

**EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS PARA LA INACTIVACIÓN DE
LAS ENZIMAS POLIFENOL OXIDASA Y PEROXIDASA EN EL JUGO DE FIQUE
(*Furcraea gigantea Vent.*) PRODUCIDO EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO**

**LAURA INÉS LATORRE VÁSQUEZ
ANA LUCIA PANTOJA CHAMORRO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2011**

**EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS PARA LA INACTIVACIÓN DE
LAS ENZIMAS POLIFENOL OXIDASA Y PEROXIDASA EN EL JUGO DE FIQUE
(*Furcraea gigantea Vent.*) PRODUCIDO EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO**

**LAURA INÉS LATORRE VÁSQUEZ
ANA LUCIA PANTOJA CHAMORRO**

**Trabajo de grado, presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Agroindustrial**

**Asesor:
DIEGO FERNANDO MEJIA ESPAÑA
Ingeniero Agroindustrial**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2011**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1º de acuerdo 324 de octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

Nota de aceptación:

MSc. Dolly Revelo

Dr. Oswaldo Osorio

San Juan de Pasto, Marzo de 2011

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía, mi luz y mi fuerza para seguir adelante

*A mis padres y hermanos por brindarme su apoyo incondicional y
acompañarme en todo momento*

*A todas aquellas personas que compartieron conmigo momentos inolvidables
y grandes experiencias que permitieron culminar satisfactoriamente mi
carrera*

Ana Lucía Pantoja Chamorro

DEDICATORIA

*Al finalizar este paso por la academia quisiera dedicar mi trabajo de grado a
Dios por darme fuerza en todos los momentos de mi vida*

A mi familia por su apoyo incondicional

A mis profesores y a mi asesor por su orientación

*A mis compañeros, amigos y todas las personas que me ofrecieron su apoyo en
mi crecimiento profesional y personal*

Laura Inés Laterre Vásquez

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus sinceros agradecimientos a:

A la Universidad de Nariño por permitirnos la culminación de nuestra carrera.

VIPRI por la financiación de este trabajo de investigación.

Grupo de investigación TEA por la asesoría y colaboración brindada.

Funcionarios Planta Piloto por la colaboración brindada.

Ing. Diego Mejía E. por su apoyo, colaboración y aportes en el desarrollo del trabajo de grado.

PH.D Andrés Hurtado por su asesoría en diseños experimentales y colaboración brindada.

PH.D Oswaldo Osorio por su asesoría y correcciones del trabajo de grado.

MSc. Dolly Revelo por las correcciones del trabajo de grado.

Ing. David Álvarez por su asesoría y colaboración brindada.

A las personas que de alguna manera colaboraron en la realización y culminación de este trabajo de grado.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 OBJETIVO GENERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4. MARCO TEÓRICO	23
4.1 JUGO DE FIQUE	23
4.2 ENZIMAS.....	24
4.2.1 Peroxidasa (POD) y Polifenol Oxidasa (PPO).	25
4.3 TRATAMIENTOS DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA.....	27
4.4 METODOLOGÍA PARA LA INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA	28
4.4.1 Obtención del extracto enzimático	28
4.4.2 Inactivación térmica de POD y PPO	29
4.4.3 Medición de la actividad enzimática:.....	30
4.4.3.1 Peroxidasa	30
4.4.3.2 Polifenol oxidasa.....	31
4.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL JUGO	32
5. DISEÑO METODOLÓGICO	33
5.1 PROCEDENCIA Y OBTENCIÓN DE JUGO DE FIQUE	33
5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	33
5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
5.4 TRATAMIENTOS TÉRMICOS.....	35
5.5 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA	36
5.6 PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	36
5.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	38

6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	40
6.1.1	Peroxidasa.....	40
6.1.1.1	Análisis de varianza para actividad residual POD:.....	45
6.1.2	Polifenol oxidasa.....	48
6.1.2.1	Análisis de varianza para actividad residual PPO.....	52
6.2	MEDICIÓN DEL PORCENTAJE DE CRECIMIENTO	55
6.2.1	Análisis de varianza para Porcentaje de Crecimiento.....	58
7.	CONCLUSIONES	63
8.	RECOMENDACIONES.....	64
	BIBLIOGRAFIA	65

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Resultados del diseño experimental POD	41
Tabla 2. ANOVA para actividad residual POD	45
Tabla 3. Óptima respuesta para actividad residual POD.....	46
Tabla 4. Resultados del diseño experimental PPO	49
Tabla 5. ANOVA para actividad residual PPO	52
Tabla 6. Óptima Respuesta para actividad residual PPO	53
Tabla 7. Resultados del diseño experimental para porcentaje de crecimiento.....	56
Tabla 8. ANOVA para porcentaje de crecimiento.....	58
Tabla 9. ANOVA para porcentaje de crecimiento.....	59
Tabla 10. Prueba de múltiples rangos.....	59
Tabla 11. Matriz del Diseño Experimental PC	60
Tabla 12. Resultados de porcentaje de crecimiento.....	61
Tabla 13. ANOVA para porcentaje de crecimiento.....	61
Tabla 14. Prueba de múltiples rangos.....	62

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Composición química de la hoja del fique	24
Cuadro 2. Obtención de extractos enzimáticos en diversos productos	29
Cuadro 3. Inactivación térmica en diversos productos	30
Cuadro 4. Matriz del diseño experimental	34
Cuadro 5. Reactivos, cantidades y concentraciones para la determinación enzimática	37
Cuadro 6. Comparación de resultados para actividad residual POD	44
Cuadro 7. Comparación de resultados para actividad residual PPO.....	51

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Cultivo de fique	23
Figura 2. Estructura de la enzima peroxidasa	25
Figura 3. Estructura de la enzima polifenol oxidasa	26
Figura 4. Equipo de extracción de jugo	33
Figura 5. Baño Termostatado Modelo YCW 010.....	35
Figura 6. Centrifuga Thermo IEC Multi RF 8466	36
Figura 7. Espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS	38
Figura 8. Cámara de siembra.....	39
Figura 9. Reacción enzimática de POD y PPO	40
Figura 10. Actividad enzimática inicial de POD	41
Figura 11. Actividad residual de POD	42
Figura 12. Log % actividad residual de POD.....	43
Figura 13. Efectos principales para actividad residual POD.....	46
Figura 14. Gráfico de Pareto para actividad residual POD.....	47
Figura 15. Superficie de Respuesta para actividad residual POD.....	48
Figura 16. Actividad enzimática inicial de PPO	48
Figura 17. Actividad residual de PPO.....	50
Figura 18. Log % actividad residual de PPO.....	50
Figura 19. Efectos principales para actividad residual PPO	54
Figura 20. Gráfico de Pareto para actividad residual PPO.....	54
Figura 21. Superficie de Respuesta para actividad residual PPO	55
Figura 22. Inhibición <i>in-vitro</i> sobre el crecimiento de <i>P. infestans</i>	57
Figura 23. Actividad Biológica	58
Figura 24. Gráfica de medias para porcentaje de crecimiento	60
Figura 25. Gráfica de medias para porcentaje de crecimiento	62

GLOSARIO

ABSORBANCIA: Es la medida de energía radiante o flujo radiante que es absorbido por un material o una superficie como función de la longitud de onda de dicha energía o flujo. Es la cantidad de intensidad de luz que absorbe una muestra.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA: Es una expresión que se emplea para describir los efectos benéficos o adversos que se producen sobre la materia viva.

DISEÑO EXPERIMENTAL: Es un conjunto de experimentos o pruebas, de tal manera que los datos generados puedan analizarse estadísticamente para obtener conclusiones válidas y objetivas acerca de un sistema o proceso.

ENZIMAS: Son proteínas que catalizan las reacciones bioquímicas del metabolismo, actúan sobre las moléculas conocidas como sustratos y permiten el desarrollo de los diversos procesos celulares.

EXTRACTO ENZIMÁTICO: Muestra en la cual se encuentran localizadas las enzimas en mayor proporción.

FACTORES: Variables que influyen en el sistema y que pueden ser controladas por el investigador.

FIQUE: Plantas grandes, de tallo erguido, densamente poblado de hojas de color verde, en forma radial, angostas, carnosas, puntiagudas, acanaladas, y dentado espinosas.

PASTEURIZACIÓN: Es una operación de estabilización de alimentos que persigue la reducción de la población de microorganismos presentes en estas de forma que se prolongue el tiempo de vida útil del producto.

PEROXIDASA: Es una enzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno.

POLIFENOL OXIDASA: Es una enzima oxidoreductasa de importancia en productos vegetales ya que está relacionada con el oscurecimiento enzimático que ocurre durante el almacenamiento o durante el procesamiento industrial.

RESUMEN

Del proceso de obtención de fibra de cabuya dependen aproximadamente 3.000 familias en el Departamento de Nariño. El proceso de desfibrado, se lleva a cabo en el mismo lote de cultivo y el lavado de la cabuya se hace muchas veces en ríos y quebradas aledaños al mismo, causando contaminación y muerte de la ictio fauna que lo habita (CARACTERIZACION OCUPACIONAL DEL SUBSECTOR FIQUERO DE COLOMBIA, 2006).

Como alternativa de solución al problema ambiental generado por este proceso, se han propuesto distintas alternativas de uso del jugo de fique, entre las que se destaca el aprovechamiento de sus características como bioinsumo. El inconveniente se presenta en la rápida autólisis y fermentación que conllevan a cambios en la coloración del jugo de fique, deteriorando la calidad de sus valiosos componentes con potencial biocida.

Se ha reportado efectos del bioinsumo de fique (*Furcraea gigantea Vent.*) sobre el pseudohongo *Phytophthora infestans*, que es el agente causal de la enfermedad de la gota, principal limitante para el cultivo de la papa (ROJAS, 2008), (ALVAREZ, DELGADO, SALAZAR, & HURTADO, 2010).

Con este trabajo de investigación se buscó una alternativa que permita al jugo conservar sus características biocidas. Una de ellas es aplicar al jugo un tratamiento térmico que disminuya considerablemente la presencia de las enzimas peroxidasa (POD) y polifenol oxidasa (PPO) posiblemente causantes del deterioro del jugo.

La mejor combinación de temperatura-tiempo que presentó una reducción de la actividad enzimática y un menor porcentaje de crecimiento de *Phytophthora infestans* fue 75°C por 4 min, reportando unos valores de actividad residual para POD de 10.6% y para PPO de 3.2% y porcentaje de crecimiento de 2.1%.

Palabras claves: Actividad enzimática, jugo de fique, peroxidasa, *Phytophthora infestans*, polifenol oxidasa, tratamiento térmico.

ABSTRACT

On the process of obtaining fiber of sisal-grass approximately 3.000 families depend in Nariño's Department. The process of shredding is carried out in the same lot of culture and the wash of the sisal-grass is done often in rivers and broken boundaries to the same one, causing pollution and death of the ictio fauna that he it lives (CARACTERIZACION OCUPACIONAL DEL SUBSECTOR FIQUERO DE COLOMBIA, 2006).

As alternative of solution to the environmental problem generated by this process, they have proposed different alternatives of use of the juice of fique, between that is outlined the utilization of his characteristics as bioproduct. The disadvantage appears in the rapid autolysis and fermentation that they carry to changes in the coloration of the juice of fique, spoiling the quality of his valuable components with potential bioproduct.

Effects of the bioproduct have been brought of fique (*Furcraea gigantea* Vent.) on the pseudofungus *Phytophthora infestans* that is the causal agent of the disease of the drop, main bounding for the culture of it eats (ROJAS, 2008), (ALVAREZ, DELGADO, SALAZAR, & HURTADO, 2010).

With this work of investigation an alternative was looked that allows the juice to preserve his characteristics bioproduct. One of them is to apply to the juice a thermal treatment that diminishes considerably the presence of the enzymes peroxidase (POD) and polyphenol oxidase possibly causative (PPO) of the deterioration of the juice.

The best combination of temperature - time that presented a reduction of the enzymatical activity and a minor percentage of growth of *Phytophthora infestans* was 75°C for 4 min, bringing a few values of residual activity for POD of 10.6% and for PPO of 3.2% and percentage of growth of 2.1%.

Key words: Enzymatic activity, juice of fique, peroxidase, *Phytophthora infestans*, polyphenol oxidase, thermal treatment.

INTRODUCCIÓN

Los principales departamentos productores de fique se ubican en la región andina del país, son 13 departamentos y se calcula en 72 los municipios productores de fique. Sin embargo, los cinco (5) principales departamentos productores son Cauca, Nariño, Antioquia, Santander y Boyacá y representan el 99% de la superficie cosechada, estimada en más de 23.000 hectáreas (MADR, IICA & Corpoica, 2004a).

Los tres (3) principales departamentos de mayor área cultivada son Cauca, Nariño y Santander, que representan el 87.2% en el periodo 2002 – 2008 (SECRETARÍA TÉCNICA NACIONAL DEL FIQUE CADEFIQUE, 2008). El Departamento de Nariño ocupó el primer lugar en área cultivada en el país, en el 2008 con 7.292 ha, el segundo lugar en rendimiento, con 1.2 ton/ha y produjo 7.540 toneladas de fibra que equivalen a un 34.1 % del total nacional siendo el segundo departamento en producción (CRUZ H, 2008).

Del 100% de la hoja de fique, solo el 4% se utiliza como fibra. Los residuos del proceso de extracción constituyen el 96% del peso de la hoja, de esta cantidad, el 50% lo constituyen los jugos de fique (SECRETARÍA TÉCNICA NACIONAL DEL FIQUE CADEFIQUE, 2006).

La demanda internacional de sustancias que se encuentran en la planta de fique, ha incentivado a que se realicen investigaciones para obtener un mejor aprovechamiento de sus componentes, buscando un modelo sostenible de la cadena de fique. Los productos industriales del jugo de fique tienen el potencial de ser competitivos (CADENA PRODUCTIVA NACIONAL DEL FIQUE CADEFIQUE, 2006).

El jugo de fique además de ser un residuo en la producción de fibras naturales, es una sustancia que se caracteriza por tener propiedades tensoactivas, plaguicidas, y por poseer esteroides naturales entre los que se han encontrado saponinas y fitoesteroles (GOMEZ & VANEGAS, 2001).

En estudios de actividad biológica, las propiedades biocidas del jugo de fique han sido previamente estudiadas y documentadas en Colombia. Se ha realizado estudios *in vitro* del extracto de fique para determinar la acción biocida de esta sustancia sobre las estructuras micelial y conidial de los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporoides* y *Sclerotinia sclerotiorum*, causantes de las enfermedades conocidas como pudrición algodonosa del Lulo (*Solanum quitoense*), antracnosis del tomate de árbol (*Solanum betacea*) (GÓMEZ H, 2001) y tizón tardío o gota de la papa causado por el pseudohongo *Phytophthora infestans* (ALVAREZ, DELGADO, SALAZAR, & HURTADO, 2010).

Las propiedades biocidas del jugo de fique pueden alterarse o perderse debido a su rápida degradación a temperatura ambiente (ROJAS, 2008), lo cual se puede controlar con métodos de conservación, que emplean efectos físicos o químicos que impiden o retardan la descomposición de material biológico; como el calor, frío, control de actividad del agua, del oxígeno en el aire, entre otras (FELLOWS, 1994). Por lo tanto, esta investigación está encaminada a evaluar una alternativa de conservación de sus características biocidas.

