

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

EN LA CALIDAD DEL BROCOLI (*Brassica oleracea* var. *italica*) DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN CONGELACION.

POR

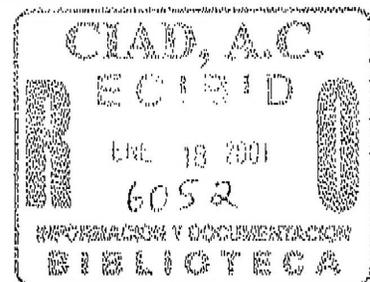
GERARDO TORRES GARCIA

TESIS APROBADA POR LA

COMISIÓN DE EXAMINADORES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN
Y DESARROLLO, A. C.

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS



Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.

**EFFECTO DEL ESCALDADO Y DEL ACONDICIONAMIENTO
TÉRMICO EN LA CALIDAD DEL BRÓCOLI (*Brassica oleracea*
var. Italica) DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN
CONGELACIÓN.**

POR

GERARDO TORRES GARCÍA

TESIS APROBADA POR LA

**DIRECCION DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN VEGETAL**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA.

DICIEMBRE DE 1999

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Gerardo Torres García, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



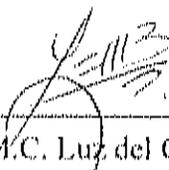
Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez

Director de Tesis

Dr. John R. Whitaker



Dra. Irasema Vargas Arispuro

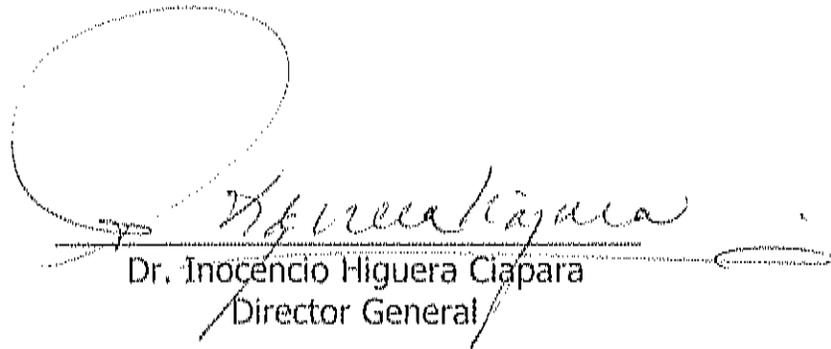


M.C. Luz del Carmen Montoya

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en estas tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de la tesis.



Dr. Inocencio Higuera Ciapara
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, por permitirme realizar uno de mis sueños. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme una beca para mis estudios de postgrado.

El presente trabajo formó parte del proyecto UC MEXUS-CONACYT "Manejo postcosecha y procesamiento de brócoli y coliflor" en colaboración con la Universidad de California en Davis.

Al Dr. Miguel Angel Martínez Téllez por su dirección, confianza y apoyo en este proyecto. Pero sobre todo, por distinguirme con su amistad.

A la Dra. Irasema Vargas Arispuro por sus valiosas observaciones y sugerencias en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. John R. Whitaker quien con su conocimiento y experiencia orientó gran parte del trabajo experimental.

A la M.en C. Luz del Carmen Montoya por todas sus aportaciones en el estudio de la peroxidasa. A la M. en C. Rosalba Troncoso, por su confianza en la etapa inicial de esta proyecto. A la Dra. Ana María Calderón de la Barea por sus enseñanzas y apoyo.

A mis compañeros, Víctor García, René Balandran, Ramón Dolores Valdez, y Guillermo Pérez con quienes compartí la experiencia de trabajar y desvelarme en el laboratorio y de quienes escuche siempre palabras de aliento. Por su amistad, Gracias.

En especial a la Q.B. Olivia Briseño por la ayuda brindada en el desarrollo de las técnicas. Pero sobre todo, por su amistad.

Aunque este lejos, gracias al M. en C. Albino Rodríguez por creer en mí. Al Ing. Arturo Ledezma Payán Gerente de manufactura del grupo Bimbo por las facilidades prestadas en la etapa final de este proyecto de tesis.

Muy especialmente a Don Román Gonzalez Gastelum y a la Sra. María Elena Ochoa por recibirme en su casa al llegar a este bello estado. Gracias por su confianza y amistad.

DEDICATORIA

Al quien fue, quien es y ha de venir a El sea toda la gloria y la honra.
A mi madre María por su grande y tierno amor.

A mis Padres:

Javier Torres Gutierrez de quien aprendí el valor del trabajo y la perseverancia.

A mi Madre María Trinidad García de Torres por su hermoso y comprensivo amor.

Espero se sientan orgullosos de mí.

A mis Hermanas Paty, Chely y en especial a mi hermana Olga por su apoyo y confianza y sobre todo por su amor. Gracias.

Y sobre todo a mi amada esposa Fabiola. Quien fue un impulso y un descanso en esos momentos en que todo parece difícil.

Te amo.

CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DEL AUTOR.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
CONTENIDO.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	3
Calidad y Escaldado.....	3
Normas de Calidad (USDA).....	3
Clasificación y Distribución de las Peroxidasas en Vegetales.....	5
Efecto de las Peroxidasas en Vegetales.....	7
Clasificación y Distribución de la Cistina Liasa en Vegetales.....	9
Efecto de la Cistina Liasa en Vegetales.....	10
OBJETIVO.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Material Vegetal.....	16
Manejo Postcosecha.....	16
Corte y Escaldado.....	17
Congelación y Almacenamiento.....	17
Metodología.....	18
Extracción.....	18

CONTENIDO (Continuación)

Reacción Estándar para Cuantificación de Ensayos de Actividad.....	18
Determinación de la Actividad de Peroxidasa.....	19
Determinación de la Actividad Cistina Liasa por Medio de la Formación de Dinitrofenilhidrazona.....	20
Determinación de la Actividad Cistina Liasa por Medio de la Formación de Tiocisteína.....	20
Cuantificación de Proteína	21
Medición de Color.....	22
Determinación de Textura.....	23
Diseño Estadístico.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
Efecto de la Temperatura y el Almacenamiento.....	24
Efecto de la Temperatura y el Almacenamiento Sobre la Actividad de Peroxidasa.....	24
Efecto de la Temperatura y el Almacenamiento Sobre la Actividad de Cistina Liasa Medida por el Método de Dinitrofenilhidrazona.....	32
Efecto de la Temperatura y el Almacenamiento Sobre la Actividad de Cistina Liasa Medida por la Formación de Tiocisteína.....	37
Efecto de la Temperatura y el Almacenamiento Sobre la Concentración de Proteína.....	41
Efecto de la Temperatura y el Almacenamiento Sobre la Textura.....	44
Efecto de la Temperatura y el Almacenamiento Sobre el Color.....	46
CONCLUSIONES.....	51
REFERENCIAS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.- Conversión enzimática de S-Metil Cisteina Sulfóxido.....	12
2.- Porcentaje de actividad residual de POD en floretes de brócoli sometidos a diferentes tratamientos térmicos y almacenados a -20°C durante 6 meses.....	29
3.- Efecto de los tratamientos térmicos sobre la actividad de POD En floretes de brócoli almacenados a -20°C	30
4.- Porcentaje de actividad residual de CL medida por el método de DNPH en floretes de brócoli sometidos a diferentes tratamientos térmicos y almacenados a -20°C durante 6 meses.....	34
5.- Efecto de los diferentes tratamientos térmicos sobre la actividad de CL medida por el método de DNPH en floretes de brócoli almacenados a -20°C	35
6.- Porcentaje de actividad residual de CL medida por el método de tiocisteína en floretes de brócoli sometidos a diferentes tratamientos y almacenados a -20°C durante 6 meses.....	38
7.- Efecto de los diferentes tratamientos térmicos sobre la actividad de CL medida por el método de tiocisteína en floretes de brócoli almacenados a -20°C	39

8.- Efecto de los diferentes tratamientos térmicos sobre la concentración de proteína en floretes de brócoli almacenados a -20°C y medida por el método de Biuret.....	42
9.- Efecto de los diferentes tratamientos térmicos sobre la textura en floretes de brócoli almacenados a -20°C . La textura se expresa como la resistencia a la punción en Newtons.....	46
10.- Efecto de los diferentes tratamientos sobre el color en floretes de brócoli almacenados a -20°C . El cambio de color se midió como diferencia total de color, tomando como referencia el producto fresco al inicio del experimental.....	49
11.- Efecto de los diferentes tratamientos sobre el color en floretes de brócoli almacenados a -20°C . El cambio de color está graficado a través del ángulo Hue.....	51

RESUMEN

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*) es una hortaliza de alto valor nutricional. Su consumo es en forma fresca o procesada. Esta hortaliza sufre cambios degradativos en el color, sabor y aroma debido a su alta velocidad de respiración y a la catálisis enzimática. Un proceso convencional empleado para disminuir la actividad enzimática, es el escaldado a 80°C o más, durante 3 y hasta 5 minutos, en donde se busca inactivar a las catalasas (CAT) y a las peroxidasas (POD). Investigaciones recientes sustentan la hipótesis de que la cistina liasa (CL) es la enzima responsable de la modificación del sabor y el aroma en el brócoli. A pesar de esto, se sigue empleando a la POD como enzima indicadora de calidad en su procesamiento, lo cual supone cambios desfavorables en la textura, color, sabor y aroma ya que es necesaria más temperatura para inactivar a la POD y la CAT que a la CL. Por lo anterior se compararon las características de calidad del brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*) procesado y congelado durante 6 meses, empleando a la CL y a la POD como enzimas indicadoras de calidad. Las actividades de POD y CL se midieron en floretes de brócoli escaldados a 85°C, 80°C y 75°C durante 3 minutos, y acondicionados a 68°C, 63°C y 58°C durante 2 minutos. Se estableció además, un grupo control el cual no recibió tratamiento térmico. Para conservar las características de calidad de los tratamientos, los floretes se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C durante 6 meses, de donde cada mes se tomaron muestras para analizar las actividades de POD y CL, así como para realizar las pruebas de firmeza y color. La actividad de CL se siguió a través de la formación de piruvato y tiocisteína. La actividad de POD se midió a través de la conversión de guaiacol a tetraguaiacol. La textura mediante el esfuerzo máximo a la punción y el color, determinando los parámetros de L* (luminosidad) y de a* , b* (chroma). Los resultados obtenidos en la actividad de POD indican que los escaldados a 85°C y 80°C durante 3 minutos fueron suficientes para reducir la actividad de la enzima frente al control POD al 0.15% y 7.5% respectivamente. Estos valores se han relacionado con floretes congelados de buena calidad.

(75°C, 68°C, 63°C y 58°C durante 3 minutos) tuvieron actividad con niveles en los que la actividad enzimática es superior al 12%, lo que se puede relacionar con pérdida de la calidad, la actividad (k CL medida por la inhibición de piruvato fue inhibida a 85°C y 80°C durante 3 minutos, durante el tratamiento la actividad k CL de los escaldados a 85°C, 80°C y 75°C durante 3 minutos permaneció con una actividad muy reducida durante los 6 meses de almacenamiento a -20°C. El resto de los tratamientos redujo la actividad de la clorofila durante 3 meses de almacenamiento, estableciendo niveles muy reducidos hasta el final del almacenamiento. La actividad de CL medida a través de la formación de tiocianato mostró un comportamiento similar tanto por el efecto de los tratamientos térmicos, como durante el almacenamiento en congelación. Se determinó la concentración de proteína por el método de Biuret y los resultados mostraron que los grupos control y si tuvieron concentraciones superiores al resto (p<0,05). Estos resultados indican que la concentración de proteína disminuyó por efecto de los tratamientos térmicos y no por el almacenamiento. En la prueba de color no existió diferencia estadística significativa (p>0,05) en la respuesta a la punción entre ningún grupo. En la prueba de color los resultados indican que existe diferencia estadística significativa (p<0,05) entre el control y el resto de los grupos por efecto de los escaldados y almacenamiento térmicos. El almacenamiento a -20°C no tuvo efecto en la diferencia total de color (p>0,05). Los lotes en los que se observó un mejor desarrollo de color verde fueron los lotes escaldados a 85°C, 80°C y 75°C durante 3 minutos. De lo anterior, se concluyó que los tratamientos empleados no afectaron significativamente (p>0,05) la textura de la muestra. El color de los lotes en los tratamientos térmicos fue estable durante el almacenamiento siendo más activo en los lotes escaldados a 85°C y 80°C durante 3 minutos. Las actividades de CL y k CL no presentaron reactivación en ninguno de los tratamientos durante el almacenamiento.

INTRODUCCIÓN

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) es originario de Asia Occidental y Europa. El género *Brassica* incluye hortalizas como el repollo, nabo, coliflor y la col lombarda; en la especie *oleracea* se incluyen la coliflor y el brócoli. El brócoli es la hortaliza de mayor producción y consumo mundial. Es una hortaliza cuyo cultivo se remonta a los romanos. Sin embargo, fue hasta el siglo XVI cuando esta hortaliza se difundió por el resto del mundo. El nombre de brócoli viene del italiano *broccolo*, palabra empleada para definir a jóvenes vástagos que se desarraigan en plantas jóvenes en algunas especies del género *Brassica*. Anatómicamente el brócoli consta de un eje central (de color verde con un gran número de tallos, axilares solamente los que se desarrollan pequeñas inflorescencias. (Lincoln, 1987)

El cultivo del brócoli se ha vuelto muy popular en los países del primer mundo en donde goza de una gran aceptación por estar catalogado como una hortaliza de alto valor nutricional. El brócoli es una hortaliza importante de vitaminas ya que una ración de 148 g rebasa en un 220% los requerimientos de vitamina C; además es abundante en vitamina A, calcio y rico en fibra, ya que contiene 1.670 mg de fibra por cada 100 gramos de porción comestible (Lincoln, 1987). Lo anterior ha propiciado que en los últimos 5 años el mercado de esta hortaliza se haya vuelto muy dinámico. En 1997 en toda la América se comercializó un volumen de brócoli de 300,000 toneladas, de las cuales el 20% fue producido en Guanajuato, estado mexicano que exportó a los Estados Unidos 173,000 toneladas de esta hortaliza fresca, (Lincoln, 1987),

En los últimos años se ha incrementado el consumo de brócoli en forma de floretes escaldados y congelados. Lo anterior nos muestra la importancia de esta hortaliza para nuestro país. Sin embargo, es necesario realizar una comparación entre las etapas involucradas en el proceso de producción e industrialización del brócoli en México y los Estados Unidos, se estimó que en México es un 20% más barato

producirlo, pero los costos por ni;mejo, transporte e ind.lslri11Jización son de JO u 40%, superiores. Por lo anl.crior, es nacc;ario realizar inv,\stigaciones encnminadas a optimizar los procesos \k industrializ.ación y comcrd:tlizadón de esla horlaliw (Mitchdl, 1992),

El brócoli fresco sufre cambios dcgradntlvos nlpidrunente y ull11dú las n1zoncs crl su nhu tasn de rcspirndón (Brcnnmi y Silcwfelt, 1989). Ulm pn'.lclica común a la que w l\cUJTe pam. disminuir esta ws,11\spiratorln es cubrir c{n hielo molido la superclkie de In hortaliza, esto se lkv n a cabo con la fnulidad de disminuir su vdoddad metabólka ' prolongar las (anrnteristicns de frescum por 111's tiempo, Sin embargo; CStn pdlctica ol'iginn pérdidns dd prodllcto por alaquc microbiano, adem.'is de ckvar los costo:l por manejo y lnnsportc (Milc.hdl, 1992; Brnckett, 1989; Kliober y Will 1991),

Investigadom,s rccicnl.rs han mostrndo que los cnmbios qlw sufre el hrócoli (J/n1ssica olerm:ca var. /alico) (lll sus prindpules c-nn.ldcrlslkas de ü-csur.l como: l:olor, sxl0l· y nrorm, se (ncucntrnn muy reindolrndos con la catúllsis cnzimi'tlka llfomirc:l y Whitaker, 1997), l'nra dismin11ir In aclividad en7.imálfó:l a nivck8 NI don,k no se presenten sus efectos, se recurre al escaldado. Para monitorear este proceso en el hrócoli la "Food ,ind Drugs Administnltio11" (Fl)A de lo; Estados Unido,, rccollwndó d ,:rnpko de In PC)D como enzima indkndora de cnlidad (Lim y Col., 1989) debido a sl1 olliclJidnd y In likil rndiciún de su aclivid:ld (Joslyn y Cnless 1929; Joslyn 1949, 1961, 1970). En algun:ls hort:ilizas In P(O)J n:ull;j ser un indicador sensibk al proceso ,k escndado (Lim y col., 1989). Sin cmbilfgo, exist,n l'1lz0lic; que polmn en tela de juicio d empleo genend.izado de cma tnzima como indicadora para el rc.to de los vegc:llc:,; pñ\<(:sados, y e,, que su corrdnción con In c,l'idad aún no e; clara (Willi:1ms >col., 1970).

