



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS MATEMÁTICAS, FÍSICAS Y
QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

TRABAJO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
INGENIERO QUÍMICO

MODALIDAD: INVESTIGATIVA

TEMA:

**“ESTUDIO CINÉTICO DE LA POLIFENOLOXIDASA EN
DIFERENTES VARIEDADES DE CAFÉ”**

AUTORAS:

MARÍA LISSETTE ARTEAGA ALCÍVAR
SOFÍA CONSEPCIÓN TUÁREZ BENITEZ

DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN:

ING. FELIPE JADÁN PIEDRA, PhD.

PORTOVIEJO – MANABÍ - ECUADOR

2016

DEDICATORIA

A:

DIOS, por darme la oportunidad de vivir, por guiar cada uno de mis pasos y haber puesto en mi camino a todas esas personas que fueron mi soporte y compañía durante mi periodo de estudio.

Mis padres, Francisco y Fátima por creer en mí, porque son esa fuerza que me impulsa a ser mejor, gracias por darme una profesión para mi futuro y ser mi pilar de vida.

Mis hermanos y cuñados por estar conmigo y motivarme siempre, a mis sobrinos para que vean en mi un ejemplo a seguir.

Mis amigas que son como mis hermanas en especial a Sofía Tuárez por apoyarnos mutuamente en nuestra formación profesional convirtiendo esta etapa en una experiencia única, a mis amigos por compartir buenos y malos momentos conmigo.

“Todo este trabajo ha sido posible gracias a ustedes”

María Lissette Arteaga Alcívar

DEDICATORIA

Este gran logro lo dedico en primer lugar a Dios, por ser mi guía y confidente.

A mis queridos padres Ramón Tuárez (+) y Elvia Benitez, que desde el primer día que me acogieron en sus brazos me mostraron el mayor tesoro que puede tener un ser humano “amor verdadero”, por enseñarme a ser constante y perseguir mis sueños sin importar lo duro que resulte obtenerlos. Mi padre que me inspiro amar cada letra, número y palabra que mis maestros me enseñaron y a nunca conformarme con lo poco que ya creía haber aprendido. A mi madre que ha estado a mi lado todo este tiempo motivándome, apoyándome y dándome fuerzas para seguir en este gratificante recorrido.

A mis hermanos, por ser mis cómplices, defensores y por estar siempre a mi lado cuando necesito sonreír. También al ser que me enseñó que existen otras formas de amar, mi mejor amigo, mi primer amor y dueño de mi corazón.

Finalmente pero no menos importante, a mí amiga, hermana de corazón y compañera de tesis por compartir momentos inolvidables, puros y sinceros, que siempre conservaré con mucho aprecio.

“Ningún soñador es pequeño y ningún sueño es demasiado grande”

Sofía Concepción Tuárez Benitez

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento se dirige en primer lugar a Dios por bendecirnos con seres humanos que nos guiaron por el mejor camino, por darnos fuerza, fe para creer en lo que parecía imposible y ahora es una realidad.

A nuestra Alma Mater, UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ, Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas y a nuestra querida Escuela de Ingeniería Química, por darnos la oportunidad de instruirnos y ser unas profesionales.

A nuestro director de tesis, Ing. Felipe Jadán Piedra, PhD por habernos brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también por su paciencia, esfuerzo y dedicación durante el desarrollo de la tesis.

También nos gustaría agradecer a nuestros catedráticos que durante nuestra preparación profesional nos brindaron sus sapiencias, en especial a nuestro revisor de tesis Ing. Ernesto Rosero no solo por involucrarse en nuestro trabajo de titulación sino también por mostrarse como un amigo siempre predispuesto a ayudar, al Ing. Carlos Moreira por su rectitud en su profesión como docente, apoyo incondicional y amistad.

De igual manera agradecer a la Ing. Virginia Sánchez, Jefa de los Laboratorios de la Escuela de Ingeniería Química, al Lcdo. Oswaldo y al personal encargado del Laboratorio de Química del Instituto de Ciencias Básicas que siempre están gustosos en ayudar y abrir las puertas a los estudiantes para que se motiven en sus investigaciones.

Finalmente agradecer a nuestro amigo querido “niño” Willy Gabriel por estar presente durante nuestra experimentación, siendo un gran apoyo durante este proceso arduo.

“Nada de esto hubiese sido así de especial sin vuestro apoyo”

María Arteaga & Sofía Tuárez

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

CERTIFICACIÓN

Yo, Ingeniero Felipe Jadán Piedra, PhD, catedrático de la facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas de la Universidad Técnica de Manabí, para los fines legales.

CERTIFICO

Que el trabajo de titulación titulado **“ESTUDIO CINÉTICO DE LA POLIFENOLOXIDASA EN LAS DIFERENTES VARIETADES DE CAFÉ”** fue desarrollado bajo mi dirección y control por las señoritas **ARTEAGA ALCÍVAR MARÍA LISSETTE** con C.I.: 131495211-8 y **TUÁREZ BENITEZ SOFÍA CONSEPCIÓN** con C.I.: 131291840-0, previo a la obtención del Título de **INGENIERO QUÍMICO**, cumpliendo con todos los requisitos del nuevo Reglamento para la Elaboración de Trabajo de titulación que exige la Universidad, alcanzado mediante el esfuerzo, dedicación y perseverancia demostrado por las autoras de este trabajo.



Ing. Felipe Jadán Piedra, PhD

DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

CERTIFICACIÓN DEL REVISOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Ingeniero Ernesto Rosero Delgado, catedrático de la facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas de la Universidad Técnica de Manabí, para los fines legales.

CERTIFICO

Que el trabajo de titulación, en la modalidad de investigación y que lleva por tema: **“ESTUDIO CINÉTICO DE LA POLIFENOLOXIDASA EN LAS DIFERENTES VARIEDADES DE CAFÉ”** fue desarrollado por las señoritas **ARTEAGA ALCÍVAR MARÍA LISSETTE** con C.I.: 131495211-8 y **TUÁREZ BENITEZ SOFÍA CONSEPCIÓN** con C.I.: 131291840-0, previo a la obtención del Título de **INGENIERO QUÍMICO**, bajo la tutoría y control del señor Ing. Felipe Jadán Piedra, PhD., docente de la Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas y cumpliendo con todos los requisitos del nuevo reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la Universidad Técnica de Manabí, aprobada por el H. Consejo Universitario, cumpla con informar que en la ejecución del mencionado trabajo de titulación, sus autoras:

- Han respetado los derechos de autor correspondiente a tener menos del 10 % de similitud con otros documentos existentes en el repositorio.
- Han aplicado correctamente el manual de estilo de la Universidad Andina Simón Bolívar de Ecuador.
- Las conclusiones guardan estrecha relación con los objetivos planteados.
- El trabajo posee suficiente argumentación técnica científica, evidencia en el contenido bibliográfico consultado.
- Mantiene rigor científico en las diferentes etapas de su desarrollo.
- Sin más que informar suscribo este documento **NO VINCULANTE** para los fines legales pertinentes.



Ing. Ernesto Rosero Delgado

REVISOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS MATEMÁTICAS, FÍSICAS Y
QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

TEMA:

“ESTUDIO CINÉTICO DE LA POLIFENOLOXIDASA EN LAS
DIFERENTES VARIEDADES DE CAFÉ”

TRABAJO DE TITULACIÓN

Sometido a consideración de la comisión de revisión y evaluación,
legalizada por el Honorable Consejo Directivo como requisito previo
a la obtención del título de:

INGENIERO QUÍMICO
APROBADA POR EL TRIBUNAL

DECLARACIÓN SOBRE DERECHOS DE AUTOR

Las Autoras, **ARTEAGA ALCÍVAR MARÍA LISSETTE** y **TUÁREZ BENITEZ SOFÍA CONSEPCIÓN**, egresadas de la Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas de la Universidad Técnica de Manabí.

DECLARAMOS QUE:

Las ideas expuestas en el presente trabajo titulado: **“ESTUDIO CINÉTICO DE LA POLIFENOLOXIDASA EN LAS DIFERENTES VARIEDADES DE CAFÉ”**, son absoluta responsabilidad de las autoras.


ARTEAGA ALCÍVAR MARÍA
AUTORA


TUÁREZ BENITEZ SOFÍA
AUTORA

ÍNDICE DE CONTENIDO

PRELIMINAR

DEDICATORIA.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTO.....	III
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	IV
CERTIFICACIÓN DEL REVISOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	V
DECLARACIÓN SOBRE DERECHOS DE AUTOR	VII
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	VIII
RESUMEN.....	XIV
SUMMARY	XV
1. TEMA:.....	1
“ESTUDIO CINÉTICO DE LA POLIFENOLOXIDASA EN LAS DIFERENTES VARIEDADES DE CAFÉ”	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
2.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA	2
2.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	2
2.3. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
2.3.1. ESPACIAL.....	3
2.3.2. TEMPORAL.....	3
2.4. JUSTIFICACIÓN	3
3. REVISIÓN DE LA LITERATURA Y DESARROLLO DEL MARCO TEÓRICO	4
3.1. ANTECEDENTES	4
3.2. FUNDAMENTO TEÓRICO	5
3.2.1. DEFINICIÓN DEL CAFÉ	5
3.2.1.1. Taxonomía.....	6
3.2.1.2. Composición química.....	7

3.2.1.3.	Variedades	7
3.2.1.4.	Características	10
3.2.2.	POLIFENOLOXIDASA	11
3.2.3.	ESTRATEGIA DE EXTRACCIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA ...	15
3.2.3.1.	Control de pH	16
3.2.3.2.	Control de temperatura	16
3.2.4.	SUSTRATO	18
3.2.4.1.	Catecol.....	18
3.2.4.1.1.	Usos y aplicaciones	19
3.2.4.1.2.	Derivados del Catecol	20
3.2.5.	CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	20
3.2.5.1.	Modelo Cinético de Michaelis-Menten.....	23
3.2.5.2.	Actividad enzimática.....	26
4.	VISUALIZACIÓN DEL ALCANCE DE ESTUDIO.....	29
4.1.	APORTE SOCIAL	29
4.2.	APORTE ECONÓMICO.....	29
4.3.	APORTE CIENTÍFICO.....	29
5.	ELABORACIÓN DE HIPÓTESIS Y DEFINICIÓN DE VARIABLES	30
5.1.	HIPÓTESIS	30
5.2.	DEFINICIÓN DE VARIABLES	30
5.2.1.	VARIABLE INDEPENDIENTE	30
5.2.2.	VARIABLE DEPENDIENTE.....	30
5.3.	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	30
6.	DESARROLLO DEL DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	32
6.1.	OBJETIVOS	32
6.1.1.	OBJETIVO GENERAL	32
6.1.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32

6.2.	CAMPO DE ACCIÓN.....	32
6.3.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	32
6.3.1.	TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	32
6.3.2.	MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN	33
6.3.3.	TÉCNICAS.....	33
6.3.3.1.	Materiales.....	33
6.3.3.2.	Equipos.....	34
6.3.3.3.	Sustancias y reactivos.....	34
7.	PROCESO EXPERIMENTAL REALIZADO	35
7.1.	MATERIAL VEGETAL	35
7.2.	REACTIVOS	35
7.3.	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS OBJETO DE ESTUDIO	35
7.4.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO	35
7.5.	DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA ÓPTIMA.....	36
7.6.	DETERMINACIÓN DE pH ÓPTIMO.....	36
7.7.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	36
7.8.	DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (K_m) Y VELOCIDAD MÁXIMA (V_{máx})	37
7.9.	ESTUDIO DE LA OXIDACIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA.....	38
8.	RECOLECCIÓN DE DATOS	39
8.1.	RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE LA PPO	39
8.2.	RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMA DE LA PPO 40	
8.3.	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	41
8.3.1.	RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PPO	41
8.3.2.	RESULTADOS DE CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (K_m) Y VELOCIDAD MÁXIMA (V_{máx})	42

8.3.3. MECANISMO DE ACTUACIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA	44
9. ANÁLISIS DE LOS DATOS	46
10. ELABORACIÓN DEL REPORTE DE LOS RESULTADOS	49
10.1. DISCUSIÓN.....	49
10.2. CONCLUSIONES	50
10.3. RECOMENDACIONES	51
11. PRESUPUESTO.....	52
12. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	53
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS	59
ANEXO 1. FOTOGRAMA	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción generalizada de la PPO en plantas.....	12
Figura 2. Geometría de los centros activos de la PPO.....	12
Figura 3. Mecanismo cinético propuesto para la oxidación de o-difenol (catecol [A]) y un monofenol (fenol [B]).....	13
Figura 4. Estructura de algunos sustratos naturales de la PPO.....	14
Figura 5. Cinética enzimática. Modelo de Michaelis-Menten.	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del cultivo de café.....	6
Tabla 2. Principales características de las especies arábica y robusta.	10
Tabla 3. Condiciones óptimas de la extracción de la PPO.	17
Tabla 4. Condiciones óptimas de la extracción de PPO en el café.....	18
Tabla 5. Características principales y propiedades físico-químicas del catecol.	19
Tabla 6. Valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) de PPO.....	25
Tabla 7. Valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) de PPO en variedades de café.....	26
Tabla 8. Actividad de la Polifenol oxidasa en granos de café arábica mantenidas durante ocho días antes del secado.	27
Tabla 9. Purificación parcial de PPO de <i>Pleurotus florida</i>	27
Tabla 10. Listado de materiales empleados en la experimentación.	33
Tabla 11. Listado de equipos empleados en la experimentación.	34
Tabla 12. Listado de sustancias y reactivos empleados en la experimentación.	34
Tabla 13. Resultados de la Absorbancia (nm) de la PPO frente a la temperatura.....	39
Tabla 14. Resultados de la absorbancia (nm) frente al pH.....	40
Tabla 15. Actividad de la PPO en las diferentes variedades de café.....	42
Tabla 16. Resultados de absorbancia y S/V de las diferentes variedades de café para la determinación de K_m y $V_{máx}$	42
Tabla 17. Resultados de la K_m y $V_{máx}$ de la PPO en las tres variedades de café.....	44
Tabla 18. Estudio de oxidación de la PPO.	44
Tabla 19. Presupuesto (Gastos durante el desarrollo de la tesis).	52
Tabla 20. Cronograma de actividades del proyecto de tesis.....	53

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Temperatura óptima de la PPO.	40
Gráfico 2. pH óptimo de la PPO.....	41
Gráfico 3. Recta de calibrado para la PPO.	41
Gráfico 4. Velocidad de reacción de la PPO en las tres variedades de café.....	43
Gráfico 5. Ecuación de Hanes-Woolf para la obtención de la Km y Vmáx con la enzima PPO.....	43
Gráfico 6. Consumo de sustrato en diferentes tiempos de las tres variedades de café... 45	
Gráfico 7. Temperatura óptima de trabajo de la PPO en diferentes variedades de café. 46	
Gráfico 8. pH óptimo de trabajo de la PPO en las diferentes variedades de café.	46
Gráfico 9. Actividad de la PPO en las variedades de café.	47
Gráfico 10. Constante de Michaelis-Menten (Km).....	47
Gráfico 11. Velocidad máxima de reacción de la PPO.	48
Gráfico 12. Estudio de Oxidación de la PPO.	48

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Producción de Café en la Finca San José.	59
Ilustración 2. Cereza de café lista para ser cosechada.	59
Ilustración 3. Granos de las variedades de café arábigo molidos.....	60
Ilustración 4. Preparación de las muestras para iniciar el proceso de extracción de la PPO.....	60
Ilustración 5. Centrifugación y extracción de la PPO de las diferentes variedades de café.....	61
Ilustración 6. Preparación de la solución del tampón Buffer fosfato sódico y control de pH.	61
Ilustración 7. Proceso de reacción de la PPO a temperatura óptima (sometida a baño María durante 3 minutos)	62
Ilustración 8. Agitación de la solución reactante con la enzima.	62
Ilustración 9. Medición de los diferentes análisis en el espectrofotómetro.....	63

RESUMEN

El café es uno de los productos más populares en el mundo y económicamente aporta divisas al Estado y generación de ingresos para las familias dedicadas a esta labor.

En este trabajo, se estudió la cinética enzimática de la Polifenoloxidasa (PPO) en diferentes variedades de café arábica (Typico, Caturra y Salchimor), producidos en el cantón Jipijapa, recinto San José, además se evaluó la temperatura y pH óptimo de la PPO, la actividad enzimática (U) y la constante de Michaelis-Menten.

Se empleó el espectrofotómetro UV-Vis JENWAY 7305 con una longitud de onda de 410nm para todos los ensayos, en donde se pudo obtener la temperatura y pH óptimo de 50°C y 7.0 respectivamente, siendo este valor constante en las variedades de café estudiadas.

La actividad de la PPO utilizando catecol como sustrato en las diferentes variedades fue Typico ($K_m=8.22\text{mM}$ y 6234.32 U/mL), Salchimor ($K_m=13.43\text{mM}$ y 5612.10 U/mL) y Caturra ($K_m= 21.86\text{mM}$ y 3710.86 U/mL). Por otra parte la cinética enzimática se evaluó mediante el consumo del sustrato durante 160 segundos de reacción.

Palabras clave: café, estudio cinético, actividad enzimática, cinética enzimática, temperatura, pH.

SUMMARY

Coffee is one of the most popular products in the world, provides economically foreign exchange to the state and generates incomes for the dedicated families to this work.

In this research, it studied the enzymatic kinetics of Polyphenoloxidase (PPO) in different varieties of arabica coffee (Typico, Caturra and Salchimor), produced in Jipijapa canton, San José enclosure, moreover temperature and pH of the PPO, the enzymatic activity (U) and the Michaelis-Menten constant were also evaluated.

It employed the UV- Vis spectrometer JENWAY 7305 with a wavelength of 410nm for all the assays, where it could obtain the optimum temperature and pH of 50°C and 7.0 respectively, being a constant value in the studied coffee varieties.

Activity of PPO using catechol as substrate in the different varieties was Typico (= 8.22mM and 6234.32 U/mL), Salchimor(=13.43mM and 5612.10 U/mL) and Caturra (= 21.86mM and 3710.86 U/mL). On the other hand enzymatic kinetics was evaluated by the consumed of the substrate for 160 seconds of reaction.