1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El fique es un producto estratégico para el desarrollo agropecuario y agroindustrial del país, teniendo en cuenta el proceso de expansión experimentado por el cultivo en los últimos años y la tendencia internacional de utilización de empaques biodegradables, así como el uso industrial de sus derivados (CARACTERIZACIÓN OCUPACIONAL DEL SUBSECTOR FIQUERO DE COLOMBIA, 2006).

Del proceso de desfibrado del fique, queda un 96% de residuos tóxicos (CADENA PRODUCTIVA NACIONAL DEL FIQUE CADEFIQUE, 2006), el jugo constituye el 70% de los residuos que se desechan al ambiente. En Nariño, se producen cerca de 103.000 ton/año de jugo, que actualmente no está siendo aprovechado (ECOFIBRAS Empresa Cooperativa de Fibras Santander Limitada, 2005). Debido al deterioro que ocasionan estos vertimientos al ambiente (MARTÍNEZ & CAICEDO, 2002), se ha propuesto estudiar más a fondo el residuo con el fin de brindar alternativas de uso.

Una de ellas es realizar un tratamiento térmico que permita retardar su deterioro y conservar sus características; evaluando la eficiencia del tratamiento mediante la presencia de enzimas termoestables como son peroxidasa (POD) y polifenol oxidasa (PPO) las cuales se pueden involucrar en el deterioro de los jugos vegetales, además de tener un importante papel en la fisiología de las plantas, estas enzimas son de gran interés en la tecnología de alimentos, debido a su influencia sobre la calidad de frutas, vegetales crudos y procesados (MORALES-BLANCAS, CHANDIA, & CISNEROS- ZEVALLOS, 2002), (ROBINSON, 1991b).

Tanto la POD como la PPO han sido estudiadas en una gran cantidad de frutas y hortalizas, pero no se ha reportado en la literatura disponible, la composición enzimática del jugo de fique. Por tratarse de un jugo vegetal y con base en ensayos previos de actividad específica cualitativa, realizados por el grupo de investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria de la Universidad de Nariño se detectó la presencia de estas enzimas en el jugo de fique.

Por ello, se considera importante realizar un estudio de inactivación enzimática del jugo de fique, ya que este puede constituirse en una alternativa orgánica con un amplio potencial en diversos campos de la industria farmacéutica y agrícola.

2. JUSTIFICACIÓN

En Colombia, 70.000 familias dependen directamente del cultivo de fique y están ubicadas en zonas marginales, cuya tierra no es apta para otros productos (COLOMBIA - MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL - OBSERVATORIO AGROCADENAS, 2006). Información aportada por el Observatorio de Agrocadenas afirma que el cultivo de fique genera un significativo número de empleos por hectárea. Durante el año 2005, generó 0.70 empleos por hectárea, cifra superior a la de cultivos como cacao (0.50 empleos), caña de azúcar (0,18), algodón (0,40), maíz (0,22), y arroz (0,14). Sin embargo, para el período 2000 – 2005, la producción creció a una tasa de 1.4%, mientras el empleo aumentó a un ritmo anual de 4%, al pasar de 10.538 personas ocupadas en el sector a 12.264, lo que refleja una baja productividad laboral del sector (COLOMBIA - MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL - OBSERVATORIO AGROCADENAS, 2006).

En el mes de octubre de 2006, el eslabón Industrial (Compañía de Empaques S.A., Coohilados del Fonce Ltda. y Empaques del Cauca S.A.), decidió la disminución en \$ 277 del precio de compra de fique (materia prima), pasando de \$1.650 a \$1.373 por kg en los departamentos de Nariño, Santander y Cauca. El precio de proyección para el año 2008, se situó en \$1.370, lo cual significa una disminución del 12% con referencia al precio pagado en 2006, que fue de \$1.550 (CRUZ H, 2008).

Esta importante desvalorización de los precios de la fibra en los últimos 2 años ha impulsado a los productores, centros de investigación y a la Cadena Agroindustrial del fique, a buscar alternativas de aprovechamiento integral, sobre todo en las regiones más productoras, como Cauca, Nariño y Santander.

A esto se suma el alto grado de ineficiencia del proceso de extracción de la fibra. Del 100% de la hoja de fique, solo el 4% se utiliza como fibra. Los residuos del proceso de extracción constituyen el 96% del peso de la hoja, lo que sumó 518.400 toneladas en 2003; de esta cantidad, el 50% lo constituyen los jugos de fique (SECRETARÍA TÉCNICA NACIONAL DEL FIQUE CADEFIQUE, 2006).

En el departamento de Nariño, del beneficio del fique, se producen aproximadamente 103.000 toneladas/año de jugo, que actualmente no está siendo aprovechado (ECOFIBRAS Empresa Cooperativa de Fibras Santander Limitada, 2005).

Además, el lavado de la cabuya muchas veces se hace en las quebradas, contaminando el agua con graves consecuencias para la biodiversidad de las diferentes regiones; ello se debe a las propiedades fisicoquímicas de los jugos. En un estudio realizado por Martínez y Caicedo en 2002, se concluyó que la

concentración letal media CL50 (a las 96 horas) de los jugos del fique es de 1 mg/L (1 ppm) para alevinos de trucha arco iris de una pulgada; igualmente se encontró que 3 ppm es la concentración crítica muriendo el total de peces expuestos (MARTÍNEZ & CAICEDO, 2002).

Según Peinado J. E., 2005, el jugo del fique es más tóxico que el mancozeb (fungicida) y que el propanil (herbicida). La concentración letal media CL50, medida a las 48 horas, es de 1,0 mg/l para el jugo de fique, mientras que para el mancozeb es de 2,2 mg/l. El jugo de fique solo es superado en toxicidad por un insecticida, el clorpirifos (PEINADO, PEÑALOSA, & GAMBOA, 2005).

No existe información acerca de toxicidad en otras especies causada por sustancias generadas a partir del jugo de fique. Entre estas sustancias se destaca la presencia de saponinas esteroidales. Sparg (2004) reporta que las saponinas, ingeridas por vía oral, tienen una leve toxicidad para las especies de sangre caliente, pero es tóxica para especies de sangre fría, propiedad que se ha utilizado para capturar peces (SPARG, LIGHT, & VAN STADEN, 2004).

Diversos estudios realizados sobre plantas de la familia de las Agaváceas (a la que pertenece el fique) dan cuenta de una interesante actividad biológica, debida a su composición (VERÁSTEGUI, SÁNCHEZ, HEREDIA, & GARCÍA-ALVARADO, 1996), (GARCÍA, SÁENZ, PUERTA, QUILEZ, & FERNÁNDEZ, 1999), (PEREIRA, OLIVEIRA, & PAZ, 2006), (MELÉNDEZ & CAPRILES, 2006), (VERÁSTEGUI, VERDE, GARCÍA, HEREDIA, ORANDAY, & RIVAS, 2008), (KHANNA & KANNABIRAN, 2008), (SÁNCHEZ, HEREDIA, & GARCÍA, 2005), (DEEPAK, OROS, SATHYANARAYANA, SHETTY, SHETTY, & SASHIKANTH, 2005).

No existen reportes sobre la utilización efectiva de esta sustancia a nivel comercial, posiblemente debido a las dificultades para estabilizarlo.

En ensayos preliminares realizados por Rojas en 2008, la autora reporta actividad contra el fitopatógeno *Phytophthora infestans*, que causa la enfermedad de la gota en papa. Sin embargo, se encontraron dificultades para utilizar el extracto, debido principalmente a la rápida descomposición del jugo utilizado a temperatura ambiente. A pesar de que los resultados fueron medianamente satisfactorios, la autora recomienda que para profundizar en el estudio, se debe primero estabilizar el jugo de fique (ROJAS, 2008).

Entre los agentes causales de deterioro en los jugos vegetales se encuentran las enzimas peroxidasa (POD) y polifenol oxidasa (PPO). Además de tener un importante papel en la fisiología de las plantas, estas enzimas son de gran interés en la tecnología de alimentos, debido a su influencia sobre la calidad de frutas y vegetales crudos y procesados (MORALES-BLANCAS, CHANDIA, & CISNEROS-ZEVALLOS, 2002), (PRESTAMO & MANZANO, 1993), (ROBINSON, 1991b).

Existen estudios sobre estabilización de jugos diferentes al de fique, en los cuales buscan inactivar las enzimas causantes del deterioro o cambios desfavorables para el producto, mediante tratamientos térmicos; como en zanahoria (SOYSAL & SOYLEMEZ, 2005), calabaza, (AGUERO, ANSORENA, ROURA, & DEL VALLE, 2008), arazá (NARVAEZ, 2008), hojas de menta (RUDRA, SHIVHARE, & BASU, 2008), tomillo (DOGAN & DOGAN, 2004), aguacate (LUIZ, MEDEIROS, & CLEMENTE, 2007), lechuga (GAWLIK-DZIKI, ZLOTEK, & SWIECA, 2008) y uvas (RAPEANU, VAN, SMOUT, & HENDRICKX, 2006) que se llevan a cabo variando temperaturas en ciertos rangos de tiempo de acuerdo a la muestra de interés.

Los estudios existentes en cuanto a tratamientos térmicos incluyen la pasteurización como método para lograr la estabilidad de la composición de los jugos. La aplicación de tratamientos térmicos para preservar alimentos es una técnica muy antigua de uso común en la actualidad. Se basa en la destrucción térmica de enzimas, formas vegetativas de microorganismos, y estructuras de reproducción como endosporas, con el fin de prolongar la vida útil de los alimentos por varios días (SILVA & GIBBS, 2004).

Para cuantificar el grado de inactivación enzimática, es necesario desarrollar una metodología de extracción y cuantificación adecuada, que permita obtener buenos resultados (NARVAEZ, 2008).

La carencia de información sobre la función de las enzimas polifenol oxidasa y peroxidasa en jugo de fique, y la falta de un protocolo de extracción y medida de actividad adecuadas, son factores que impulsan a investigar más a fondo este aspecto.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar varios tratamientos térmicos para la inactivación de las enzimas peroxidasa y polifenol oxidasa en el jugo de fique (*Furcraea gigantea Vent.*) producido en el departamento de Nariño.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Optimizar la efectividad de los tratamientos térmicos que inactiven las enzimas peroxidasa y polifenol oxidasa mediante la medición de la actividad enzimática remanente en el jugo de fique (*Furcraea gigantea Vent.*) tratado.
- ✓ Determinar la actividad biológica del jugo de fique (*Furcraea gigantea Vent.*) tratado, mediante pruebas de inhibición de *Phytophthora infestans*.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 JUGO DE FIQUE

Es un subproducto del proceso de obtención de fibra de cabuya, y representa el 70% de la hoja, éste es una suspensión con características variables, dependiendo de la edad, la estación del año y la fertilidad del suelo. De color verde ocre, tiene un olor característico fuerte, y es muy corrosivo. Su densidad media a escala experimental es de 1.02 Kg. /L y su pH varía entre 4 y 5. Sus constituyentes se conocen en forma cualitativa, siendo agua, celulosa, materia orgánica y minerales, con los siguientes valores porcentuales:

- 85% humedad.
- 6% celulosa. (D-glucosa)
- 8% parte orgánica y amorfa (Con sacarosa, proteínas, nitrógeno, fósforo, calcio, potasio, saponinas y sapogeninas).
- 1% Minerales.

(CADENA PRODUCTIVA NACIONAL DEL FIQUE CADEFIQUE, 2006)

Figura 1. Cultivo de fique



Fuente: esta investigación

En el cuadro 1 se puede observar la composición química de la hoja de fique.

Cuadro 1. Composición química de la hoja del fique

Fibra		Jugo	Bagazo	
Cenizas	0.7%	Clorofila	Cenizas	12.2%
Celulosa	73.8%	Carotenoides	E.E.	3.64%
Resinas, ceras y grasas	1.9%	Saponinas Azúcares	Proteína Elementos Nitrogenados	9.84% 71.29%
Lignina	11.3%	Resinas	Calcio	21.65%
Pentosanos	10.5%	Flavonoides Ácidos orgánicos	Fósforo Magnesio	0.09% 0.2%
TOTAL	98.2%	Alquitranes Agua Lignina Calcio Lipoides Fósforo	Fósforo Sodio Cobre Hierro Manganeso Zinc	1.81% 0.04% 14 ppm 647 ppm 33 ppm 17 ppm

Fuente: Arroyave & Velásquez, 2001.

El jugo de fique presenta características especiales de tipo biocida pero no se ha podido establecer la composición química exacta del jugo. Mediante estudios fitoquímicos preliminares, llevados a cabo en la Universidad de Nariño (BENAVIDES, BACCA, & ORTIZ, 2009), se ha logrado determinar la presencia de diversas sustancias en el jugo de fique, entre las que se encuentran Alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esteroides, quinonas y glucósidos cardiotónicos. Su presencia se encontró en jugos de dos variedades de fique, Uña de Águila (*Furcraea macrophylla*) y tunosa común o Negra Común (*Furcraea gigantea*). El estudio se llevó a cabo con jugo fermentado y sin fermentar.

4.2 ENZIMAS

Una enzima es un catalizador biológico que lleva a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades y con un elevado grado de especificidad; en su ausencia, la mayoría de las transformaciones químicas requeridas para mantener activas las células tardarían mucho tiempo en efectuarse o simplemente no procederían (BADUI, 1999).

Las enzimas son específicas para el sustrato con el que pueden interactuar. El sustrato debe reunir ciertas características para que pueda ser utilizado como tal. La especificidad puede ser estereoquímica (isómeros L o D como sustratos), baja especificidad (atacan un determinado enlace químico), especificidad de grupo (un

enlace y grupo químico específico al lado de éste) y especificidad absoluta (una sola sustancia) (BADUI, 1999).

Las enzimas pueden ser desnaturizadas por varios medios, entre ellos el calor. La mayoría de las enzimas son, por lo tanto termolábiles y generalmente una temperatura de 70 a 80 °C durante 2 a 5 min basta para inactivarlas. El efecto desnaturizante de la temperatura se produce al desorganizar totalmente la estructura de la macromolécula, provocándole muchos cambios de solubilidad (coagulación), color, digestibilidad, etcétera (CRUZ, VIEIRA, & SILVA, 2006).

4.2.1 Peroxidasa (POD) y Polifenol Oxidasa (PPO). La peroxidasa (POD) se ha vinculado con cambios en la coloración de frutas y hortalizas, degradación de compuestos fenólicos con importante valor antioxidante y pérdida de aroma (NARVAEZ, 2008). Además, ha sido ampliamente usada como indicadora de efectividad del escaldado por su alta tolerancia a tratamientos térmicos.

La POD ($\text{guayacol} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{tetrahydroguayacol} + \text{H}_2\text{O}$, EC 1.11.17), es una enzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno (SESSA & ANDERSON, 1981). Esta tiene la capacidad de degradar el H_2O_2 a expensas del consumo de sustancias de tipo fenólico, aunque con la generación de sustancias pardas, razón por la cual ha sido ubicada dentro del sistema enzimático antioxidante (HANSBERG, 2002).

