

CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA POLIFENOL OXIDASA DEL BANANO *GROS MICHEL* EN DIFERENTES ESTADOS DE MADURACIÓN

ENZYME KINETICS OF POLYPHENOL OXIDASE FROM *GROS MICHEL* BANANA THROUGH DIFFERENT MATURATION STAGES

Claudia L. GARCÍA W.^{1*}, Germán A. GIRALDO G.¹, Hernando HURTADO T.¹ y Carlos O. MENDIVIL²

Recibido: Abril 24 de 2006 Aceptado: Octubre 3 de 2006

RESUMEN

La postcosecha del banano se acompaña de múltiples reacciones enzimáticas, causantes de la degradación de almidones y clorofila, de la síntesis de azúcares y carotenos, y de los cambios en la acidez, ablandamiento de tejidos y pardeamiento enzimático. Este pardeamiento es causado por la acción de la Polifenol Oxidasa (PFO) sobre los fenoles contenidos en el fruto y es considerado un cambio indeseable por el consumidor. Con el objeto de determinar el momento de mínima actividad enzimática para lograr su óptimo procesamiento, se caracterizó la variedad *Gros Michel* en diferentes estados de maduración, en cuanto a su color, textura, actividad de agua, humedad y grados Brix, y luego se midió la cinética enzimática, aprovechando la formación del color café durante el pardeamiento, empleando un espectrofotómetro de UV-visible a 420nm. También se cuantificó la cantidad de proteína (enzima) mediante el método de Bradford (lectura a 595nm). Una vez identificadas las cinéticas de cada estado de maduración, se hizo una comparación entre cada uno de los grupos mediante la técnica estadística de Análisis de Varianza con Medidas Repetidas en el tiempo, que mostró una marcada diferencia, estadísticamente significativa, entre los bananos de menor y mayor estado de maduración en forma decreciente, y se encontró el punto mínimo de actividad de la enzima en los estados más avanzados de maduración.

Palabras Clave: postcosecha, banana, Polifenoloxidasa, pardeamiento, procesamiento.

ABSTRACT

The post harvest of banana is accompanied by multiple enzymatic reactions, which cause the degradation of starches and chlorophyll, the synthesis of sugars and carotenenes, changes in the acidity, tissue softening and enzymatic browning. This browning is caused by the action of the Polyphenoloxidase (PPO) on the phenols contained in the fruit and is considered an undesirable change by the consumer. To determine the time of minimum enzymatic activity in order to obtain its optimal processing, the variety *Gros Michel* was characterized in colour, texture, activity of water, humidity and Brix degrees; then its enzyme kinetics were studied by measuring the formation of brown colour with an UV-visible spectrophotometer at 420nm. The amount of total protein (enzyme) was also quantified by the Bradford method (reading at 595 nm). Once the kinetics of each maturation stage were identified, a comparison was made among each of the groups by means of Repeated Measures Analysis of Variance, showing a marked and statistically significant difference among banana of young and old maturation stages in a decreasing manner, finding the minimum point of activity of the enzyme in the most advanced maturation stages.

Key words: postharvest, banana, Polyphenoloxidase, browning, processing.

1 Programa de Química. Universidad del Quindío. Calle 12 Norte Cra 15, Armenia, Colombia.

2 Universidad Nacional de Colombia. Ciudad Universitaria. Transversal 38 N° 40-01. Bogotá, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: clgwagner@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

Colombia es el tercer productor mundial de banano con un área cultivada aproximada de 30.000 Ha (1), de las cuales aproximadamente 500.000 toneladas son de banano *Gros Michel* (*Musa AAA Simmonds*), principalmente para el consumo nacional (2). Las pérdidas durante la cosecha y postcosecha de banano se han estimado en 50.000 toneladas/año, equivalentes a más del 10% de la producción nacional (1), lo que afecta seriamente la economía del país.