ANTECEDENTES

Calidad y Escaldado

El concepto de calidad puede definirse como el conjunto características que en forma individual, determinan el grado de aceptación del producto por parte del consumidor (Brewer y col., 1994).

Normas de Calidad (USDA)

Debido a que la parte de interés comercial de la planta de brócoli es la inflorescencia o florete como se le conoce comúnmente, las normas de calidad de la USDA tienen como finalidad definir las características ideales de esta porción de la hortaliza. A continuación se describen las características estructurales que garantizan una selección de brócoli fresco de alta calidad para su procesamiento:

- a).- Forma. La forma esférica de las cabezas de brócoli o ligeramente aplanada puede ser la ideal, debido a que el agua de lluvia no queda retenida en la superficie.
- b).- Grano. El mercado demanda cabezas con floretes de grano fino, aunque también pueden ser aceptados floretes con grano de semi-grueso a fino.
- c).- Maduración del grano. Es deseable que sea uniforme y buena, que todos los granos engrosen a la vez.
- d).- Color. Hay amplitud de matices aceptables que van desde verdes con tonalidades violetas pasando por verdes claros, medios y oscuros, hasta verdes oscuros con tonalidad azulada a grisácea que varían según la intensidad de la cerosidad.
- e).- Tamaño. Depende de la variedad y de la densidad de la planta.

f).- Tronco hueco. Defecto que depende de la variedad y que también puede estar influenciado por las técnicas de cultivo, abonos nitrogenados excesivos, poca densidad de plantas y siembras muy tempranas.

g).- Resistencia a enfermedades. Se deben procurar cabezas con floretes resistentes principalmente a Mildiu y Alternaria.

Por último es importante seleccionar cabezas con floretes resistentes a heladas y altas temperaturas.

Existen varios factores que pueden influir en la calidad nutricional y de mercado del brócoli, entre ellos podemos enumerar el manejo y procesamiento post-cosecha, condiciones de almacenamiento y humedad relativa de la atmósfera (Mitchel, 1992).

Se han realizado diversos estudios encaminados a evaluar el comportamiento postcosecha del brócoli, con la finalidad de proporcionar los fundamentos que ayuden a optimizar los procesos diseñados para prolongar sus características de frescura. Algunos trabajos de investigación muestran que esta hortaliza puede prolongar sus índices de frescura por varias semanas a temperaturas entre 1 y 2°C y humedades relativas cercanas al 95% (Ryall y col.,1979; Lipton y col, 1974; Shewfelt y col., 1983). Forney (1995) encontró que la inmersión en agua caliente de floretes de brócoli a 50 y 52°C durante 2 minutos resultó efectiva para evitar el marchitamiento.

Para la selección del brócoli por parte del consumidor, el color es el atributo de mayor importancia (Francis y Clydesdale, 1975). La retención del color verde en las hortalizas procesados es continuamente monitoreada (Sweeney y Martin, 1958) y puede verse estabilizada mediante el proceso de escaldado (Klein, 1992). Sin embargo, existen otros atributos muy importantes por considerar como el sabor y el aroma (Lim y col., 1989).

El escaldado es el proceso convencional empleado en la industria para la inactivación de las enzimas en frutas y hortalizas. Es un método de conservación que consiste en exponer el tejido de la hortaliza a un tratamiento térmico durante 1 y 5 minutos a temperaturas que fluctúan entre los 80°C y 100°C durante cortos períodos (Schwimmer, 1980).

En la industria son ya conocidos los beneficios del escaldado en el procesamiento de vegetales y entre los más importantes podríamos señalar: la fijación del color, disminución de la carga microbiana, acondicionamiento de la textura para su consumo y por supuesto la disminución de la actividad enzimática. Sin embargo, un mal diseño de este proceso puede reflejarse en una pérdida de humedad, textura, sabor, aroma y calidad nutricional en el alimento (Hemeda y Klein, 1990).

Clasificación y Distribución de las Peroxidasas en los Vegetales

Las peroxidasas (POD, E.C. 1.11.1.7; donador: H₂O₂) están ampliamente distribuidas en frutas y hortalizas (Vamos y Vigyazo, 1981). De acuerdo con Fridovich (1974) la función principal de las POD (incluyendo las CAT) es eliminar el peróxido de hidrógeno presente en grandes concentraciones en los tejidos de las frutas y hortalizas. Este compuesto al estar en contacto con el anión superóxido produce una gran cantidad de oxígeno en forma de radical libre, el cual es altamente reactivo y puede inducir oxidaciones de compuestos fenólicos, lo que puede provocar cambios indeseables en la calidad general de los vegetales (Schwimmer, 1978)

Las CAT y las POD en plantas y animales son enzimas que se caracterizan por tener un grupo prostético hemo, el cual es un anillo protoporfirina que puede estar unido covalentemente o no a la proteína, este grupo se encuentra muy difundido entre varios tipos de enzimas como las mioglobinas y las hemoglobinas y es determinante en la funcionalidad de las enzimas que lo poseen. Esta fracción prostética se encuentra

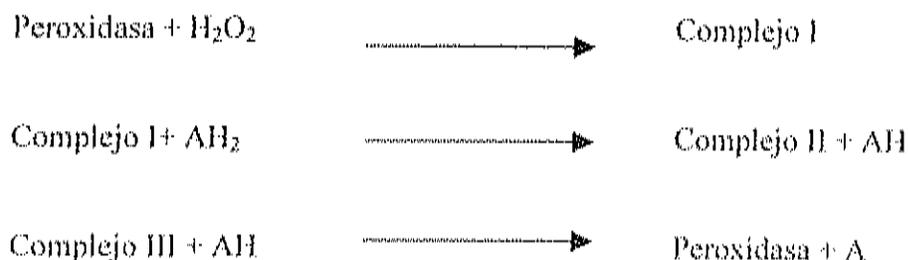
relacionada con la unión de oxígeno a la enzima (Matthews y van Holde, 1997). Aunque se ha demostrado la existencia de varias isoformas de la POD, estas no difieren significativamente en su tamaño y peso molecular el cual generalmente fluctúa entre los 40,000 y 50,000 Da. Es de particular importancia la presencia en todas ellas de cuatro residuos de cisteína y tres residuos de histidina implicados en forma determinante en la actividad de la enzima. Los estudios estructurales de proteínas que contienen un grupo hemo tales como la hemoglobina y la mioglobina muestran que los residuos de histidina distal se encuentran invariablemente ligados en la quinta y la sexta posición de coordinación del grupo hemo y participan activamente en el mecanismo de absorción del oxígeno (Stryer, 1990).

Reed en 1975 reportó la existencia de tres tipos de peroxidasas (POD): las ferriprotoporfirina peroxidasas, las verde peroxidasas y las flavoproteína peroxidasas. El primer grupo (ferriprotoporfirina peroxidasas) se encuentra localizado en las plantas superiores, además de ser abundante en tejidos animales (triptófano pirrolidasa, tiroide yoduro pirrolasa) y estar presentes en microorganismos (citocromo C peroxidasa). El grupo prostético de este grupo de enzimas es el ferriprotoporfirina III. El segundo grupo se conoce como las verdoperoxidasas por ser de color verde. El grupo prostético de estas enzimas contiene un grupo ferriprotoporfirina III el cual se encuentra unido a un grupo verde hematin (Karlson, 1965). Por último, al tercer grupo pertenecen las flavoproteínas peroxidasas estas enzimas han sido purificadas de algunas cepas de estreptococos fecales y de algunos tejidos animales. El grupo prostético de estas enzimas es el flavin adenina dinucleótido (FAD) (Karlson, 1965).

Reed en 1975 definió a las POD como enzimas que catalizan la siguiente reacción:



En esta reacción, ROOH es un ácido carboxílico o bien HOOH o algún otro peróxido orgánico. En el mecanismo se involucran varias etapas en las que se incluye un complejo donador de hidrógeno y dos pasos oxidativos en donde participa el grupo prostético de la enzima. La secuencia general de reacciones se puede apreciar en el siguiente esquema:



Donde: AH_2 es el compuesto donador de hidrogeno y A representa al donador oxidado.

Efecto de las Peroxidasas en los Vegetales

Haard en 1977 realizó una amplia discusión sobre el papel que desempeñan las POD y lo resumió en 4 puntos principales:

- 1).- Biosíntesis de lignina.
- 2).- Formación de metabolitos del estrés, especialmente furanoterpenoides.
- 3).- Modificaciones en la textura relacionados con la pérdida de calidad en frutos como la pera y en hortalizas como el espárrago.
- 4).- Maduración de frutos en procesos que involucran la degradación del ácido indol acético (IAA) el cual es un compuesto regulador del crecimiento.

En las últimas décadas las propiedades catalíticas de las POD han sido ampliamente investigadas debido a su relación con cambios desfavorables de color y textura en diversas frutas y hortalizas. Sin embargo, en el estudio del comportamiento de

estas enzimas se han encontrado varios obstáculos; por ejemplo, los procesos de oxidoreducción en los que se ven implicadas las POD y que son difíciles de controlar debido a la alta estabilidad térmica que presentan y a su facilidad para catalizar reacciones con un gran número de sustratos (Burnette, 1975). Las POD generan radicales libres que en teoría son capaces de provocar la oxidación de una amplia gama de sustratos en constituyentes naturales de frutas y hortalizas. Estas enzimas combinadas con peróxido de hidrógeno producen un complejo activado que reacciona con compuestos como el ácido ascórbico, ácidos grasos y carotenoides entre los más importantes. Se sabe que algunas de estas reacciones están íntimamente relacionadas con modificaciones sustanciales en características como el sabor, aroma, color y pérdida del valor nutricional (Hemeda y Klein, 1990). Las POD son enzimas que marcaron un giro especial en la historia de la enzimología, ya que fueron las primeras en las cuales se demostró la formación de un complejo enzima-sustrato llamado peroxidasa-peróxido (Robinson, 1987).

En 1975 el departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) recomendó la inactivación de la POD como necesaria para minimizar el deterioro durante la congelación de frutas y hortalizas escaldadas. Lu y Whitaker (1974) encontraron que el porcentaje de inactivación de la POD en rábanos tiene relación no solo con la temperatura, sino con otros factores como el pH. Ellos encontraron que el porcentaje de inactivación decrece hasta 8 veces cuando el pH se incrementa de 4 a 7 y el doble cuando el valor es por arriba de 10. Asimismo observaron que si se adiciona hematin (grupo prostético de las POD) el porcentaje de inactivación de la POD se ve reducido. De esta forma establecieron que el efecto tan marcado del pH en la inactivación de la enzima se encontraba asociado con la liberación del grupo hemo de la apoproteína, la cual al quedar desprovista de este grupo propicia que el complejo hemoproteína sea más termolábil. Asimismo, realizaron otros descubrimientos interesantes en esa misma línea de investigación al estudiar el efecto de la fuerza iónica en la inactivación de la POD.

En presencia de NaCl, la POD presentó un considerable decremento en la termoestabilidad de la POD y el porcentaje de inactivación se incrementó hasta en 8 veces en presencia de NaCl 0.6 M (Lu y Whitaker, 1974). Estos investigadores afirmaron que tal decremento en la termoestabilidad podría ser provocado por los cambios conformacionales inducidos por este compuesto en la estructura de la enzima y la posibilidad de disociación de los agregados moleculares que la hacen más estable.

Clasificación y Distribución de la Cistina Liasa en los Vegetales

Investigaciones efectuadas por Lim y col. (1989) apoyan la hipótesis de que la cistina liasa es la enzima responsable de la modificación del sabor y el aroma en el brócoli. Para llegar a este planteamiento ellos aislaron POD y CL y las añadieron en varias combinaciones a homogenados de brócoli (*Brassica oleracea* cv. *Valiant* 501) libre de actividades enzimáticas. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente (23°C) por 15 minutos, para posteriormente ser evaluadas por un panel de jueces previamente entrenado en la detección de aromas. Entre las conclusiones a las que llegaron estuvieron las siguientes: las muestras a las que se añadió POD no presentaron diferencias estadísticamente significativas en la producción de aromas con respecto al control. La CL provocó un notable incremento en la aparición de aromas descritos como agrio, ácido y azufrado.

La hipótesis de Lim y col. (1989) respecto al origen de los aromas de deterioro en el brócoli se ha ido fortaleciendo con estudios posteriores como los efectuados por Chin y Linsay (1993) quienes afirmaron que la producción de compuestos volátiles azufrados se presentan en el tejido macerado de las hortalizas del género *Brassica*. En este mismo sentido, Buttery y col. (1976) señalaron que los compuestos azufrados desempeñan un papel primordial en la impartición de sabores y olores característicos en

estas hortalizas. Posteriormente Ramirez y Whitaker (1997) señalaron que la cistina liasa (E.C. 4.4.1.8.) es la enzima responsable de la modificación del aroma en el brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). La presencia de la CL en hortalizas del género *Brassica* fue reportada por Hamamoto y Mazelis (1986). Estudios de purificación y caracterización de esta enzima muestran un peso molecular 11,000 Da y valores óptimos de temperatura y pH de 35°C y 8.4 respectivamente (Ramirez y Whitaker, 1999).

Efecto de la Cistina Liasa en los Vegetales

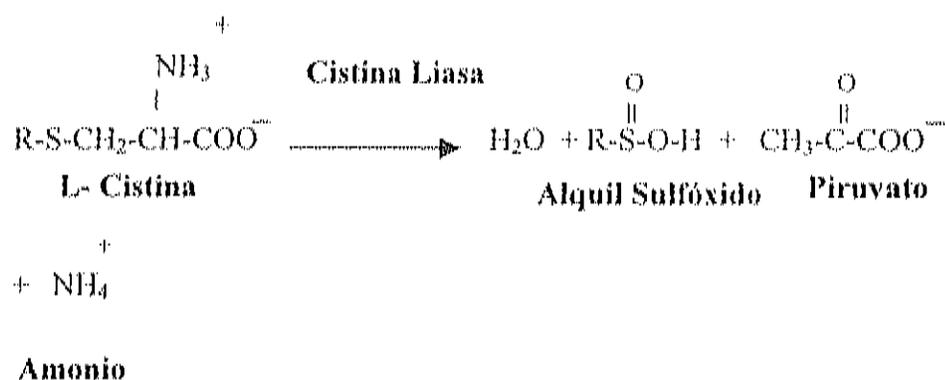
Una de las teorías más sustentada sobre el papel que desempeña la CL en las plantas establece que tiene un papel bactericida (Kyung y Fleming, 1994). Esta teoría tiene su origen en los resultados de muchos años de investigación sobre las propiedades antibacteriales del ajo y la cebolla. Primeramente Cavallito y Bailey (1944a) aislaron un componente del ajo el cual inhibía el crecimiento de microorganismos gram positivos y gram negativos y lo nombraron alicina, ellos encontraron que la estructura de este compuesto era: alil-2-propenil-1-tiosulfinato (Cavallito y col., 1944a; Stoll y Seebeck, 1951) ahora se conoce que este compuesto es uno de los productos de la acción de la cistina liasa sobre sus sustratos específicos. Investigaciones en esa misma línea realizadas por Kyung y Fleming en 1994, mostraron que el principal compuesto antibacterial en el repollo era el metil metano tiosulfinato y establecieron que era uno de los productos de la β -eliminación del S-metil-L-cisteína sulfóxido, el cual es un compuesto de origen no protéinico que se puede acumular en las hortalizas del género *Brassica* en concentraciones del 0.89 al 1.71% en base seca (Bradshaw y Borzucki, 1982).

