



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
ESCOLA SUPERIOR D'AGRICULTURA DE BARCELONA
GRAU EN ENGINYERIA ALIMENTÀRIA

EFFECTE DE L'APLICACIÓ D'ULTRASONS EN L'ENFOSQUIMENT ENZIMÀTIC DE LA PATATA *(Solanum Tuberosum L.)*

Treball de Final de Grau realitzat per:
Miquel Sadurní Ensenyat

Sota la direcció de:
Dra. Montserrat Pujolà i Cunill
Dr. Francesc Sepulcre i Sánchez

Castelldefels, juny de 2018

Resum

EFFECTE DE L'APLICACIÓ D'ULTRASONS EN L'ENFOSQUIMENT ENZIMÀTIC DE LA PATATA (*Solanum Tuberosum*)

Autor: Miquel Sadurní Ensenyat

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

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

L'enfosquiment enzimàtic en vegetals frescos causa pèrdues en la producció degut a que el canvi de color que es genera és detectat com un problema de qualitat en l'aliment i el consumidor rebutja el producte. Per satisfer al consumidor i obtenir aliments amb una bona qualitat organolèptica i sanitàriament segurs es poden utilitzar diferents processos químics i físics. Entre els nous processos físics trobem els tractaments amb camps elèctrics polsants (CEP), les altes pressions hidrostàtiques o els ultrasons.

L'objectiu d'aquest treball ha sigut determinar l'efecte dels ultrasons i diferents solucions àcides sobre l'enfosquiment enzimàtic en patata tallada. S'ha fet ús d'un bany d'ultrasons de 42kHz i 130 W a diferents temps de sonicació (5,10 i 20 minuts) combinat amb aigua, àcid cítric a l'1% o àcid ascòrbic a l'1%. S'ha avaluat l'efecte dels ultrasons tant en les solucions (%Ss, pH i temperatura) com en les mostres de patata (color, pH, temperatura i activitat enzimàtica de la polifenoloxidasa (PPO) i peroxidasa (PRO)). L'activitat enzimàtica de la PPO i PRO s'ha quantificat a partir de la reacció amb catecol o guaiacol en presència de H₂O₂ i posterior mesura de les seves absorbàncies a $\lambda=410\text{nm}$ i $\lambda=420\text{nm}$ respectivament, obtenint lectures cada 30 segons durant 10 minuts.

Els resultats obtinguts indiquen que l'aplicació d'ultrasons tant en l'aigua com en les solucions àcides comporta un increment de temperatura de 11-12 graus. No es veuen variacions del pH en les solucions però sí en la mostra. A nivell d'activitat enzimàtica, la PPO i la PRO no segueixen la mateixa evolució i es veuen afectats de diferent manera per el temps de sonicació i per les solucions aplicades. Per la PPO lo que més inhibeix és l'àcid ascòrbic a 5 minuts de sonicació mentre que per la PRO també és l'ascòrbic però a 20 minuts de sonicació. La inhibició no només és degut a l'efecte dels ultrasons ja que en l'ús de l'àcid ascòrbic cal tenir en compte el descens de pH i l'efecte antioxidant. Si la solució del bany utilitzada és l'àcid cítric els millors efectes d'inhibició es succeeixen en els 5-10 minuts pel cas de la PPO i no s'observen diferències d'inhibició respecte el temps aplicat d'ultrasons per la PRO. En el cas de l'àcid cítric la inhibició no es deu sols als ultrasons sinó que també al pH àcid i a l'efecte quelant. Si la solució utilitzada és l'aigua l'efecte de inhibició del enfosquiment només es notòria en els primers 5 minuts de temps de sonicació per la PPO, en canvi en la PRO a major temps de sonicació disminueix la inhibició. En quant al color de la patata es veuen variacions significatives en l'índex de color per efecte del temps de sonicació i les solucions àcides utilitzades.

Paraules clau: Polifenoloxidasa (PPO), Peroxidasa (PRO), Color, Inhibició, Ultrasons.

Resumen

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS EN EL PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO DE LA PATATA (*Solanum Tuberosum*)

Autor: Miquel Sadurní Ensenyat

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

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona –Grado en Ingeniería Alimentaria, Universidad Politécnica de Catalunya.

El pardeamiento enzimático en vegetales frescos causa pérdidas en la producción debido a que el cambio de color que se genera es detectado como un problema de calidad en el alimento y el consumidor rechaza el producto. Para satisfacer al consumidor y obtener alimentos con una buena calidad organoléptica y sanitariamente seguros se pueden utilizar diferentes procesos químicos y físicos. Entre los nuevos procesos físicos encontramos los tratamientos con campos eléctricos pulsantes (CEP), las altas presiones hidrostáticas o los ultrasonidos.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar el efecto de los ultrasonidos y diferentes soluciones ácidas sobre el pardeamiento enzimático en patata cortada. Se ha utilizado un baño de ultrasonidos de 42kHz de frecuencia y 130 W de potencia a diferentes tiempos de sonicación (5,10 y 20 minutos) combinado con agua, ácido cítrico al 1% o ácido ascórbico al 1%. Se ha evaluado el efecto de los ultrasonidos tanto en las soluciones (%Ss, pH y temperatura) como en las muestras de patatas (color, temperatura, pH y actividad enzimática de la polifenoloxidasasa (PPO) y la peroxidasa (PRO)). La actividad enzimática de la PPO y PRO se ha cuantificado a partir de la reacción con catecol o gayacol en presencia de H₂O₂ y posterior medida de sus absorbancias a $\lambda=410\text{nm}$ y $\lambda=420\text{nm}$ respectivamente, obteniendo lecturas cada 30 segundos durante 10 minutos.

Los resultados obtenidos indican que la aplicación de ultrasonidos tanto en el agua como en las soluciones ácidas comporta un incremento de temperaturas de 11-12 grados. No se ven variaciones del pH en las soluciones pero sí en la muestra. A nivel de actividad enzimática, la PPO i la PRO no siguen la misma evolución y se ven afectados de diferente manera por el tiempo de sonicación y por las soluciones aplicadas. Por la PPO lo que más inhibe es el ácido ascórbico a 5 minutos de sonicación mientras que por la PRO también es el ácido ascórbico pero a 20 minutos de sonicación. La inhibición no solo es debido al efecto de los ultrasonidos ya que en el uso del ácido ascórbico se debe tener en cuenta el descenso de pH y el efecto antioxidante. Si la solución del baño usada es el ácido cítrico los mejores efectos de inhibición suceden en los 5-10 minutos por la PPO y no se observan diferencias de inhibición respecto al tiempo aplicado de ultrasonidos por la PRO. En el caso del ácido cítrico la inhibición no solo se debe a los ultrasonidos sino que también al pH ácido i al efecto quelante. Si la solución usada es agua el efecto de inhibición del pardeamiento solo es notoria en los 5 primeros minutos de tiempo de sonicación por la PPO, en cambio en la PRO a mayor tiempo de sonicación disminuye la inhibición. En el color de la patata se ven variaciones significativas en el índice de color por los efectos del tiempo de sonicación y las soluciones ácidas usadas.

Palabras clave: Polifenoloxidasasa (PPO), Peroxidasasa (PRO), Color, Inhibición, Ultrasonidos.

Abstract

EFFECT OF THE APPLICATION OF ULTRASOUNDS IN THE ENZYMATIC BROWNING OF POTATO (*Solanum Tuberosum*)

Author: Miquel Sadurní Ensenyat

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

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona – Food Engineering Degree,
Universitat Politècnica de Catalunya.

Enzymatic browning in fresh vegetables causes losses in production because the color change generated is detected as a quality problem in the food and the consumer rejects the product. Different chemicals and physical processes can be used to satisfy the consumer and obtain a high organoleptic quality and healthy safe food. Among the new physical processes we find pulsating electric fields, high hydrostatic pressures or ultrasounds.

The aim of the present work has been to determine the effect of ultrasounds and different acid solutions on enzymatic browning in cut potato. An ultrasonic bath of 42Hz of frequency and 130W of power, has been used in different times (5, 10 and 20 minutes) with different solutions (water, (1%) of acid citric or (1%) of acid ascorbic). The effect of the ultrasounds has been evaluated both in the solutions (percentage of soluble solids, pH and temperature) and in the potato samples (color, pH, temperature and enzymatic activity of the polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD)). The enzymatic activity of PPO and POD has been quantified from the reaction with catechol or gallic acid in the presence of H₂O₂ and subsequent measurement of absorbance at $\lambda=410\text{nm}$ and $\lambda=420\text{nm}$ respectively, obtaining readings every 30 seconds for 10 minutes.

The results obtained indicate that the application of ultrasounds in both water and acid solutions involves an increase in temperature of 11-12 degrees. No pH variations have been observed in the solutions but in the sample. In enzymatic activity, the PPO and the POD do not follow the same evolution and are affected differently by the time of sonication and by the applied solutions. For the PPO, the most inhibited is ascorbic acid at 5 minutes of sonication while the POD is also ascorbic acid but at 20 minutes of sonication. The inhibition is not only due to the effect of ultrasounds, in the use of ascorbic acid should take into account the decrease in pH and the antioxidant effect. If the solution is citric acid, the best effects of inhibition happen in 5-10 minutes by the PPO and no differences of inhibition are observed respect to the applied time of ultrasounds by POD. In case of citric acid, the inhibition is not only due to ultrasounds, also to the acidic pH and the chelating effect. If the solution used is water, the browning inhibition effects are only in the first 5 minutes of sonication time by PPO. In the POD in longer time of sonication the inhibition decreases. The color of potato shows significant variations in the color index due to the effects of sonication time and the acids solutions used.

Keywords: Polyphenoloxidase (PPO), Peroxidase (POD), Color, Inhibition, Ultrasounds.

Índex

1. Introducció	2
1.1 Enfosquiment enzimàtic: Polifenoloxidasa i peroxidasa	2
1.2 Tractaments i control del enfosquiment enzimàtic	4
1.2.1 Agents “Antibrowning” (antienfosquiment)	5
1.2.1.1 Acidulants	5
1.2.1.2 Agents reductors	5
1.2.1.3 Agents quelants o complexants	6
1.2.1.4 Altres agents “antibrowning”	6
1.2.2 Tractaments físics pel control del enfosquiment.....	6
1.2.2.1 Reducció de la disponibilitat d'oxigen.....	7
1.2.2.2 Revestiments comestibles.....	7
1.2.2.3 Efectes de la temperatura.....	8
1.2.2.4 Tecnologia d'altres pressions.....	8
1.2.2.5 Tractament amb camps elèctrics polsants (CEP)	8
1.2.2.6 Tècnica dels ultrasons	9
1.3 Aplicacions dels ultrasons a aliments.....	10
1.3.1 Inactivació enzimàtica mitjançant l'ús ultrasons	11
2. Objectius	14
3. Material i mètodes.....	15
3.1 Patata.....	15
3.2 Equips.....	15
3.3 Disseny experimental.....	15
3.4 Mètodes analítics.....	17
3.4.1 Bany d'ultrasons	17
3.4.1.1 Temperatura, sòlids solubles i pH	17
3.4.2 Mostra de patata	17
3.4.2.1 Temperatura.....	17
3.4.2.2 Color.....	17
3.4.2.3 Determinació de les activitats enzimàtiques polifenoloxidasa i peroxidasa	18
3.4.3 Anàlisi estadístic	19
4. Resultats i Discussió	20
4.1 Evolució de la temperatura, pH i contingut de sòlids solubles durant l'aplicació d'ultrasons	20
4.1.1 Evolució del pH	20
4.1.2 Evolució de la temperatura	21
4.1.3 Efectes del tractament sobre els sòlids solubles.....	22
4.2 Efectes de la sonicació i les solucions àcides sobre l'enfosquiment enzimàtic en la patata tallada.....	22

4.2.1 Efecte dels diferents tractaments en la cinètica de la reacció de la polifenoloxidasa (PPO)	22
4.2.2 Efecte dels diferents tractaments en la cinètica de la reacció de la peroxidasa (PRO).....	24
4.2.3 Percentatge d'inhibició de l'activitat enzimàtica en la patata tallada	26
4.3 Avaluació dels diferents paràmetres del color.....	29
5. Conclusions.....	31
6. Referències.....	32

Índex de taules

Taula 1. Mecanismes d'acció dels ultrasons.....	10
Taula 2. Aplicacions dels ultrasons d'alta energia en la ciència i tecnologia dels aliments.....	10
Taula 3. Eficiència de la inactivació enzimàtica.....	12
Taula 4. Evolució del pH per efectes del temps de sonicació i solució utilitzada.....	20
Taula 5. Comparació dels tractaments i el temps de sonicació de la temperatura de les solucions pel mètode Tukey.....	21
Taula 6. Efecte del tractament sobre el percentatge de sòlids solubles per efecte del temps de sonicació i solució utilitzada.....	22
Taula 7. Equacions de la recta per cada tractament i temps (minuts) de sonicació.....	24
Taula 8. Equacions de la recta per cada tractament i temps (minuts) de sonicació.....	26
Taula 9. Percentatge d'inhibició de la PPO i PRO deguda al efecte de les solucions àcides i/o dels ultrasons més l'aigua.....	28
Taula 10. Evolució de la lluminositat (L^*), Chroma (C^*), hue (h^*) i index de color (IC) en patata tractada i sense tractar amb ultrasons a diferents temps de sonicació i en les diferents solucions.....	29
Taula 11. Efecte de les solucions emprades en els diferents paràmetres del color.....	29
Taula 12. Efecte del temps de sonicació en es diferents paràmetres del color.....	30

Índex de figures i imatges

Figures

Figura 1. Reacció d'hidroxilació i oxidació sobre compostos fenòlics catalitzades per PPO.....	3
Figura 2. Reaccions sobre compostos fenòlics catalitzades per la PRO.....	4
Figura 3. Implosió de les bombolles per cavitació.....	9
Figura 4. Disseny experimental emprat en el treball.....	16
Figura 5. Activitat enzimàtica de la PPO i PRO d'una mostra de patata sense tractament.....	19
Figura 6. a)Evolució de la temperatura de les diferents solucions i el temps de sonicació aplicat. b)Evolució de la temperatura interior de la patata depenent de la solució i el temps de sonicació emprats.....	21
Figura 7. Efecte del temps de sonicació i la solució emprada; aigua (a), àcid cítric (b) i àcid ascòrbic (c) en l'activitat de la PPO. El balnc és la patata sense tractar exposada a l'aire.....	23
Figura 8. Efecte del temps d'aplicació d'ultrasons en l'activitat de la PPO en patata a diferents solucions: aigua (a), àcid cítric (b) i àcid ascòrbic (c).....	25
Figura 9. Percentatge d'inhibició de l'activitat de la PPO respecte a la patata fresca.....	27
Figura 10. Percentatge d'inhibició de l'activitat de la PRO respecte a la patata fresca.....	27

Imatges

Imatge 1. Equip d'ultrasons. Branson 2510 42 kHz.....	15
---	----

1. Introducció

Una de les prioritats de la indústria alimentària és buscar noves tecnologies per tal de solucionar problemes que sorgeixen en la producció i comercialització dels aliments, intentant no alterar les propietats originals d'aquests.