Los bananos son susceptibles de daño mecánico durante la cosecha, transporte, almacenamiento o procesamiento; dichos cambios causan estrés físico que afecta los tejidos de la planta y altera el metabolismo fenólico (3). Las enzimas son activadas al momento de la cosecha (4), por lo tanto, durante la maduración se producen cambios en la actividad enzimática que alteran las estructuras subcelulares.

El pardeamiento enzimático en los tejidos ha sido atribuido a la actividad de la polifenol oxidasa (PFO), una cobreproteína que actúa en los compuestos fenólicos, causando su oxidación y polimerización con el consecuente desarrollo de un color café (3) como se muestra en la Figura 1. Dado a que el color es un atributo importante en las comidas, un cambio en él puede señalar otras alteraciones y, además, reducir la aceptabilidad del consumidor (5).

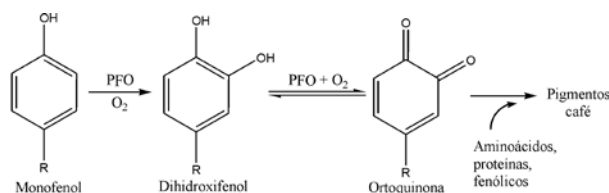


Figura 1. Acción de la PFO sobre los compuestos fenólicos

Para conocer a fondo las causas y efectos de dicha enzima, algunos investigadores han hecho estudios sobre el manejo pre y postcosecha de muchos frutos como manzanas, peras, duraznos, uvas, aguacates, papas, hojas de té (6), donde se ha estudiado el efecto de la polifenol oxidasa (PFO). Para analizarla se emplean métodos como la medición de la absorción de oxígeno, la desaparición de compuestos fenólicos, la formación de un intermediario en la reacción, o la formación del color café mediante espectrofotometría.

El objetivo de este trabajo es caracterizar los frutos fisicoquímicamente y analizar la cinética enzimática de la Polifenol Oxidasa del banano *Gros Michel* en la postcosecha a través de sus estados de maduración, empleando métodos espectrofotométricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

El estudio se realizó con frutos de banano *Gros Michel* cultivados en la finca La Judea, vereda Riobamba, ubicada al norte de Armenia, departamento del Quindío, a una altitud de 1560 m.s.n.m. Las muestras seleccionadas se almacenaron a temperatura ambiente hasta alcanzar diferentes grados de maduración. Cada fruto se caracterizó en color, grados Brix, textura, actividad de agua y humedad, en el Laboratorio Diseño de Nuevos Productos, de la Universidad del Quindío.

Actividad de la enzima PFO

La actividad enzimática se determinó con base en el método propuesto por Montgomery y Sgarbieri. Se tomaron 4 g de pulpa, se homogenizaron con 0.4 gramos de polivinilpirrolidona y 20 mL de buffer de fosfato (pH 6.5), luego se filtraron y centrifugaron a 12000 rpm durante 20 minutos a 0°C. Se mezcló 1 mL del extracto de enzima con 4 mL de catecol como sustrato y se leyó su absorbancia a 420nm durante 10 minutos cada 30 segundos.

Cuantificación de la concentración de proteína (enzima)

La cuantificación de la proteína se determinó por el método de Bradford (7), el cual cuantifica la unión del colorante Azul de Coomassie a una proteína desconocida y se compara con el estándar de diferentes concentraciones de proteína suero de albúmina bovina (BSA).

Análisis fisicoquímico

La masa se determinó por gravimetría en una balanza analítica con tres cifras significativas. La humedad, secando las muestras en un horno a 60°C hasta peso constante según el método 20013 del AOAC (8). La textura, con un texturómetro Bertuzzi. La actividad de agua (a_w), con un higrómetro de punto de rocío (Decagón), el color con un colorímetro Minolta C-10, y los grados Brix con un refractómetro Bertuzzi.