La CL también presenta afinidad por otros sustratos, entre los cuales están los alquil-cisteínas y los alquil-cisteína sulfóxidos. Un descubrimiento importante fue el realizado por Ramirez y Whitaker (1999). Ellos establecieron que los sustratos

principales de esta enzima son L-cisteínas o L-cisteína sulfóxidos sustituidos. Esto es importante señalarlo, porque las suposiciones iniciales eran que el sitio activo de la enzima reconocía grupos SH y las investigaciones de estos autores muestran que el grupo tiol tiene que ser sustituido en su hidrógeno por un grupo alquilo, con la única restricción de que sea pequeño (un grupo metilo) lo anterior resulta esencial en el reconocimiento del sustrato por parte de la enzima.

Los alquil cisteínas y los alquil cisteínas sulfóxidos son los mayores constituyentes de los aminoácidos libres en la mayoría de los miembros de la familia de las crucíferas, leguminosas y liláceas. (Ramírez y Whitaker, 1998a) estos compuestos también se encuentran presentes en altas concentraciones en las hortalizas del género *Brassica* (Hall y Smith, 1983; Hamamoto y Mazelis, 1986) y específicamente en el brócoli. Ramírez y Whitaker (1997) observaron la capacidad de estos compuestos para degradar L-cistina a piruvato en homogenizados de hojas de col. Posteriormente Stanton y Mazelis (1991) identificaron la presencia de dos isoenzimas con diferente especificidad en las hortalizas del género *Brassica*, la cistina liasa y la β -cistationasa. Esta última solo ha sido purificada de hojas de espinacas, lo que pudiera ser evidencia de que la cistina liasa desempeña un papel protector en dos familias de plantas taxonómicamente separadas.

El rompimiento de estos aminoácidos se lleva a cabo como se ilustra en la siguiente reacción general:



Aún y a pesar de los descubrimientos realizados, se ha especulado sobre el papel que desempeña la cistina liasa en el rompimiento de cistationeína para producir homocisteína y su participación en el ciclo de la biosíntesis de la metionina. Lo anterior se ha evidenciado en los microorganismos, pero los mecanismos en las plantas aún no han sido determinados (Ramírez y Whitaker, 1998a). Sin embargo, la cistina liasa continua catalizando la reacción de otros sustratos en donde se producen una gran variedad de compuestos que influyen notablemente en la modificación del sabor y el aroma de la hortaliza. Para explicar la continuidad de esta reacción se han propuesto distintos mecanismos (Stoll y seebeck, 1951), pero en términos generales estos se resumen en la siguiente figura:

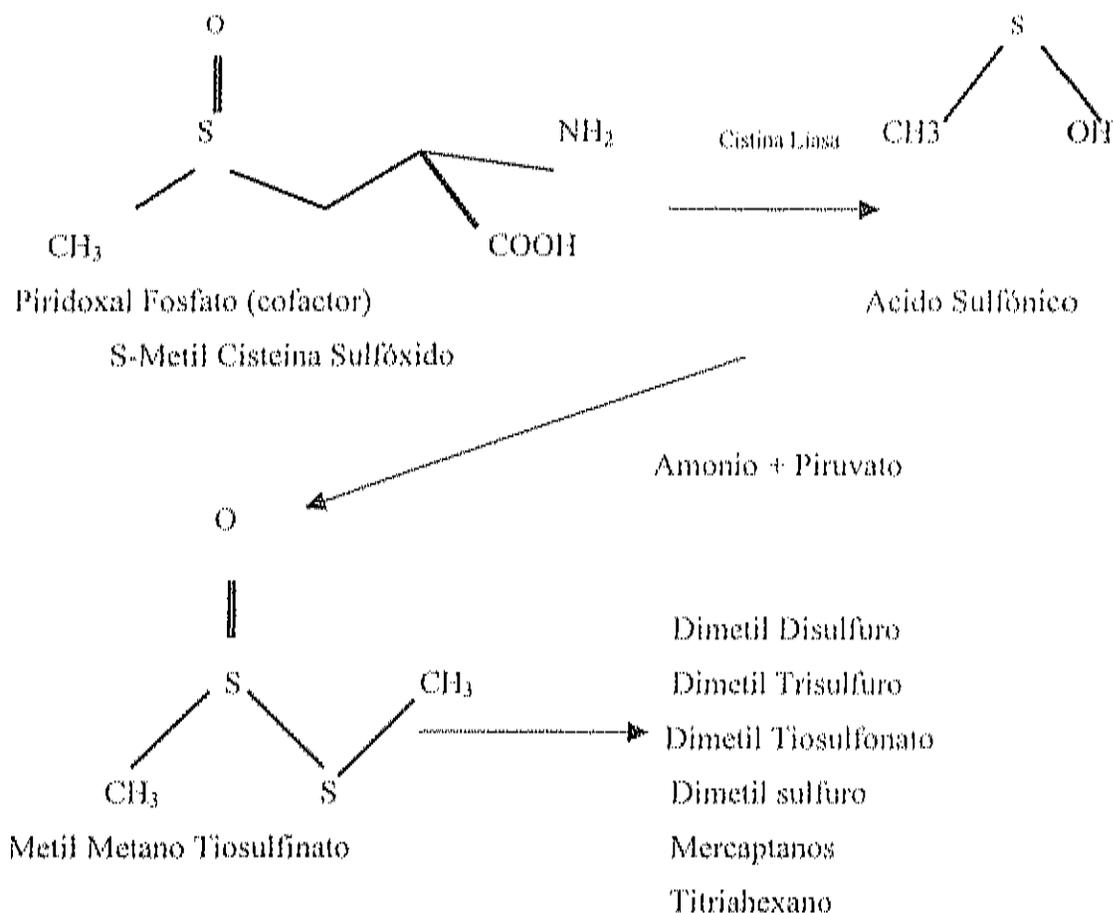


Fig. 1.- Conversión Enzimática de S-Metil Cisteína Sulfóxido.

Existen varios compuestos que son el producto de la acción continua de la cistina liasa sobre sus sustratos (fig 1). El más importante por su efecto nocivo es el dimetil disulfuro, el cual es el compuesto que más se produce en el tejido dañado de varias hortalizas del género *Brassica* (Bailey y col., 1961; Chin y Lindsay, 1993) y que fue encontrado en brócoli por (Forney y col., 1991; Hansen y col., 1992) y es considerado el producto secundario de la acción de las C-S liasas sobre el S-metil-L-cistein sulfóxido.

Otro compuesto identificado en los floretes de brócoli es el metanotiol, el cual a pesar de ser muy inestable es un intermediario clave en la síntesis de otros compuestos que modifican a su vez las características de frescura en el brócoli. (Schmidt y col., 1985; Di Pentima y col., 1995) reportaron que la síntesis de este compuesto se realiza a partir de la metionina. En bacterias y hongos se ha encontrado que este mecanismo involucra la producción de metanotiol a partir de metionina, reacción que es catalizada por la enzima metioninasa (Ruiz-Herrera y Starkey, 1969, Lindsay y Ripe, 1986). Por otro lado Forney (1991) fortaleció esta idea al afirmar que en la producción de este compuesto se involucran enzimas del tipo C-S liasas.

Chin y Lindsay (1993) sugirieron que el rompimiento enzimático del S-metil-cistein sulfóxido produce metanotiol. Sin embargo, existen otros compuestos que también confieren aromas desagradables a las hortalizas del género *Brassica* y entre los cuales se han identificado a los trimetil sulfóxidos (Bailey y col., 1961; Chin y Lindsay, 1993; Hansen y col., 1992) compuestos de los cuales el metanotiol también es un precursor y que a partir de reacciones de óxido-reducción es posible obtenerlos. Cabe señalar que estos compuestos se identificaron inicialmente en otras hortalizas como el ajo por (Oaks y col., 1964). Estudios realizados por Obenland y Aung (1996) y (Dan y col., 1997) opinan que la cistina liasa y la cisteína sulfóxido liasa están involucradas en la biosíntesis anaeróbica del dimetil disulfuro y el metanotiol en floretes de brócoli.

De lo todo lo anteriormente expuesto podemos concluir que la CL es la enzima responsable de la producción de aromas de deterioro en la familia de las crucíferas, lo cual afecta significativamente la comercialización de esta hortaliza. A pesar de esto, la actividad residual de POD se sigue empleando como el parámetro indicador del escaldado en las crucíferas, lo cual expone al tejido del brócoli a condiciones térmicas muy severas, ya que la POD es una enzima menos termolábil que la CL y requiere para su inactivación de temperaturas por arriba de los 70°C (Ramírez y Whitaker, 1997) y en cambio la cistina liasa requiere de temperaturas y tiempos de exposición menos intensos y prolongados para su inactivación (Ramírez y Whitaker, 1998a).

Por otro lado, se han encontrado diferentes isoformas de la POD que presentan diferente estabilidad térmica (McCune, 1961); además, resulta difícil predecir la resistencia de esta enzima a la temperatura ya que del 1 al 10% de la actividad residual de esta enzima es térmicamente estable en la mayoría de las hortalizas (Barret y Theerakulkait, 1995).

Por lo tanto, al emplear a la POD como enzima indicadora del escaldado del brócoli se pueden ver afectadas propiedades como: textura, color, sabor y pérdida de peso fresco de la hortaliza. En teoría estas propiedades no serían afectadas si se empleara a la cistina liasa como la enzima responsable de monitorear el escaldado, esto nos muestra la importancia de seleccionar a la enzima adecuada como indicadora de calidad en el procesamiento y así diseñar un tratamiento térmico adecuado que la inactive.

HIPOTESIS

La enzima cistina liasa al igual que peroxidasa puede servir como indicadora de calidad del brócoli, durante el procesamiento y conservación en congelación.

OBJETIVO GENERAL

Comparar las características de calidad del brócoli (*Brassica oleracea var. Italica*) escaldado a diferentes temperaturas y almacenado en congelación.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la actividad enzimática de cistina liasa y peroxidasa en brócoli escaldado a diferentes temperaturas y almacenado en congelación.
- Determinar el efecto del escaldado a diferentes temperaturas en la firmeza y el color del brócoli almacenado en congelación durante seis meses.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En la fase experimental de esta investigación se utilizó brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica* cv. *Marathon*) cultivado en la costa de Hermosillo. La hortaliza se produjo en el ciclo invierno de 1998 y su cosecha se efectuó el 4 de febrero de 1999. De esta producción se tomaron 100 kg de material fresco para el desarrollo del trabajo experimental

Manejo Postcosecha

La selección de los floretes se realizó descartando aquellos que presentaran evidencia de daño mecánico, ataque de plaga o algún otro agente biológico. Se tuvo especial atención en seleccionar cabezas con buenas características físicas como: color verde oscuro uniformemente distribuido, cabezas de forma cónica y compacta constituidas por granos gruesos, firmes y apretados, así como cabezas de volumen y tamaño similar cuyo peso fluctuó entre los 200 y los 400 g, con tallos de 15 cm de longitud aproximadamente.

Inmediatamente después del corte se hicieron mazos de cabezas que fueron acomodados de manera alternada (cabeza contra tallo) dentro de cajas de cartón de 9 Kg de capacidad, esta forma de empaçado es la empleada por los productores para conservar y transportar brócoli fresco con calidad de exportación. Posteriormente las cabezas dentro de la caja fueron cubiertas con una capa de hielo picado de 5 cm de espesor. Por último, el material fue transportado en un tiempo de 1 hora a las instalaciones, del área de Ingeniería de Procesos del Departamento de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal del CIAD, para continuar con la siguiente fase del proyecto.

Corte y Escaldado

Inmediatamente después de recibir el material se procedió a desempacarlo para cortar el tallo y obtener floretes de 4 cm de longitud y de 2 a 4 cm de diámetro. Las dimensiones de los floretes se establecieron reproduciendo las medidas del producto comercial. Se cortaron y procesaron un total de 90 kg. de floretes.

El corte de las cabezas se realizó en forma manual y con cuchillos de acero inoxidable. Los floretes cortados fueron escaldados y tratados térmicamente por inmersión en marmitas de 50 litros de capacidad. Los escaldados y los tratamientos térmicos se llevaron a cabo en lotes de 6 kg ya que en pruebas preliminares, estos volúmenes fueron los que garantizaron una transferencia de calor uniforme y mejores condiciones de manejo y agitación. Se tomaron tres lotes de floretes de 12 kg. para escaldarlos a 85°C, 80°C y 75°C durante 3 minutos y tres lotes para acondicionarlos térmicamente a 68°C, 63°C y 58°C durante 2 minutos. Inmediatamente después de realizar los escaldados y los acondicionamientos térmicos, los floretes se sumergieron en agua fría con hielo, con la finalidad de eliminar rápidamente el calor y detener la actividad enzimática.

Congelación y Almacenamiento

Los floretes escaldados y acondicionados térmicamente se congelaron con nitrógeno líquido a una temperatura de -70°C, esta parte del proceso se llevó a cabo en un congelador de charolas con capacidad para 6 kg. Para llevar a cabo el proceso de congelación, los floretes se distribuyeron uniformemente en charolas de maya de acero inoxidable con capacidad de 1 kg, las cuales después de contener los floretes fueron colocadas dentro del congelador, el espacio entre cada charola fue de 20 cm con la finalidad de permitir el flujo de nitrógeno rápidamente para obtener una congelación uniforme en un periodo de 3 a 4 minutos.

Los floretes congelados fueron envasados en presentaciones de 1 kg en bolsas Zip-Loc (Johnson-Jonhson) para producto congelado. Los floretes se almacenaron a una temperatura de -20°C durante 6 meses. Cabe señalar que en todas estas condiciones se buscó reproducir lo mas fielmente las características en las que se maneja el producto comercial.

Metodología

Extracción

Para efectuar las determinaciones enzimáticas se obtuvieron extractos crudos de los floretes de brócoli de acuerdo con el protocolo propuesto por (Ramírez y Whitaker, 1997) para el mismo tejido. El protocolo seguido fue el siguiente: en un recipiente frío ($0-4^{\circ}\text{C}$) se colocaron 20 g de floretes de brócoli cortados en trozos de 1 cm aproximadamente, 2 g de polivinilpolipirrolidona (Sigma Chemical St. Louis Mo.) 40 ml de buffer de extracción salina (Fosfato de potasio K_2HPO_4 0.05 M de J.T. Baker Inc., ácido cítrico 0.05 M $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ de J.T. Baker Inc., cloruro de sodio NaCl 0.855 M de J.T. Baker Inc.) pH = 6.4. La mezcla se trituro durante 20 s, con un homogenizador de tejidos Biomixer 1081-1 Bartlesville, Oklahoma. El homogenado se filtró en tela de nylon, en forma manual hasta obtener un volumen aproximado de 35 ml. El homogenado se separó en una centrifuga Beckman J2-M1 con temperatura controlada a 4°C , en un rotor JA-20 con ocho camisas dispuestas a 108° de inclinación, se centrifugó 30 minutos a 27,500 g. El sobrenadante se filtro empleando papel Whatman # 2 en un cuarto frío a 4°C .

Reacción Estándar para la Cuantificación de Ensayos de Actividad

Para determinar la actividad de la cistina liasa a través de la conversión del piruvato a dinitrofenilhidrazona (DNPH). Se empleó el protocolo empleado por

(Friedeman y Haugen, 1943) en la producción de piruvato, tiocisteína y amonio a partir de L-cistina (Sigma Chemical St. Louis Mo.) 0.04 M como sustrato para posteriormente cuantificar espectrofotométricamente el DNPH formado a través del cambio de absorbancia a 450 nm. Un volumen de 0.7 ml se inactivó en agua hirviendo en viales eppendorf de 1.5 ml durante 15 minutos para preparar una mezcla de reacción en tubos de ensayo combinando los siguientes compuestos: 650 μ l de bicine (Sigma Chemical St. Louis Mo.) 0.23 M, 300 μ l de L-cistina (Sigma Chemical St. Louis Mo.) 0.04 M, 25 μ l de piridoxal fosfato (Sigma Chemical St. Louis Mo.) 1 mM y 25 μ l del homogenado. En el caso del testigo se agregaron los mismos reactivos con excepción de que los 25 μ l de homogenado fueron inactivados previamente en agua hirviendo durante 15 minutos para que no presentara alguna reacción enzimática. La reacción de la mezcla se llevó a cabo durante 10 minutos a 30°C y se detuvo agregando 1 ml de ácido tricloro acético (TCA) (Sigma Chemical St. Louis Mo.) 0.612 M. Se tomaron 0.8 ml del contenido de la reacción y se centrifugaron en una microcentrífuga Bio-Rad modelo 14K a 10, 000 rpm durante 10 minutos.

