



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

Efecte de l'aplicació d'ultrasons sobre la inhibició de la polifenoloxidasa i peroxidasa en patata (*Solanum tuberosum*)

Treball final de grau
Enginyeria Alimentaria

Treball de Final de Grau realitzat per:

Ivan de Gea Teixidó

Sota la direcció de:

Dra. Montserrat Pujolà i Cunill

Dr. Francesc Sepulcre i Sánchez

Castelldefels, juny de 2019



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

Resum

Efecte de l'aplicació d'ultrasons sobre la inhibició de la polifenoloxidasa i peroxidasa en patata (*Solanum tuberosum*)

Autor: Ivan de Gea Teixidó

Directores: Dra. Monstserrat Pujolà Cunill i Dr. Francesc Sepulcre Sánchez

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona – Grau en Enginyeria Alimentària, Universitat Politècnica de Catalunya.

La indústria alimentària té com a prioritat el desenvolupament de mètodes que permetin l'obtenció d'aliments amb seguretat, bon aspecte i que al mateix temps conservin les qualitats organolèptiques. Hi ha un gran nombre de mètodes, entre els nous trobem el d'aplicació d'altres pressions i els ultrasons.

L'objectiu d'aquest treball és determinar l'efecte de tots els paràmetres del tractament de sonicació(ultrasons, solucions àcides, aigua i temperatura) sobre l'activitat de la Polifenoloxidasa (PPO) i Peroxidasa (PRO). Per determinar l'efecte de l'aigua i la temperatura, s'ha utilitzat un bany d'aigua termoregulable on s'ha submergit la patata tallada (5,10 i 20 minuts) en diferents temperatures, (17°C, 30°C i 35°C).

Per determinar l'efecte dels ultrasons i els medis àcids, s'ha aplicat tractament d'ultrasons a la patata tallada durant diferents temps (5,10 i 20 minuts) en diferents medis (aigua, àcid cítric 1% i àcid ascòrbic 1%). S'han avaluat la temperatura i els sòlids solubles en el medi i en la mostra de la patata el color, i l'activitat de PPO i PRO. L'activitat enzimàtica de la PPO s'ha quantificat a partir de la reacció amb catecol i mesurant l'absorbància a $\lambda=410\text{nm}$, i la PRO a partir de la reacció amb guaiacol en presència de H_2O_2 i posteriorment mesurant l'absorbància a $\lambda=420\text{nm}$, cada una d'elles realitzant lectures cada 30 segons durant 10 minuts.

Els resultats obtinguts indiquen que la immersió de la patata en aigua té un efecte inhibidor sobre l'activitat de la PPO i la PRO, mentre que la temperatura té l'efecte contrari especialment a major temperatura (35°C) i major temps d'exposició (20 min).

L'aplicació ultrasons, té un efecte inhibició en el cas de l'activitat de la PPO, sent major als 10 minuts, en canvi té un efecte contrari en la PRO. L'aplicació dels ultrasons en els diferents medis genera un increment de temperatura d'uns 14-16°C als 20 minuts, arribant fins a un màxim de 33°C.

La utilització de medis àcids en el tractament de sonicació genera un increment de la inhibició de l'activitat de la PPO, en canvi en el cas de la PRO no s'han obtingut resultats conclouents.

En el cas dels tractaments amb àcids s'observa un augment de la inhibició respecte a el temps de sonicació, sent major a 20 minuts. El tractament de sonicació amb àcid ascòrbic 1% durant 20 min, és el que presenta una major inhibició de la PPO.

L'estudi del color ens mostra una relació significativa entre la PPO amb la lluminositat, i la PRO amb el Chroma de la patata.

Paraules clau: Enfosquiment enzimàtic, Inhibició, Ultrasons. Àcid ascòrbic, àcid cítric, temperatura .

Resumen

Efecto de la aplicación de ultrasonidos sobre la inhibición de la polifenoloxidasas y peroxidasa en patata (*Solanum tuberosum*)

Autor: Ivan de Gea Teixidó

Directores: Dra. Monstserrat Pujolà Cunill y Dr. Francesc Sepulcre Sánchez

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona – Grada en ingeniería Alimentària, Universitat Politècnica de Catalunya.

La industria alimentaria tiene como prioridad el desarrollo de métodos que permitan la obtención de alimentos con seguridad, buen aspecto y que al mismo tiempo conserven las cualidades organolépticas. Hay un gran número de métodos, entre los nuevos encontramos el de aplicación de altas presiones y los ultrasonidos.

El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de todos los parámetros del tratamiento de sonicación (ultrasonidos, soluciones ácidas, agua y temperatura) sobre la actividad de la polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (PRO). Para determinar el efecto del agua y la temperatura, se ha utilizado un baño de agua termoregurable donde se ha sumergido la patata cortada en agua destilada (5,10 y 20 minutos) a diferentes temperaturas, (17 °C, 30 °C y 35 °C).

Para determinar el efecto de los ultrasonidos y los medios ácidos, se ha aplicado tratamiento de ultrasonidos a la patata cortada durante diferentes tiempos (5,10 y 20 minutos) en diferentes medios (agua, ácido cítrico 1% y ácido ascórbico 1%). Se han evaluado la temperatura y los sólidos solubles en el medio y en la muestra de la patata el color, y la actividad de PPO y PRO. La actividad enzimática de la PPO se ha cuantificado a partir de la reacción con catecol y midiendo la absorbancia a $\lambda = 410\text{nm}$, y la PRO a partir de la reacción con guaiacol en presencia de H_2O_2 y posteriormente midiendo la absorbancia a $\lambda = 420\text{nm}$, cada una de ellas realizando lecturas cada 30 segundos durante 10 minutos.

Los resultados obtenidos indican que la inmersión de la patata en agua tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la PPO y la PRO, mientras que la temperatura tiene el efecto contrario especialmente a mayor temperatura (35 °C) y mayor tiempo de exposición (20 min).

La aplicación ultrasonidos tiene un efecto inhibición en el caso de la actividad de la PPO, siendo mayor a los 10 minutos, en cambio tiene un efecto contrario en la PRO. La aplicación de los ultrasonidos en los diferentes medios genera un incremento de temperatura de unos 14-16 °C los 20 minutos, llegando hasta un máximo de 33 °C.

La utilización de medios ácidos en el tratamiento de sonicación genera un incremento de la inhibición de la actividad de la PPO, en cambio en el caso de la PRO no se han obtenido resultados concluyentes.

En el caso de los tratamientos con ácidos observa un aumento de la inhibición respecto al tiempo de sonicación, siendo mayor a 20 minutos. El tratamiento de sonicación con ácido ascórbico 1% durante 20 min, es el que presenta una mayor inhibición de la PPO.

Palabras clave: Oscurecimiento enzimático, Inhibición, Ultrasonidos. Ácido ascórbico, ácido cítrico, temperatura.

Abstract

Effect of ULTRASOUND APPLICATION on the inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase in potato (*Solanum tuberosum*)

Author: Ivan de Gea Teixidó

Directors: Dr. Monstserrat Pujolà Cunill and Dr. Francesc Sepulcre Sánchez

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona – Grau en Enginyeria Alimentària, Universitat Politècnica de Catalunya.

The food industry has as a priority the development of methods that allow the obtaining of food with security, good looks and at the same time retain the organoleptic qualities. There are a great number of methods, among the new we find the application of high pressures and ultrasounds.

The objective of this work is to determine the effect of all the parameters of sonication treatment (ultrasound, acid solutions, water and temperature) on the activity of Polyphenoloxidase (PPO) and Peroxidase (PRO). To determine the effect of water and temperature, a thermoregulable water bath has been used where the cut potato (5.10 and 20 minutes) has been submerged in different temperatures, (17 °C, 30 °C and 35 °C)

To determine the effect of ultrasound and acid media, applied ultrasound treatment to potato carved for different times (5, 10 and 20 minutes) in different media, water, 1% citric acid and ascorbic acid 1%. The temperature and the soluble solids in the medium and in the sample of the potato have been evaluated the color, and the activity of PPO and PRO. The enzymatic activity of the PPO has been quantified from the reaction with catechol and measuring the absorbance at $\lambda = 410$ nm, and the PRO from the reaction with guaiacol in the presence of H₂O₂ and subsequently measuring the absorbance at $\lambda = 420$ nm, each one performing readings every 30 seconds for 10 minutes.

The results obtained indicate that the immersion of the potato in water has an inhibitory effect on the activity of the PPO and the PRO, while the temperature has the opposite effect especially at higher temperatures (35°C) and longer exposure time (20 min).

The ultrasonic application has an inhibitory effect in the case of the PPO activity, being greater than 10 minutes, but has an opposite effect on the PRO. The application of ultrasound in different media generates an increase in temperature of about 14-16 °C at 20 minutes, reaching a maximum of 33°C.

The use of acidic means in the treatment of sonication generates an increase in the inhibition of the activity of the PPO, however, in the case of the PRO, no conclusive results have been obtained.

In the case of acid treatments, an increase in the inhibition with respect to sonication time is observed, being greater than 20 minutes. The sonication treatment with ascorbic acid 1% for 20 min is the one that has a greater inhibition of the PPO.

Keywords: Enzymatic Enfosition, Inhibition, Ultrasound. Ascorbic acid, citric acid, temperature.



Índex

1. Introducció	1
1.1 Enfosquiment enzimàtic	1
1.2 Enzims relacionats amb l'enfosquiment enzimàtic	2
1.2.1 Polifenoloxidasa (PPO)	2
1.2.2 Peroxidasa (PRO)	3
1.3 Mètodes per evitar l'enfosquiment enzimàtic	3
1.3.1 Mètodes Físics	4
1.3.2 Mètodes químics	7
2. Objectius	9
3. Materials i mètodes	10
3.1 Patata	10
3.2 Equips	10
3.3 Disseny experimental	12
3.3.1 Tractament d'immersió en aigua destil·lada a diferents temperatures	13
3.3.2 Sonicació en diferents medis	13
3.3.3 Tractament Control	14
3.3.4 Determinació de l'activitat enzimàtica de la PPO i PRO de les mostres	14
3.3.5 Determinació del grau d'inhibició	15
3.3.6 Determinació del color	15
3.3.7 Anàlisi estadístic	16
4. Resultats i Discussió	17
4.1 Efectes de la sonicació sobre el medi: Temperatura i sòlids solubles	17
4.1.1 Efecte de la sonicació sobre la temperatura del medi	17
4.1.2 Efecte de la sonicació sobre el contingut de sòlids solubles	18
4.2 Efectes dels tractaments sobre l'activitat de l'enzim polifenoloxidasa (PPO)	18
4.2.1 Activitat Enzimàtica de les mostres control. (PPO)	18
4.2.2 Efectes de l'aigua i temperatures sobre l'activitat enzimàtica (PPO)	19
4.2.3 Efecte dels ultrasons i solucions àcides en l'activitat de la polifenoloxidasa (PPO)	23
4.2.4 Efectes dels tractaments sobre la inhibició de l'activitat de la polifenoloxidasa (PPO)	27
4.2.5 Percentatges d'inhibició dels diferents paràmetres sobre l'activitat enzimàtica (PPO)	29
4.3 Efecte dels tractaments sobre l'activitat enzimàtica de la Peroxidasa (PRO)	32
4.3.1 Activitat Enzimàtica de les mostres control (PRO)	32
4.3.2 Efectes de l'aigua i temperatura sobre l'activitat enzimàtica (PRO)	32
4.3.3 Efecte dels ultrasons i solucions àcides sobre l'activitat de la peroxidasa (PRO)	36
4.3.4 Efectes dels tractaments sobre la inhibició de l'activitat de la peroxidasa (PRO)	40
4.3.5 Efectes inhibidors dels diferents paràmetres sobre l'activitat enzimàtica (PRO)	41
4.4 Comparació dels efectes dels tractaments de la PPO i PRO	43
4.4.1 Efecte de l'aigua i la temperatura en els diferents paràmetres de color	44
4.4.2 Efecte del tractament de sonicació en els diferents paràmetres de color	46
4.4.3 Relació de l'activitat de la PPO i PRO amb els paràmetres de color	47
5. Conclusions	48
6. Bibliografia	49

Índex de figures

Figura 1. Reaccions catalitzades per la polifenoloxidasa.....	2
Figura 2. Reaccions sobre compostos fenòlics catalitzades per la PRO	3
Figura 3. Implosió de les bombolles per cavitació.....	7
Figura 4. Bany d'aigua amb resistències calorífiques, Selecta.....	10
Figura 5. Equip d'ultrasons. Branson 2510 42kHz.	11
Figura 6. Espectrofotòmetre utilitzat, Shimadzu UV-1800.....	11
Figura 7. Diagrama del disseny experimental.....	12
Figura 8. Temperatura dels medis a diferents temps de sonicació (5,10 i 20 min)	17
Figura 9. Activitat de la polifenoloxidasa (PPO) en les mostres control	18
Figura 10. Activitat PPO de mostres submergides en aigua a diferents temperatures (17°C, 30°C i 35°C) a 5(a), 10(b) i 20 min(c).	20
Figura 11. Activitat de la PPO de les mostres submergides en aigua a diferents temperatures, 17°C (a), 30°C (b), 35°C (c).....	21
Figura 12. Activitat de la PPO (Absorbància) a temps zero de les mostres submergides en aigua a diferents temps (PPO)	23
Figura 13. Activitat PPO de les mostres sonicades en diferents medis (Aigua, A.Cítric i A.Ascòrbic) a 5min(a), 10 min (b) i 20 min (c).....	24
Figura 14. Activitat PPO de les mostres sonicades en diferents medis.(Aigua (a), Àcid cítric 1% (b), Àcid ascòrbic (c)).....	25
Figura 15. Activitat de la PPO (Absorbància) a temps zero de les mostres tractades per sonicació en diferents medis.	27
Figura 16. Inhibició de l'activitat de la PPO de les mostres submergides en aigua a diferents temperatures	28
Figura 17. Inhibició de l'activitat de la PPO de les mostres sonicades en diferents medis.....	29
Figura 18. Activitat de la peroxidasa (PRO) en la mostra control (Mitjana de tres repeticions) 32	
Figura 19. Activitat PRO de mostres submergides en aigua a diferents temperatures (17°C, 30°C i 35°C) a 5 min (a), 10 min (b) i 20 min (c).....	33
Figura 20. Activitat de la PRO de les mostres submergides en aigua a diferents temperatures, 17°C (a), 30°C (b), 35°C (c).....	34
Figura 21. Activitat de la PRO (absorbància) a temps zero de les mostres submergides en aigua a diferents temps.	36
Figura 22. Activitat PRO de les mostres sonicades en diferents medis (Aigua, A.cítric i A.ascòrbic) a 5min(a), 10 min (b) i 20 min (c).	37
Figura 23. Activitat PRO de les mostres sonicades en diferents medis.(Aigua (a), Àcid cítric 1% (b), Àcid ascòrbic (c)).....	38
Figura 24. Activitat de la PRO (absorbància) a temps zero de les mostres sonicades en diferents medis.	39
Figura 25. Inhibició de l'activitat de la PRO de les mostres submergides en aigua a diferents temperatures	40
Figura 26. Inhibició de l'activitat de la PRO de les mostres sonicades en diferents medis.....	41

Índex de taules

Taula 1. Mètodes utilitzats en la indústria alimentaria per inhibir l'enfosquiment enzimàtic	4
Taula 2. Equacions de la corbes d'activitat de la PPO per cada temps i temperatura d'immersió	22
Taula 3. Equacions de la corbes d'activitat de la PPO per cada temps i medi de sonicació	26
Taula 4. Grau d'inhibició de l'aigua i temperatura sobre l'activitat enzimàtica	30
Taula 5. Grau d'inhibició dels ultrasons i àcids sobre l'activitat enzimàtica	30
Taula 6. Efecte d'inhibició de la PPO dels paràmetres dels tractaments de sonicació en medis àcids	31
Taula 7. Equacions de la corbes d'activitat de la PRO per cada temps i temperatura d'immersió	35
Taula 8. Equacions de les corbes d'activitat de la PRO per cada temps i medi de sonicació	39
Taula 9. Grau d'inhibició de l'aigua i la temperatura sobre l'activitat enzimàtica (PRO)	41
Taula 10. Grau d'inhibició dels ultrasons i àcids sobre l'activitat enzimàtica (PRO)	42
Taula 11. Efecte d'inhibició de la PRO dels paràmetres dels tractaments de sonicació en medis àcids	43
Taula 12. Evolució de la lluminositat (L*), Chroma (C*), hue (h*) i índex de color (IC) en patata sense tractar i tractada amb immersió en aigua destil·lada a diferents temperatures.	44
Taula 13. Efecte de les diferents temperatures sobre els diferents paràmetres de color	45
Taula 14. Efecte del temps d'immersió en els diferents paràmetres del color	45
Taula 15. Evolució de la lluminositat(L*), Chroma(C*), hue(h*) i índex de color(IC) en patata sense tractar i tractada amb ultrasons a diferents temps de sonicació i en les diferents solucions.....	46
Taula 16. Efecte de les solucions emprades en els diferents paràmetres del color.	47
Taula 17. Efecte del temps de sonicació en els diferents paràmetres del color.	47



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

1. Introducció

Amb el repte d'alimentar a una població creixent, la indústria alimentària, evoluciona constantment. La tecnologia juga un paper imprescindible en aquest sector, on l'ajuda d'avanços científics i tècnics és possible produir aliments i begudes que s'adaptin millor a les demandes del consumidor de manera segura i amb processos productius més sostenibles i eficients.

Una de les prioritats de la indústria alimentària, és solucionar problemes que sorgeixen en la producció i la posterior comercialització dels aliments, aconseguint preservar el màxim possible les propietats originals d'aquest.

Un dels fenòmens important en els aliments vegetals, és l'enfosquiment enzimàtic. Aquest fenomen produeix coloracions fosques en el producte, que en la majoria d'ocasions suposen un problema. Aquestes reaccions es duen a terme a causa dels trencaments de teixits vegetatius, ocasionats per cops, durant el pelat, tallat, o altres tipus de manipulació. Aquests fenòmens produeixen un gran malbaratament alimentari i suposen una gran pèrdua econòmica per les empreses, ja que representen un defecte per al consumidor.

1.1 Enfosquiment enzimàtic

L'enfosquiment enzimàtic és una reacció d'oxidació, que afecta a la majoria de fruites, verdures, tubercles i altres aliments. En la reacció, intervenen com a substrat l'oxigen molecular i la reacció és catalitzada per enzims.

Els compostos foscos s'obtenen per un conjunt complex de reaccions, que s'inicia per les reaccions catalitzades de forma enzimàtica. La primera reacció succeeix quan el substrat està present com a monofenol i es transforma a difenol. La segona reacció és la transformació del difenol a quinona. A partir de la formació de quinones, la reacció progressa de forma espontània, ja que aquests compostos són molt reactius, donant lloc a polímers i reaccions amb altres substàncies presents en els aliments, especialment proteïnes. Els productes finals anomenats melanines, són d'un color molt fosc o negre, i insoluble en aigua. Aquests colors foscos són negatius per a la indústria alimentària, ja que afecten a les característiques dels productes finals. Aquests productes, també alteren el gust i l'aroma dels aliments.

Tot i que aquesta alteració de color, produït pels polímers, visualment és negatiu, aquests tenen propietats antimicrobianes actuant com a mecanisme de defensa dels vegetals.