Análisis estadístico

La técnica estadística para evaluar los resultados de las comparaciones entre los grupos fue “Análisis de Varianza con Medidas Repetidas en el Tiempo”; se aplicaron además pruebas de esfericidad de la varianza (Mauchly), corrección de grados de libertad por Greenhouse-Geisser y comparaciones por pares de curvas con las pruebas de Bonferroni y t de Dunnet. Para el procesamiento de la información se utilizó el software SPSS para Windows versión 12.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del fruto fresco

La pulpa de banano *Gros Michel* en estado fresco se caracterizó en los diferentes estados de maduración, obteniendo los siguientes resultados.

Color: El color del fruto es un indicador del estado de desarrollo o maduración a lo largo de la postcosecha, el cual se relaciona directamente con los grados Brix. La medida del color se expresa como luminosidad y croma, entre otros; la luminosidad se analiza en la figura 2.

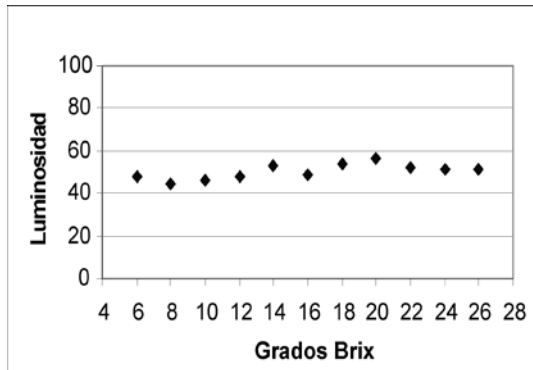


Figura 2. Variación de la luminosidad del banano a lo largo de sus estados de maduración.

La luminosidad presenta una leve variación, incrementándose al avanzar la maduración, pero luego decrece hasta alcanzar niveles cercanos al estado inicial. Esta variación se debe probablemente al aumento del color amarillo en la cáscara durante el período de maduración, y decrece con la aparición de manchas debidas al deterioro del banano (9).

En la figura 3 se observa el análisis del croma, donde se aprecia la influencia que tiene el color a lo largo de la maduración.

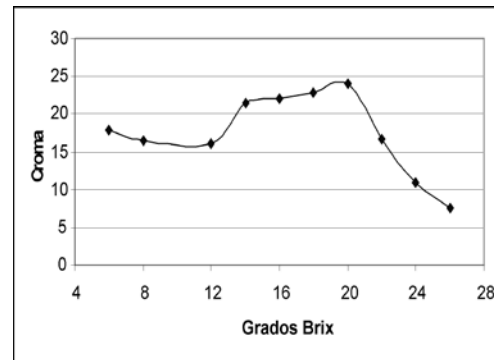


Figura 3. Variación del croma del banano a lo largo de sus estados de maduración.

En ésta se observa una tendencia a la homogeneidad hasta los 12 °Brix, lo que corresponde a los dos primeros estados de maduración, a partir de los cuales se incrementan, generando otra área constante entre 14 y 20 °Brix, luego desciende en forma constante hasta el final de la maduración. Esta variación del croma se debe posiblemente a los cambios en el color, ya que va del verde al café, pasando por el amarillo (10).

Textura: Los cambios en la textura del banano *Gros Michel* se aprecian en la figura 4. El descenso que se observa en la textura de la pulpa del fruto a través de los diferentes grados Brix, se puede atribuir a la acción de la maduración, por incremento en los niveles de etileno y de otros catalizadores metabólicos, que causan la degradación de la pectina y de los almidones, y el aumento de los azúcares. Estos cambios originan un debilitamiento de la estructura de la lámina media, permitiendo una mayor movilidad celular y, por ende, una mayor fluidez de líquidos intracelulares (9). Este comportamiento se observa en la figura anterior, donde el cambio en la textura es muy leve al inicio de la maduración porque el fruto está verde, pero de ahí en adelante la estructura se debilita por la maduración hasta llegar a la senescencia, efecto causado por la degradación de la protopectina en pectina y en ácido galacturónico.