En l'àmbit de la bioquímica dels aliments, estudis realitzats sobre enzims han posat en evidència la importància dels processos enzimàtics en l'elaboració i conservació d'aliments. Un fenomen important en aliments vegetals és l'enfosquiment enzimàtic el qual planteja seriosos problemes de decoloració en el producte i s'accentua quan s'alteren els teixits d'aquests vegetals degut a danys per cops o pel procés de pelat o tallat. Aquest fenomen genera grans pèrdues econòmiques a la indústria degut a l'enfosquiment de la matèria vegetal, que representa un defecte per el comprador. Diferents mètodes són emprats per disminuir o eliminar aquests defectes com per exemple: l'ús de sulfits, solucions àcides o agents quelants, camps elèctrics polsants, altres pressions, ultrasons o bé la genòmica com pot ser "gene scissors" o també conegut com CRISPR/Cas 9 (González et al. , 2018).

L'enfosquiment enzimàtic pot ser desitjable en productes com les panses, les prunes deshidratades, el té, el cafè o la sidra de poma. Però en molts altres productes vegetals es veu com una manca de qualitat i és molt important la seva inhibició, havent diverses estratègies per poder evitar-lo. La deshidratació, la congelació i tractaments tèrmics són eficaços sempre que no ocasionin canvis en la textura, el desenvolupament de gustos indesitjables, canvi del color o deteriorament de les propietats funcionals i organolèptiques.

L'activitat enzimàtica pot augmentar durant el emmagatzemat del producte vegetal fresc a causa de la destrucció de les estructures cel·lulars que separen als enzims del substrat. Elevades quantitats de fruita es perden degut a un maneig, transport o emmagatzemat inadequats, causant l'activitat d'enzims endògens o exògens procedents dels microorganismes adherits. Que la pell del vegetal estigui intacte és important per a la protecció contra l'enfosquiment.

1.1 Enfosquiment enzimàtic: Polifenoloxidasa i peroxidasa

L'enfosquiment enzimàtic està causat per enzims que la seva acció provoca un canvi en la pigmentació del producte. Aquests enzims estan relacionats per tenir la mateixa arquitectura de centre actiu amb un nucli de dos coures (units oxidativament) de tipus-3. Aquests poden catalitzar reaccions que donen lloc a productes diversos, polimèrics i conjugats denominats melanines, que en conjunt donen el color marró-rogenç.

Els dos enzims implicats en l'enfosquiment enzimàtic són la polifenoloxidasa (PPO) i la peroxidasa (PRO) sent en la majoria dels casos, l'acció de la polifenoloxidasa (PPO) la que està més relacionada amb les reaccions d'enfosquiment.

- a) **Les polifenoloxidasas (PPO)** estan localitzades en els plastidis i cloroplasts (en vegetals superiors) i també en el citoplasma cel·lular. La PPO catalitza la formació de *o*-quinones amb dues reaccions diferents (o activitats enzimàtiques): la hidroxilació de monofenols a difenols i l'oxidació de difenols a quinones (Cefola et al. , 2012), tal com es mostra a la Figura 1.

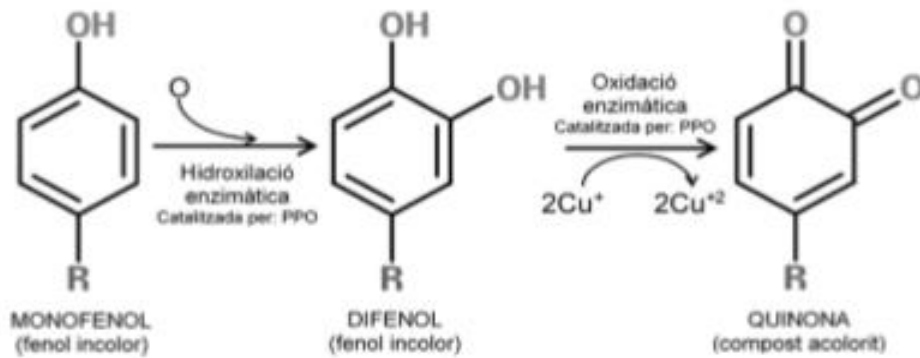


Figura 1. Reacció d'hidroxilació i oxidació sobre compostos fenòlics catalitzades per PPO.

Font: Adaptació de Queiroz et al. (2008) i Gacche et al. , (2002).

La característica estructural més important és la presència de dos àtoms de coure en el seu centre actiu, cadascun d'ells units a tres histidines. En el seu entorn es situen una sèrie de aminoàcids hidrofòbics amb anells aromàtics, els quals són importants per a la unió amb els substrats (monofenols o difenols).

Hi ha diferents mètodes per evitar l'enfosquiment degut a la polifenoloxidasas (Fennema et al. , 2008), com ara:

- Eliminant el O₂, succeeix eficaçment per la permeabilitat selectiva natural de la majoria de fruites i verdures.
- Eliminant o alterant els fenols (substrats).
- Reduint el producte inicial, *o*-benzoquinona, per formar de nou el substrat abans que la *o*-benzoquinona pugui oxidar-se, impedit així la formació de melanina (compost de color).

Entre els compostos que redueixen la *o*-benzoquinona, es troben l'àcid ascòrbic i els compostos tiòlics. Aquests compostos poden inactivar directament la PPO per la degradació de restes d'histidina o l'eliminació del Cu²⁺, ambdós de la zona activa de l'enzim.

Per tant, la inhibició del enfosquiment enzimàtic generalment es produeix a través dels següents 3 mecanismes: 1- Inhibició directe de la polifenoloxidasas. 2- Reducció no enzimàtica de *o*-quinones que es formen per oxidació enzimàtica de *o*-fenols a les derivades *o*-difenols. 3- Modificació química o eliminació de substrats fenòlics.

Els agents multifuncionals més eficients en el control del enfosquiment enzimàtic dels aliments són els sulfits. Però el seu ús en molts casos està limitat per regulacions sanitàries. Per aquesta raó, hi ha una investigació intensiva per desenvolupar alternatives. La millor alternativa coneguda és l'ús d'àcid L-ascòrbic i el seu estereoisòmer més barat, el àcid D-ascòrbic conegut comercialment com àcid eritòrbic. Un altre substitut conegut és el 4-hexilresorcinol. Els inhibidors actius del enfosquiment enzimàtic són els agents quelants, que directament formen complexos amb la polifenoloxidasas o reaccionen amb els seus substrats; un exemple és la b-ciclodextrina (reacciona amb el Cu que conté el grup prostètic de la PPO).

Segons Robinson i Eskin (1991), el pH òptim per la PPO en patates és entre 5.0 i 7.0, generalment a pH inferiors a 4.0 se inactiva aquesta activitat, donant així un mètode per controlar les reaccions d'enfosquiment. Els perfils de pH enfront activitat poden variar amb el cultivar, l'estat de maduració, la puresa de l'enzim i la naturalesa del substrat fenòlic. La PPO es considera un enzim de baixa estabilitat tèrmica, tractaments tèrmics de relativament curta durada a 70-90°C són suficients per reduir i/o eliminar completament l'activitat d'aquests enzim en productes vegetals. En contrast, cal dir que l'enzim és estable durant l'emmagatzematge a temperatures sota zero.

- b) **Les peroxidases (PRO)** estan àmpliament distribuïdes en plantes, el seu rol en l'enfosquiment enzimàtic en aliments i vegetals és qüestionable ja que el nivell intern de peròxid d'hidrogen en plantes limita l'activitat de les pròpies peroxidases.

La PRO, a diferència de la polifenoloxidasa (Figura 1), realitza l'oxidació d'un sol electró en una àmplia varietat de compostos en presència de peròxid d'hidrogen, mostrat en la Figura 2.



Figura 2. Reaccions sobre compostos fenòlics catalitzades per la PRO.

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

El principal agent responsable de l'enfosquiment enzimàtic en fruits i vegetals és la PPO, tot i que pot haver un possible efecte sinèrgic entre la PPO i la PRO.

Les peroxidases generalment tenen un pH òptim en el rang de 4.0-6.0, aquest pH òptim normalment és dependent del substrat. Les PRO es troben entre els enzims més estables al calor en teixits vegetals, aquesta característica afavoreix el seu ús com a indicadors de blanqueig. La temperatura òptima es troba en el rang dels 40-50°C. La estabilitat tèrmica és més alta que no pas en la polifenoloxidasa, la completa inactivació requereix de diversos minuts d'exposició a 80-100°C, aquesta estabilitat generalment decreix al disminuir el rang de pH a 3.0-7.0 (Fennema et al. , 2008).

1.2 Tractaments i control del enfosquiment enzimàtic

Abans de que la FDA (Administració d'aliments i medicaments) revocés el seu estat de GRAS (Generally Recognized as Safe) en 1986, degut als riscos potencials per la salut que es presenten als consumidors sensibles (Taylor,1993), els sulfits tenien una aplicació generalitzada per controlar tant l'enfosquiment enzimàtic com el no enzimàtic. La seva prohibició en fruites i verdures crues, ha comportat la recerca d'altres productes químics per a la prevenció de l'enfosquiment.

Tradicionalment, el processat d'aliments aconseguix la prevenció del enfosquiment a través de la inactivació de la PPO per calor amb tractaments com l'escaldat o cuinat, però per altre banda cal tenir en compte les modificacions que pot causar d'alguns atributs de qualitat dels aliments com la textura i el gust. En altres casos, en lloc de tractaments tèrmics, en la indústria s'apliquen diferents tipus de químics generalment coneguts com agents "antibrowning".

Un producte fresc es pot preservar de l'enfosquiment enzimàtic de forma més efectiva utilitzant una combinació de tractaments com per exemple en l'ús de fruita tallada és la combinació d'àcid ascòrbic (1%) i clorur de càlcic (0,1%). Altres tractaments combinats inclouen la combinació d'agents antienfosquiment i mètodes físics com un tractament tèrmic o l'ús d'atmosfera controlada (0,5% de O₂ amb 1% de CaCl₂, en pera tallada) (Rosen i Kader, 1989).

1.2.1 Agents “Antibrowning” (antienfosquiment)

Varis tipus de productes químics o agents antibrowning s'utilitzen en el control del enfosquiment, alguns actuen directament com inhibidors de la PPO, altres fan que el medi sigui inadequat per el desenvolupament de la reacció d'enfosquiment i altres actuen reaccionant amb els productes de la reacció de la PPO abans de que aquests puguin donar a la formació de pigments foscos.

1.2.1.1 Acidulants

Encara que el pH òptim per la PPO està entre 5,0 i 7,0 s'observa una activitat òptima a pHs de 6,0 a 6,5 mentre que es detecta poca activitat per sota de pH 4,5 i amb valors inferiors a pH 4,0 es produeix la seva inactivació (Whitaker, 1994). La inactivació irreversible de la PPO es pot aconseguir per sota de pH 3,0. (Richardson i Hyslop, 1985). L'aplicació de químics que disminueixin el pH del producte, o acidulants, s'utilitza de forma generalitzada en el control del enfosquiment enzimàtic. Els acidulants s'utilitzen amb freqüència en combinació amb altres tipus d'agents antienfosquiment degut a que és difícil aconseguir una inhibició del enfosquiment eficient únicament a través del control del pH. El acidulant utilitzat més comunament és el àcid cítric. Depenent del àcid utilitzat hi han variacions sobre l'efecte en la PPO.