El grau d'enfosquiment en l'aliment, es veu determinat principalment per un enzim anomenat polifenoloxidasa (PPO). L'enfosquiment enzimàtic serà proporcional a la quantitat que hi hagi present d'aquest enzim. És per això que la majoria dels mètodes que s'investiguen per inhibir l'enfosquiment enzimàtic, es centren en reduir l'acció de l'enzim PPO.

1.2 Enzims relacionats amb l'enfosquiment enzimàtic

1.2.1 Polifenoloxidasa (PPO)

La polifenoloxidasa (PPO) és un enzim que es troba tant en organismes procariotes com eucariotes. En organismes eucariotes sempre es localitza en òrgans cel·lulars, concretament en el cloroplast i els mitocondris. La PPO catalitza la formació de o-quinones amb dues reaccions enzimàtiques diferents:

Reacció 1: Hidroxilació de monofenols en la posició orto per obtenir o-difenols.

Reacció 2: Oxidació de o-difenols als seus corresponents o-quinonas.

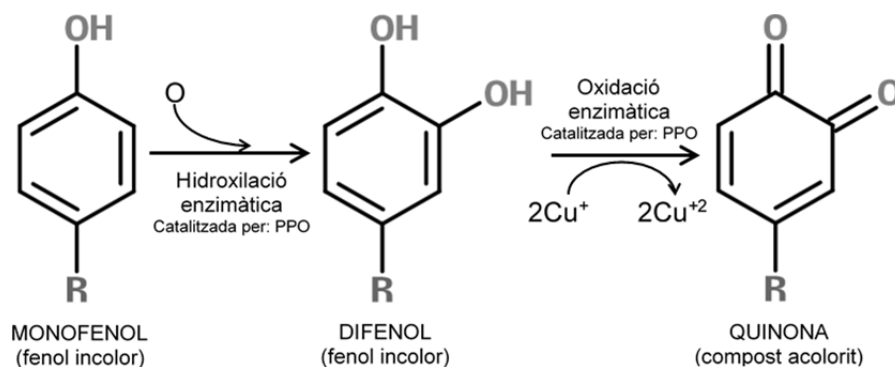


Figura 1. Reaccions catalitzades per la polifenoloxidasa

Font: Adaptació de Gacche et al. (2002).

El nivell d'activitat d'aquestes reaccions es veu afectat per diferents factors. La temperatura òptima és de 45°C i el pH òptim de 7,5. (Roquesa et al. , 2007)

1.2.2 Peroxidasa (PRO)

La peroxidasa (PRO) és un enzim que es troba àmpliament distribuït en les plantes.

Tenen ferro en el seu grup funcional, on la seva funció és oxidar els donants de hidrogen a expenses dels peròxids.

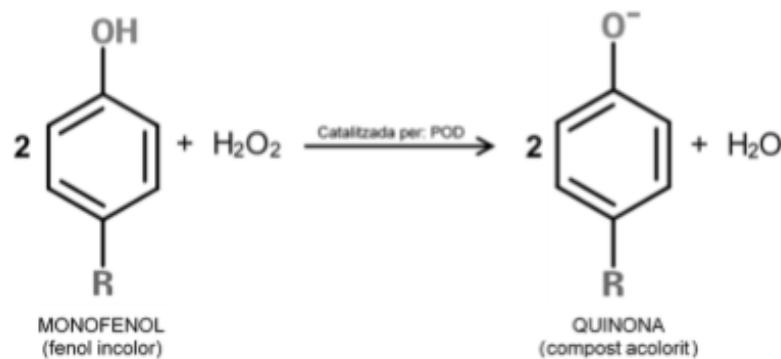


Figura 2. Reaccions sobre compostos fenòlics catalitzades per la PRO

Font: Adaptació de Gacche et al. (2002).

La temperatura òptima es troba entre els 40 i 50 °C (Castro et al. , 2006), l'estabilitat tèrmica és més alta que no pas en la polifenoloxidasa. La completa inactivació requereix un llarg període (minuts) d'exposició a una temperatura entre els 80 i 100 °C. Aquesta estabilitat generalment decreix al disminuir el pH al voltant de 3.

1.3 Mètodes per evitar l'enfosquiment enzimàtic

Hi ha diferents factors que afecten sobre l'activitat enzimàtica i que per tant són imprescindibles per evitar l'enfosquiment dels aliments. En la indústria alimentària es tenen en molta consideració els següents punts:

- **Selecció de les varietats de vegetals i fruites:** La selecció de la varietat influeix en l'activitat enzimàtica de l'aliment. És important realitzar un estudi previ per determinar la varietat més òptima.

- **Temperatura:** Les altes temperatures augmenten la velocitat d'oxidació ocasionada per l'activitat enzimàtica.
- **Disponibilitat del O₂:** L'oxigen és un reactiu de l'enfosquiment enzimàtic, per tant en la indústria alimentària és important reduir la seva presència.

En la indústria alimentària, s'apliquen diferents mètodes per evitar l'enfosquiment enzimàtic. Els mètodes desenvolupats per controlar, minimitzar o inhibir el procés d'enfosquiment enzimàtic, acostumen a ser preventius. Aquests mètodes comprenen quatre categories, segons si la pràctica inhibidora actua sobre l'enzim, el substrat, la disponibilitat d'O₂ o sobre els productes de la reacció, aquests mètodes es poden classificar a la vegada en dos categories: Mètodes físics i mètodes químics (Pérez et al. , 2003).

Taula 1. Mètodes utilitzats en la indústria alimentària per inhibir l'enfosquiment enzimàtic

Mètodes Químics	Mètodes Físics
<ul style="list-style-type: none"> - Agents quelants - Agents acidulants - Agents reductors 	<ul style="list-style-type: none"> - Tractaments tèrmics - Tractaments d'altres pressions - Reducció de la disponibilitat d'oxigen - Tractament amb polsos elèctrics - Ultrasons

1.3.1 Mètodes Físics

Per controlar l'activitat enzimàtica hi ha diferents tractaments/mètodes on es controlen o apliquen factors físics. En la indústria alimentària els paràmetres més utilitzats són: Les temperatures, les altes pressions, les atmosferes modificades, el buit, entre altres.

1.3.1.1 Tractaments tèrmics

Els tractaments tèrmics, són els més utilitzats en la indústria alimentària per la conservació d'aliments. Aquests s'utilitzen tant com per prevenir l'activitat enzimàtica com per inhibir-la.

- **Aplicació d'altres temperatures**

L'augment de temperatura, causa la desnaturalització dels enzims, normalment és irreversible i s'ajusta a una cinètica de primer ordre (Stauffer, 1989). Aquest tractament tèrmic té una alta eficiència, però la seva utilització només és recomanada per a verdures i fruites que posteriorment seran congelades o destinades per a conserves, ja que el tractament d'altres temperatures, causa una pèrdua de textura i reaccions d'enfosquiment del tipus no enzimàtic.

- **Aplicació de baixes temperatures**

La utilització de baixes temperatures és una de les mesures més utilitzades en la indústria per el control de l'activitat enzimàtica de verdures i fruites. Les temperatures baixes no només redueixen o retarden les activitats enzimàtiques responsables de l'enfosquiment, sinó que també conserven les qualitats dels productes.

Les baixes temperatures causen una reducció de la velocitat metabòlica del producte, aquest fet fa que es produeixi un increment de la vida útil dels aliments (Pérez et al. , 2003).

1.3.1.2 Tractaments d'altres pressions

El tractament d'altres pressions és un mètode que s'aplica per la conservació d'aliments. L'aplicació d'altres pressions té un gran efecte contra els microorganismes i enzims, a part d'aquest benefici per la conservació, aquest mètode té efectes mínims sobre el gust i els valors nutricionals dels productes. La inactivació dels enzims és produïda per danys induïts per pressió, sent el pH i la temperatura del tractament dos paràmetres importants davant l'estabilitat enzimàtica. Els enzims polifenoloxidasa i peroxidasa són molt resistents a la pressió (Cheftel et al., 1995) per això es combina amb altres tractaments, per evitar l'activitat d'aquests enzims.

1.3.1.3 Reducció de la disponibilitat de l'oxigen

Una de les millors formes per inhibir l'enfosquiment enzimàtic, és reduir el màxim possible el contacte del O₂ amb l'aliment. El mètode més senzill utilitzat per verdures i fruites és la immersió en aigua, amb sucre o sal, per retardar la difusió de l'oxigen (Pérez et al., 2003). La part negativa d'aquest tractament és l'equilibri osmòtic, que pot produir una pèrdua de soluts dels aliments.

Un dels mètodes és envasar el producte en **atmosfera modificada**, es podria dir que és la tecnologia idònia per envasar productes vegetals, i per tant allarga la vida útil dels productes. L'atmosfera del envasat és pobre en O₂ i enriquit en CO₂. Les mesclades de gasos estan constituïdes per O₂, CO₂, CO i/o N₂, la modificació dels gasos resulta possible creant una composició de gas idònia per cada aliment, és econòmica i és senzill utilitzant envasos hermètics i formats amb polímers. Un altre mètode que redueix la disponibilitat de l'oxigen i evita l'enfosquiment enzimàtic és la tècnica de **recobriments comestibles**, que consisteix en l'aplicació d'una pel·lícula superficial als productes tallats. L'aplicació d'aquestes recobriments, té la funció de substituir la pell natural del fruit, això fa allargar la vida útil de les verdures i fruites. Els revestiments comestibles s'utilitzen com una barrera semipermeable que ajuda a: Reduir la respiració, retardar la pèrdua d'aigua, millorar la textura i la integritat mecànica, ajudar a retenir compostos volàtils i actua com a barrera per al creixement microbià.

1.3.1.4 Polsos elèctrics

L'aplicació d'aquesta tecnologia té un efecte d'inactivació microbiològica i enzimàtica a partir de la formació de porus en les membranes cel·lulars, i al mateix temps conservar les propietats nutricionals (Cerón et al., 2010). Aquest mètode consisteix en l'aplicació de descàrregues elèctriques curtes d'alt voltatge, això genera estrès i desestabilitza la membrana cel·lular.

1.3.1.5 Aplicació d'ultrasons

És un mètode en desenvolupament que consisteix en l'aplicació d'ultrasons, que són ones sonores amb una freqüència superior a la capacitat d'audició de l'oïda humana (aproximadament 20.000 Hz).

Aquestes ones sonores s'utilitzen a la indústria alimentària com a mètode d'inhibició microbiana i enzimàtica, al ser aplicades en els aliments produeixen diferents fenòmens que són els responsables de la inhibició.

Primer de tot té lloc el fenomen de cavitació, que consisteix en la formació creixement i implosió de diminutes bombolles de gas en el líquid quan les ones d'ultrasons passen a través d'ell. Quan exploten les bombolles es produeixen increments de temperatura extrems (5000 °C) i pressions

de (500 MPa) en punts localitzats. Un altre efecte és el trencament de les partícules d'aigua i la formació de radicals lliures molt oxidants.

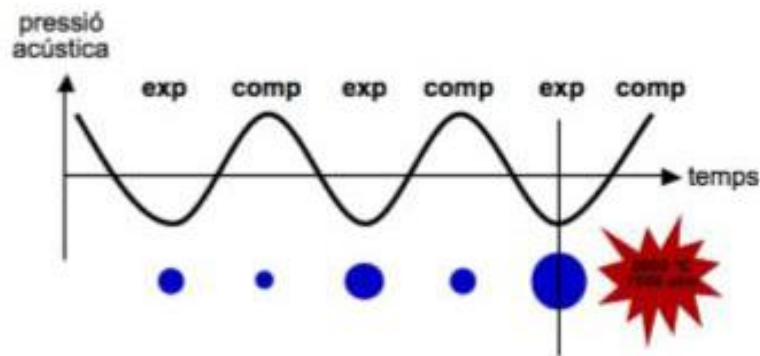


Figura 3. Implosió de les bombolles per cavitació

Font: Adaptació Angurell et al., 2014

Aquesta l'augment extrem de temperatura i pressió, i la formació de radicals, provocant danys a les parets dels microorganismes i enzims.

Actualment en la indústria s'està investigant la seva aplicació en aliments, per intentar arribar a nivells d'efectivitat similars als de pasteurització i esterilització, però sense modificar les característiques organolèptiques. Aquesta tècnica té l'avantatge que és combinable amb altres mètodes i additius químics, d'aquesta forma augmentant el nivell d'efectivitat d'inhibició. Es considera una tecnologia neta i de gran potencial d'aplicació

1.3.2 Mètodes químics

Els mètodes químics són els més utilitzats per evitar l'enfosquiment enzimàtic, aquests mètodes consisteixen en l'aplicació d'agents químics que tenen un efecte inhibidor sobre l'enzim, els substrats o els productes de les reaccions (Pérez et al. , 2003). En l'actualitat s'està intentant reduir la utilització d'aquests agents, i substituir-los per mètodes físics que no afectin a les propietats dels aliments. Els compostos que actuen a nivell enzimàtic, són els agents quelants i els acidulants.

1.3.2.1 Agents quelants

Els agents quelants són additius que complexen els cations de molts enzims, o bé a la mateixa proteïna, en el cas de la polifenoloxidasa, complexa l'ió de coure inhibint la seva activitat. Entre els agents quelants es troben l'àcid etilendiaminotetracètic (EDTA), un altre potent inhibidor de l'activitat de la PPO és el 4-hexilresorcinol que interacciona amb la PPO formant un complex inactiu incapaç de catalitzar la reacció d'enfosquiment (Silveira, 2017).

1.3.2.2 Agents acidulants

Els agents acidulants, aquests agents s'utilitzen per modificar el pH i crear un medi on els enzims causants de l'enfosquiment enzimàtic es desnaturalitzen i perden activitat. El pH idoni de la PPO es troba entre 5 i 7. Per aquest mètode s'utilitzen àcids orgànics com àcid cítric, màlic, etc.

1.3.2.3 Agents reductors

Per altra part, trobem els agents reductors, que causen una reducció química de o-quinones incolores. Aquests agents, un cop s'oxiden deixen de tindre funcionalitat davant a la protecció contra la oxidació, ja que quan tot l'agent reductor hagi reaccionat, els enzims poden començar la reacció d'oxidació. Per això aquests agents s'acostumen a utilitzar en tractaments de curta durada. En aquest grup trobem l'àcid ascòrbic (vitamina C) que és molt utilitzat en la indústria alimentària sobre fruites, verdures i hortalisses.

2. Objectius

L'objectiu principal d'aquest estudi va ser determinar l'eficiència dels ultrasons (42kHz) i/o l'efecte de diferents solucions àcides com a mètode per reduir o retardar l'activitat enzimàtica de la PPO i PRO en la patata tallada.

Objectius específics:

- Avaluat l'efecte de la temperatura sobre l'activitat enzimàtica de la PPO i PRO
- Avaluat l'efecte de l'aigua sobre l'activitat enzimàtica de la PPO i PRO
- Avaluat l'efecte d'inhibició de les solucions emprades en el bany d'ultrasons (aigua, àcid cítric 1% i àcid ascòrbic 1%) en l'activitat enzimàtica de la PPO i PRO.
- Comprovar l'efecte del temps d'aplicació dels ultrasons (5, 10 i 20 min) en cadascuna de les solucions utilitzades en la inhibició de la PPO i PRO
- Correlacionat l'efecte dels ultrasons i solucions àcides emprades amb el color en la patata tallada

3. Materials i mètodes

3.1 Patata

L'experiment s'ha dut a terme amb patata fresca (*Solanum tuberosum*) varietat Monalisa adquirida en un supermercat de Castelldefels. Es va escollir aquesta varietat, ja que és la més consumida, per la seva versatilitat.

Les patates es presenten en sacs de malla de 3 kg; el seu calibre era entre 25-35 mm. Les patates van estar conservades a temperatura ambient, protegides de la humitat i la llum per evitar la germinació.

3.2 Equips

Bany d'aigua

L'equip utilitzat (*Figura 4*) és un bany de la casa Selecta, consta de 6 tancs amb una resistència elèctrica. Que disposen d'una potència de 2300W per tots els tancs i una freqüència de 50 Hz



Figura 4. Bany d'aigua amb resistències calorífiques, Selecta

Equip d'ultrasons

L'equip que va ser utilitzat per realitzar el tractament de sonicació sobre les mostres de patata fresca és un sonicador Branson 2510 amb un volum de 2,8 litres, amb 2 litres efectius. El tanc té unes dimensions de 24x14,5x10, amb una potència de 130W i una freqüència de 42 kHz. (*Figura 5*)



Figura 5. Equip d'ultrasons. Branson 2510 42kHz.

L'equip d'ultrasons Branson 2510 (*Figura 5*) està conformat d'un tanc d'acer inoxidable i disposa d'una cistella del mateix material on es diposita el producte a tractar. L'equip disposa d'un transductor, que conté cristalls amb propietats piezomètriques que en ser sotmesos a corrent elèctric, vibren i emeten ultrasons.

Espectrofotòmetre

Per a la determinació de l'activitat enzimàtica (PPO i PRO) es va utilitzar un espectrofotòmetre Shimadzu UV-1800 (*Figura 6*). Aquest equip permet realitzar 6 lectures d'absorbància simultànies. Aquest equip disposa d'un software que permet mesurar el canvi d'absorbància a causa d'una reacció determinada, fent lectures en funció del temps.



Figura 6. Espectrofotòmetre utilitzat, Shimadzu UV-1800

3.3 Disseny experimental

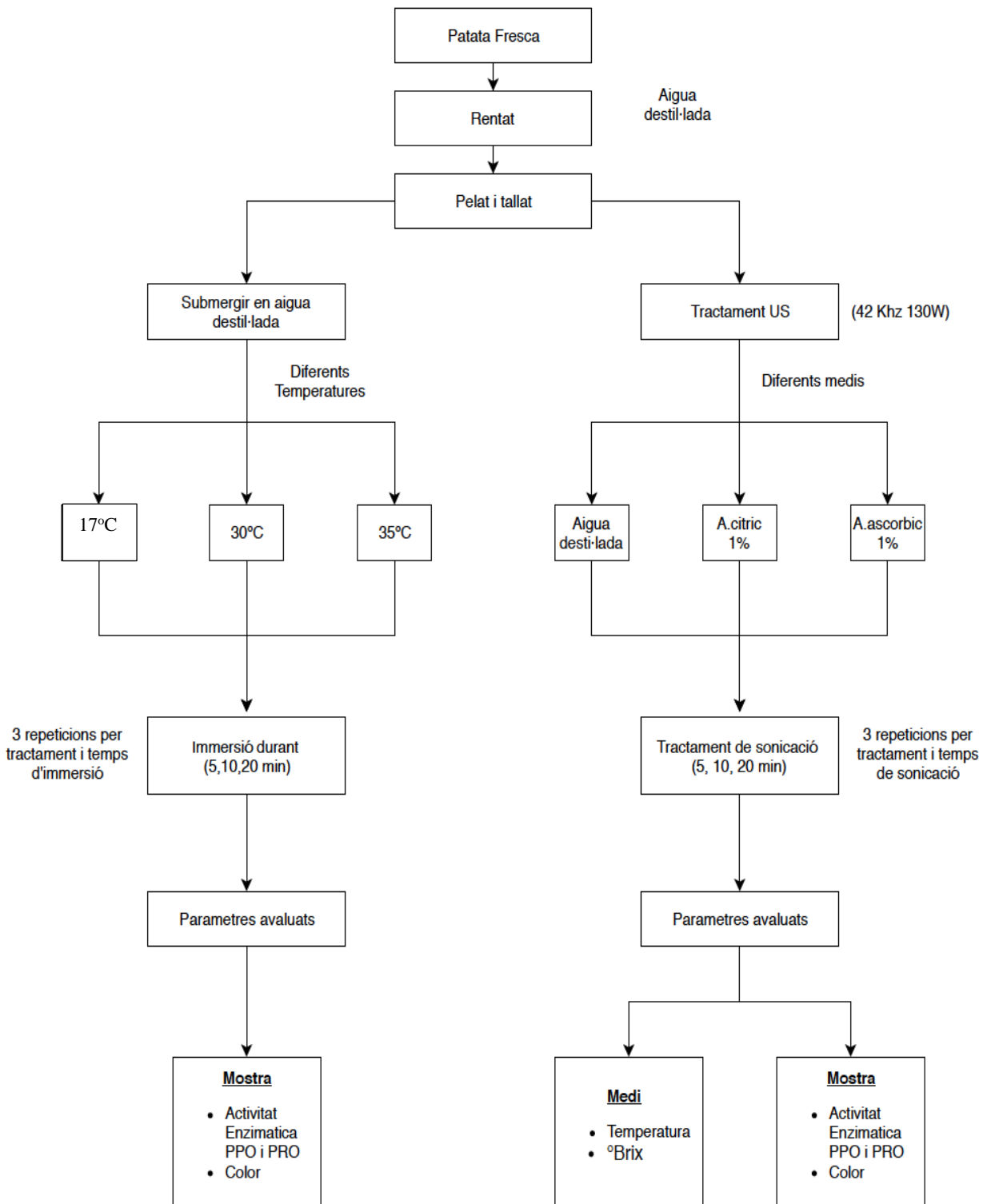


Figura 7. Diagrama del disseny experimental

Primer de tot es va preparar la patata, es va rentar amb aigua destil·lada i posteriorment es van pelar i tallar (1x1x4cm).