Key words: coffee, kinetic study, enzymatic activity, enzymatic kinetics, temperature, pH.

1. TEMA:

“ESTUDIO CINÉTICO DE LA POLIFENOLOXIDASA EN LAS
DIFERENTES VARIEDADES DE CAFÉ”

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

La polifenoloxidasas produce cambios no deseables en algunos frutos y vegetales, las causas y efectos de dicha enzima han llevado a la realización de algunos estudios sobre el manejo pre y postcosecha de muchos frutos como manzanas, peras, duraznos, uvas, aguacates, papas, hojas de té, donde se ha estudiado el efecto de la polifenoloxidasas (PPO) actividad que en este caso resulta perjudicial,¹ en donde el cambio de coloración en la superficie cortada de estos productos se producen debido a que los compuestos fenólicos son oxidados hasta formas quinónicas mediante reacciones catalizadas por la PPO.² Pero en ciertos casos como la manufactura de malta y jarabe de arce, tostado del café, cacao, nueces, tostado de cereales, horneado de pan, la producción de color oscuro y los cambios del sabor que le acompañan, son deseables.³

En el café la relación entre la calidad y actividad PPO no se conoce bien, aunque en diversos estudios se ha establecido que la baja calidad del café tiene una baja actividad PPO, o bien una mejor calidad presenta una mayor actividad de la enzima polifenoloxidasas.^{4 5 6 7}

Por lo antes expuesto, es necesario caracterizar la actividad de esta enzima en distintas especies de café, como una primera etapa para poder determinar el grado de incidencia en la calidad del producto terminado.

2.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Una base de datos sobre la cinética enzimática de las diferentes variedades de café, servirán para mejorar las condiciones del manejo industrial?

¹ García, C. L., Giraldo, G. A., Hurtado, H., & Mendivil, C. O. (2006). Enzyme Kinetics of Polyphenol Oxidase from Gros Michel Banana Through different maturation atages. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 13(2), 13-19.

² Rezapour, I., Jasimizad, T., Ayatollahi, M., Zamani, M., Aghaei, S., & Jebali, A. (2016). The presentation of a new inhibitor to prevent enzymatic browning in mushroom, banana, and apple. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(4), 1109-1122.

³ Hernández Váldez, E. (Septiembre de 2009). Monografía de la Universidad Veracruzana. *Acción y Efecto de la Polifenoloxidasas en Alimentos*. Obtenido de <http://cdigital.uv.mx/bits/tream/123456789/32464/1/hernandezvaldez.pdf>

⁴ Amorim, H. B., & Silva, D. M. (1968). Relationship between the polyphenol oxidase activity of coffee beans and quality of beverage. *Nature* (219), 381-382.

⁵ Amorim, H. B., & Amorim, V. L. (1977). Coffee enzymes and coffee quality. In: Ory, R.L., St Angelo, A. J. (Eds), *Enzymes in Food and Beverages Processing*, ACS Symposium Series, 47. *American Chemical Society*, 27-56.

⁶ Amorim, H. V., & Melo, M. (1991). Significance of enzyme in non- alcoholic coffee beverage. *Food Enzymology*, 2, 189-209.

⁷ Centro Interamericano de Documentación e Información Agrícola (CIDIA). (1992). *REDCAFE* (Vol. 4), pp 45. Turrialba, Costa Rica.

2.3. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

2.3.1. ESPACIAL

Los ensayos y análisis del presente trabajo de titulación se realizaron en el laboratorio de Química del Instituto de Ciencias Básicas (ICB) y en el laboratorio de Química, Microbiología y Ecotoxicología de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Técnica de Manabí.

2.3.2. TEMPORAL

El presente trabajo de investigación se realizó tomando en cuenta la información desde el año 2000 hasta el primer semestre del año 2016.

2.4. JUSTIFICACIÓN

La importancia del estudio cinético de la polifenoloxidasasa en el grano crudo de café es un valioso aporte en las características organolépticas de este, ya que refleja importantes modificaciones bioquímicas en él y sirve para emprender estudios sistemáticos de los numerosos factores que se presume pueden afectar la calidad de la bebida de café.⁸

Se han realizado diferentes estudios sobre la caracterización de la polifenoloxidasasa en varios países tales como Colombia y Brasil con el café arábigo de su zona, pero sin reportar de qué variedad dentro de esta categoría fueron tomadas las muestras.

En el Ecuador a pesar de poseer una de las variedades más comercializadas no se ha caracterizado la actividad enzimática de ninguna de ellas (caturra, salchimor y typica), de allí radica la importancia de este estudio en las tres variedades de café arábigo producido en la zona de Jipijapa-Manabí.

El estudio de la caracterización de la PPO en el grano de café es el primer paso para identificar la acción de esta enzima sobre la calidad del mismo, mediante el estudio comparativo, tanto de los parámetros cinéticos (K_m y $V_{máx}$), así como pH, temperatura y sustrato óptimo de la PPO.

⁸ Sanint, B., & Valencia, A. (Junio de 1970). *Actividad enzimática en el grano de café en relación con la calidad de la bebida. Cenicafé* (Colombia), 21 (2), 59-71. Obtenido de <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=ORTON.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mf%3D032898>.

3. REVISIÓN DE LA LITERATURA Y DESARROLLO DEL MARCO TEÓRICO

3.1. ANTECEDENTES

La importancia económica de esta especie se encuentra relacionada con la producción de bebidas a partir de sus granos procesados que se consideran un importante producto mundial.⁹ Por lo que resulta necesario llevar a cabo investigaciones que detallen cuales son las características físico-químicas y enzimáticas del café de la especie *Coffea arabica*; los estudios realizados hasta la presente fecha se describen a continuación:

En el primer caso se ha caracterizado la PPO con extractos parcialmente purificados de las hojas como del endospermo del café (*Coffea arabica* L.). Donde la máxima actividad enzimática se logró a pH comprendidos entre de 6 y 7 y a una temperatura de ensayo de 30°C. El sustrato utilizado fue el ácido clorogénico el cual reportó un Km (Constante de Michaelis-Menten) de 0.882 mM para las hojas y de 2.27 mM para el endospermo de la fruta.¹⁰

En un caso particular se evaluó las propiedades antioxidantes en algunos componentes de los extractos acuosos de muestras de café verde de 5 calidades que se comercializan en Colombia (Excelso UGQ, excelso D3, chorreado de pergamino, consumo y pasilla de máquinas). Los contenidos de fenoles totales los determinaron por el método Follin Ciocalteu, los ácidos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución y las capacidades antioxidantes por los métodos DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracil) y ORAC (oxygen radical absorbance capacity), reportando que el café Excelso UGQ tiene altas concentraciones de ácidos fenólicos responsables de su mayor actividad antioxidante, comparado con las cuatro calidades de café más consumidos en Colombia.¹¹

En Brazil se realizó un estudio sobre la miel de café que se produce en el Estado de Espírito Santo, donde se caracterizaron las propiedades físico-químicas, nutricionales, contenido de minerales y cafeína esta última fue medida

⁹ Ricon, R., Cesarino, I., Mazzafera, P., & Carnier, M. (2014). Flower development in *Coffea arabica* L.: new insights into MADS-box genes. *Plant Reprod*, 27, 79-94.

¹⁰ Mazzafera, P., & Robinson, S. P. (2000). Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry*, 55, 285-296.

¹¹ Naranjo, M., Vélez, L., & Rojano, B. A. (2011). Antioxidant activity of different grades of Colombian Coffee. *SciELO, Revista Cubana de Plantas Medicinales, Versión On-line* ISSN 1028-4796, 16 (2), 164-173.

por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).¹² El contenido de cafeína en el néctar de las flores de café se midió mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).¹² Todas las muestras de miel monofloral contenían (75-78%) que pertenece el polen de *C. arabica*, los minerales estudiados en fueron potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), de sodio (Na), hierro (Fe), cobre (Cu), litio (Li), zinc (Zn), aluminio (Al), y níquel (Ni), siendo los más abundantes el potasio y el calcio ($962,59 \pm 154,3$ y 343.75 ± 25.56 mg kg⁻¹, respectivamente). El contenido de cafeína en el café néctar ($1,64$ mg kg⁻¹) era aproximadamente 8 veces menor que la de la miel ($12,02 \pm 0,81$ mg kg⁻¹), así mismo la miel de café contiene altos niveles de ácido ascórbico (294.68 mg kg⁻¹) y bajas cantidades de flavonoides totales ($3,51 \pm 0,18$ mg QE kg⁻¹).¹²

En otro estudio se caracterizó la composición del café expreso preparado a partir de granos de café *Coffea arabica* L. en diversos grados de tostado, definidos según su clasificación básica convencional (ligero, medio, medio-oscuro y tostado oscuro), fueron analizados por cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem, estos análisis revelaron cuatro grupos de compuestos entre ellos ácidos clorogénicos, lactonas, melanoidinas particulares y específicas.¹³

3.2. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.2.1. DEFINICIÓN DEL CAFÉ

El café se define como la semilla seca de la planta de café sin importar que haya sido tostada o molida.¹⁴ La planta del café es una dicotiledónea, proveniente de un arbusto perenne que pertenece a la familia de las *Rubiaceae* y el género *coffea*, con aproximadamente 100 especies, siendo muy importante dos de sus especies: *Coffea arabica* Linn y *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, conocidas en el comercio como arábica y robusta respectivamente. Una tercera especie de interés comercial *Coffea liberica* Bull exHier.¹⁵

¹² Moura, S., Zaluski, R., Pace Pereira, G., Mazzafera, P., & De Oliveria, R. (2016). Characterization of Coffea arabica monofloral honey from Espírito Santo, Brazil. *Food Chemistry*, 203: 252-257.

¹³ Kucěra, L., Papoušek, R., Kurka, O., Barták, P., & Bednár, P. (2016). Study of composition of espresso coffee prepared from various roast degrees of Coffea arabica L. Coffee beans. *Food Chemistry*(199), 727-735.

¹⁴ Badui, S. (1993). *Química de los Alimentos*. México: Pearson Education.

¹⁵ Rojas Cuberos, G., & Albarado Soto, M. (2007). Cultivo y Beneficios del Café. En G. Rojas Cuberos, & M. Albarado Soto, *Taxonomía del café* (pág. 11). San José: Editorial Universidad Estatal a Distancia.

La especie de *Coffea arabica* representa aproximadamente el 80-90% de la producción mundial.¹⁶ A nivel molecular el café arábico contiene una mayor concentración de trigonelina y sacarosa que el café robusta.¹⁷

El café contiene una serie de sustancias como la cafeína el compuesto más importante, pero también aporta sustancias como el cafestol, el kahweol, el ácido clorogénico a los cuales se les atribuye propiedades antioxidantes.¹⁸ Además contiene una serie de micronutrientes como el magnesio, potasio, niacina, trigonolina, tocoferoles, entre otros, a los cuales se les ha atribuido con mayor o menor impacto, efectos benéficos.¹⁹

3.2.1.1. Taxonomía

La clasificación taxonómica del café, se describe a continuación:

Tabla 1. Clasificación taxonómica del cultivo de café.

TAXONOMÍA	NOMBRE
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Sub-división	Angiospermae
Clase	Magnoliata
Sub-clase	Asteridae
Orden	Rubiales
Familia	Rubiaceae
Género	Coffea
Especie	Arabica, canephora y liberica

Fuente: (Alvarado, M. y Rojas, G., 1994)²⁰

¹⁶ Temis Pérez, A. L., López Malo, A., & Sosa Morales, M. E. (2011). Producción de café (*Coffea arabica* L): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. *Temas selectos de Ingeniería en Alimentos*, 5(2), 54-74.

¹⁷ Soler, G., Losada, J. D., & Vargas, C. (Abril de 2013). Caracterización vibracional por espectroscopia Raman del grano de café tipo comercial. *Scientia Et Technica*, 18(1), 275-279.

¹⁸ Valenzuela, A. (2010). El Café y sus efectos en la salud cardiovascular y en la salud materna. *Scielo*, p. 14-15-17.

¹⁹ Tavani, A., Bertuzzi, M., & Gallus, S. (2004). Risk factors for non fatal acute myocardial infarction in Italian women. *Prev Med*, p. 128-34.

²⁰ Alvarado Soto, M., & Rojas Cubero, G. (1994). *El cultivo y beneficiado del café*. (pág 11). Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.

3.2.1.2. Composición química

La pulpa de café contiene alrededor del 80 % de humedad, que se considera importante bajo el punto de vista de transporte, conservación y deshidratación; el contenido de proteína es de aproximadamente del 11% aunque existe una variación desde 8 hasta 16%, debido a la variedad, método y zona de cultivo. El material seco contiene alrededor de 0,7% de cafeína, 1,85% de taninos, 0,6% de ácido clorogénico y 0,24% de ácido cafeico, estos valores varían según la procedencia de la pulpa de café y al proceso empleado en su deshidratación.²¹ La pulpa de café contiene alrededor de 48% de contenido celular, 49% de paredes celulares y cantidades relativamente altas de celulosa, hemicelulosa y lignina según la metodología de Van Soest.²²

La cafeína fue descubierta y aislada por el químico alemán Ferdinand Runge y en 1832 se determinó su composición química $C_8H_{10}N_4O_2$ (1-3-7 Trimetilxantina) por Pfaffaud y Liebig. Se trata de un alcaloide perteneciente al grupo de las purinas que se encuentran no solo en el café, sino también en el té y el chocolate.²² El café robusta posee más cafeína que el café arábigo.

3.2.1.3. Variedades

Entre las variedades de café más importantes desde el punto de vista económico se destacan *Coffea arabica* (café arábigo) y *Coffea canephora* (café robusta), otra especie también conocida pero cultivada en menor escala es *Coffea liberica* (café libérica).

Coffea arabica es genéticamente diferentes a otras especies de café, debido a que es un tetraploide con un total de 44 cromosomas, una especie que se autopoliniza, lo que conduce a que sus variedades tiendan a permanecer genéticamente estables.²² Se trata de un arbusto grande de unos 5 metros de altura, con hojas ovaladas y de color verde oscuro brillante, sus variedades más conocidas son arábica (typica) y bourbon, pero a partir de estas se han desarrollado nuevas cepas y cultivares diferentes como: Caturra, Mundo Novo, Tico, San Ramón, Moca, Maragogipe, Columnaris o Blue Mountain, Pacas, Catuaí, Catimor y Salchimor.²²

²¹ Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA (IICA). (1974). *Primera reunión Internacional sobre la utilización de subproductos del café en la alimentación animal y otras aplicaciones agrícolas e industriales*. Costa Rica, pp14.

²² Pérez, E., & Carril, U. (2014). Café I (G. Coffea). *Reduza*, 7(2), 113-132.

Características morfológicas de las principales variedades de *C. arabica* que se cultivan en Ecuador (ANECAFE, 1985):²³

- A. *Typica*: es una variedad arábica pura originaria de Etiopía, de porte alto que puede alcanzar cerca de los 4 metros a libre crecimiento, los brotes tiernos son de color bronceado, las ramas se intersectan en el tallo principal formando un ángulo aproximado de 60 grados, los frutos los alargados de buen tamaño.

- B. *Bourbón*: comprende dos cultivares como *Bourbón rojo* y *Bourbón amarillo*, es un variedad originaria de las Islas Reunión (antes *Bourbón*). El tamaño de la planta es similar a la variedad *Typica*, las ramas forman un ángulo de 40 a 50 grados con respecto al eje ortotrópico, el rendimiento tiende a ser superior a la variedad *Typica*. Las introducciones del CATIE, identificadas como: *Bourbón rojo* T-2307, T-983 y T-995; y el *Bourbón amarillo* T-2540, constituye el germoplasma distribuido por parte del INIAP.

- C. *Caturra*: fue encontrada en Minas Gerais (Brasil) y es considerada como una mutación del café *Bourbón*, esta variedad comprende dos cultivares *Caturra rojo* y *Caturra amarillo*, nombres atribuidos por la coloración de los frutos. La planta es de porte bajo, aspecto vigoroso y compacto, los entrenudos son cortos y con una coloración verde en sus brotes tiernos, las bandolas (ramas) forman ángulos de 45 grados con respecto al eje central. Tiene amplio rango de adaptabilidad y alta producción, pero susceptible a la roya del cafeto.

- D. *Pacas*: esta variedad es originaria de El Salvador y considerada como una mutación del café *Bourbón*, las características agronómicas y productivas son similares a la variedad *Caturra rojo*. El germoplasma del CATIE, identificado como *Pacas* T-2942 se introdujo, evaluó y distribuyó en el Ecuador.

²³ Asociación Nacional de Café (ANECAFE). (1985). Manual de Caficultura. Revista N°250 ANECAFE- Guatemala, 5-13.

- E. Catuaí: se originó en Brasil y tiene como base genética una hibridación artificial entre Mundo novo (Sumatra x Bourbón) y Caturra (mutación de Bourbón). Comprende dos cultivares comerciales Catuaí rojo y Catuaí amarillo, las plantas de esta variedad son de tamaño bajo-mediano, las ramas forman un ángulo de 45 grados con relación al eje ortotrópico, los entrenudos son cortos y los brotes nuevos de coloración verde que pueden llegar a medir de 0,90 a 1,20 metros de largo.
- F. Catimor: es un híbrido desarrollado por el Centro Internacional de las Royas del Café (CIFC-Portugal) resultado del cruce de la variedad Caturra con Híbrido de Timor. El Híbrido de Timor es un genotipo arabicoide de naturaleza tetraploide ($2n = 44$), considerado fuente de resistencia a la roya (*Hemileia vastatrix*) y a los nemátodos del género *Meloidogyne*. El porte de la planta es variable con un altura de 1,90 a 2,30 metros, arquitectura compacta, tamaño de bandolas de 0,90 a 1,20 metros, con entrenudos cortos.
- G. Salchimor: es un material sintetizado en el CIFC-Portugal, en base al cruzamiento de Villa Sarchi (selección de Typica) con Híbrido de Timor. La línea de Salchimor C-1669, en las condiciones de Manabí y otras zonas relativamente secas, ha mostrado una buena adaptación, plantas son de porte intermedio, de estructura compacta de forma cónica, con altura de 1,90 a 2,40 metros, las ramas forman un ángulo de 45 grados con respecto al eje central y un largo que varía entre 0,80 a 1,20 metros.
- H. Cavimor: es un material sintetizado en el CIFC-Portugal, en base al cruce entre las variedades Catuaí con Catimor, la altura de la planta tiende a ser mediana, la producción es superior a la variedad caturra rojo, la arquitectura de la planta es compacta.