1.2.1.2 Agents reductors

Aquest tipus d'agent antienfosquiment causa una reducció química de *o*-quinones. Els reductors s'oxiden irreversiblement durant la reacció, per tant, la protecció que confereixen només és temporal ja que es van consumint en la reacció. Quan tot l'agent reductor agregat és oxidat, les *o*-quinones de la reacció de la PPO poden experimentar més reaccions d'oxidació (que no impliquen la PPO), i finalment una ràpida polimerització que desemboca a la formació de pigments marrons. L'àcid ascòrbic probablement és el agent antienfosquiment més utilitzat, a més de les propietats reductores, també redueix lleugerament el pH. El àcid ascòrbic redueix les *o*-benzoquinones novament a *o*-difènols, i també tenen un efecte directe en la PPO (Whitaker, 1994; Golan-Goldhirsh et al. , 1992). Una de les grans desavantatges del àcid ascòrbic es la seva inestabilitat a temperatures altes, la llum i la concentració que incrementa la velocitat de degradació d'aquest a àcid deshidroascòrbic.

Els compostos que contenen tiols, com la cisteïna, també son agents reductors que inhibeixen l'enfosquiment enzimàtic. Encara, que per un control complet del enfosquiment, la quantitat de cisteïna és incompatible amb el gust del producte (Taylor, 1993).

1.2.1.3 Agents quelants o complexants

Per complexar el centre actiu de la PPO, compostos quelants, com l'àcid etilendiaminotetraacètic disòdic (EDTA-Na₂) poden inhibir la PPO. Sporix és un bon quelant i també acidulant.

Aquesta categoria inclou agents capaços d'atrapar o formar complexos amb substrats de la PPO o productes de reacció. Exemples són les ciclodextrines o oligosacàrids cíclics no reductors de sis o més D-residus de glucosa. En solució aquosa la cavitat central de la ciclodextrina pot formar complexos d'inclusió amb compostos fenòlics, esgotant així la PPO. (La β-ciclodextrina té una solubilitat baixa en l'aigua.

Grans variacions en les propietats inhibidores de les ciclodextrines varien segons el tipus de fenols; ja que varia la força d'unió de la β-ciclodextrina amb el fenol. En models que contenen un sol compost fenòlic, la β-ciclodextrina sempre funciona com inhibidor de la PPO; però amb mescles de compostos fenòlics, els resultats varien, i el equilibri entre els substrats de la PPO present poden ser modificats, el que comporta canvis de color després de l'oxidació enzimàtica catalitzada per la PPO. (Billaud et al. , 1995).

1.2.1.4 Altres agents “antibrowning”

Clorur sòdic: El clorur és un inhibidor dèbil i els nivells de clorur requerits per la inhibició de la PPO són elevats, posant en compromís el gust del producte. El control del enfosquiment pot ser possible sempre que les solucions d'immersió siguin àcides, on es suggereix un pH per lo menys 3,5 (Rouet-Mayer i Philippon, 1986).

Proteases: els tractaments enzimàtics amb proteasa provoquen la proteòlisis en llocs específics per a l'activació de la PPO. Un altre possible mecanisme d'acció està relacionat amb el grup sulfhídric (com la cisteïna) de les proteases. S'han fet diferents estudis d'inhibició de la PPO amb bromelina (extreta de la pinya), papaïna (de la papaia) i ficina (de les figues) (Taylor, 1993).

Àcids carboxílics aromàtics: L'ús d'àcids com el benzoic i cinàmic com inhibidors de la PPO (Walker,1995), han donat una protecció curta en front a l'enfosquiment. Les solucions de cinamat de sodi utilitzades en poma tallada, només van obtenir una prevenció al enfosquiment a curt termini, però en menys de 24 h es va desenvolupar un enfosquiment sever (Sapers et al. , 1989), això suggereix que els cinamats i els benzoats poder patir una lenta però gradual conversió en substrats de la PPO (Mc Evily et al. , 1992).

1.2.2 Tractaments físics pel control del enfosquiment

Un dels punts comunament utilitzats per controlar l'activitat enzimàtica en productes frescos és l'ús de la baixa temperatura durant la manipulació, processat i emmagatzemat. A baixes temperatures, no només es redueix l'activitat enzimàtica sinó que els processos metabòlics generals també disminueixen, el que ajuda a allargar la vida útil del producte. En la indústria alimentària es busca l'ús de mètodes físics que inhibeixin l'enfosquiment enzimàtic i es preservin les qualitats de l'aliment.

1.2.2.1 Reducció de la disponibilitat d'oxigen

En verdura o fruita fresca recent tallada destinada a ser un producte pre-preparat, és convencional la immersió en aigua, salmorra o xarop per disminuir la difusió del oxigen. Tot i així, el teixit es tornarà marró al exposar-lo a l'aire. A més, durant el temps que es manté el teixit en la solució, l'equilibri osmòtic pot donar com a resultat la pèrdua de soluts i imbibició de la solució en el emmagatzemat.

Invasat en atmosfera modificada

Les atmosferes controlades retarden la senescència i per tant amplien el temps de emmagatzemat i la vida útil dels productes. Aquestes s'han de veure com un suplement a un maneig adequat de la temperatura i la humitat (Kader,1992) i té com objectiu l'obtenció d'un gas ideal en l'envàs. Normalment es varien les concentracions d'oxigen i CO₂ d'acord amb les necessitats de cada aliment, evitant el desenvolupament de gustos i olors estranys (Wills et al. ,1998). La modificació de l'atmosfera de l'envàs conjuntament amb un maneig adequat del producte per evitar contaminacions, treballar a baixes temperatures i controlar la humitat permet allargar el temps de emmagatzemat i per tant la vida útil del producte (Kader, 1992).

1.2.2.2 Revestiments comestibles

La extensió de la vida útil també s'ha investigat per mitjà de l'ús de recobriments comestibles aplicats al producte tallat. Aquests recobriments són capes primes de materials protectors aplicats a la superfície de la fruita o verdura com a substitució del teixit natural protector (epidermis, closca). 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.

Aquests recobriments, bàsicament, són (polisacàrids, proteïnes, resines, ceres o olis), que poden mullar-se degut a l'addició de plastificants, surfactants o emulsionants. La seva facilitat d'adherència a la superfície fa que el seu poder barrera a la humitat o la difusió del vapor d'aigua varii i siguin més o menys efectiu (Baldwin et al. ,1995).

Els recobriments lipídics encara que confereixen importants característiques barrera a l'aigua, poden donar gustos cerosos o gomosos al producte.

Per augmentar la seva eficiència poden incorporar-se al recobriment altres compostos com per exemple antioxidants. L'eficàcia del àcid ascòrbic per enrederir l'enfosquiment enzimàtic en patata millora quan s'incorpora en una formulació del revestiment (Baldwin et al, 1995).

1.2.2.3 Efectes de la temperatura

La gestió de la temperatura durant la manipulació de la fruita o verdura és essencial per minimitzar els efectes negatius de les lesions mecàniques ja que a baixes temperatures es redueixen les reaccions metabòliques. La temperatura té efecte en la taxa de respiració, afecta a la permeabilitat dels gasos i retarda el creixement microbià (Watada et al. , 1996). La temperatura de emmagatzemat és un paràmetre crític per aconseguir una vida útil màxima dels productes. A temperatures de refrigeració (4 a 8°C) l'activitat de la PPO disminueix, mentre que a temperatures de congelació (-20°C) l'activitat enzimàtica s'atura quasi totalment i la seva aparició durant la descongelació dependrà del producte i del sistema emprat.

L'aplicació de tractaments tèrmics com l'escaldat, pasteurització o esterilització provoquen la desnaturalització de l'enzim. La PPO mostra un comportament decreixent de l'activitat en funció del temps del tractament i la temperatura. Els tractaments tèrmics a 150°C que duren temps curts (segons fins a pocs minuts) o els tractaments d'escaldat (75-90°C durant 30-40 minuts) s'han utilitzat per inactivar enzims oxidases. La velocitat específica d'inactivació augmenta amb el increment de temperatura, sent la PPO menys termostable amb el increment de temperatura.

1.2.2.4 Tecnologia d'altres pressions

El processat a alta pressió s'aplica en la conservació d'aliments degut al seu efecte potencial sobre microorganismes i enzims. Una avantatge important d'aquesta tecnologia és que té efecte mínims sobre el gust i el valor nutricional del producte. La inactivació del enzim es produeix per danys a la membrana induït per la pressió, sent el pH i la temperatura del tractament dos paràmetres a tenir en compte, ja que tenen efectes sobre la estabilitat del enzim. Tant la PPO com la PRO son molt estables als tractaments de pressió (Hendrickx et al. , 1998), per tant, per millorar l'eficiència inhibidora sobre l'enfosquiment enzimàtic caldria complementar-ho amb altres tractaments com la refrigeració, l'ús d'atmosfera modificades, l'escaldat... Les pressions emprades varien depenent del enzim a inhibir.

1.2.2.5 Tractament amb camps elèctrics polsants (CEP)

El CEP es considerat un tractament no tèrmic degut al lleuger increment de la temperatura que té el producte durant el procés (Robles et al. , 2012). Aquest tractament consisteix en l'aplicació de polsos elèctrics molt curts d'alt voltatge per curts períodes de temps. L'efectivitat del tractament amb CEP depèn de diferents paràmetres i condicions com: la intensitat del camp, el ample, la freqüència del pols i el temps del tractament, així com el pH, la conductivitat i la composició del producte (Cerón et al. , 2010). Ginger et al. (2001), a l'aplicar tractaments de CEP amb una força de camp de 24,6 kV/cm i 31 kV/cm per temps entre 1-6 ms, van aconseguir reduir l'activitat de la PPO en poma tallada. L'aplicació de CEP comporta canvis mínims en les propietats sensorials i nutricionals dels productes.

1.2.2.6 Tècnica dels ultrasons

Els ultrasons es poden classificar per alta i baixa freqüència. Els d'alta freqüència operen en un rang de 2-20 Mhz mentre que els de baixa freqüència operen en un rang de entre 20-100 kHz.

La propagació d'ultrasons té el seu fonament en les ones de compressió-expansió que s'indueixen en les molècules del medi on viatja la ona. (Awad et al. , 2012).

Els efectes dels ultrasons sobre un sistema líquid està principalment relacionat al fenomen de cavitació.

La cavitació és el fenomen de la formació de microbombolles en un líquid durant la pressió negativa produïda per el cicle d'expansió alternada. Quan s'aplica una pressió negativa suficientment gran a un líquid, el augment de la distància entre molècules resulta en cavitats i a continuació es formen bombolles de cavitació. La pressió negativa requerida per produir la cavitació és proporcional a la força de tensió del líquid. Aquestes bombolles de cavitació creixen fins arribar a una mida crítica on la bombolla col·lapsa donant com a resultat una ràpida alliberació de l'energia emmagatzemada derivada dels ultrasons (Figura3).

Aquesta transitòria implosió cavitacional està altament localitzada i està associada a temperatures al voltant de 5000 °K i pressions pròximes als 1000 bar. Un altre fenomen resultant del col·lapse de la bombolla és el desenvolupant de forts micro-corrents que alteren les característiques del medi. Un altre efecte important és que les molècules d'aigua poden trencar-se i generar radicals lliures altament reactius, que poden reaccionar amb altres molècules i modificar-les. Els paràmetres que condicionen el seu efecte són: freqüència, la longitud i amplitud d'ona, la potència de sonicació i la intensitat, així com la forma de la sonda, la temperatura, temps de sonicació o el tipus de solvent utilitzat.

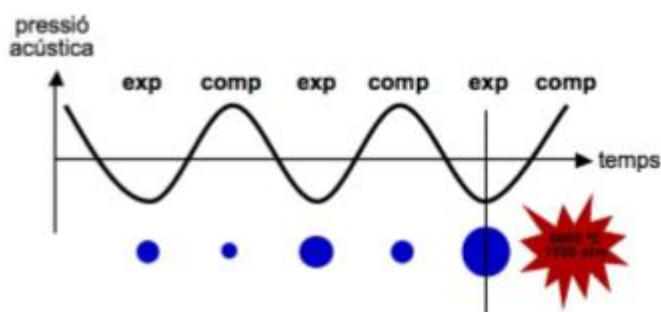


Figura 3. Implosió de les bombolles per cavitació.

Font: Adaptació Patist i Bates, 2008

Existeixen dubtes respecte el potencial dany oxidatiu associat als radicals lliures formats durant la sonicació. Segons Yeoh i Ali (2017), l'aplicació d'ultrasons als aliments és difícil d'estandarditzar ja que els estudis realitzats poden ser contradictoris en quant a la preservació de certs components, per exemple, la sonicació és un desavantatge per a la preservació dels fenols però pot millorar la eficiència com a antioxidant dels flavonoides. La oxidació causada pels radicals lliures pot ser beneficiosa per alguns tipus de xocolata i perjudicial per altres.

1.3 Aplicacions dels ultrasons a aliments

L'efectivitat dels ultrasons dependran de diferents factors com els mecanismes d'acció dels ultrasons o depenent de per a que siguin les aplicacions dels ultrasons.

Els mecanismes d'acció dels ultrasons es classifiquen en tèrmics (generació d'energia calòrica o mecànica) i no tèrmics (cavitació, rarefacció, formació de radicals lliures, xocs micro-mecànics i forces de radiació) Taula 1.

Taula 1. Mecanismes d'acció dels ultrasons.