Figura 2. Estructura de la enzima peroxidasa



Fuente: bioinformatica.upf.edu/.../Ey/GPXhumanas.html

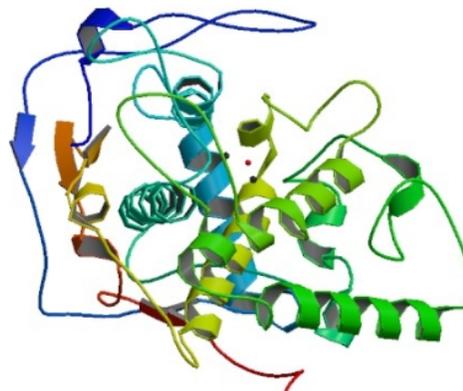
La actividad de POD se estima por la medida del incremento de la absorbancia a 470 nm (HALPIN, PRESSEY, JEN, & MONDY, 1989), posee una alta resistencia térmica, su presencia se utiliza para monitorear la calidad del tratamiento térmico y la estabilidad del alimento procesado (MACHADO & SARAIVA, 2002).

La inactivación térmica de POD generalmente ocurre en estado bifásico debido a la presencia de isoenzimas con diferentes estabilidades térmicas, la estabilidad de diferentes isoenzimas varía con la proporción del donador de sustrato y de hidrogeno; esto es importante si se usa la enzima como indicador de un tratamiento térmico para frutas y hortalizas (SOYSAL & SOYLEMEZ, 2005).

La cinética de inactivación térmica de la peroxidasa en productos hortofrutícolas ha sido muy estudiada y está constituida por dos fases, cada una de las cuales caracterizada por una cinética de primer orden. Esas dos fases se deben a la existencia de isoenzimas de diferentes estabilidades térmicas, las cuales pueden ser lábiles o resistentes al calor (AVALLONE, CRAUZOV, MONTENEGRO, & PELLIZZARI, 2000).

La polifenol oxidasa (PPO) es responsable de las reacciones de pardeamiento enzimático que ocurren durante el almacenamiento, manipulación y procesamiento de frutas y hortalizas. Además cataliza la hidroxilación de monofenoles a ortodifenoles, posteriormente oxidados a ortoquinonas, las cuales se polimerizan dando lugar a pigmentos que presentan color marrón, rojo o negro, dependiendo de los componentes naturales presentes en los tejidos vegetales (GASULL & BECERRA, 2006). La actividad de la enzima PPO puede ser inhibida por calentamiento o por remoción de alguno de sus componentes necesarios (GUERRERO & BELTRAN, 2005).

Figura 3. Estructura de la enzima polifenol oxidasa



Fuente: bioinformatica.upf.edu/.../Ey/GPXhumanas.html

La PPO es una metaloenzima ampliamente distribuida en la escala filogenética, encontrándose tanto en organismos procariontas como eucariotas y en el reino vegetal, siendo detectada en algas, briófitas, pteridófitas, gimnospermas y angiospermas (MAYER & HAREL, 1979).

Recibe muchos nombres debido a la gran diversidad de sustratos que emplea. Técnicamente es una o-difenol oxígeno reductasa. Su reacción se puede describir de la siguiente manera ($2 \text{ catechol} + \text{O}_2 = 2 \text{ 1,2- benzoquinone} + 2 \text{ H}_2\text{O}$, E.C 1.10.3.1). Esta enzima puede llevar a cabo la oxidación directa aerobia de compuestos mono y difenoles (tirosina, fenol, p-cresol, 3, a-dimetil fenol, 4-terbutilfenol). La actividad de PPO es de una significativa importancia económica, particularmente en frutas y vegetales (SILVA & GIBBS, 2004).

La presencia de polifenol oxidasa se ha podido identificar y caracterizar usando hojas y frutos de numerosas especies vegetales como fuente enzimática. Los niveles de PPO varían dependiendo de la especie, cultivo, estado de maduración, estado fenológico (MAYER & HAREL, 1979).

4.3 TRATAMIENTOS DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA

Los tratamientos térmicos estabilizan productos porque tienen la capacidad para destruir microorganismos y para inactivar enzimas (CRUZ, VIEIRA, & SILVA, 2006). La optimización de los tratamientos térmicos precisa los siguientes elementos: a) conocimiento de las cinéticas de penetración de calor en el producto tratado y de las propiedades térmicas de dicho producto, b) conocimiento de la cinética de destrucción de microorganismos y de los parámetros que caracterizan su termo-resistencia, c) conocimiento de la cinética de las reacciones secundarias que acompañan a la destrucción térmica de los microorganismos; destrucción de enzimas, vitaminas, reacciones decolorantes o de pardeamiento, cinéticas de cocción, etc. (MAFART, 1994).

Entre los tratamientos térmicos más usados para inactivar las enzimas y mejorar la conservación de los jugos vegetales con mínimas pérdidas en su valor nutricional, se encuentra la pasteurización. Se define como un tratamiento térmico relativamente suave (Temperaturas inferiores a 100°C), que conserva los alimentos por inactivación de sus enzimas y destrucción de los microorganismos relativamente termosensibles (FELLOWS, 1994).

El objetivo principal en los alimentos de baja acidez ($\text{pH} > 4,5$) consiste en la destrucción de las bacterias patógenas, mientras que en los alimentos ácidos ($\text{pH} < 4,5$) suele ser más importante la destrucción de los microorganismos causantes de su alteración y la inactivación de sus enzimas (FELLOWS, 1994).

La pasteurización emplea generalmente temperaturas por debajo del punto de ebullición (en cualquier tipo de alimento), ya que en la mayoría de los casos las temperaturas superiores a este valor afectan irreversiblemente ciertas características físicas y químicas del producto alimenticio; así, por ejemplo, si en la leche se sobrepasa el punto de ebullición, las micelas de caseína se “coagulan” irreversiblemente (LEWIS & HEPPELL, 2004).

El proceso de calentamiento de la pasteurización, si se hace a bajas temperaturas, tiene además la función de detener los procesos enzimáticos. Hoy en día, la pasteurización realizada a los alimentos es un proceso industrial continuo aplicado a alimentos, con la intención de ahorrar energía y costes de producción. Existen tres tipos de procesos bien diferenciados: pasteurización VAT o lenta, pasteurización a altas temperaturas durante un breve periodo de tiempo (HTST - High Temperature/Short Time) y el proceso a ultra-altas temperaturas (UHT - Ultra-High Temperature) (LEWIS & HEPPELL, 2004).

En cuanto a la pasteurización de productos de elevada acidez ($\text{pH} < 4,6$) como el jugo de fique, no están definidos claramente los criterios de pasteurización. Actualmente, la industria diseña procesos de pasteurización utilizando un enfoque empírico, dependiendo de las características del proceso, de la planta, del ingeniero o del producto, así como experiencias previas con el alimento, entre otras (SILVA & GIBBS, 2004).

4.4 METODOLOGÍA PARA LA INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA

4.4.1 Obtención del extracto enzimático. Diversas investigaciones han trabajado en la obtención del extracto enzimático, acorde con métodos para cada especie. Los productos se deben adecuar por medio de cortes en pequeñas piezas para ser mezclado con agua o buffer fosfato, formando una solución que luego es filtrada y centrifugada a 4°C , las muestras son almacenadas en congelación hasta su uso; los ensayos realizados en diferentes tejidos vegetales se muestran a continuación:

Cuadro 2. Obtención de extractos enzimáticos en diversos productos

PRODUCTO	PROPORCION		CENTRIFUGACION		REFERENCIA
	Tejido (gr)	Buffer (mL)	Velocidad	Tiempo	
Zanahoria	2	1	12000 rpm	15 min	(SOYSAL & SOYLEMEZ, 2005)
Calabaza	1	3	1000 g	15 min	(AGUERO, ANSORENA, ROURA, & DEL VALLE, 2008)
PRODUCTO	PROPORCION		CENTRIFUGACION		REFERENCIA
	Tejido (gr)	Buffer (mL)	Velocidad	Tiempo	
Sandia	1	4	15000 rpm	15 min	(AVALLONE, CRAUZOV, MONTENEGRO, & PELLIZZARI, 2000)
Arazá	1	3	12000 rpm	15 min	(NARVAEZ, 2008)
Hojas de Menta	1	3	18000 rpm	0.5 min	(RUDRA, SHIVHARE, & BASU, 2008)
Tomillo	1	10	20000 g	30 min	(DOGAN & DOGAN, 2004)
Uchuva - Lulo	1	1	4000 g	60 min	(MUÑOZ, BRAVO, ZAPATA, & LONDOÑO, 2007)
Aguacate	1	2	12000 rpm	20 min	(LUIZ, MEDEIROS, & CLEMENTE, 2007)
Lechuga	1	8	32000 g	20 min	(GAWLIK-DZIKI, ZLOTEK, & SWIECA, 2008)
Brócoli	1	8	32000 g	20 min	(GAWLIK-DZIKI, ZLOTEK, & SWIECA, 2008)
Uvas	2	1	4000 g	15 min	(RAPEANU, VAN, SMOUT, & HENDRICKX, 2006)

Fuente. Esta investigación

4.4.2 Inactivación térmica de POD y PPO. Los tratamientos térmicos para inactivar la POD y la PPO son variados y dependen de la matriz alimenticia a la que se apliquen. También es importante la termoresistencia de sus componentes.

En el cuadro 3 muestra las temperaturas y tiempos empleados en distintos productos:

Cuadro 3. Inactivación térmica en diversos productos

PRODUCTO	TEMPERATURAS	TIEMPO	REFERENCIA
Zanahoria	35-75 °C	1-180 min	(SOYSAL & SOYLEMEZ, 2005)
Calabaza	60-90 °C	0.083- 60 min	(AGUERO, ANSORENA, ROURA, & DEL VALLE, 2008)
Arazá	80-92 °C	0- 5 min	(NARVAEZ, 2008)
Hojas de Menta	70-100 °C	5 seg - 9 min	(RUDRA, SHIVHARE, & BASU, 2008)
Tomillo	45 - 85 °C	4 - 60 min	(DOGAN & DOGAN, 2004)
PRODUCTO	TEMPERATURAS	TIEMPO	REFERENCIA
Aguacate	60 - 80 °C	1 - 10 min	(LUIZ, MEDEIROS, & CLEMENTE, 2007)
Lechuga	25 - 70 °C	10 - 60 min	(GAWLIK-DZIKI, ZLOTEK, & SWIECA, 2008)
Uvas	25 - 90 °C	10 min	(RAPEANU, VAN, SMOUT, & HENDRICKX, 2006)

Fuente. Esta investigación

4.4.3 Medición de la actividad enzimática:

4.4.3.1 Peroxidasa. En diferentes estudios se reporta al guayacol como el sustrato más utilizado en la determinación de la actividad enzimática. La actividad de POD en calabaza es determinada en un espectrofotómetro a 470 nm por 2 min, la celda contiene 0.1 mL de extracto + 2.9mL de solución sustrato (10 mL Buffer Fosfato de Sodio 0.05M (pH6.5) + 10 mL de guayacol al 1% + 1 mL de H₂O₂ al 0.3%) (AGUERO, ANSORENA, ROURA, & DEL VALLE, 2008).

Para determinar la actividad enzimática en sandía, en un erlenmeyer de 50 mL se adiciona 20 mL de tampón fosfato 0,2M, pH 6,0 y 2 mL de extracto enzimático, luego se deja en Baño-María a 25°C hasta estabilizar la temperatura. Posteriormente se adiciona 1 mL de guayacol al 0,5% y 1 mL de H₂O₂ al 0,08%, se homogeniza rápidamente y se realiza 10 lecturas, una por minuto, en espectrofotómetro a 470 nm utilizando como blanco la mezcla reactiva sin peróxido de hidrógeno (AVALLONE, CRAUZOV, MONTENEGRO, & PELLIZZARI, 2000).

El producto de reacción se mide por espectrofotometría a 470 nm cada 5 s durante 2 min para POD de arazá, la reacción se inicia por adición de 250 μ L del extracto enzimático crudo, incubado previamente durante 2 min a 25 °C, en 250 μ L de una solución preparada con guayacol 0.08M y H₂O₂ 0.04 M en buffer citratos 0.2M pH 5,5 (NARVAEZ, 2008).

La actividad de peroxidasa en hojas de menta se mide por absorbancia a 470 nm por 20 min, se utiliza una solución de sustrato que contiene 0.1 mL de guayacol, 0.1 mL de H₂O₂ al 30% y buffer fosfato de potasio 0.1M pH 6.5. Para las lecturas se toma 3.48 mL de la solución de sustrato y se adiciona 0.12 mL de enzima (RUDRA, SHIVHARE, & BASU, 2008).

4.4.3.2 Polifenol oxidasa. En la mayoría de los estudios realizados para la determinación de actividad enzimática de polifenol oxidasa utilizan catecol como sustrato.

Para la determinación de la actividad de PPO en tomillo se mide el incremento de absorbancia a 420 nm con catecol y 320 nm para 4-metylcatecol. La muestra contiene 0,1 mL de la enzima; 2,3 mL de solución fosfato buffer (0.1M) y 0.6 mL de solución sustrato (0.1M). Como blanco se utiliza 0.6 mL de sustrato y 2.4 mL de solución fosfato buffer. La muestra debe estar a 25 °C (DOGAN & DOGAN, 2004).

En sandia se adicionan 3 mL de catecol (0.1 M) y 96 mL de tampón fosfato (0.2M), pH 6 (sustrato), a 30 °C. Al sustrato se le adiciona 1 mL de extracto enzimático. Las lecturas se realizan cada minuto (10 lecturas) a 425 nm, usando agua destilada como blanco (AVALLONE, CRAUZOV, MONTENEGRO, & PELLIZZARI, 2000).

Para brócoli se realiza a 420 nm en un tiempo de 2 min. La muestra contiene 2.95 mL de solución de sustrato (10 mM catecol ó 4-metilcatecol) en 50 mM de fosfato buffer pH 6.8 y 0.05 mL de solución enzimática. La muestra del blanco contiene 2.95 mL de solución sustrato y 0.05 mL de fosfato buffer (GAWLIK-DZIKI, ZLOTEK, & SWIECA, 2008).

La determinación de actividad enzimática en uvas se realiza a 400 nm a 25 °C durante 30 min. La muestra contiene 1mL de sustrato (catecol 10 mM en Mcllvaine buffer pH 5 en el caso de jugo) y 100 μ l de extracto enzimático ó jugo de uva. El blanco contiene solución sustrato en Mcllvaine buffer, pH 5 (RAPEANU, VAN, SMOUT, & HENDRICKX, 2006).

4.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL JUGO

Una de las enfermedades más limitantes en los cultivos de papa (*Solanum tuberosum*) es la gota o tizón tardío, causada por el oomycete *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. El manejo de esta enfermedad se ha basado principalmente en la utilización de fungicidas de acción protectante y/o sistémica (ERWIN & RIBEIRO, 1996).

Una de las metodologías utilizadas para determinar la eficiencia de los fungicidas, es la sensibilidad *in-vitro* la cual consiste en enmendar un medio de cultivo con el bioinsumo, luego se inocula el patógeno para posteriormente evaluar su crecimiento.