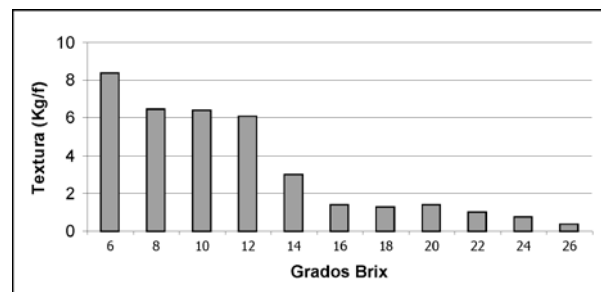


Figura 4. Textura de la pulpa de banano en sus diferentes estados de maduración.

Humedad: La humedad en la fruta es alta por las condiciones estructurales en la célula y por la fisiología del fruto. Los niveles de humedad del banano *Gros Michel* en la postcosecha se aprecian en la figura 5.

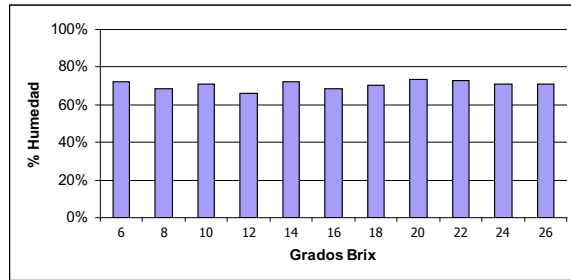


Figura 5. Porcentaje de humedad del banano *Gros Michel* a lo largo de sus estados de maduración.

Se aprecian unos niveles de humedad del banano *Gros Michel* superiores al 65%, pero con poca variabilidad significativa a lo largo de la postcosecha porque a que los cambios fisiológicos y bioquímicos ocurren en toda la fruta. Si la fruta se conserva bajo condiciones adecuadas: se espera mantener el equilibrio osmótico y difusional entre los metabolitos tanto en la pulpa como en la cáscara, (9,11).

Actividad de agua: Los análisis de la a_w de los frutos frescos a lo largo de las variaciones en la postcosecha se aprecian en la figura 6. La figura muestra una mínima variación en los estados de maduración, posiblemente por los errores experimentales, pero en condiciones normales de conservación, la humedad relativa del ambiente y la actividad del agua, así como el sistema difusional y osmótico se mantienen en equilibrio, permitiendo un desarrollo adecuado de la maduración y la percibibilidad del fruto.

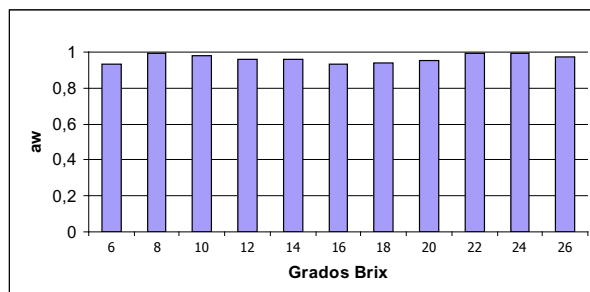


Figura 6. Actividad de agua del banano *Gros Michel* a lo largo de sus estados de maduración.

Cinética enzimática

Las muestras del banano *Gros Michel* se evaluaron en la cinética correspondiente a la Polifenol Oxidasa (PFO) en función del tiempo. La

absorbancia del extracto enzimático se relacionó con la concentración de la proteína y se determinó el valor relativo de la enzima en cada tiempo y en cada tratamiento, valores en unidades de PPO por mg de proteína extraíble, que al graficarlos contra el tiempo muestran una tendencia creciente que se estabiliza o decrece poco con el tiempo. El banano, en su periodo de postcosecha, presentó el comportamiento representado en la figura 7.

