza el efecto de la fase de calentamiento y permite la comparación directa del efecto del calor entre el enzima purificado y el de la mezcla de isoenzimas de la matriz.

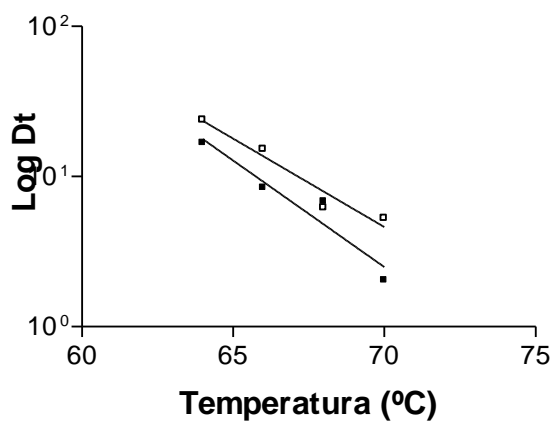
Las gráficas de inactivación se muestran en las figuras 14 y 15 y las de termodestrucción en la figura 16. Así mismo, se recogen los valores  $D_t$  y  $z$  en la tabla 2.



**Figura 14.** Gráficas de inactivación de la fracción de mayor actividad específica PME en tampón McIlvaine pH 4,3 a 64(■) , 66(□) , 68(●) y 70°C(X).



**Figura 15.** Gráfica de inactivación de la actividad PME del zumo de tomate diluido 1/10 en tampón McIlvaine pH 4,3 a 64(■) , 66(□) , 68(●) y 70°C(X)..



**Figura 16.** Gráfica de termodestrucción de la fracción 6 (■) y de pasta de tomate (□) en tampón McIlvaine pH 4,3.

**Tabla 2.** Valores Dt y z de la fracción 6 y de tomate sometidos a tratamiento térmico en tampón McIlvaine pH 4,3

T <sup>a</sup> (°C)	Dt (min)		
	Fracción	Tomate	
64	17,1821306	23,7529691	
66	9,19963201	15,1745068	Z Fracción = 7,4°C
68	6,8119891	6,17283951	Z Tomate = 8,4°C
70	2,03417413	5,25762355	

Como se observa en las figuras las curvas de la fracción purificada siguen un curso de inactivación estrictamente exponencial, en tanto que las gráficas de supervivencia de la pasta de tomate muestran desviaciones de la linealidad, como ya observamos en los apartados anteriores, y que es claramente visible en la curva correspondiente a 66 °C. Además los valores Dt obtenidos resultaron ser mayores en la pasta de tomate que para fracción 6 del enzima purificado. Estos resultados indican que o bien la pasta de tomate contiene isoenzimas de PME de distinta termorresistencia, o bien que parte de las moléculas del enzima se encuentran unidos a algún componente del tomate que cambia su termorresistencia, como ya sugirió Castaldo et al. (1996).

En cualquier caso, asumiendo un orden logarítmico de inactivación, calculamos los valores Dt y, a partir de ellos, construimos las líneas de termodestrucción (fig. 16) que presentaron unos coeficientes de determinación de 0,9238 y 0,9414. A partir de las líneas de termodestrucción calculamos unos valores z de 7,4 y 8,4 que no diferían significativamente ( $p > 0,05$ ).

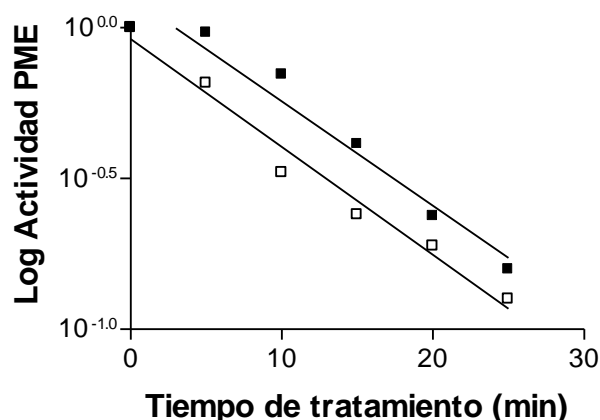
Como ya comentamos en apartados anteriores, los valores publicados de la termorresistencia de la PME presentan grandes diferencias. En cualquier caso, los valores obtenidos por López et al. (1997), que trabaja con unas condiciones semejantes, son similares a los obtenidos en esta investigación.

En definitiva, las curvas de inactivación en tampón de la actividad PME de una fracción purificada no coinciden con las observadas en el tomate, lo que se podría deber a la coexistencia de fracciones de distinta termorresistencia o a interacciones del enzima con otros componentes del tomate, por lo que decidimos profundizar en el estudio de las causas de las diferencias observadas.

### **6.3.3. Estudio de la resistencia de distintas fracciones de PME al calor y del efecto del medio de calentamiento en su termorresistencia.**

Para estudiar si la termorresistencia del enzima recogido en distintas fracciones era diferente, decidimos comparar las de las fracciones 6 y 4 (véase material y métodos). Dado que la concentración del enzima en la fracción 4 era baja, resultaba imposible realizar los experimentos en el termoblock por lo que decidimos utilizar para esta comparación el método de los capilares.