Teoria	Mecanisme	Aplicacions	Referència
Cavitació	Expulsió mecànica per irrupció, a través de les bombolles localitzades amb altres temperatures (5500C°) i pressions (500MPa).	Processos de desinfecció, lisis cel·lular, bactericida i inactivació enzimàtica.	Piyasena et al.(2003)
Formació de radicals lliures	Sonòlisi de l'aigua que pot produir ions (OH- i H+) i peròxids d'hidrogen.	Inactivació microbiana i enzimàtica.	O'Donnell et al. (2010)
Xocs mecànics intracel·lulars	Ruptura de les cèl·lules i disminució del gruix de les parets cel·lulars.	Lisi cel·lular, inactivació enzimàtica i efecte antimicrobià.	O'Brien (2007) i Piyasena et al (2003)
Generació de energia calòrica i mecànica	Propagació de la ona, decreix la distància al ser aplicat en un material. La part que és absorbida es tradueix en calor.	Inactivació microbiana.	O'bien (2007)
Força de radiació	Moviment o vibració local d'un teixit per força de la radiació acústica.	Anàlisis clínics.	Delgado (2011)
Compressió i rarefacció	Micro-corrent acústica.	Inactivació microbiana i enzimàtica.	O'Donnell et al. (2010)

Algunes aplicacions dels ultrasons d'alta energia en la ciència i tecnologia dels aliments es poden veure a la Taula 2.

Taula 2. Aplicacions dels ultrasons d'alta energia en la ciència i tecnologia dels aliments.

Aplicació	Mecanisme	Avantatges
Extracció	L'energia generada pel col·lapse de les bombolles de cavitació produeix una millor penetració del dissolvent en el material cel·lular i millora la transferència de massa.	Augment de la eficiència d'extracció i del rendiment del dissolvent.
Emulsió o homogeneïtzació	Si una bombolla de cavitació col·lapsa prop de la superfície de la capa límit de dos líquids immiscibles, l'ona de xoc provoca la barreja de les dues capes, formant emulsions fines i estables.	Formació rentable de l'emulsió.

Cristal·lització	Nucleació i modificació de la formació de cristalls. S'usa per controlar la mida i la velocitat de formació de cristalls de gel en aliments congelats.	Formació de petits cristalls de mida uniforme que redueixen considerablement el dany cel·lular.
Filtració	Els ultrasons produeixen vibració per mantenir les partícules en suspensió i moviment, deixant canals oberts i lliures en el filtre per a la elució del dissolvent.	Prolongació de la vida útil del filtre degut a la contínua cavitació en la superfície del filtre que evita l'obstrucció d'aquest.
Separació	Els ultrasons condueixen la fase dispersa als nodes o antinodes del camp estacionari, mantenint així les gotes en posició i unides.	Ús auxiliar en procediments de separació no químics.
Alteració de la viscositat	Modificació sonoquímica que implica formació de xarxes i reestructuració.	Augmentar o disminuir la viscositat i donar efecte temporal o permanent.
Antiespumant	Ones àeries de pressió que causen el col·lapse de bombolles.	Reducció o eliminació de productes químics antiespumants.
Extrusió	Vibració mecànica, reducció de fricció.	Redueix la resistència i millora el comportament del flux, incrementant el rendiment.
Inactivació enzimàtica i microbiana	Augment de la transferència de calor i d'alta cisalla. Dany cavitacional directe en les membranes cel·lulars microbianes.	Inactivació enzimàtica per millorar atributs de qualitat. A temperatures elevades (>50°C), es debilita la membrana bacteriana i augmenta l'efecte de la cavitació deguda als ultrasons. Preservació qualitat (propietats fisicoquímiques, color i sabor) dels productes.
Fermentació	Els ultrasons usats com desgasificant, expulsen el CO ₂ (produït durant la fermentació) que normalment inhibeix la fermentació.	Acceleració dels processos fermentatius.
Transferència de calor	Millor transferència de calor a través de corrents acústiques i cavitació.	Acceleració de l'escalfament, refrigeració i assecat de productes a temperatura baixa. Conservació de la integritat del producte.

Font: Adaptació de Patist i Bates, 2008

1.3.1 Inactivació enzimàtica mitjançant l'ús ultrasons

La inactivació enzimàtica mitjançant ultrasons és el resultat de la desnaturalització de les proteïnes, ja sigui per forces de cisalla resultants de la formació i col·lapse de les bombolles de cavitació o per la formació de radicals lliures formats durant la sonòlisi (descomposició) de les molècules d'aigua. La inactivació enzimàtica s'incrementa al augmentar el poder ultrasònic, la freqüència, la intensitat de cavitació, la temperatura i la pressió del procés, però disminueix quan el volum a tractar augmenta (Gómez i López, 2009).

La eficiència de la inactivació enzimàtica mitjançant els ultrasons depèn de diversos factors, presentats a la Taula 3.

Taula 3. Eficiència de la inactivació enzimàtica en aliments.

Factors	Procés	Resultats
Potència US	Manotermosonicació a 20kHz i diferents temperatures i pressions (70°C/200kPa i a 130°C/500kPa)	La producció de radicals lliures (OH ⁻) es veu incrementada a 70°C mentre que a temperatures superiors és mínima.
	Sacarificació enzimàtica	Hidròlisi eficaç amb l'augment de intensitats ultrasòniques específiques.
Temperatura	Digestió ultrasònica	Augment del nombre de pèptids identificats al incrementar la temperatura.
	Inactivació enzimàtica	Al augmentar la temperatura augmenta la taxa d'inactivació.
	Producció de radicals lliures	Al augmentar la temperatura disminueix la producció de radicals lliures.
Temps	Inactivació enzimàtica	L'activitat decreix amb el temps de sonicació.
	Hidròlisi enzimàtica	Amb l'augment del temps de sonicació i la intensitat, es redueix el temps d'hidròlisi.
Freqüència	Inactivació enzimàtica en buffer fosfat	Major energia d'activació en ultrasons de baixa freqüència.
pH	Degradació ultrasònica	La taxa de degradació disminueix amb l'increment de pH.
	Manotermosonicació enzimàtica	Efecte sinèrgic del calor i les ones ultrasòniques és superior a pH àcids.
	Inactivació enzimàtica	A pH baixos, 4-5, l'activitat es veu reduïda augmentant l'inactivació, mentre que a pH superiors a 5 no té efecte.
	Inactivació enzimàtica en solucions buffer, pH 4,0-11,0 per la sonicació	Alta cinètica d'inactivació a pH<6 i pH>9.
Antioxidants	Inactivació enzimàtica	L'antioxidant disposa la inactivació de l'enzim tant a alta com a baixa freqüència.
	Estabilització enzimàtica	El polietilenglicol i l'alcohol polivinílic incrementa la estabilitat
	Inactivació enzimàtica amb àcid ascòrbic (1%)	El tractament combinat inactiva l'activitat de la PPO i PRO.
Radicals Lliures	Inactivació i agregació enzimàtica	Els radicals lliures formats durant la cavitació no afecten a la estructura de tots els enzims.
	Inactivació enzimàtica	Els radicals lliures estan relacionats en la inactivació ultrasònica dels enzims en solucions aquoses.

Font: Adaptació de Islam et al., 2014.

La presència d'antioxidants té un efecte sinèrgic en la inactivació enzimàtica mitjançant ultrasons. L'efecte del tractament combinat dels ultrasons amb un àcid, com és l'ascòrbic, pot inactivar la peroxidasa durant l'emmagatzematge de vegetals i fruites.

La velocitat d'inactivació de la peroxidasa decreix constantment amb el increment del valor del pH. A pH inferiors a 5, els radicals lliures generats durant la cavitació ultrasònica reaccionen ràpidament amb els residus d'aminoàcids funcionals situats a les zones actives de la peroxidasa. Per tant, els radicals lliures juguen un paper principal en la inactivació d'aquest enzim (Islam et al., 2014).

2. Objectius

El principal objectiu d'aquest estudi és avaluar l'eficiència de l'ús de banys d'ultrasons (42kHz) amb diferents solucions com mètode per reduir l'enfosquiment enzimàtic en la patata (*Solanum tuberosum*) tallada.

Objectius específics:

- Avaluar els canvis de pH i temperatura en les diferents solucions assajades en el bany d'ultrasons.
- Avaluar l'efecte de les solucions emprades en el bany d'ultrasons (aigua, àcid cítric 1% i àcid ascòrbic 1%) en la inactivació de la polifenoloxidasa i peroxidasa.
- Avaluar l'efecte del temps d'aplicació dels ultrasons (5, 10 i 20min) en cadascuna de les solucions en la inhibició dels enzims polifenoloxidasa i peroxidasa.
- Comprovar l'efecte dels ultrasons i solucions àcides emprades sobre el color en la patata tallada

3. Material i mètodes

3.1 Patata

L'experiment s'ha dut a terme amb patata fresca (*Solanum Tuberosum L.*) de la varietat monalisa adquirida en un supermercat de Castelldefels. Les patates es presenten en paquets de 3kg; el pes de cada patata oscil·lava entre 150-400 grams amb un calibre entre 50-90 mm. Des de la compra fins al processat, les patates van estar conservades a $2\pm 1^{\circ}\text{C}$. Per evitar la seva germinació es va mantenir en absència de llum. El temps de emmagatzemat no va superar els trenta dies.

3.2 Equips

L'equip d'ultrasons utilitzat és un sonicador Branson 2510 d'una capacitat de 2,8 litres amb un volum efectiu de 2 litres. Les dimensions del tanc són de 24x14,5x10 cm amb una potència de 130W i una freqüència de 42 kHz.



Imatge 1. Equip d'ultrasons. Branson 2510 42 kHz.

L'aparell està dissenyat amb un exterior de polipropilè amb controls resistents a líquids, el tanc en canvi, és d'acer inoxidable i compta amb una cistella de malla per a dipositar la mostra. La peça més important de l'aparell és el transductor, un component electromagnètic encarregat de generar els ultrasons, transformant l'energia elèctrica en mecànica i produint les vibracions en el bany, generant l'efecte de cavitació.

3.3 Disseny experimental

La quantitat de mostra utilitzada ha estat un total de 12 kg de patata varietat monalisa.

La patata va ser rentada i tallada prèviament al tractament de sonicació. La proporció patata/solució emprada per fer els tractaments va ser aproximadament 1/8 (300 grams de mostra en 2 litres d'aigua). Cada tractament amb l'aigua o les solucions d'àcid cítric 1% o àcid ascòrbic 1% combinats amb els diferents temps de sonicació (5, 10 i 20 minuts) es varen fer per triplicats.

Durant el tractament es va controlar l'evolució de la temperatura i el pH del medi i la temperatura, pH i %Ss de la mostra. Després de la sonicació es va quantificar el color i l'activitat enzimàtica de la mostra (PPO i PRO). Com a control s'utilitza patata fresca tallada i exposada a l'aire durant els diferents temps assajats amb ultrasons.

A continuació en la figura 4 es representa un diagrama de flux que indica les etapes del procés i les determinacions realitzades tant a les solucions com a la patata durant el procés experimental.

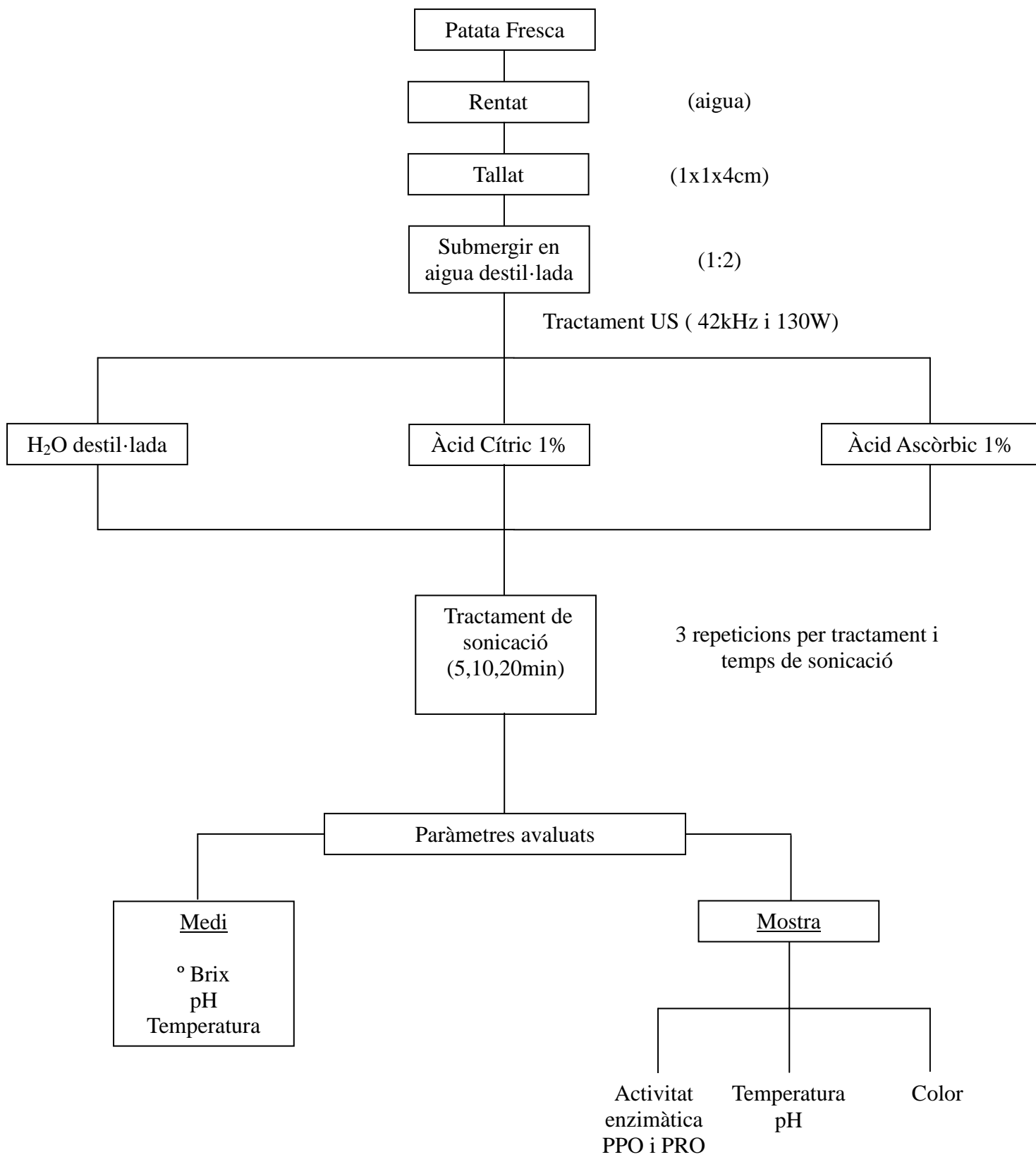


Figura 4. Disseny experimental emprat en el treball.