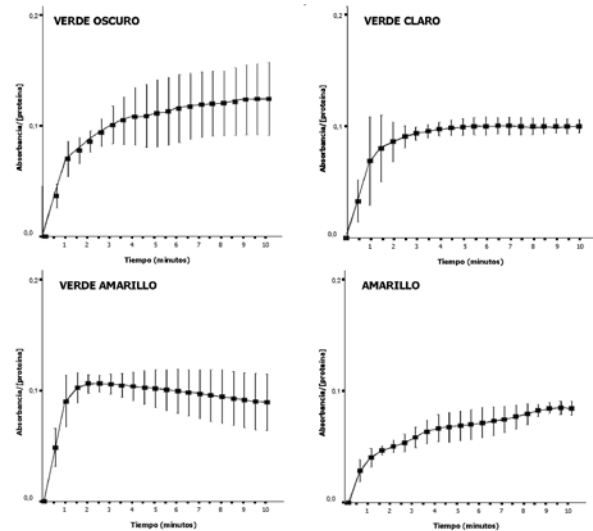


Figura 7. Cinética enzimática de la PFO en los diferentes estados de maduración del banano.

Las gráficas de la figura 7 muestran la cinética enzimática descrita por Michaelis-Menten; aunque la ecuación común representa la cinética de una enzima en función de la concentración del sustrato a tiempo constante, en este caso se muestra la absorbancia de la enzima en relación con el tiempo con una concentración de sustrato constante en tiempo cero (11, 12). El análisis muestra que la cinética difiere significativamente de unos grados de maduración a otros, porque la actividad enzimática de la PFO decrece a medida que se incrementa la maduración, y además se da la aparición de compuestos que se enmascaran este tipo de enzimas (la putrescina ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$) y cadaverina ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$) que existen libres o combinadas con diversos compuestos fenólicos), por lo que se modificaría la cinética al incrementar la maduración; probablemente dichas porfirinas se conjugan con los polifenoles formando un compuesto que no hace fácil el reconocimiento de la PFO en el espectrofotómetro (13).

Al observar las curvas promedio de los diferentes estados de maduración y analizarlas bajo criterios estadísticos, no parece existir una clara diferenciación

en la actividad de PFO a lo largo del tiempo ya que los intervalos de confianza de las diferentes curvas pueden superponerse unos con otros; sin embargo, se observa que en los primeros 6 minutos la actividad es menor para los bananos de color amarillo.

Análisis Estadístico

Antes de probar estadísticamente los resultados sugeridos, es necesario verificar el supuesto de esfericidad de la varianza:

Como se puede ver en la tabla 1, la prueba dio significativa, lo que quiere decir que el supuesto de esfericidad de la varianza no se cumple. Por lo tanto, de ahora en adelante se interpretarán las significancias calculadas con la Corrección de grados de libertad (g.l.) de Greenhouse-Geiser.

Tabla 1 Prueba de esfericidad de Mauchly para todos los Grados Brix

Prueba de esfericidad de Mauchly(b)				
Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Chi-cuadrado	gl	Significación
ABS_PROT	7,17742E-28	946,897	209	0,000

La interacción entre el tiempo (la variable ABS_PROT combina las mediciones de absorbancia/concentración de proteína en el tiempo) y los grados Brix es significativa, como aparece en la tabla 2. Esto demuestra que los grados Brix (que se relacionan con el grado de maduración) de los bananos tienen una relación significativa en el comportamiento de la actividad enzimática a lo largo del tiempo; es así como al aumentar los grados Brix se da una disminución en la actividad enzimática.

Tabla 2. Valoración de los efectos utilizando todos los grados Brix de efectos intra-frutos con la corrección de grados de libertad de Greenhouse-Geiser

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
ABS_PROT	Esfericidad asumida	,395	20	,020	1326,712	,000
	Greenhouse-Geisser	,395	3,622	,109	1326,712	,000
	Huynh-Feldt	,395	6,396	,062	1326,712	,000
	Límite-inferior	,395	1,000	,395	1326,712	,000
ABS_PROT * GRAD_BX	Esfericidad asumida	,195	200	,001	65,577	,000
	Greenhouse-Geisser	,195	36,225	,005	65,577	,000
	Huynh-Feldt	,195	63,960	,003	65,577	,000
	Límite-inferior	,195	10,000	,020	65,577	,000
Error(ABS_PROT)	Esfericidad asumida	,007	440	1,489E-05		
	Greenhouse-Geisser	,007	79,695	8,218E-05		
	Huynh-Feldt	,007	140,712	4,655E-05		
	Límite-inferior	,007	22,000	,000		