La figura 17 muestra las líneas de inactivación a 64 °C de la fracción 6 de PME obtenidas con el método del termoblock y el de los capilares. Ambas líneas presentaron coeficientes de determinación elevados, de 0,9549 y 0,9857 para termoblock y los capilares respectivamente.

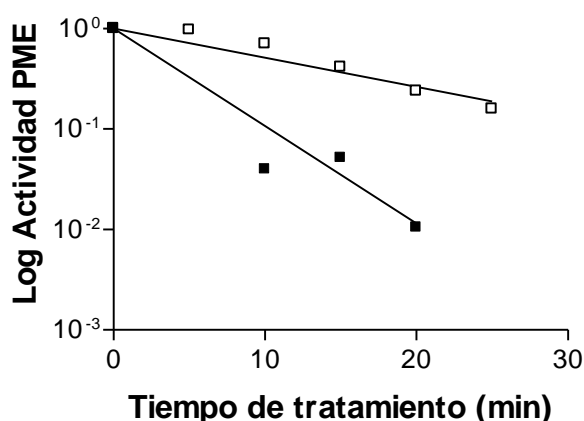


**Figura 17.** Gráfica de inactivación de la fracción 6 en tampón McIlvaine pH 4,3 tratado en termoblock (■) y capilares (□)

Los valores  $D_{64}$  a partir de las curvas de inactivación obtenidas con el método de los capilares (28,90 min) y los obtenidos con el termoblock (27,96 min) no difirieron significativamente ( $p < 0.05$ ). Estos resultados nos indican que los datos obtenidos por ambas metodologías podrían ser comparados directamente.

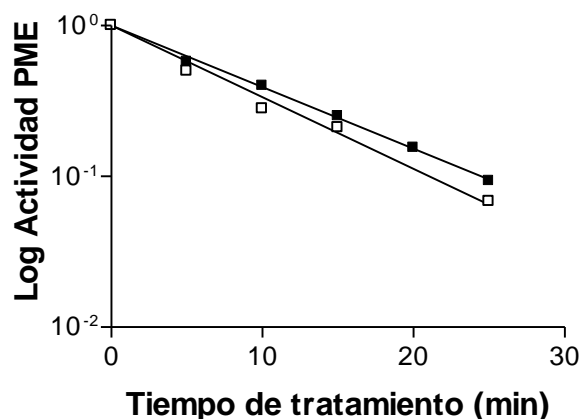
Una vez demostrada la adecuación del método de los capilares para aplicar los tratamientos decidimos comparar la termorresistencia de las fracciones 4 y 6. La figura 18 muestra las curvas de inactivación de ambas fracciones de PME obtenidas en la primera purificación. Los valores  $D_{64}$  calculados a partir de las pendientes de las líneas de inactivación resultaron ser de 9,47 minutos para la fracción 4, y de 28,99 para la fracción 6. El análisis estadístico de los resultados demostró que ambos valores diferían significativamente ( $p < 0.05$ ). De

estos resultados se puede deducir que existen dos isoenzimas, al menos, de diferente termorresistencia. Algunos investigadores (Lopez, et al., 1998) han obtenido un solo pico de actividad PME, otros (Fachin, et al., 2002) han observado la aparición de dos picos con diferente termorresistencia y otros, incluso más (Laratta et al., 1995; Tucker et al., 1982). En nuestro caso la fracción termolábil corresponde al primer pico de elución con actividad específica PME con un peso molecular de 40 KDa y la fracción resistente al segundo pico de elución correspondiente a un peso de 35KDa.



**Figura 18.** Gráfica de inactivación a 64°C mediante capilares de la fracción 4 (■) y fracción 6 (□).

Una vez confirmada la existencia de al menos dos isoenzimas, quedaba por aclarar si se producían interacciones entre alguno de estos isoenzimas con otros componentes del tomate responsable de cambios adicionales de termorresistencia. Para abordar este estudio tratamos en el termoblock la fracción 6, que tenía mayor actividad PME, en tampón y en tomate previamente esterilizado para eliminar los enzimas endógenos. Los resultados del experimento se muestran en la figura 19





**Figura 19.** Gráfica de inactivación a 64°C de la fracción 6 suspendida en tampón McIlvaine pH 4.3 (■) y en tomate esterilizado (□).

Los valores  $D_{64^{\circ}\text{C}}$  obtenidos en tampón resultaron ser de 23.75, y en tomate de 22,17 min. No encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre ambos valores lo que nos permite concluir que a iguales pHs de tratamiento los componentes del tomate no modifican la termorresistencia del isoenzima estudiado y que, por tanto, la coexistencia de isoenzimas de distinta termorresistencia parece ser la responsable de las desviaciones de la linealidad y de la falta de concordancia entre los valores obtenidos en condiciones isotérmicas y anisotérmicas.