3.4 Mètodes analítics

3.4.1 Bany d'ultrasons

3.4.1.1 Temperatura, sòlids solubles i pH

La temperatura s'han mesurat amb un termòmetre d'alcohol i s'ha fet un seguiment de la temperatura de cada solució per cada temps de sonicació i repetició.

La mesura de sòlids solubles en les diferents solucions després de la sonicació s'ha fet amb un refractòmetre digital ATAGO Pocket PAL-1 de rang (0,0 a 53,0 ± 0,2 ° Brix), calibrat amb aigua destil·lada.

El pH de l'aigua i les solucions àcides s'ha mesurat tant en el moment inicial abans del tractament com en cada temps de sonicació establert. Es va fer servir un pH-metre CRISON BASIC 20 i GPL 22 amb un sonda CRISON 52-01, calibrat diàriament.

3.4.2 Mostra de patata

3.4.2.1 Temperatura

Per mesura l'evolució de la temperatura de la patata degut al tractament s'ha utilitzat un aparell amb cinc sondes que realitzen una lectura cada cinc segons. En els tractaments de la patata tallada a tires les sondes es situen en el centre.

3.4.2.2 Color

La determinació del color es mesura mitjançant un colorímetre Minolta CR-400 dins l'espai CIELab. 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 de L*, a* i b* i les formules proposades per Wrolstad & Smith, (2010) s'obtenen els paràmetres de h*(angle Hue), C*(Chroma) i el IC (Índex de color).

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

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

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

L'anàlisi del color es va dur a terme amb la mostra de patata crua i després de realitzar el tractament de sonicació de forma immediata per evitar l'exposició prolongada de la mostra a l'oxigen que pot provocar enfosquiment. Es van realitzant 6 lectures per cada temps d'exposició als ultrasons i per cadascuna de les 3 rèpliques efectuades.

3.4.2.3 Determinació de les activitats enzimàtiques polifenoloxidasa i peroxidasa

Per veure l'efecte inhibitor de les solucions i dels ultrasons sobre l'enfosquiment enzimàtic es varen realitzar 3 tractaments diferents:

- Àcid cítric 1% (pH = 1,7)
- Àcid ascòrbic 1% (pH = 2,4)
- Aigua destil·lada (pH = 6,2)

A) Extracció: Es pesen $3 \pm 0,001$ g de mostra de patata tallada i tractada. A continuació s'homogeneïtza la mostra amb 18 mL de tampó sodi-fosfat (tampó McIlvaine 50 mM a pH 6 que conté 50g/L de polivinilpirrolidona) durant 2 minuts. Quan la mostra ja està homogeneïtzada es centrifuga l'extracte durant 20 minuts a 9500 rpm a una temperatura de 2°C. Seguidament es filtra en un tub FALCON de plàstic de 12mL. A continuació s'analitza l'extracte mantingut a temperatura de refrigeració per reduir al mínim l'activitat dels enzims. L'extracte obtingut ens servirà per determinar l'activitat de la PPO i PRO per colorimetria.

B) Quantificació de l'activitat enzimàtica:

- B1) Quantificació de la polifenoloxidasa (PPO)

S'introdueixen en una cubeta 1200µL d'extracte, 1000µL de tampó sodi-fosfat 50mM i 200µL de catecol 20mM. Un cop els reactius son barrejats en la cubeta es fa una lectura de l'absorbància cada 30 segons, durant 10 min a una longitud d'ona $\lambda=410$ nm. Paral·lelament es fa un control amb els mateixos reactius substituint l'extracte per el mateix volum d'aigua destil·lada, aquest control ens servirà per posar l'aparell a 0 d'absorbància

- B2) Quantificació de la peroxidasa (PRO)

S'utilitzen 1200µL d'extracte, 1000µL de guaiacol 40 mM i 400µL de peròxid d'hidrogen 26mM , fent una lectura cada 30 segons, durant 10 minuts a una longitud d'ona $\lambda=420$ nm. Paral·lelament es fa un control amb els mateixos reactius substituint l'extracte per el mateix volum d'aigua destil·lada, aquest control ens servirà per posar l'aparell a 0 d'absorbància.

En la figura 5 s'observa l'activitat enzimàtica de la PPO i la PRO de una mostra de patata sense tractar.

Activitat enzimàtica

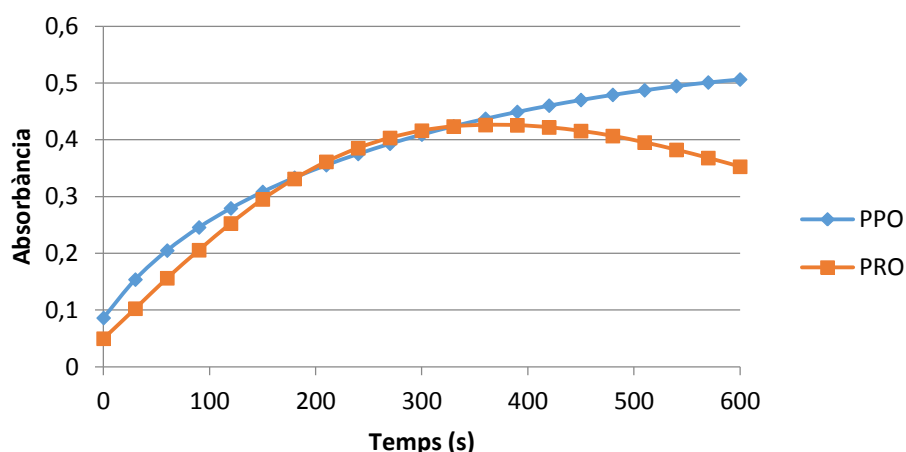


Figura 5. Activitat enzimàtica de la PPO i PRO d'una mostra de patata sense tractament.

Percentatge d'inhibició de l'activitat enzimàtica

S'ha fet ús de l'equació (Manohan i Wong, 2012) per calcular el percentatge d'inhibició de l'activitat de la PPO i la PRO per l'efecte de les diferents solucions utilitzades i/o a la sonicació.

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

On la A_0 és l'activitat inicial de la mostra sense tractar i A_1 és l'activitat inicial de la mostra tractada, ambdós a cada temps d'exposició.

Per calcular les unitats d'activitat enzimàtica s'ha fet un reajustament de les línies de tendència de tipus polinòmica d'ordenació 2 dels gràfics d'absorbància enfront el temps. Considerant que una unitat d'activitat enzimàtica (UA) tant per la PPO com la PRO, és definida per Yeoh Ali (2017) com la quantitat d'enzim que incrementa l'absorbància en $0,001 \text{ min}^{-1}$ sota condicions d'assaig.

3.4.3 Anàlisi estadístic

Amb els valors obtinguts s'ha fet un tractament estadístic utilitzant el programari Minitab 17 *Statistical Software*, el nivell de significació en tots els casos ha estat de $\alpha=0,05$.

S'han realitzat anàlisis de variància (ANOVA) d'un factor i anàlisis de model lineal general (GLM) tant en els paràmetres de color com en els de pH, temperatura i percentatge de sòlids solubles, enfront els diferents tractaments i temps de sonicació. En el cas dels valors significatius, s'ha utilitzat la prova de comparació múltiple de Tukey amb un nivell de confiança del 95% per observar les diferències entre tractaments i temps de sonicació.

4. Resultats i Discussió

A continuació es detallen els resultats obtinguts durant la part experimental com a mitjana de tres rèpliques de mostres sonicades o amb la mostra fresca en diferents medis i temps i dels diferents paràmetres avaluats en les solucions emprades en el bany d'ultrasons.

4.1 Evolució de la temperatura, pH i contingut de sòlids solubles durant l'aplicació d'ultrasons

4.1.1 Evolució del pH

S'ha observat que el tractament d'ultrasons no afecta al pH de la solució al final del tractament, però en canvi sí afecta al pH de la mostra. Seguidament s'ha avaluat quines han sigut les variacions del pH en la patata a partir les diferents solucions al aplicar els ultrasons durant els diferents temps d'exposició (Taula 4).

Taula 4. Evolució del pH per efectes del temps de sonicació i solució utilitzada.

	Solució	Patata			
	pH inicial	pH			
	-	0 min	5 min	10 min	20 min
Aigua	6,2 ± 0,1		6,23 ± 0,05 B	6,31 ± 0,06 AB	6,34 ± 0,04 A
Àcid Cítric (1%)	1,7 ± 0,1	6,3 ± 0,15	5,72 ± 0,02 E	5,40 ± 0,09 F	5,25 ± 0,03 G
Àcid Ascòrbic (1%)	2,4 ± 0,2		6,04 ± 0,02 C	5,90 ± 0,04 D	5,83 ± 0,09 D

Nota. Els valors de les mitjanes ± desviació estàndard que no comparteixen lletra són significativament diferents ($p < 0,05$) entre ells.

La solució d'àcid cítric (1%) amb un valor de pH de 1,7 és la solució amb el pH més baix i és la que produeix una disminució estadísticament significativa del pH de la mostra en tots els temps de sonicació aplicats. Aquesta baixada de pH de la mostra pot atribuir-se a l'efecte conjunt del fenomen de cavitació provocat per la sonicació i al pH àcid de la solució. Els valors de pH són diferents significativament ($p < 0,05$) a nivell de solució (tractaments) i de temps d'exposició als ultrasons aplicats a un mateix tractament (Taula 4).

4.1.2 Evolució de la temperatura

En la figura 6 es mostra l'evolució de la temperatura de les solucions emprades i de la mostra de patata respecte els diferents temps de sonicació.

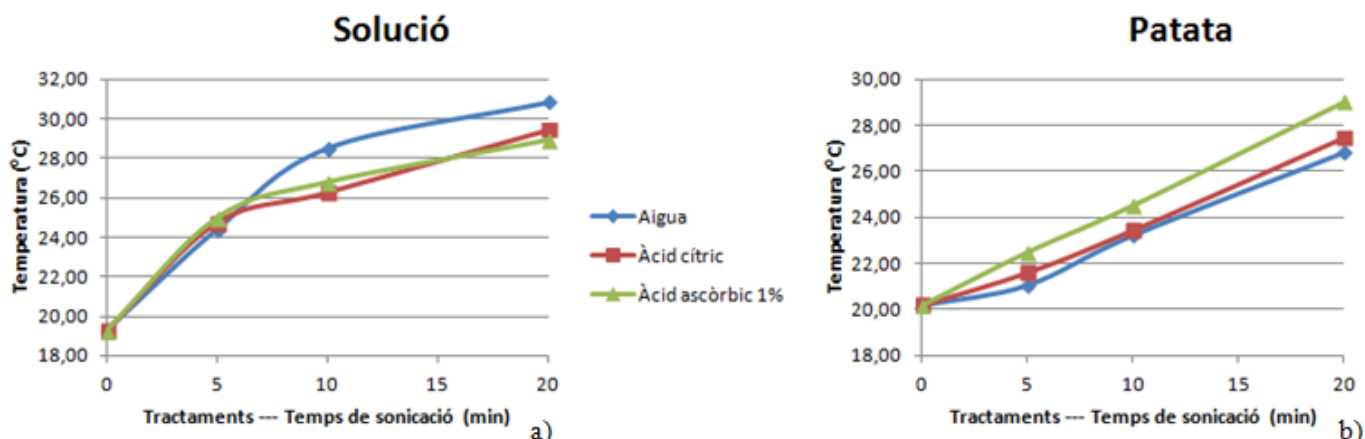


Figura 6. a)Evolució de la temperatura de les diferents solucions i el temps de sonicació aplicat. b)Evolució de la temperatura interior de la patata depenent de la solució i el temps de sonicació emprats.

Les temperatures de les solucions (figura a)) tenen el major increment de la temperatura als 5 minuts de sonicació, a partir dels 5 minuts, les solucions àcides augmenten menys de temperatura respecte l'aigua que té el valor més alt (31°C) als 20 minuts de tractament patint un increment de 11,5°C respecte la temperatura inicial. Com es pot veure a la figura 6 b) a més temps de sonicació la temperatura a l'interior de la mostra augmenta, però no s'observa que en el cas de l'aigua pateixi increments de temperatura superiors que les altres solucions tal com passava en les solucions soles. La solució amb àcid ascòrbic és la que presenta un valor més alt de la temperatura de la mostra en tots els temps de sonicació assajats arribant als 29°C als 20 minuts de sonicació.

En la taula 5 es compara els diferents tractaments per a cada temps de sonicació de la temperatura de les solucions.