Cada un dels tractaments es va fer per triplicat per cada un dels termes variables. Obtenint un total de 27 mostres tractades per cada un dels mètodes (Immersió en aigua a diferents temperatures i sonicació en diferents medis)

3.3.1 Tractament d'immersió en aigua destil·lada a diferents temperatures

Per cada experiment es van utilitzar 300 g de patata, que van ser submergides en l'aigua destil·lada a diferents temperatures (17°C, 30°C i 35°C), cada tractament de temperatura a diferents temps (5, 10 i 20 minuts) es van fer per triplicat. Posterior al tractament de temperatura per immersió, es va quantificar el color de la mostra. Es van realitzar 3 mostres per cada temps i temperatura, i 2 extraccions per cada una de les mostres, obtenint un total de 54 extractes.

3.3.2 Sonicació en diferents medis

Per a la realització de cada un dels experiments es van utilitzar uns 300 grams de patata fresca, per 2 litres de medi. Es van realitzar tractaments de sonicació de les mostres (5, 10 i 20 minuts) en diferents medis (aigua, àcid cítric 1% i ascòrbic 1%), es van realitzar tres mostres per cada temps de tractament i medi, i dues extraccions per cada una de les mostres, obtenint un total de 54 extractes. La temperatura de l'aigua es va controlar, a causa del fet que la sonicació la pot augmentar considerablement.

Es van mesurar els sòlids solubles expressats com °Brix amb un refractòmetre digital ATAGO Pocket PAL-1 de rang de 0 a 53°Brix, concretament als temps 0, 5, 10 i 20 minuts.

Els resultats coincideixen amb els presentats en l'estudi (Sadurní, 2018) on es diu que els valors de %SS no presenten canvis en augmentar el temps de sonicació.

3.3.3 Tractament Control

Es consideren mostres control, aquelles que no han estat sotmeses a cap tipus de tractament. Les mostres control, van estar exposades a l'aire durant els mateixos temps de tractament de sonicació i immersió (5, 10 i 20 min). Es van realitzar tres mostres per cada temps, i dues extraccions per cada una de les mostres tractades, obtenint un total de 18 extractes.

3.3.4 Determinació de l'activitat enzimàtica de la PPO i PRO de les mostres

Immediatament d'acabar el corresponent tractament, es realitza les extraccions individuals per a cada una d'elles, fent dues extraccions per cada una de les mostres. S'agafen $5 \pm 0,001$ g de mostra amb 30ml tampó sodi-fosfat 50 mM a un pH 6, amb un contingut de 50 g/l de polivinilpirrolidona, i s'homogeneïtza durant 2 minuts. Un cop la mostra està homogènia, es centrifuga a 9500 rpm durant 20 minuts a una temperatura de 2 °C, seguidament es filtra per eliminar les partícules en suspensió. Aquest extracte es mantindrà en refrigeració (4 °C) fins la realització de la determinació de l'activitat enzimàtica (PPO i PRO).

a) Quantificació de l'activitat de la polifenoloxidasasa (PPO)

En una cubeta de l'espectrofotòmetre s'introdueixen 1200µL d'extracte de mostra, 1000µL de tampó sodi-fosfat 50mM i 200µL de catecol de 20mM. Simultàniament es fa un blanc que conte els mateixos reactius, substituint la quantitat de l'extracte de la mostra per aigua destil·lada, d'aquesta forma eliminant l'absorbància dels reactius. Un cop els reactius estan mesclats dins de la cubeta, es van realitzant lectures periòdiques cada 30 segons a una longitud d'ona $\lambda=410$ nm durant 10 minuts; ja que els compostos generats per la reacció de la PPO són visibles i tenen el seu pic d'absorbància a la longitud 410 nm.

b) Quantificació de l'activitat de la Peroxidasa (PRO)

En una cubeta s'introdueixen 1200µL d'extracte de mostra, 1000µL de guaiacol 40mM i 400µL de peròxid d'hidrogen 26mM (preparada recentment). Simultàniament es fa un blanc que conté els mateixos reactius, substituint la quantitat de l'extracte de la mostra per aigua destil·lada. Un cop els reactius estan mesclats dins de la cubeta, s'introdueix a l'espectrofotòmetre i es van realitzant lectures periòdiques cada 30 segons a una longitud d'ona $\lambda=420$ nm durant 10 minuts;

ja que els compostos generats per la reacció de la PRO són visibles i tenen el seu pic d'absorbància a la longitud 420nm.

3.3.5 Determinació del grau d'inhibició

Per determinar la inhibició sobre l'activitat de la PPO i PRO amb l'aplicació dels tractaments, es va utilitzar l'equació proposada per Manohan i Wong (2012)

$$\text{Inhibició (\%)} = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \cdot 100$$

A_0 és l'activitat inicial de la mostra control i A_1 és l'activitat a temps 0 de la mostra tractada. Per poder aplicar aquesta equació, s'ha realitzat un reajustament de les línies de tendència de tipus polinòmica de segon ordre de les gràfiques de les absorbàncies determinades amb l'espectrofotòmetre, d'aquesta forma s'obtenen les equacions de segon grau que s'ajusten a les reaccions enzimàtiques.

3.3.6 Determinació del color

Per determinar l'efecte dels tractaments sobre el color de la patata, es van realitzar mesures mitjançant un colorímetre Minolta CR-400.

Els components estudiats van ser: L^* lluminositat, a^* proporció de vermell-verd (+a vermell, -a verd) i b^* proporció groc-blau (+b groc, -b blau). Amb els valors obtinguts es van calcular els paràmetres de h^* (angle Hue), C^* (Chroma) i el IC (Índex de color).

$$\text{Chroma: } C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

$$\text{hue: } h^* = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$$

$$\text{Índex de color: } IC^* = \frac{a^* \cdot 1000}{L^* \cdot b^*}$$

Aquestes mesures es van determinar de la patata acabada de pelar i tallar, i posteriorment després de ser sotmesa a cada tractament. Per al mètode d'immersió es van realitzar 2 mesures per mostra obtenint un total de 144 lectures. Per al mètode de sonicació a diferents medis i

mostres control, es van realitzar 5 lectures per mostra, realitzant un total de 360 i 120 lectures per cada un dels tractaments respectivament.

3.3.7 Anàlisi estadístic

Amb els valors obtinguts, s'ha realitzat un tractament estadístic de les mostres per triplicat amb el Programa Microsoft Excel. Es va establir un nivell de confiança del 95% , és a dir una significança de ($p < 0,05$). S'ha determinat el coeficient de correlació de Spearman i posteriorment el grau de significança. S'ha realitzat la relació de l'activitat de la PPO I de la PRO, i els paràmetres de color amb l'absorbància i temps de tractament.

4. Resultats i Discussió

A partir dels resultats obtinguts, s'ha determinat l'efecte inhibidor de l'activitat enzimàtica tenint en compte els diferents tractaments. Primer de tot s'analitzarà l'efecte dels ultrasons en el medi (temperatura, SS), i posteriorment s'estudiarà els efectes dels paràmetres involucrats en el tractament (aigua, temperatura, ultrasons i solucions àcides) sobre la inhibició de l'activitat de la PPO i PRO.

4.1 Efectes de la sonicació sobre el medi: Temperatura i sòlids solubles

4.1.1 Efecte de la sonicació sobre la temperatura del medi.

Durant el tractament de sonicació, les ones d'ultrasons provoquen un augment de la temperatura de la solució. En la *Figura 8* s'observa l'evolució de la temperatura en les tres solucions emprades en la sonicació. Es va mesurar la temperatura dels medis en els temps 0, 5, 10 i 20 minuts del tractament de sonicació.

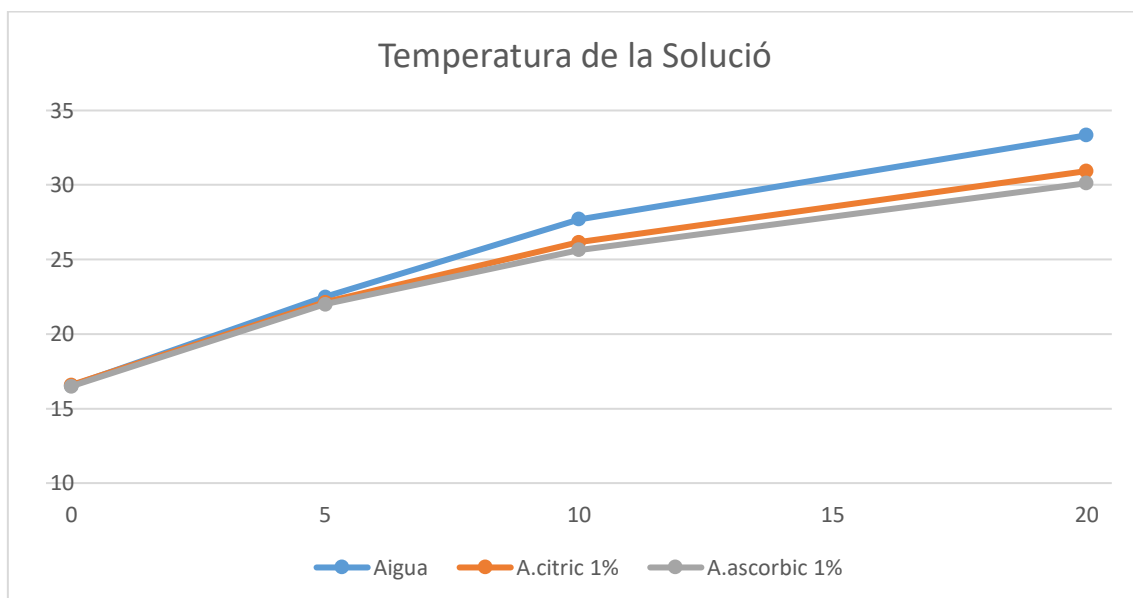


Figura 8. Temperatura dels medis a diferents temps de sonicació (5,10 i 20 min)

S'observa un increment de la temperatura d'1,33°C /min, que és lleugerament superior en els 5 primers minuts de sonicació. Aquest valor s'atenua al llarg de la sonicació.

Per altra part, es pot observar que la mostra d'aigua sonicada, és la que arriba a temperatures més elevades (33,3 °C), sent menors les temperatures al final del tractament de sonicació de les solucions amb àcid cítric 1% (30,9°C) i àcid ascòrbic 1% (30,1°C) amb increments de 16,5, 14,4 i 13,6 °C respectivament.

Els resultats coincideixen en diferents investigacions (Caballero., 2017 i Sadurní., 2018) on també s'observa un increment de la temperatura de l'aigua, superior a les solucions d'àcid cítric 1% i d'àcid ascòrbic 1%.

4.1.2 Efecte de la sonicació sobre el contingut de sòlids solubles

En el cas dels sòlids solubles (°Brix), no s'ha pogut observar cap diferència al llarg del tractament. En el tractament amb aigua destil·lada no es detecten pràcticament, en el tractament amb àcid cítric i ascòrbic, els valors de l'inici no varien al llarg del temps, assolint uns valors entre 0,8 i 1,2 °Brix.

4.2 Efectes dels tractaments sobre l'activitat de l'enzim polifenoloxidasa (PPO)

A continuació es mostren els resultats de l'activitat de la PPO dels assajos realitzats: Tractament control, tractament d'immersió en aigua a diferents temperatures i tractament de sonicació en diferents medis.

4.2.1 Activitat Enzimàtica de les mostres control. (PPO)

Es va realitzar la determinació de l'activitat enzimàtica de les mostres control, a 16 °C durant 5, 10 i 20 min. A continuació en la *Figura 9* s'observa l'activitat de la PPO de les mostres control.

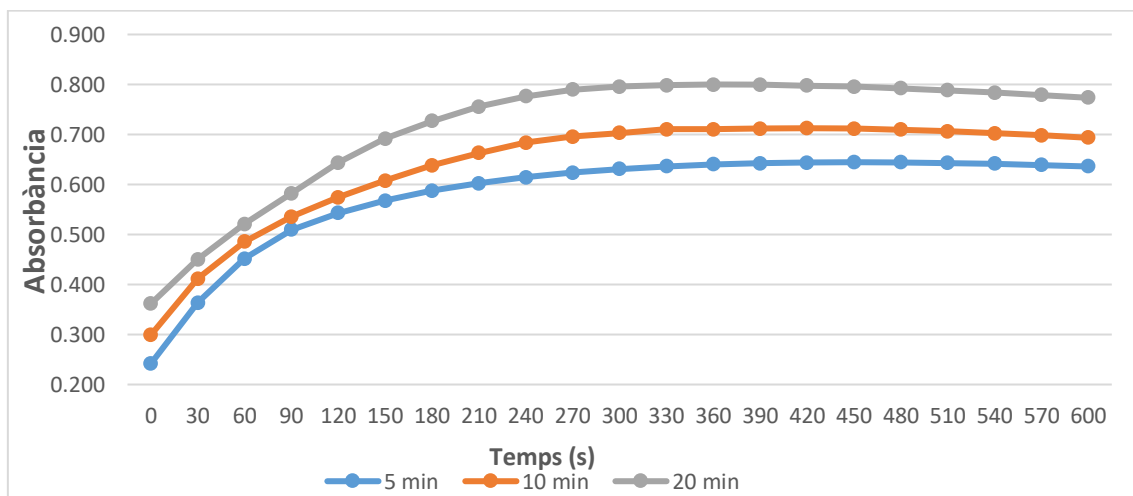


Figura 9. Activitat de la polifenoloxidasa (PPO) en les mostres control

En les dades obtingudes s'observa que a l'incrementar el temps d'exposició de les mostres a l'aire incrementa l'activitat enzimàtica, sent la mostra exposada 20 minuts la de més activitat.

4.2.2 Efectes de l'aigua i temperatures sobre l'activitat enzimàtica (PPO).

En la *Figura 10 (a, b i c)* s'observa que la mostra de patata control, presenta generalment una major absorbància respecte a les mostres submergides en aigua destil·lada. Es pot observar una relació directa en l'increment d'absorbància en funció del temps de tractament.

En la *Figura 10 (a)* (Immersió en aigua 5 min) podem observar que la mostra sotmesa a 35°C és la que presenta una major absorbància, superant a la de control, i sent la mostra sotmesa a 30°C la que presenta una menor absorbància.

En la *Figura 10 (b)* (Immersió en aigua 10 min) la mostra de 35°C segueix sent la que presenta una major absorbància, superant la mostra control, en aquest cas la mostres tractades a 17°C presenta una menor absorbància..

En la *Figura 10 (c)* (Immersió en aigua 20 min) s'observa un augment dràstic de l'absorbància de la mostra tractada a 17°C fins arribar a uns valors semblants als obtinguts a la mostra tractada a 35°C. En general la mostra tractada a 35°C és la mostra que presenta una major absorbància en tots els casos. S'observa una important diferència entre la tractada a 30°C i la a 35°C.

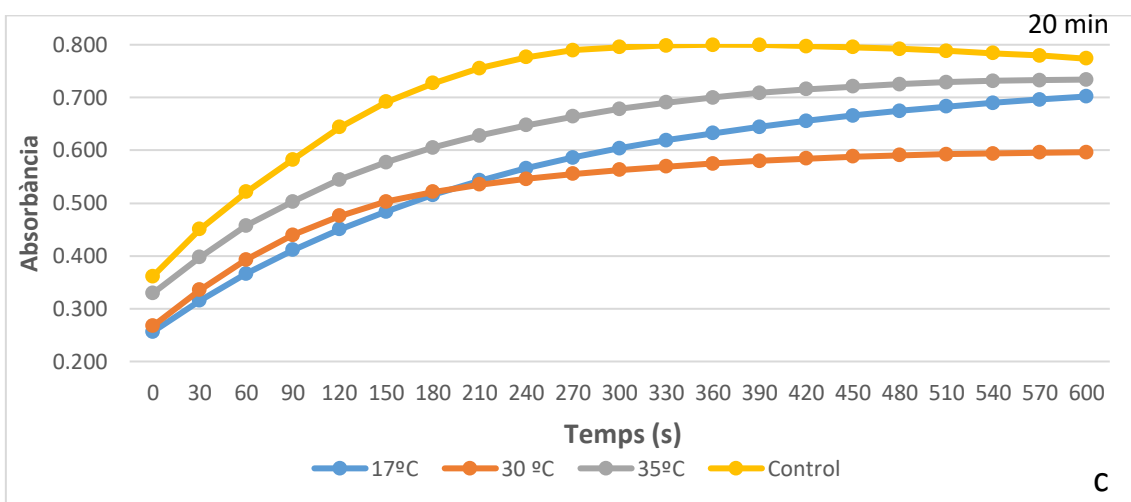
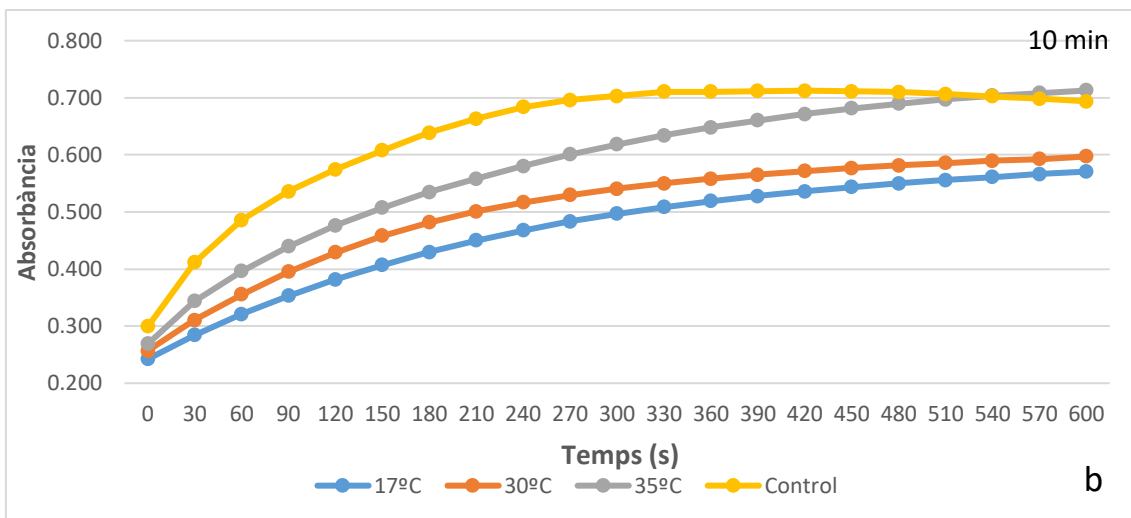
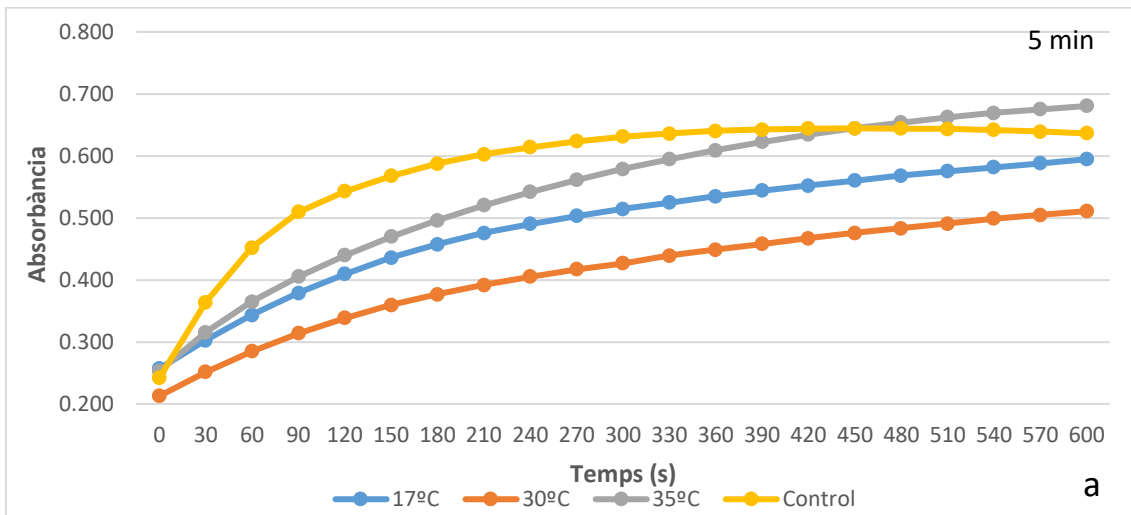


Figura 10. Activitat PPO de mostres submergides en aigua a diferents temperatures (17°C, 30°C i 35°C) a 5(a), 10(b) i 20 min(c).