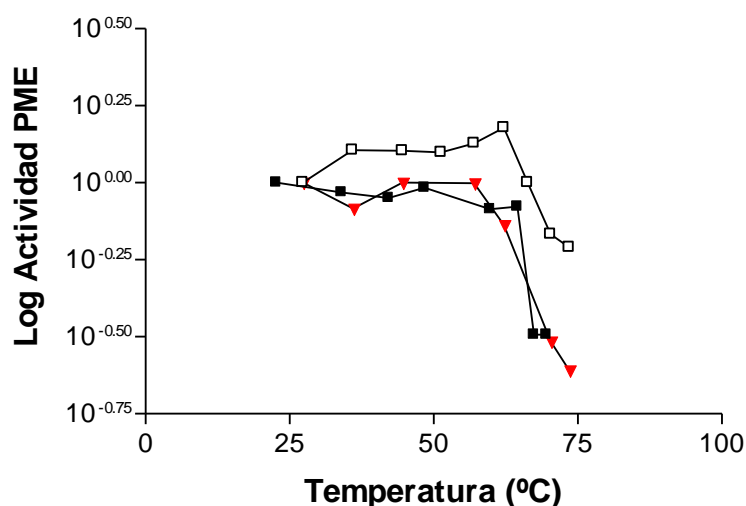
#### **6.4. Inactivación del enzima PME por tecnologías diferentes al calor.**

Como se indica anteriormente, los consumidores demandan cada vez más productos naturales, seguros y con características organolépticas que recuerden al fruto de origen, además de una vida útil alargada. Debido a ello, las nuevas tecnologías son cada vez más utilizadas.

##### **6.4.1 Manotermosonicación**

El uso de estas tecnologías se encuentra justificado por los resultados encontrados en diferentes investigaciones. En ellas se indica que el efecto de los ultrasonidos no es suficiente para inactivar un enzima resistente pero que el uso sinérgico de ambas tecnologías produce la inactivación y/o algunos cambios en la función catalítica de los enzimas, haciéndoles perder su actividad. (Burgos et al., 1994 y Vercet, 1998)

Para poder relacionar de forma directa los efectos de los ultrasonidos aplicados a la inactivación enzimática, se comparó con los obtenidos mediante solo tratamiento térmico a 10°C/min. El ritmo de calentamiento fue escogido como se indica en el apartado de Material y Métodos, porque es el ritmo que tuvo el equipo de MTS a una amplitud de 102μM y 215 kPa.



**Figura 20.** Gráfica de inactivación de la enzima PME en zumo de tomate pH 4,3. Réplica de tratamiento anisotérmico por MTS a un ritmo de calentamiento de 10°C/ min (■ y □) y en un termorresistómetro a un ritmo de 10°C/min. (▼)

Se puede observar en la figura que, al igual que ocurría en el tratamiento anisotérmico a un ritmo de calentamiento de 2°C/min, comienza a disminuir la actividad PME a partir de 60°C. En el caso de la muestra tratada mediante MTS existe un ligero hombro comenzando la inactivación con una pendiente más brusca a partir de los 70°C, aunque la variabilidad en la determinación de actividad no permitió elucubraciones más profundas.

La variabilidad obtenida por las muestras tratadas por MTS no es excesivamente alta teniendo en cuenta que las condiciones son difíciles de controlar dada la precisión de la sonda de temperatura y el manómetro. A pesar de que Pascual et al. (1998) exponen una reducción de un ciclo logarítmico mediante tratamiento de MTS de 200kPa, con una amplitud de 117μM en PME purificada en tampón, en este experimento realizado con zumo de tomate no se advierte una inactivación significativamente distinta entre tratamiento térmico y manotermosonicación. Se podría indicar por tanto que esta última tecnología no produce la suficiente inactivación en zumo de tomate.

#### **6.4.2 Pulsos eléctricos de alto voltaje**

Aunque se ha demostrado ampliamente la eficacia de la tecnología de PEAV para la inactivación microbiana (Condón et al. 2012, Álvarez et al. 2012, Saldaña et al. 2013), existen dudas sobre su aplicación en enzimas. Hasta el momento no se ha encontrado ningún tratamiento aplicable a escala industrial capaz de inactivar las enzimas de los alimentos debido a la gran cantidad de energía que se requiere para lograr la reducción de

la actividad hasta valores que no supongan una alteración en el producto, y las limitaciones de los equipos existentes en la actualidad.

En este trabajo se aplicó un tratamiento de PEAV de 22 kV/cm y 150 us, viable a escala industrial para la descontaminación microbiana de zumos de frutas (Timmermans et al., 2011). La intensidad de tratamiento se considera similar a la del estudio llevado a cabo por Agcam et al (2014) para la inactivación de enzimas PME, 25 kV/cm, aunque estos autores aplicaron un tiempo de tratamiento mucho más elevado y por lo tanto, de mayor energía específica, inviable a escala industrial.

Tras la aplicación de los tratamientos de PEAV, se observó tan solo un 11% de reducción en la actividad enzimática de la PME del tomate. Agcam et al. (2014) encontraron hasta un 93% de reducción en la actividad del mismo enzima en (zumo de naranja pH 3,5). A la vista de estos resultados, se consideró que el tratamiento aplicado no resultó eficaz para el control de la actividad de la PME en tomate.