Taula 5. Comparació dels tractaments i els temps de sonicació de la temperatura de les solucions pel mètode Tukey.

tractament*temps de sonicació	N	Mitjana	Agrupació		
Aigua 20 min	3	30,83	A		
Àcid cítric 20 min	3	29,43	A	B	
Àcid ascòrbic 20 min	3	28,90	B		
Aigua 10 min	3	28,50	B		
Àcid ascòrbic 10 min	3	26,77	C		
Àcid cítric 10 min	3	26,27	C		
Àcid ascòrbic 5 min	3	24,97	D		E
Àcid cítric 5 min	3	24,73	D		E
Aigua 5 min	3	24,40	E		
Aigua 0 min	3	19,27	F		
Àcid cítric 0 min	3	19,17	F		
Àcid ascòrbic 0 min	3	19,00	F		

Nota. Agrupació de les mitjanes de les temperatures de la solució utilitzant el mètode Tukey amb una confiança del 95%.

La temperatura de les solucions (taula 5) es veu afectada significativament ($p < 0,05$) per els diferents temps de sonicació, però no s'han trobat diferències significatives entre els tractaments emprats. Al aplicar els ultrasons es produeix el fenomen de cavitació que comporta en si un alliberament d'energia i per tant un augment localitzat de la temperatura, per aquest motiu en tots els tractaments la temperatura de les diferents solucions augmenta i com a conseqüència es produeix un increment de la temperatura de la mostra.

4.1.3 Efectes del tractament sobre els sòlids solubles

En el cas dels sòlids solubles no es veuen diferències significatives ($p < 0,05$) de cap tractament.

Taula 6. Efecte del tractament sobre el percentatge de sòlids solubles per efecte del temps de sonicació i solució utilitzada.

% Sòlids solubles	Tractament	Temps de sonicació (min)			
		0	5	10	20
	Aigua	ND	ND	ND	ND
	Àcid cítric (1%)	1,17 ± 0,12	1,13 ± 0,06	1,1 ± 0,1	1,03 ± 0,06
	Àcid ascòrbic (1%)	1,23 ± 0,15	1,23 ± 0,06	1,13 ± 0,06	1,13 ± 0,15

Com es pot veure en la taula 6, només es va poder determinar els percentatges de sòlids solubles àcides, sent que el contingut en l'aigua no es detecta. Pels valors obtinguts no sembla que el temps de sonicació comporti un increment de sòlids solubles en la solució.

4.2 Efectes de la sonicació i les solucions àcides sobre l'enfosquiment enzimàtic en la patata tallada

L'estudi pretén determinar l'efecte del temps d'exposició als ultrasons i de les solucions sobre l'activitat de la PPO i PRO.

4.2.1 Efecte dels diferents tractaments en la cinètica de la reacció de la polifenoloxidasa (PPO)

En la Figura 7 (a,b i c) es pot observar que les mostres de patata sense tractar presenten absorbàncies superiors a les mostres que han rebut el tractament de sonicació, però el seu comportament varia segons la solució emprada en el bany d'ultrasons. També es pot observar que, en general, no hi ha una relació directe entre el temps de sonicació i l'activitat enzimàtica.

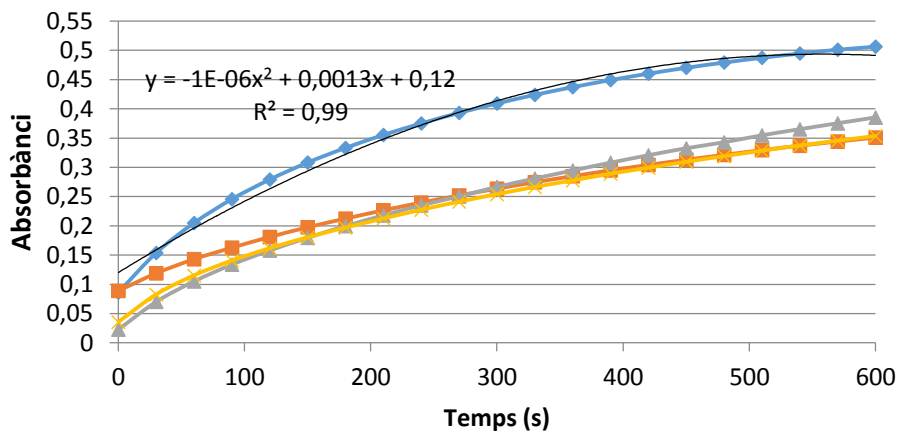
En la Figura 7; a (bany d'ultrasons amb aigua), el temps de sonicació no té repercussió sobre l'activitat enzimàtica ja que les lectures són similars entre elles. A major temps de sonicació no es produeix una disminució de l'activitat enzimàtica.

En els tractaments amb solucions àcides Figura 7; b (bany d'ultrasons amb àcid cítric 1%) i c (bany d'ultrasons amb àcid ascòrbic 1%), el comportament és semblant al tractament amb aigua, però es veu un efecte diferencial del temps de sonicació als 20 minuts ja que s'observa un augment de l'activitat enzimàtica respecte als tractaments de 5 i 10 minuts de sonicació; resultats similars obtinguts per altres autors quan apliquen ultrasons a suc de meló cantaloupe (Fonteles et al. (2012)) i suc de poma (Balsar, Ertugay (2013)). El tractaments de 5 i 10 minuts en les dues solucions àcides tenen un efecte semblant en la disminució de l'activitat de la PPO i són valors inferiors al tractament amb aigua. El tractament amb àcid ascòrbic a temps de sonicació més baixos 5-10 minuts, són els que disminueixen més l'activitat de la PPO respecte la mostra sense tractar i la resta de tractaments.

També amb la solució d'ascòrbic, a temps de sonicació de 5 i 10 minuts l'activitat enzimàtica té un comportament anòmal on inicialment es detecta una espècie d'inhibició ja que pràcticament no es mostra absorbència.

Segons Robinson i Eskin (1991), el pH òptim per la PPO en patates és entre 5.0 i 7.0, això fa visible que els tractaments que disminueixen més l'activitat enzimàtica respecte la mostra sense tractar es trobin en els banys amb solucions àcides i no en el bany d'ultrasons amb aigua.

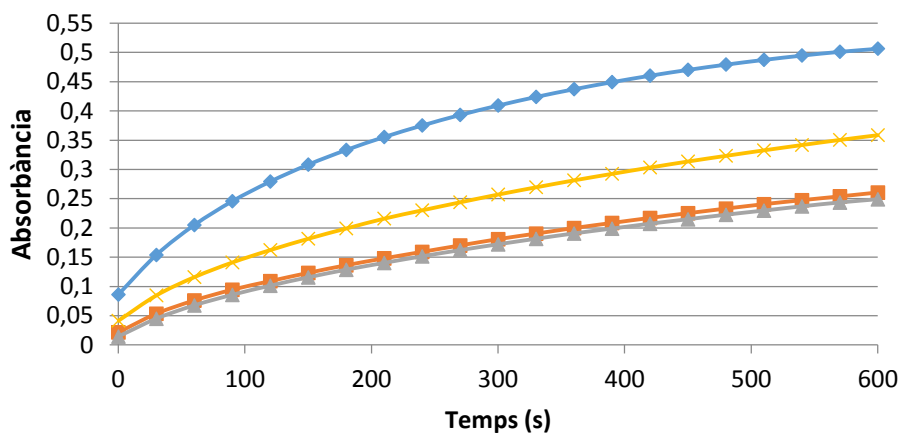
Activitat enzimàtica (PPO): Aigua



a

Control 5 min 10 min 20 min Polinòmica (Control)

Activitat enzimàtica (PPO): Àcid cítric



b

Control 5 min 10 min 20 min

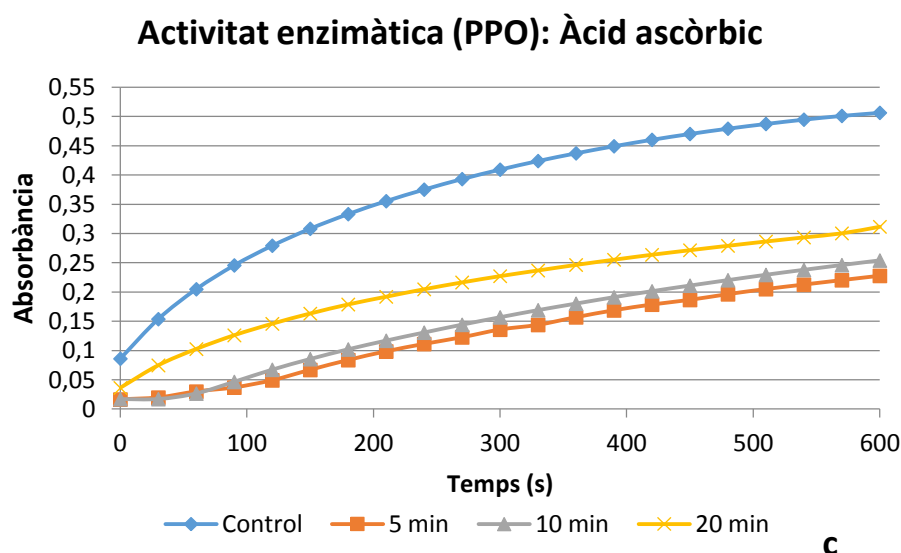


Figura 7. Efecte del temps de sonicació i la solució emprada; aigua (a), àcid cítric (b) i àcid ascòrbic (c) en l'activitat de la PPO. El control és la patata sense tractar exposada a l'aire.

Per tal de calcular les unitats d'activitat enzimàtica de la PPO, s'ha dut a terme un reajustament de les rectes agregant una línia de tendència de tipus polinòmica de grau 2. Les equacions de les rectes obtingudes es troben a la taula 7.

Taula 7. Equacions de la recta per cada tractament i temps (minuts) de sonicació.

Temps (min)	Tractament		
	Aigua	Àcid cítric	Àcid ascòrbic
5	$y = -5E-07x^2 + 0,0007x + 0,1001$ $R^2 = 0,9975$	$y = -4E-07x^2 + 0,0006x + 0,0359$ $R^2 = 0,9954$	$y = -2E-07x^2 + 0,0005x + 0,0037$ $R^2 = 0,9957$
10	$y = -7E-07x^2 + 0,0009x + 0,0446$ $R^2 = 0,9951$	$y = -4E-07x^2 + 0,0006x + 0,028$ $R^2 = 0,9954$	$y = -3E-07x^2 + 0,0006x + 0,0023$ $R^2 = 0,9966$
20	$y = -6E-07x^2 + 0,0008x + 0,0593$ $R^2 = 0,9926$	$y = -6E-07x^2 + 0,0008x + 0,0618$ $R^2 = 0,9944$	$y = -6E-07x^2 + 0,0008x + 0,0554$ $R^2 = 0,9919$
Control (patata sense tractar): $y = -1E-06x^2 + 0,0013x + 0,12$ $R^2 = 0,99$			

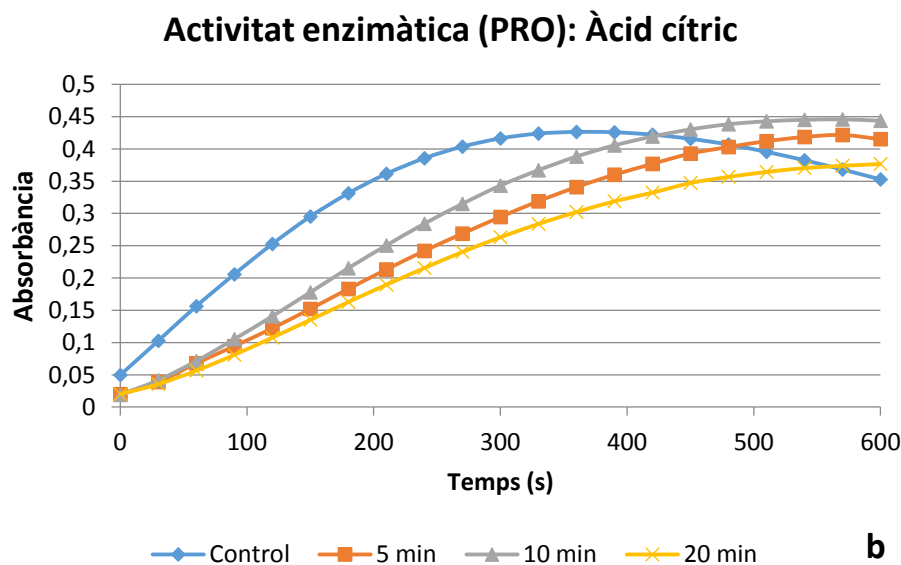
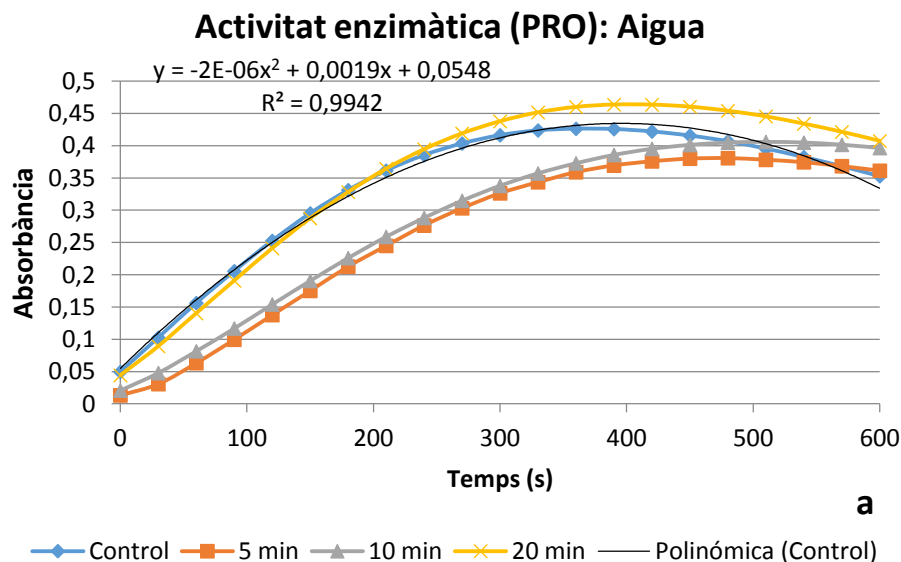
4.2.2 Efecte dels diferents tractaments en la cinètica de la reacció de la peroxidasa (PRO)

En el cas de la peroxidasa (Figura 8), els comportaments de les activitats enzimàtiques enfront els tractaments i temps de sonicació tenen un comportament diferent a les de la polifenoloxidasa.