Determinación de la Actividad de Peroxidasa

La actividad de peroxidasa POD se midió por el método de Maehly y Chance (1954). En este método se siguió la reducción de guaiacol a tetraguaiacol por acción de la POD y se determinó la capacidad de conversión a través del cambio de absorbancia a 420 nm. El protocolo de extracción fue el siguiente:

En una celda de cuarzo de 3 ml se combinaron 3 ml de la mezcla de reacción constituida por: 1 parte de guaiacol (Sigma Chemical St. Louis Mo.) 0.05 M, 1 parte de buffer fosfato (J.T. Baker Inc.) 0.2 M pH = 6.5, 1 parte de peróxido de hidrógeno (Sigma Chemical St. Louis Mo.) 0.02 M y 7 partes de agua destilada y 25 μ l de homogenado obtenido de acuerdo con el protocolo de extracción. Se leyó el cambio de absorvancia a

420 nm durante 3 minutos a 18°C. Cada unidad de POD corresponde a los μ moles de peróxido de hidrógeno consumidos/ minuto.

Determinación de la Actividad de Cistina Liasa por Medio de la Formación de DNPH

Se preparó una curva de calibración con 6 estándares mezclando los siguientes reactivos: 2.5 ml de TCA (Sigma Chemical St. Louis Mo.) 0.612 M y volúmenes de piruvato (Sigma Chemical St. Louis Mo.) 1mM de 0, 50, 100, 150, 200 y hasta 250 μ l. A los tubos con piruvato se les agregó agua destilada hasta alcanzar un volumen de 500 μ l. A cada tubo se le agregó 1 ml de dinitrofenilhidrazina (Sigma Chemical St. Louis Mo.) 5.05 mM y se incubó durante 5 minutos en baño de María a 30°C. La reacción se detuvo agregando 5 ml de Hidróxido de sodio (J.T. Baker Inc.) 2.5 M. Los estándares se midieron después de 10 minutos de transcurrida la reacción a través del cambio de absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro Shimadzu Bio-Spec 1601.

Para determinar la actividad de la enzima en los floretes se tomaron 500 μ l de sobrenadante de los viales centrifugados como se describe en el protocolo de extracción y se siguió el mismo procedimiento que en los estándares. A todos los ensayos se les hicieron nueve repeticiones. En los datos reportados una unidad de CL corresponde a los μ moles de piruvato transformados/minuto.

Determinación de la Actividad de Cistina Liasa por Medio de la Formación de Tiocisteína

En esta reacción se siguió la formación de aryl mercaptan a partir de tiocisteína a 412 nm de acuerdo a la metodología propuesta por Whitaker (1976).

La reacción se preparó en tubos de ensayo agregando 625 μ l de buffer borato preparado con ácido bórico (J.T. Baker Inc.) 0.5 M pH = 8.0 4, 300 μ l de L-cistina (Sigma

Chemical St. Louis Mo.) 0.04 M, 25 μ l de piridoxal fosfato (Sigma Chemical St. Louis Mo.) 1 mM, 25 μ l de ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzoico (Sigma Chemical St. Louis Mo.) 10 mM y 25 μ l de homogenado obtenido de acuerdo con el protocolo de extracción descrito anteriormente. Para el testigo se agregaron los mismos compuestos, con excepción de los 25 μ l de homogenado que fueron substituidos por 25 μ l de agua destilada. Después de la adición del homogenado se dejó reaccionar la muestra durante 5 minutos y se midió el cambio de absorbancia a 412 nm. A todas las determinaciones se les hicieron nueve repeticiones. Cada unidad de CL corresponde a los μ moles de tiocisteina formados/minuto.

Cuantificación de Proteína

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Biuret (Gornall y col., 1943). Se empleó suero de albúmina de bovino (BSA) de Sigma- Aldrich de 96%-99% de pureza como fuente conocida de proteína.

Se preparó una curva de calibración con 4 estándares, a cada tubo se le agregaron 4 ml de reactivo de Biuret preparado con sulfato de cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6mM, tetracaltrato de sodio y potasio $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Chemical St. Louis Mo.) 21.26 mM e hidróxido de sodio NaOH 0.75 M de J.T. Baker Inc.) En seguida se añadieron 0, 100, 200 y 300 μ l de suero de albúmina de bovino como fuente conocida de proteína. Posteriormente se añadieron 1000, 900, 800 y 700 μ l de agua destilada respectivamente. Después de 40 minutos de efectuada la reacción se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Shimadzu Bioespec 1601 en una celda de 3 ml.

Para determinar la concentración de proteína en las muestras problema se mezclaron 200 μ l de homogenado de brócoli obtenidos de acuerdo con el protocolo de extracción, 800 μ l de agua y 4 ml de reactivo de Biuret. La reacción se dejó reposar 40 minutos y se leyó a 540 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Medición del Color

Se utilizó un colorímetro minolta CR-300 serie 71821015 Japan. Para efectuar estas determinaciones se tomaron 10 floretes al azar se descongelaron a temperatura ambiente durante 2 horas aproximadamente. Se les eliminó el exceso de agua y se efectuó una medición a cada florete obteniéndose los valores de L^* , a^* y b^* . Para la calibración del colorímetro se empleó un mosaico de cerámica proporcionado por minolta y se realizaron 3 mediciones en la condición D_{65} introduciendo los valores de $Y= 92.04$, $X= 0.3161$, $y = 0.3324$. Los valores obtenidos en cada muestra fueron:

L^* .- Representa el valor de la luminosidad del color en el florete, el cual está definido en el espacio tridimensional del diagrama de color; a^* y b^* indican el Chroma en el espacio. Valores de a^* negativos indican una tendencia hacia el verde oscuro y valores de b^* positivos indican una tendencia hacia el verde amarillo. Esto último resulta importante puntualizarlo, pues a valores de a^* muy negativos el color tiene más características de producto fresco y valores de b^* elevados indican amarillamiento, lo que significa que está relacionado con pérdida de la calidad. El color se calculó a partir de los valores de los valores de L^* , a^* y b^* . A su vez, se calculó el ángulo de matiz (θ) y la diferencia total de color (ΔE), utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Angulo de Matiz } (\theta) = \text{Tag}^{-1} b/a$$

Donde:

Tag = Tangente

a= Valor en la escala de rojo-verde

b= Valor en la escala de amarillo-azul

$$\text{Diferencia total de color } (\Delta C) = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

Donde:

(ΔL) = Diferencia entre el valor inicial y final de "L".

(Δa) = Diferencia entre el valor inicial y final de "a".

(Δb) = Diferencia entre el valor inicial y final de "b".

Determinación de Textura

Se empleó un texturómetro TA-XT2 de Stable Micro Systems con una puntilla de 2 mm de diámetro para medir la resistencia del tallo a la punción. El equipo se programó para obtener como lectura la fuerza de resistencia a la punción en Newtons. Para efectuar la determinación se seleccionaron 3 floretes cuyo tallo tuviera diámetro similar y así evitar fluctuaciones considerables en los datos por efecto de la variación en la superficie de penetración. A cada tallo se le realizaron tres punciones para obtener los datos finales. Para la textura se reportaron los valores de resistencia a la punción en Newtons.

Diseño Estadístico.

El diseño del trabajo experimental fue completamente al azar. Para el análisis de los datos, se realizó un análisis de varianza ANOVA y comparación de medias con la prueba de rango múltiple de Tukey ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la Temperatura y el almacenamiento

Efecto de la Temperatura y el Almacenamiento Sobre la Actividad de Peroxidasa

La actividad de Peroxidasa (POD) fue determinada a partir de la reducción de guaiacol a tetraguaiacol por parte de la enzima. La fig. 2 muestra los resultados obtenidos por efecto de los escaldados y los acondicionamiento térmicos en la actividad residual de POD.

Los datos obtenidos mostraron que en los floretes escaldados a 85°C durante 3 minutos la actividad residual de POD fue de 0.15% y en los floretes escaldados a 80°C la actividad residual fue de 7.53%. Estos datos muestran el efecto de los tratamientos térmicos en la actividad de la enzima. Los valores de actividad residual de estos tratamientos se pueden relacionar con floretes de buena calidad comercial pues no presentaron una actividad residual elevada de POD. Lo anterior se basa en las recomendaciones de actividad residual efectuadas por Bötcher (1975) quien recomendó actividades residuales de POD para col de bruselas procesadas de entre 7.5-11% y de 2.9-8.2% para coliflor procesada, que al igual que el brócoli pertenecen a la familia de las crucíferas, por lo que se puede inferir un comportamiento similar.

Los niveles de actividad residual de POD obtenidos al escaldar floretes de brócoli a 80°C durante 3 minutos fueron similares a los datos obtenidos por Ramírez y Whitaker (1997) quienes para estos mismos tratamientos obtuvieron valores de actividad residual de cero.

De lo anterior, concluimos que las diferencias en la actividad residual de POD pueden deberse a la diferencia del cultivar empleado, al lugar de siembra y los factores climáticos que esto involucra.

Por otro lado, las bajas actividades residuales en los lotes escaldados a 85°C y 80°C durante 3 minutos, concuerdan con los hallazgos de Susan y Col. (1995), quienes encontraron que al escaldar floretes de brócoli en agua hirviendo durante 4 minutos los valores de actividad residual fueron de cero. Asimismo, Los datos obtenidos de este experimental confirman los reportados por Burnette (1975) quien señaló que el escaldado de hortalizas en general a temperaturas de 121°C durante 6 minutos resultó ser un tratamiento que inactiva a la POD.

Existen otros experimentos como los efectuados por Lang y Bog-Hansen (1993) en chicharos escaldados a 80°C durante 3 minutos, en donde se reportaron valores de actividad residual del 35%. Las variaciones entre los resultados de Lang y Bog-Hansen (1993) los de Ramírez y Whitaker (1997) y los de este proceso experimental, confirman que aún para los mismos tratamientos térmicos el valor de actividad residual en diferentes hortalizas puede variar. Además, las diferencias en los protocolos de determinación de la actividad tienen un papel determinante en los valores finales de actividad que se obtienen. Nebesky y col. (1950) reportaron el efecto de la diferencia de sustratos empleados al momento de determinar la actividad de la POD.

La actividad de las enzimas depende preponderantemente del valor de pH ya que este se relaciona con la estructura cuaternaria de la enzima y por lo tanto con su actividad. Por ello es de esperarse que conjuntamente con los factores hasta aquí expuestos existan algunas diferencias entre los datos obtenidos en los experimentos para la actividad residual de POD y los de otras investigaciones. Sin embargo, el comportamiento de la enzima en este proceso experimental comparado con otras

investigaciones manifiestan una tendencia similar y por lo tanto es posible realizar inferencias sobre el comportamiento del brócoli después del procesamiento.

En los floretes escaldados a 75°C durante 3 minutos se presentó una actividad residual de POD de 24.95%, lo cual si se toman en cuenta las recomendaciones de Bötcher (1975) se consideran floretes que pueden presentar daños por efecto de la POD. En este punto cabe señalar que los floretes escaldados a 85°C, 80°C y 75°C durante 3 minutos fueron los lotes que presentaron un mejor desarrollo de color (fig. 10) por efecto del tratamiento térmico, lo que indica que efectivamente una de las funciones del escaldado es fijar el color en la hortalizas procesadas (Schwimmer, 1980). En los floretes acondicionados térmicamente a 68°C durante 2 minutos la actividad residual fue de 50.87%, lo que se considera un valor alto de actividad residual de POD (Bötcher, 1975). Cabe señalar, que para este tratamiento específico no encontramos datos reportados de actividad de POD.

En los floretes escaldados a 63°C durante 2 minutos el valor de actividad residual de POD obtenido fue de 60.49% lo cual también se considera alto. Este valor es menor a los valores de actividad de POD obtenidos por Ramírez y Whitaker (1997) para este mismo tratamiento quienes reportaron un valor de actividad residual del 85%. Estas diferencias pueden deberse a la diferencia de cultivar empleado como material, la estación de siembra, así como las condiciones de manejo previas a los tratamiento térmicos

Por último, la actividad residual de POD en los floretes escaldados a 58°C durante 2 minutos fue la más alta con un valor de 63.22%, lo cual se relaciona con producto de mala calidad por efecto de la POD, de acuerdo con las recomendaciones de Bötcher (1975) para crucíferas procesadas.

En cuanto al efecto del almacenamiento en la actividad de POD (fig. 3) para los diferentes escaldados y acondicionamientos térmicos, se encontró que la actividad de POD fue disminuyendo paulatinamente durante el primero y segundo mes de almacenamiento.

En los floretes escaldados a 85°C y 80°C durante tres minutos, se observó un ligero incremento de la actividad enzimática del orden de 300 unidades en el tercero, cuarto, quinto y sexto mes de almacenamiento.

Una explicación de este fenómeno puede relacionarse con cambios a nivel de estructura terciaria de la proteína y su vez con la presencia de isoenzimas. El papel de las isoenzimas en la regeneración de la actividad fue investigado hace tiempo por Wang y Di Marco (1972) a través de técnicas de espectrometría de ultravioleta y análisis de sedimentación. Ellos observaron que un ligero incremento en la temperatura de almacenamiento puede provocar agregados moleculares que contribuyen parcialmente a la regeneración de la actividad, dichos estados de agregación producen cambios conformacionales en la enzima posteriormente.

Lu y Whitaker (1974) añaden a esta información que el grupo prostético de las POD presenta varias etapas en su proceso de inactivación y regeneración. Ellos observaron en estudios de cinética de POD que el proceso de reactivación sigue una cinética de segundo orden, esto habla de la relativa complejidad del proceso pues manifiesta cambios conformacionales de la proteína durante el proceso de reactivación.

López y Burgos (1995) efectuaron experimentos para evaluar la reactivación de las POD en rábanos. Después de tratamientos de escaldado a 126.5°C, encontraron que se presentó una reactivación de POD en el orden de 14%, 42% y 69% después de 100, 300 y 450 minutos respectivamente, durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

Tales resultados muestran un cierto grado de reactivación, pero resulta difícil comparar estos hallazgos con los resultados de este experimental, ya que los tratamientos, los tiempos y las temperaturas de almacenamiento son diferentes. En un mismo orden de ideas, López y Burgos (1995) concluyen que la reactivación de las POD se ve más favorecida a temperatura ambiente que a bajas temperaturas. Lo anterior concuerda con los experimentos efectuados por Susan y col. (1995) quienes encontraron reactivación de la POD durante las primeras 72 horas de almacenamiento en floretes de brócoli escaldados en agua hirviendo durante 4 minutos.

En experimentos realizados por Ganthavorn y Powers (1988) en espárragos escaldados y almacenados posteriormente a -18°C durante 250 días, se encontró un incremento en la actividad de POD al mes y medio de almacenamiento. Sin embargo, en sus conclusiones no pudieron explicar ese hecho, ya que pasado ese tiempo la actividad de la POD regresó a los niveles iniciales que mostró después del escaldado. Finalmente atribuyeron este súbito incremento en la actividad a un posible error sistemático en su proceso experimental.

De lo anteriormente expuesto, concluimos que a pesar de no apreciar cambios en las características de calidad en los floretes escaldados a 85°C y 80°C durante 3 minutos del tercero al sexto mes de almacenamiento, es probable que se hubiesen presentados cambios conformacionales en el grupo prostético de la proteína que al final provocaran un cambio sensible en la absorción de espectro de luz ultravioleta y que se apreciara en un incremento de 300 unidades en la actividad de la POD en los floretes de brócoli.

Las diferencias en los resultados de actividad por efecto del almacenamiento entre las investigaciones de este proceso experimental y los de los otros autores pueden deberse a la diferencia de cultivar y a las condiciones en las cuales se realizó el experimental.

Otra diferencia puede estribar en lo reportado por McCune (1961) quien señaló la presencia de varias isoformas de la POD, las cuales presentan diferente termoestabilidad, lo cual también fue reportado por Robinson (1987).

Continuando con el análisis de los datos obtenidos, para el grupo control en el quinto mes la actividad se elevó con respecto a la tendencia que se venía observando en los meses anteriores. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre este valor y el de junio, por lo que no se puede decir que haya reactivación de la enzima. Este ligero aumento pudo deberse a una fluctuación en la temperatura de almacenamiento. Por último en el sexto mes se mantuvo la tendencia a la baja de la actividad enzimática.