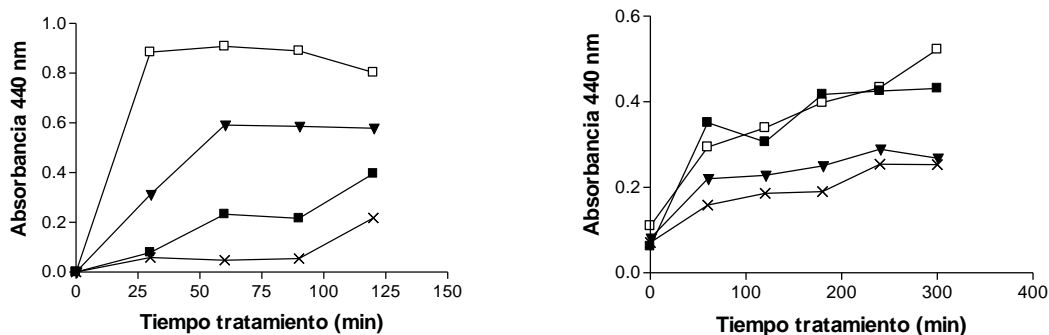
### **6.4.3 Proteasas**

Como se ha indicado anteriormente, las enzimas proteolíticas presentan una gran importancia en la industria agroalimentaria para la elaboración de una amplia gama de productos y se ha sugerido su utilización para reducir la actividad de enzimas alterantes (Puski, G. 1975) aunque apenas existan datos contrastados.

Con el fin de conocer su efecto sobre la PME, se decidió utilizar proteasas muy conocidas y utilizadas en la industria actualmente: proteasa de *Rhizopus spp.* (P0107-5G, Sigma), Pepsina de mucosa gástrica de porcino (P7000-25G, Sigma), Tripsina de páncreas bovino (T9201-500mG, Sigma) y Proteasa de páncreas bovino (P4630-250mG, Sigma), las dos primeras por su bajo pH óptimo, pH 2-3 cercano al del zumo de tomate, y las dos segundas por su disponibilidad, pH óptimo de 7,5.

#### **6.4.3.1 Determinación de la actividad proteasa.**

El primer paso era comprobar que los enzimas eran activos a los pHs a los que se pretendía trabajar. Para ello se recurrió a la azocaseína ya que al ser un sustrato cromógeno permitía medir fácilmente la actividad y, mediante extrapolación conocer el efecto presumible sobre la PME. Debido al problema de la solubilidad explicado en la sección de material y métodos, se decidió realizar esta prueba tanto a pH 5,15 como a pH 7.



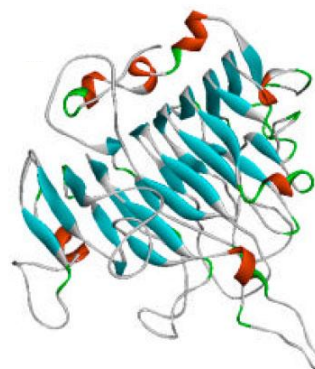
**Figura 21.** Absorbancia de péptidos coloreados liberados de azocaseína en función de la actividad enzimática a pH 5,15 (dcha) y 7 (izda) por las proteasas de *Rhizopus spp.* (■), páncreas (□), tripsina (▼) y pepsina (x) en relación 1:6, incubando a 30°C.

La actividad en las condiciones estudiadas se analizó en función de su pendiente inicial. En base a ello, se observó que a pH 7 las proteasas con mayor velocidad de reacción enzimática fueron las de *Rhizopus spp.* y de páncreas bovino a diferencia de la tripsina y la pepsina. Este resultado era esperable en base a los resultados obtenidos al determinar la actividad de las proteasas a pH 7 y 5,15.

Cuando el pH disminuye se observa que el tiempo de tratamiento necesario para obtener la misma absorbancia de péptidos coloreados liberados es mayor, lo cual se traduce en un descenso de la velocidad de la reacción enzimática. Analizando la gráfica de forma individual se puede deducir que la actividad de la proteasa de *Rhizopus spp.* aumenta hasta coincidir con la de páncreas bovino que, a pesar de que se aleja de su pH óptimo, es una de las enzimas proteolíticas que mayor actividad presentan. Tripsina sin embargo, reduce su absorbancia un tercio y la de pepsina no varía.

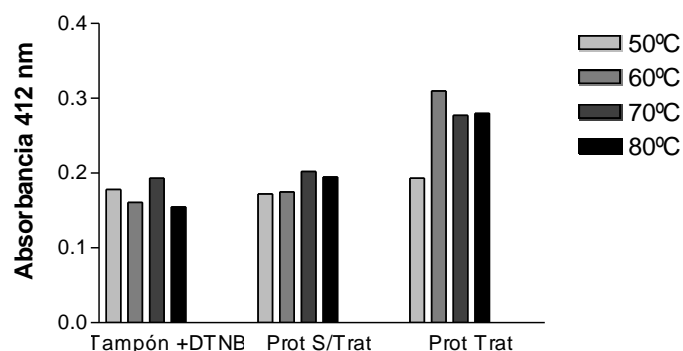
#### 6.4.3.2 Determinación de condiciones térmicas para desplegar el enzima PME

Debido a que la estructura de PME es muy compacta, se cree que el acceso de enzimas para hidrolizar los enlaces peptídicos puede resultar complicado (Shipra et al., 2002). Por ello, existe la hipótesis de que al romper los puentes disulfuro que conforman la estructura terciaria de la proteína se obtendría un enzima más desplegado y, por tanto, las proteasas podrían acceder mejor.