ABS_PROT*GRAD_B: absorbancia / concentración de la proteína, por los grados Brix

Al determinar la prueba de esfericidad de Mauchly para los estados de maduración con la tabla 3, se encuentra gran significancia, demostrando que el supuesto de esfericidad de la varianza no se cumple. De igual manera, al interpretar las significancias calculadas con la Corrección de grados de libertad (g.l.) de Greenhouse-Geiser, se obtiene como respuesta lo expresado en la tabla 4.

Tabla 3. Prueba de esfericidad de Mauchly para los estados de maduración

Prueba de esfericidad de Mauchly(b)				
Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Chi-cuadrado	gl	Significación
ABS_PROT	1,93718E-41	2076,446	209	0,000

ABS_PROT: absorbancia / concentración de la proteína

Tabla 4. Prueba de efectos intra-estados de maduración con la corrección de grados de libertad de Greenhouse-Geiser

Medida: MEASURE_1

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Medida cuadrática	F	Significación
ABS_PROT	Esfericidad asumida	,386	20	,019	73,613	,000
	Greenhouse-Geisser	,386	1,777	,217	73,613	,000
	Huynh-Feldt	,386	2,080	,185	73,613	,000
	Límite-inferior	,386	1,000	,386	73,613	,000
ABS_PROT * EST_MADU	Esfericidad asumida	,050	60	,001	3,166	,000
	Greenhouse-Geisser	,050	5,331	,009	3,166	,013
	Huynh-Feldt	,050	6,241	,008	3,166	,008
	Límite-inferior	,050	3,000	,017	3,166	,039
Error(ABS_PROT)	Esfericidad asumida	,152	580	,000		
	Greenhouse-Geisser	,152	51,529	,003		
	Huynh-Feldt	,152	60,333	,003		
	Límite-inferior	,152	29,000	,005		

ABS_PROT*EST_MADU: absorbancia / concentración de la proteína, por los estados de maduración

Se observa que la interacción entre tiempos y estados de maduración es significativa ($p=0,013$), es decir, el estado de maduración de un banano influye significativamente en el comportamiento de la actividad enzimática a lo largo del tiempo.

Para determinar si existe diferencia significativa entre grados de maduración, se hace una prueba de comparación de curvas (Prueba t de Dunnett).

En las comparaciones por pares de curvas, ajustando el error por el método de Bonferroni

expresado en la tabla 5, se nota que según los niveles de significancia encontrados ($p<0,001$), la diferencia del comportamiento de la enzima se da entre los grados de maduración más distantes u opuestos. Al comparar todas las curvas contra una curva “control” (la de verde oscuro y los menos maduros), mediante la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples contra un control, se confirmó que entre amarillo y verde oscuro existe una diferencia de $p<0,001$.

Tabla 5. Comparaciones por pares de curvas utilizando los cuatro estados de maduración

	(I) Estado de maduración	(J) Estado de maduración	Diferencia entre medias (I - J)	Error típ.	Significación	Intervalo de confianza al 95%.	
						Límite inferior	Límite superior
Bonferroni	Verde oscuro	Verde claro	,0119	,00882	1,000	-,0131	,0369
		Verde amarillo	,0084	,00789	1,000	-,0139	,0308
		Amarillo	,0367*	,00789	,000	,0144	,0590
	Verde claro	Verde oscuro	-,0119	,00882	1,000	-,0369	,0131
		Verde amarillo	-,0035	,00882	1,000	-,0285	,0215
		Amarillo	,0248	,00882	,053	-,0002	,0498
	Verde amarillo	Verde oscuro	-,0084	,00789	1,000	-,0308	,0139
		Verde claro	,0035	,00882	1,000	-,0215	,0285
		Amarillo	,0283*	,00789	,007	,0059	,0506
	Amarillo	Verde oscuro	-,0367*	,00789	,000	-,0590	-,0144
		Verde claro	-,0248	,00882	,053	-,0498	,0002
		Verde amarillo	-,0283*	,00789	,007	-,0506	-,0059
t de Dunnett (bilateral) ^a	Verde claro	Verde oscuro	-,0119	,00882	,410	-,0338	,0100
	Verde amarillo	Verde oscuro	-,0084	,00789	,591	-,0280	,0112
	Amarillo	Verde oscuro	-,0367*	,00789	,000	-,0563	-,0171

Basado en las medias observadas.