Gamboa (2003), obtuvo extractos de *Flourensia cernua*, *Origanum majorana* y *Bouvardia ternifolia*, para evaluar su efecto en el crecimiento micelial de *Phytophthora infestans*, los cuales disolvió en un medio de cultivo PDA e inoculó con el patógeno e incubó a 25 °C por 96 h. Reportó porcentajes de inhibición significativos de *P. infestans* al utilizar extracto de *O. majorana* con dosis desde 8000 ppm (GAMBOA, HERNÁNDEZ, GUERRERO, SÁNCHEZ, & LIRA, 2003).

Castellanos (2009), presentó resultados de la evaluación del efecto inhibitor de diferentes extractos fermentados de Chipaca (*Bidens pilosa*) frente al crecimiento de *P. infestans* en placas de medio de cultivo. Evaluó cuatro extractos compuestos por hojas y tallos, raíces, flores y finalmente la mezcla total del tejido vegetal de *B. pilosa*, empleó la técnica del cilindro o anillos de vidrio en donde fueron agregados 50 µL de diferentes concentraciones de los extractos en pequeños pozos sobre placas de agar PDA, arveja (*Pisum sativum*) y centeno (*Secale cereale*) previamente inoculados en superficie con el fitopatógeno. Siete días post-infección, se evaluó el efecto antagónico, encontrándose que los extractos de flores y raíces presentaron la formación de halos de amensalismo, competencia por espacio e inhibición en las placas de medio contra el hongo (CASTELLANOS, ENRIQUEZ, DIAZ, & LEÓN, 2009).

Álvarez (2010), evaluó la respuesta de sensibilidad de *P. infestans* al bioinsumo de fique (*Furcraea gigantea Vent*) comparándolo con productos comerciales. Enmendó diferentes concentraciones (10, 100, 1000, 10000, 100000 µg mL⁻¹) del bioinsumo a un medio de cultivo agar tomate, reportó porcentajes de crecimiento mínimos a altas concentraciones de extracto de fique (ALVAREZ, DELGADO, SALAZAR, & HURTADO, 2010).

5. DISEÑO METODOLÓGICO

En la investigación fue indispensable primero establecer unos protocolos de extracción y determinación enzimática, basados en literatura y adecuados a las condiciones de la muestra; jugo de fique, los cuales ya se encuentran definidos y se utilizan para llevar a cabo el cumplimiento de los objetivos.

5.1 PROCEDENCIA Y OBTENCIÓN DE JUGO DE FIQUE

Se realizó en un equipo diseñado para tal fin (Figura 4), el jugo se extrajo directamente de las pencas de fique de variedad Negra Común procedentes del municipio de El Tambo en la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Nariño, las muestras de jugo que no fueron analizadas después de la obtención se almacenaron en congelación (-10°C) con el propósito de evitar la degradación del mismo.

Figura 4. Equipo de extracción de jugo



Fuente: esta investigación

5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para este trabajo se elaboró un diseño experimental utilizando la metodología factorial multinivel, además fue necesario el uso de una comparación de múltiples muestras. Se fijaron dos factores: temperatura y tiempo de tratamiento en 5

niveles cada uno (cuadro 4); se realizó un modelamiento matemático que represente la región experimental del tipo:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_1x_2 + b_4 x_1^2 + b_5x_2^2$$

Donde y = variable de respuesta, b = Constantes, x = Variables independientes
El diseño experimental propuesto, estuvo formado por 25 experimentos.

Cuadro 4. Matriz del diseño experimental

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)				
70	2	3	4	5	6
75	2	3	4	5	6
80	2	3	4	5	6
85	2	3	4	5	6
90	2	3	4	5	6

Fuente: esta investigación

Las variables de respuesta o dependientes fueron la actividad residual de cada enzima y el porcentaje de crecimiento de *Phytophthora infestans*. El análisis estadístico de los datos fue realizado con ayuda del programa estadístico STATGRAPHICS Plus 5.0 (Statistical Graphics Corp.1994–2000).

Este diseño permite encontrar tanto el error experimental, la falta de ajuste, las interacciones entre los factores, la curvatura de la superficie de respuesta, los coeficientes del modelo que describan el comportamiento del sistema dentro del intervalo experimental estudiado y los valores físicos que pueden optimizar las variables de respuesta (ZALAZAR & PULIDO, 2004).

5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de resultados se realizó utilizando la técnica de analisis de varianza con lo que determino la significancia estadistica de los factores sobre las variables de respuesta, por medio de:

- ✓ Tabla ANOVA
- ✓ Óptima Respuesta
- ✓ Diagrama Efectos Principales

- ✓ Modelo Matemático
- ✓ Diagrama de Pareto
- ✓ Superficie de Respuesta
- ✓ Gráfica de Medias
- ✓ Prueba de Múltiples Rangos

5.4 TRATAMIENTOS TÉRMICOS

Los experimentos se realizaron según la matriz del diseño, cada muestra se colocó en tubos de ensayo, sumergidos en un baño Termostático (Figura 5), con agitación y una precisión de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ durante el tiempo establecido. Posteriormente se introdujo en un baño de agua con hielo con el fin de realizar el choque térmico. Las muestras se almacenaron en congelación hasta su uso (SOYSAL & SOYLEMEZ, 2005).

Figura 5. Baño Termostático Modelo YCW 010



Fuente: esta investigación

Se utilizó temperaturas inferiores al punto de ebullición del jugo (92°C) (previamente comprobado) y tiempos determinados en base a estudios revisados; como en zanahoria (SOYSAL & SOYLEMEZ, 2005), calabaza (AGUERO, ANSORENA, ROURA, & DEL VALLE, 2008), hojas de menta (RUDRA, SHIVHARE, & BASU, 2008) y aguacate (LUIZ, MEDEIROS, & CLEMENTE, 2007),

ya que las enzimas difieren entre sí dependiendo de la especie, lugar de origen, condiciones climáticas y su estructura (isoenzimas), entre otras (BADUI, 1999).

5.5 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA

Se realizó de la siguiente manera para cada una de las enzimas:

Peroxidasa (POD): Se preparó la muestra con jugo de fique y buffer en una proporción 1:1, se utilizó buffer fosfato 0.05M pH 6.5 con Tritón X-100 al 1.5%; luego se centrifugó a 5000 rpm por 15 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante el cual se utiliza como extracto enzimático (GONZALES, ANCOS, & CANO, 2000).

Figura 6. Centrifuga Thermo IEC Multi RF 8466



Fuente: esta investigación

Polifenol Oxidasa (PPO): Se llevó a cabo en dos etapas, una clarificación del jugo donde se centrifugó a 5000 rpm por 15 min a 4°C; se recogió el precipitado el cual se reconstituye en buffer fosfato 0.05M pH 6.5 con PVPP al 2% y Tritón X-100 al 1.5% en una proporción 1:4; luego se centrifugó a 8000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante es el extracto enzimático (GONZALES, ANCOS, & CANO, 2000).

5.6 PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se planteó la siguiente metodología para determinar la actividad de las enzimas POD y PPO de forma cuantitativa antes y después del tratamiento térmico en el jugo de fique. Se colocó en reacción el extracto enzimático con la solución sustrato

la cual se compone como se muestra en la cuadro 5 para cada una de las enzimas.

Cuadro 5. Reactivos, cantidades y concentraciones para la determinación enzimática

	CANTIDAD		CONCENTRACIÓN
	POD	PPO	
Buffer Fosfato pH 6.5	99.8 mL	1.8 mL	0.2 M
Guayacol	0.1 mL		98 %
Pirocatecol		1 mL	0.175 M
Peróxido de Hidrógeno	0.1 mL		30 %
pfenilendiamina		0.1 mL	1 % (p/v)
Solución sustrato	3.48 mL	2.9 mL	
Extracto Enzimático	0.12 mL	0.1mL	

Fuente: esta investigación

Para la determinación de la actividad de la enzima POD se utilizó como sustrato guayacol; como en coliflor (LEE, PENNESI, & DICKSON, 1984), menta (RUDRA, SHIVHARE, & BASU, 2008) y rábano picante (ZHONG, y otros, 2007), peróxido de hidrogeno y el extracto enzimático.

Para PPO se determinó con catecol como sustrato, al igual que en banana (ÜMIT, 2007), tomillo (DOGAN & DOGAN, 2004), pera y manzana (GASULL & BECERRA, 2006), pfenilendiamina y extracto enzimático.

Tanto para POD y PPO se empleó buffer fosfato pH 6.5 como se reportó en puré de fresa (OSORIO, 2008), marula (MDLULI, 2005) y mora (GONZALES, ANCOS, & CANO, 2000).

La muestra se evaluó por espectrofotometría (Figura 7) durante 10 min cada 0.5 min, a longitudes de onda de 420 nm para PPO y 470 nm para POD; para ambas enzimas se utilizó como blanco el buffer de reacción (sin extracto enzimático).

La actividad enzimática se determinó como el cambio de absorbancia por min (Abs/min) bajo las condiciones de ensayo a 25°C. La pendiente se calculó con la parte lineal de la curva (RUDRA, SHIVHARE, & BASU, 2008).

La actividad residual (AR) se determinó con la Ecuación 1 (MATSUI, GRANADO, DE OLIVEIRA, & TADINI, 2007).

$$AR = A/A_0 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde: A = actividad enzimática después del tratamiento térmico (Abs/min) y A_0 = actividad enzimática antes del tratamiento térmico (Abs/min).

Figura 7. Espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS



Fuente: esta investigación

5.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Se cuantificó siguiendo la metodología propuesta por Riveros (2003), que consiste en evaluar el crecimiento radial de las colonias de *Phytophthora infestans* luego de 8 días después de la inoculación. Para esto, discos de micelio de 1.1 cm de diámetro del patógeno, se establecieron en cajas de Petri (Figura 8) con medio agar tomate, enmendado con jugo de fique a 75000 ppm (ALVAREZ, DELGADO, SALAZAR, & HURTADO, 2010) tratado térmicamente. El testigo absoluto (sin enmendar) se utilizó como comparador.

Figura 8. Cámara de siembra



Fuente: esta investigación

Para calcular el porcentaje de crecimiento (PC) se utiliza la Ecuación 2 (RIVEROS, 2003).

$$PC = ((DMCM - 1.1) / DMCA) * 100 \text{ (Ecuación 2)}$$

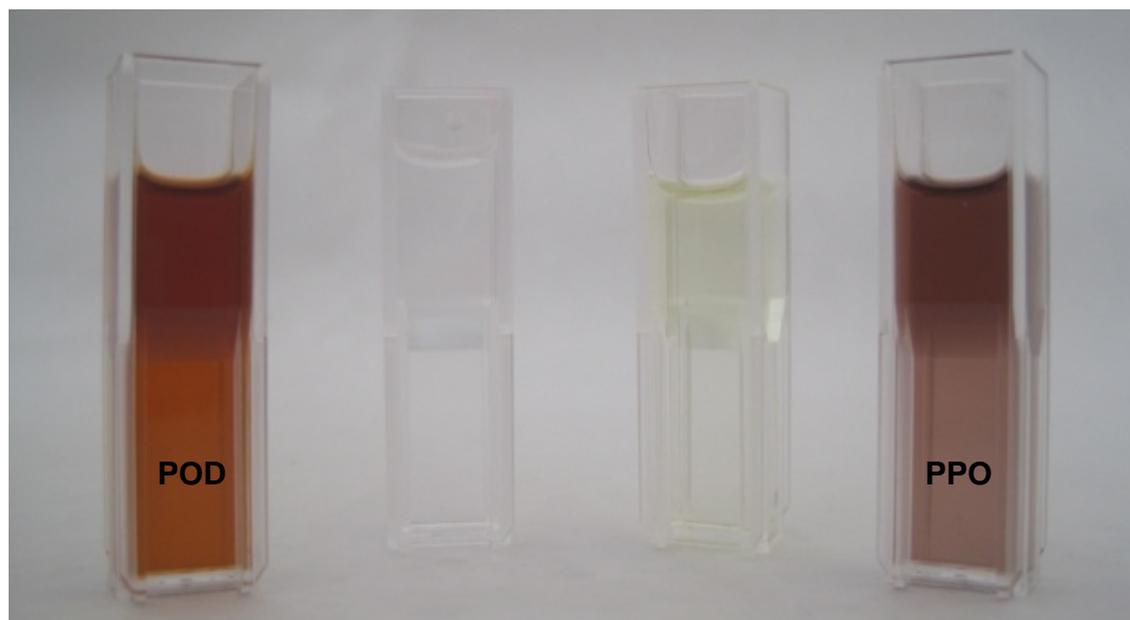
Donde: DMCM = diámetro medio de colonia creciente en el tratamiento (cm), 1.1 = diámetro del micelio (cm) y DMCA = diámetro medio de colonia sin enmendar (cm).

Se evaluó el porcentaje de crecimiento según la escala propuesta por Riveros (2003), sensibles (S) < 10% del crecimiento del testigo, intermedio (I) entre 10 y 60% del crecimiento del testigo y resistente mayor del 60% (RIVEROS, 2003).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 9 se observa la reacción de las enzimas; a la izquierda la peroxidasa, seguida del blanco y del inicio de la reacción para ambas enzimas; a la derecha la polifenol oxidasa.

Figura 9. Reacción enzimática de POD y PPO

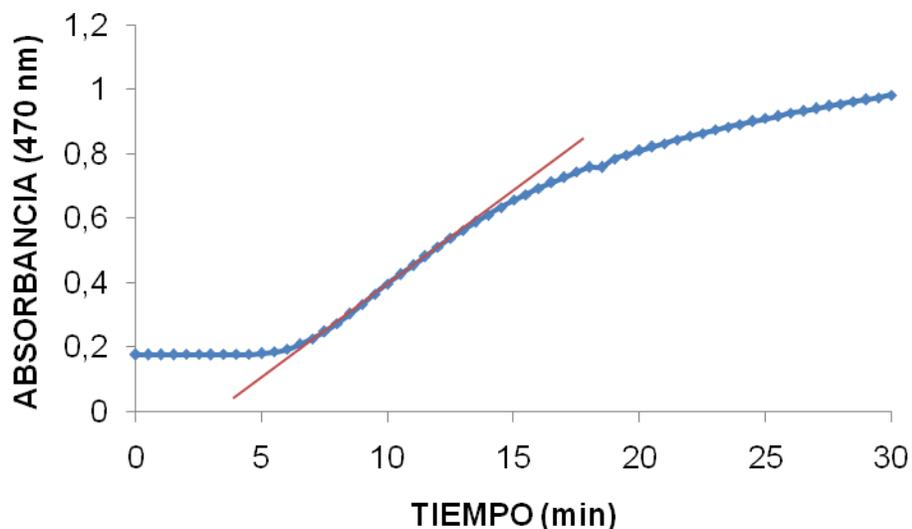


Fuente: esta investigación

6.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

6.1.1 Peroxidasa. La figura 10 muestra el incremento en la absorbancia de la muestra con el tiempo. Los puntos experimentales se ajustan perfectamente a una recta con una pendiente de 0.0585 Abs/min. Siendo la actividad inicial A_0 , y a su vez es indispensable para la determinación de la actividad residual de cada tratamiento.