**Figura 22.** Estructura 3D del enzima PME (Shipra et al, 2013).

El método colorimétrico de Ellman permite conocer de forma indirecta el desplegamiento de la estructura terciaria mediante la absorbancia a 412nm de los grupos sulfhidrilo libres de la muestra. Debido al pequeño volumen que se obtiene en las purificaciones de cada una de las fracciones, fue necesario recurrir a la segunda purificación para llevar a cabo las pruebas con proteasas. Habiendo comprobado la existencia de dos enzimas de diferente termorresistencia, con pesos moleculares de 40KDa en el caso de la forma lábil y de 35KDa la forma resistente, se decidió trabajar con la fracción termorresistente 41/42.



**Figura 23.** Absorbancia a 412nm de la fracción termorresistente 41-42 mediante el método Ellman del tampón fosfato base con DTNB, de la proteína control sin tratar para cada una de las condiciones de tratamiento y de la proteína tratada 10 minutos a 50°C, 60°C, 70°C y 80°C.

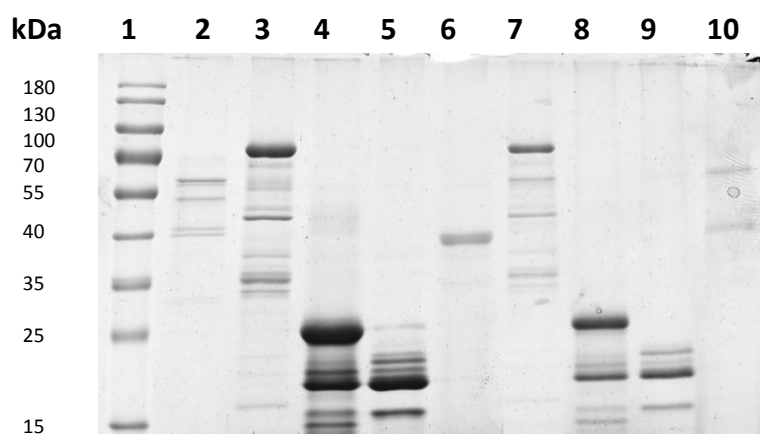
La muestra de PME purificada puede contener de forma natural grupos sulfhidrilo libres (-SH), por ello la absorbancia de la muestra sin tratar como medida control es relevante para conocer las condiciones a las que se produce el desplegamiento del enzima. Del mismo modo sucede con la absorbancia del reactivo y del tampón necesario para la determinación, pudiendo observarse que coincide en todos los casos con la de la proteína sin tratar. Esto indicaría que la señal producida cuando no se da un tratamiento térmico,  $0,189 \pm 0,013$ , no se debe a grupos -SH libres.

De manera contraria, cuando se trata la muestra con calor se puede apreciar la existencia de grupos sulfhidrilo libres a partir de 60°C, temperatura a la que comienza la inactivación por calor demostrada anteriormente en los tratamientos anisotérmicos.

El calor produce el desplegamiento de la estructura terciaria, sin embargo, una temperatura elevada puede dar lugar a la agregación de las proteínas. Esto es lo que podría haber ocurrido al tratar a 70 y 80°C ya que la absorbancia es menor a la obtenida a 60°C ( $0,313 \pm 0,002$ ).

#### **6.4.3.3 Estudio de la resistencia de la fracción mayoritaria de PME al tratamiento con proteasa**

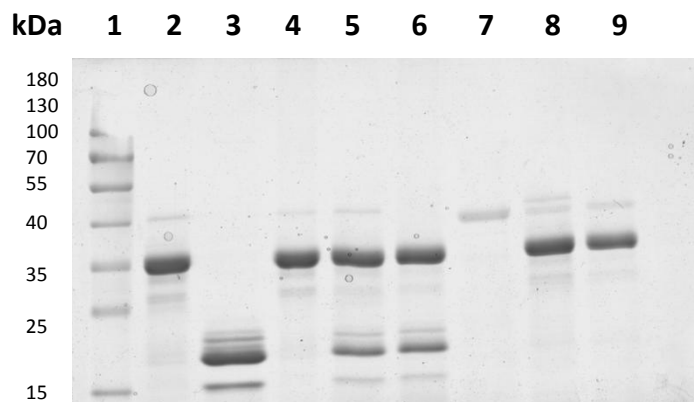
Una vez conocida la actividad enzimática de las proteasas a utilizar en las condiciones estudiadas y un tratamiento térmico que permite romper puentes disulfuro (S=S), se llevó a cabo el tratamiento con proteasa. Para ello se incubaron tanto la isoenzima termoestable como un sustrato control, la catalasa, en una relación 10:1 con las diferentes proteasas a 30°C durante 2 horas a pH 5,15. Con el fin de comprobar si un tratamiento térmico anterior al enzimático permite mayor acceso a las proteasas y, por tanto, mayor grado de hidrólisis de la PME, se calentó la muestra a 60°C durante 10 minutos, a la luz de los resultados obtenidos anteriormente.



**Figura 24.** Electroforesis en gel de poliacrilamida 12%, pH 5,15 en el que se observa el resultado del tratamiento de catalasa con proteasa durante 2 horas a 30°C teñido con Azul de Coomasie. [1-Marcador de pesos moleculares, 2-Catalasa. 3-*Rhizopus spp.*, 4-Páncreas. 5-Tripsina. 6-Pepsina. 7-Catalasa y *Rhizopus spp.*, 8-Catalasa y Páncreas. 9-Catalasa y Tripsina. 10-Catalasa y pepsina.]