Con respecto al efecto del almacenamiento en la actividad enzimática de los filetes escaldados a 68°C, 63°C y 58°C durante 2 minutos los niveles de actividad de POD permanecieron constantes en el segundo y tercer mes durante el almacenamiento, por lo que se puede inferir que no existió ningún efecto del almacenamiento en este periodo. Para estos mismos tratamientos en el tercer, cuarto, quinto y sexto mes respectivamente, se presentó una ligera elevación en la actividad. Sin embargo, no se puede considerar como una reactivación, pues no existió diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto a los meses anteriores.

De lo anterior podemos concluir que los efectos estadísticamente significativos ($p < 0.05$) en la actividad de POD, fueron provocados en forma general por efecto de los tratamientos térmicos y no por el almacenamiento.

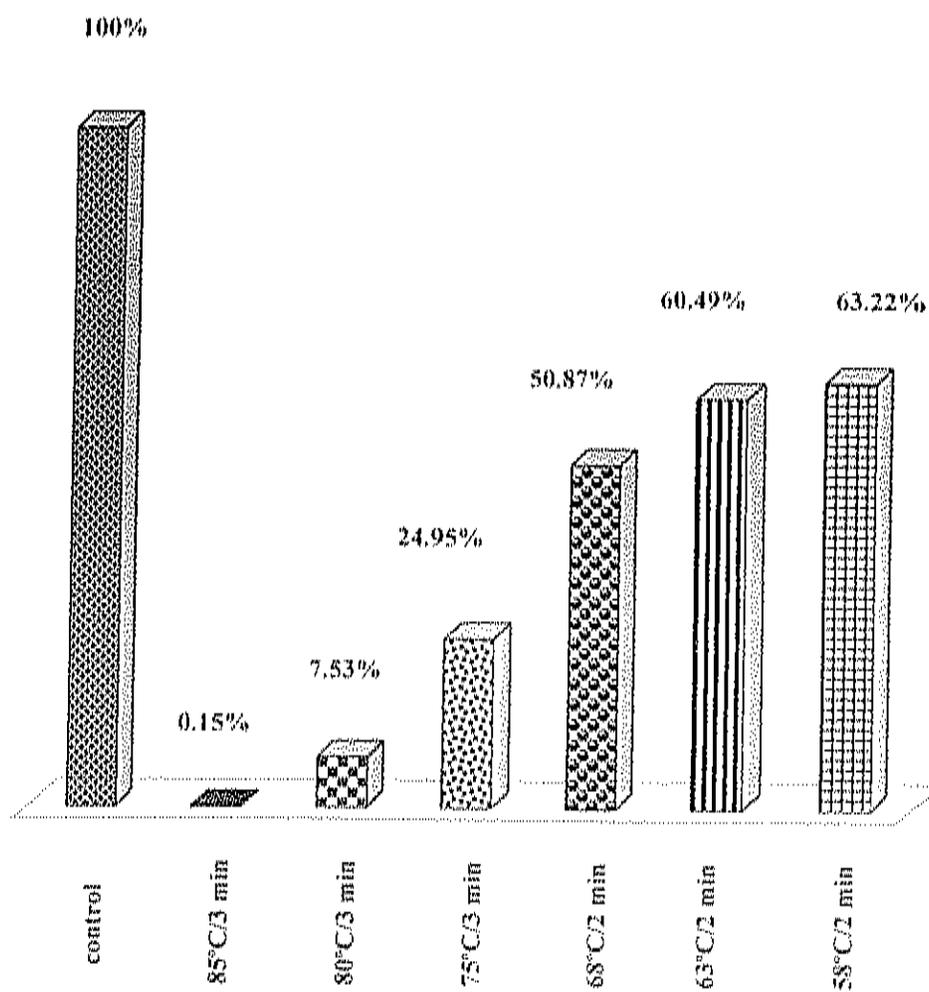


Fig. 2.- Porcentaje de actividad residual de POD en floretes de brócoli sometidos a diferentes tratamientos térmicos y almacenados a -20°C durante 6 meses.

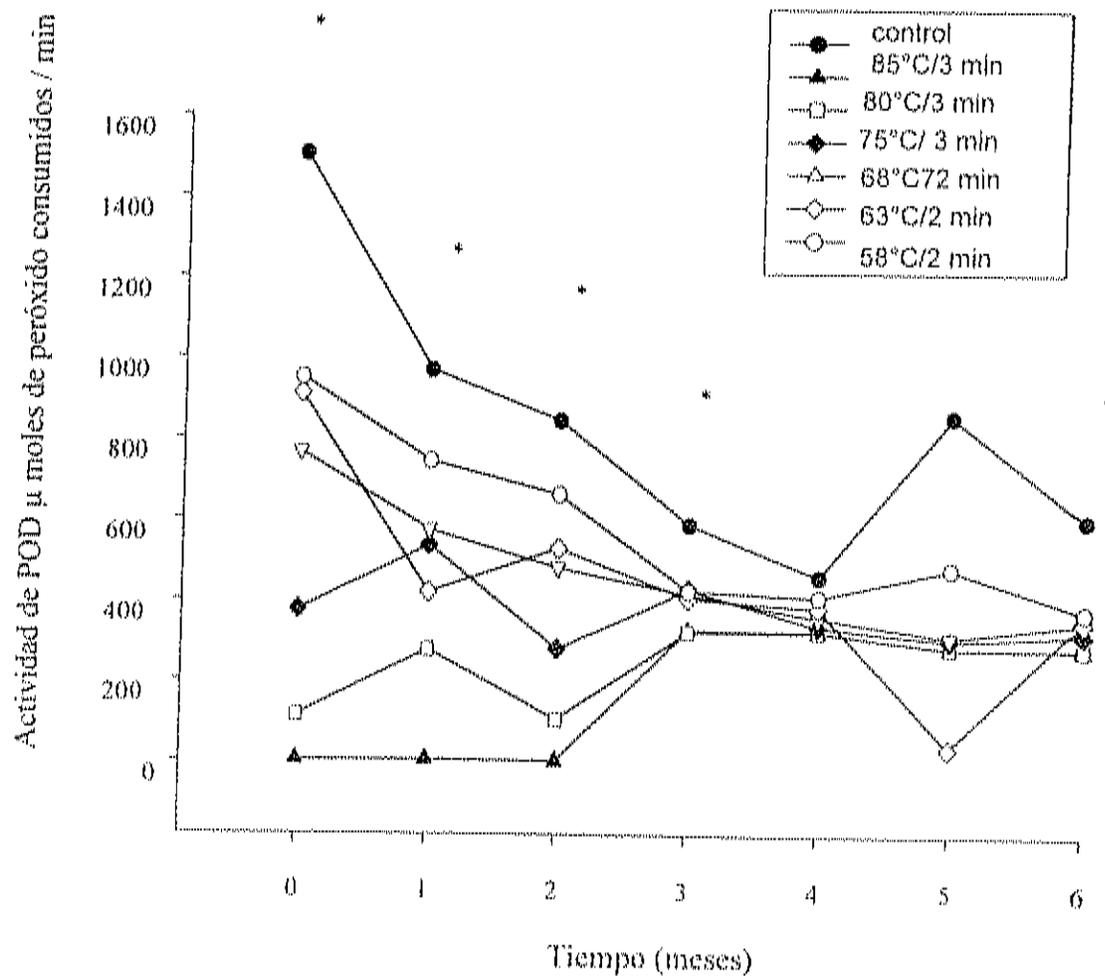


Fig. 3.- Efecto de los tratamientos térmicos sobre la actividad de POD en floretes de brócoli almacenados a -20°C . (*) Significancia estadística entre las medias de los tratamientos.

Efecto de la Temperatura y el Almacenamiento Sobre la Actividad de Cistina Liasa Medida por el Método de Dinitrofenilhidrazona.

La figura 4 muestra los resultados de la actividad residual de CL medida a través de la formación de dinitrofenilhidrazona, a partir de la reacción de dinitrofenilhidrazina con el piruvato proveniente de la catálisis enzimática de la CL.

Los resultados obtenidos muestran que los escaldados a 85°C y 80°C durante 3 minutos inactivaron por completo la actividad de la CL, estos datos concuerdan con los de Ramirez y Whitaker (1997) quienes sometieron floretes de brócoli a los mismos tratamientos y obtuvieron resultados similares. Los floretes de brócoli escaldados a 75°C durante 3 minutos presentaron actividad residual del 5,52% y aunque no existen valores de actividad residual recomendados para esta enzima en brócoli, podemos decir que es un valor bajo, pues las recomendaciones para la actividad residual de enzimas en el procesamiento fluctúan entre el 2 y 12% (Scwhimmer, 1980). Por lo anterior, suponemos que en los floretes de brócoli escaldados por arriba de los 75°C durante 3 minutos no presentarán síntesis de compuestos que modifiquen el sabor y el aroma en los floretes de brócoli por acción de la CL sobre sus sustratos (Lim y col., 1989)

Con respecto al tratamiento de 68°C durante 2 minutos, la actividad residual de CL en esos floretes fue de 12,35%, podemos suponer que el valor está en el límite de las actividades enzimáticas residuales permitidas para brócoli procesado, ya que en crucíferas como la coliflor y la col de bruselas los estándares de actividad enzimática para monitorear el proceso de escaldado no rebasan el 12% (Bötcher, 1975). De lo anterior podemos suponer que la síntesis de compuestos que modifican el aroma se presentará en niveles muy bajos.

Los floretes acondicionados a 63°C durante 2 minutos presentaron valores de actividad residual de CL de 29,11% este valor se considera alto y se relaciona con la síntesis de compuestos que modifican el sabor y el aroma en el brócoli (Lim y col., 1989). Estos resultados fueron diferentes a los encontrados por Ramírez y Whitaker (1997) quienes para este mismo tratamiento reportaron una inactivación de 100% de actividad de CL. La razón de estas variaciones con en los dos proceso experimentales puede deberse a la diferencia de cultivar, la estación de siembra y cosecha, así como a las condiciones de manejo previas a los acondicionamientos térmicos.

Los floretes acondicionados a 58°C durante 2 minutos presentaron una actividad residual de 59,44% y por lo tanto es de esperarse que en estos lotes también se presente una síntesis temprana de compuestos que modifican el sabor y el aroma de brócoli por acción de la CL (Lim y col., 1989).

Con respecto al efecto del almacenamiento en la actividad de CL (fig. 5) en el grupo control se observó una disminución paulatina de la actividad en el primero y segundo mes a partir del tercer mes y hasta el sexto, los niveles de actividad de CL disminuyeron por abajo del 70% con respecto a los niveles observados al inicio del almacenamiento. Para estas condiciones y esta enzima, no existen datos reportados de experimentos similares. Sin embargo, es probable que la enzima en este periodo haya sufrido cambios irreversibles en su estructura terciaria por efecto combinado del tiempo y de las bajas temperaturas y por lo tanto podemos inferir que en estos floretes a partir del tercer mes de almacenamiento la síntesis de compuestos que modifican el sabor y el aroma será nula.

En los lotes de floretes escaldados a 85°C y 80°C durante 3 minutos se inactivó por completo a la CL y esto mismo se presentó en todos los meses subsecuentes. El escaldado a 75°C durante 3 minutos fue suficiente para inactivar prácticamente a la enzima y a excepción de un pequeño incremento en la actividad en el primer mes de

almacenamiento se observó el efecto combinado de la temperatura y el tiempo que a partir del tercer mes inactivaron a la enzima por completo.

Por lo tanto, podemos concluir que los escaldados convencionales son suficientes para inactivar a la CL y por lo tanto evitar que se sintetizen compuestos que modifiquen el sabor y el aroma por acción de esta enzima (Lim y col., 1989). Así mismo, el almacenamiento a -20°C a lo largo del tiempo provoca que la actividad de la enzima disminuya a niveles prácticamente de cero, esto se presenta principalmente a partir del tercer mes.

Por otro lado, en floretes acondicionados a temperaturas inferiores a los 68°C durante 2 minutos, la enzima presentó niveles de actividad que pueden propiciar la síntesis de compuestos que modifican el aroma y el sabor de acuerdo con Lim y col., (1989) y se puede inferir que el almacenamiento a -20°C a partir del tercer mes inactiva casi por completo la actividad de la CL.

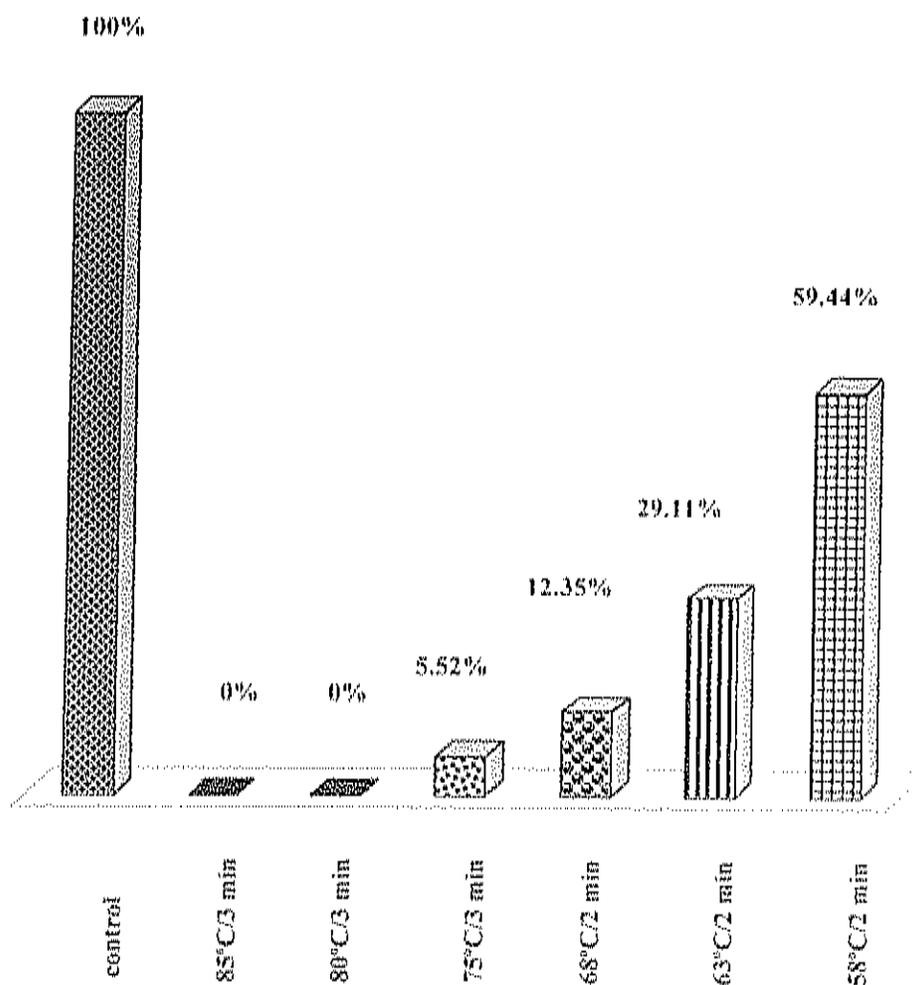


Fig. 4.- Porcentaje de actividad residual de CL medida por el método de DNPH en floretes de brócoli sometidos a diferentes tratamientos térmicos y almacenados a -20°C durante 6 meses.