Coffea canephora es diploide u autoestéril por lo que origina muchas formas y variedades silvestres diferentes por lo que la identificación de cultivares es confusa, pero se reconocen dos formas principales “Robusta”

(erguidas) y “Uganda” (esparcidas).²⁴ Es un árbol robusto con raíz poco profunda que puede alcanzar aproximadamente 10 metros de altura, cuyo fruto es redondeado que tarda 11 meses en madurar, su semilla es alargada y más pequeña que *C. arabica*, mientras que las hojas por lo general suelen ser más grandes.²²

Coffea liberica es un árbol que puede alcanzar hasta 20 metros de altura, con hojas grandes y coriáceas.²²

3.2.1.4. Características

El café arábigo y robusta tienen algunas características fenotípicas y genotípicas que los diferencian, como se muestra a continuación:²⁵

Tabla 2. Principales características de las especies arábigo y robusta.

Características	Arábigo	Robusta
Tipo de planta	Arbusto	Árbol
Copa	Piramidal	Irregular
Hojas	Elípticas, oblongas y a veces lanceoladas	Elípticas, oblongas de ápices agudo
Inflorescencia	2 a 3 cimbras por axila	3 a 5 cimbras por axila
Frutos	Drupas elipsoidales	Drupas elipsoidales o subglobosas
Fecundación	Autógama	Alógama
Compatibilidad	Autocompatible	Autoincompatible
Estructura genética	Tetraloide	Diploide
Número de cromosomas	2n = 44	2n = 22
Contenido de cafeína (% materia seca)	0.6 – 1.80	1.30 – 5.20

Fuente: Charrier & Berthaud (1985).²⁵

²⁴ Waller, B. V., Bigger, M., & Hillocks, R. J. (2007). *Coffea Pests. Diseases and Their Management*, 437.

²⁵ Charrier, A., & Berthaud. (1985). Botanical classification of coffee. Botany, *Biochemistry and Production of Beans Beverage*, 13-47.

3.2.2. POLIFENOLOXIDASA

La Comisión de Enzimas (EC) clasifica la polifenoloxidasas, con el número 1.10.3.1. Dentro de la clase de las Oxidoreductasas, actuando sobre difenoles con oxígeno como aceptor.

La Polifenoloxidasas conocida como tirosinasa, fenolasa, monofenol oxidasas o creolasa, o-difenoloxidasas y catecol oxidasas, catalizan 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.²⁶

La enzima polifenoloxidasas (PPO) es una metaloenzima que se encuentra ampliamente distribuido en plantas y hongos.²⁷ El PPO contiene dos átomos de cobre en el sitio activo que catalizan dos tipos de reacciones usando O_2 como agente oxidante: (1) la o-hidroxilación de monofenoles para producir o-difenoles y (2) la posterior oxidación de o-difenoles a o-quinonas.

La reacción general sugiere que la enzima cataliza la formación de quinonas altamente reactivas que reaccionan con grupos amino o sulfhídrido de las proteínas, estas reacciones generan cambios en las características físicas, químicas y nutricionales del alimento.²⁸

Las quinonas también pueden conducir a la polimerización y a reacciones de condensación entre proteínas y polifenoles, produciendo como consecuencia pigmentos de color café, proceso conocido como “pardeamiento enzimático”.²⁹

La PPO fue descubierta y aislada inicialmente de champiñones; ella actúa sobre dos tipos de sustratos: monohidroxifenoles como por ejemplo el p-cresol hidroxilandolos en posición orto con respecto al grupo hidroxilo original, EC 1.14.18.1, y sobre odihidroxifenoles tales como el catecol, oxidándolos a benzoquinona por remoción de hidrógenos del grupo hidroxilo, EC 1.10.3.1.³⁰

²⁶ Gasull, E., & Bacerra, D. (2006). Characterization of Polyphenyloxidase Extracted from Pears (cv. Packam's Triumph) and Apples (cv. Red Delicious). *SciELO*, 17(6), 69-74.

²⁷ Mayer, A., & Harel, E. (1979). Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, 18, 193-215.

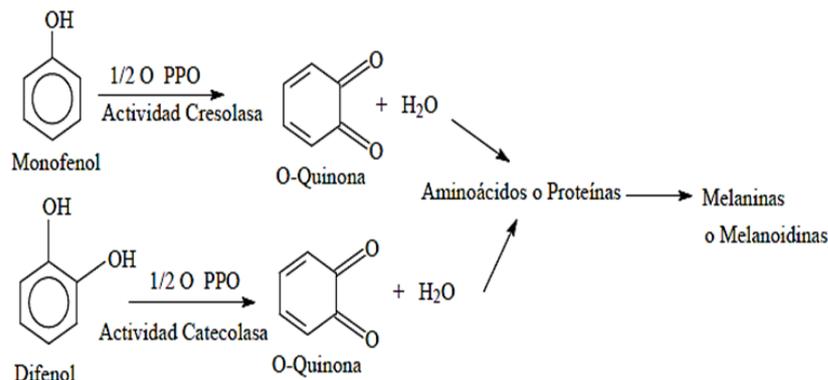
²⁸ Muñoz Durango, K., Bravo Muñoz, K., Zapata Ocampo, P., & Londoño Londoño, J. (2007). Caracterización preliminar del enzima Polifenol Oxidasas en frutas tropicales: Implicaciones en su proceso de Industrialización. *Scientia et Technica Año XIII, No 33*(UTP. ISSN 0122-1701), 161-164.

²⁹ Vaughn, K. C., & Duke, S. O. (1984). Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol*, 60, 106-112.

³⁰ Ramírez, E. C., & Whitaker, J. R. (2003). Polyphenol Oxidase. *Handbook of Food Enzymology*, 509-523.

En la figura 1 se indican las dos actividades que ella presenta:³¹

Figura 1. Reacción generalizada de la PPO en plantas.

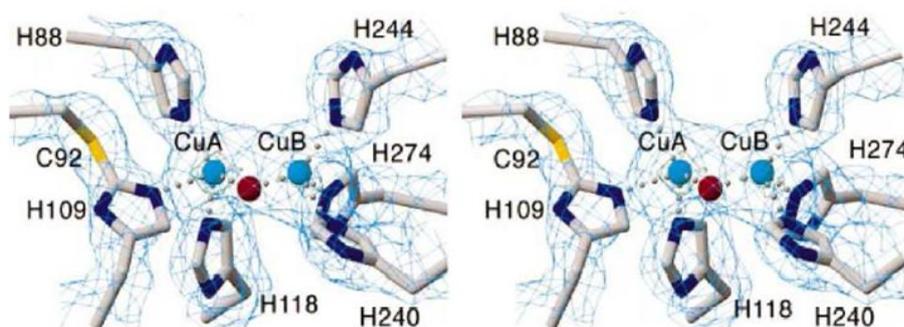


Fuente: Gacche *et al.* (2003).³¹

La característica estructural más importante de la PPO es la presencia en su centro activo de dos átomos de cobre, unidos a histidinas; alrededor de los cobres, se sitúan aminoácidos hidrofóbicos, con anillos aromáticos importantes para la unión de los sustratos.³²

Los sitios activos se muestran en la figura 2, estos tienen una estructura piramidal trigonal coordinadas por las esferas formadas por los tres ligandos de histidina y la molécula del solvente como puente. El átomo de azufre de la cisteína 92 no se liga al centro del cobre pero está unido covalentemente al átomo del carbono de la histidina 109.³²

Figura 2. Geometría de los centros activos de la PPO.



Fuente: Klabunde *et al.* (1998)³³

³¹ Gacche, R. N., Zore, G. B., & Ghole, V. S. (2003). Kinetics of Inhibition of Polyphenol Oxidase Mediated Browning in Apple Juice by β -Clodextrin and L-ascorbate-2-triphosphate. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18: 1-5.

³² Calvo, M. (30 de Noviembre de 2016). Estructura de la Polifenol oxidasa. *Bioquímica de los Alimentos*. Obtenido de <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/enzimas/tirosinasa.html>

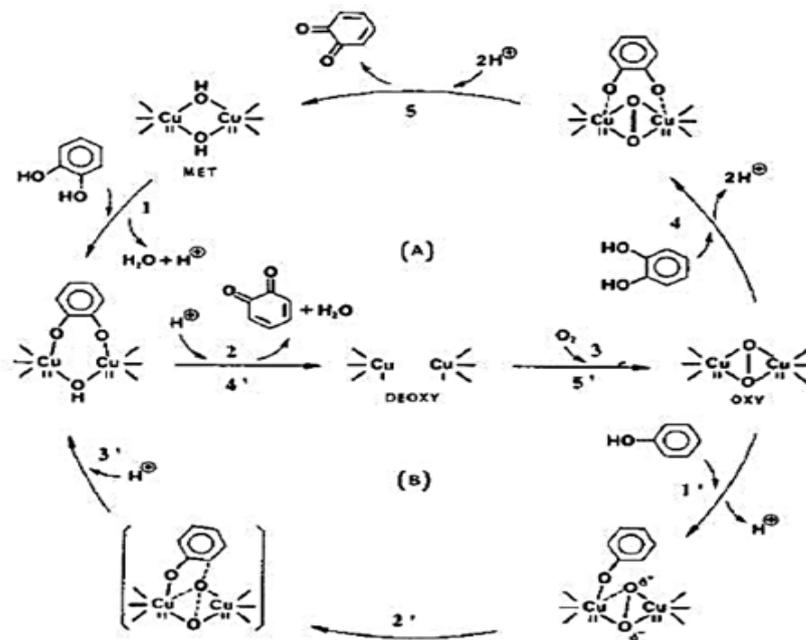
³³ Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C., & Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*, 5(12): 1084-1090.

El mecanismo de reacción de la PPO, se basa en la catálisis de dos etapas: oxidación de un monofenol a *o*-difenol y la subsiguiente oxidación de este a *o*-quinona, actividad cresolasa y catecolasa respectivamente. Siguiendo un mecanismo ordenado, la enzima liga primero el oxígeno y después el monofenol.³³

Se produce un cambio de valencia de los iones de cobre de Cu^{1+} a Cu^{2+} formándose un complejo que tiene un enlace O - O bien polarizado donde se produce la hidroxilación a *o*-difenol. La oxidación del *o*-difenol a *o*-quinona finaliza el ciclo.³⁴

La polifenoloxidasasa es capaz de catalizar reacciones de oxidación de compuestos polifenólicos en presencia de oxígeno molecular y la presencia de los compuestos oxidados por la enzima son precursores de las reacciones de pardeamiento que ocurren en los procesos de pos-recolección y manipulación de frutas y hortalizas.³⁵

Figura 3. Mecanismo cinético propuesto para la oxidación de *o*-difenol (catecol [A]) y un monofenol (fenol [B]).



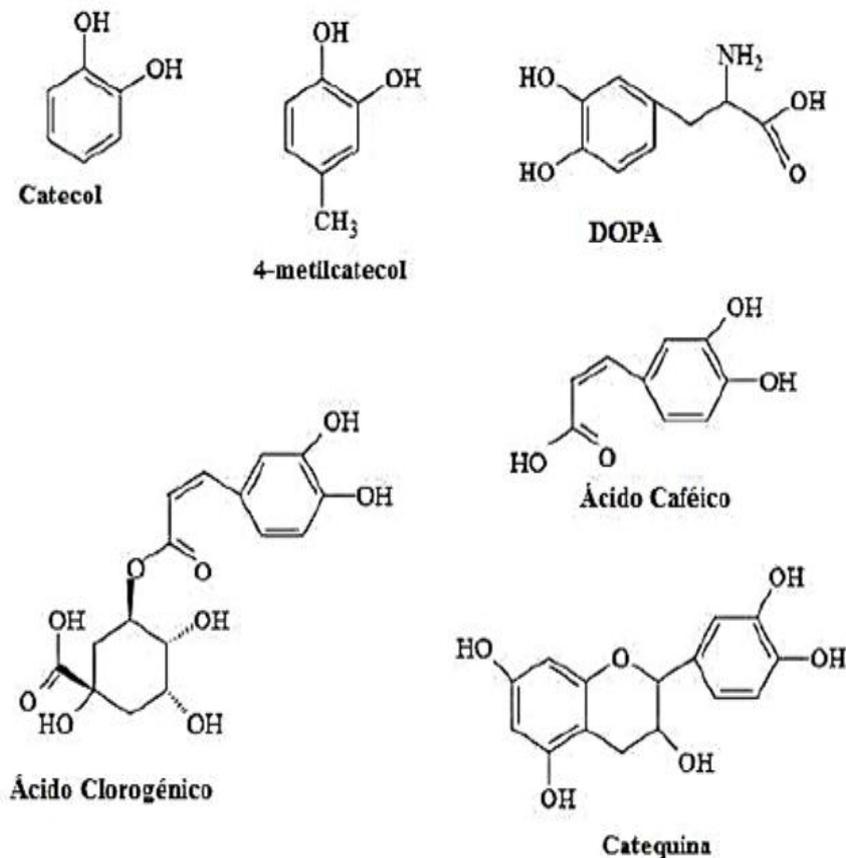
Fuente: Ramírez *et al* (2003).³⁰

³⁴ Belitz, H. D., & Grosh, W. (1997). *Química de los Alimentos*. Zaragoza: Editorial Acirbia S.A.

³⁵ Ayaz, F. A., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y., & Colak, A. (2008). Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chemistry*, 106:291-298.

Palmer en 1961, evalúa varios tipos de sustratos ver figura 4, para determinar la actividad enzimática en mono o difenoles, como por ejemplo dopamina, ácido clorogénico, catecol, dopa, entre otros.³⁶

Figura 4. Estructura de algunos sustratos naturales de la PPO.



Fuente: Queiroz *et al.* (2008).³⁷

La presencia de esta enzima en ciertas frutas y productos de consumo humano es indeseable, como por ejemplo las harinas elaboradas de: aguacate, plátano, manzanas, papa, provocando el oscurecimiento, reducción de compuestos fenólicos que tienen propiedades antioxidantes, pérdida de características sensoriales en productos como (cerveza, vino, aceite de oliva no procesado, ají y en los camarones produce manchas negras.^{36 37}

³⁶ Palmer, J. K. (1961). Banana Polyphenoloxidase Preparation y Properties. *Plant Physiology*, 36: 508-513.

³⁷ Queiroz, C., López, M. L., Fialho, E., & Valente-Mesquita, V. L. (2008). Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*, 24: 361-375.

Por otra parte, la presencia de la enzima PPO también tiene su lado positivo, ya que el oscurecimiento que esta produce es deseable en ciertos productos como por ejemplo en el chocolate, té, café, algunas variedades de uvas y en la elaboración de cidra.^{36 37}

3.2.3. ESTRATEGIA DE EXTRACCIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA

Estudios en enzimología afirman que la acción catalítica para la conversión de una sustancia en otra es en general ineficaz, si la enzima no ha sido parcialmente purificada.³⁸ La mezcla de diferentes enzimas liberadas de un extracto crudo, que contiene varios reordenamientos del material de partida hace que la acción de la enzima se vea afectada.

La purificación de la enzima asegura que un solo tipo de enzima dirige la conversión desde una sustancia A hacia B; de esta forma, se puede comprender, como la enzima hace su trabajo.³⁸ En las plantas, los polifenoles se encuentran localizados principalmente en las vacuolas y su oxidación es catalizada por la PPO.

Los procesos de extracción de la PPO del tejido vegetal presentan algunos aspectos a considerar, como por ejemplo, la resistencia de la pared celular, por la presencia de celulosa. Debido a que las vacuolas ocupan gran parte del volumen total de la célula; cuando estas, son destruidas liberan proteasas al medio, lo cual, hace que el pH del medio disminuya; adicionalmente, los compuestos fenólicos en la célula reaccionan con el oxígeno en presencia de la PPO formando pigmentos poliméricos. Para minimizar estos efectos es usual adicionar agentes reductores como el 2-mercaptoetanol para inhibir la actividad de la PPO o adicionar polímeros como la polivinilpirrolidona para adsorber los compuestos fenólicos.³⁹

En la mayoría de los métodos de extracción se involucra el control del pH utilizando soluciones amortiguadoras para estabilizar las membranas celulares y el fraccionamiento de las proteínas, consiguiendo la separación. Se utilizan surfactantes no iónicos, como Triton X-114, Triton X-100.⁴⁰ Los agentes precipitantes como acetona o sulfato de amonio permiten separar la proteína en

³⁸ Kornberg, A. (1990). Why Purify Enzymes. *Methods in enzymology*, 1-5.

³⁹ Price, N. C., & Stevens, L. (2001). Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Enzyme Assays*, 209-224.

⁴⁰ Neugebauer, J. M. (1990). *Methods in Enzymology*, Guide to Protein Purification. San Diego Ca: Deutscher M.P.

una primera fase de purificación. Posteriormente se utilizan técnicas como la centrifugación las cuales se deben llevar a cabo a bajas temperaturas.⁴¹

Durante los procesos de destrucción de los tejidos vegetales la enzima puede disminuir su actividad o llegar a perderla.

Para evitar esto hay que diseñar estrategias de extracción con el fin de proteger su actividad trabajando a bajas temperaturas, vitando de esta manera dicha perdida, el material de extracción debe ser protegido utilizando también guantes.

3.2.3.1. Control de pH

Muchas enzimas presentan su actividad máxima en estrechos intervalos de pH, la exposición a valores de pH por fuera del intervalo, puede conducir a la pérdida irreversible de actividad.

Algunos factores importantes a tener en cuenta al momento de seleccionar la solución amortiguadora para la extracción de la enzima son los siguientes:³⁹

- El intervalo de pH cercano a la máxima actividad.
- Fuerza iónica y temperatura que pueden afectar la solución buffer.
- La solución no debe afectar la actividad de la enzima ya sea por efectos quelantes o por interferencias en etapas posteriores de purificación.

3.2.3.2. Control de temperatura

Durante los procesos de rompimiento y/o manipulación del material biológico la temperatura puede aumentar considerablemente, para evitar esto, es necesario trabajar a temperaturas bajas o utilizar instrumentos que ayuden a disiparla. En la tabla 3 se puede observar los valores óptimos de pH y temperatura en que la PPO alcanza su máxima actividad.