Figura 10. Actividad enzimática inicial de POD



Fuente: esta investigación

A continuación se muestran los datos promedio de tres determinaciones de actividad residual para la enzima POD (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados del diseño experimental POD

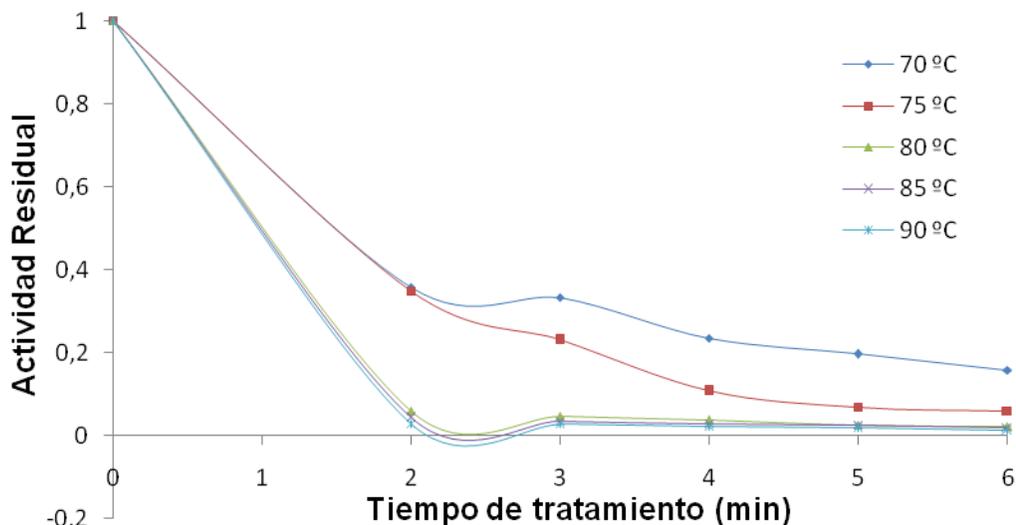
Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Actividad Residual
2	70	0,355 35,50%
2	75	0,349 34,90%
2	80	0,058 5,80%
2	85	0,042 4,20%
2	90	0,029 2,90%
3	70	0,332 33,20%
3	75	0,23 23,00%
3	80	0,045 4,50%
3	85	0,033 3,30%
3	90	0,028 2,80%
4	70	0,234 23,40%
4	75	0,106 10,60%
4	80	0,036 3,60%

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Actividad Residual	
4	85	0,028	2,80%
4	90	0,021	2,10%
5	70	0,196	19,60%
5	75	0,067	6,70%
5	80	0,025	2,50%
5	85	0,024	2,40%
5	90	0,017	1,70%
6	70	0,157	15,70%
6	75	0,059	5,90%
6	80	0,023	2,30%
6	85	0,019	1,90%
6	90	0,013	1,30%

Fuente: esta investigación

La Figura 11 es la representación gráfica de la actividad residual Vs tiempo de tratamiento para cada temperatura. La enzima POD de jugo de fique muestra una reducción considerable con la aplicación de tratamientos térmicos aproximadamente desde un 65 % hasta un 98 % de su actividad inicial, utilizando temperaturas en un rango de 70°C a 90°C y tiempos de 2 a 6 min.

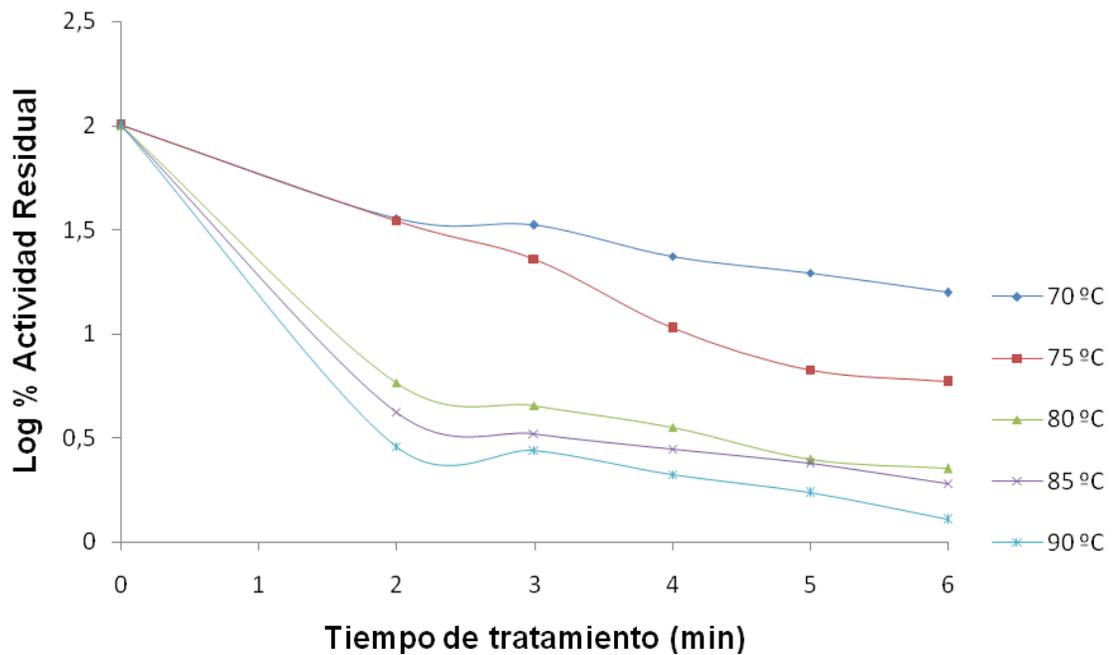
Figura 11. Actividad residual de POD



Fuente: esta investigación

En la Figura 12 se observa con mayor claridad la reducción de la actividad enzimática.

Figura 12. Log % actividad residual de POD



Fuente: esta investigación

Infortunadamente no existen reportes sobre actividad enzimática en jugo de fique, por tal razón se hace una comparación con los resultados de inactivación enzimática de algunos extractos vegetales, tal como se muestra en la cuadro 6.

Cuadro 6. Comparación de resultados para actividad residual POD

Producto	Tratamiento Térmico		Actividad Residual (%)	Fuente
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)		
Brócoli	95	10	1	(MORALES-BLANCAS, CHANDIA, & CISNEROS-ZEVALLOS, 2002)
Espárragos			15	
Zanahoria			10	
Producto	Tratamiento Térmico		Actividad Residual (%)	Fuente
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)		
Papa	84	2	10	(ANTHON & BARRETT, 2002)
Coliflor	50	3	50	(LEE, PENNESI, & DICKSON, 1984)
Hojas de menta	75	2	20	(RUDRA, SHIVHARE, & BASU, 2008)
Calabaza	70	10	10	(AGUERO, ANSORENA, ROURA, & DEL VALLE, 2008)
Fresa	90	2	10	(OSORIO, 2008)
Ají	80	10	3.3	(SCHWEIGGERT, SCHIEBER, & CARLE, 2005)
Paprika			3.5	
Jugo de fique	75	4	10.6	Esta investigación

Fuente: esta investigación

En general la reducción de la actividad enzimática depende del incremento de la temperatura y el tiempo de tratamiento, observándose un comportamiento descendiente en las curvas de actividad residual.

6.1.1.1 Análisis de varianza para actividad residual POD:

Tabla 2. ANOVA para actividad residual POD

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón - F	Valor - P
A:Temperatura	0.179592	1	0.179592	131.13	0.0000
B:Tiempo	0.0428952	1	0.0428952	31.32	0.0000
AA	0.0293601	1	0.0293601	21.44	0.0002
AB	0.0278189	1	0.0278189	20.31	0.0002
BB	0.00185658	1	0.00185658	1.36	0.2587
Error total	0.0260225	19	0.00136961		
Total (corr.)	0.307546	24			

R-Cuadrada = 91.54%

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 89.31%

Error estándar del est. = 0.0370082

Error absoluto medio = 0.0220518

Estadístico Durbin-Watson = 2.84585 (P = 0.0021)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.471585

Fuente: esta investigación

En el análisis de varianza (Tabla 2) se observa que todos los efectos a excepción de la interacción tiempo-tiempo son significativos sobre la actividad residual de POD, con un P-Valor menor a 0.05.

Por su parte el coeficiente R-Cuadrado evidencia un ajuste del 91.54% el cual explica la variabilidad en la actividad residual de las muestras, con lo cual se puede deducir que el diseño cuenta con un buen ajuste, permitiendo hacer un análisis confiable sobre las variables implicadas.

El test de Durbin-Watson, indica que el valor de p es menor de 0.05 ($p= 0.0021$) lo que muestra que hay autocorrelación en el residual de los datos, garantizando una buena aleatorización de los experimentos.

Tabla 3. Óptima respuesta para actividad residual POD

Optimizar Respuesta

Meta: minimizar Actividad Residual

Valor óptimo = 0.002476

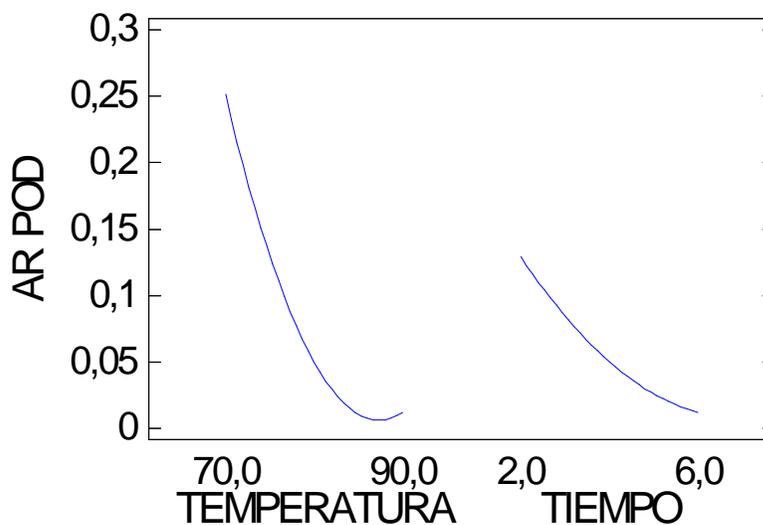
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	70	90	84.5
Tiempo	2	6	5.4

Fuente: esta investigación

La Tabla 3 indica la mejor combinación de tiempo-temperatura donde se encuentra la mayor reducción de actividad enzimática, con un valor óptimo de 0.0025 en 84.5 °C por 5.4 min.

El diagrama de efectos principales (Figura 13) muestra un marcado efecto de la variable temperatura, se observa claramente el efecto negativo a medida que se incrementa la temperatura y el tiempo sobre la actividad residual.

Figura 13. Efectos principales para actividad residual POD



Fuente: esta investigación

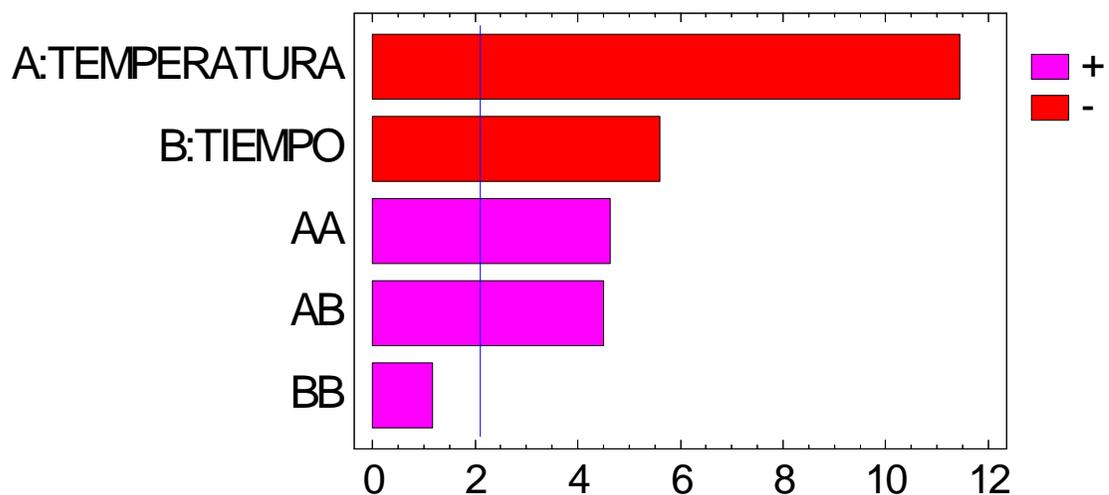
El modelo matemático que describe la actividad residual de POD se muestra en la Ecuación 3. Esta ecuación es la que modela de forma adecuada la actividad residual de POD según los resultados obtenidos tras cada experimento y permite predecir los valores de AR POD en el rango de temperaturas trabajado para posteriores experimentos bajo las mismas condiciones.

$$\text{AR POD} = 7,51853 - 0,156402 \cdot \text{Temperatura} - 0,337354 \cdot \text{Tiempo} + 0,0008192 \cdot \text{Temperatura}^2 + 0,003358 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Tiempo} + 0,00515 \cdot \text{Tiempo}^2$$

(Ecuación 3)

El diagrama de Pareto (Figura 14) muestra claramente el efecto significativo de la temperatura y el tiempo de manera negativa sobre la actividad residual de POD, además del efecto significativo pero positivo de las interacciones temperatura-temperatura y temperatura-tiempo.

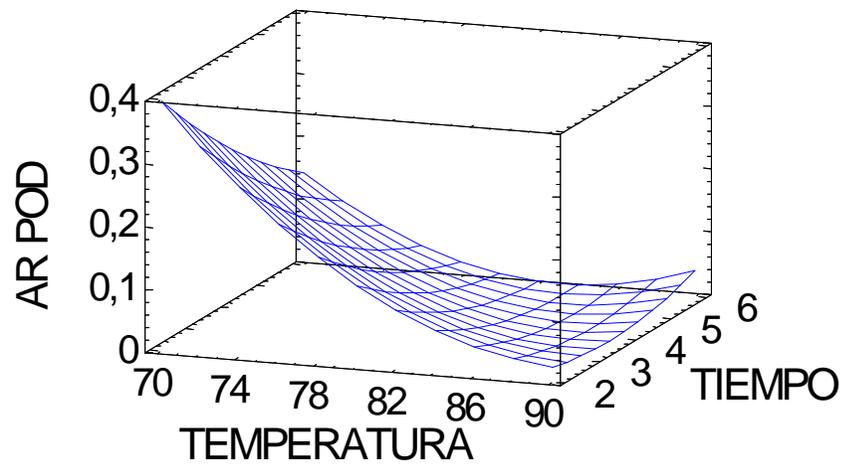
Figura 14. Gráfico de Pareto para actividad residual POD



Fuente: esta investigación

La superficie de respuesta (Figura 15) muestra la combinación óptima de las variables independientes para minimizar la actividad residual de POD que se encuentra dentro de los niveles mínimos y máximos de cada factor.