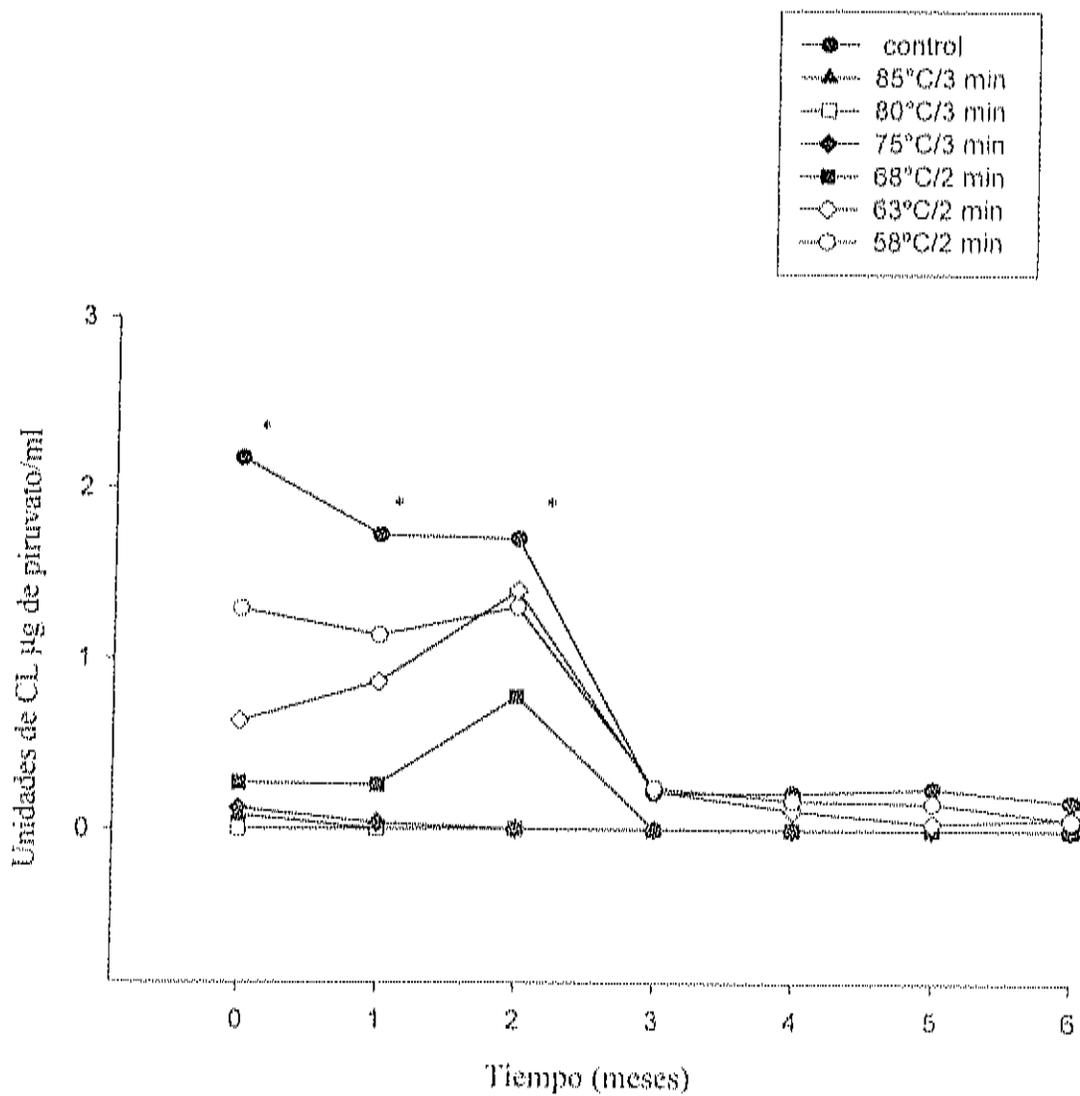


Figura 5.- Efecto de los diferentes tratamientos térmicos sobre la actividad de CL medida por el método de DNPH en floretes de brócoli almacenados a -20°C . Control (*) Significancia estadística entre las medias de los tratamientos.

Efecto de la Temperatura y el Almacenamiento sobre la Actividad de Cistina Liasa Medida por la Formación de Tiocisteína.

La Fig. 6 muestra la actividad residual de CL a través de la formación de tiocisteína, el cual es uno de los productos de reacción de esta enzima sobre sus sustratos.

Los resultados indicaron que los escaldados a 85°C y 80°C durante 3 minutos fueron suficientes para inactivar por completo la actividad de CL. Algo similar ocurrió con los floretes escaldados a 75°C durante 3 minutos en donde los niveles de actividad de CL fueron de 3.38% aproximadamente. Estos datos son similares a los obtenidos por el método de DNPH. Por lo tanto podemos inferir que en los escaldados convencionales no se sintetizan compuestos que modifican el sabor y el aroma por acción de la CL (Lim y col., 1989).

En los floretes escaldados a 68°C durante 2 minutos la actividad residual de la enzima fue del 11.51% lo que se considera un valor relativamente bajo de acuerdo con las recomendaciones de Bötcher (1975). Para los acondicionamientos de 63°C y 58°C durante 2 minutos los valores de actividad residual se comportaron de la misma forma que los datos obtenidos por la técnica de medición de CL por DNPH, es decir; los niveles fueron por arriba del 50% lo que hace suponer que en estos lotes de floretes se sintetizaran los compuestos que modifican el sabor y el aroma en el brócoli (Lim y col., 1989).

Con respecto al efecto del almacenamiento en la actividad de la CL (fig. 7) los resultados indican que en el primer mes las actividades enzimáticas del grupo control y el grupo de floretes acondicionado térmicamente a 58°C durante 2 minutos, presentaron valores de actividad de CL estadísticamente superiores ($p < 0.05$) al resto de los escaldados y tratamientos térmicos. En estos dos lotes la actividad fue disminuyendo

paulatinamente mes con mes y de forma constante hasta llegar a un 50% menos de la actividad inicial en el almacenamiento. De lo anterior podemos decir que el almacenamiento a -20°C a través del tiempo, sí tiene un efecto de inhibición sobre la actividad de la CL.

El lote de floretes acondicionado a 63°C durante 2 minutos presentó una disminución de la actividad enzimática a lo largo del tiempo. Sin embargo, la disminución no fue tan drástica como en el grupo control y la del acondicionamiento a 68°C . El comportamiento más estable de la enzima en los floretes escaldados a 63°C puede aducirse a que en esta temperatura los cambios conformacionales en la estructura terciaria de la proteína no son tan severos.

Por último los floretes acondicionados a 68°C durante 2 minutos y los escaldados a 85°C , 80°C y 75°C durante 3 minutos fueron suficientes para mantener los niveles de actividad de CL casi en cero y así permanecieron a lo largo del almacenamiento, por lo que podemos decir que el almacenamiento no tuvo efecto significativo en los niveles de actividad de CL medida por el método de tiocisteína

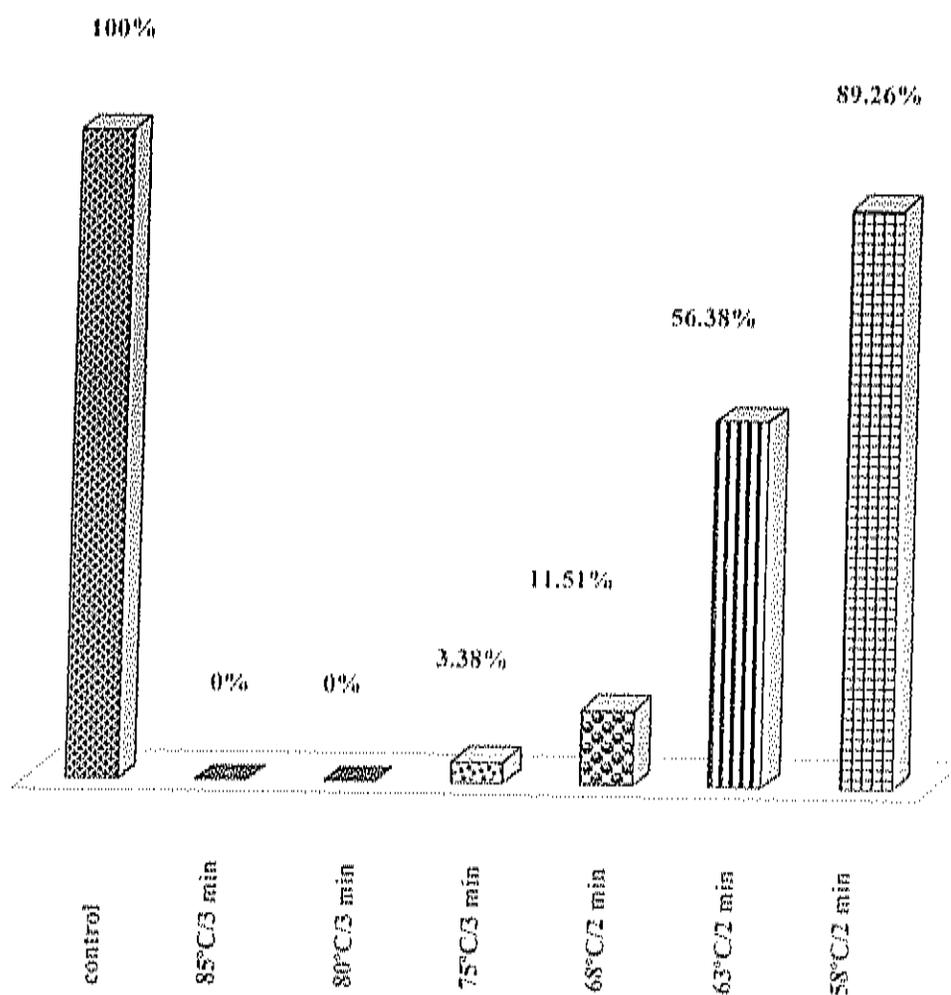


Fig. 6.- Porcentaje de actividad residual de CL, medida por el método de tiocisteína en floretes de brócoli sometidos a diferentes tratamientos térmicos y almacenados a -20°C durante 6 meses.

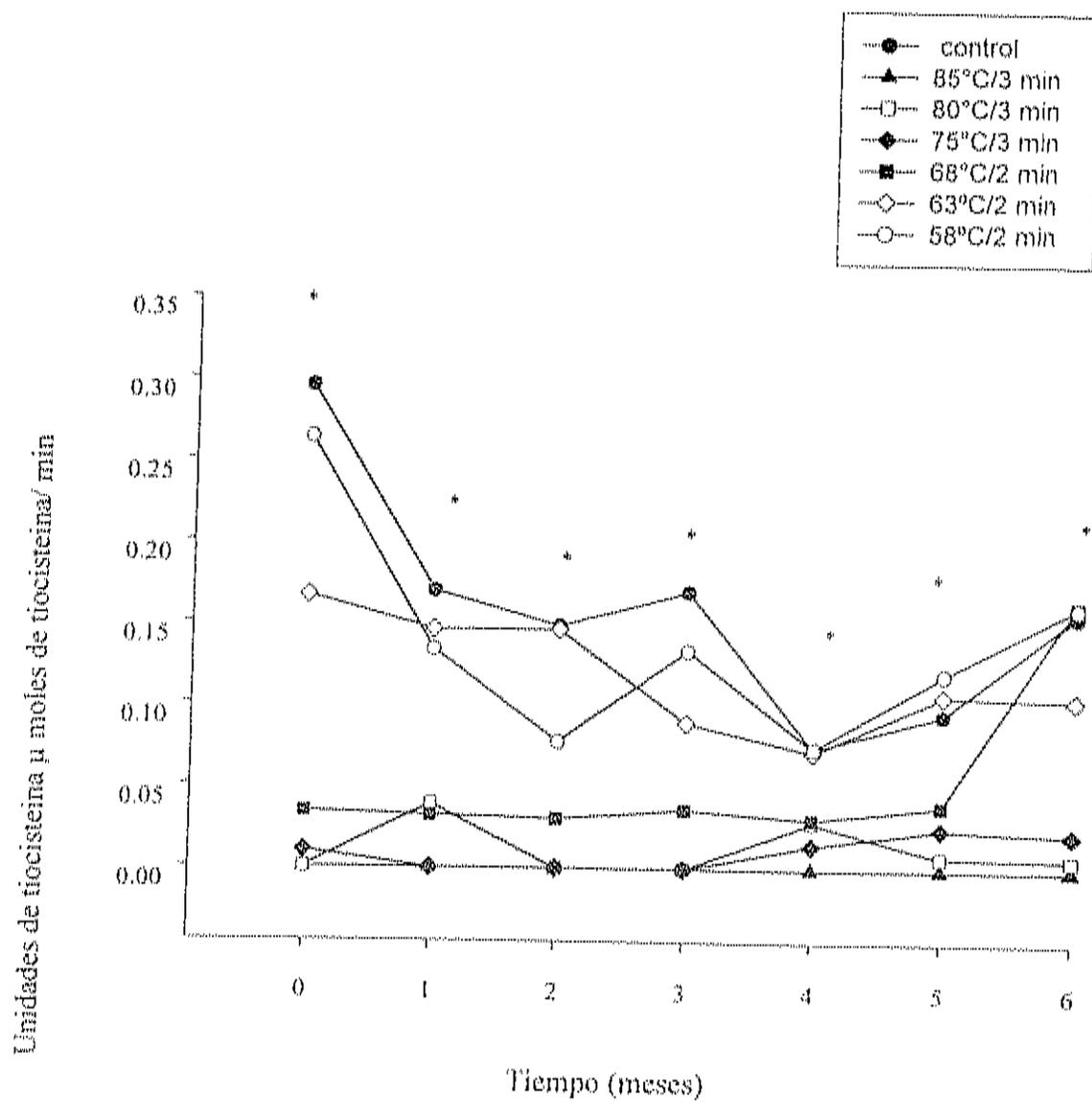


Figura 7.- Efecto de los diferentes tratamientos térmicos sobre la actividad de CL medida por el método de tiocisteina en floretes de brócoli almacenados a -20°C . (*) Significancia estadística entre las medias de los tratamientos

Efecto de la Temperatura y el Almacenamiento Sobre la Concentración de Proteína.

La Figura 8 muestra los resultados obtenidos para la determinación de la concentración de proteína por el método de Biuret en floretes de brócoli sometidos a diferentes escaldados y acondicionamientos térmicos y almacenados a -20°C .

En el inicio del experimental se observó que en el grupo control (sin ningún tratamiento) y el grupo acondicionado térmicamente a 58°C durante 2 minutos, la concentración de proteína fue estadísticamente mayor ($p < 0.05$) a la encontrada en los floretes escaldados a 85°C , 80°C y 75°C durante 3 minutos y los floretes acondicionados térmicamente a 68°C y 63°C durante 2 minutos.

Los resultados obtenidos nos indican que la concentración de proteína disminuyó significativamente ($p < 0.05$) por efecto de los escaldados y los acondicionamientos térmicos, pero estas concentraciones no presentaron cambios estadísticamente significativos ($p > 0.05$) durante el almacenamiento a -20°C durante 6 meses. Esta disminución en las primeras horas se debe a que las proteínas son un sustrato del proceso de respiración, el cual es continuo en el tejido poco después de la cosecha.

A partir de los datos obtenidos se observa que la concentración de proteína permaneció constante a lo largo de los seis meses de almacenamiento, la explicación de estas diferencias estriba en que la temperatura de almacenamiento a -20°C disminuyó en gran medida la velocidad metabólica y por lo tanto aquellos procesos en donde la proteína puede ser un sustrato metabólico. Lo anterior descarta la posibilidad de que el almacenamiento por congelación tenga un efecto sustancial en la disminución de la concentración de proteína.

De lo anterior podemos concluir que las variaciones en las concentraciones de proteína tienen que atribuirse al efecto de los tratamientos térmicos. Al respecto estudios efectuados por Tian y col. (1997) en floretes de brócoli acondicionados a 20°C, 45°C y 47°C durante 10, 10 y 7.5 minutos respectivamente, reportaron un decremento del 50% en la concentración de proteína soluble después de 7 horas. Esto se relaciona con los resultados obtenidos, en donde también se percibe una disminución notable en la concentración de proteína posterior a los escaldados, lo cual puede aducirse a una desnaturalización parcial de la proteína por efecto de la temperatura, pues según se observa entre más severo es el tratamiento térmico, menor es la concentración de proteína.