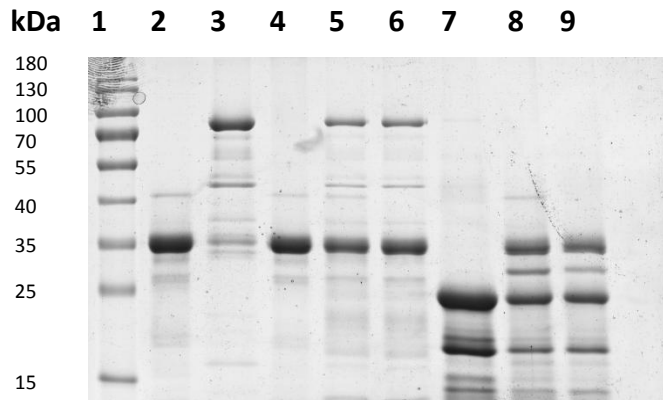
Se puede observar en la figura que la preparación de catalasa presenta tres bandas principales entre 40 y 70KDa (54 según Jeoung J. et al, 2007). Estas quedan hidrolizadas totalmente por las diferentes proteasas a excepción de la pepsina que, debido a su baja actividad, solo hidroliza parcialmente el sustrato control apareciendo una banda entre los 55 y 70KDa.

Una vez comprobado que las proteasas actúan sobre el sustrato control, se procedió al tratamiento de la isoenzima de PME con enzimas proteolíticas.



**Figura 25.** Electroforesis en gel de poliacrilamida 12%, pH 5,15 en el que se observa el resultado del tratamiento de PME termorresistente con pepsina y tripsina durante 2 horas a 30°C teñido con Azul de Coomassie. [ 1-Marcador de pesos moleculares, 2-Fracción PME. 3-Pepsina. 4-Fracción PME tratada térmicamente. 5-PME sin tratar y pepsina. 6- PME tratada y pepsina. 7-Tripsina. 8- PME sin tratar y tripsina. 9- PME tratada y tripsina]

La figura 25 muestra que la fracción de PME nativa y la tratada térmicamente presentaron el mismo perfil, de forma que se elimina cualquier sesgo debido al calor. Por otra parte, cuando se trata la isoenzima con las dos proteasas que presentaron la menor actividad, se observa que no se consigue la proteólisis de la PME después de 2 horas de tratamiento. Así mismo, el resultado que se obtiene cuando se realiza un tratamiento térmico previo es el mismo.



**Figura 26.** Electroforesis en gel de poliacrilamida 12%, pH 5,15 en el que se observa el resultado del tratamiento de PME termorresistente con proteasa de *Rhizopus spp.* y de páncreas durante 2 horas a 30°C teñido con Azul de Coomassie. [ 1-Marcador de pesos moleculares, 2-Fracción PME. 3-*Rhizopus spp.*, 4-Fracción PME tratada térmicamente. 5-PME sin tratar y *Rhizopus spp.*, 6- PME tratada y *Rhizopus spp.*, 7-Páncreas. 8- PME sin tratar y páncreas. 9- PME tratada y páncreas]

Al comparar el gel de electroforesis obtenido al tratar la fracción de PME termorresistente con proteasa de *Rhizopus spp.* o de páncreas, los dos enzimas proteolíticos con mayor actividad a pH 5,15, se puede observar que los resultados son diferentes a los obtenidos anteriormente.

El tratamiento resulta insuficiente en el caso de la proteasa de *Rhizopus spp.* ya que no se observa la desaparición de bandas de la proteína objetivo. Sin embargo, en el caso de la proteasa de páncreas se observa que, independientemente del tratamiento térmico previo, se produce una hidrólisis parcial del enzima PME. La aparición de una banda con un peso molecular aproximado de 25KDa distinta al perfil obtenido para la proteasa y para el enzima PME nativo permite deducir un resultado positivo en el uso de este método.

Debido al último resultado, se decidió comprobar la reducción de actividad PME al tratar la fracción termorresistente con proteasa de páncreas bovino. Tanto con un tratamiento previo con calor, como en el únicamente incubado con el enzima proteolítico, la actividad se redujo en un  $30\% \pm 0,05$  respecto al valor de la enzima pura.

Esto parece indicar que el tratamiento proteolítico de PME podría resultar viable para conseguir una reducción de su actividad y, por consiguiente, reducir las alteraciones en zumos. No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo distan de las condiciones en las que se procesa el zumo. Sería necesario explorar por tanto, enzimas activos con capacidad de actuar a temperaturas de refrigeración y/o en alimentos reales.



## **7. Conclusiones**

De la presente investigación se puede extraer una conclusión general: Existe una tecnología distinta al calor, el tratamiento con proteasas, que inactiva parcialmente el enzima de referencia escogido en esta exploración, la PME.