Lo usual es llevar a cabo los procesos de extracción en intervalos de temperaturas comprendidos entre -4°C y 4°C para minimizar los procesos de desnaturalización de la enzima y reducir la actividad de las proteasas.⁴²

⁴¹ Harding, S. E., & Rowe, A. J. (1996). *Purification and analysis of enzyme preparations*. San Diego Ca: P.C.Engel.

⁴² Lowe, M. K., & Thomas, J. A. (2007). *Purification and Analysis of Enzyme Preparations*. San Diego Ca: P.C.Engel.

En la tabla 3 se indican los valores óptimos de pH y temperatura para realizar la extracción de la PPO en diferentes alimentos.

Tabla 3. Condiciones óptimas de la extracción de la PPO.

Alimento	Sustrato con alta afinidad	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)
Manzana	4-metilcatecol Catecol	7.0	15
Alcachofa	4-metilcatecol Catecol	6.0	25
Berenjenas	Catecol	7.0	20
Banano (cv. Anamur)	Catecol	7.0	30
Uva (cv. Victoria)	Ácido clorogénico Catequina	5.0	25
Nispero	Ácido clorogénico 4-tercatecol	6.5	30
Mango (cv. Tainong)	Catecol Pirogalol	7.0	30
Mora	Pirogalol 4-metilcatecol	7.5	20
Pimienta	Catecol	7.0	30
Fresa (cv. Elsanta)	Catecol	5.0	25

Fuente: Queiroz *et al.* (2008).³⁷

Los valores óptimos para la extracción de la solución enzimática en distintas variedades de café se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones óptimas de la extracción de PPO en el café.

Variedades de Café	Sustrato con alta afinidad	pH	Temperatura (°C)	Fuente bibliográfica
Café robusta (grano)	—	6.0	50	(Mathur, <i>et al.</i> , 2015)
Café arábigo (hojas y endospermo)	Ácido clorogénico	6.0 – 7.0	30	(Mazzafera & Robinson, 2000)

Fuente: Mathur, *et al.* (2015); Mazzafera & Robinson (2000).^{10 43}

3.2.4. SUSTRATO

3.2.4.1. Catecol

Catecol (Pirocatecol, 1,2-dihidroxibenceno, 1,2-bencenodiol, o-dihidroxibenceno) es un compuesto cristalino con olor fenólico el cual posee un peso molecular de 110,11 g/mol, este cristaliza en el sistema monoclinico y los cristales son incoloros. Se sublima y es volátil con vapor de agua. El aire y la luz le provocan cambios de coloración. Fue preparado por primera vez en 1839 por Reinsch mediante la destilación de la catequina. Con los dos grupos hidroxilo adyacente que tiene el catecol, puede formar complejos con casi todas las sales metálicas. Muchos de los complejos del catecol y los derivados del catecol son reactivos analíticos de gran utilidad.⁴⁴

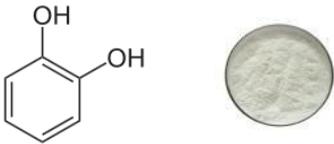
El catecol por ser dihidroxibenceno experimenta todas las reacciones características de los fenoles, por lo cual el catecol al reaccionar con anhídrido ftálico para formar histazarina (2,3-dihidroxi-9,10-antracendiona) y alizarina (1,2-dihidroxi-9,10-antracendiona), con sus dos grupos hidroxilo adyacentes experimenta una reacción de ciclización con cloruro de metileno para dar metilendioxi-benceno (1,3-benzodioxol) y con 2-cloroetil diéter se produce s-dibenzo-18-corona-6-poliéter. Al reaccionar el pirocatecol con amoniaco resulta los p-, m- y o-amonifenoles correspondientes.⁴⁴

⁴³ Mathur, R., Navya, P., Basavaraj, K., & Murthy, P. (2015). Bioprocess of robusta cherry coffee with polyphenol oxidase and quality enhancement. *EUR Food Res Technol* (240), 319-325.

⁴⁴ Kirk, & Othmer. (1998). *Enciclopedia de Química Industria* (Vol 3). New York: LIMUSA, S.A. de C.V.

Además de estas reacciones el catecol puede aparearse fácilmente con las sales de aril diazonio para dar compuestos azo y biazos que se emplean como tintes. El catecol reacciona con cloroformo en condiciones alcalinas para dar una mezcla de aldehídos proto- y catéquicos. Los dihidroxibencenos experimentan carboxilación por reacción con el dióxido de carbono y con sus sales de metales alcalinos.⁴⁴ En la tabla 5 se indican las propiedades más relevantes del catecol.

Tabla 5. Características principales y propiedades físicos-químicas del catecol.

Fórmula química	$C_6H_4(OH)_2$
Fórmula estructural	
Peso molecular	110.11 g/mol
Apariencia y olor	Cristales incoloros y olor a fenol
Temperatura de ebullición (P=101.3 Kpa)	245 °C
Temperatura de fusión	105 °C
Solubilidad (a 60 °C g/100 g de solución)	80.4 en agua 74.0 en alcohol etílico 65.3 en éter etílico 75.2 en acetona 7.3 en benceno

Fuente: Kirk & Othmer, (1998)⁴⁴

3.2.4.1.1. Usos y aplicaciones

Por orden de mayor a menor desde el punto de vista económico las principales aplicaciones del catecol son: en el revelado fotográfico, como adhesivos en los neumáticos, como antioxidantes de hule y antiozonizantes e inhibidores de monómeros, como adhesivos para madera, como absorbentes en el ultravioleta y abrillantadores ópticos, como tintes y en derivados diversos.⁴⁴

Otros usos importantes del catecol incluyen: la preparación de productos medicinales y colorantes, en la vulcanización del caucho, el teñido de pieles y tintas especiales para el cabello, como agente para la eliminación de oxígeno y baños galvánicos y en la producción de antioxidante para caucho y aceites lubricantes. Además también se ha utilizado en soluciones y ungüentos antisépticos para su aplicación en heridas y quemaduras.⁴⁴

3.2.4.1.2. Derivados del Catecol

- A. El Catecol es precursor en la síntesis de adrenalina (principio activo de la médula suprarrenal).
- B. También es utilizado para sintetizar piperonal, compuesto utilizado en la producción de perfumes.
- C. El dihidroxifenilmetano obtenido de la condensación del catecol en presencia de formaldehído se utiliza en la preparación para curtido de pieles.
- D. Las resinas sintéticas pueden prepararse también a partir de catecol, a más de los productos de condensación obtenidos por reacción de catecol con formaldehído, acetaldehído, acetona. Los ésteres monoméricos de catecol que contienen un grupo alquilo insaturado puede ser polimerizado a partir de productos de interés como laminación de resinas. Estos productos son usados recientemente en el tratamiento de tejidos de nylon para mejorar su estabilidad a la luz.

Las funciones ya mencionadas fueron descritas por Kirk y Othmer (1998).⁴⁴

3.2.5. CINÉTICA ENZIMÁTICA

Antes de iniciar la descripción del significado de la cinética enzimática, resulta necesario tener una visualización de los conceptos básicos sobre la cinética química, que es aquella que se encarga del estudio de la velocidad de reacción y mecanismos a través del cual los reactivos se transforman en productos. A continuación se detalla la clasificación del orden de reacción.⁴⁵

- A. Orden cero. La velocidad de formación es independiente de la concentración de sustrato: $v = k$.

⁴⁵ González, J. M. (2010). *Curso de Biomoléculas*. Universidad del País Vasco. Obtenido de <http://www.ehu.eus/biomoleculas/enzimas/enz3.htm>

B. Primer orden. La velocidad de formación de productos es directamente proporcional a la concentración del sustrato: $v = k [A]$.

C. Segundo orden: La velocidad de formación de los productos depende de:

- La concentración de dos sustratos: $V = k [A_1] [A_2]$.
- Del cuadrado de la concentración de un único sustrato: $v = k [A]^2$.

Los principios generales de la cinética de las reacciones químicas son aplicables a las reacciones catalizadas por las enzimas, en los seres vivos.⁴⁶ Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad de la enzima.⁴⁵

La medida de la velocidad se la debe realizar en condiciones óptimas de pH, temperatura, presencia de cofactores, etc, utilizando diferentes concentraciones de sustrato. En estas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$). Ésta puede determinarse bien midiendo la formación de los productos o la desaparición de los sustratos.⁴⁵

Al medir la velocidad de formación de producto o desaparición del sustrato en función del tiempo se obtiene la llamada curva de avance de la reacción, o simplemente, la cinética de la reacción. A medida que la reacción transcurre, la velocidad de acumulación del producto va disminuyendo porque se va consumiendo el sustrato de la reacción, es decir que la concentración del sustrato, satura el centro activo de la enzima.⁴⁵

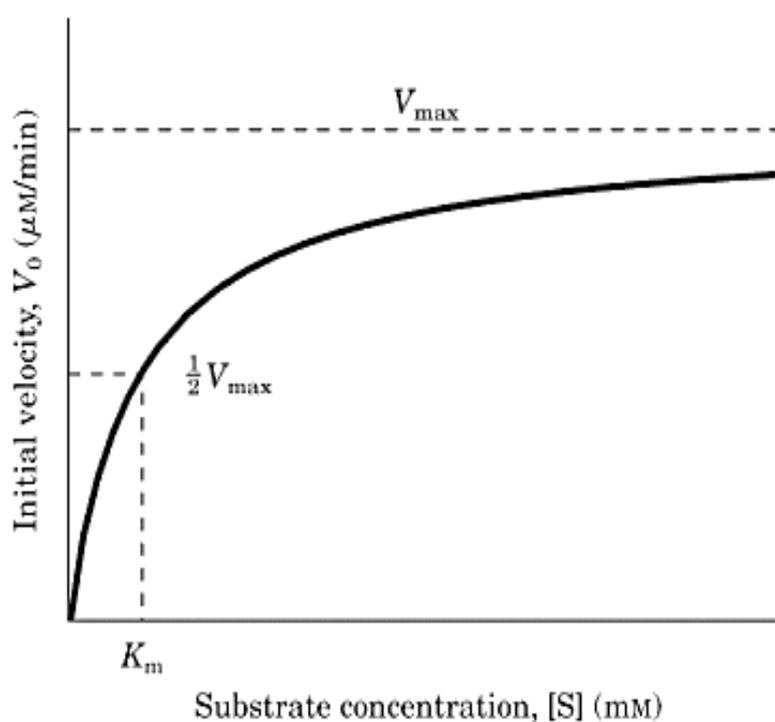
Una simplificación en los experimentos cinéticos consiste en medir la velocidad inicial (V_0). Si el tiempo es suficientemente corto la disminución de sustrato será mínima y ésta podrá considerarse, por tanto, casi constante.⁴⁶ La velocidad inicial de la reacción es igual a la pendiente de la curva de avance a tiempo cero. De esta forma, la medida de V_0 se realiza antes de que se consuma el 10% del total del sustrato, de forma que pueda considerarse la $[S]$ como esencialmente constante a lo largo del experimento.

⁴⁶ Herrera, E., Ramos, M., Roca, P., M, M., & Arribas, V. (2014). *Bioquímica Básica*. Madrid: Elsevier.

Además, en estas condiciones no es necesario considerar la reacción inversa, ya que la cantidad de producto formada es tan pequeña que la reacción inversa apenas ocurre. De esta forma se simplifican enormemente las ecuaciones de velocidad.⁴⁵

Para estudiar la cinética enzimática se mide el efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción, manteniendo la cantidad de enzima constante. En la figura 5 se puede observar la tendencia que presentan las oxidoreductasas.

Figura 5. Cinética enzimática. Modelo de Michaelis-Menten.



Fuente: Herrera, et al. (2014).⁴⁶

Cuando $[S]_0$ es pequeña, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y por tanto, la reacción es de primer orden. A altas concentraciones $[S]_0$, la enzima se encuentra saturada y la velocidad ya no depende de $[S]_0$. En este punto, la reacción es de orden cero y la velocidad es máxima (V_{max}).⁴⁵

3.2.5.1. *Modelo Cinético de Michaelis-Menten*

Los estudios sistemáticos del efecto de la concentración inicial del sustrato sobre la actividad enzimática comenzaron a desarrollarse a finales del siglo XIX. El concepto de complejo enzima-sustrato como intermediario del proceso de catálisis enzimática se introdujo en 1882. Leonor Michaelis y Maud Menten en 1913 desarrollaron esta teoría y propusieron una ecuación de velocidad que explica el comportamiento cinético de las enzimas.⁴⁵ En la cinética enzimática se distinguen tres fases:

- A. Para una concentración baja de sustrato, la velocidad de la reacción es directamente proporcional a la concentración del sustrato (relación lineal), la cinética es de primer orden.
- B. Para una concentración alta de sustrato, la velocidad de la reacción se hace prácticamente constante e independiente de la concentración, la cinética se considera de orden cero.
- C. Para concentraciones de sustrato intermedias la velocidad del proceso deja de ser lineal, y a esta zona se la denomina de cinética mixta.

Para explicar la relación observada entre la velocidad inicial (V_0) y la concentración inicial de sustrato $[S]_0$ Michaelis y Menten propusieron que las reacciones catalizadas enzimáticamente ocurren en dos etapas: En la primera se forma el complejo enzima-sustrato y en la segunda, el complejo enzima-sustrato da lugar a la formación del producto.⁴⁵

La curva que expresa la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad inicial tiene la misma forma para la mayoría de las enzimas; se trata de una hipérbola rectangular, (Figura 5) cuya expresión algebraica viene dada por la ecuación de Michaelis-Menten, donde muestra la relación entre la velocidad inicial (V_0) y la concentración de sustrato, $[S]$. Ecuación 1.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ec. (1)}$$

Los términos $V_{m\acute{a}x}$ (velocidad máxima) y K_m (constante de Michaelis-Menten) son dos parámetros cinéticos característicos de cada enzima, que pueden determinarse experimentalmente. La velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) se obtiene cuando la velocidad de reacción se hace independiente de la

concentración de sustrato, cuando esto ocurre la velocidad alcanza un valor máximo. Este valor depende de la actividad de la enzima.

La constante de Michaelis (K_m) nos indica la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Este parámetro es independiente de la concentración de enzima, y es característico de cada enzima según el sustrato utilizado. La K_m también es un indicador de la afinidad que posee la enzima por el sustrato, siendo ésta mayor, cuanto menor es la K_m (cerca de 0). Cuanto menor sea la K_m menor será la cantidad de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima, lo que implica una mayor afinidad de la enzima hacia el sustrato.⁴⁶

La constante de Michaelis-Menten (K_m) es un parámetro cinético muy importante por múltiples razones:

- A. K_m es la concentración de sustrato en donde la velocidad de reacción es igual a la mitad de la velocidad máxima. En efecto, si $K_m = [S]$, la ecuación de Michaelis-Menten se reduce a: $v = V_{max}/2$.
- B. El valor de K_m da idea de la afinidad de la enzima por el sustrato: A menor K_m , mayor afinidad del enzima por el sustrato, y a mayor K_m , menor será dicha afinidad. Este hecho tiene fácil explicación si tenemos en cuenta que K_m se define como (k_2+k_3/k_1) , donde las reacciones 2 y 3 destruyen el complejo ES, mientras que la reacción 1 lo forma. Así, si K_m es grande, el complejo ES es inestable pues predomina la tendencia a destruirlo (poca afinidad hacia el sustrato), y si K_m es pequeña, el complejo ES es estable, ya que predomina la tendencia a formarlo (gran afinidad hacia el sustrato).
- C. La K_m del sustrato natural es menor que la de los sustratos análogos. Si dos sustratos de la misma enzima tienen distinta K_m , el que presente mayor K_m tiene menor afinidad por el enzima, y la reacción transcurre siempre a menor velocidad que con el sustrato de menor K_m , salvo a concentraciones saturantes de sustrato, donde la $v = V_{max}$.

D. Los valores de Km de muchas enzimas son próximos a los de la concentración fisiológica de sus sustratos, de forma que pequeñas variaciones en la [S] pueden suponer grandes cambios en la velocidad de toda una ruta metabólica. En la tabla 6 se indican los valores de la Km para diferentes matrices.

Tabla 6. Valores de la constante de Michaelis-Menten (Km) de PPO.

Alimentos	Sustrato con alta afinidad	Km (mM)
Manzana	4-metilcatecol	3.1
	Catecol	34.0
Alcachofa	4-metilcatecol	10.2
	Catecol	12.4
Berenjenas	Catecol	8.7
Banano (cv. Anamur)	Catecol	8.5
Uva (cv. Victoria)	Ácido clorogénico	3.2
	Catequina	4.3
Nispero	Ácido clorogénico	1.0
	4-tercatecol	1.2
Mango (cv. Tainong)	Catecol	6.3
	Pirogalol	47.8
	Pirogalol	1.2
Mora	4-metilcatecol	9.2
	Catecol	19.8
Pimienta	Catecol	6.3
Fresa (cv. Elsanta)	Catecol	5.9
Aguacate (Hass)*⁴⁷	Catecol	1.38
	DL-DOPA	78.03

Fuente: Queiroz *et al.* (2008).³⁷

⁴⁷ Amaya Paredes, E., Tarkus Patiño, R., & Domínguez Magaña, M. (2008). Extracción y caracterización cinética de la enzima polifenoloxidasa del aguacate (Persea americana Miller) variedad Hass. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química* (47), 10-16.

También se registran valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) en distintas variedades de café, tal como se detalla en la tabla 7.

Tabla 7. Valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) de PPO en variedades de café.