Figura 15. Superficie de Respuesta para actividad residual POD

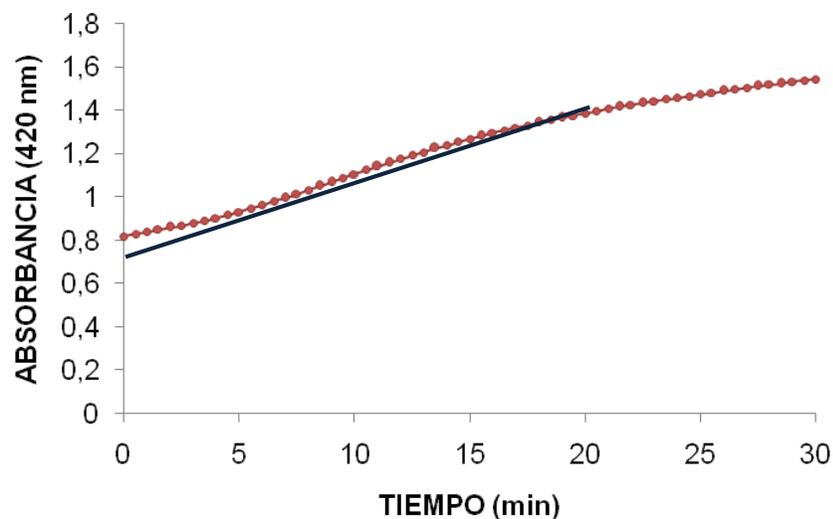


Fuente: esta investigación

Con el análisis realizado se observa que la mayor reducción de la actividad enzimática se presentó en 84.5°C por 5.4 min.

6.1.2 Polifenol oxidasa. A continuación se muestra el comportamiento de la enzima PPO en el tiempo (Figura 16). Los puntos experimentales se ajustan perfectamente a una recta con una pendiente de 0.0347 Abs/min. Siendo la actividad inicial A_0 .

Figura 16. Actividad enzimática inicial de PPO



Fuente: esta investigación

El promedio de tres determinaciones de actividad residual para la enzima POD se presentan en la Tabla 4.

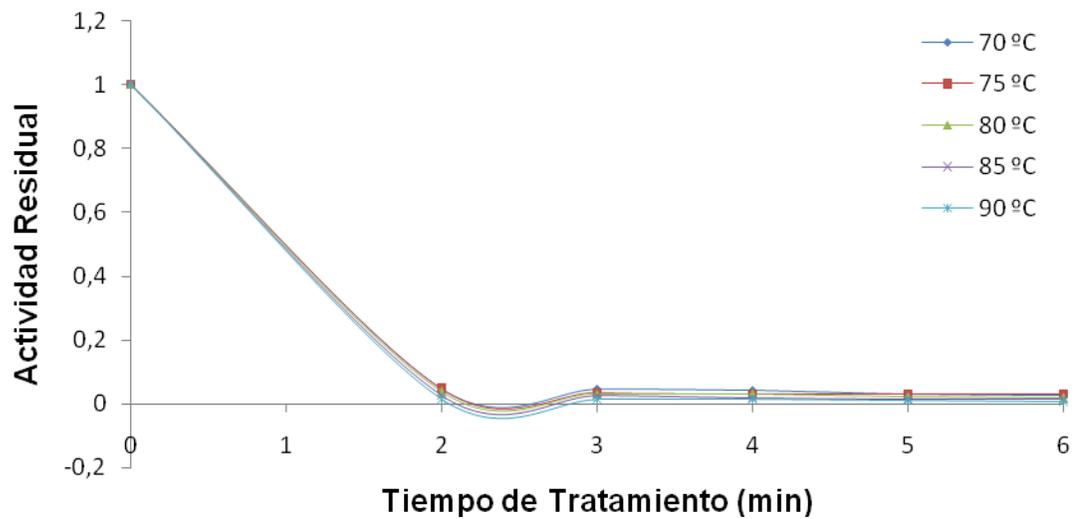
Tabla 4. Resultados del diseño experimental PPO

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Actividad Residual	
2	70	0,047	4,70%
2	75	0,045	4,50%
2	80	0,036	3,60%
2	85	0,026	2,60%
2	90	0,015	1,50%
3	70	0,046	4,60%
3	75	0,034	3,40%
3	80	0,031	3,10%
Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Actividad Residual	
3	85	0,026	2,60%
3	90	0,014	1,40%
4	70	0,042	4,20%
4	75	0,032	3,20%
4	80	0,029	2,90%
4	85	0,02	2,00%
4	90	0,014	1,40%
5	70	0,03	3,00%
5	75	0,031	3,10%
5	80	0,023	2,30%
5	85	0,014	1,40%
5	90	0,011	1,10%
6	70	0,026	2,60%
6	75	0,03	3,00%
6	80	0,016	1,60%
6	85	0,014	1,40%
6	90	0,007	0,70%

Fuente: esta investigación

La Figura 17 es la representación gráfica de la actividad residual Vs el tiempo de tratamiento para cada temperatura.

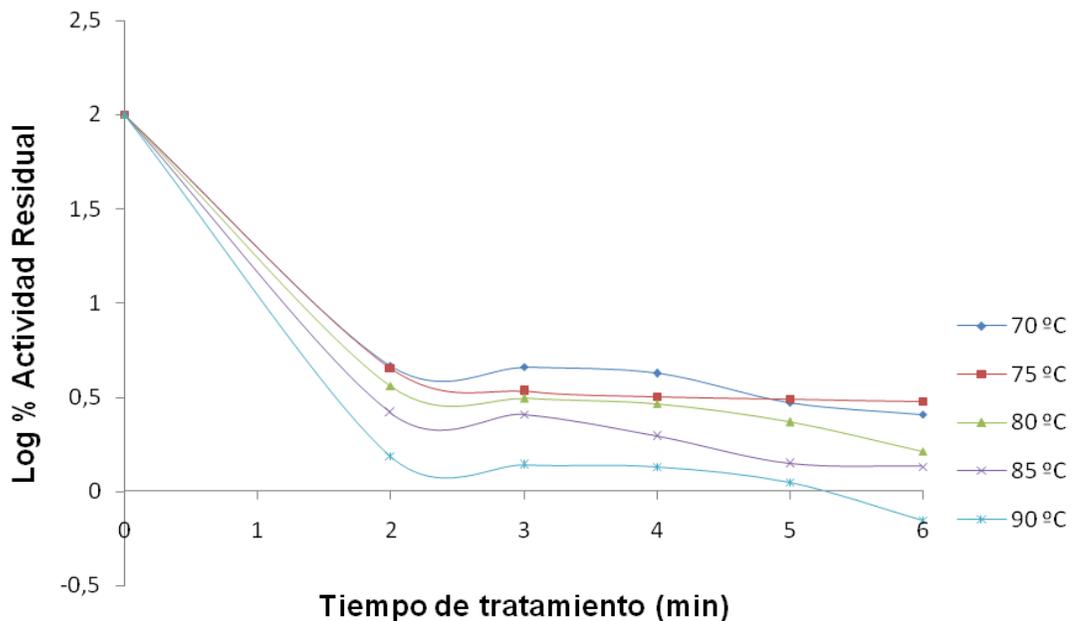
Figura 17. Actividad residual de PPO



Fuente: esta investigación

En PPO la actividad enzimática de los tratamientos disminuyó significativamente en un 90% aproximadamente de la actividad inicial, esto se aprecia con mayor claridad en escala logarítmica (Figura 18).

Figura 18. Log % actividad residual de PPO



Fuente: esta investigación

Debido a que no existen reportes sobre actividad de PPO en jugo de fique, se comparó con resultados de inactivación enzimática en algunos extractos vegetales (cuadro 7).

Cuadro 7. Comparación de resultados para actividad residual PPO

Producto	Tratamiento Térmico		Actividad Residual (%)	Fuente
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)		
Cereza	75	30	10	(ANIL, KISHOR, & MURUGAN, 2008)
Pera	70	10	1	(GASULL & BECERRA, 2006)
Manzana	70	30	3	
Banana	75	5	20	(ÜMIT, 2007)
Producto	Tratamiento Térmico		Actividad Residual (%)	Fuente
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)		
Piña	90	5	1.2	(CHUTINTRASRI & NOOMHORM, 2006)
Lechuga	70	5	50	(GAWLIK-DZIKI, ZLOTEK, & SWIECA, 2008)
Tomillo	65	34.3	50	(DOGAN & DOGAN, 2004)
Uvas	65	15	10	(RAPEANU, VAN, SMOUT, & HENDRICKX, 2006)
Paprika	80	10	0	(SCHWEIGGERT, SCHIEBER, & CARLE, 2005)
Ají				
Jugo de fique	75	4	3.2	Esta investigación

Fuente: esta investigación

La reducción de la actividad enzimática en PPO varía con el incremento de la temperatura y el tiempo de tratamiento, observándose un comportamiento descendiente en las curvas de actividad residual.

6.1.2.1 Análisis de varianza para actividad residual PPO. El análisis de varianza (Tabla 5) indica los parámetros más influyentes en el proceso con un intervalo de confianza del 95%. Todos aquellos factores o interacciones entre los mismos que obtengan un valor $P < 0.05$ serán considerados como los más relevantes en el proceso para obtener la mínima actividad residual.

El modelo presenta un excelente ajuste, se obtiene una alta correlación (valor de R^2) de 95.55% se minimizan las posibles causas de error a un 4.45% restante.

El test de Durbin-Watson, indica que el valor de p es menor de 0.05 ($p = 0.0004$) lo que muestra que hay autocorrelación en el residual de los datos, garantizando una buena aleatorización de los experimentos.

Tabla 5. ANOVA para actividad residual PPO

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón - F	Valor - P
A:Temperatura	0.0021912	1	0.002191	295.27	0.0000
B:Tiempo	0.000761	1	0.0007605	102.48	0.0000
AA	0.00002592	1	0.00002592	3.49	0.0771
AB	0.00005285	1	0.00005285	7.12	0.0152
BB	$7.41 \cdot 10^{-7}$	1	$7.41 \cdot 10^{-7}$	0.10	0.7555
Error total	0.000141	19	0.00000742		
Total (corr.)	0.0031722	24			

R-Cuadrada = 95.55%

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 94.38%

Error estándar del est. = 0.00272416

Error absoluto medio = 0.00192299

Estadístico Durbin-Watson = 3.01099 ($P = 0.0004$)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.524778

Fuente: esta investigación

Tabla 6. Óptima Respuesta para actividad residual PPO

Optimizar Respuesta

Meta: minimizar Actividad Residual

Valor óptimo = 0.006737

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	70	90	90
Tiempo	2	6	6

Fuente: esta investigación

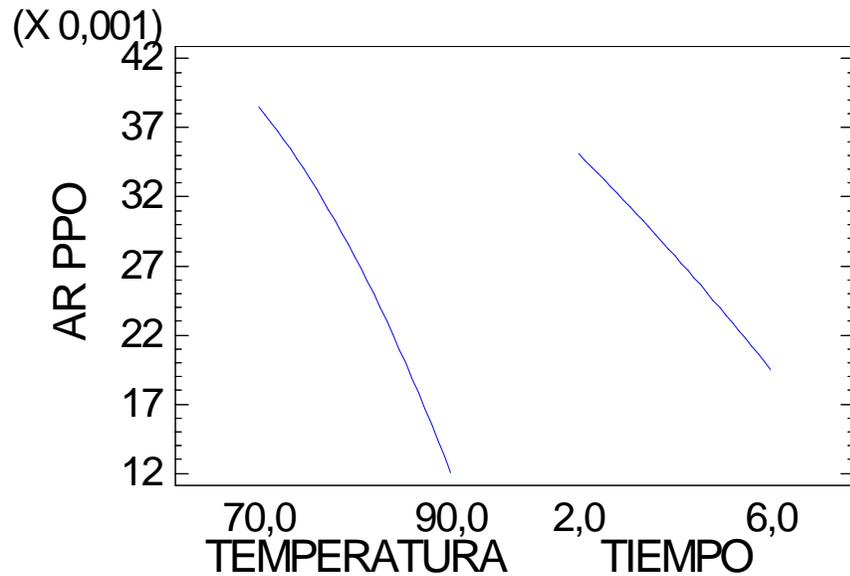
Mediante el modelo se puede optimizar la variable de respuesta, para este caso, minimizar la actividad residual de PPO. La Tabla 6 indica la mejor combinación de tiempo-temperatura con un valor óptimo de 0.0067 a 90 °C por 6 min.

El modelo matemático que describe la actividad residual de PPO se muestra en la ecuación 4. Esta ecuación es la que modela de forma adecuada la actividad residual PPO según los resultados obtenidos tras cada experimento, y es la que sirve para posteriores experimentos bajo las mismas condiciones de trabajo.

$$\text{AR PPO} = 0,0383229 + 0,00198926*\text{Temperatura} - 0,0147091*\text{Tiempo} - 0,0000243429*\text{Temperatura}^2 + 0,0001454*\text{Temperatura}*\text{Tiempo} - 0,000102857*\text{Tiempo}^2 \quad \text{(Ecuación 4)}$$

El efecto particular de cada uno de los efectos sobre la variable de respuesta puede observarse con mayor claridad en la Figura 19. Las representaciones de los efectos de la temperatura y el tiempo presentan pendientes que explican la gran significancia de estos para los tratamientos.

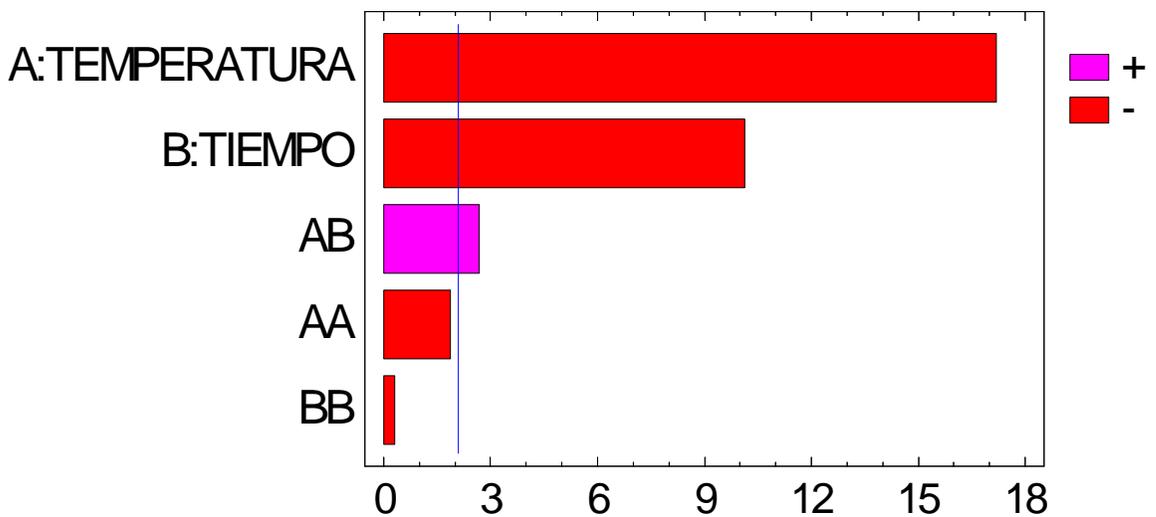
Figura 19. Efectos principales para actividad residual PPO



Fuente: esta investigación

El diagrama de Pareto mostrado en la Figura 20 es una representación gráfica del análisis de varianza donde igualmente se observan los factores más influyentes, en su respectivo orden, sobre la inactivación térmica. Los efectos de color rojo son inversamente proporcionales a la variable de respuesta, mientras que los de color morado son directamente proporcionales.