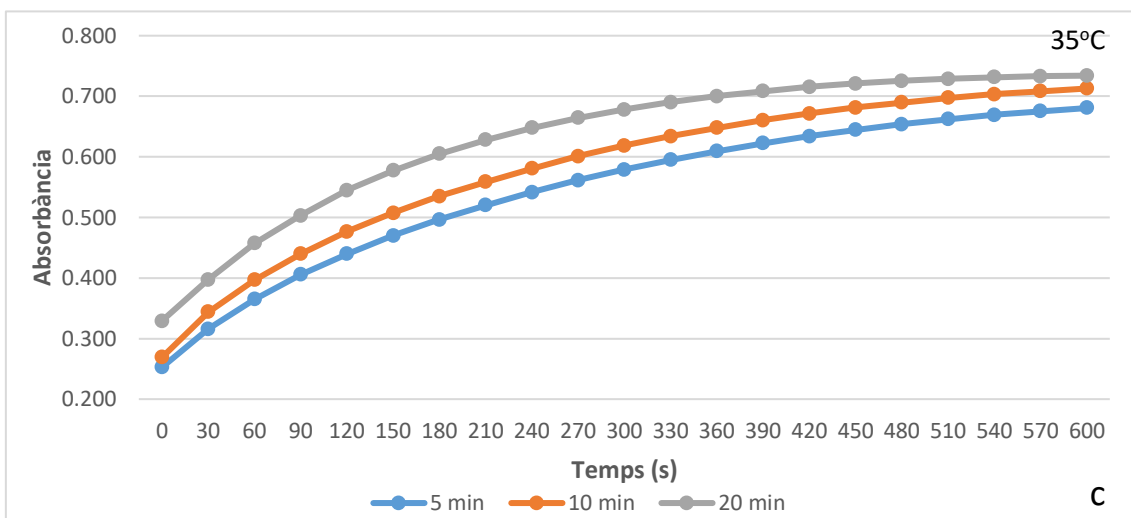
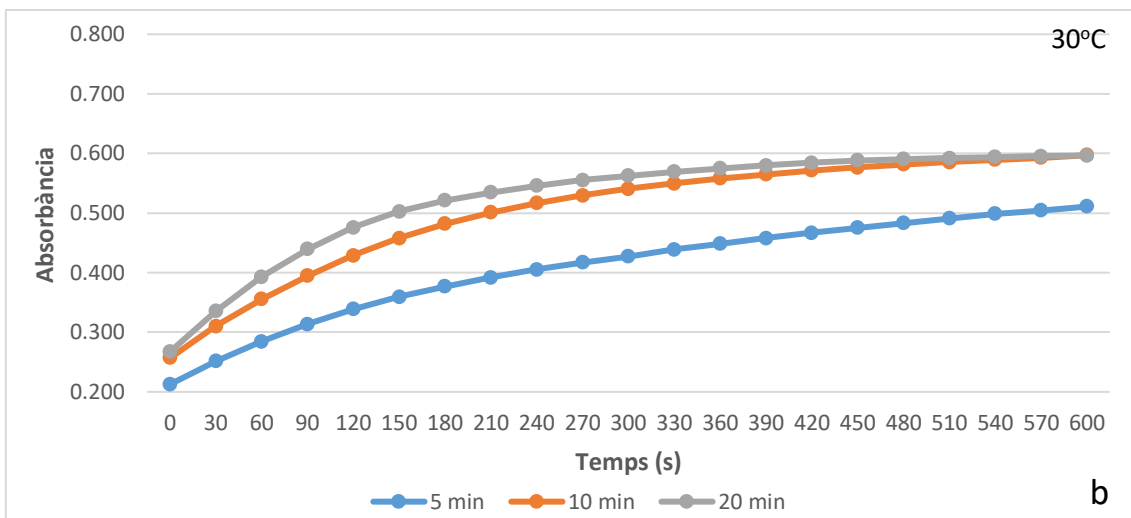
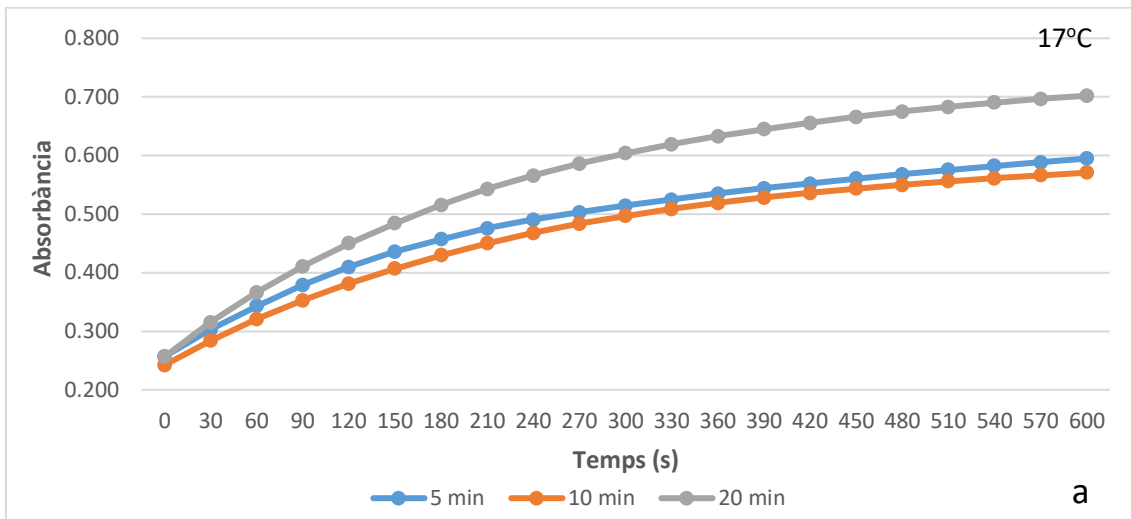


Figura 11. Activitat de la PPO de les mostres submergides en aigua a diferents temperatures, 17°C (a), 30°C (b), 35°C (c)

En la *Figura 11 (a, b i c)* es mostren els resultats de l'activitat de la PPO, com a la *Figura 10*, però en aquest cas estan classificats per temperatures de tractament. S'observa un augment de l'absorbància a l'augmentar la temperatura. També hi ha un increment de l'absorbància a l'augmentar el temps de tractament.

En el gràfic corresponent al tractament amb aigua a 17°C (*Figura 11, a*), s'observa un increment d'activitat en els 20 minuts d'immersió arribant a un màxim de 0,7 d'absorbància. En els altres dos temps de tractament, (5 i 10 min) es mostra una activitat similar, sent lleugerament inferior la de 10 min. (0,60 i 0,57 A) respectivament.

A 30°C (*Figura 11, b*) les majors activitats corresponen a 10 i 20 minuts, sent la segona lleugerament més elevada (0,6 A). S'observa una diferència important de l'absorbància de les mostres tractades a 30 °C durant 5 i 10 minuts, sent molt superior la dels 10 minuts.

En el tractament a 35°C (*Figura 11, c*) les absorbàncies detectades en els tres casos (5, 10 i 20 min) són similars (0,68, 0,71 i 0,73) respectivament.

Les dades obtingudes s'han analitzat mitjançant regressions de tipus polinòmic de segon grau. A continuació (*Taula 2*) es mostren les diferents equacions obtingudes. Aquests reajustaments són bons, ja que la correlació és pròxima a 1.

Taula 2. Equacions de les corbes d'activitat de la PPO per cada temps i temperatura d'immersió

Determinació PPO				
Temps (min)	Control		Tractament	
	Aire	Aigua 17°C	Aigua 30 °C	Aigua 35 °C
5	$y = -0,0018x^2 + 0,0523x + 0,2824$	$y = -0,0009x^2 + 0,0344x + 0,2462$	$y = -0,0007x^2 + 0,0278x + 0,2048$	$y = -0,0011x^2 + 0,0432x + 0,2378$
	$R^2 = 0,911$	$R^2 = 0,988$	$R^2 = 0,9912$	$R^2 = 0,994$
10	$y = -0,002x^2 + 0,0576x + 0,3106$	$y = -0,0009x^2 + 0,0348x + 0,2227$	$y = -0,0011x^2 + 0,0396x + 0,245$	$y = -0,0012x^2 + 0,0464x + 0,259$
	$R^2 = 0,9569$	$R^2 = 0,9955$	$R^2 = 0,9848$	$R^2 = 0,9912$
20	$y = -0,0023x^2 + 0,0664x + 0,3436$	$y = -0,0012x^2 + 0,0474x + 0,2325$	$y = -0,0013x^2 + 0,0411x + 0,2744$	$y = -0,0014x^2 + 0,0492x + 0,3157$
	$R^2 = 0,9641$	$R^2 = 0,9943$	$R^2 = 0,9558$	$R^2 = 0,9859$

L'activitat enzimàtica després de realitzar els diferents tractaments en aigua. Agafant el terme independent de les equacions s'obté l'absorbància a temps zero, sent directament proporcional a l'activitat enzimàtica (*Figura 12*).

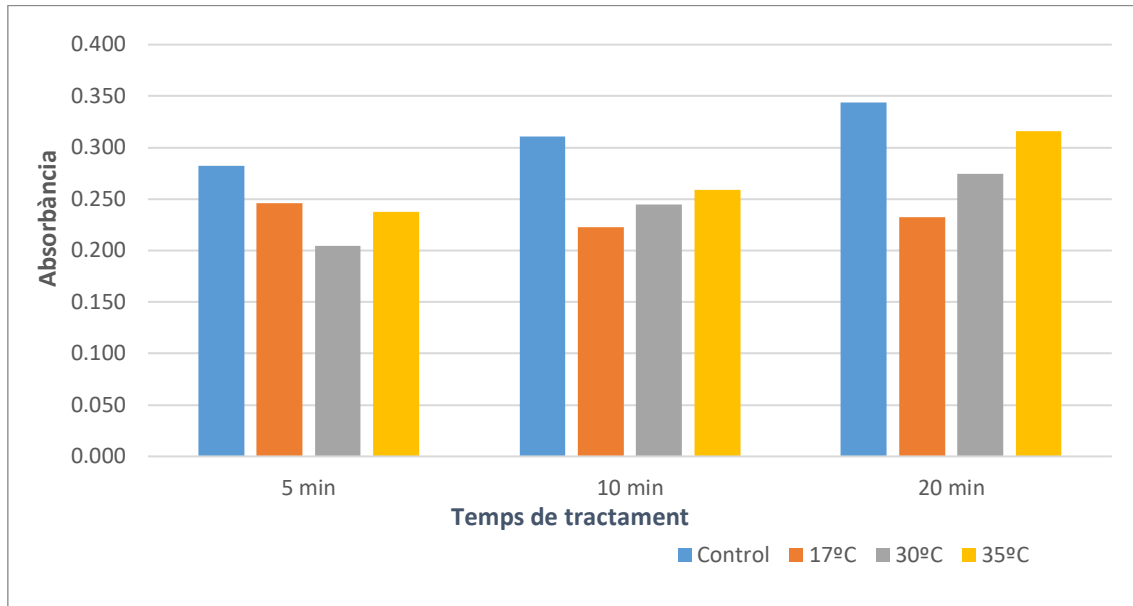


Figura 12. Activitat de la PPO (Absorbància) a temps zero de les mostres submergides en aigua a diferents temps (PPO)

Les mostres tractades amb aigua a 17°C no mostren una variació en els diferents temps de tractament, en canvi les mostres tractades a 30 i 35 °C si que presenten un augment d'activitat enzimàtica a l'incrementar els temps de tractament. D'aquesta forma podem dir que les temperatures de 30 i 35 °C provoquen un augment de l'activitat de la PPO i a l'incrementar el temps d'exposició a aquestes temperatures augmenta l'activitat.

4.2.3 Efecte dels ultrasons i solucions àcides en l'activitat de la polifenoloxidasa (PPO)

A continuació en la *Figura 13* es pot observar que tant el medi (*Aigua, Ac. cítric 1% i Ac. ascòrbic 1%*) com el temps de sonicació (*5, 10 i 20 min*) tenen un efecte rellevant sobre l'activitat enzimàtica de la polifenoloxidasa.

Les mostres sonicades amb solucions àcides (*àcid cítric 1% i ascòrbic 1%*), presenten una menor absorbància respecte a les sonicades amb aigua destil·lada, sent l'àcid cítric el medi que inhibeix més l'activitat enzimàtica.

Les mostres tractades amb àcid cítric i ascòrbic en el tractament de 10 minuts (*Figura 13 b*) presenten una menor absorbància respecte a els altres temps de tractament (*Figura 13, a i c*)

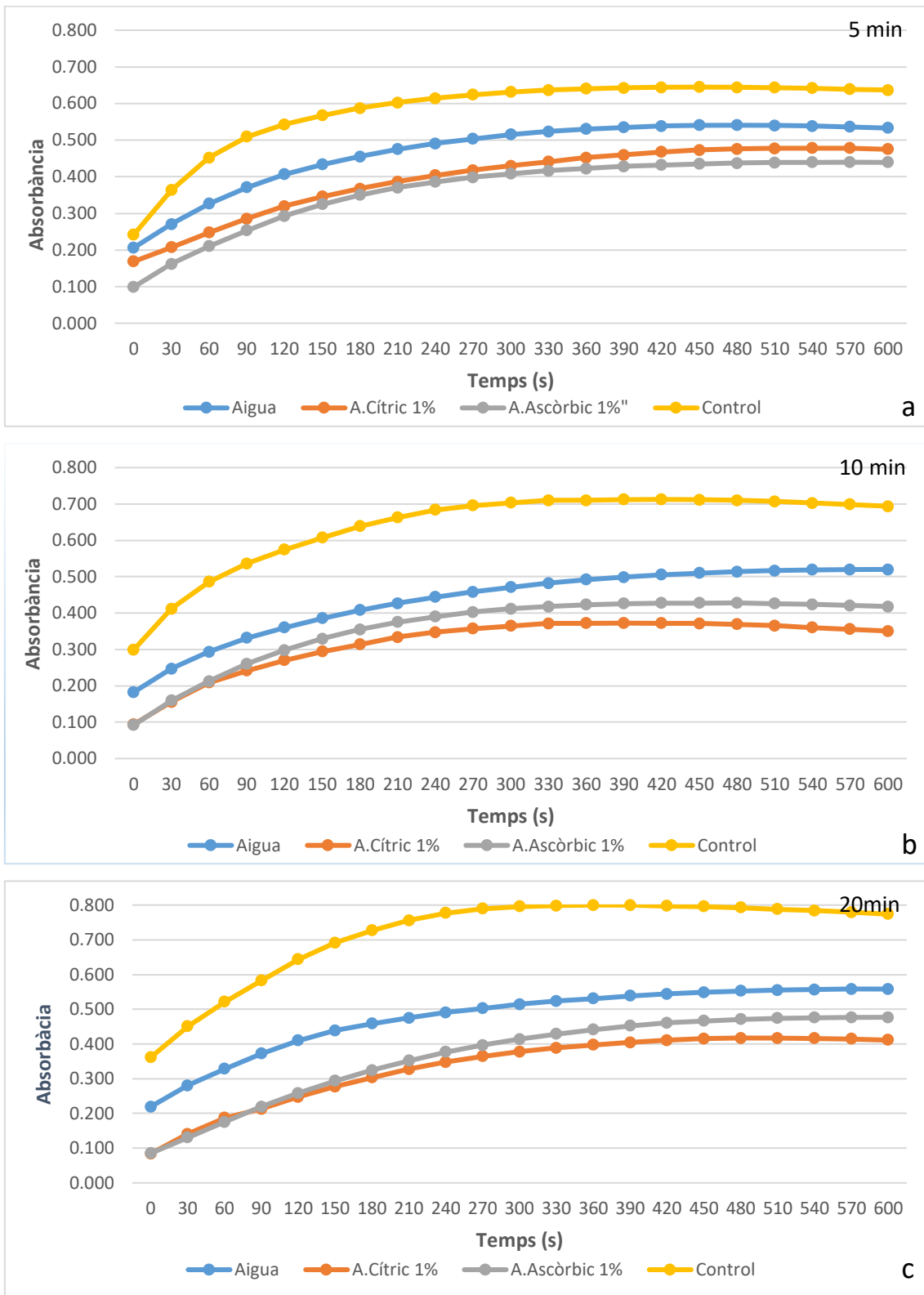


Figura 13. Activitat PPO de les mostres sonicades en diferents medis (Aigua, A.Cítric i A.Ascòrbic) a 5min(a), 10 min (b) i 20 min (c).