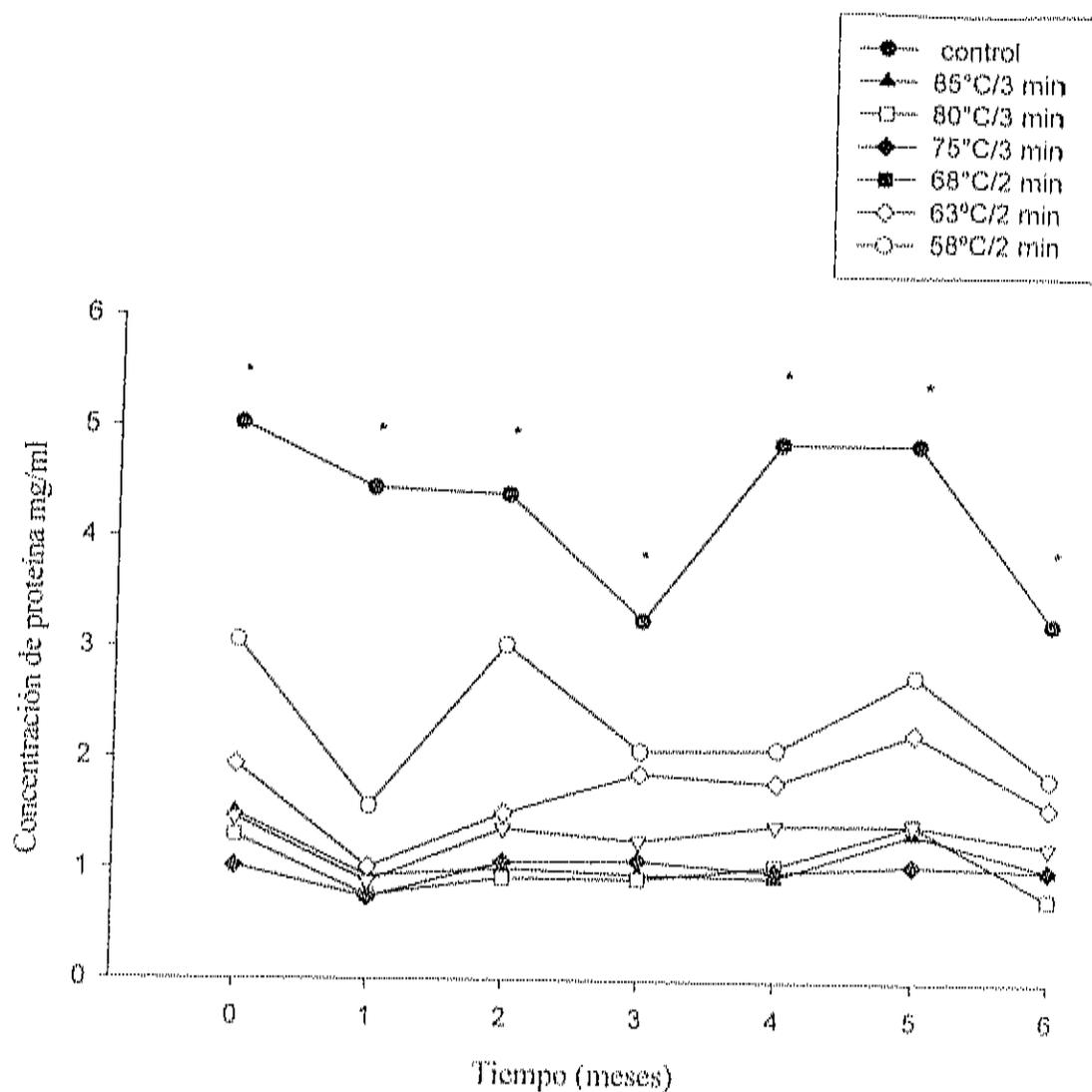


Figura 8.- Efecto de los diferentes tratamientos térmicos sobre la concentración de proteína en floretes de brócoli almacenados a -20°C y medida por el método de Biuret. (*) Significancia estadística entre las medias de los tratamientos.

Efecto de la Temperatura y el Almacenamiento Sobre la Textura

La Fig. 9 muestra los resultados en la determinación de textura a través de la medición de la resistencia a la punción en el tallo de los floretes de brócoli sometidos a los diferentes escaldados y acondicionamientos térmicos y almacenados a -20°C durante 6 meses.

Los resultados arrojados por las pruebas de textura indican que no existió diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la resistencia a la punción entre ninguno de los grupos de los floretes escaldados y acondicionados térmicamente. Estos resultados fueron los más intrigantes dentro de este proceso experimental, sobre todo si partimos de la suposición de que la exposición de tejido a una fuente relativamente alta de calor debe propiciar cambios en las paredes de las células, que se reflejen en la modificación de la textura. La posible explicación de esta resistencia a los tratamientos de escaldado y acondicionamientos térmicos radica en lo siguiente:

El contenido de tejido parenquimatoso en el brócoli es muy elevado (Schrumpf y Charley, 1975). Este tejido se caracteriza por cumplir con dos funciones básicas que son, ser conductivo y conectivo. En el caso del brócoli este tejido se encuentra estructuralmente arreglado de tal manera que forma una cobertura a lo largo de la porción central del tallo.

Experimentos efectuados por Schrumpf y Charley (1975) en donde sometieron tallos de brócoli a escaldados en agua hirviendo durante 12 minutos, mostraron a través de microfotografías que el tejido parenquimatoso no mostró cambios sustanciales en su constitución al ser comparado con tallos frescos. Esto nos puede dar un indicio de la notable resistencia de los tallos de brócoli en los datos obtenidos.

Otro hallazgo interesante en sus experimentos fue que las células se encontraban colapsadas por efecto de la temperatura, lo que se reflejaba en un notorio arrugamiento de su superficie. Ellos adujeron que esto era provocado por el tratamiento térmico tan severo. Sin embargo, en los datos obtenidos del experimental no incluimos pruebas de pérdidas de peso para poder relacionar el efecto de los acondicionamientos térmicos con la deshidratación del tejido.

Otra hipótesis plausible para explicar la resistencia del tejido del brócoli, es en el sentido de la posible acción de la enzima pectín metil esterasa (PME) y su posible efecto en el reblandecimiento de los tejidos en frutas y hortalizas. (Sterling, 1963) señaló que una remoción rápida de una considerable cantidad de agua puede tener efecto en la pared celular de las frutas y hortalizas al modificar las características de polímeros como la celulosa, la hemicelulosa y las sustancias pécticas, ya que pueden cristalizar por efecto de la deshidratación. Sterling (1963) señaló que la (PME) en los tejidos de algunos vegetales (no preciso cuales) se encuentra inactiva a temperaturas por abajo de los 50°C y superiores a los 70°C. De lo anterior podemos suponer que en los procesos de escaldado de 85°C, 80°C y 75°C durante 3 minutos esta enzima se inactivó y por lo tanto no se presentó ningún efecto de reblandecimiento por su causa.

Respecto a los acondicionamientos térmicos de 68°C, 63°C y 58°C durante 2 minutos, el efecto de la (PME) puede inferirse que no actuó debido a la alta resistencia del tejido parenquimatoso que cubre el centro del tallo y que debido a lo leve de los tratamientos térmicos quedó intacto.

Al respecto (Schrumpf y Charley, 1975) efectuaron un análisis de las cantidades de sustancias pécticas en tejido del brócoli, ellos encontraron que el porcentaje de estos polímeros en el tejido era del 0.42% en peso fresco y que el escaldado en agua hirviendo incrementaba esta cantidad en un 0.12% mas. Sin embargo, ellos lo atribuyen al colapsado de las células y concluyen que la estimación de estas sustancias no es un

elemento sólido para defender la hipótesis de que la (PME) desempeña un papel importante en la modificación de la textura en el brócoli y concluyen que la resistencia del tejido radica en la cantidad de tejido parenquimatoso.

Efecto de la Temperatura y el Almacenamiento Sobre el Color

Se efectuaron las mediciones de color obteniéndose los valores de a^* , b^* y L^* . A partir de estos parámetros se obtuvo la diferencia total de color (fig. 10) de cada uno de los tratamientos térmicos. La diferencia total de color se hizo con respecto al grupo control, el cual fue el producto fresco al inicio del experimental.

Los resultados indicaron que existió una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el color, entre el control y el resto de los tratamientos térmicos por efecto de los escaldados y los acondicionamientos térmicos. El incremento notable en los valores de la diferencia total de color en el inicio del experimental se debió a un aumento en los valores de b^* y L^* respecto al control por efecto de los escaldados y los acondicionamientos térmicos. Datos similares fueron reportados por (Gnanasekhraran y col., 1992) quienes realizaron experimentos en floretes de brócoli almacenados a dos temperaturas -4°C y 21°C , que aunque son condiciones diferentes a las de nuestro experimental, las diferencias totales de color se comportaron en forma similar, lo que nos indica que las temperaturas inducen cambios de color en el tejido del brócoli.

Las diferencias significativas que se apreciaron entre el control y el resto de los tratamientos térmicos se deben a un incremento en el valor de ($-a^*$) provocado por el tratamiento térmico, dato también reportado por (Susan y col., 1995) quienes efectuaron mediciones de color en floretes de brócoli escaldados en agua hirviendo durante 4 minutos. Este cambio en el color verde de los floretes se debe a la oxidación que sufre el

Mg⁺² del centro de las clorofilas por efecto de la temperatura, estas clorofilas se oxidan a feofitinas que son compuestos oxidados que absorben diferente longitud de onda que las clorofilas sin tratamiento térmico, esto último se refleja en un aumento en la intensidad de color verde.

En los mismos experimentos de (Susan y col.,1995) reportaron que el escaldado de floretes de brócoli en agua hirviendo durante 4 minutos produjo un incremento en el parámetro *chroma*, el cual determina la saturación y la intensidad del color verde. Esto mismo se apreció en todos los escaldados y acondicionamientos térmicos del proceso experimental.

Sin embargo, se apreciaron diferencias con respecto a los resultados de color reportados por Susan y col. (1995) y los datos obtenidos en este trabajo de investigación. Ellos reportaron que el valor de *b** en los tallos y los floretes escaldados en agua hirviendo aumentó considerablemente con respecto al control, lo cual representa un amarillamiento en la apariencia del florete. Lo anterior fue diferente a los resultados obtenidos, pues los valores de *b** después de los escaldados y acondicionamientos térmicos en general fueron disminuyendo, tanto por efecto del tratamiento térmico como por efecto del almacenamiento en congelación. En otras palabras, los floretes se tornaron más verdes por efecto de los escaldados. Una posible explicación de esta diferencia podría fundamentarse en la intensidad del tratamiento al que fueron sometidos sus floretes, ya que el agua estuvo muy cercana a los 100°C, además la exposición en el tiempo fue mayor (4 min.) y por lo tanto las clorofilas pudieron ser mas susceptibles a degradarse en compuestos de color amarillo como son las feofitinas, lo cual es un fenómeno ya comprobado.

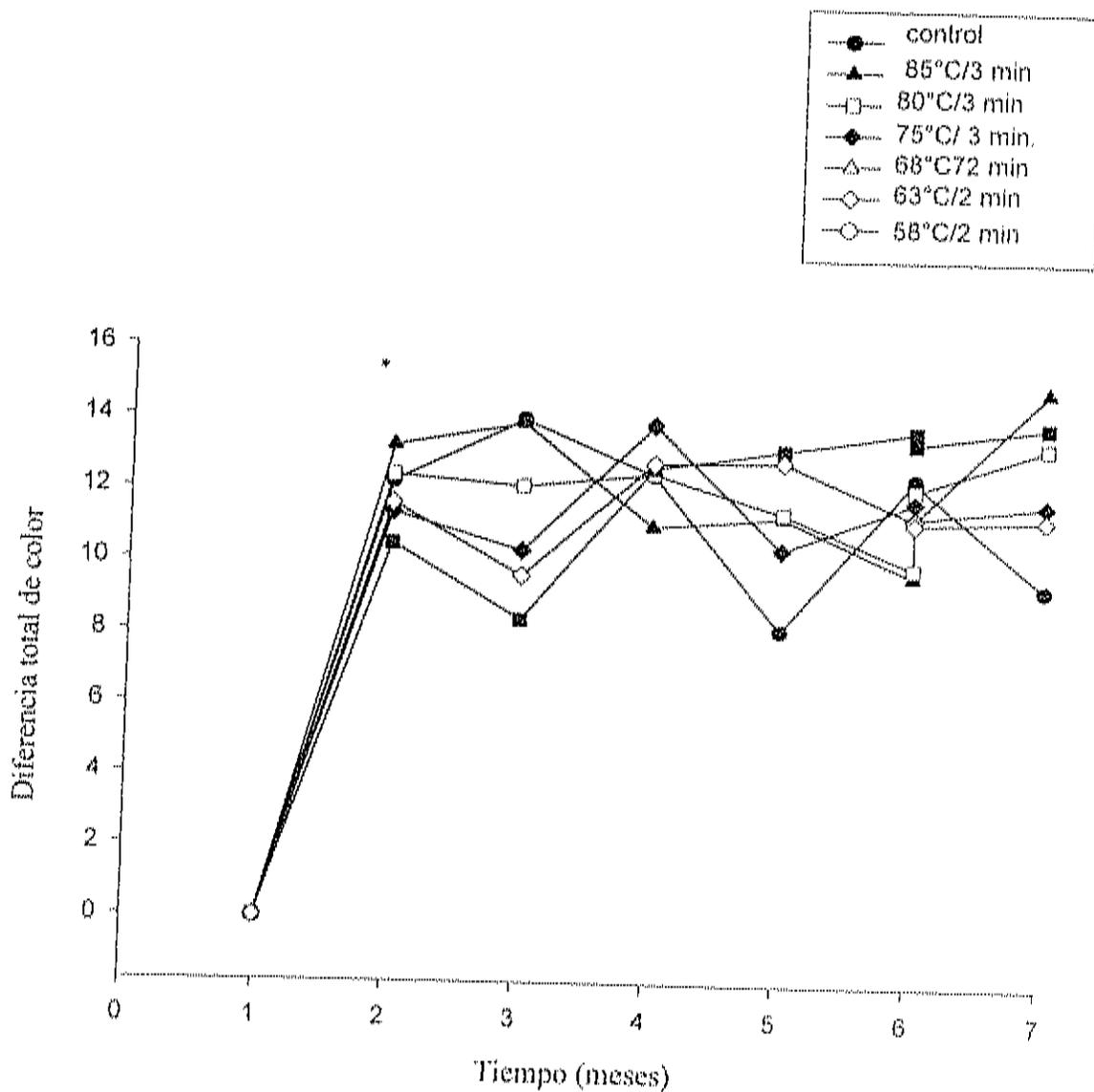


Figura 10.- Efecto de los diferentes tratamientos térmicos sobre el color en floretes de brócoli almacenados a -20°C . El cambio de color se midió como diferencia total de color, tomando como referencia el producto fresco al inicio del experimental. (*) Significancia estadística entre las medias de los tratamientos.

Por último, se obtuvo el ángulo de matiz Hue (fig.11) para cada uno de los escaldados y acondicionamientos térmicos, se efectuaron las comparaciones y los resultados fueron los siguientes: los valores medios de Hue de los floretes acondicionados térmicamente a 68°C, 63°C y 58°C durante 2 minutos fueron mayores estadísticamente ($p < 0.05$) a los valores de Hue de los floretes escaldados a 85°C, 75°C y 75°C durante 3 minutos. Lo anterior concuerda con lo establecido por Schwimmer (1980) quien menciona que lo escaldados tienen como una de sus funciones fijar el color verde de los hortalizas. Esto se corroboró en el proceso experimental pues las diferencias totales de color y el ángulo de matiz Hue mostraron que entre más elevado fue el tratamiento térmico, más verde se tornaron los floretes.