En el cas del tractament amb aigua (Figura 8; a), els diferents temps de sonicació tenen una activitat enzimàtica inferior a les mostres de patata sense tractar, tot i que a 20 minuts de sonicació es pot observar que la inactivació del enzim és mínima. L'activitat enzimàtica de la PRO als 20 minuts de sonicació és la més alta en el tractament amb aigua i respecte els tractaments amb les solucions àcides. Els tractaments a 5-10 minuts de sonicació són molt similars mentre que en el tractament amb aigua s'observa una major activitat de la PRO ja que l'enzim es troba aproximadament en el seu rang de pH òptim, entre 4,0 i 6,0 (Fennema et al. , 2008).

En el tractament amb àcid cítric 1% (Figura 8; b) a més temps de sonicació l'activitat de la PRO es veu més afectada i disminueix. Aquest tractament dóna menors activitats que el realitzat amb aigua.

El tractament en que s'afegeix àcid ascòrbic a concentració 1% (Figura 8; c) el temps de sonicació més rellevant és a 20 minuts, on l'activitat de la PRO s'inhibeix per complet. A un major temps de sonicació comporta una major disminució de l'activitat enzimàtica encara que a temps de sonicació inferiors als 10 minuts no hi ha una variació molt visible en la reducció de l'activitat. Aquest tractament és el que dóna millors resultats per la reducció de l'activitat de la PRO respecte els altres (aigua i cítric 1%).



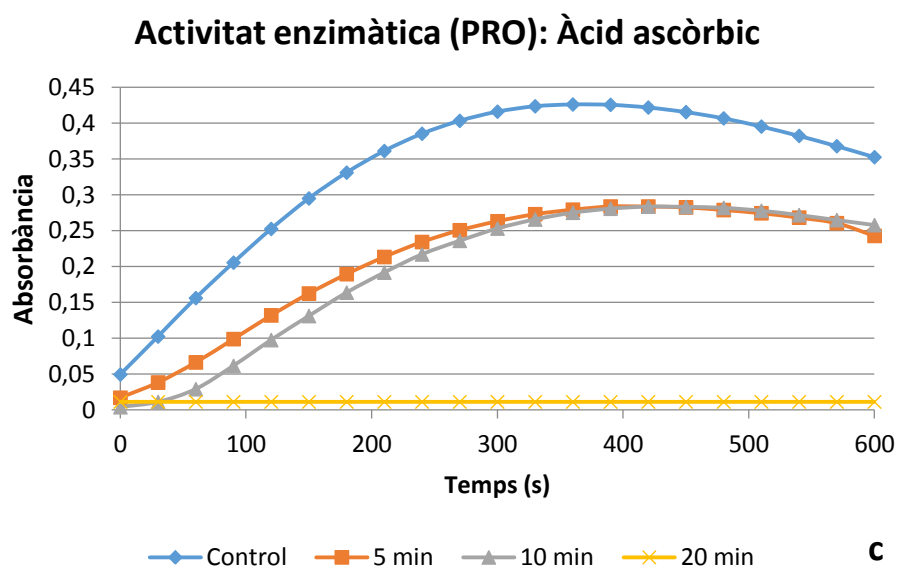


Figura 8. Efecte del temps d'aplicació d'ultrasons en l'activitat de la PRO en patata a diferents solucions: aigua (a), àcid cítric (b) i àcid ascòrbic (c).

Per tal de calcular les unitats d'activitat enzimàtica de la PRO, s'ha dut a terme un reajustament de les rectes agregant una línia de tendència de tipus polinòmica de grau 2 (Taula 8)

Taula 8 Equacions de la recta per cada tractament i temps (minuts) de sonicació.

Temps (min)	Tractament		
	Aigua	Àcid cítric	Àcid ascòrbic
5	$y = -2E-06x^2 + 0,0016x - 0,0169$ $R^2 = 0,994$	$y = -9E-07x^2 + 0,0012x - 0,0025$ $R^2 = 0,9951$	$y = -2E-06x^2 + 0,0013x + 0,0023$ $R^2 = 0,9964$
10	$y = -1E-06x^2 + 0,0016x + 8E-05$ $R^2 = 0,9971$	$y = -1E-06x^2 + 0,0015x - 0,0098$ $R^2 = 0,9949$	$y = -1E-06x^2 + 0,0014x - 0,0292$ $R^2 = 0,988$
20	$y = -2E-06x^2 + 0,002x + 0,0343$ $R^2 = 0,9976$	$y = -7E-07x^2 + 0,0011x - 0,0017$ $R^2 = 0,9955$	-
Control (patata sense tractar): $y = -2E-06x^2 + 0,0019x + 0,0548$ $R^2 = 0,9942$			

En resum, les solucions utilitzades i els temps de sonicació emprats no segueixen el mateix comportament en l'activitat de la PPO i la PRO. La reducció de l'activitat enzimàtica és major al utilitzar els tractaments amb solucions àcides que no amb aigua. En la PPO a major temps de sonicació hi ha un increment de l'activitat fent que el tractament sigui menys efectiu i per tant s'hauran de realitzar sonicacions de curta durada. Per la PRO els tractaments amb solucions àcides a major temps de sonicació l'activitat del enzim és menor, aquí els temps de sonicació es buscarà que siguin de més llarga durada. Per a la PPO i PRO el millor tractament és l'ús d'ultrasons combinat amb la solució d'àcid ascòrbic 1%.

4.2.3 Percentatge d'inhibició de l'activitat enzimàtica en la patata tallada

Per tal de saber l'efecte inhibitor del bany d'aigua amb ultrasons o de les solucions àcides sobre l'activitat enzimàtica inicial, s'ha calculat els percentatge d'inhibició dels dos enzims (PPO i PRO) respecte a les mostres sense tractar (Figura 9 i Figura 10). El càlcul del percentatge d'inhibició de la PPO i PRO s'ha fet a partir de les unitats d'activitat enzimàtica (UA) obtinguts del reajustament de la recta d'absorbància enfront al temps. S'ha fet ús de la equació (Manohan i Wong, 2012) per calcular el percentatge d'inhibició de l'activitat de la PPO i la PRO. Es considera com a referència (100% d'activitat enzimàtica) la mostra de patata sense tractar.

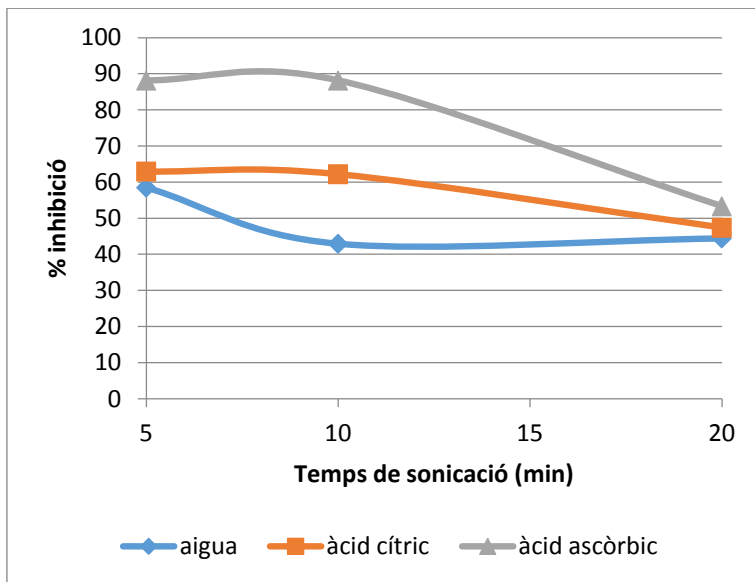


Figura 9. Percentatge d'inhibició de l'activitat de la PPO de les diferents solucions emprades on s'han aplicat ultrasons respecte a la patata fresca tallada (aire).

En el cas de la PPO en els tractaments d'ultrasons amb solucions àcides hi ha una major inhibició respecte el tractament d'ultrasons amb aigua quan la sonicació s'ha aplicat durant un període curt de temps (5 i 10 minuts). Si s'augmenta el temps de sonicació fins als 20 minuts s'aconsegueix un efecte contrari i l'efectivitat de tots els tractaments sobre la PPO disminueix. En general, als 20 minuts de sonicació s'observen inhibicions entre els 44-55% respecte al control en tots els tractaments assajats (Figura 9).

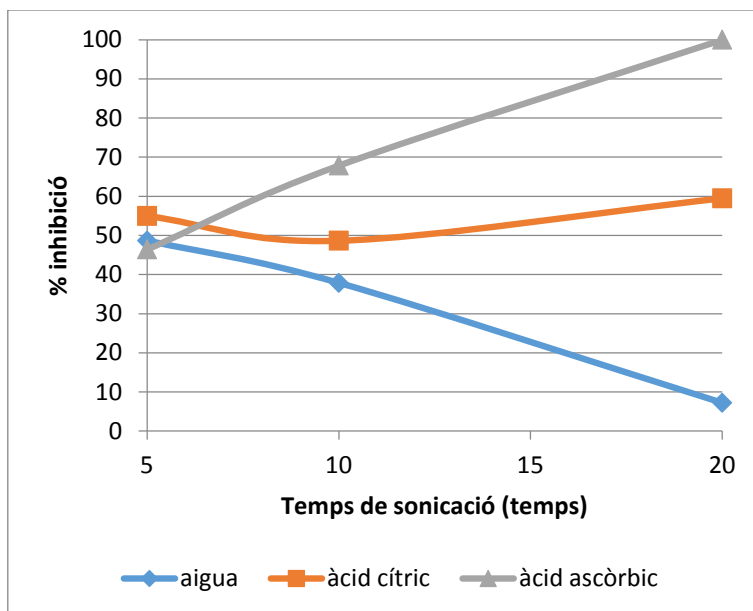


Figura 10. Percentatge d'inhibició de l'activitat de la PRO de les diferents solucions emprades on s'han aplicat ultrasons respecte a la patata fresca.

Pel que fa referència a la inhibició de la PRO el comportament és oposat al de la PPO, ja que a mesura que augmenta el temps de sonicació les diferències són més grans entre els tractaments. Mentre en el cas de la solució d'àcid cítric la inhibició de la PRO quasi bé no es veu afectada pel temps de sonicació aplicat, en el cas de la solució d'àcid ascòrbic la inhibició va augmentant amb el temps de sonicació arribant als 20 minuts de tractament pràcticament a una completa inhibició. L'ús d'aigua té un comportament oposat a la solució d'àcid ascòrbic arribant als 20 minuts on no causa quasi inhibició (7%) respecte a la mostra control sense tractar.

Aquest efecte inhibidor observat respecte la patata tallada mantinguda a l'aire és degut a la combinació de diferents factors:

- Aigua: pressió osmòtica, difusió del oxigen
- Àcid ascòrbic: efecte del pH (2,3) conjuntament amb l'efecte antioxidant i el ús d'un bany d'ultrasons
- Àcid cítric: efecte del pH (1,7) conjuntament amb l'efecte quelant i el del bany d'ultrasons
- Temps d'aplicació dels ultrasons: increment de temperatura de la solució (5, 8 i 11°C als 5, 10 i 20 minuts d'aplicació respectivament)

En el bany d'ultrasons en aigua la PPO i PRO només rebrà l'efecte inhibidor dels ultrasons més l'efecte de l'aigua conjuntament amb el increment de temperatura. Si es resta aquest efecte a les solucions àcides es podrà obtenir una idea aproximada de l'efecte inhibitori atribuïble al bany d'ultrasons (Taula 9).

Taula 9. Percentatge d'inhibició de la PPO i PRO deguda al efecte de les solucions àcides i/o dels ultrasons més l'aigua.

Tractament	Temps sonicació	% inhibició PPO		% inhibició PRO	
		Efecte solucions àcides	Efecte ultrasons	Efecte solucions àcides	Efecte ultrasons
Àcid cítric 1%	5 min	6,4	93,6	11,0	89,0
	10 min	30,6	69,4	22,5	77,5
	20 min	6,4	93,6	88,1	11,9
Àcid ascòrbic 1%	5 min	32,9	67,1	-	100,0
	10 min	50,2	48,9	44,1	55,9
	20 min	17,0	83,0	93,0	7,0

A l'afegir una solució àcida combinada amb els ultrasons, es contribueix a la disminució del pH tant de la solució com de la mostra de patata. Conseqüentment tots els valors de l'activitat enzimàtica d'aquestes mostres sonicades (excepte la de l'àcid ascòrbic a 5 minuts de sonicació) disminueixen respecte al tractament amb aigua aconseguint així una major inhibició. Com s'observa a la taula 9, el percentatge d'inhibició degut al bany d'ultrasons més aigua en general és superior a l'efecte produït per les solucions àcides, excepte als 10 minuts en que l'efecte de les solucions àcides s'incrementa.