Variedades de Café	Sustrato con alta afinidad	K_m (mM)		Fuente bibliográfica
		PPO-H	PPO-E	
Café arábigo (hojas y endospermo)	Ácido clorogénico	0.88	2.27	(Mazzafera & Robinson, 2000)
	DOPA	1.08	0.42	(Goulart,
Café arábigo (bebida de café Río y Suave)	Ácido clorogénico	0.74	0.06	Donizeti, Murad,
	Catecol	0.49	0.09	Padilha, & De
	Ácido gálico	2.39	0.11	Oloveira, 2000)
	Ácido pirogálico	3.59	0.25	

Fuente: Mazzafera, Robinson & Goulart et al. (2000).^{10 48}

3.2.5.2. Actividad enzimática

La velocidad de una reacción (V) nos indica la cantidad de sustrato consumido, o producto formado, por unidad de tiempo. En el Sistema Internacional se designa por “U” (unidad de actividad enzimática) y corresponde a los μ moles de sustrato consumidos en 1 min, o bien a los μ moles de producto formado en 1 min.

$$U \equiv \mu\text{mol S/min} \equiv \mu\text{mol P/min}$$

La unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que origina la transformación de 1 μmol (10^{-6} mol) de sustrato por minuto a 25 °C, en condiciones óptimas de medida. La actividad específica es el número de unidades de la enzima por miligramo de proteína. Constituye una medida de la pureza de la enzima, que aumenta durante el proceso de purificación y llega a ser máxima y constante cuando esta se haya en estado puro.

⁴⁸ Goulart, P., Donizeti, J., Murad, M., Padilha, R., & De Oloveira, L. (2000). Isolamento e características cinéticas da Polifenoloxidase em diferentes tipos de amostras de grãos de *coffea arabica*. *Simposio de Pesquisa dos cafés do Brasil*, 705-709.

La comisión de enzimas ha recomendado una nueva unidad internacional para la actividad enzimática el *catal* (cat), que se define como la cantidad de actividad enzimática que transforma 1 mol S⁻¹ de sustrato.

Además la actividad puede ser expresada en microcatales (μcat), nanocatales (ncat) o picocatales (pcat). Definido el concepto básico de la actividad enzimática, resulta necesario señalar valores de la actividad de la Polifenoloxidasas en distintas variedades de café.

Tabla 8. Actividad de la Polifenol oxidasas en granos de café arábica mantenidas durante ocho días antes del secado.

Tiempo (días)	Actividad de la PPO (U/min/g)
0	68.20
1	66.33
2	64.23
3	62.13
4	61.20
5	60.03
6	58.71
7	58.87

Fuente: Pimenta et al. (2000)⁴⁹

La actividad enzimática es muy variable con respecto al origen de la misma, tal es el caso del estudio realizado en el café robusta,⁴³ detallado en la siguiente tabla.

Tabla 9. Purificación parcial de PPO de *Pleurotus florida*.

Purificación	Actividad total (U/ml)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg proteína)
Enzima cruda	4000	125	32

Fuente: Mathur et al. (2015).⁴³

⁴⁹ Pimenta, C. J., Cássio de Carvalho, J., & Ribeiro Vilela, E. (2000). Polifenoloxidasas activity, potassium lixiviation, titratable acidity and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.), maintained sacked for different periods of time before drying. *Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 630-634.

En el estudio antes mencionado, se desarrolló en las siguientes condiciones un tratamiento al grano de café robusta con la enzima PPO obtenida de *P. florida*, realizando una mezcla de enzimas (PPO 32 U/mg de actividad específica) durante 30 y 60 minutos a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ en condiciones estáticas, una vez tratados los granos fueron lavados con agua limpia y secados al sol hasta una humedad del 12%.⁴³

4. VISUALIZACIÓN DEL ALCANCE DE ESTUDIO

4.1. APORTE SOCIAL

Con este trabajo de investigación se aportará de manera significativa al sector cafetero de la Provincia específicamente a los agricultores del Cantón Jipijapa, dando a conocer las características cinéticas de la variedad de café que posee mejores características sensoriales.

4.2. APORTE ECONÓMICO

Siendo la agricultura una de las potencias económicas de la Provincia, el desarrollo de este trabajo juega un papel importante en el sector cafetalero ya que una de estas variedades de café puede ser explotada más que las otras por poseer mayor calidad, lo que le daría mayor relevancia en el aspecto económico, al aportar divisas al Estado y a la generación de ingresos para las familias que se dedican a esta labor, además de aportar a otros factores de cadena productiva que dependen de las contingencias y precios del café, llegando a convertirse en referente donde se cultiva café de exportación, incentivando no sólo a los agricultores del cantón sino también al país.

4.3. APORTE CIENTÍFICO

Al demostrar que la actividad enzimática de la Polifenoloxidasa actúa de manera directa en la calidad del café desde la etapa de la cosecha hasta su procesamiento como café soluble, se pone de manifiesto una nueva manera de evaluar características como el sabor, color y aroma mediante investigaciones de este tipo.

5. ELABORACIÓN DE HIPÓTESIS Y DEFINICIÓN DE VARIABLES

5.1. HIPÓTESIS

La actividad cinética enzimática de la Polifenoloxidasa presenta diferente comportamiento entre las diferentes de café evaluadas en la pulpa de diferentes variedades de café son afines con el sustrato.

5.2. DEFINICIÓN DE VARIABLES

5.2.1. VARIABLE INDEPENDIENTE

Variedades de café, parámetros físicos de operación.

5.2.2. VARIABLE DEPENDIENTE

Actividad enzimática.

5.3. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE: Diferentes sustratos, parámetros físicos de operación.				
MANIFESTACIÓN	CATEGORÍA	INDICADOR	ÍTEMS	TÉCNICA
Variedades de Café. El empleo de diferentes variedades de café será útil para identificar cual posee mayor cantidad de la enzima.	Variedades de café	Typico Salchimor Caturra	¿La actividad de la enzima dependerá del origen del cual haya sido extraída?	Método de extracción
Parámetros físicos de operación. Tienen gran influencia en la actividad de la enzima, ya que el pH o temperatura inapropiada puede afectar en el proceso de la misma.	VARIABLES físicas de ensayo	Temperatura pH	¿La determinación de los parámetros de temperatura y pH permiten optimizar el proceso de evaluación de la actividad enzimática?	Espectrofotometría UV/Visible
Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)				

VARIABLE DEPENDIENTE: Actividad enzimática				
MANIFESTACIÓN	CATEGORÍA	INDICADOR	ÍTEMS	TÉCNICA
<p>Actividad enzimática. Se la puede definir como la cantidad de enzima que cataliza la conversión dada por unidades presentes por cada mL (U).</p>	<p>Evaluación de parámetros cinéticos</p>	<p>Constante de Michaelis-Menten (Km)</p> <p>Velocidad máxima de reacción (V_{máx})</p> <p>Actividad de la enzima</p>	<p>¿La Km y la velocidad máxima de reacción dan a conocer el perfil cinético de la PPO?</p> <p>¿La concentración de la enzima permitirá evaluar la actividad enzimática?</p>	<p>Espectrofotometría UV/Visible</p>
Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)				

6. DESARROLLO DEL DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación está basado en los resultados experimentales obtenidos de manera secuencial, tomando en consideración los diferentes parámetros cinéticos tales como la V_{max} , K_m así como también la afinidad de la enzima hacia el sustrato de este modo se identifica la variedad de café con el mejor perfil enzimático.

6.1. OBJETIVOS

6.1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la cinética enzimática de la polifenoloxidasas en diferentes variedades de café con el empleo de catecol como sustrato para identificar cuál de estas es más afín a la enzima.

6.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Evaluar los parámetros de operación para la Polifenoloxidasas pH, temperatura.
- Determinar la actividad de la enzima (U) presente en la pulpa.
- Calcular la constante de afinidad de la enzima por el sustrato (Km).
- Evaluar el consumo de sustrato durante un determinado tiempo.

6.2. CAMPO DE ACCIÓN

Este trabajo de investigación tiene como campo de acción los laboratorios de la Universidad Técnica de Manabí, entre ellos el Laboratorio de Química, Microbiología y Ecotoxicología de la Carrera de Ingeniería Química y el Laboratorio de Química del Instituto de Ciencias Básicas (ICB).

6.3. DISEÑO METODOLÓGICO

6.3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

La información preliminar necesaria para la fundamentación de este trabajo de titulación se obtuvo a partir de información secundaria (artículos científicos y tesis doctorales). Para este proyecto se utilizó una investigación de tipo aplicada, la cual se basó en la experimentación, obteniéndose de forma directa la información, la cual se procesó y se tabuló con sus respectivas desviaciones estándar, comprobando de esta forma la hipótesis planteada sobre las variaciones de la actividad enzimáticas de la PPO presente en la pulpa de café según el sustrato empleado.

6.3.2. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

Esta experimentación se describió a través de métodos cuantitativos para describir la investigación, teniendo la posibilidad de controlar las variables independientes, ya que es un procedimiento que explica hechos por medio de datos, técnicas y tecnologías estadísticas para comprobar la hipótesis. La metodología adoptada para la extracción del extracto enzimático fue la desarrollada por Duangmal et al., (1999); Ni Eidhin et al., (2010), con modificaciones.^{50 51}

6.3.3. TÉCNICAS

Las técnicas que se utilizaron en los experimentos del laboratorio estuvieron basadas en procedimientos estandarizados mediante protocolos nacionales e internacionales, los equipos y reactivos que se utilizaron estaban calibrados y estandarizados de acuerdo a las mismas normas establecidas en los protocolos.

6.3.3.1. Materiales

Tabla 10. Listado de materiales empleados en la experimentación.

Materiales	Medidas	Margen de error	Observaciones
Matraz aforado	(50 – 100) mL	0.08%	Material de vidrio
Vaso de precipitación	(25 - 50 – 1000) mL	±5%	Material de vidrio
Probeta	1000 mL	±2%	Material de vidrio
Pipeta	(1 - 5 – 10) mL	±0.05%	Material de vidrio
Frasco autoclavable	500 mL	-	Material de vidrio
Frascos ámbar y transparente	-	-	Material de vidrio
Vidrio de reloj	-	-	Material de vidrio
Termómetro	(-30 a 500) °C	±5%	Material de vidrio
Tubo de ensayo	-	-	Material de plástico
Espátula	-	-	Madera/metal
Pastilla de agitación	-	-	Plástico/imán
Pera	-	-	Plástico/caucho
Malla de filtración	-	-	Plástico
Papel filtro	125 mm	-	Papel

Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016).

⁵⁰ Duangmal, K., Richard, K., & Apenten, O. (1999). Comparative study of polyphenol oxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato. *Food Chemistry* (64), 351-359.

⁵¹ Ni Eidhi, D., Degn, P., & O'Beirne, D. (2010). Characterization of polyphenol oxidase from Rooster potato (*solanum tuberosum* cv Rooster). *Journal of biochemistry* (34), 13-30.

6.3.3.2. Equipos

Tabla 11. Listado de equipos empleados en la experimentación.

Equipos	Modelo	Observaciones
Espectrofotómetro	UV-Vis JENWAY 7305 Spectrophotometer	Tipo visible, características: halógeno de xenón, longitud de onda (Min: 198nm – Máx: 1000nm)
Balanza analítica	GemPlus Sartorius, Modelo CP, GC y GP Sorvail RC-5B	Mayor precisión con cuatro decimales
Centrifuga	refrigerated superspeed centrifuge	Separación efectiva de faces
Calentador agitador	Thermo SCIENTIFIC CHIMAREN	Resistente a elevadas temperaturas
Micropipeta	Wama Diagnostica	Tecnología mecánica de volumen regulable y canal simple. Volumen (Min: 0mL y Máx: 1mL)

Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016).

6.3.3.3. Sustancias y reactivos

Tabla 12. Listado de sustancias y reactivos empleados en la experimentación.

Sustancias /Reactivos	Características	Proveedor
Tampón buffer fosfato sódico (PO₄H₂K)	Peso molecular 137.99 g/mol Catálogo: S369 Lugar de origen: China Fecha expiración: Marzo 2019	NOVACHEM del Ecuador
Catecol (C₆H₆O₂)	Peso molecular 110.11 g/mol	BIOCHEM
Hidróxido de sodio (NaOH)	Peso molecular 2.13 g/cm ³	UTM
Agua destilada	Sustancia cuya composición se basa en las moléculas de H ₂ O que ha sido purificada mediante destilación	UTM
Café arábigo (caturra, salchimor y typico)	Muestras producidas sin el empleo de químicos	Finca el Paraíso, Ruta del café Jipijapa-Noboa, Recinto San José

Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016).

7. PROCESO EXPERIMENTAL REALIZADO

7.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado en este estudio, estuvo constituido por café de la variedad *Coffea arabica*, cultivado en el Cantón Jipijapa de la provincia de Manabí, específicamente en la ruta del café Jipijapa-Noboa, recinto San José, Finca el Paraíso. Estos frutos fueron recolectados manualmente de plantas que han alcanzado su madurez fisiológica. Las variedades café arábigo: typica, salchimor y caturra.

7.2. REACTIVOS

Se utilizó tampón Buffer Fosfato Sódico de la casa comercial NOVACHEM del Ecuador de peso molecular 137,99 g/mol, hidróxido de sodio de 0.2M de la Universidad Técnica de Manabí y el sustrato: Catecol de la casa comercial BIOCHEM, de peso molecular 110,11 g/mol.

7.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los granos de café fueron seleccionados y lavados, para luego ser triturados y posteriormente almacenados en refrigeración, previo a la extracción del extracto enzimático el cual se mantuvo a -20°C.

7.4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

La metodología adoptada para la obtención del extracto enzimático fue desarrollada por Duangmal et al., (1999), Ni Eidhin et al., (2010), con algunas modificaciones. La extracción de la fracción enriquecida en PPO se llevó a cabo a 4°C para las tres variedades de café anteriormente mencionadas. Se pesó 90g del grano de café (typico, caturra y salchimor) los cuales previamente estuvieron molidos, se mezcló con tampón Buffer fosfato sódico 0.2 M a pH 7.0, con un volumen de 280 mL, esta solución fue homogenizada durante 20 minutos para cada muestra. Se utilizó un agitador-calentador Thermo SCIENTIFIC CHIMAREN.

A continuación se realizó un filtrado utilizando una serie de mallas para eliminar el material más grueso que se encuentra en la disolución, este líquido se filtró utilizando un sistema al vacío. El líquido se centrifugó utilizando una velocidad de 5000 r.p.m. durante 15 minutos con el equipo ((Sorvail RC-5B refrigerated superspeed centrifuge).

Finalmente el sobrenadante se filtró nuevamente al vacío utilizando papel filtro de 125 mm de diámetro poroso.

7.5. DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA ÓPTIMA

La determinación de la temperatura óptima de la PPO, se ensayó en un rango comprendido entre 25°C y 65°C (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 y 65 °C), se fijó 5mL de la concentración de catecol en 100mM, 10mL de tampón Buffer Fosfato sódico 0.2M de pH 7.0 y 5ml de extracto crudo enzimático diluido (1/70) de café arábigo (typico, caturra y salchimor), la reacción tuvo una duración de 3 minutos, la metodología adoptada para este ensayo fue la descrita por Mathur, *et al*, (2015).

7.6. DETERMINACIÓN DE pH ÓPTIMO

Para el ensayo del pH se utilizaron concentraciones en un rango que va desde 5.5 a 9 (5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9), con el fin de establecer el pH óptimo en la actividad PPO. El efecto del pH fue evaluado por la adición de 5mL de extracto enzimático diluido (1/70) de las tres variedades de café (typico, caturra y salchimor) con 5ml de catecol, ambos en una concentración de 100mM y 10mL de Buffer fosfato sódico 0.2M; todas las concentraciones se fijaron a la temperatura óptima previamente obtenida (50°C) durante 3 minutos, luego de esto se midió la absorbancia a 410nm en el espectrofotómetro UV/Visible, la metodología adoptada para este ensayo fue la descrita por Ni Eidhin et al., (2010), con algunas modificaciones.

7.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática la Polifenoloxidasa (PPO), se realizó según lo descrito por Trujillo, Villamizar, & Durán (2012); Ni Eidhin et al., (2010) y Mathur, *et al*, (2015), con algunas modificaciones.

La temperatura que se utilizó fue 50 °C, se graficó una recta de calibrado con cuatro puntos (100mM, 120mM, 180mM y 200mM), utilizando 5mL de catecol con una concentración de 100mM, 10mL de tampón Buffer fosfato sódico 0.2 M a pH 7.0 y 5mL de extracto crudo enzimático diluido 1/70 (69mL de tampón Buffer fosfato sódico 0,2 M a pH 7 con 1mL del extracto enzimático puro).

Las unidades se determinaron como μmoles de producto formado en 1 min (U/mL) y la actividad específica (U/mg proteína) se midió con una longitud de onda de 410nm.

7.8. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (K_m) Y VELOCIDAD MÁXIMA ($V_{m\acute{a}x}$)

Para la determinación de la K_m y la $V_{m\acute{a}x}$, se utilizó la representación lineal de Hannes Woolf que permitirá obtener un valor mucho más fiable que otras linealizaciones de la ecuación de Michaelis-Menten.

La ecuación correspondiente se obtiene multiplicando ambos miembros de la ecuación de dobles inversos por la concentración $[S]$, de esta manera obtendremos:

$$\left(\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]}\right) \times [S] \quad \text{Ec. (2)}$$

$$\frac{[S]}{V_0} = \frac{[S]}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \quad \text{Ec. (3)}$$

$$\frac{[S]}{V_0} = \left(\frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}}\right) + \left(\frac{1}{V_{m\acute{a}x}}\right) [S] \quad \text{Ec. (4)}$$

$$y = b + m x$$

La representación de $[S]/V_0$ frente a $[S]$, da una recta que se debe graficar $[S]/V_0$ en el eje de las ordenadas y $[S]$ en el eje de las abcisas.

La ordenada en el origen es $K_m/V_{m\acute{a}x}$ y la pendiente es $1/V_{m\acute{a}x}$, donde:

$[S]$: Concentración, K_m : Constante de Michaelis-Menten (mM),

V_0 : Velocidad inicial y V_{max} : Velocidad máxima

Para este ensayo el volumen del catecol fue 8.75mL (catecol y 4-metilcatecol) en concentraciones comprendidas entre 10mM y 300mM (10mM, 20mM, 40mM, 60mM, 80mM, 100mM, 120mM, 140mM, 160mM, 180mM, 200mM, 220mM, 240mM, 260mM, 280mM y 300mM), con la adición de 8.75mL de tampón Buffer fosfato sódico 0.2 M a pH 7 y 0.25mL del extracto enzimático PPO puro. Esta mezcla se somete a baño María durante 3 minutos a una temperatura de 50°C descrito por Mathur, *et al*, (2015).