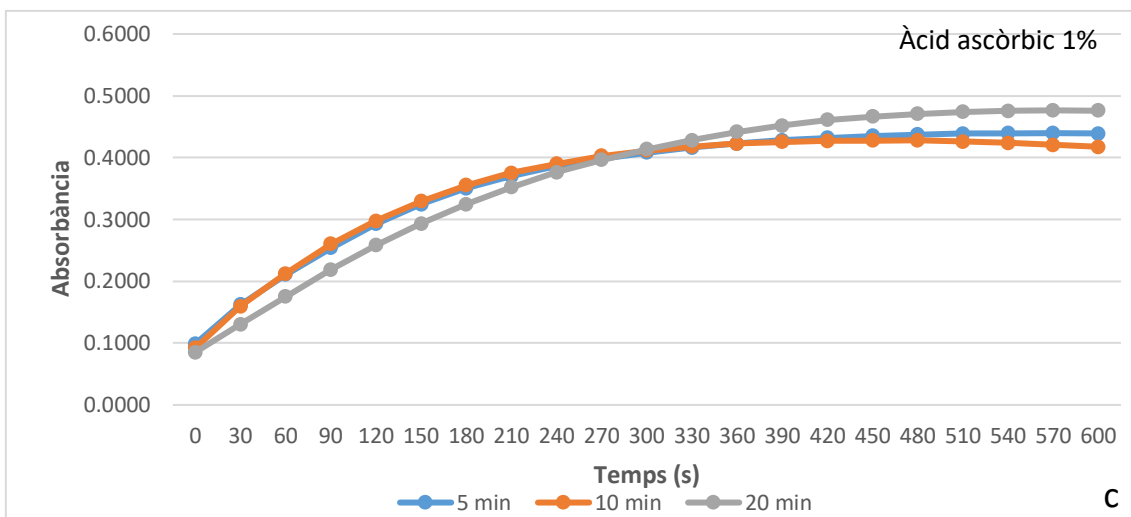
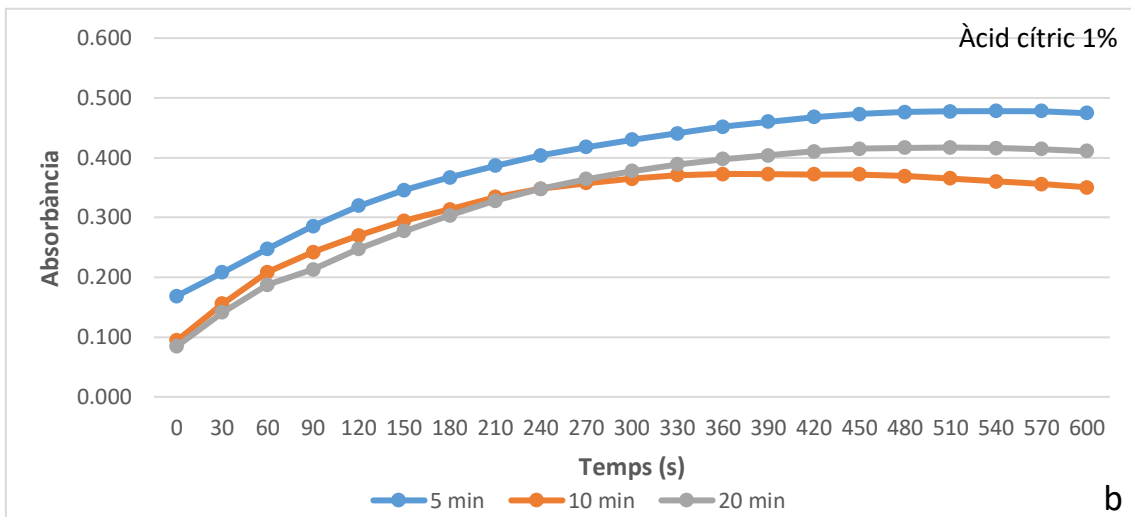
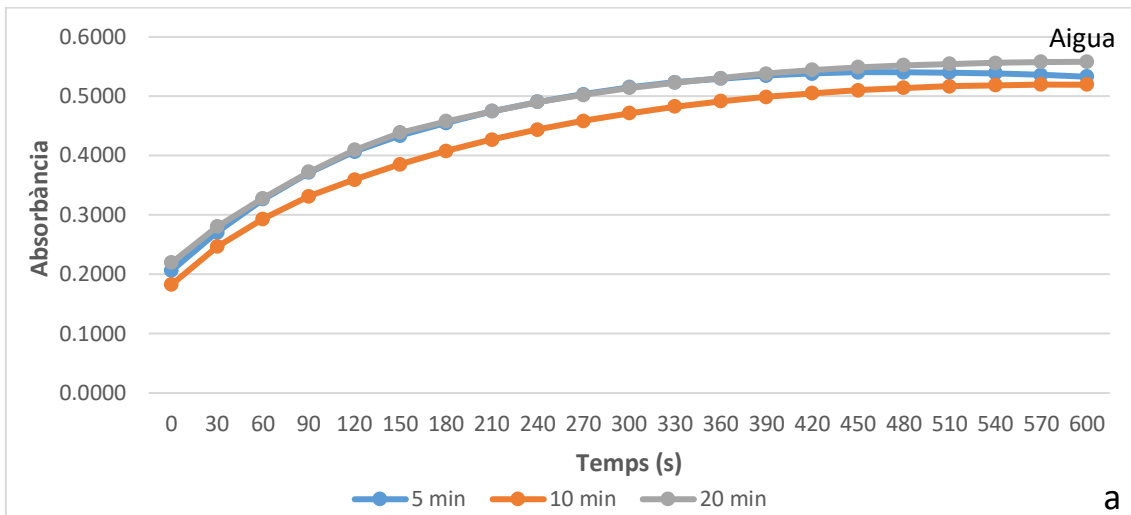


Figura 14. Activitat PPO de les mostres sonicades en diferents medis. (Aigua (a), Àcid cítric 1% (b), Àcid ascòrbic (c))

En la *Figura 14 (a, b i c)* es mostren els resultats de l'activitat de la PPO, com a la *Figura 13*, però en aquest cas estan classificats pels medis utilitzats en els tractaments de sonicació (Aigua, A. cítric 1% i A. ascòrbic 1%).

En el tractament de sonicació amb aigua (*Figura 14, a*) els tres temps d'aplicació (5, 10 i 20 min) tenen uns valors semblant, sent a 10 minuts on s'observa una menor activitat (0,53, 0,52, 0,56) respectivament.

En el tractament de sonicació amb àcid cítric 1% (*Figura 14, b*) el temps 10 és el que presenta menor activitat, arribant a màxims d'absorbància de 0,37, i seguidament el tractament de 5 i 20 minuts amb absorbàncies màximes de (0,47 i 0,42) respectivament.

En el tractament de sonicació amb aigua (*Figura 14, c*) els tres temps d'aplicació (5, 10 i 20 min) tenen uns valors semblant, sent als 20 minuts on es mostra una major activitat (0,44, 0,43, 0,48) respectivament.

El reajustament de les rectes agregant una línia de tendència de tipus polinòmica de segon grau, per poder avaluar la inhibició de l'activitat enzimàtica de la PPO corresponen als ultrasons i als diferents medis. Es pot trobar a la *Taula 3*. Aquests reajustaments són bons, ja que la correlació és pròxima a 1.

Taula 3. Equacions de la corbes d'activitat de la PPO per cada temps i medi de sonicació

Determinació PPO				
Temps (min)	Control		Tractament US	
	Aire	Aigua	Àcid Cítric 1%	Àcid ascòrbic 1%
5	$y = -0,0018x^2 + 0,0523x + 0,2824$	$y = -0,0014x^2 + 0,0449x + 0,1976$	$y = -0,0011x^2 + 0,0385x + 0,1432$	$y = -0,0014x^2 + 0,0447x + 0,087$
	$R^2 = 0,911$	$R^2 = 0,9795$	$R^2 = 0,9952$	$R^2 = 0,9804$
10	$y = -0,002x^2 + 0,0576x + 0,3106$	$y = -0,0012x^2 + 0,0399x + 0,1757$	$y = -0,0013x^2 + 0,0427x + 0,0612$	$y = -0,0015x^2 + 0,0473x + 0,0814$
	$R^2 = 0,9569$	$R^2 = 0,9874$	$R^2 = 0,9957$	$R^2 = 0,9757$
20	$y = -0,0023x^2 + 0,0664x + 0,3436$	$y = -0,0012x^2 + 0,0415x + 0,2125$	$y = -0,0014x^2 + 0,0405x + 0,0881$	$y = -0,0014x^2 + 0,0484x + 0,045$
	$R^2 = 0,9641$	$R^2 = 0,9704$	$R^2 = 0,9742$	$R^2 = 0,998$

Agafant el terme independent de les equacions s'obté l'absorbància a temps zero, sent directament proporcional a l'activitat enzimàtica *Figura 15*.

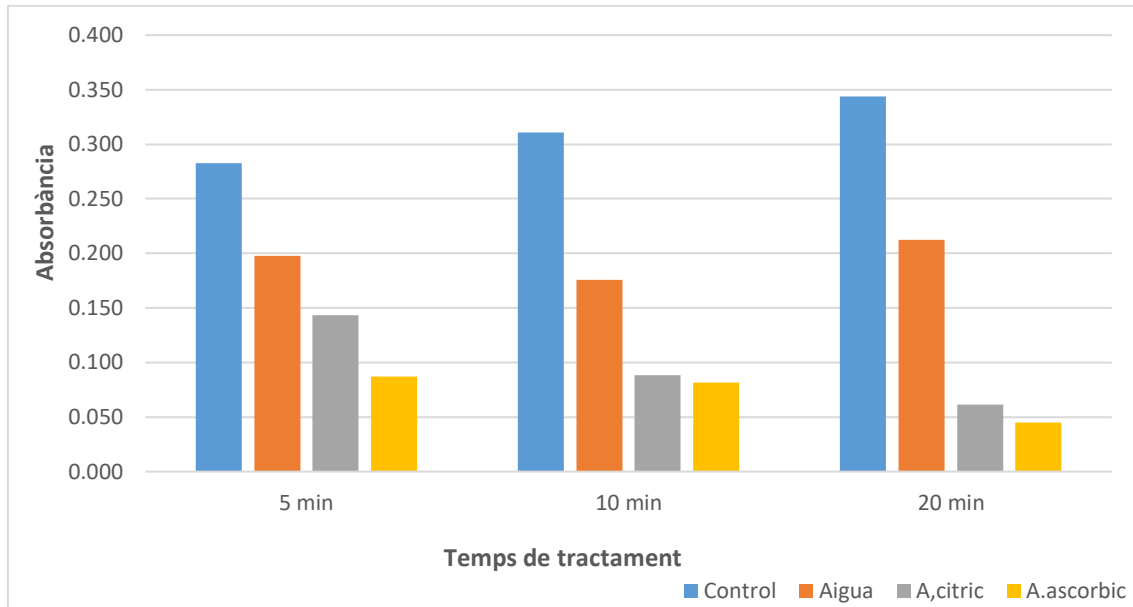


Figura 15. Activitat de la PPO (Absorbància) a temps zero de les mostres tractades per sonicació en diferents medis.

Les mostres sonicades en medis àcids presenten una disminució de l'absorbància a l'incrementar el temps de sonicació, obtenint una absorbància als 20 minuts en l'àcid cítric i ascòrbic de 0,0612 i 0,045 respectivament.

En les mostres sonicades en aigua s'observa una disminució de l'absorbància fins als 10 minuts, a l'augmentar el temps de sonicació genera un augment de l'absorbància.

4.2.4 Efectes dels tractaments sobre la inhibició de l'activitat de la polifenoloxidasa (PPO)

Per determinar l'efecte inhibidor dels diferents paràmetres sobre l'activitat de la polifenoloxidasa (PPO) respecte les mostres control. S'ha utilitzat l'equació proposada per Manohan i Wong (2012) descrita anteriorment. S'ha utilitzat els termes independents de les equacions de segon grau de les *Taules 2 i 3* per determinar l'efecte inhibidor de cada un dels tractaments.

Efecte d'Inhibició de la PPO en les mostres submergides en aigua a diferents temperatures.

Es pot veure (Figura 16) que els efectes inhibidors no superen el 33% d'inhibició i varien discretament al llarg del temps assajat. A l'inici entre 15-27% d'inhibició i final entre 33-8% d'inhibició.

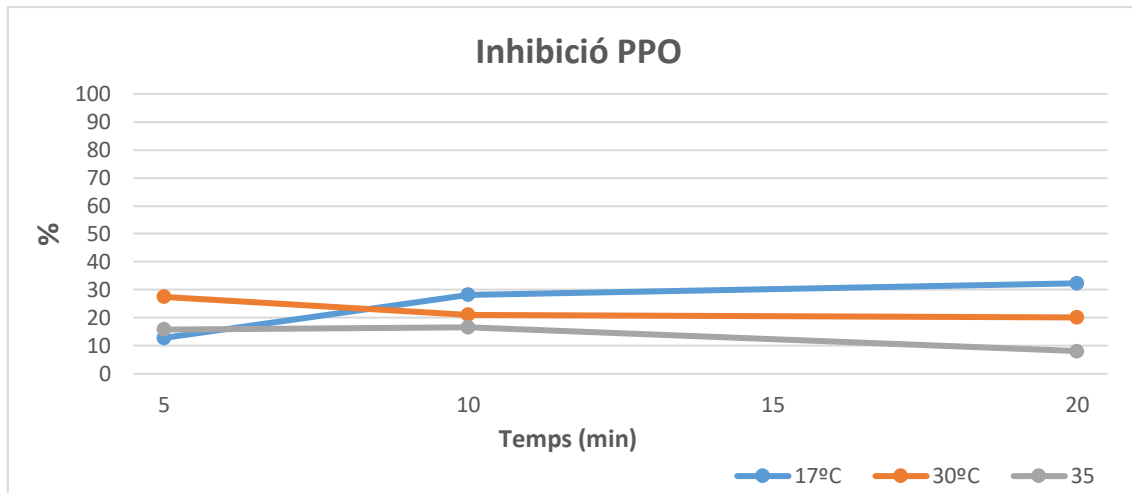


Figura 16. Inhibició de l'activitat de la PPO de les mostres submergides en aigua a diferents temperatures

Els primers minuts (5 min) l'efecte més notori a nivell d'inhibició el fa la solució d'aigua a 30°C (27% d'inhibició). Al final del 20 min s'observa un cert canvi, sent el tractament amb aigua el que té un efecte superior (33%) mentre que el tractament amb àcid ascòrbic és el que menys inhibeix (8%). Això significaria que a l'augmentar el temps d'immersió, la patata s'apropa a la temperatura de l'aigua. D'aquesta forma es pot dir que a major temperatura menor és el nivell d'inhibició.

Els resultats són els esperats, ja que contra més pròxim a la temperatura òptima (45 °C) menor es la inhibició de l'activitat de la PPO.

Efecte d'Inhibició de la PPO en les mostres sonicades en diferents medis

En les mostres sonicades en medis àcids hi ha una major inhibició respecte a les sonicades en aigua destil·lada.

Respecte a el temps del tractament, en les mostres tractades en medis àcids, la inhibició augmenta al llarg del tractament, sent més notable en les mostres tractades en àcid ascòrbic

86,9% i 74,35% en àcid cítric. La inhibició de la mostra sonicada en aigua, es veu disminuïda dels 10 als 20 minuts, passant de 43,4% a 38,15% l'efecte d'inhibició respecte la mostra control.

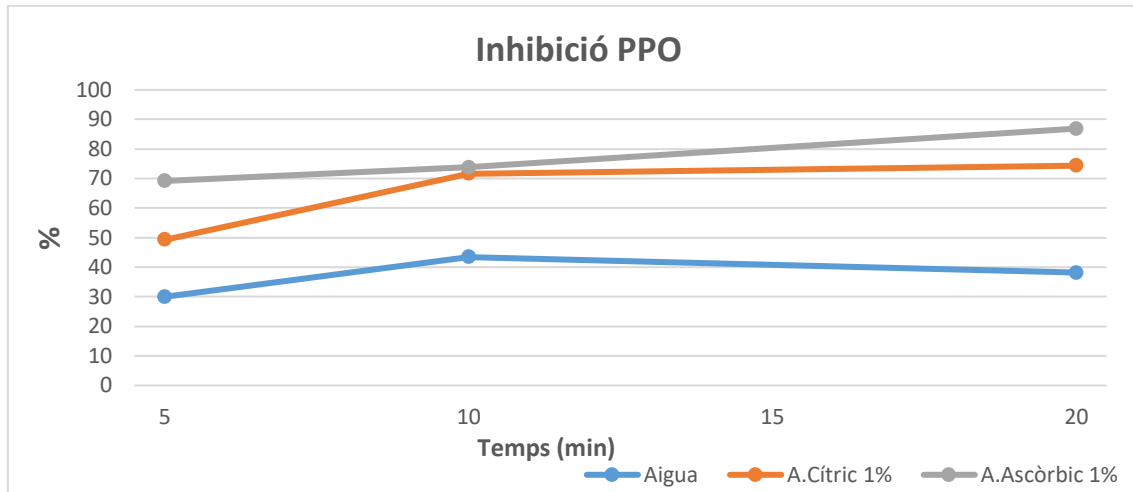


Figura 17. Inhibició de l'activitat de la PPO de les mostres sonicades en diferents medis

Es continua observant el diferent comportament inhibitori dels àcids assajats en els temps curts i llargs de sonicació, mentre que en el temps de 10 min el comportament sobre la inhibició és similar. Els resultats coincideixen (Sadurnir, 2018) en l'ordre d'efectivitat de les solucions, sent superior la inhibició de les solucions àcides que la de l'aigua, i sent l'àcid ascòrbic 1% el medi amb un major efecte inhibitori.

4.2.5 Percentatges d'inhibició dels diferents paràmetres sobre l'activitat enzimàtica (PPO)

A continuació (*Taula 4 i 5*) es mostren els efectes inhibidors de l'activitat de la PPO dels diferents paràmetres (aigua, temperatura, ultrasons, i àcids). Per a la determinació de l'efecte es va utilitzar l'equació proposada per Manohan i Wong (2012) emprada anteriorment per l'obtenció de les inhibicions totals respecte a el control.

Efecte de l'aigua i de la temperatura

Taula 4. Grau d'inhibició de l'aigua i temperatura sobre l'activitat enzimàtica

Inhibició PPO				
Temps (min)	Efecte Aigua		Efecte temperatura	
	17°C	30°C	35°C	
5	12,82 %	16,82 %	3,53 %	
10	28,30 %	-10,01 %	-14,02 %	
20	32,33 %	-18,02 %	-26,34 %	

Els resultats reflecteixen que a l'incrementar el temps d'immersió de la mostra, l'aigua té un major efecte inhibidor sobre l'activitat de la PPO.

Una exposició de la patata durant temps prolongat a temperatures de 30 i 35°C, té un efecte negatiu en la inhibició de la PPO, és a dir, a major a temperatura, major activitat enzimàtica.

Efecte dels ultrasons i les solucions àcides

L'efecte inhibidor dels US sobre l'activitat enzimàtica (PPO) no és molt elevada (entre el 8,6-19,7%) sent als 10 minuts quan s'obté una major efectivitat (21,1%). És a dir que a l'augmentar el temps de tractament, a partir dels 10 minuts, els ultrasons perden una efectivitat considerable

Taula 5. Grau d'inhibició dels ultrasons i àcids sobre l'activitat enzimàtica

Inhibició PPO				
Temps (min)	Efecte US		Efecte Àcids	
		A. cítric 1%	A. ascòrbic 1%	
5	19,7 %	27,53 %	55,97 %	
10	21,1 %	49,86 %	53,67 %	
20	8,6 %	58,54 %	78,82 %	

L'efecte dels àcids es determina aplicant l'equació proposada per Manohan i Wong (2012), sent A_0 =Terme independent de l'equació de les mostres tractades amb Ultrasons i aigua i A_1 = Terme independent de l'equació de les mostres tractades amb ultrasons més àcid cítric i àcid ascòrbic.