A la taula 9 pel cas de la PRO es pot observar que a mesura que incrementa el temps d'aplicació dels ultrasons l'efecte inhibidor degut a les solucions emprades s'inverteix. Mentres a temps baixos (5 minuts) l'inhibició es deu majoritàriament a l'efecte dels ultrasons més l'aigua. A mesura que incrementa el temps de sonicació s'incrementa l'efecte de l'ús de la solució àcida utilitzada (àcid cítric i àcid ascòrbic).

4.3 Avaluació dels diferents paràmetres del color

A continiació es pot observar l'evolució dels diferents paràmetres del color per cada tractament i temps emprats (taula 10), l'efecte del tractament (taula 11) i l'efecte de sonicació en el color (taula 12). El tractament estadístic realitzat és un anàlisi de variància (ANOVA) i anàlisi de model lineal general (GLM).

Com es pot veure, l'aplicació d'ultrasons i les diferents solucions (aigua i solucions àcides) comporta un increment significatiu ($p < 0,05$) de la lluminositat respecte a la mostra fresca sense tractar cosa que indica una major brillantor en les mostres tractades, sobretot aquest increment és significativament superior als demés quan s'apliquen 20 minuts de sonicació en el tractament amb àcid ascòrbic. En el chroma (saturació) el angle de hue (matís) i l'índex de color també es veuen afectat sobretot en les solucions àcides.

Taula 10. Evolució de la lluminositat (L^*), Chroma (C^*), hue (h^*) i índex de color (IC) en patata tractada i sense tractar amb ultrasons a diferents temps de sonicació i en les diferents solucions.

Tractament	Temps US (min)	L^*	C^*	h^*	IC	ΔE
Sense Tractar	0	63,26	35,34	88,49	-0,78	47,81
	5	65,33 B	34,68 AB	88,49 A	-0,98 BC	46,59 AB
Aigua	10	67,7 AB	38,42 A	88,49 A	-0,93 BC	49,33 A
	20	67,39 AB	34,86 AB	88,49 A	-0,96 BC	48,43 A
	5	67,37 AB	37,06 A	88,49 A	-1,03 C	49,41 A
Àcid cítric 1%	10	67,33 AB	26,59 BC	88,48 A	-0,88 B	47,47 AB
	20	67,9 AB	25,97 BC	88,49 A	-0,92 BC	47,44 AB
	5	65,66 B	26,73 BC	88,49 A	-0,93 BC	45,18 B
Àcid ascòrbic 1%	10	66,99 B	26,71 BC	88,48 A	-0,85 B	47,3 AB
	20	69,47 A	23,32 C	88,47 A	-0,72 A	49,34 A

Nota. Les dades corresponen a la mitjana ($n=18$). Els valors de les mitjanes que no comparteixen lletra són significativament diferents ($p < 0,05$). US = Ultrasons

Taula 11. Efecte de les solucions emprades en els diferents paràmetres del color.

Tractament	L^*	C^*	h^*	IC	ΔE
Aigua	66,81 A	35,98 A	88,49 A	-0,96 B	48,12 A
Àcid cítric 1%	67,53 A	29,87 B	88,49 A	-0,94 B	48,10 A
Àcid ascòrbic 1%	67,37 A	25,59 C	88,48 A	-0,83 A	47,27 A

Nota. Les dades corresponen a la mitjana ($n=18$). Els valors de les mitjanes que no comparteixen lletra són significativament diferents ($p < 0,05$).

Si mirem únicament l'efecte de les solucions es pot veure que la lluminositat no es veu afectada significativament però sí que hi ha una disminució del chroma amb l'ús de les solucions àcides. En el cas de l'angle hue només es veu afectat per les solucions d'àcid ascòrbic (taula 11). També hi ha una lleugera variació del índex de color. L'aplicació dels ultrasons combinat amb les solucions àcides comporta variacions significatives de l'índex de color, especialment més notoris pel cas de l'àcid ascòrbic, indicant una menor tendència al enfosquiment (IC entre -2 i +2 correspon al verdós-groc).

Taula 12. Efecte del temps de sonicació en es diferents paràmetres del color.

Temps (min)	L*	C*	h*	IC	ΔE
5	66,12 B	32,82 A	88,49 A	-0,98 B	47,06 B
10	67,34 A	30,57 AB	88,48 A	-0,89 A	48,03 AB
20	68,25 A	28,05 B	88,48 A	-0,87 A	48,41 A

Nota. Les dades corresponen a la mitjana (n=18). Els valors de les mitjanes que no comparteixen lletra són significativament diferents ($p < 0,05$).

El temps de sonicació afecta al color si s'aplica a temps més llargs, a partir dels 10 minuts es pot veure en el cas de la lluminositat, l'angle hue i l'índex de color mentre que als 20 minuts es veu afectat significativament el chroma.

Els estudis sobre l'associació entre l'activitat de la PPO i els canvis en el color difereixen entre els autors. D'acord amb Severini et al., les mesures de color es podrien considerar com un índex indirecte de l'activitat de la PPO. Cabezas-Serrano et al., també va dir que hi ha una correlació negativa entre els valors de la L* i la b* amb l'activitat de la PPO. Per altre banda, Cantos et al., no va observar ninguna correlació entre el patró de l'activitat de la PPO de les patates mínimament processades i la susceptibilitat al enfosquiment.

5. Conclusions

A partir dels resultats obtinguts es pot concloure que:

- L'aplicació d'ultrasons amb aigua o solucions àcides d'àcid cítric o àcid ascòrbic al 1% comporta un increment de temperatura de la solució entre 5-11,5°C segons el temps de sonicació aplicat, el pH de la patata en les solucions àcides decreix entre 0,5-1 unitats a temps llargs de sonicació (20 minuts) mentre que el pH de la solució no es veu afectat.
- El temps de sonicació té repercussions sobre l'activitat enzimàtica de la patata tallada però el seu efecte no està directament relacionat amb el temps aplicat, tant en la polifenoloxidasa com en la peroxidasa les seves activitats segueixen comportaments diferents respecte els temps exposats als ultrasons. Però el major o menor efecte inhibitori de la seva activitat dependrà també de la solució utilitzada.
- El tractament més efectiu en la inhibició de l'activitat dels enzims causants de l'enfosquiment enzimàtic ha resultat ser la combinació d'ultrasons amb la solució d'àcid ascòrbic 1%, ja que rep un efecte combinat de l'efecte antioxidant de l'ascòrbic amb el descens del pH i la sonicació.
- En el cas de la polifenoloxidasa, el tractament més efectiu ha sigut l'ús d'àcid ascòrbic a un temps de sonicació de 5 minuts mentre que per la peroxidasa ha resultat més efectiva la combinació d'ultrasons a un temps de sonicació de 20 minuts amb l'àcid ascòrbic.
- L'aplicació d'ultrasons combinat amb les solucions àcides són les que tenen més efecte sobre el color però aquests canvis encara que són significativament estadístics no són suficients com per dir que el color sigui un paràmetre per determinar aquestes variacions d'inhibició.
- Tenint en compte que l'aplicació d'ultrasons pot augmentar l'activitat enzimàtica un possible treball de futur podria ser estudiar la possibilitat de l'existència d'isoenzims que expliquin aquesta reactivació.

6. Referències

- Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D. i Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis processing and quality control food. *Food Research International*, 48(2), 410-427.
- Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. O., i Baker, R. A. (1995). Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. *Hort Science* 30(1), 35-37.
- Balsar M. i Ertuga M. F. (2013). The effect of ultrasound and photosonication treatment on polyphenol oxidase (PPO) activity, total phenolic component and colour of apple juice. *International Journal Food Science and Emerging Technologies* 48(4), 886-892.
- Billaud, C., Regaudie, E., Fayad, N., Richard-Forget, F., i Nicolas, J. (1995). Effect of cyclodextrins on polyphenol oxidation catalyzed by apple polyphenol oxidase, *Food science* 44(5), 281-290.
- Cantos E., Tudela J. A., Gil M. I., i Espin J. C. (2002). Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(10), 3015-3023.
- Cabezas-Serrano A. B., Amodio M. L., Cornacchia R., i Rinaldi R., i Colelli G. (2009). Suitability of five different potato cultivars (*Solanum Tuberosum L.*) to be processed as fresh-cut products. *Postharvest Biology and Technology* 53(3), 138-144.
- Cefola, M., D'Antuono, I., Pace, B., Calabrese, N., Carito, A., Linsalata, V., i Cardinali. (2012). Biochemical relationships and browning index of assessing the storage suitability of artichoke genotypes. *Food Research International*, 48(2), 397-403.
- Cerón-Carrillo, T., Palou, E. i Lopez-Malo, A. (2010). Pulsos Eléctricos: Fundamentos y aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 4(1), 9-26.
- Delgado, J. (2012). Aplicación del Ultrasonido en la Industria de los Alimentos. *Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Consumo*, (1), 129-151.
- Fennema, O. R. Srinivasan, D., i Parkin, K. L. (2008). *Fennema's Food Chemistry*. Capítol 6 pg 331-436 (4th ed.). Boca Raton, FL: CRC Press. (POSAR PAIs)
- Fonteles T. V., Costa M. G., Jesus A. T., Miranda M. R., Fernandes F. A., i Rodrigues S. (2012). Power of ultrasound processing of cantaloupe melon juice: effects on quality parameters. *Food Research International* 48(1), 41-48.
- Gacche, R. N., Ghole, V. S., Khobragade, C. N., i Sager, A. D. (2002). Potato phenoloxidase immobilized s-triazine containing dialdehyde: An efficient biocatalysts for bioremediation of phenols. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 61(8), 621-624.
- Giner, J., Gimeno, V., Barbosa-Cánovas, G. i Marín, O. (2001). Effects on Pulsed Electric Field Processing on Apple and Pear Polyphenoloxidases. *Food Science and Technology International*, 7(4), 339-345.
- Golan-Goldhirsh, A., Osuga, D. T., Chen, A. O., i Whitaker, J. R. (1992). Effect of ascorbic acid and Copper on proteins. *FEBS Letters*, 18(5), 61-77.

- Islam, M. N., Zhang, i Adhikari, B. (2014). The Inactivation of Enzymes by Ultrasound – A Review of Potential Machanisms. *Food Reviews International*, 30(1), 1-21.
- Gómez, J. i López, A. (2009). Aplicaciones del ultrasonido en el tratamiento de alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de alimentos*, 3(1), 59-79.
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I. i Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends Food Science Technology*, 9(2), 107-203.
- Kadder, A. A. (1992). Postharvest technology of horticultural crops. *University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 3311*, 15-20.
- Loyala, N., Oyarce, E., i Acuña, C. (2010). Evaluación Del Contenido De Almidón En Papas. *IDESA*, 28(2), 41-52.
- Matías Gonzàlez, Cecilia Décima y Gabriela Massa. (2018, Abril, 1). Modify the gene that causes the potato to turn black. *Revista de Investigaciones Agropecuarias (RIA)*, 44(1), 18-21.
- McEvily, A. J., Iyengar, R. i Otwell, W. S. (1992). Inhibition of enzyatic browning in foods and beverages. *Food science and nutrion*, 32(3), 253-273.
- M.Victoria Martinez, i John R.Whitaker. (1995). The biochemesry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology*, 6(3), 195-200.
- O'Brien, W. D. (2007). Ultrasound-biophysics mechanisms. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 93(1), 212-255.
- O'Donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P. i Cullen, P. J. (2010). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 358-367.
- Patist, A. i Bates, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food indstry. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 147-154.
- Piyasena, P. ,Mohareb, E. i McKellar, R. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound. *International Journal Food Science and Emerging Technologies*, 21(7), 358-367.
- Queiroz, Mendez Lopes, M. L., Fialho, E., i Valente-Mesquita, V. L. (2008). Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Contol. *Food Reviews International*, 24(4), 361-375.
- Rachel, A. i Eileen A. (2009). Correlation Between L*a*b* Color Space Values and Carotenoid Content in Pumpkins and Squash. *Hort Science*, 44(3), 633-637.
- Robinson, D. S., i Eskin, N. A. M. (1991). *Oxidative enzymes in foods*. London; New York: Elsevier Applied Science.
- Robles, L. E., Ozuna, L. A. i Ochoa-Martínez. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de los alimentos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13(2), 60-78.
- Robles, M., Robles, R., Camarillo-Cadena, M., Hernandez-Arana, A., Welti-Chanes, J. i Hernández-Sánchez, H. (2012). Efecto de los Campos Elèctricos Pulsantes sobre la Estructura de la A-Lacto albúmina Bovina. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(3), 373-382.

Rosen, J. C. i Kader, A. A. (1989). Postharvest physiology and quality maintenance of sliced pear and strawberry fruits. *Journal Food Science*, 54(1), 656-659.

Taylor, S. L. (1993). Why sulfite alternative. *Food Technology*. 47(10), 14-16.

Watada, A. E., Ko, N. P., i Minott, D. A. (1996). Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. *Posthavest biology and technology*, 9(1), 115-125.

Whitaker, J. R. (1994). *Principles of enzymology for food sciences*. New York: Marcel Dekker 2nd ed.

Wills. R., McGlasson, B., Graham. D. i Joyce, D. (1998). Postharvest. An introduction to the physiology & handling of fruit and vegetable. *UNSW Press*, 4(2), 262.

Yeoh, W. K. i Ali, A. (2017). Ultrasound treatments on phenolic metabolism and antioxidant capacity of fresh-cut pineapple durnig cold storage. *Food Chemistry*, 216, 247-253.