* La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

CONCLUSIONES

La cinética enzimática de la Polifenol Oxidasa, a través de los estados de maduración del Banano *Gros Michel*, se identificó con la ecuación de Michaelis-Menten y dio como resultado una diferencia significativa en términos estadísticos entre las curvas que representaban los diferentes estados, siendo el fruto de menor actividad de la enzima el que presentaba el mayor estado de maduración, lo que indica que esta se va degradando con la maduración.

Los análisis realizados para la extracción de la enzima y su cuantificación resultaron confiables, ya que las gráficas presentaron una tendencia expresada como la cinética enzimática de Michaelis-Menten.

El análisis de la cinética enzimática de la Polifenol Oxidasa del banano *Gros Michel* en la postcosecha en sus sucesivos estados de maduración dió como resultado una significativa diferencia, en términos estadísticos, de las curvas que representaban cada uno de los estados; esto quiere decir que la actividad enzimática en cada estado de maduración difiere de las demás, al igual que para cada grado Brix. Esto nos da respuesta al problema del pardeamiento, pues si se procesa un banano en el estado amarillo, cuando presenta la mínima actividad de la enzima, probablemente su producción industrial tendrá resultados óptimos.

Teniendo en cuenta el punto máximo de actividad de la enzima en cada estado de maduración, se encontró que el mejor momento para procesar el banano

es el estado final, más claramente a 22 °Brix punto en el que se registró la actividad enzimática más baja, correspondiente al punto de inflexión de la curva.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ochoa RH. Plátano y banano. En: Ruiz CR. Manual práctico de frutas. Temas de Orientación Agropecuaria. 7 edición. Bogotá: CORPOICA; 1987 p.189-91
- Giraldo G, Cayón G, Arcila MI. Postcosecha y agroindustria del plátano en el Eje Cafetero de Colombia. CORPOICA, Universidad del Quindío, ASIPLAT, Comité Departamental de Cafeteros del Quindío, COLCIENCIAS. Armenia: Fudesco 2000 267p
- Quinde Z, Ullrich SE, Baik BK. Genotypic variation in color and discoloration potential of barley-based food products. *Cereal Chemistry*. 2004; 81(6):752-758.
- Nelson D, Cox M. Lehninger: Principles of Biochemistry. Worth Publishers, New York. 2000.
- Vargas W. Fundamentos de Ciencia Alimentaria. 2ª edición. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. 1991 440p.
- Rapeanu G, Loey AV. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape. *Food Chemistry* En prensa.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72:248-254.
- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemist Official Methods of Analysis. Washington, D.C 1890.
- Giraldo G, Cayón G, Arcila M, Torres F. Cambios químicos durante la maduración del fruto de plátano dominico-hartón (*Musa AAB Simmonds*) asociados con el clima de la región cafetera central colombiana. *Corbana* 2000; 26(53):21-34.
- Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA. Biochemistry of Fruit Ripening. 1 edición. Londres: Chapman and Hall; 1993. 451p.
- Jiménez M, Giraldo G, Duque A. Comportamiento fisicoquímico y enzimático en la postcosecha del plátano dominico harton (*Musa AAB Simmonds*) en estado verde. *Revista Investigaciones* 2003(4):3. p.139-46.
- Miller DD. Química de alimentos: Manual de laboratorio. New Cork; Limusa Wiley. 2003. 173 p.
- Salisbury F, Ross C. Fisiología vegetal. 4ª edición. México: Grupo Editorial Iberoamérica; 1994. 759p.