L'efecte inhibitor sobre l'activitat de la PPO de les solucions àcides és més elevat que la dels ultrasons, i que l'àcid que té un major efecte és l'ascòrbic a un temps de tractament de 20 minuts (78,82% d'inhibició)

Es pot dir que l'actuació, de reduir l'oxigen, de l'àcid ascòrbic té una efectivitat més ràpida i superior a la funció quelant de l'àcid cítric.

Els resultats obtinguts no coincideixen amb estudis anteriors (Caballero., 2017 i Sadurní., 2018) on l'efecte dels ultrasons és major als 20 minuts, i els efectes de les solucions àcides són molt menors i tendeixen a disminuir l'incrementar el temps de tractament.

Taula 6. Efecte d'inhibició de la PPO dels paràmetres dels tractaments de sonicació en medis àcids

Tractament	Temps (min)	Efecte de l'aigua (%)	Efecte US (%)	Efecte Àcids (%)	Efecte Total (%)
US + A.Cítric.1%	5	12,82	19,7	27,53	60,09
	10	28,30	21,1	49,86	99,26
	20	32,33	8,6	58,54	88,46
US + A.Ascòrbic.1%	5	12,82	19,7	55,97	88,53
	10	28,30	21,1	53,67	103,08
	20	32,33	8,6	78,82	101,74

En la *Taula 6* es presenten el percentatge inhibitor de cada paràmetre en els tractaments de sonicació en medis àcids. S'observa que els efectes totals són superiors a les inhibicions generals (*Figura 17*) d'aquesta forma es conclou, que hi ha paràmetres que tenen efectes negatius sobre la inhibició que no han estat avaluats.

4.3 Efecte dels tractaments sobre l'activitat enzimàtica de la Peroxidasa (PRO)

A continuació es mostren els resultats de l'activitat de la PRO dels diferents assajos realitzats, tant d'immersió en aigua a diferents temperatures, com d'ultrasons en diferents medis. D'aquesta forma s'avaluen els efectes inhibidors dels tractaments i dels paràmetres implicats.

4.3.1 Activitat Enzimàtica de les mostres control (PRO)

Es va realitzar la determinació de l'activitat enzimàtica de les mostres sense tractar (controls). Aquestes mostres van estar exposades a l'aire a 16°C durant 5, 10 i 20 min .

Es pot observar que en les mostres exposades a l'aire durant 20 minuts, l'activitat enzimàtica de la PRO és major.

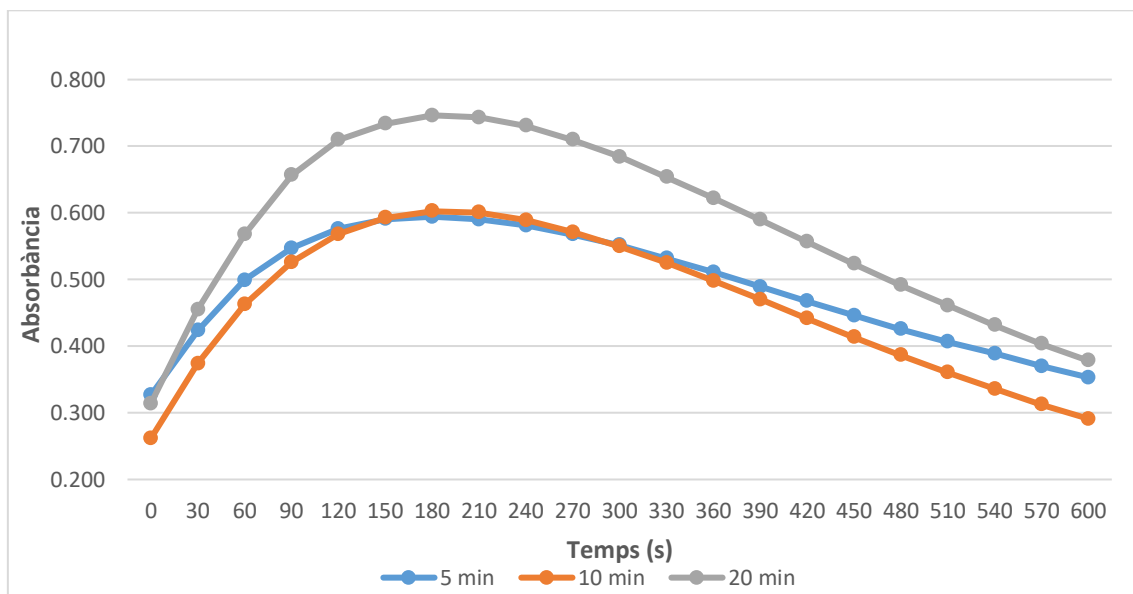


Figura 18. Activitat de la peroxidasa (PRO) en la mostra control (Mitjana de tres repeticions)

4.3.2 Efectes de l'aigua i temperatura sobre l'activitat enzimàtica (PRO)

En la Figura 19 es presenten els resultats obtinguts de la mostra control i les mostres submergides en aigua destil·lada.

En tots els tractaments d'immersió, es presenta un retardament de la reacció de la PRO, respecte la mostra control, per tant es pot veure que els factors, aigua i temperatura tenen importància en aquest retardament de l'activitat enzimàtica. Per altre costat, els tractaments a

35°C han mostrat una major activitat de la PRO en tots els temps, que els de 30 °C, això indica que aquests 5°C de diferència són de gran importància en l'activitat de la peroxidasa.

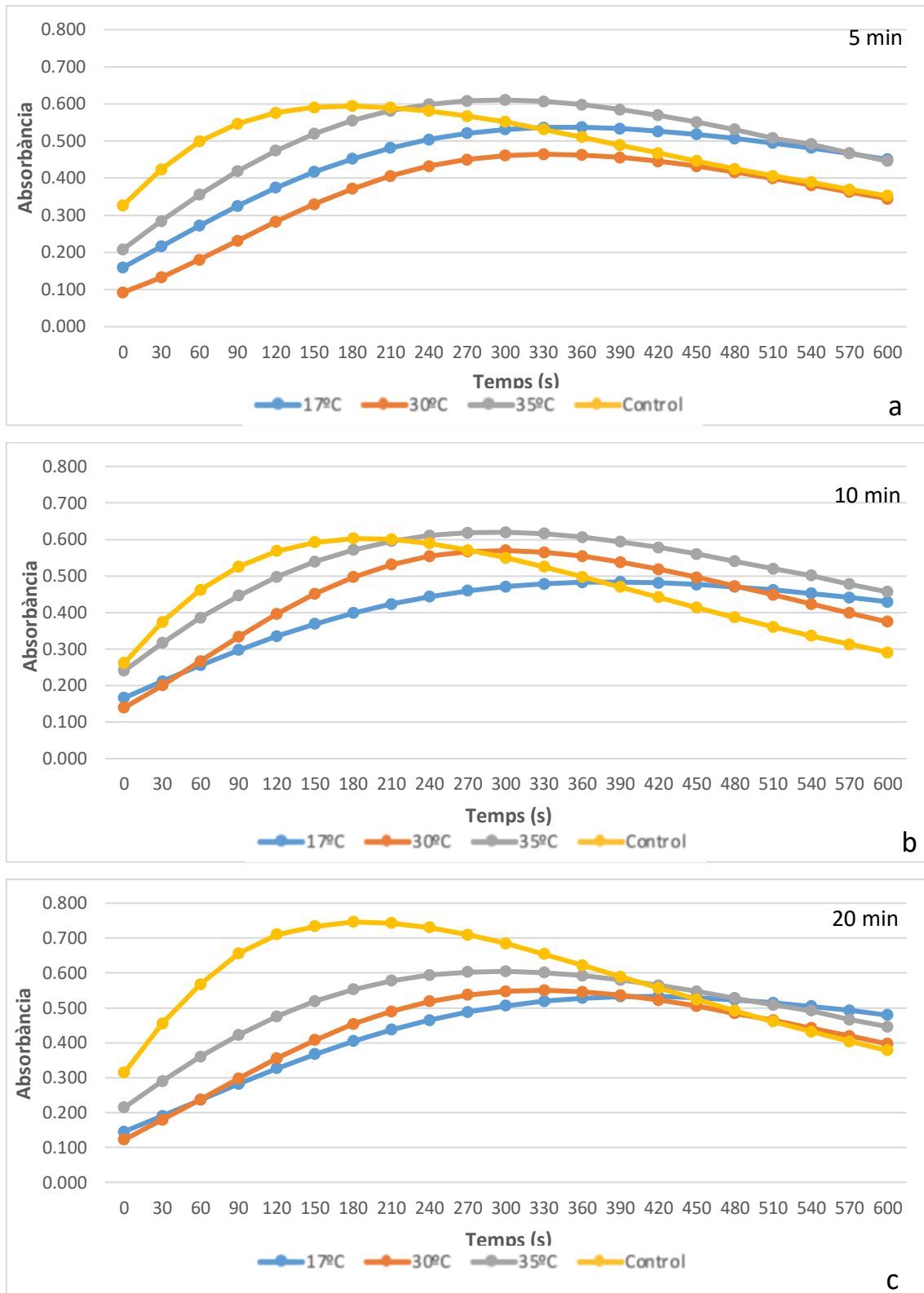


Figura 19. Activitat PRO de mostres submergides en aigua a diferents temperatures (17°C, 30°C i 35°C) a 5 min (a), 10 min (b) i 20 min (c).

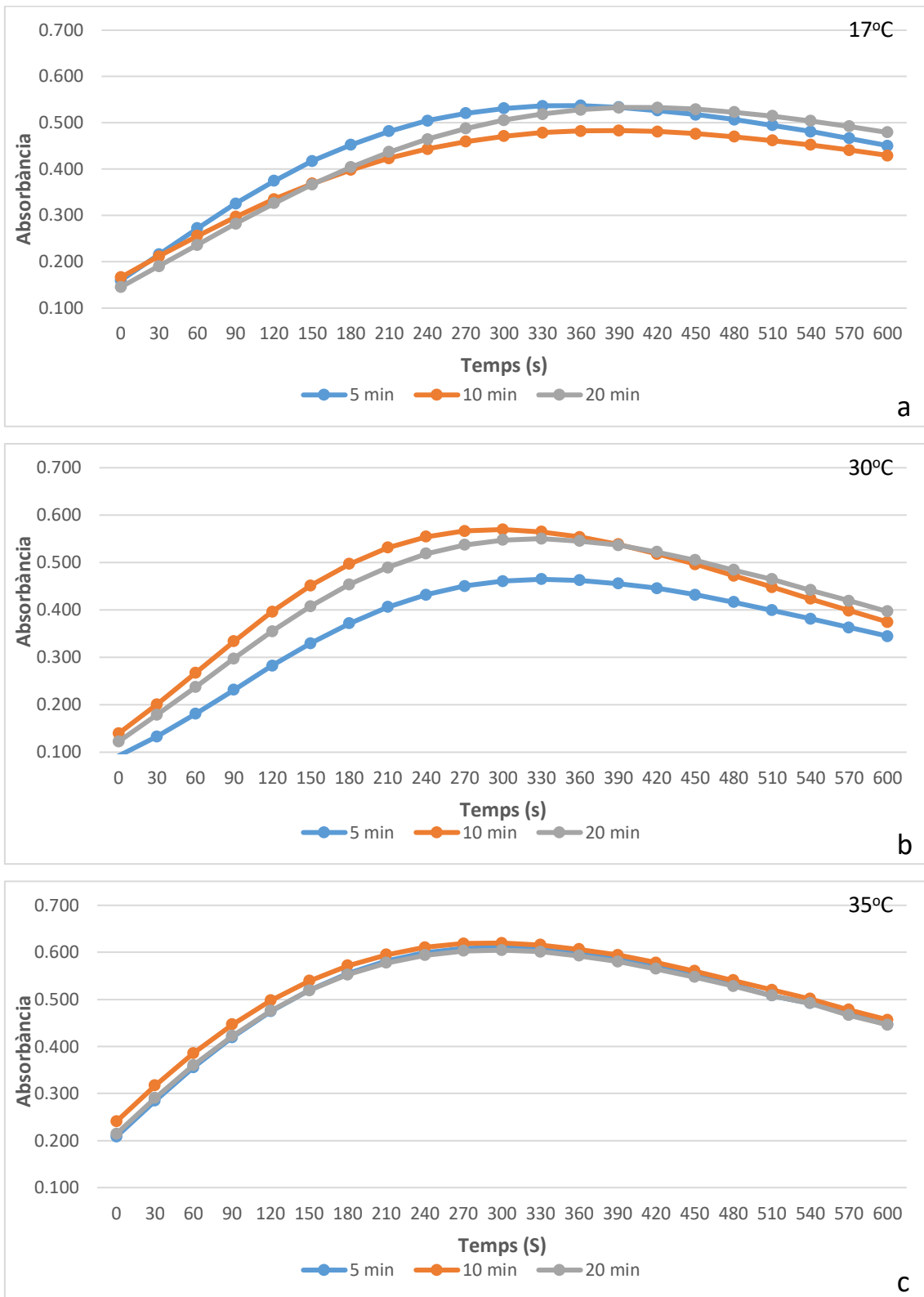


Figura 20. Activitat de la PRO de les mostres submergides en aigua a diferents temperatures, 17°C (a), 30°C (b), 35°C (c)

En la *Figura 20* es mostren els resultats de l'activitat de la PRO, com a la *Figura 19*, però en aquest cas estan classificats per temperatures de tractament.

En el gràfic (*Figura 20, a*), s'observen resultats similars en els tres temps, sent als 10 minuts on les mostres presenten una menor activitat enzimàtica.

En el tractament a 30°C (*Figura 20, b*), les mostres corresponents a 5 minuts, presenten una menor absorbància respecte a els altres temps de tractament (10 i 20 min)

En el tractament a 35 °C (*Figura 20, c*) les absorbàncies dels tres temps (5, 10 i 20 min) són molt semblants, tenint una absorbància màxima lleugerament superior a 0,6.

L'ajustament de les rectes a un polinomi de segon grau, ens permet avaluar la inhibició de l'activitat enzimàtica de la PRO. A continuació (*Taula 7*) es mostren les diferents equacions obtingudes. Les equacions obtingudes són bones, ja que els coeficients de correlació són propers a 1.

Taula 7. Equacions de les corbes d'activitat de la PRO per cada temps i temperatura d'immersió

Determinació PRO				
Temps (min)	Control	Tractament		
	Aire	Aigua 17 °C	Aigua 30 °C	Aigua 35 °C
5	$y = -0,002x^2 + 0,0384x + 0,3837$	$y = -0,0023x^2 + 0,0632x + 0,1093$	$y = -0,0025x^2 + 0,067x + 0,0165$	$y = -0,0029x^2 + 0,071x + 0,1726$
	$R^2 = 0,8042$	$R^2 = 0,989$	$R^2 = 0,9895$	$R^2 = 0,9625$
10	$y = -0,0027x^2 + 0,0516x + 0,3184$	$y = -0,0018x^2 + 0,0507x + 0,1226$	$y = -0,0032x^2 + 0,0797x + 0,0725$	$y = -0,0027x^2 + 0,067x + 0,2114$
	$R^2 = 0,8242$	$R^2 = 0,9957$	$R^2 = 0,9707$	$R^2 = 0,9594$
20	$y = -0,0033x^2 + 0,0648x + 0,388$	$y = -0,002x^2 + 0,06x + 0,0799$	$y = -0,0029x^2 + 0,077x + 0,0457$	$y = -0,0028x^2 + 0,0687x + 0,1823$
	$R^2 = 0,8068$	$R^2 = 0,9984$	$R^2 = 0,9872$	$R^2 = 0,9611$

Agafant el terme independent de les equacions s'obté l'absorbància a temps zero, sent directament proporcional a l'activitat enzimàtica *Figura 21*.

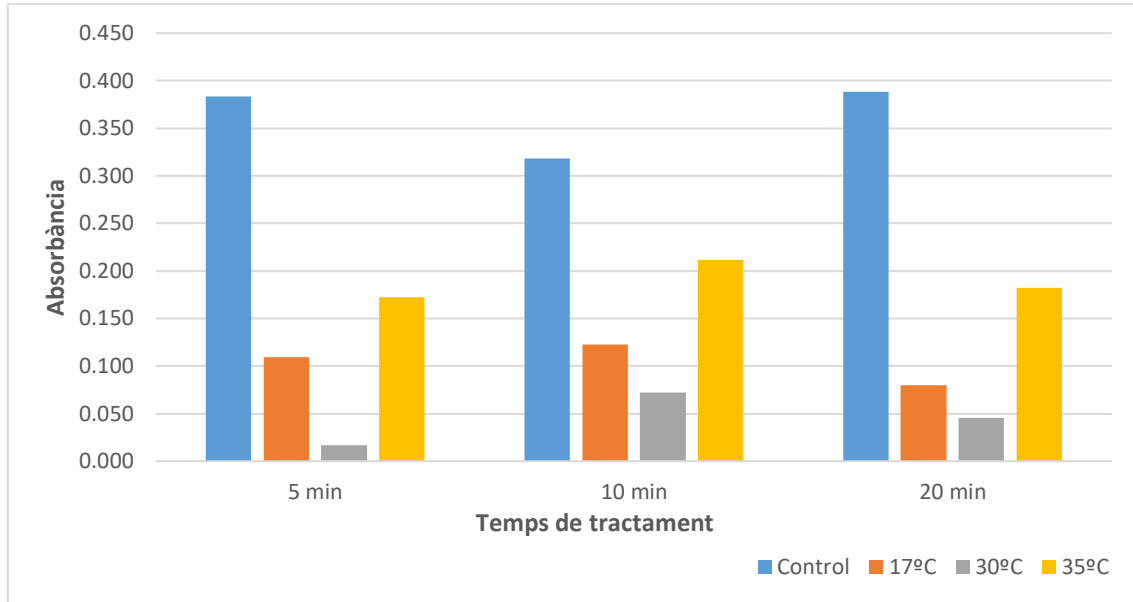


Figura 21. Activitat de la PRO (absorbància) a temps zero de les mostres submergides en aigua a diferents temps.

Les mostres submergides en aigua destil·lada a 30°C són les que mostren una menor activitat de PRO, sent als 5 minuts on l'absorbància és menor. Les mostres tractades a 35 °C són les que mostren una major activitat en els tres temps de tractament, sent a minut 10 on es mostra una major absorbància.

4.3.3 Efecte dels ultrasons i solucions àcides s'obre l'activitat de la peroxidasa (PRO)

En el cas de la PRO (*Figura 22*) s'observa un comportament diferent de la PPO en front als tractaments i temps d'aplicació d'ultrasons.

En el tractament a 5 minuts (*Figura 22, a*), totes les mostres tenen una activitat enzimàtica inferior a la mostra control. Sent la mostra tractada amb aigua destil·lada la de menor activitat, seguidament de la mostra tractada amb àcid ascòrbic.