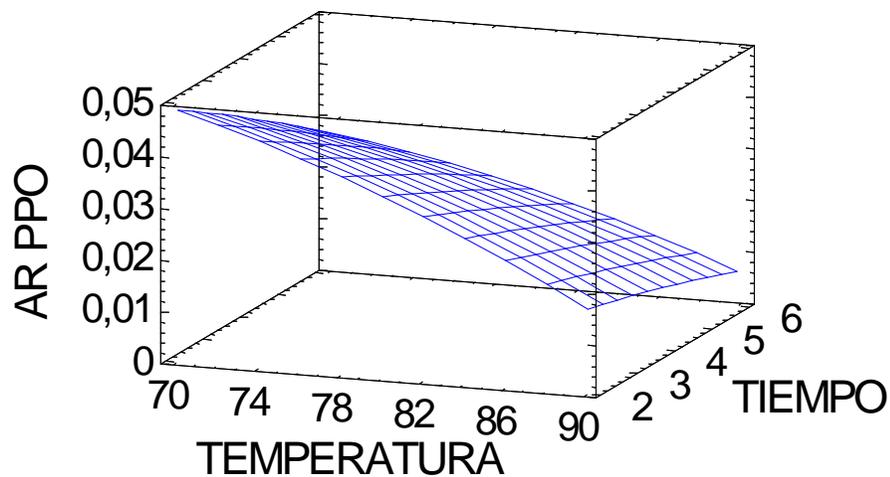
Figura 20. Gráfico de Pareto para actividad residual PPO



Fuente: esta investigación

En la Figura 21 se muestra gráficamente la superficie de respuesta obtenida mediante el modelo. Muestra a su vez diferentes contornos, cada uno de ellos corresponde a un rango de actividad residual obtenida pronosticado por el modelo e ilustran la forma en que este responde a las variaciones de los valores de los parámetros del diseño de experimentos. La superficie en general muestra un descenso, sin formas complejas. El óptimo se representa en el punto mínimo de la superficie siendo 90°C por 6 min.

Figura 21. Superficie de Respuesta para actividad residual PPO



Fuente: esta investigación

6.2 MEDICIÓN DEL PORCENTAJE DE CRECIMIENTO

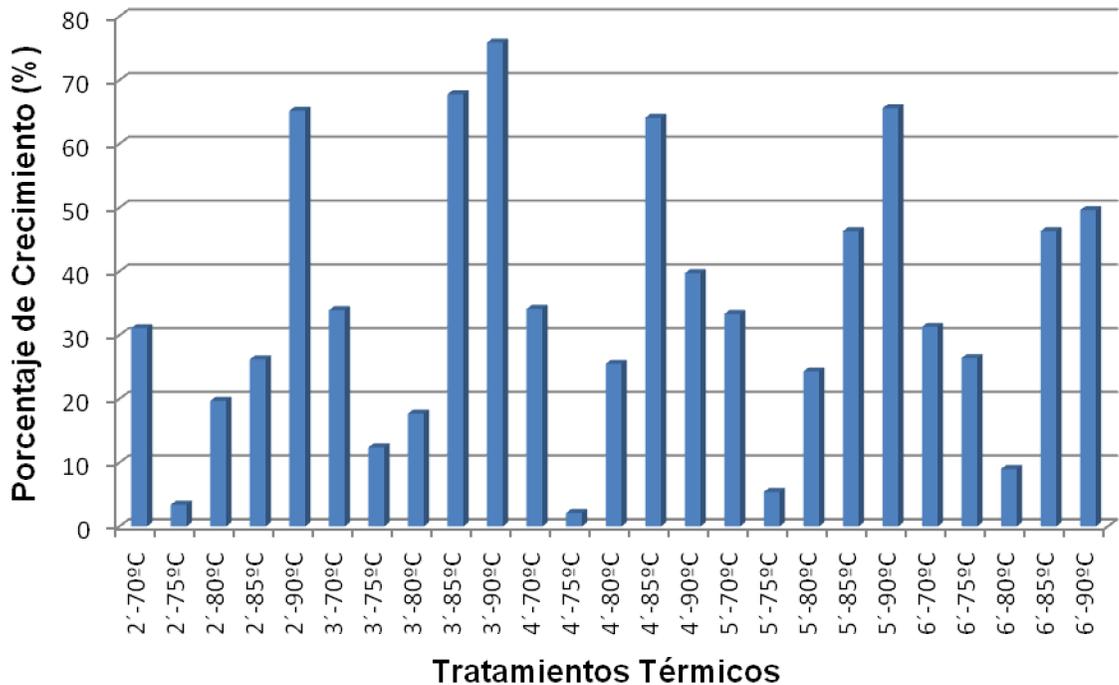
Los resultados obtenidos después de realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* se presentan en la Tabla 7 y Figura 22, se observa un porcentaje de crecimiento menor en los tratamientos térmicos de 75°C por 2, 4 y 5 min y 80°C por 6 min con valores de 3.4%, 2.5%, 5.4% y 9% respectivamente; los cuales se consideran sensibles según la escala de Riveros (RIVEROS, 2003).

Tabla 7. Resultados del diseño experimental para porcentaje de crecimiento

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Crecimiento medio micelial (cm)	Porcentaje de crecimiento (%)
2	70	2,42	31,10
2	75	1,24	3,40
2	80	1,93	19,70
2	85	2,21	26,20
2	90	3,86	65,20
3	70	2,53	33,90
3	75	1,62	12,40
3	80	1,85	17,70
3	85	3,97	67,80
3	90	4,32	75,90
4	70	2,55	34,10
4	75	1,19	2,10
4	80	2,18	25,50
4	85	3,82	64,10
4	90	2,78	39,70
5	70	2,51	33,30
5	75	1,33	5,40
5	80	2,13	24,30
5	85	3,06	46,30
5	90	3,88	65,60
6	70	2,43	31,30
6	75	2,22	26,40
6	80	1,48	9,00
6	85	3,06	46,30
6	90	3,20	49,60

Fuente: esta investigación

Figura 22. Inhibición *in-vitro* sobre el crecimiento de *P. infestans*

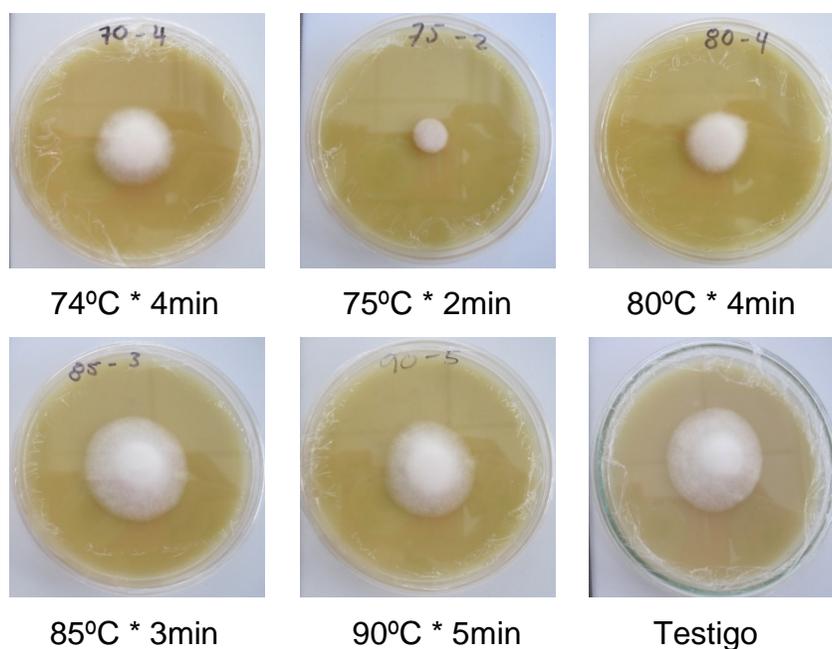


Fuente: esta investigación

En la Figura 23 se observa la diferencia de tamaño del diámetro del micelio de cada tratamiento. La inhibición del pseudohongo se puede atribuir a la presencia de sustancias como saponinas, flavonoides y alcaloides que aportan al jugo de fique un interesante potencial como bioinsumo. Similares resultados fueron reportados por Alvarez (2010), donde encontró un efecto letal del bioinsumo a una concentración de 75000 ppm en ensayos *in-vitro* con jugo fermentado y tratado a 65 °C por 30 min (ALVAREZ, DELGADO, SALAZAR, & HURTADO, 2010).

Al aplicar tratamientos térmicos, como método de conservación se observó que las sustancias presentes en el jugo tienden a perder sus efectos de inhibición al incrementar la temperatura y tiempo de tratamiento.

Figura 23. Actividad Biológica



Fuente: esta investigación

6.2.1 Análisis de varianza para Porcentaje de Crecimiento. El análisis del efecto en el crecimiento del pseudohongo *P. infestans* en el medio de cultivo agar tomate enmendado con el bioinsUMO de fique se muestra a continuación.

Tabla 8. ANOVA para porcentaje de crecimiento

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón - F	Valor - P
A:Temperatura	4335.67	1	4335.67	21.61	0.0002
B:Tiempo	0.0288	1	0.0288	0.00	0.9906
AA	2599.82	1	2599.82	12.96	0.0019
AB	105.884	1	105.884	0.53	0.4764
BB	134.969	1	134.969	0.67	0.4222
Error total	3811.35	19	200.597		
Total (corr.)	10987.7	24			

Fuente: esta investigación

R-Cuadrada = 65.31%

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 56.18%

Error estándar del est. = 14.16

Error absoluto medio = 9.378
 Estadístico Durbin-Watson = 2.57884 (P = 0.0162)
 Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.312881

El análisis de varianza (Tabla 15) muestra que solo el efecto temperatura y su interacción son significativos sobre el porcentaje de crecimiento, con un P-Valor inferior a 0.05.

Por su parte el coeficiente R-Cuadrado evidencia un ajuste del 65.31%, con lo cual se puede deducir que el diseño no cuenta con un buen ajuste. Por lo tanto se realizó un análisis por el método de comparación de múltiples muestras, teniendo en cuenta la temperatura como el único factor significativo.

La Tabla 9 muestra que hay diferencia significativa entre los grupos, asociados por temperatura, con un nivel de confianza del 95%. Con la prueba de LSD se observa 3 grupos homogéneos (Tabla 10).

Tabla 9. ANOVA para porcentaje de crecimiento

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón - F	Valor - P
Entre Grupos	8467.75	4	2116.94	16.8	0.0000
Dentro Grupos	2519.97	20	125.998		
Total (corr.)	10987.7	24			

Fuente: esta investigación

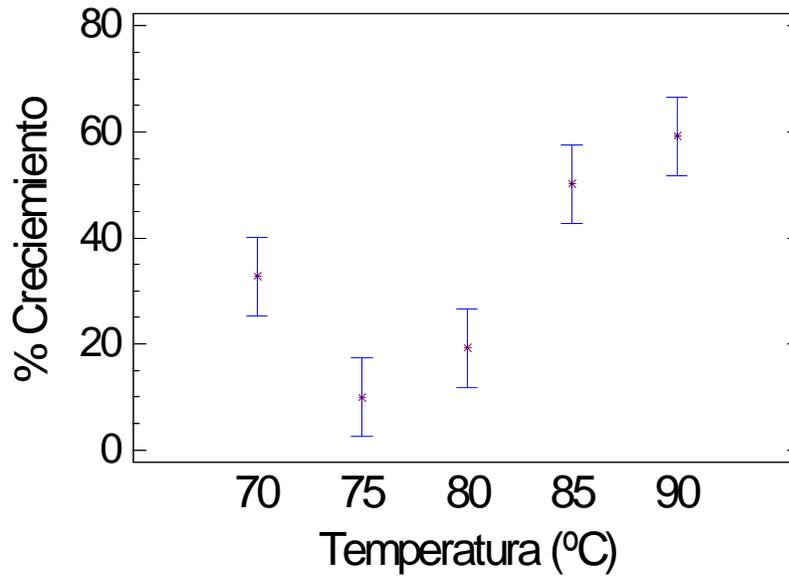
Tabla 10. Prueba de múltiples rangos

Muestra	Media	Grupos
		Homogéneos
75°C	5	9.94 X
80°C	5	19.24 XX
70°C	5	32.74 X
85°C	5	50.14 X
90°C	5	59.2 X

Fuente: esta investigación

De la gráfica de medias (Figura 24) podemos inferir que las temperaturas que menor porcentaje de crecimiento provocaron frente a *P. infestans* son 75 y 80 °C.

Figura 24. Gráfica de medias para porcentaje de crecimiento



Fuente: esta investigación

Con el análisis de comparación de múltiples muestras se estableció que en 75°C se encontró el menor porcentaje de crecimiento, siendo para la investigación el tratamiento óptimo 75°C por 4 min con un valor de 2.1%.

Teniendo en cuenta que a las temperaturas de 75 y 80°C se presentó el menor porcentaje de crecimiento, se decidió corroborar el comportamiento de los resultados para mayor confiabilidad.

Se evaluó 2 temperaturas a 3 tiempos como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Matriz del Diseño Experimental PC

Temperatura (°C)	Tiempo (min)		
75	2	6	10
80	2	6	10

Fuente: esta investigación

Se realizó un análisis mediante una comparación de múltiples muestras, los resultados obtenidos en 3 determinaciones se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados de porcentaje de crecimiento

Tratamiento	Temperatura (°C): Tiempo (min)	Crecimiento medio micelial (cm)	Porcentaje de crecimiento (%)
T1	75: 2	1,97	18,40
T2	80: 2	1,66	11,77
T3	75: 6	1,62	10,97
T4	80: 6	1,49	8,15
T5	75: 10	1,67	12,00
T6	80: 10	1,66	11,77
T1	75: 2	1,94	17,76
T2	80: 2	1,53	9,08
T3	75: 6	1,67	12,00
T4	80: 6	1,81	14,94
T5	75: 10	1,59	10,33
T6	80: 10	1,75	13,76
T1	75: 2	1,78	14,35
T2	80: 2	1,94	17,76
T3	75: 6	1,79	14,56
T4	80: 6	1,72	13,10
T5	75: 10	2,00	19,05
T6	80: 10	1,55	9,42

Fuente: esta investigación

El análisis de varianza (Tabla 13) muestra que no hay diferencias entre tratamientos, con un 95% de confianza.

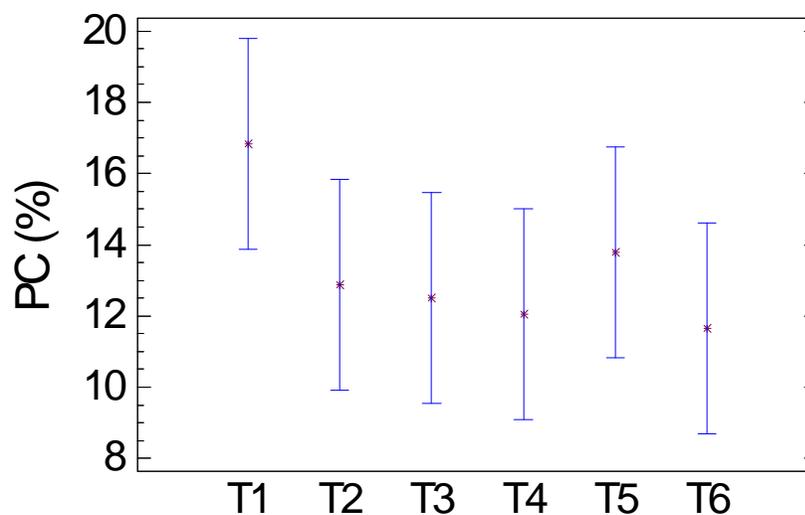
Tabla 13. ANOVA para porcentaje de crecimiento

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón - F	Valor - P
Entre Grupos	53.4338	5	10.6868	0.97	0.4758
Dentro Grupos	132.747	12	11.0626		
Total (corr.)	186.181	17			

Fuente: esta investigación

Este análisis (Figura 25) confirma que no existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, como se muestra en la prueba de múltiples rangos (Tabla 14).