7.9. ESTUDIO DE LA OXIDACIÓN DE LA PPO

El estudio de la oxidación de la PPO se determinó a partir del consumo del sustrato (300mM) en función del tiempo (segundos).

Este consistió en preparar 72.7mL de tampón Buffer fosfato sódico 0.2 M a pH 7.0, 18.1mL de sustrato (catecol) y 9.09 del extracto enzimático diluido, este último se adicionó a la mezcla anterior una vez estabilizada la temperatura de reacción a 50°C, se produce la reacción en estas condiciones para extraer una alícuota de 2.7mL cada 10 segundos hasta alcanzar los 160 segundos. Para detener la reacción, se utilizó 0.3mL de ácido acético.

La lectura de los diferentes puntos se determinó a una longitud de onda de 410nm descrito por Trujillo, Villamizar, & Durán (2012), Mathur, *et al*, (2015).

8. RECOLECCIÓN DE DATOS

8.1. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE LA PPO

La determinación de la temperatura óptima de las variedades de café arábigo, se realizó por triplicado según lo descrito en el apartado 7.5, modificando la temperatura desde 25°C hasta 65°C, con la finalidad de identificar cuál de estas es la más adecuada para la PPO.

Los datos experimentales se detallan en la tabla 13, cuyos valores corresponden al valor promedio de las repeticiones.

Tabla 13. Resultados de la Absorbancia (nm) de la PPO frente a la temperatura.

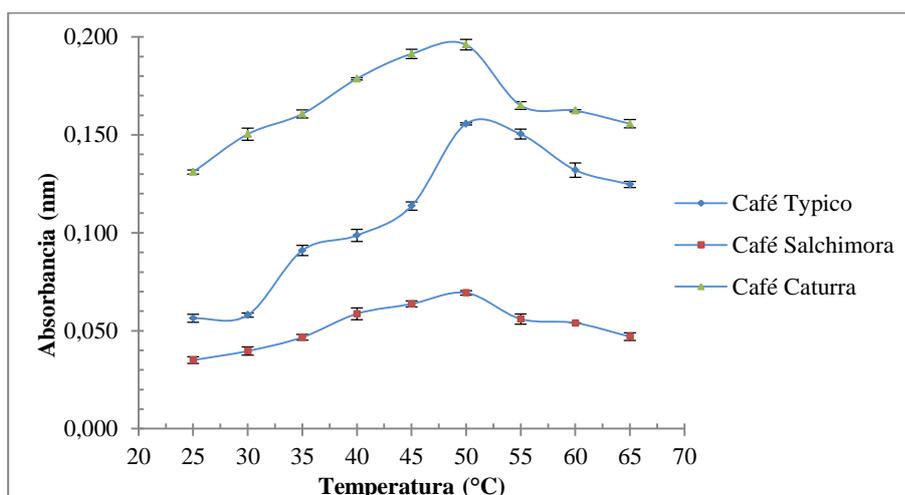
Temperatura (°C)	VARIEDADES DE CAFÉ					
	<i>C. arábigo (Typico)</i>		<i>C. arábigo (Salchimor)</i>		<i>C. arábigo (Caturra)</i>	
	Absorbancia	Desviación	Absorbancia	Desviación	Absorbancia	Desviación
25	0,056	±0,002	0,035	±0,002	0,131	±0,001
30	0,058	±0,001	0,040	±0,002	0,150	±0,003
35	0,091	±0,003	0,047	±0,002	0,161	±0,002
40	0,099	±0,003	0,059	±0,003	0,179	±0,001
45	0,114	±0,002	0,064	±0,002	0,191	±0,002
50	0,156	±0,001	0,069	±0,001	0,196	±0,003
55	0,150	±0,003	0,056	±0,003	0,165	±0,002
60	0,132	±0,004	0,054	±0,000	0,162	±0,001
65	0,125	±0,002	0,047	±0,002	0,156	±0,001

*Los valores reportados de absorbancia se encuentran en nm.

Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

De acuerdo a los datos de la tabla 13, la temperatura óptima para todas las variedades de café Typico, Salchimora y Caturra, fue de 50°C, valores representados en el grafico 1.

Gráfico 1. Temperatura óptima de la PPO.



Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

8.2. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMA DE LA PPO

La determinación del pH óptimo para todas las variedades de café arábigo, se realizó por triplicado según lo descrito en el apartado 7.6. Realizando los ensayos con diferentes pH que van desde 5.5 a 9.0 y temperatura de 50°C obtenida del ensayo anterior (gráfico 1). Los datos experimentales se detallan en la tabla 14, cuyos valores corresponden al valor promedio de las repeticiones.

Tabla 14. Resultados de la absorbancia (nm) frente al pH.

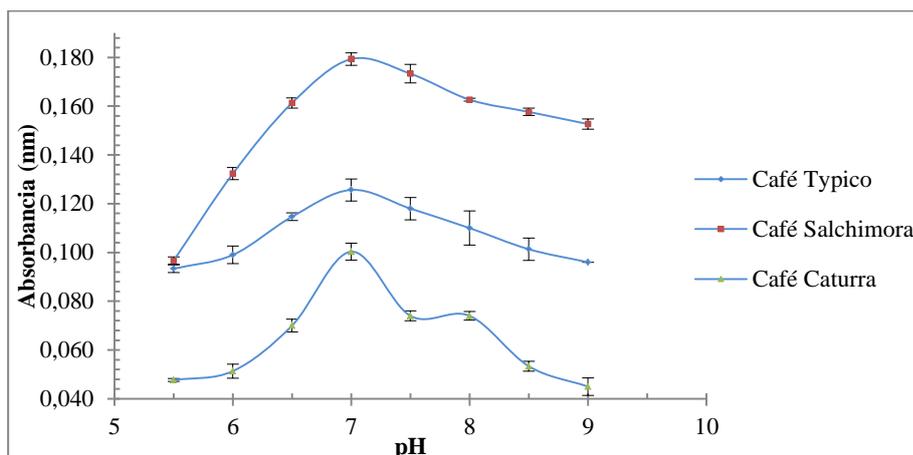
pH	VARIETADES DE CAFÉ					
	<i>C. arábigo (Typico)</i>		<i>C. arábigo (Salchimor)</i>		<i>C. arábigo (Caturra)</i>	
	Absorbancia	Desviación	Absorbancia	Desviación	Absorbancia	Desviación
5,5	0,093	±0,002	0,097	±0,002	0,048	±0,001
6	0,099	±0,004	0,132	±0,003	0,051	±0,003
6,5	0,120	±0,002	0,161	±0,002	0,070	±0,003
7	0,125	±0,005	0,179	±0,003	0,100	±0,004
7,5	0,118	±0,005	0,173	±0,004	0,074	±0,002
8	0,110	±0,007	0,163	±0,001	0,074	±0,002
8,5	0,101	±0,005	0,158	±0,002	0,053	±0,002
9	0,096	±0,000	0,153	±0,002	0,045	±0,004

*Los valores reportados de absorbancia se encuentran en nm.

Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

En base a los datos de la tabla 14, el pH óptimo fue de 7.0 para todas las variedades de café (Typico, Salchimora y Caturra), se puede apreciar en el grafico 2 con mayor claridad.

Gráfico 2. pH óptimo de la PPO.



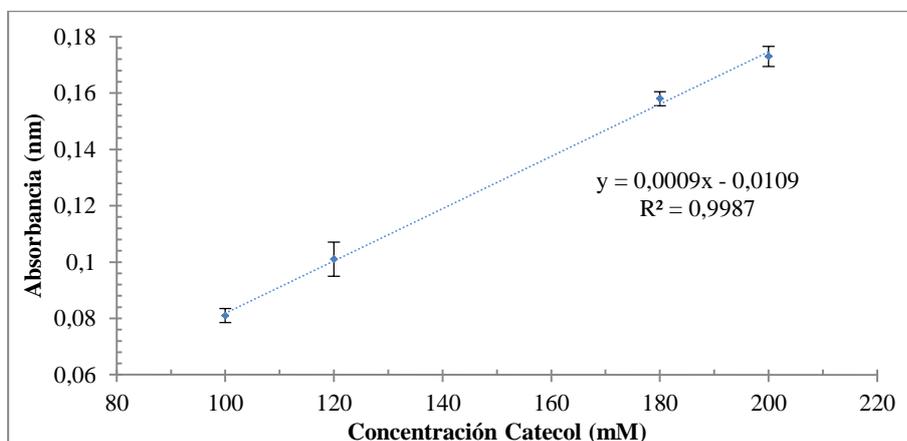
Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

8.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

8.3.1. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PPO

Para calcular la actividad de la PPO es necesario empezar ensayando con el sustrato; para esto se grafica una recta de calibrado utilizando catecol según lo descrito en el apartado 7.7. Los cuatro puntos de la recta (100mM, 120mM, 180mM y 200mM) presentaron un $R^2 = 0,9987$.

Gráfico 3. Recta de calibrado para la PPO.



Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

Para el cálculo de la actividad se utilizó la ecuación $y=0,0009x - 0,0109$ (gráfico 3), en donde la variable independiente (x) representa la unidad enzimática por cada mililitro de solución (U/mL) y la variable dependiente (y) representa la absorbancia medida a una longitud de onda a 410nm.

Los resultados para las tres variedades se indican en la tabla 15.

Tabla 15. Actividad de la PPO en las diferentes variedades de café.

Muestra	Actividad enzimática (U/mL)	Actividad relativa (U/mg proteína)
Café arábigo (Typico)	6234.32	58.19
Café arábigo (Salchimor)	5612.10	47.14
Café arábigo (Caturra)	3710.86	34.64

Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

8.3.2. RESULTADOS DE CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (K_m) Y VELOCIDAD MÁXIMA ($V_{m\acute{a}x}$)

La determinación de la constante de Michaelis-Menten K_m y la velocidad máxima $V_{m\acute{a}x}$ de la PPO de las tres variedades de café arábigo se realizó por triplicado según lo descrito en el apartado 7.8. Los datos experimentales obtenidos se detallan en la tabla 16, indicando la relación de la absorbancia para diferentes concentraciones de sustrato (catecol), así como el cociente entre la concentración (mM) de sustrato [S] y la velocidad de reacción (nm/s).

Tabla 16. Resultados de absorbancia y S/V de las diferentes variedades de café.

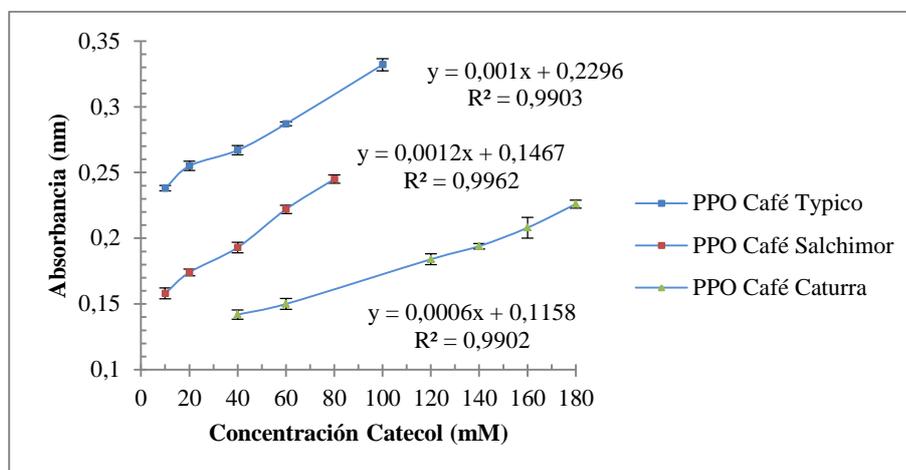
Concentración (mM)	VARIEDADES DE CAFÉ					
	<i>C. arábigo (Typico)</i>		<i>C. arábigo (Salchimor)</i>		<i>C. arábigo (Salchimora)</i>	
	Absorbancia	S/V	Absorbancia	S/V	Absorbancia	S/V
10	0,238	42,0168	0,158	63,2911	0,081	123,4567
20	0,255	78,4313	0,174	114,943	0,107	186,916
40	0,267	149,813	0,193	207,254	0,142	281,690
60	0,287	209,059	0,222	270,270	0,150	400,000
80	0,295	271,186	0,245	326,531	0,176	454,545
100	0,332	301,205	0,256	390,625	0,180	555,556
120	0,335	358,209	0,276	434,783	0,184	652,174
140	0,345	405,797	0,285	491,228	0,194	721,649
160	0,375	426,667	0,290	551,724	0,208	769,231
180	0,380	473,684	0,317	567,823	0,226	796,460
200	0,406	492,611	0,349	573,066	0,268	746,269
220	0,429	512,821	0,351	626,781	0,270	814,815
240	0,440	545,455	0,366	655,738	0,284	845,070
260	0,445	584,270	0,379	686,016	0,286	909,091
280	0,449	623,608	0,387	723,514	0,289	968,858
300	0,450	666,667	0,389	771,208	0,309	970,874

*Los valores reportados de absorbancia se encuentran en nm.

Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

En el gráfico 4 se puede observar el tramo lineal obtenido para cada variedad, siendo el café Salchimor el que mayor linealidad presenta ($R^2 = 0,9962$), seguidos del café Typico ($R^2 = 0,9903$) y café Caturra ($R^2 = 0,9902$).

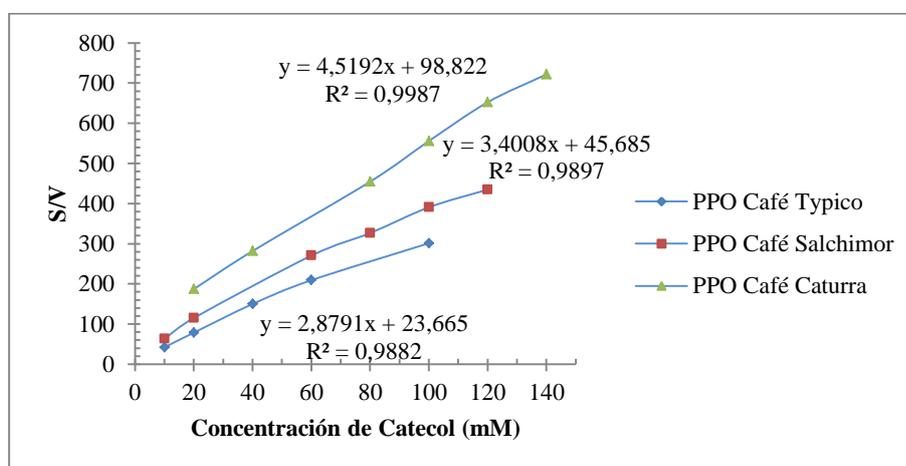
Gráfico 4. Velocidad de reacción de la PPO en las tres variedades de café.



Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

En el gráfico 5 se obtiene la velocidad máxima de reacción para cada una (tabla 17). Se puede observar el tramo lineal de medida para cada variedad de café. Para el cálculo de la K_m y $V_{máx}$ se emplea la ecuación de Michaelis-Menten con la representación lineal de Hanes-Woolf $[S]/V_0 = 1/V_{máx} \times [S] + K_m/V_{máx}$, siendo equivalente a $y = mx + b$, de tal manera que se emplea la ecuación de las curvas para el cálculo respectivo. La ordenada en el origen es $K_m/V_{máx}$ y la pendiente es $1/V_{máx}$.

Gráfico 5. Ecuación de Hanes-Woolf para la obtención de la K_m y $V_{máx}$ con la enzima PPO.



Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

En la tabla 18 se detallan los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la PPO, obtenidos a partir de los datos experimentales (gráfico 5).

Tabla 17. Resultados de la K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la PPO en las tres variedades de café.

Descripción de resultados	VARIEDADES DE CAFÉ		
	<i>C. arábigo (Typico)</i>	<i>C. arábigo (Salchimor)</i>	<i>C. arábigo (Caturra)</i>
Pendiente (m) = $1/V_{m\acute{a}x}$	2.88	3.40	4.52
Variable (b) = $K_m/V_{m\acute{a}x}$	23.67	45.69	98.88
Velocidad máxima (nm/s)	0.35	0.29	0.22
Constante de Michaelis-Menten (Mm)	8.22	13.43	21.86

Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

8.3.3. MECANISMO DE ACTUACIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA

Se estudió la oxidación del catecol por la acción de la PPO según el apartado 7.9, de las tres variedades de café arábigo, donde muestra la respuesta del consumo de catecol en función del tiempo.

Tabla 18. Estudio de oxidación de la PPO.

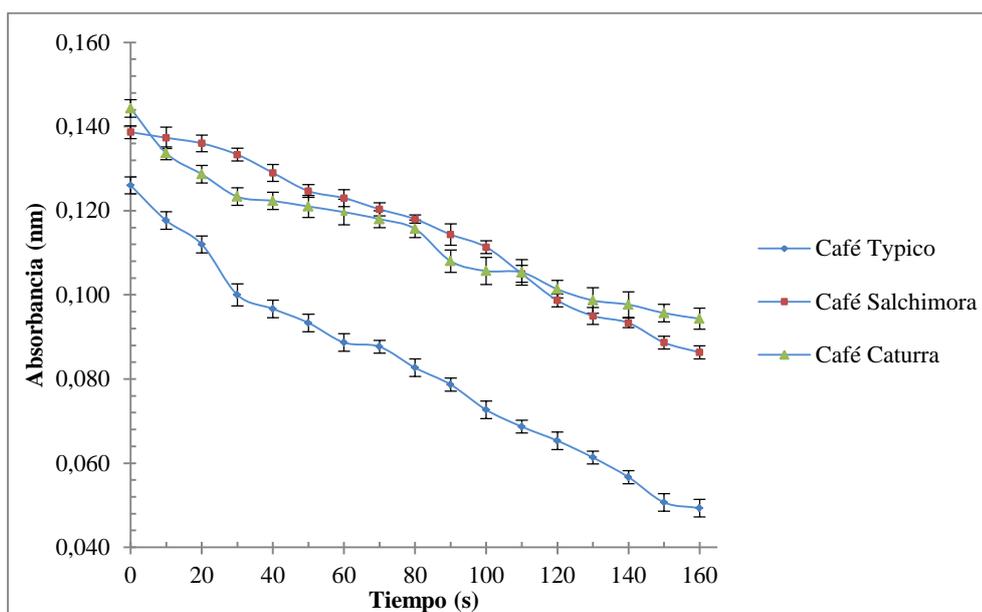
Tiempo (s)	VARIEDADES DE CAFÉ					
	<i>C. arábigo (Typico)</i>		<i>C. arábigo (Salchimor)</i>		<i>C. arábigo (Caturra)</i>	
	Absorbancia	Desviación	Absorbancia	Desviación	Absorbancia	Desviación
0	0,126	±0,002	0,139	±0,002	0,144	±0,002
10	0,118	±0,002	0,137	±0,003	0,134	±0,002
20	0,112	±0,002	0,136	±0,002	0,129	±0,002
30	0,100	±0,003	0,133	±0,002	0,123	±0,002
40	0,097	±0,002	0,129	±0,002	0,122	±0,002
50	0,093	±0,002	0,125	±0,002	0,121	±0,003
60	0,089	±0,002	0,123	±0,002	0,120	±0,003
70	0,088	±0,002	0,120	±0,002	0,118	±0,002
80	0,083	±0,002	0,118	±0,001	0,116	±0,002
90	0,079	±0,002	0,114	±0,003	0,108	±0,003
100	0,073	±0,002	0,111	±0,002	0,106	±0,003
110	0,069	±0,002	0,105	±0,002	0,105	±0,003
120	0,065	±0,002	0,099	±0,002	0,101	±0,002
130	0,061	±0,002	0,095	±0,002	0,099	±0,003
140	0,057	±0,002	0,093	±0,001	0,098	±0,003
150	0,051	±0,002	0,089	±0,002	0,096	±0,002
160	0,049	±0,002	0,086	±0,002	0,094	±0,003

*Los valores reportados de absorbancia se encuentran en nm.

Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

En el gráfico 6 se indica el consumo del sustrato de las tres variedades de café a través del tiempo, siendo el café Typico, donde se agota rápidamente el sustrato a los 160 segundos, es decir que en cuanto mayor absorbancia tenga, mayor actividad tendrá la enzima.

Gráfico 6. Consumo de sustrato en diferentes tiempos de las tres variedades de café.

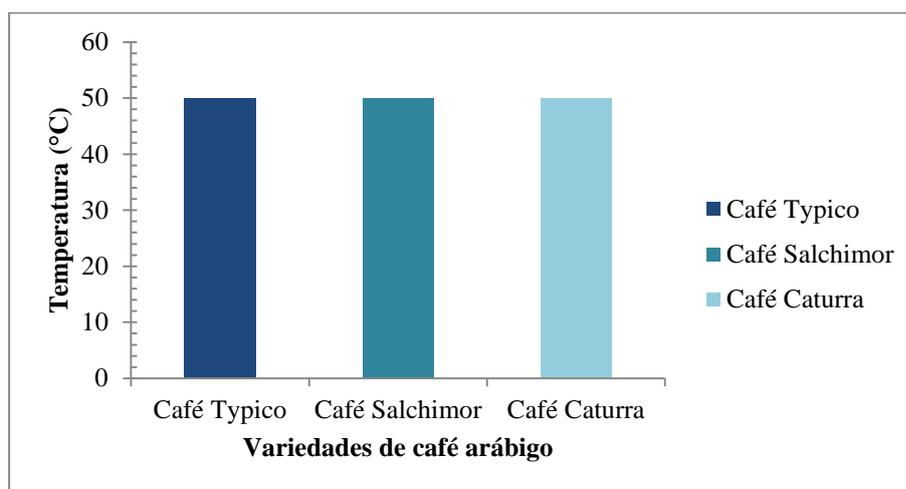


Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

9. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los resultados obtenidos experimentalmente para la temperatura óptima de la PPO de las diferentes variedades de café fue 50°C (gráfico 7), valor que refleja que conforme aumenta la temperatura, aumenta la velocidad de reacción alcanzando un máximo en dicha temperatura y por encima de ésta la estabilidad de la enzima disminuye.

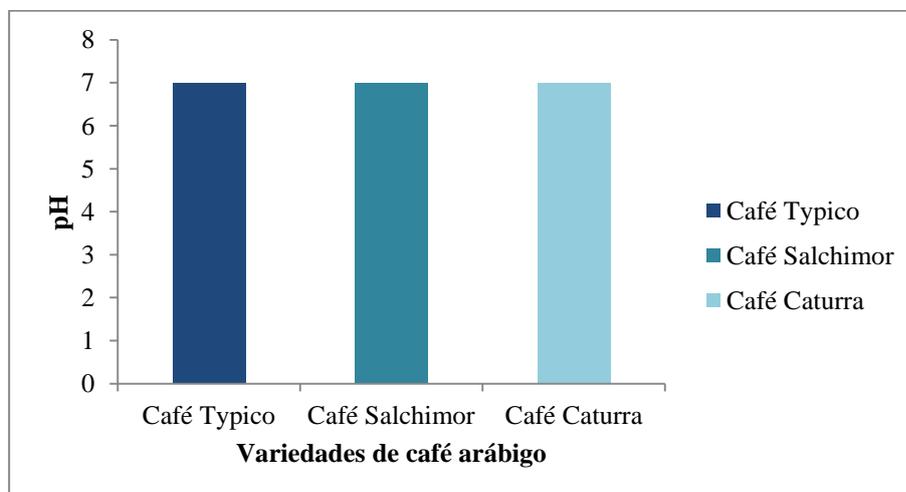
Gráfico 7. Temperatura óptima de trabajo de la PPO en diferentes variedades de café.



Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

El pH de la PPO de las variedades de café estudiadas se obtuvo al realizar los ensayos a la temperatura óptima 50°C (gráfico 7), obteniendo un valor de pH 7.0 (gráfico 8).

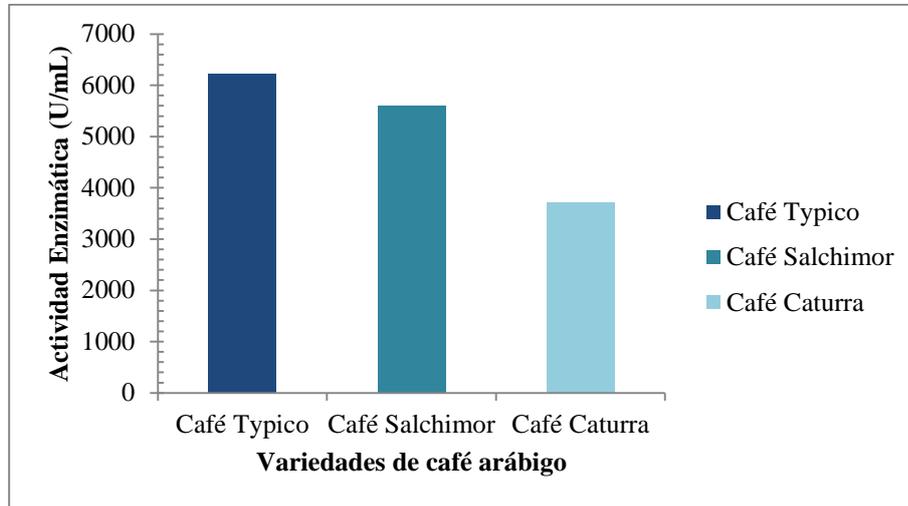
Gráfico 8. pH óptimo de trabajo de la PPO en las diferentes variedades de café.



Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

En el gráfico 9, se puede observar que el café Typico presenta una mayor actividad (Concentración U/mL) de 6234,32 en comparación con las otras variedades de café arábigo.

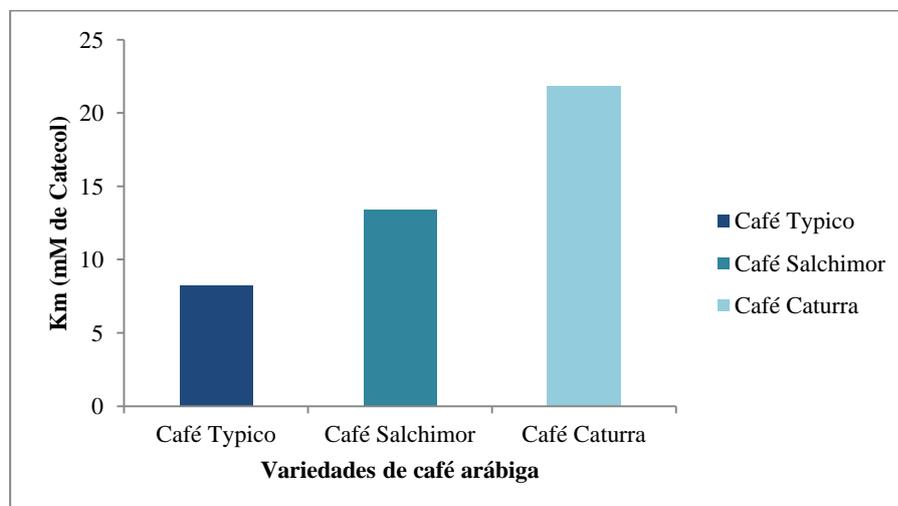
Gráfico 9. Actividad de la PPO en las variedades de café.



Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

En la determinación de la K_m utilizando catecol como sustrato, la mayor afinidad la tuvo la PPO presente en la variedad Typico seguida de Salchimor y Caturra (gráfico 10). Por lo tanto, se puede evaluar que a mayor afinidad de la enzima por el sustrato, mayor será su velocidad máxima, por ello de las tres variedades de café el Typico es el que tiene mayor tendencia a formar el complejo enzima –sustrato.

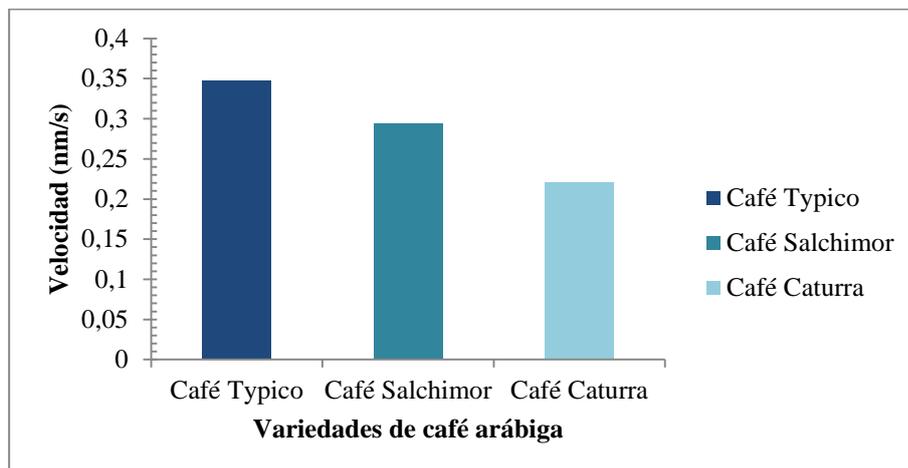
Gráfico 10. Constante de Michaelis-Menten (K_m).



Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

En el gráfico 11, se compara la Velocidad máxima del café Typico (0.3473), café Salchimor (0.2940) y café Caturra (0.2213) respectivamente, lo que representa que la PPO de la variedad Typico logra consumir el sustrato en mayor proporción que las otras dos variedades.

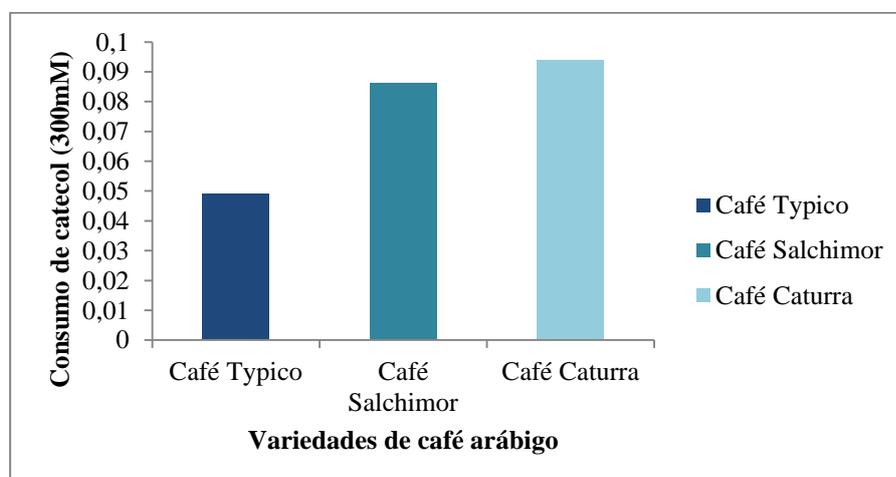
Gráfico 11. Velocidad máxima de reacción de la PPO.



Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

Así también se presentan gráficamente los datos de la cinética enzimática respecto la formación de producto estos son (0.049, 0.086 y 0.094) typico, salchimor y caturra respectivamente. Estos valores indican que mientras la reacción transcurre en la formación de o-quinona y alcanza la velocidad máxima, esta empieza a disminuir ya que la enzima ha consumido en gran parte el sustrato durante la reacción saturando el centro activo de la PPO.

Gráfico 12. Estudio de Oxidación de la PPO.



Elaborado por: Arteaga María & Tuárez Sofía, (2016)

10. ELABORACIÓN DEL REPORTE DE LOS RESULTADOS

10.1. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación estuvo enfocado en el estudio cinético de la enzima Polifenoloxidasa (PPO) en diferentes variedades de café del género *Coffea arabica* (Typico, Salchimor y Caturra) desarrollando la técnica en el espectrofotómetro UV-Vis JENWAY 7305 utilizando catecol como sustrato, por lo cual en este apartado se presenta los principales hallazgos de este estudio:

La temperatura y pH óptimo de trabajo de la Polifenoloxidasa en las diferentes variedades de café arábigo, donde la enzima presentó su máxima actividad fue de 50°C y 7.0 respectivamente. Temperaturas similares en las tres variedades de café (Typico, Salchimora y caturra) fueron descritas por Mathur, *et al.*(2015). Por otra parte estudios específicos (Mazzafera, Robinson, 2000 & Queiroz, *et al.* 2008) han indicado valores similares para el pH que van desde 5.5 hasta 7.5.

En cuanto a la concentración de la enzima (unidades enzimáticas presentes en cada mL) se observó que la variedad Typico presentó la mayor actividad (6234.32 U/mL) entre las tres evaluadas, seguidas de la variedad Salchimor (5612.10 U/mL) y Caturra (3710.86 U/mL), utilizando catecol como sustrato. Estos resultados es un indicador de que esta variedad presentará un color, aroma y sabor más intenso en la bebida terminada.

Para la afinidad de la enzima por el sustrato (K_m), se determinó que la variedad Typico fue la más afin seguida de Salchimor y Caturra (tabla 17), esto cuando se utiliza catecol como sustrato.

La oxidación de la PPO se calculó al medir la velocidad de consumo de catecol a través del tiempo, ya que la velocidad de acumulación de producto va disminuyendo por qué se consume el sustrato (Herrera, *et al*, 2014), en base a lo indicado la PPO del café Typico (0.049nm) es el que más rápido se consume, seguido del café Salchimor (0.086nm) y café Caturra (0.094nm), es decir que a menor valor de absorbancia mayor será el consumo de sustrato.

10.2. CONCLUSIONES

- El pH y la temperatura óptima de la PPO para las tres variedades de café se evaluaron con el empleo de la técnica descrita en este trabajo, obteniendo valores 7.0 y 50°C respectivamente, los mismos que pueden deberse a las condiciones climáticas, tipos de suelo, entre otras, en las que estas variedades fueron cultivadas.
- Muchas investigaciones indican que entre mayor actividad presente la PPO en el café, mayor será la calidad organoléptica, por lo cual al determinar la actividad enzimática de la PPO presente en las tres variedades de café, la variedad Typico fue la que mejor característica presenta de acuerdo al estudio realizado.
- La metodología aplicada para el estudio cinético de la PPO resultó ser una técnica válida, dado a que existen reportes con resultados similares a los obtenidos en la experimentación de la constante de Michaelis-Menten y la velocidad máxima, reportándose que de las tres variedades de café arábigo, el Typico es el que mayor afinidad tiene hacia el sustrato, por lo tanto tendrá aumento en su velocidad de reacción en comparación con las otras dos muestras de estudio.
- El consumo del sustrato por la enzima se la evaluó hasta un tiempo de 160 segundos, siendo la variedad de café Typico, la que presentó el menor valor de absorbancia (0.049 nm), lo cual indica que el consumo de catecol fue superior entre las tres variedades.

10.3. RECOMENDACIONES

- Es imprescindible que este tipo de investigación se difunda, analizando no solo la parte enzimática, sino otras características en las diversas variedades de café, para que los agricultores saquen el máximo provecho a las propiedades que tienen sus cafetales, promocionado de este modo la calidad del mismo y tengan competitividad a nivel nacional con café de calidad.
- Se debe generar información de esta índole que aporte con el desarrollo de nuevos estudios que tengan tendencia investigativa, ya que en el país existe un déficit en información de este tipo.

11. PRESUPUESTO

Tabla 19. Presupuesto (Gastos durante el desarrollo de la tesis).