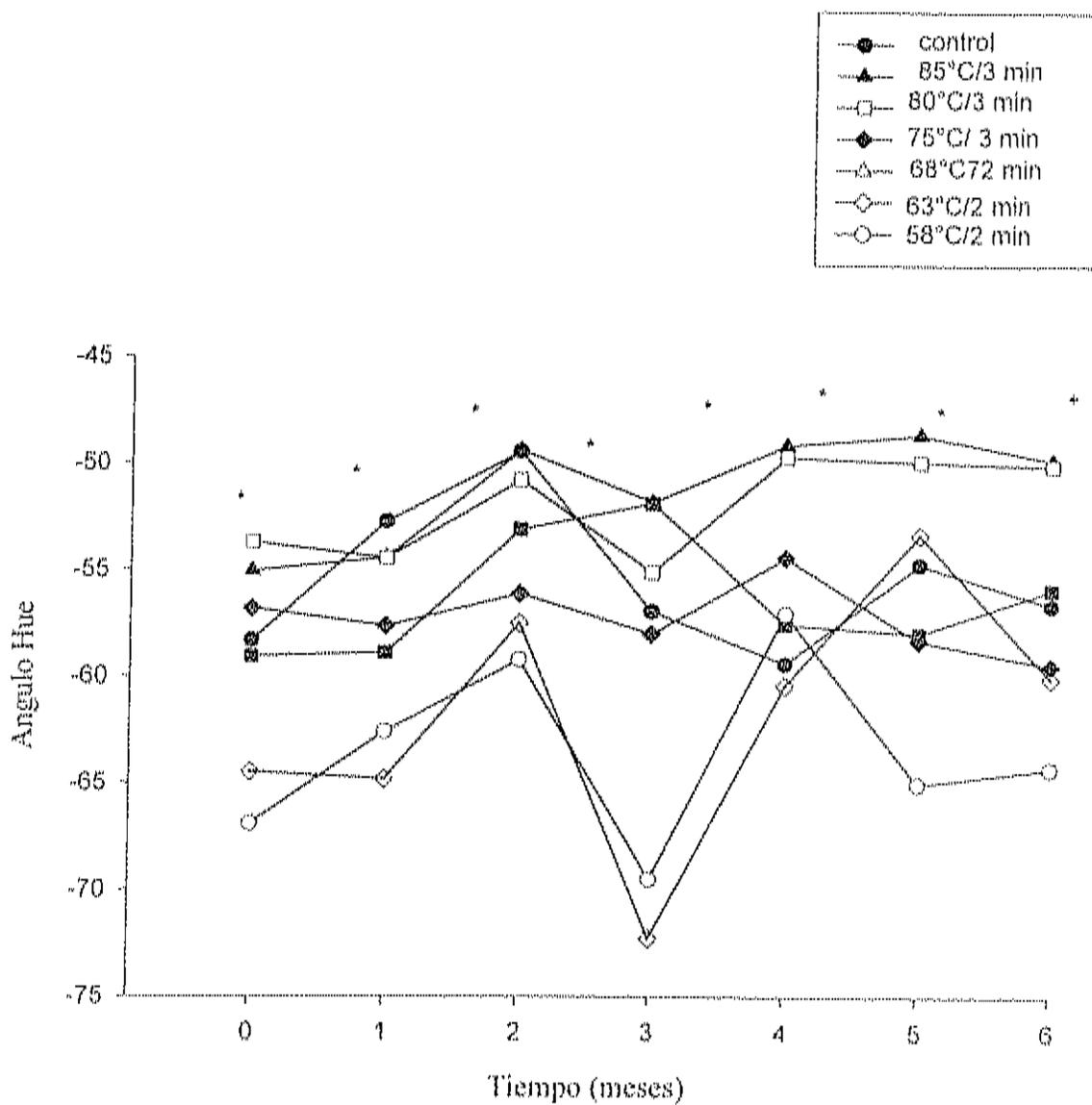


Figura 11.- Efecto de los diferentes tratamientos térmicos sobre el color en floretes de brócoli almacenados a -20°C . El cambio de color está graficado a través del ángulo Hue. (*) Significancia estadística entre las medidas de los tratamientos.

CONCLUSIONES

El escaldado a 85°C, 80°C y 75°C durante 3 minutos reduce la actividad de POD en los floretes de brócoli a niveles recomendados en vegetales procesados.

La actividad de POD presentó un ligero incremento durante el tercer, cuarto, quinto y sexto mes durante el almacenamiento en los floretes escaldados a 85°C y 80°C durante 3 min. Sin embargo, no se observaron cambios sustanciales en las características generales de frescura.

El escaldado a 75°C durante 3 minutos, así como, el acondicionamiento a 68°C durante 2 minutos, reducen la actividad de CL en los floretes de brócoli a niveles del 12%, respecto al grupo control y es inhibida a partir de 80°C durante 3 minutos.

La actividad de CL no presentó reactivación en ninguno de los tratamientos durante el almacenamiento a -20°C, estabilizando su actividad a partir del tercer mes de almacenamiento.

El color de los floretes de todos los tratamientos térmicos fue estable durante el almacenamiento, siendo más atractivo en los floretes escaldados a 85°C y 80°C durante 3 minutos.

La firmeza de los floretes no mostró diferencias estadísticas por efecto de los tratamientos térmicos.

Es necesario realizar investigación más detallada, en tratamientos entre los 75°C durante 3 minutos y 68°C durante 2 minutos, ya que la actividad de CL y POD en estos tratamientos, puede relacionarse con productos de buena calidad.

REFERENCIAS

- Bailey, S D., Bazinet, M.L., Driscoll, J. L. And McCarthy, A. I. 1961. The volatile sulfur components of cabbage. *Journal Food Science*. 26: 163-170.
- Barret, M.D. and Theerakulkait, C. 1995. Quality Indicators in Blanched, Frozen, Stored Vegetables. *Food technology*. 2 : 62-65.
- Böttcher, H. 1975. Enzyme activity and quality of frozen vegetables. I. Remaining residues of peroxidase (German). *Nahrung* 19: 173-179.
- Brackett, R. E. 1989. Changes in the microflora of packaged fresh broccoli. *Journal Food Quality*. 12: 169-181.
- Brennan, P. S. and Shewfelt, R. L. 1989. Effect of cooling delay at harvest on broccoli quality during postharvest storage. *Journal Food Science*. 12: 13-22.
- Brewer, M. S., Klein, B. P., Rastogi, B. K. and Perry, A., K. 1994. Microwave blanching effects on chemical, sensory and color characteristics of frozen green beans. *J. Food Quality* 17: 245-259.
- Burnette, F. S. 1975. Peroxidase and its relationship to Food flavor and quality: a review. *J. Food Sci.* 42: 1-6.
- Buttery, R. G., Guadagni, D. G., Ling, L. C., Seifert, R. M. and Lipton, W. 1976. Additional volatile components of cabbage, broccoli, and cauliflower. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 24: 829-832.

- Cavallito, C. J. and Bailey, J. H. 1944a. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. Isolation, physical properties and antimicrobial action. Journal American Chemistry. Society. 66: 1950-1951.
- Chin, H. W., Linsay, R.C. 1993. Volatile sulfur compounds formed in disrupted tissues of different cabbage cultivars. Journal Food Science. 58: 835-839.
- Dan, K., Todoriki, S., Nagata, M. and Yamashita, I., 1997. Formation of volatile compounds in broccoli florets stored under anaerobic conditions. Journal Jpn. Soc. Hort. Sci. 65: 867-875.
- Di Pentima, J., Clemente, A. and Olias, J. 1995. Biogenesis of off-odor in broccoli storage under low-oxygen atmosphere. J. Agric. Food Chem. 43: 131-1313.
- Forney, C. F. 1995. Hot-Water Dips Extend the Shelf Life of Fresh Broccoli. HortScience. 30(5): 1054-1057.
- Forney, C. F., Matteis, J. P., Austin R.K. 1991. Volatile compounds produced by broccoli under anaerobic conditions. Journal Food Science. 39: 2257-2259.
- Francis, F., J. and Clydesdale, F., M. 1975. Green Vegetables. In Food Colorimetry: Theory and Applications. Ch 2: 214-226.
- Fridovich, I. 1974. Superoxide dismutase. Adv. Enzymol. 41: 35-97.
- Friedemann, T. and Haugen, G. 1943. The determination of Keto Acids in Blood and Urine. J. Biol. Chem. 147: 415-442. Journal Agricultural Food Chemistry

- Ganthavorn, C., Nagel, C. And Powers, J. 1991. Thermal inactivation of asparagus lipoxigenase and peroxidase. *J.of Food Sci.* 56: 47-49.
- Gornall, A., Bardawill, C. and David, M. 1949. The Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-766.
- Gnanasekharan, R., Shewfelt, and Chinman, M. 1992. Detection of color changes in green vegetables. *Journal of Food Science.* Vol. 57.
- Haard, N. F. 1977. Physiological roles of peroxidase in postharvest fruits and vegetables. In *Enzymes in fruits and beverages*. R. L. Ory and A. J. St. Angelo (Editors). Am. Chem. Soc., Washington, D. C.
- Hall, D. and Smith, and 1983. Partial purification and characterization of cystine liase from cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata). *Plant Physiol.* 72: 702-706.
- Hamamoto, A. and Mazells, M. 1986. The C-S liases of higher plants: isolation and properties of homogeneous cystine lyase from broccoli buds. *Plant Physiol.* 80: 702-706.
- Hansen, M., Buttery, R. G., Stern, D. J., Cantwell, M. I., Ling, L. C. 1992. Broccoli storage under low-oxygen atmosphere: identification of higher boiling volatiles. *Journal Food Science.* 40: 850-852.
- Hemeda, H., M. and Klein, B., P. 1990. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *J. Food Science.* 55: 184-187.
- Joslyn, M. A. and Cruces, W. 1929. Freezing of fruits and vegetables. *Fruit Prod. Journal* 8 (7): 9-12.

- Joslyn, M. A. 1949. Enzyme activity in frozen vegetable tissue. *Adv. Enzymol.* 9: 606-652.
- Joslyn, M. A. 1961.B. Physiological and enzymological aspects of juice production. In *Fruit and vegetable juice processing Technology*. D. K. Tressler and M.A. Joslyn (editors). AVI Publishing Co., Wesport, Conn.
- Joslyn, M. A. 1966. The freezing of fruits and vegetables. In *Cryobiology*. H. T. Meryman (Editor). Academic Press, New York.
- Karlsn, P. 1965. Ch. 9. Porphyrins and Hemins. *Introduction to modern Biochemistry*, Academic Press. New York. 173.
- Klein, B., P. 1992. Fruits and vegetables. In *Food Theory and Applications*, (J. Bowers, ed.), Macmillan Publishing Co., New York, NY. 687-766.
- Klieber, A. and Will, R.H. 1991. Optimisation of storage conditions for 'Shogun' broccoli. *Scientia Horticulturae*. 47: 201-208.
- Kyung, K. and Fleming, H. 1994. S-Methyl-L-Cysteine Sulfoxide as the Precursor of Methyl Methanethiosulfinate, the Principal Antibacterial Compound in Cabbage. *Journal Food Science*. 59: 350-355.
- Lang, J., Bog-Hansen, T. C., Poulsen, K.P. 1994. Blanching control by use of several enzyme indicators. *Proceedings of L'Association Nationale du Froid*. Actes Edition, Rabat, Marokko. 129-138.

- Lim, M.H., Velasco, P.J., Pangborn, R.M. and Whitaker, J.R. 1989. Enzymes involved in off-roma formation in broccoli. in "Quality factors of fruits and vegetables" de. Comstock, M.J. : 72-83., ACS Symposium Series, No. 45 Washington, D.C.
- Linsay, R. and Rippe, J. 1986 Enzymic Generation of Methanotiol to Assist in the Flavor Development of Cheddar Chesse and other Foods. ACS Symp. Ser. 137: 286-308.
- Lincoln C. Pierce. 1987. Characteristics, production and Marketing. John Wiley and Sons Inc. 12: 207-217.
- Lipton, W. J. and C. M. Harris. 1974. Controlled atmosphere effects on market quality of stored broccoli. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99:200.
- López, P, and Burgos, J, 1995. Peroxidase stability and reactivation after heat treatment and manothermosonication. J. of Food Sci. 60: 451-455.
- Lu, A. T. and Whitaker, J. R. 1974. Some Factors Affecting rates of heat inactivation of horseradish peroxidase. J. Food Sci. 39: 1173-1177.
- Maehly, A. and Chance, B. 1954. The assay of catalases and peroxidases. In Methods of Biochemical Analysis. Interscience Publishers, New York. 1; 357
- Mathews C. K. and van Holde K. E. 1990. Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 216-259.
- McCune , D. C. 1961. Multiple peroxidases in corn. Ann. N. Y. Acad. Sci. 94: 723.

- Mitchell, F. G. 1992. Cooling horticultural commodities: 53-63. In: A.A. Kader (ed.). Postharvest Technology of horticultural crops. Univ. of California Publi. 3311.
- Nebesky, E. A., Esselen, W. B., Kaplan, A. M. Y Fellers, C., R. 1950. Thermal destruction and stability of peroxidase in acid foods. Food Res. 15: 114.
- Oaks, D. M., Hartmann, H., Dimick, K. P. 1964. Analisis of sulfur compounds With electron capture hydrogen flame dual channel gas chromatography. Anal. Chem. 36: 1560-1565.
- Obenland, D., and Aung, L., 1996. Cystine lyase activity and anaerobically-induced sulfur gas emission from broccoli florets. Phyton, 58: 147-156.
- Ramírez E. C. and Whitaker J. R. 1997. Thermal Stability Between Cystine Lyase and Peroxidase in Broccoli. J. Food Sci. (Accepted).
- Ramírez E. C. and Whitaker J. R. 1998a. Cystin liase as blanching indicator in broccoli. Italian Journal of Food Science, (Accepted).
- Ramírez E. C. and Whitaker, J. R. 1999. Caracterización of Cystine Lyase from Broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*). Journal Agricultural and Food Chemistry. 47:2218-2225.
- Reed, G. 1975. Oxidorreductases. In Enzymes in Food Processing, P. 216. Academic Press, New York.
- Robinson, D. S. 1987. Food: Biochemistry and Nutritional Value. Harlow, Essex, England: Longman Scientific & Technical: New York: Wiley.

- Ruiz-Herrera, J. Starkey, R. L. 1969. Dissimilation of Methionine by a Demethylase of *Aspergillus* Species. *Journal Bacteriology* 99: 286-770.
- Ryall, A. L. and Lipton, W. J. 1979. Handling, transportation and storage of fruits and vegetables. Vol. 1 Vegetables and melons. 2nd. ed. AVI, Wesport, Conn.
- Schmidt, A., Rennenberg, H., Wilson, L. G., Filner, P. 1985. Formation of methanethiol By Leaf tissue. *Phytochemistry*. 24(6): 1181-1185.
- Schrumpf, E and Charley, H. 1975. Texture Broccoli and carrots cooked by microwave energy. *Journal of Food Science*. 1025-1029.
- Schwimmer, S. 1978. Enzyme action and modification of cellular integrity in fruits and vegetables: Consequenses for food quality during ripening, senescence and processing. In post-harvest Biology and Biotechnology. H. O. Hultin and M. Milner (Editors). Food and Nutrition Press, Wesport, Conn.
- Schwimmer, S. 1980. Source Book of Food Enzymology. Avi Publishing Co. 1a. Edición. 202-216.
- Shewfelt, R. L., Batal, K.M. and Heaton E. K. 1983. Broccoli storage: Effect of N6-benzaladenine, packaging, and icing on colour of fresh broccoli. *Journal Food Science*. 48: 1594-1597.
- Stanton, A. and Mazelis, M. 1991. The C-S Lyases of higher plants: Homogeneous β -cystathionase of spinach leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 290: 46-50.
- Sterling, C. 1963. Texture and Cell-Wall polysaccharides in Foods, recent advances in food Science-3, (J.M Leitch and D.N. Rhodes, Eds.) Butterworths, London.

- Stoll, A. and Seebeck, E. 1951. Chemical investigation of allin, the specific principle of garlic. *Adv. Enzymol.* 11: 377-400.
- Stryer, 1990. *Bioquímica* 4^o Ed. Editorial Reverté S. A. España. Cap 7:152
- Susan, M., Shahnaz, B and Ava, Bozeman. 1995. Microwave and Conventional Blanching Effects On Chemical, Sensory, and Color Characteristics of Frozen Broccoli. *Journal of Food Quality*, 18: 479-493.
- Sweeney, J and Martin, M. 1958. Determination of Chlorophyll and Pheophytin in Broccoli Heated By Various Procedures. Human Nutrition Research Service, U.S. Department of Agricultural, Washington D. C.
- Tian M.S., Talebul Islam, D.G. Stevenson and D.E. Irving. 1997. Color, ethylene production, respiration, and compositional changes in broccoli dipped in hot water. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122(1): 112-116.
- USDA. 1975. Technical inspection procedures for the use of USDA inspectors. U.S. Dept. of Agriculture, Agricultural Marketing Service, Washington, D. C.
- Vamos-Vigyazo, L.V. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- Wang, L. H., and Di Marco, G. R. 1972. Isolation and characterization of the native, thermally inactivated and regenerated horseradish peroxidase isozymes. *J Food Sci.* 39: 574-578.
- Whitaker, J. R. 1976. Development of flavor, odor, and pungency in onion and garlic. *Adv. Food Res.* 22: 73-133.

Williams, D. C., Lim, M. H., Chen, A. O., Pangborn, R. M. and Whitaker, J. R. 1986.
Blanching of vegetables for freezing-Which indicator enzyme to choose. *Food Technol.* 40(6): 130-140.

Williams, D. C., Lim, M. H., Chen, A. O., Pangborn, R. M. and Whitaker, J. R. 1986.
Blanching of vegetables for freezing-Which indicator enzyme to choose. *Food Technol.* 40(6): 130-140.