En el tractament a 10 i 20 minuts (*Figura 22; b i c*) l'activitat de la peroxidasa es veu una mica incrementada, tenint nivells d'absorbància similars en els dos casos. No s'observa cap relació significativa entre l'activitat enzimàtica i els medis utilitzats.

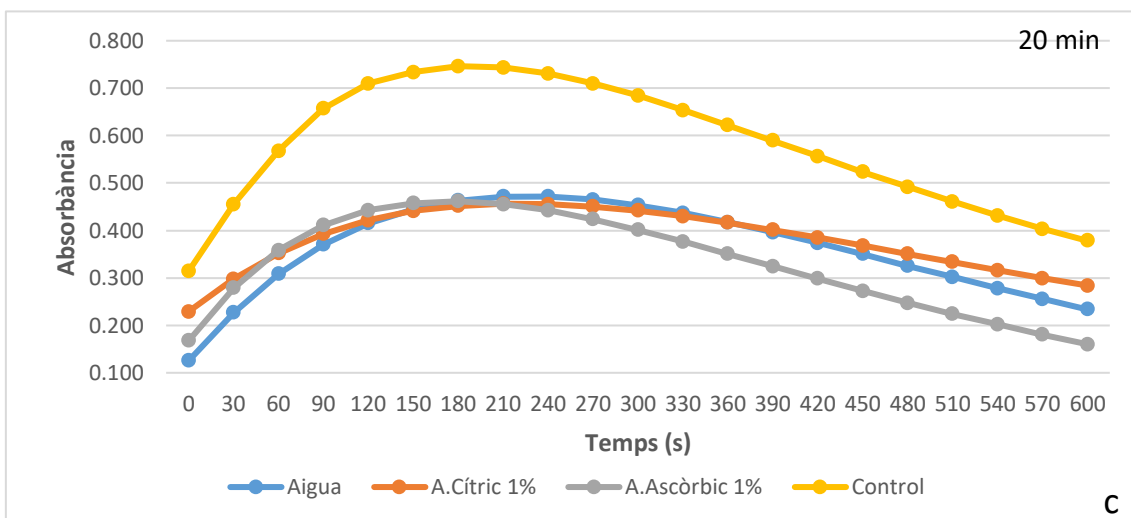
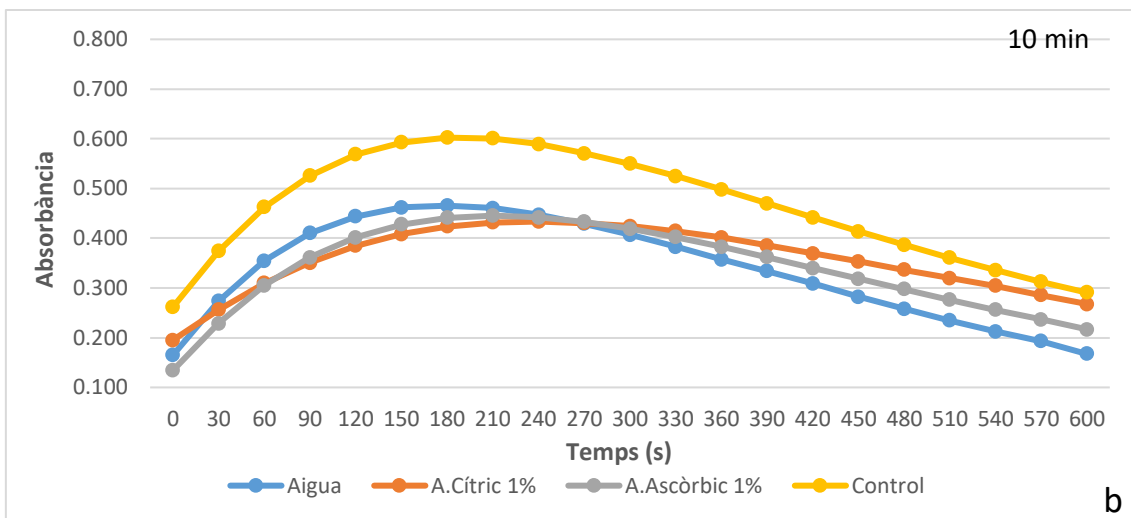
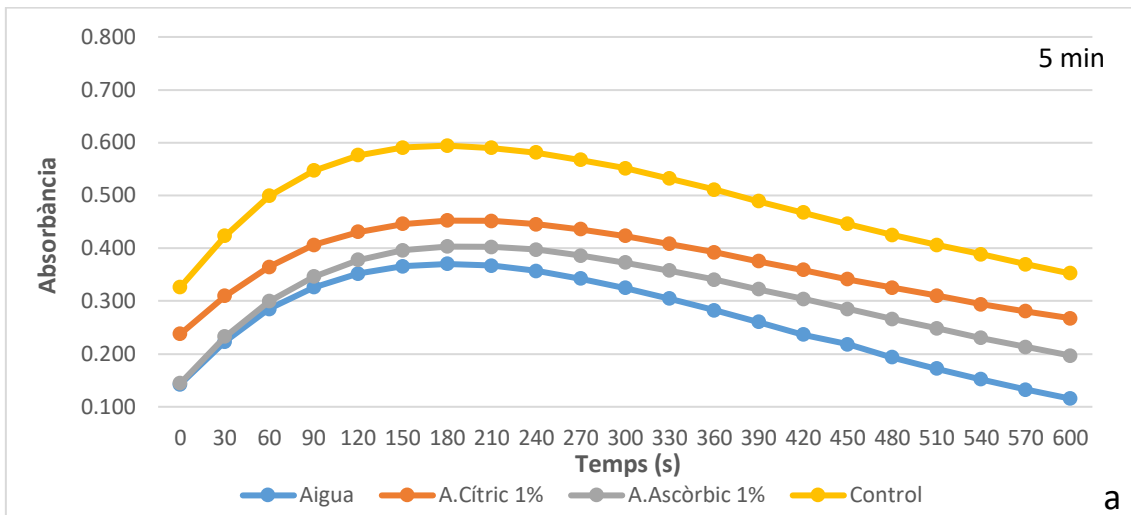


Figura 22. Activitat PRO de les mostres sonicades en diferents medis (Aigua, A.cítric i A.ascòrbic) a 5min(a), 10 min (b) i 20 min (c).

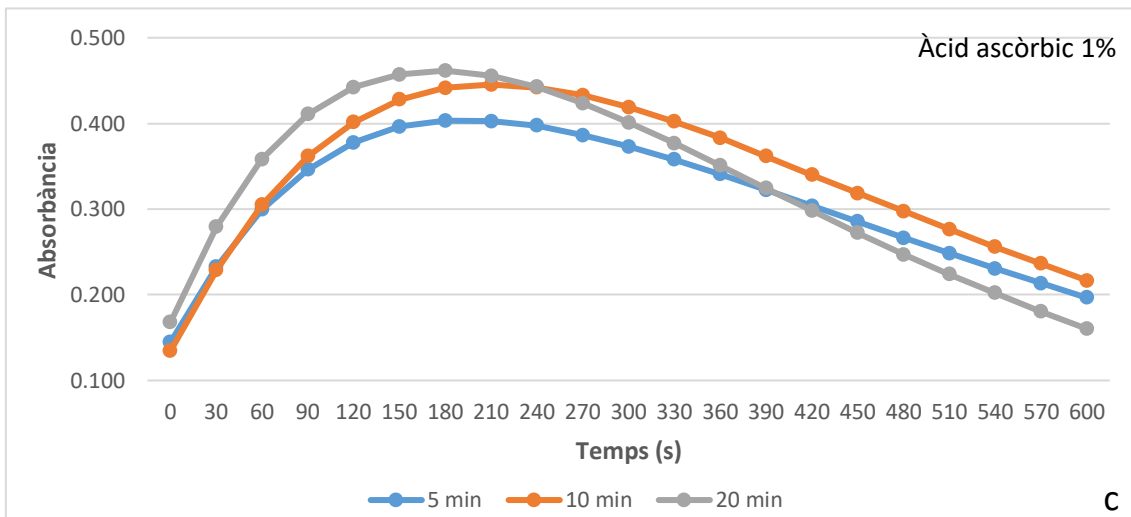
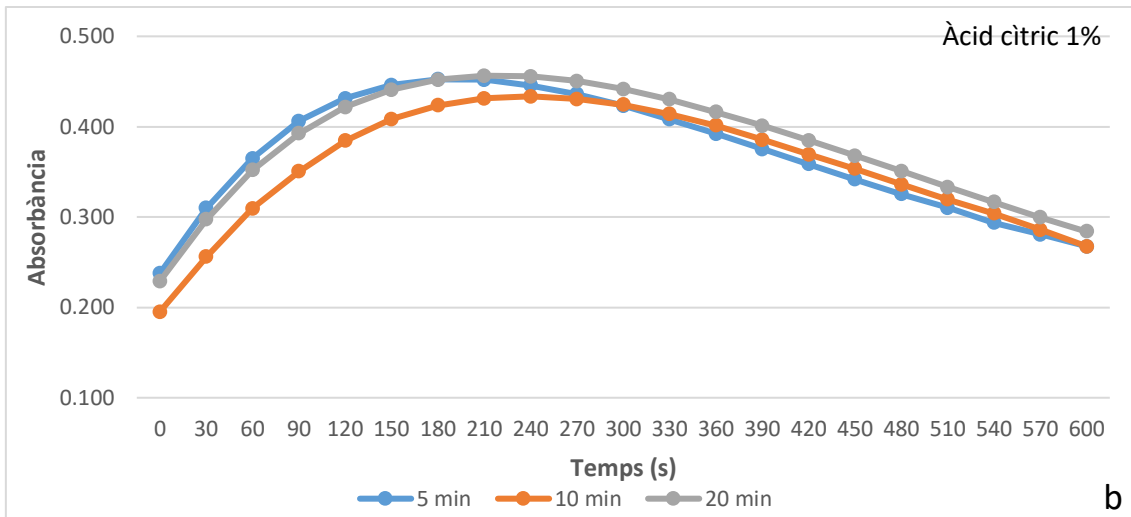
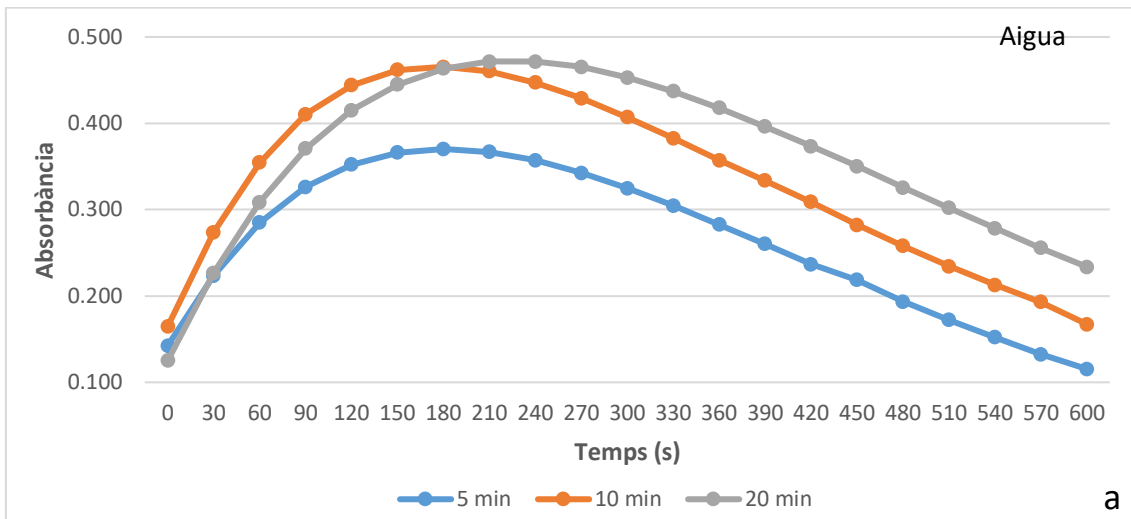


Figura 23. Activitat PRO de les mostres sonicades en diferents medis. (Aigua (a), Àcid cítric 1% (b), Àcid ascòrbic (c))

A continuació es mostren les equacions obtingudes del reajustament de les rectes a un polinomi de segon grau. Aquest cop la correlació no és tant bona, ja que es troben en un rang de 0,81 – 0,89.

Taula 8. Equacions de les corbes d'activitat de la PRO per cada temps i medi de sonicació

Determinació PRO				
Temps (min)	Control		Tractament US	
	Aire	Aigua	Àcid Cítric 1%	Àcid ascòrbic 1%
5	$y = -0,002x^2 + 0,0384x + 0,3837$	$y = -0,0019x^2 + 0,0342x + 0,1876$	$y = -0,0017x^2 + 0,0326x + 0,2734$	$y = -0,002x^2 + 0,0396x + 0,1858$
	$R^2 = 0,8042$	$R^2 = 0,8541$	$R^2 = 0,8185$	$R^2 = 0,8176$
10	$y = -0,0027x^2 + 0,0516x + 0,3184$	$y = -0,0023x^2 + 0,0429x + 0,23$	$y = -0,0019x^2 + 0,0418x + 0,1987$	$y = -0,0024x^2 + 0,05x + 0,167$
	$R^2 = 0,8242$	$R^2 = 0,8165$	$R^2 = 0,8976$	$R^2 = 0,8383$
20	$y = -0,0033x^2 + 0,0648x + 0,388$	$y = -0,0027x^2 + 0,0579x + 0,1497$	$y = -0,0018x^2 + 0,0382x + 0,2469$	$y = -0,0023x^2 + 0,0412x + 0,2366$
	$R^2 = 0,8068$	$R^2 = 0,8659$	$R^2 = 0,8706$	$R^2 = 0,8205$

Agafant el terme independent de les equacions s'obté l'absorbància a temps zero, sent directament proporcional a l'activitat enzimàtica (Figura 24). D'aquestes dades no es pot extreure una conclusió clara respecte a l'efecte que tenen el temps i el medi de tractament sobre les diferents mostres.

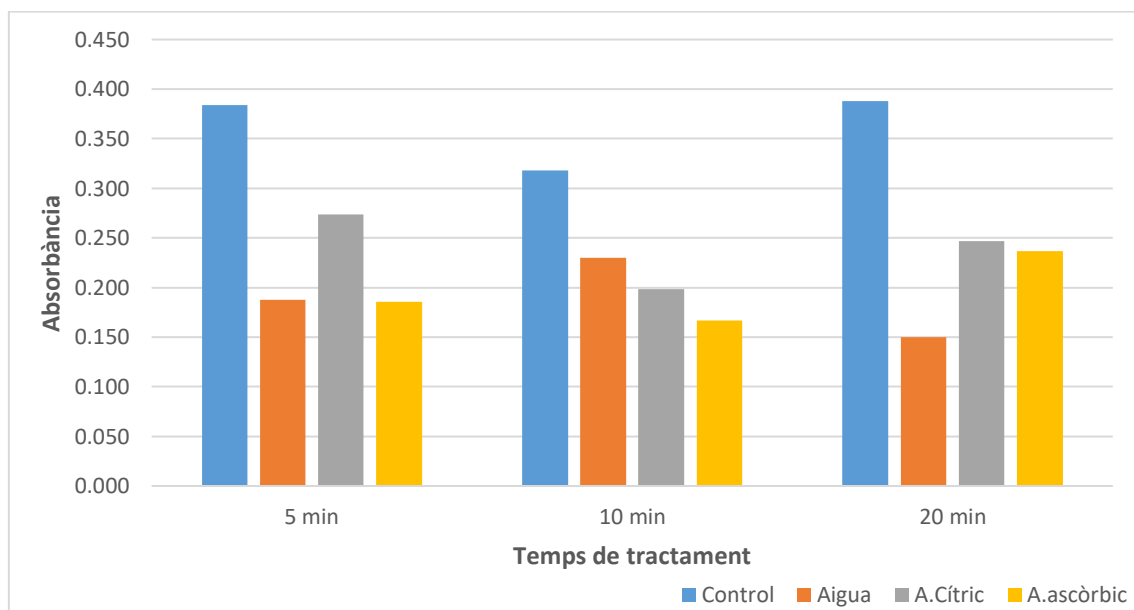


Figura 24. Activitat de la PRO (absorbància) a temps zero de les mostres sonicades en diferents medis.

4.3.4 Efectes dels tractaments sobre la inhibició de l'activitat de la peroxidasa (PRO)

En les següents figures (*Figura 25 i 26*) es presenten els percentatges d'inhibició de la PRO dels tractaments realitzats amb els dos mètodes.

Efecte de la inhibició de la PRO dels tractaments d'immersió en aigua a diferents temperatures.

Es pot observar que el tractament a 30°C té una major inhibició, respecte a la mostra control en tots els temps de tractament. Per contra la immersió a 35°C és el que té una menor inhibició en tots els temps de tractament. És diferent que en el cas de la PPO, on el tractament amb major inhibició era el d'immersió a 17°C.

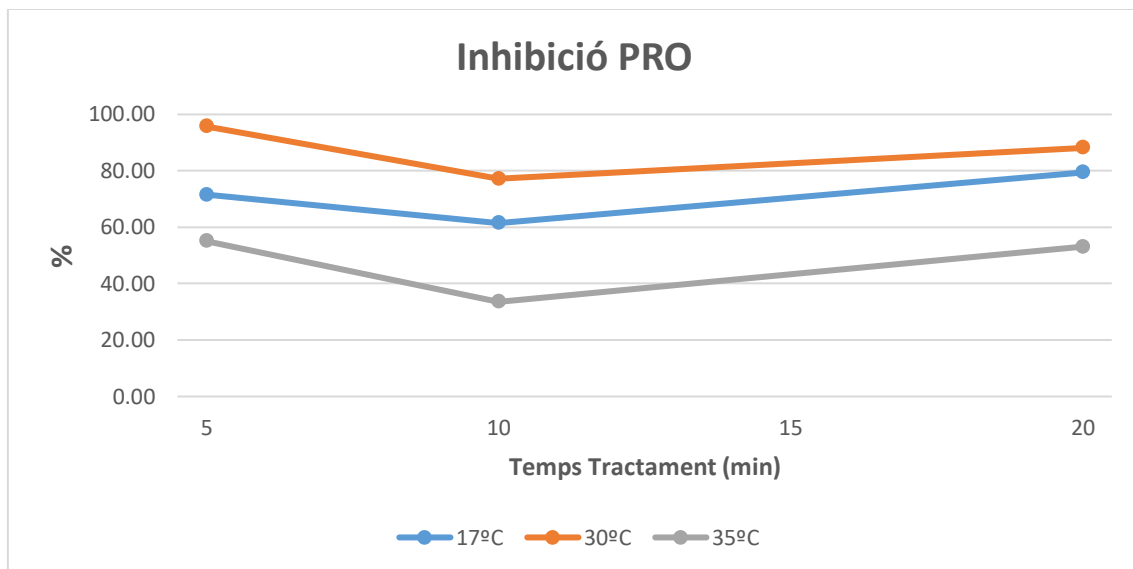


Figura 25. Inhibició de l'activitat de la PRO de les mostres submergides en aigua a diferents temperatures

Efecte de la inhibició de la PRO dels tractaments de sonicació en diferents medis.

Les mostres tractades amb ultrasons mostren una menor inhibició que les tractades amb aigua destil·lada. Això significa que el tractament d'ultrasons té un efecte negatiu, és a dir que augmenta l'activitat catalítica de l'enzim.

Els tractaments realitzats en aigua, no segueixen una tendència clara, disminuint la inhibició d'un 51% que s'obté al tractament de 5 minuts a un 37% que s'obté als 10 minuts i posteriorment augmentant-la per sobre de 61% sent la major inhibició d'aquest mètode.