Al margen de esta conclusión general también pueden extraerse varias conclusiones parciales:

- Existen al menos 2 fracciones de PME en zumo de tomate que presentan diferente termorresistencia, coincidiendo la más lábil con un peso molecular de 40KDa y la más estable con 35KDa.
- La resistencia presentada por el enzima PME extraído no difiere cuando se cambia el medio de tratamiento, tomate o tampón.
- Los tratamientos de manotermosonicación y pulsos eléctricos utilizados no son eficaces en la reducción de actividad PME en tomate siendo necesarias condiciones no viables industrialmente.
- El tratamiento enzimático con proteasa de páncreas bovino resulta levemente eficaz en la hidrólisis del enzima PME obteniéndose una banda de 25KDa y una reducción de la actividad PME del 30% en las condiciones estudiadas. No se observan diferencias significativas en la susceptibilidad a la proteólisis al realizar un tratamiento térmico previo al tratamiento con proteasa.

## **8. Referencias Bibliográficas**

- Anthon, G.E. y Barrett D.M. (2002) Kinetic parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14): 4119-4125.
- Agcam, E., Akyıldız A., y Akdemir Evrendilek, G. (2014) Effects of PEF and heat pasteurization on PME activity in orange juice with regard to a new inactivation kinetic model. *Food chemistry*, 165: 70-76.
- Álvarez I., Raso J., Condón S., Monfor S. y Saldaña G. (2012) Effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of Salmonella Typhimurium and Escherichia coli O157:H7 by pulsed electric fields. *El Sevier*. 45 (2). P.1080-1086
- Avilés, et al. (1994) Activación de precursores de proteínas. *Research Bulletin*, 100 (210): 74-81.
- Basak, S. (1997) Ultra high pressure treatment of orange juice: A kinetic study of inactivation of pectin methyl esterase. *Elsevier Science*, 29 (7): 601-607.
- Burgos, J., Condón, S., López, P., Ordoñez, J., Raso J. y Sala, F.J. (1994) Sterilization by Manothermosonication. *Journal of Dairy Science*, 80 (1): 29-36.
- Carbonell, J.V., Contreras P., Carbonell L. y Navarro J. L. (2005) Pectin methylesterase activity in juices from mandarins, oranges and hybrids. *European Food Research and Technology*, 222 (1-2): 83-87.
- Castaldo D., et al. (1996) Presence of residual pectin methylesterase activity in thermally stabilized industrial fruit preparations. *LWT-Food Science and Technology*, 30 (5): 479-484.
- Condón S., Raso J., Álvarez I., Saldaña G. y Monfort S. (2012) Inactivation of Salmonella spp. In liquid whole egg using pulsed electric fields, heat and additives. *El Sevier*. 40 (2): 393-399.

- Coll, L. (1996) Polisacáridos estructurales y degradación enzimática de la membrana carpelar de mandarina satsuma. Pelado enzimático de los segmentos. Tesis doctoral, Universidad de Murcia, CEBAS-CSIC.
  
- Ellman, G. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82: 70–77.
  
- Evrendilek G.A. y Zhang Q. H. (2005) Effects of pulse polarity and pulse delaying time on pulsed electric fields-induced pasteurization of *E. coli* O157:H7. *Journal of Food Engineering*, 68: 271–276.
  
- Fachin D., et al. (2002) Comparative study of the inactivation kinetics of pectinmethylesterase in tomato juice and purified form. *Biotechnology progress*, 18: 739-74.
  
- Fennema (2002) Química de los Alimentos. 2da. Edición. Ed., Acribia S.A. Zaragoza, España.
  
- Flourey J, et al. (2006) Continuous processing of skim milk by a combination of pulsed electric fields and conventional heat treatments: does a synergetic effect on microbial inactivation exist? *Lait*, 86: 203–211.
  
- Food and Drug Administration (FDA) (2001) Hazard analysis and critical control point (HACCP) procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice; final rule. *Federal Register*, 66. FR 6137-6202.
  
- Food and Drugs Administration (FDA) (2010) FDA Recommended Pasteurization Time/Temperatures. Penn State University, Pensilvania, EE.UU.
  
- Gaffe, J., Tieman, D. y Handa, A.K. (1994) Pectin methylesterase isoforms in tomato (*Lycopersicum esculentum*) tissues. Effects of expression of a pectin methylesterase antisense gene. *Plant Physiology*, 105: 199-203.

- Heinz V., et al. (2003) Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4: 167-175.
- Hendrickx M., Verachtert B. y Van Loey A. (2001) Effects of high field pulses on enzymes. *Trends in Food Science & Technology*, 12 (3-4): 94-102.
- Jeoung, J. et al. (2007) HTHP: A novel class of hexameric, tyrosine-coordinated heme proteins. *Journal of molecular biology* 368 (4): 1122-1131.
- Johansson, K., et al. (2002) Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS letters* 514 (2): 243-249.
- Jolie, R. P. (2009) Carrot pectin methylesterase and its inhibitor from kiwi fruit: Study of activity, stability and inhibition. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4): 601–609.
- Laratta, B., Loidice, R., Giovane, A., Quagliuolo, L., Servillo, L. y Castaldo, D. (1995) Thermostability of three pectinesterase isoenzymes in tomato fruit. *Food Chemical Journal*, 52: 414-418.
- Leclere, L., Van Cutsem, P. y Michiels C. (2013) Anti-cancer activities of pH-or heat-modified pectin. *Front Pharmacol* 4 (128): 1-8.
- López, P., De la Fuente J.L. y Burgos, J. (1994) Temperature dependence of lipoxygenase heat inactivation; evaluation with linearly increasing temperature profiles. *Z Lebensm Unters Forsch*, 199: 281-284.
- López, P. y Burgos, J. (1995) Lipoxygenase inactivation by manothermosonication: Effects of sonication physical parameters, pH, KCl, sugars, glicerol and enzyme concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 620-625.
- López P., Sanchez A.C., Vercet, A. (1997) Thermal resistance of tomato polygalacturonase and pectinmethylesterase at physiological pH. *Z.Lebensm Unters Forsch*, 20): 146-150.