CANTIDAD	DESCRIPCIÓN	P. UNITARIO	VALOR NETO
REACTIVOS Y MATERIALES DE EXPERIMENTACIÓN			
1	Catecol 100g	\$ 171,00	\$ 171,00
1	Sodio dihidrógeno fosfato H2O acs, 1kg	\$ 48,39	\$ 48,39
6	Frascos ámbar	\$ 0,60	\$ 3,60
12	Frascos ámbar	\$ 0,75	\$ 9,00
5	Frascos de vidrio transparente	\$ 0,75	\$ 3,75
4	Frasco ámbar	\$ 0,50	\$ 2,00
1	Cubículo de vidrio	\$ 30,00	\$ 30,00
3	Variedades de café	\$ 29,50	\$ 88,50
SUBTOTAL			\$ 356,24
IMPREVISTOS (10%)			\$ 35,62
MATERIAL ADICIONAL			
1	Vinagre	\$ 1,50	\$ 1,50
1	Paquete de Mascarillas	\$ 5,00	\$ 5,00
1	Paquete de guantes	\$ 5,00	\$ 5,00
2	Papel de aluminio	\$ 2,50	\$ 5,00
1	Frasco de alcohol	\$ 3,50	\$ 3,50
1	Jabón líquido	\$ 2,25	\$ 2,25
2	Papel de limpieza	\$ 3,00	\$ 6,00
SUBTOTAL			\$ 28,25
IMPREVISTOS (10%)			\$ 2,83
GASTOS EXTRAS			
	Copias e impresiones	\$ 30,00	\$ 30,00
	Alimentación	\$ 102,00	\$ 102,00
3	Transporte público	\$ 3,00	\$ 9,00
2	Transporte privado	\$ 30,00	\$ 60,00
SUBTOTAL			\$ 201,00
IMPREVISTOS (10%)			\$ 20,10
TOTAL			\$ 644,04

12. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tabla 20. Cronograma de actividades del proyecto de tesis

ACTIVIDADES	PRIMER MES				SEGUNDO MES				TERCER MES			
	SEMANAS				SEMANAS				SEMANAS			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Presentación del anteproyecto ante la comisión especial de titulación y aprobación del mismo	X											
Elaboración de las técnicas de investigación y levantamiento bibliográfico		X										
Recolección y selección de materia prima			X									
Planeamiento experimental para el cultivo y extracción de la enzima PPO			X	X								
Estudio de la cinética enzimática				X	X	X						
Estudio bromatológico				X	X	X						
Análisis de los resultados							X	X				
Presentación del trabajo final al tutor								X	X			
Revisión del trabajo final por parte del revisor									X	X		
Subir el trabajo final al repositorio de trabajo de titulación de la Universidad Técnica de Manabí											X	
Solicitar fecha y hora de defensa del trabajo de titulación												X

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado Soto, M., & Rojas Cubero, G. (1994). *El cultivo y beneficiado del café*. Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Amaya Paredes, E., Tarkus Patiño, R., & Domínguez Magaña, M. (2008). Extracción y caracterización cinética de la enzima polifenoloxidasa del aguacate (*Persea americana* Miller) variedad Hass. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*(47), 10-16.
- Amorim, H. B., & Amorim, V. L. (1977). Coffee enzymes and coffee quality. In: Ory, R.L., St Angelo, A. J. (Eds), *Enzymes in Food and Beverages Processing*, ACS Symposium Series, 47. *American Chemical Society*, 27-56.
- Amorim, H. B., & Silva, D. M. (1968). Relationship between the polyphenol oxidase activity of coffee beans and quality of beverage. *Nature*(219), 381-382.
- Amorim, H. V., & Melo, M. (1991). Significance of enzyme in non- alcoholic coffee beverage. *Food Enzymology*, 2, 189-209.
- Asociación Nacional de Café (ANECAFE). (1985). Manual de Caficultura. *Revista N°250 ANECAFE- Guatemala*, 5-13.
- Ayaz, F. A., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y., & Colak, A. (2008). Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar(*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chemistry*, 106:291-298.
- Badui, S. (1993). *Química de los Alimentos*. México: Pearson Education.
- Belitz, H. D., & Grosh, W. (1997). *Química de los Alimentos*. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.
- Calvo, M. (30 de Noviembre de 2016). Estructura de la Polifenol oxidasa . *Bioquímica de los Alimentos*. Obtenido de <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/enzimas/tirosinasa.html>
- Charrier, A., & Berthaud. (1985). Botanical classification of coffee. *Botany, Biochemistry and Production of Beans Bererage*, 13-47.

- Centro Interamericano de Documentación e Información Agrícola (CIDIA). (1992). *REDCAFE* (Vol. 4). Turrialba, Costa Rica.
- Duangmal, K., Richard, K., & Apenten, O. (1999). Comparative study of polyphenol oxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato. *Food Chemistry*(64), 351-359.
- Gacche, R. N., Zore, G. B., & Ghole, V. S. (2003). Kinetics of Inhibition of Polyphenol Oxidase Mediated Browning in Apple Juice by β -Cyclodextrin and L-ascorbate-2-triphosphate. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18: 1-5.
- García, C. L., Giraldo, G. A., Hurtado, H., & Mendivil, C. O. (2006). Enzyme Kinetics of Polyphenol Oxidase from Gros Michel Banana Through different maturation stages. *Vitae, Revista de la Facultad de química Farmacéutica*, 13(2), 13-19.
- Gasull, E., & Bacerra, D. (2006). Characterization of Polyphenoloxidase Extracted from Pears (cv. Packam's Triumph) and Apples (cv. Red Delicious). *SciELO*, 17(6), 69-74.
- González, J. M. (2010). Curso de Biomoléculas. *Universidad del País Vasco*. Obtenido de <http://www.ehu.es/biomoleculas/enzimas/enz3.htm>
- Goulart, P., Donizeti, J., Murad, M., Padilha, R., & De Oloveira, L. (2000). Isolamento e características cinéticas da Polifenoloxidase em diferentes tipos de amostras de grãos de *coffea arabica*. *Simposio de Pesquisa dos cafés do Brasil*, 705-709.
- Harding, S. E., & Rowe, A. J. (1996). *Purification and analysis of enzyme preparations*. San Diego Ca: P.C.Engel.
- Hernández Valdez, E. (Septiembre de 2009). *Acción y Efecto de la Polifenoloxidasa en Alimentos*. Obtenido de <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/32464/1/hernandezvaldez.pdf>
- Herrera, E., Ramos, M., Roca, P., M., M., & Arribas, V. (2014). *Bioquímica Básica*. Madrid: Elsevier.
- Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas . (1974). *Primera reunión Internacional sobre la utilización de subproductos del café en la alimentación animal y otras aplicaciones agrícolas e industriales*. Costa Rica.

- Kirk, & Othmer. (1998). *Enciclopedia de Química Industria (Vol 3)*. New York: LIMUSA, S.A. de C.V.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C., & Krebs, B. (1998). Cristal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*, 5(12): 1084-1090.
- Kornberg, A. (1990). Why Purify Enzymes. *Methods in enzymology*, 1-5.
- Kučera, L., Papoušek, R., Kurka, O., Barták, P., & Bednár, P. (2016). Study of composition of espresso coffee prepared from various roast degrees of *Coffea arabica* L. Coffee beans. *Food Chemistry*(199), 727-735.
- Lowe, M. K., & Thomas, J. A. (2007). *Purification and Analysis of Enzyme Preparations*. San Diego Ca: P.C.Engel.
- Mathur, R., Navya, P., Basavaraj, K., & Murthy, P. (2015). Bioprocess of robusta cherry coffee with polyphenol oxidase and quality enhancement. *EUR Food Res Technol*(240), 319-325.
- Mayer, A., & Harel, E. (1979). Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, 18, 193-215.
- Mazzafera, P., & Robinson, S. P. (2000). Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry*, 55, 285-296.
- Moura, S., Zaluski, R., Pace Pereira, G., Mazzafera, P., & De Oliveria, R. (2016). Characterization of *Coffea arabica* monofloral honey from Espírito Santo, Brazil. *Food Chemistry*(203), 252-257.
- Muñoz Durango, K., Bravo Muñoz, K., Zapata Ocampo, P., & Londoño Londoño, J. (2007). Caracterización preliminar del enzima Polifenol Oxidasa en frutas tropicales: Implicaciones en su proceso de Industrialización. *Scientia et Technica Año XIII, No 33*(UTP. ISSN 0122-1701), 161-164.
- Naranjo, M., Vélez, L., & Rojano, B. A. (2011). Antioxidant activity of different grades of Colombian Coffee. *SciELO, Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16 (2)(Versión On-line ISSN 1028-4796), 164-173.

- Neugebauer, J. M. (1990). *Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification*. San Diego Ca: Deutscher M.P.
- Ni Eidhi, D., Degn, P., & O'Beirne, D. (2010). Characterization of polyphenol oxidase from Rooster potato (*solanum tuberosum* cv Rooster). *Journal of biochemistry*(34), 13-30.
- Palmer, J. K. (1961). Banana Polyphenoloxidase Preparation y Properties. *Plant Physiology*, 36: 508-513.
- Pérez , E., & Carril, U. (2014). Café I (*G. Coffea*). *Reduca*, 7(2), 113-132.
- Pimenta, C. J., Cássio de Carvalho , J., & Ribeiro Vilela, E. (2000). Polifenoloxidase activity, potassium lixiviation, titratable acidity and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.), mantained sacked for different periods of time before drying. *Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 630-634.
- Price, N. C., & Stevens, L. (2001). Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Enzyme Assays*, 209-224.
- Queiroz, C., López, M. L., Fialho, E., & Valente-Mesquita, V. L. (2008). Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*, 24: 361-375.
- Ramírez, E. C., & Whitaker, J. R. (2003). Polyphenol Oxidase. *Handbook of Food Enzymology*, 509-523.
- Rezapour, I., Jasimizad, T., Ayatollahi, M., Zamani, M., Aghaei, S., & Jebali, A. (2016). The presentation of a new inhibitor to prevent enzymatic browning in mushroom, banana, and apple. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(4), 1109-1122.
- Ricon, R., Cesarino, I., Mazzafera, P., & Carnier, M. (2014). Flower development in *Coffea arabica* L.: new insights into MADS-box genes. *Plant Reprod*, 27, 79-94.
- Rojas Cuberos, G., & Albarado Soto, M. (2007). Cultivo y Beneficios del Café. En G. Rojas Cuberos, & M. Albarado Soto, *Taxonomía del café* (pág. 11). San José: Editorial Universidad Estatal a Distancia.

- Sanint, B., & Valencia, A. (Junio de 1970). *Actividad enzimática en el grano de café en relación con la calidad de la bebida*. Obtenido de <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=ORTON.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mn%3D032898>
- Soler, G., Losada, J. D., & Vargas, C. (Abril de 2013). Caracterización vibracional por espectroscopia Raman del grano de café tipo comercial. *Scientia Et Technica*, 18(1), 275-279.
- Tavani, A., Bertuzzi, M., & Gallus, S. (2004). Risk factors for non fatal acute myocardial infarction in Italian women. *Prev Med*, p. 128-34.
- Temis Pérez, A. L., López Malo, A., & Sosa Morales, M. E. (2011). Producción de café (*Coffea arabica* L): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. *Temas selectos de Ingeniería en Alimentos*, 5(2), 54-74.
- Valenzuela, A. (2010). El Café y sus efectos en la salud cardiovascular y en la salud materna. *Scielo*, p. 14-15-17.
- Vaughn, K. C., & Duke, S. O. (1984). Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol*, 60, 106-112.
- Waller, B. V., Bigger, M., & Hillocks, R. J. (2007). *Coffea Pests. Diseases and Their Management*, 437.

ANEXOS

ANEXO 1. FOTOGRAMA

Ilustración 1. Producción de Café en la Finca San José.



Ilustración 2. Cereza de café lista para ser cosechada.



Ilustración 3. Granos de las variedades de café arábigo molidos.

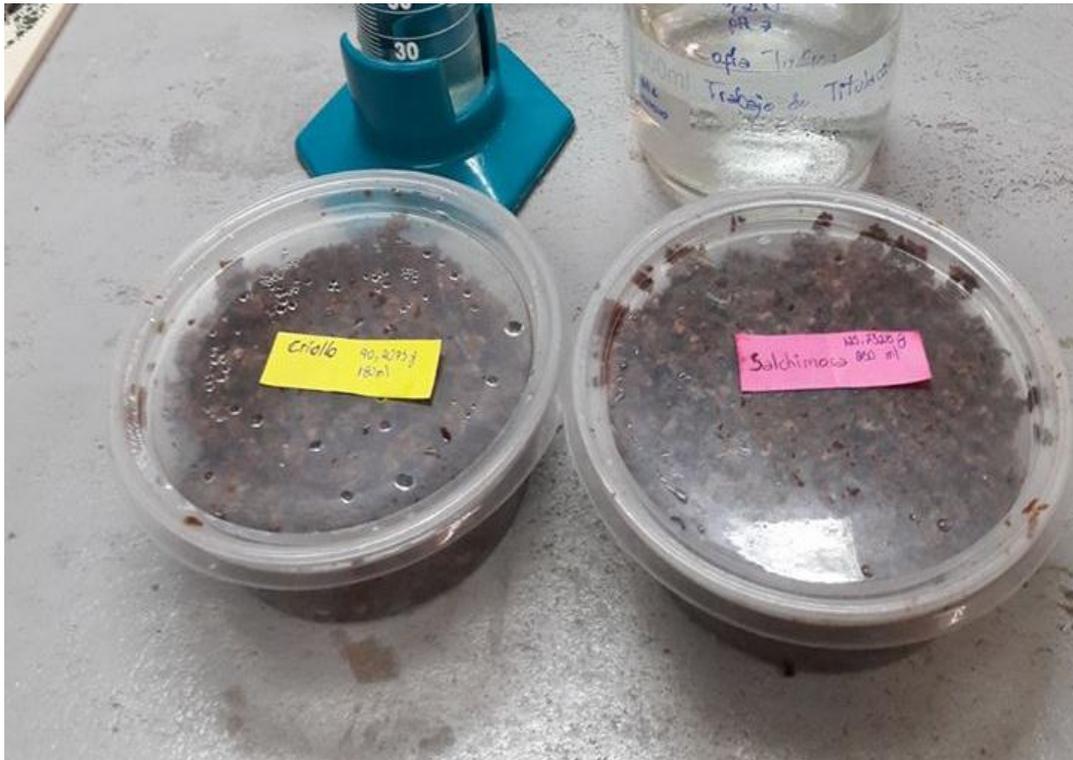


Ilustración 4. Preparación de las muestras para iniciar el proceso de extracción de la PPO.



Ilustración 5. Centrifugación y extracción de la PPO de las diferentes variedades de café.



Ilustración 6. Preparación de la solución del tampón Buffer fosfato sódico y control de pH.

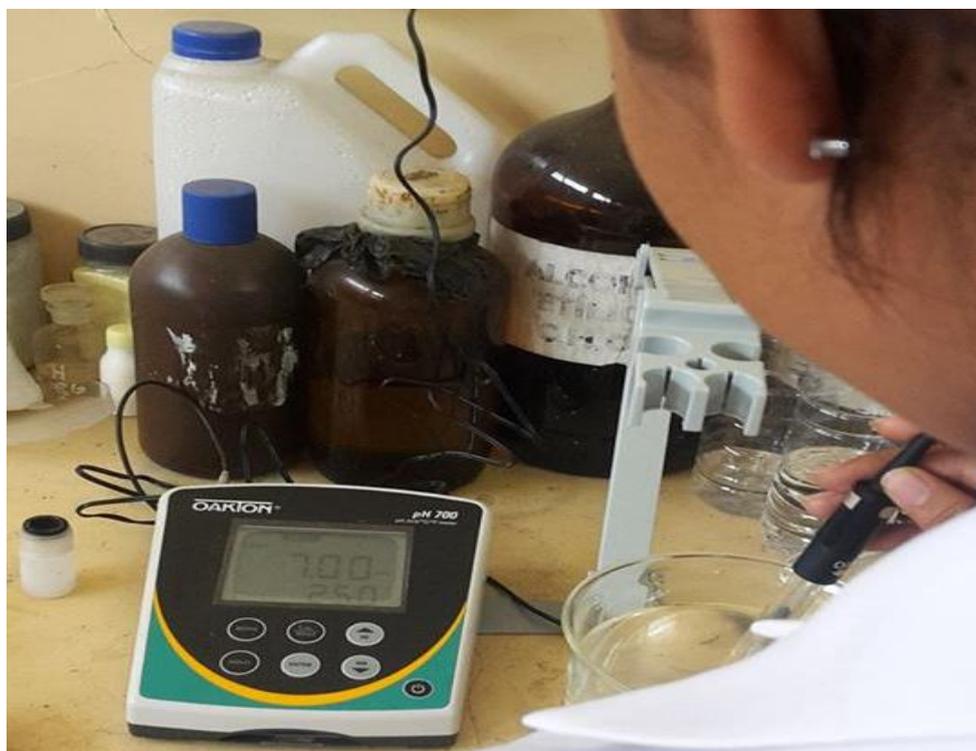


Ilustración 7. Proceso de reacción de la PPO a temperatura óptima (sometida a baño María durante 3 minutos)



Ilustración 8. Agitación de la solución reactante con la enzima.

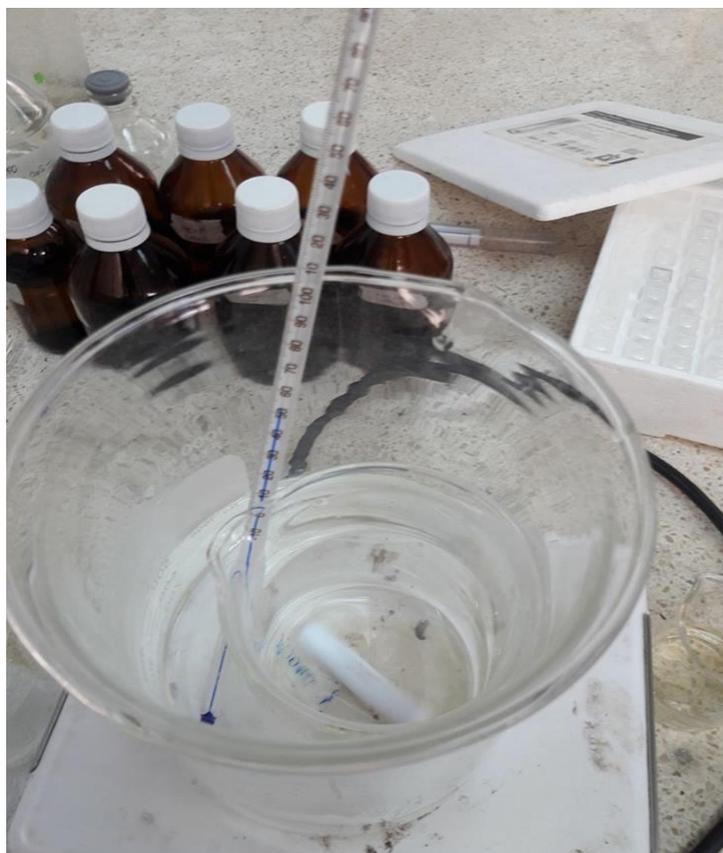


Ilustración 9. Medición de los diferentes análisis en el espectrofotómetro.