Els tractaments realitzats amb d'àcid cítric al 1% mostren un augment d'inhibició als diferents temps estudiats, estabilitzant-se i obtenint una inhibició màxima del 36% als 20 minuts.

Els tractaments realitzats en un medi d'àcid ascòrbic al 1% segueixen una tendència decreixent de la inhibició respecte el temps de tractament. Tenint una inhibició de la PRO de 51% en els 5 minuts, 47% en els 10 minuts i 39% als 20 minuts

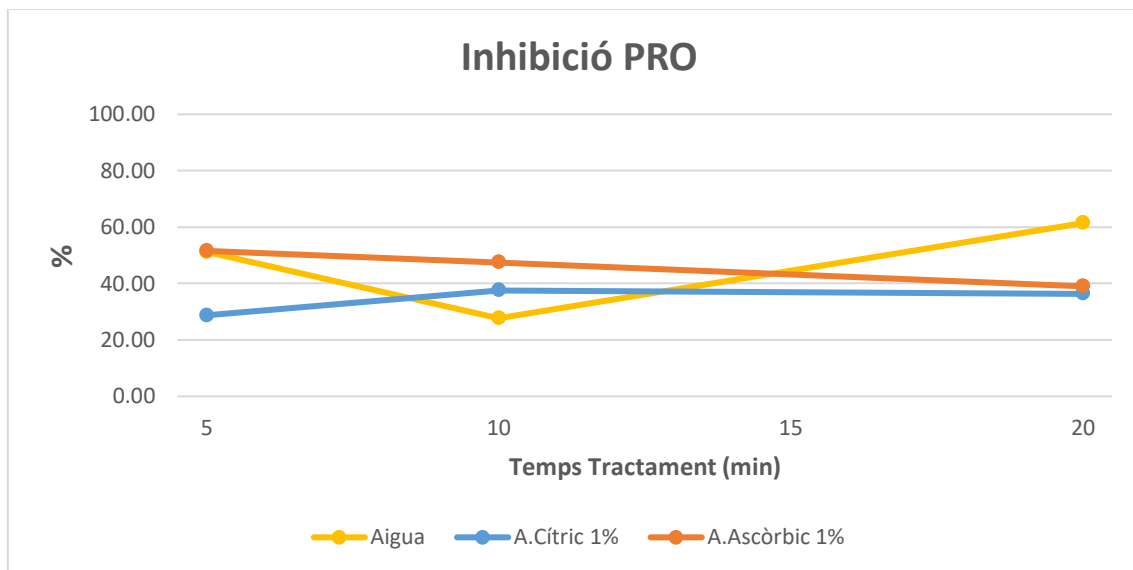


Figura 26. Inhibició de l'activitat de la PRO de les mostres sonicades en diferents medis

4.3.5 Efectes inhibidors dels diferents paràmetres sobre l'activitat enzimàtica (PRO)

A continuació (Taula 9 i 10) es mostren els efectes dels diferents paràmetres. Per a la determinació de l'efecte es va utilitzar l'equació proposta per Manohan i Wong (2012) emprada anteriorment per l'obtenció de les inhibicions totals respecte el control.

Taula 9. Grau d'inhibició de l'aigua i la temperatura sobre l'activitat enzimàtica (PRO)

% Inhibició PRO				
Temps (min)	Efecte Aigua		Efecte temperatura	
	17°C	30°C	35°C	
5	71,51 %	86,73 %	-36,67 %	
10	61,46 %	40,86 %	-42,01 %	
20	79,41 %	42,80 %	-56,17 %	

L'efecte de l'aigua sobre l'activitat de la peroxidasa obtingut ha estat: (71,51%, 61,46%, 79,41%) per el tractaments de (5, 10 i 20 min) respectivament. Es pot dir que l'aigua té un efecte inhibitor de l'activitat de la PRO.

S'observa que l'aigua a 30°C té un efecte positiu d'inhibició però que al llarg del temps perd efecte, per altre part l'aigua a 35 °C té un efecte negatiu en tots el temps de tractament (5, 10 i 20 min) (-36,67 , -42,01, -56,17 %) respectivament, es a dir que en aquest cas augmenta l'activitat enzimàtica respecta la realitzada a 17 °C.

Taula 10. Grau d'inhibició dels ultrasons i àcids sobre l'activitat enzimàtica (PRO)

% Inhibició PRO			
	Efecte ultrasons	Efecte àcids	
Temps (min)		A. cítric	A. ascòrbic
5	-71,64 %	-45,74 %	0,96 %
10	-87,60 %	13,61 %	27,39 %
20	-87,36 %	-64,93 %	-58,05 %

L'efecte inhibitor dels ultrasons sobre l'activitat de la peroxidasa (PRO) és negatiu, l'aplicació d'ultrasons a la mostra de patata fa augmentar l'activitat de la PRO, sent als 10 i 20 minuts quan s'obté un efecte més negatiu, -87,60 % i -87,36% respectivament.

L'efecte inhibitor sobre l'activitat de la PRO de les solucions àcides no mostra una tendència o evolució clara. L'àcid ascòrbic té un efecte positiu sobre la inhibició enzimàtica en els 5 i 10 minuts i efecte negatiu als 20 minuts (0,96 / 27,39 / -58,05) respectivament. Per altre costat l'àcid cítric no té tendència només tenint efecte positiu en el tractament de 10 minuts (-45,74 / 13,61 / -64,93)

Els resultats obtinguts en aquest estudi no coincideixen amb els de l'estudi (Sadurní., 2018), on els ultrasons tenen un efecte positiu en la inhibició de la PRO. En canvi, si que mostra una similitud amb l'estudi (Caballero., 2017) on es diu que en alguns casos els ultrasons afavoreixen l'activitat de la PRO.

Taula 11. Efecte d'inhibició de la PRO dels paràmetres dels tractaments de sonicació en medis àcids

Tractament	Temps (min)	Efecte de l'aigua (%)	Efecte US (%)	Efecte àcids (%)	Efecte Total (%)
US + A.Cítric.1%	5	71,51	-71,64	-45,74	-45,87
	10	61,46	-87,60	13,61	-12,53
	20	79,41	-87,36	-64,93	-72,88
US + A.Ascòrbic.1%	5	71,51	-71,64	0,96	0,83
	10	61,46	-87,60	27,39	1,25
	20	79,41	-87,36	-58,05	-66,00

4.4 Comparació dels efectes dels tractament de la PPO i PRO

Els dos enzims estudiats (PPO i PRO) han presentat una reducció de la seva activitat al submergir les mostres en aigua, això pot a causa de la reducció de la disponibilitat de l'oxigen. A 17°C la PRO mostra una major inhibició constant en el temps, en canvi es mostra una inhibició de l'activitat de la PPO inferior però creixent en funció del temps de tractament.

Per altra part els dos enzims han tingut un augment de l'activitat en submergir les mostres en aigua a 35°C. En els dos casos (PPO i PRO) aquest augment de temperatura té un gran efecte en l'activitat enzimàtica.

A l'aplicar el tractament d'ultrasons, el comportament dels dos enzims és totalment diferent. La PPO mostra una menor activitat per efecte dels ultrasons, en canvi la PRO mostra una major activitat, és a dir que els ultrasons tenen un efecte negatiu en davant la inhibició de la PRO.

Per altra part els medis àcids mostren un gran efecte inhibitori de l'activitat de la PPO. En canvi la PRO mostra una reacció diferent, augmentant la seva activitat.

S'ha realitzat un test de correlació amb un grau de confiança del 95%, per avaluar la relació entre els dos enzims. Els resultats estadístics mostren que no hi ha una relació significativa ($p > 0,05$) entre l'activitat de la PPO i la PRO.

4.4.1 Efecte de l'aigua i la temperatura en els diferents paràmetres de color

En la *Taula 12* s'observen els valors dels diferents paràmetres del color per les diferents temperatures d'immersió i temps de tractament estudiats. Per altra part, en les *Taules 13* i *Taula 14* es mostra l'efecte del temps d'immersió sobre els paràmetres del color.

Per poder estudiar els resultats de les mesures, s'han calculat el Chroma (saturació), l'angle de hue (matis) i l'índex de color.

Taula 12. Evolució de la lluminositat (L^), Chroma (C^*), hue (h^*) i índex de color (IC) en patata sense tractar i tractada amb immersió en aigua destil·lada a diferents temperatures.*

Tractament	Temps (min)	Paràmetres de Color				
		$L^*(\pm 1,35)$	$C^*(\pm 3,50)$	$h^*(\pm 0,60)$	IC($\pm 1,45$)	$\Delta E(\pm 2,13)$
Control	0	67,96	20,23	85,45	-1,17	47,63
	5	67,28	20,00	85,32	-1,22	46,74
	10	68,18	21,92	85,26	-1,22	48,80
	20	68,33	20,05	86,09	-1,00	47,81
Aigua 17°C	0	65,59	28,77	85,87	-1,10	50,04
	5	68,33	29,78	85,79	-1,08	52,81
	10	67,06	25,80	85,51	-1,17	49,60
	20	67,59	27,50	85,20	-1,24	50,98
Aigua 30°C	0	68,43	27,97	85,59	-1,13	51,93
	5	68,51	29,08	85,92	-1,04	52,59
	10	71,05	25,15	85,01	-1,23	52,73
	20	71,03	27,26	84,21	-1,43	53,73
Aigua 35°C	0	68,30	22,82	86,74	-0,83	49,27
	5	68,58	22,22	86,20	-0,97	49,17
	10	68,65	23,11	86,19	-0,97	49,71
	20	68,55	22,79	86,17	-0,98	49,45

S'ha realitzat un reagrupament de les lectures segons les temperatures de tractament, observant-se una disminució del Chroma (saturació) en les mostres tractades a 35°C. No s'ha observat més canvi per l'efecte de la temperatura.

Taula 13. Efecte de les diferents temperatures sobre els diferents paràmetres de color

Tractament	L*(± 1,28)	C*(± 2,74)	h*(± 0,57)	IC(± 0,13)	ΔE(± 1,79)
Aigua 17°C	67,66	27,70	85,50	-1,16	51,13
Aigua 30 °C	70,19	27,16	85,05	-1,23	53,01
Aigua 35 °C	68,59	22,71	86,18	-0,97	49,44

No hi ha una relació significativa ($p < 0,05$) entre la temperatura d'immersió en aigua amb els paràmetres de color.

En la següent taula (*Taula 14*) es presenten els valors dels paràmetres de color per a cada temps d'immersió en aigua.

Taula 14. Efecte del temps d'immersió en els diferents paràmetres del color.

Tractament	L*(± 0,37)	C*(± 0,65)	h*(± 0,20)	IC(± 0,04)	ΔE(± 0,14)
5 min	68,17	25,27	-85,81	-1,08	50,33
10 min	68,74	24,00	-85,49	-1,15	50,21
20 min	68,87	24,40	-85,42	-1,16	50,49

No hi ha una relació significativa ($p < 0,05$) entre el temps d'immersió en aigua amb els paràmetres de color.

4.4.2 Efecte del tractament de sonicació en els diferents paràmetres de color

En la *Taula 15* es mostren els valors dels diferents paràmetres del color per les mostres sonicades en diferents medis i amb diferent temps de tractament. En la *Taula 16* es mostra l'efecte del medi i en la *Taula 17* es mostra l'efecte del temps de sonicació sobre els diferents paràmetres que defineixen el color.

Taula 15. Evolució de la lluminositat(L), Chroma(C*), hue(h*) i índex de color(IC) en patata sense tractar i tractada amb ultrasons a diferents temps de sonicació i en les diferents solucions.*

Tractament	Temps (min)	Paràmetres de Color				
		L*(± 2,15)	C*(± 1,93)	h*(± 0,60)	IC(± 0,16)	ΔE(± 2,68)
Control	0	67,96	20,23	85,45	-1,17	47,63
	5	67,28	20,00	85,32	-1,22	46,74
	10	68,18	21,92	85,26	-1,22	48,80
	20	68,33	20,05	86,09	-1,00	47,81
Aigua	0	66,95	19,15	85,60	-1,15	46,23
	5	66,78	19,43	85,41	-1,20	46,21
	10	66,50	22,92	85,70	-1,13	47,69
	20	68,97	20,88	85,82	-1,06	48,87
A.Cítric 1%	0	69,91	24,64	86,41	-0,90	51,43
	5	71,75	24,58	86,04	-0,97	53,01
	10	73,76	25,08	84,52	-1,30	55,67
	20	71,33	22,76	85,66	-1,06	51,81
A.Ascòrbic 1%	0	67,84	23,44	86,41	-0,92	48,82
	5	70,63	21,73	85,95	-1,00	50,72
	10	71,50	23,43	86,70	-0,81	51,79
	20	70,92	21,30	86,90	-0,76	50,75

S'ha realitzat un reagrupament de les lectures (*taula 16*) segons el medi de tractament de sonicació, s'observa un increment de la lluminositat en els tractaments amb àcids, sent major amb l'àcid cítric al 1% (71,28%).

Taula 16. Efecte de les solucions emprades en els diferents paràmetres del color.

Tractament	L*(± 2,52)	C*(± 1,55)	h*(± 0,58)	IC(± 0,15)	ΔE(± 2,97)
Aigua	67,42	21,08	85,65	-1,13	47,59
A.Cítric 1%	72,28	24,14	85,41	-1,11	53,50
Ascòrbic 1%	71,02	22,15	86,52	-0,86	51,09

Es mostra un augment significatiu ($p < 0,05$) de la lluminositat de les mostres sonicades en medis àcids (A.cítric 1% i A.ascòrbic 1%).

En la següent taula (*Taula 17*) es presenten els valors dels paràmetres de color per a cada temps de sonicació.

Taula 17. Efecte del temps de sonicació en els diferents paràmetres del color.

Tractament	L*(± 0,37)	C*(± 0,65)	h*(± 0,21)	IC(± 0,04)	ΔE(± 0,14)
5 min	68,17	25,27	85,81	-1,08	50,33
10 min	68,74	24,00	85,49	-1,15	50,21
20 min	68,87	24,40	85,42	-1,16	50,49

No s'ha trobat una relació significativa ($p < 0,05$) entre el temps de sonicació amb els paràmetres de color.

4.4.3 Relació de l'activitat de la PPO i PRO amb els paràmetres de color

L'absorbància (activitat enzimàtica) de la PPO té una relació significativa ($p < 0,05$) amb la lluminositat. Presenten una correlació negativa (-0,42), això és coherent ja que al augmentar l'absorbància significa una major activitat enzimàtica i per tant un major enfosquiment (disminució de L*). Això significa que els tractaments amb ultrasons i medis àcids presenten una major lluminositat

L'absorbància de la PRO presenta una relació significativa ($p < 0,05$) amb el Chroma. Presenta una correlació negativa (-0,68), això significa que al augmentar l'absorbància el color presentarà una menor saturació. Per tant els tractaments amb una major inhibició de la PRO, presenten una major saturació de color.

Els paràmetres de angle de hue (matis) i l'índex de color, no presenten canvis significatius ($p < 0,05$) respecte l'activitat dels enzims PPO i PRO.

5. Conclusions

- L'aplicació dels ultrasons tenen un efecte inhibidor sobre l'activitat de la polifenoloxidasa (PPO), però un efecte contrari en l'activitat de la peroxidasa (PRO).
- El temps d'aplicació dels ultrasons que presenta una major inhibició de la PPO, és de 10 minuts, si s'incrementa el temps fins a 20 minuts l'efecte es redueix molt.
- La utilització de medis àcids incrementa la inhibició de la PPO, però en el cas de la PRO no s'han obtingut resultats conclouents.
- L'àcid ascòrbic té un efecte major que l'àcid cítric sobre la inhibició de la PPO, d'aquesta forma es conclou que una acció reductora que actua contra l'accessibilitat de l'oxigen, té una major efectivitat que una acció quelant que actua sobre el centre actiu de l'enzim.
- La temperatura té efectes sobre l'activitat enzimàtica (PPO i PRO), s'ha observat en els dos casos un augment significatiu de l'activitat a temperatura de 35°C respecte les altres temperatures (17 i 30 °C).
- L'aigua té un efecte inhibidor superior en l'activitat enzimàtica de la PRO que no en la PPO. El temps d'immersió no afecta en la inhibició de la PRO però sí en la inhibició de la PPO
- L'activitat de la Polifenoloxidasa (PPO) esta correlacionada negativa i significativament amb la lluminositat de la patata(-0,42), mentre que la Peroxidasa (PRO) aquesta correlació negativa i significativa es dona amb el Chroma.(-0,68)

6. Bibliografia

Angurell, I., Casamitjana, N., Caubet, A., Dinarès, I., Llor, N., ... Velasco, D. (2014). Tècniques i operacions avançades al laboratori químic (TALQ). [Consulta: 22 de juny del 2019]. Disponible a <http://www.ub.edu/talq/ca/content/361-fonament-de-la-tecnica>

Caballero Anento. (2017). Efecte dels ultrasons i solucions àcides en l'enfosquiment enzimàtic de la patata (*Solanum Tuberosum*). Treball de final de Grau. Escola superior d'agricultura de Barcelona, UPC.

Castro, J., Baquero, L., and Narváez, E., (2006). Catalasa, Peroxidasa y Polifenoloxidasa de pitahaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*), "*Revista Colombiana de Química*" vol. 35, pp.91-100

Cerón-Carrillo, T.G., Palou, E., and Lopez-Malo, A. (2010). Pulsos eléctricos: fundamentos y aplicaciones en alimentos." *Temas selectos de ingeniería de alimentos*" vol.4 no. 1, pp 9-26.

Cheftel, J. (1995). High-pressure, microbial inactivation and food preservation. "*Food Science and Technology International*". vol. 1, no. 2, pp. 75–90.

Gacche, R. N., Ghole, V. S., Khobragade, C. N., i Sagar, A. D. (2002). Potato phenoloxidasas immobilized s-triazine containing dialdehyde: An efficient biocatalysts for bioremediation of phenols. "*Journal of Scientific and Industrial Research*", vol. 61, no. 8, pp. 621–624.

Manohan, D., & Wong, C. W. (2012). Characterization of Polyphenol Oxidase in Sweet Potato (*Ipomoea Batatas* (L.)). "*for the Advancement of Science & Arts*", vol. 3, no. 1, pp. 14–31.

Pérez, L. (2003). Aplicación de métodos combinados para el control del desarrollo del pardeamiento enzimático en pera (variedad Blanquilla) mínimamente procesada. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de valencia, Departamento de tecnología de alimentos.

Roquesa, V. & Ligia, B. (2007). Ailamiento y caracterización de una polifenoloxidasa relacionada con la tolerancia del clavel (*Dianthus caryophyllus*) A *Fusarius oxysporum* f. sp. *Dianthi* raza 2. "*Acta biol. Colomb*" vol. 12, no. 2, pp. 81-94

Sadurni, M. (2018). Efecte de l'aplicació d'ultrasons en l'enfosquiment enzimàtic de la Patata (*Solanum Tuberosum*). Treball de final de Grau. Escola superior d'agricultura de Barcelona, UPC.

Silveira Gómez, A., (2017). Uso de aditivos y métodos físicos para mantener la calidad de los productos de IV gama o mínimamente procesados. "Agrociencia Uruguay" vol. 21, no 1, pp. 20-17

Stauffer, C. (1989) Enzyme assays for food scientists. Van Nostand Reinhold/AVI, New York.