- López, P., Sala, F.J., de la Fuente, J.L., Condón, S., Raso, J. y Burgos, J. (1998) Inactivation of peroxidase, lipoxygenase and polyphenol oxidase by manothermosonication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 252-256.
  
- McDonald C.J, et al. (2000) Effects of pulsed electric fields on microorganisms in orange juice using electric field strengths of 30 and 50 kV/cm. *Journal of Food Science*, 65: 984-989.
  
- Menéndez-Aguirre, O. (2006) Cambios en la actividad de  $\alpha$ -amilasa, pectinmetilesterasa y poligalacturonasa durante la maduración del *Maracuyá Amarillos* (*Passiflora edulis* var. *Flavicarpa* Degener). *Interciencia*. 31 (10): 728-733.
  
- Micheli, F. (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in plant science*, 6 (9): 414-419.
  
- Montero, R., (1955) La electroforesis: sus fundamentos. *Revista chilena de pediatría*. 1 (2): 31-34.
  
- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia R.M. y Martín-Belloso, O. (2007) Influence of treatment time and pulse frequency on *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* populations inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 192-200.
  
- Nath, N., Rao, A. y Gupta, R.G. (1983) Thermal resistance of pectin methyl esterase in juice of pusa-ruby tomatoes. *Indian Food Packer*, 37 (5): 30-38.
  
- Osorio, O., Martinez-Navarrete, G., Moraga G. y Carbonell J. V. (2008) Effect of thermal treatment on enzymatic activity and rheological and sensory properties of strawberry purees. *Food Science and Technology International*, 14 (5): 103-108.
  
- Polydera, A.C., Galanou E., Stofors N.G. y Taoukis P.S. (2004) Inactivation kinetics of pectin methylesterase of greek Navel orange juice as a function of high hydrostatic

- pressure and temperature process conditions. *Journal of Food Engineering* 62 (3): 291-298.
- Puértolas E., López N., Raso J. y Álvarez I. (2007) Inactivación mediante pulsos eléctricos de alto voltaje de levaduras implicadas en la alteración del vino. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza, España.
  - Puski, G. (1975) Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment (Protease preparation from *Aspergillus oryzae*). *Cereal Chemistry*, 52: 655 – 664.
  - Reina L.D. et al. (1998). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in milk by pulsed electric field. *Journal of Food Protection*, 61: 1203-1206.
  - Saldaña, G et al. (2011) Defining treatment conditions for pulsed electric field pasteurization of apple juice. *International journal of food microbiology*, 151 (1): 29-35.
  - Saldaña G., Jaeger H., Raso J., Álvarez I. and Meneses N. (2013) Modelling of polyphenoloxidase inactivation by pulsed electric fields considering coupled effects of temperature and electric field. *El Sevier* 20: 126-132.
  - Sharma, S.K, (2003) Ingeniería de Alimentos. Operaciones Unitarias y Prácticas de Editorial Limusa. México.
  - Shipra G.,Singh R.K., and Mishra S. (2013) Research Article In silico Study of Pectin Methylesterase in *Musa acuminata* for Delayed Ripening. Department of Biotechnology and Microbiology. Institute of Foreign Trade and Management, Moradabad UP, India.
  - Sekine Y., Wakayama T., Barrett D. (2002) Thermal Inactivation of Pectin Methylesterase in Tomato Homogenate. University of California (EE.UU.) and Nippon Del Monte (Japan).
  - Soliva-Fortuny, R., Balasa, A., Knorr D. y Martín-Belloso O. (2009) Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 20 (11): 544-556.

- Timmermans R.A.H., Mastwijk H.C., Knol J.J., Quataert M., Vervoot L., Matser A.M. (2011) Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part I: Impact on overall quality attributes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12 (3): 235-243.
  
- Tucker, G.A., Robertson, N.G. y Grierson, D. (1982) Purification and changes in activities of tomato pectinesterase isoenzyme. *Journal of Science Food Agriculture*, 33: 396-400.
  
- Vercet, A. (1998) Inactivación de enzimas termorresistentes y producción de radicales libres por manotermosonicación. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. España
  
- Versteeg, C. (1979) Pectinesterases from the orange fruit purification, general characteristics and juice cloud destabilizing properties. Tesis Doctoral. Wageningen, Holanda.
  
- Whitaker, J. (1994) Principles of enzymology for the food science. 2ed. Dekker, EE.UU. P. 225.
  
- Wong, D.W S. (1995) Food enzymes. Structure and mechanisms. Chapman Hall. New York, USA. P.212-236.
  
- Wouters, P.C., Álvarez, I, Raso, J. (2001) Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Science and Technology* 12: 112-121.