Figura 25. Gráfica de medias para porcentaje de crecimiento



Fuente: esta investigación

Tabla 14. Prueba de múltiples rangos

	Muestra	Media	Grupos Homogéneos
T6	3	11.65	X
T4	3	12.06	X
T3	3	12.51	X
T2	3	12.87	X
T5	3	13.80	X
T1	3	16.84	X

Fuente: esta investigación

Con la investigación se logró la inactivación de las enzimas POD y PPO en el jugo de fique, las cuales presentaron un comportamiento similar al de extractos vegetales. Además de la inactivación de las enzimas se consiguió mantener las características como bioinsumo.

7. CONCLUSIONES

En el jugo de fique se pudo comprobar la presencia y actividad de las enzimas peroxidasa y polifenol oxidasa, además se establecieron los protocolos de extracción y determinación enzimática de las mismas.

Los resultados obtenidos de la investigación fueron favorables, debido a que se logro una reducción mayor de la actividad enzimática de peroxidasa del 97.6% a 85°C por 5 min y de polifenol oxidasa del 99.3% a 90°C por 6 min.

El menor porcentaje de crecimiento de *Phytophthora infestans* fue de 2.1% a 75°C por 4 min, siendo un buen resultado para la investigación y sensible según la escala de Riveros (RIVEROS, 2003).

El tratamiento térmico que cumple con la disminución de la actividad enzimática de aproximadamente del 90% y la efectividad del bioinsumo es 75°C por 4 min con valores de actividad residual de 10.6% para POD y 3.2% para PPO.

8. RECOMENDACIONES

Dar continuación a la investigación enfocándose en el tiempo de conservación del jugo de fique con las condiciones encontradas en este trabajo.

Complementar la investigación con análisis químico (saponinas, flavonoides, alcaloides) del jugo de fique tratado.

Para posteriores análisis se recomienda trabajar con muestras de la misma variedad, edad, lugar, etc. Para evitar mayor variabilidad en los resultados esperados.

BIBLIOGRAFIA

AGUERO, M., ANSOARENA, M. R., ROURA, S. I., & DEL VALLE, C. E. Termal inactivation of peroxidase during blanching of butternut squash. *LWT* , 2008. 41, 407 p.

ALVAREZ, D., DELGADO, D., SALAZAR, C., & HURTADO, A. Sensibilidad *in vitro* de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary al extracto de fique (*Furcraea gigantea vent.*) y fungicidas sisteticos. Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias. 2010.

ANIL, K. V., KISHOR, M. T., & MURUGAN, K.. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra L.*). *Food Chemistry* , 2008. 110, 333 p.

ANTHON, G. E., & BARRETT, D. M.. Kinetic Parameters for the Termal Inactivation of Quality-Related Enzymes in Carrots and Potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 2002. 50 (14), 4125 p.

AVALLONE, C., CRAUZOV, A., MONTENEGRO, S., & PELLIZZARI, E.. Estudio de la actividad de la peroxidasa, pectinesterasa y polifenol oxidasa en extracto enzimatico de sandia (*Citrullus vulgaris Schard*). Obtenido de <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2001/7-Tecnologicas/T-074.pdf>. 2000.

BADUI, S. *Química de los Alimentos*. Mexico: Editorial Alambra Mexicana. 1999.

BENAVIDES, C. O., BACCA, E. D., & ORTIZ, B. Y. *Estudio fitoquímico cualitativo del jugo de dos variedades de fique del departamento de Nariño*. Informe de investigación, Universidad de Nariño., San Juan de Pasto. 2009.

CADENA PRODUCTIVA NACIONAL DEL FIQUE CADEFIQUE. *Guía ambiental del subsector ficuero*. Obtenido de http://201.234.78.28:8080/dspace/bitstream/123456789/1146/1/2007222154336_GuiaAmbientalfiquera2006.pdf. 2006.

CARACTERIZACION OCUPACIONAL DEL SUBSECTOR FIQUERO DE COLOMBIA. *Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA)*. Pasto: Impresiones Ángel. 2006.

CASTELLANOS, D. E., ENRIQUEZ, A., DIAZ, L., & LEÓN, T. E. Evaluación *in vitro* del Efecto Inhibidor de Extractos Fermentados (Purines) de Chipaca (*Bidens pilosa*) sobre el Crecimiento de *Phytophthora infestans*. *Rev. Bras. de Agroecología* , 4 (2), 1830-1834. 2009.

COLOMBIA - MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL - OBSERVATORIO AGROCADENAS. *La cadena del fique en Colombia . Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Informe de la actividad.* Bogotá. 2006.

CRUZ H, D. *Cadena Agroindustrial del fique.* Obtenido de http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2008519105246_BULLETS_CADEF IQUE_2008.pdf. 2008.

CRUZ, R. M., VIEIRA, M. C., & SILVA, C. L. Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium officinale*). *Journal of Food Engineering.* 2006.

CHUTINTRASRI, B., & NOOMHORM, A. Thermal inactivation of polyphenol oxidase in pineapple puree. *LWT* . 2006. 495 p.

DEEPAK, S. A., OROS, G., SATHYANARAYANA, S. G., SHETTY, N. P., SHETTY, H. S., & SASHIKANTH, S. Antisporulant activity of leaf extracts of Indian plants against *Sclerospora graminicola* causing downy mildew disease of pearl millet. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 2005. 38:1 , 39 p..

DOGAN, S., & DOGAN, M. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus (Thymus longicaulis subsp. chaubardii var. chaubardii)*. *Food chemistry* , 2004. 88 p.

ECOFIBRAS Empresa Cooperativa de Fibras Santander Limitada. *VI Encuentro Nacional de Fique. Memorias.* Provincia del Alto Ricaurte. 2005.

ERWIN, D., & RIBEIRO, O. *Phytophthora Diseases Worldwide.* The American Phytopathological Society Press , 1996. 133 p.

FELLOWS, P. *Tecnología del procesado de los alimentos: Principios y Practicas.* Zaragoza (España): Acribia. 1994.

GAMBOA, A. R., HERNÁNDEZ, C. F., GUERRERO, R. E., SÁNCHEZ, A. A., & LIRA, S. R. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont. (de Bary) con extractos vegetales metanólicos de hojásén (*Flourensia cernia* D.C.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 2003. 18 p.

GARCÍA, M., SÁENZ, M., PUERTA, R., QUILEZ, A., & FERNÁNDEZ, M. Antibacterial activity of *Agave intermixta* and *Cissus sicyoides*. *Fitoterapia*, 1999. 73 p.

GASULL, E., & BECERRA, D. Caracterización de Polifenoloxidasas Extraídas de Pera (cv. *Packam's Triumph*) y Manzana (cv. *Red Delicious*). *SciELO* , 2006. 17 (6), 74 p.

GAWLIK-DZIKI, U., SZYMANOWSKA, U., & BARANIA, B. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. *Food Chemistry* , 2007. 1053 p.

GAWLIK-DZIKI, U., ZLOTEK, U., & SWIECA, M.. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.). *Food Chemistry* , 2008. 107, 135 p.

GÓMEZ H, J. E. *Evaluación del extracto de fique en el desarrollo in-vitro de Colletotrichum gloeosporoides (Penz) Penz & Sacc. y Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary (CORPOICA)*. 2001.

GOMEZ, E. M., & VANEGAS, G. E. *Evaluacion de la producción de esteroides a partir del jugo de fique con cunninghamella spp.* Medellín: Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín. Facultad de Ingeniería Química. 2001.

GONZALES, E. M., ANCOS, B., & CANO, M. Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase activities in blackberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* , 2000. 5464 p.

GUERRERO, J. A., & BELTRAN, B. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorsinol, cysteine and ascorbic acid. *LWT* , 2005. 38 (16), 630 p.

HALPIN, B., PRESSEY, R., JEN, J., & MONDY, N. Purification and Characterization of Peroxidase Isoenzymes from Green Peas (*Pisum sativum*). *J. Food Sci.* , 1989. 54 (3), 644-649.649 p.

HANSBERG, T. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje bioquímico* , 2002. 54 p.

KHANNA, V. G., & KANNABIRAN, K. Antimicrobial activity of saponin fractions of the leaves of *Gymnema sylvestre* and *Eclipta prostrata*. *World J Microbiol Biotechnol* , 2008. 2740 p.

LEE, C. Y., PENNESI, A. P., & DICKSON, M. H. Characterization of the cauliflower peroxidase isoenzyme. *Journal of Agricultural and food chemistry* , 1984. 32 (1), 21 p.

LEWIS, M. J., & HEPPELL, N. J. *Continuous Thermal Processing of Foods: Pasteurization and UHT Sterilization* 2004.

LUIZ, R. C., MEDEIROS, H., & CLEMENTE, E. Cinética de inactivação da polifenoloxidase e peroxidase de abacate (*persea americana* MILL). *Cienc. agrotec* , 2007. 31 (6), 1773 p.

MACHADO, M. F., & SARAIVA, J. Inactivation and reactivation kinetics of horseradish peroxidase in phosphate buffer and buffer-dimethylformamide solutions. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic* , 2002. 457 p.

MADR, IICA & Corpoica. *Diagnostico Estrategico de la cadena del fique*. Bogota D.C. 2004.

MAFART, P. *Ingeniería Industrial alimentaria*. Zaragoza (España): Acribia S.A. 1994.

MARTÍNEZ, A. M., & CAICEDO, T. X. *Bioensayo de toxicidad de los jugos de fique en peces, en el Municipio de Tambo (Nariño)*. Bogotá: Universidad El Bosque, 2002. 26 p.

MATSUI, K. N., GRANADO, L. M., DE OLIVEIRA, P. V., & TADINI, C. C. Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solutions. *LWT* , 2007. 859 p.

MAYER, A., & HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* , 1979. 215 p.

MDLULI, K. M. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*). *Food Chemistry* , 2005. 323 p. .

MELÉNDEZ, P., & CAPRILES, V. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine* , 2006. 276 p.

MORALES-BLANCAS, E. F., CHANDIA, V. E., & CISNEROS- ZEVALLOS, L. Thermal Inactivation Kinetics of peroxidase and lipoxigenase from broccoli, green asparagus and carrots. *Journal of food science* , 2002. 67 (1), 154 p.

MUÑOZ, D. K., BRAVO, M. K., ZAPATA, O. P., & LONDOÑO, L. J. Caracterización preliminar del enzima polifenol oxidasa en frutas tropicales: Implicaciones en su proceso de industrialización. *Scintia et Technica año XIII* , 2007. 164 p.

NARVAEZ, C. Extraccion y medida de peroxidasa en pulpa de araza. *Quimica Nova* , 2008. 31 (8), 2051 p.

OSORIO, O. Influencia de tratamientos térmicos en la calidad y estabilidad del puré de fresa (*Fragaria x ananassa, cv Camarosa*). Valencia, España: Universidad Politecnica de Valencia. 2008.

PEINADO, J., PEÑALOSA, N., & GAMBOA, M.. *Actualización, ajuste y validación de la guía ambiental del subsector figuero*. Bogotá: Universidad de la Salle y Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. 2005.

PEREIRA, B., OLIVEIRA, P., & PAZ, J. Chemical structure and biological activity of steroidal saponins from *Furcraea gigantea*. *Chemistry of natural compounds* , 2006. 321 p.

PRESTAMO, G., & MANZANO, P. Peroxidases of selected fruits and vegetables and the possible use of ascorbic acid as and antioxidant. *Horticulture science* , 1993. 50 p.

RAPEANU, G., VAN, L. A., SMOUT, C., & HENDRICKX, M. Biochemical characterization and process stability of polyphenol oxidase extracted from victoria grape (*Vitis vinifera ssp. sativa*). *Food chemistry* , 2006. 261 p.

RIVEROS, F. S. Resistencia de *Phytophthora infestans* (Montagne) de Bary a Metalaxil en cultivo de papas en el norte de Chile. *Agricultura técnica Chile* , 2003. 124 p.

ROBINSON, D. Peroxidase and catalasa in food. *Elsevier Applied Science* , 1991 49 p.

ROJAS, S. M. Elaboración y evaluación de un bioinsumo a partir del jugo de fique (*furcraea spp.*) para el control de la gota (*Phytophthora Infestans*) del cultivo de la papa en el departamento de Nariño. Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ingeniería Agroindustrial. 2008.

RUDRA, S. G., SHIVHARE, U. S., & BASU, S. Thermal inactivation kinetics of peroxidasa in mint leaves. *Journal of Food Engineering* , 2008. 153 p.

SÁNCHEZ, E., HEREDIA, N., & GARCÍA, S. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. *International Journal of Food Microbiology* , 2005. 98 (3), 279 p.

BIBLIOGRAPHY \ 3082 SCHWEIGGERT, U., SCHIEBER, A., & CARLE, R. Inactivation of peroxidase, polyphenol oxidase, and lipoxygenase in paprika and chili powder after immediate thermal treatment of the plant material. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* , 2005. 411 p.

SECRETARÍA TÉCNICA NACIONAL DEL FIQUE CADEFIQUE. *Cadena Agroindustrial del Fique. Informe de coyuntura*. Bogotá. 2006.

SESSA, D. J., & ANDERSON, R. L. Soybean peroxidases: purification and some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 1981. 29 (5), 965 p.

SILVA, F. V., & GIBBS, P. Target selection in designing pasteurization processes for shelf-stable high-acid fruit products. *Critical reviews in food science and nutrition* , 2004. 360 p. .

SOYSAL, C., & SOYLEMEZ, Z. Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. *Journal of Food Engineering.* , 2005. 68 (3), 350 p.

SPARG, S., LIGHT, M., & VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* , 2004. 94, 243 p.

ÜMIT, Ü. M. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa Cavendishii*). *Food Chemistry* , 2007. 913 p.

VERÁSTEGUI, Á., VERDE, J., GARCÍA, S., HEREDIA, N., ORANDAY, A., & RIVAS, C. Species of Agave with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. *World J Microbiol Biotechnol* , 2008. 1252 p.

VERÁSTEGUI, M. Á., SÁNCHEZ, C. A., HEREDIA, N. L., & GARCÍA-ALVARADO, J. S. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahua desert. *Journal of Ethnofarmacology* , 1996. 177 p.

BIBLIOGRAPHY \ 3082 ZALAZAR, & PULIDO. Estadística aplicada. McGraw Hill. 2004. 101 p

ZHONG, K., WU, J., WANG, Z., CHEN, F., LIAO, X., HU, X., y otros. Inactivation kinetics and secondary structural change of PEF-treated POD and PPO. *Food Chemistry* , 2007. 115 p.