

# Relación de la peroxidasa con el endurecimiento de los granos de *Phaseolus vulgaris* L. y su cinética de inactivación térmica

Peroxidase relationship with bean hardening of *Phaseolus vulgaris* L. and its thermal kinetic inactivation

Relação da peroxidase com o endurecimento de grãos de feijão *Phaseolus vulgaris* L. e a sua cinética de inativação térmica

María Virginia Mujica<sup>1</sup>, Marisela Granito<sup>2</sup> y Naudy Soto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Procesos Agroindustriales. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, 3001, Barquisimeto, Venezuela. Correos electrónicos: mvmujica@ucla.edu.ve, nsoto@ucla.edu.ve. <sup>2</sup>Departamento de Tecnología de Servicios. Universidad Simón Bolívar. 1090 A. Caracas, Venezuela. Correo electrónico: mgranito@usb.ve. Fuente de financiamiento: Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), a través del Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico (CDCHT).

## Resumen

La peroxidasa es una de las enzimas posiblemente relacionadas en el endurecimiento de los granos de *Phaseolus vulgaris* L. durante el almacenamiento a temperaturas y humedades relativas altas. Se evaluó el efecto del almacenamiento sobre las actividades de la peroxidasa soluble, iónica y covalentemente enlazadas en los granos de *P. vulgaris* material SA029, y se estudió la cinética de inactivación térmica de la peroxidasa soluble en esta matriz. Los granos recién cosechados se dividieron en tres lotes, uno se analizó de inmediato y los otros dos se almacenaron por 120 días bajo condiciones diferentes: 5 °C/34% HR y 37 °C/75% HR. Para la determinación de la cinética de inactivación, la harina de los granos (ajustada a 17 y 24% de humedad) se calentó en el rango de temperatura de 75 a 95 °C por períodos de 1 a 32 min, y luego se procedió a determinar la actividad residual de la peroxidasa. Las fracciones soluble e iónica de la enzima peroxidasa presentaron una disminución significativa de sus actividades, en un 75 y 65%, respectivamente,

---

Recibido el 29-09-2016 • Aceptado el 11-04-2017

\*Autor de correspondencia e-mail: mvmujica@ucla.edu.ve

durante el almacenamiento a 37 °C/75% HR, mientras que permanecieron sin cambios significativos en los granos almacenados a 5 °C/34% HR. Por otra parte, la inactivación de la enzima siguió una cinética bifásica de primer orden, con una fracción termolábil y otra termoresistente, y resultó altamente dependiente del contenido de humedad y de la temperatura de calentamiento, observándose que a elevada humedad y temperatura se inactivó casi completamente en los primeros minutos de tratamiento. El almacenamiento de los granos de *P. vulgaris* material SA029 a alta temperatura y alta humedad relativa por 4 meses, disminuyó significativamente la actividad de las fracciones soluble e iónica de la enzima peroxidasa, lo que pudo favorecer el endurecimiento del grano.

**Palabras clave:** cinética de inactivación térmica, endurecimiento, energía de activación, peroxidasa, *Phaseolus vulgaris*.

### Abstract

Peroxidase is one of the enzymes involved in the bean hardening of *Phaseolus vulgaris* L. during storing under high temperature and high relative humidity. This research evaluated the storing effect on the activities of soluble peroxidase and ionic and covalently bound peroxidases in *P. vulgaris* SA029 material and to study the kinetics of thermal inactivation of soluble peroxidase in this matrix. The newly harvested grains were divided into three lots, one was analyzed immediately and the other two were stored for 120 days under different conditions: 5 °C/34% RH and 37 °C/75% RH. To determine the inactivation kinetics the flour of grains (adjusted to 17 and 24% moisture) was heated in the range of temperature from 75 to 95 °C for periods of 1 to 32 min and then it was proceeded to determine the residual activity of the peroxidase. The soluble and ionic peroxidase enzyme fractions had a significant decrease in their activities, 75 and 65%, respectively during storing at 37 °C/75% RH, it remained without significant changes in stored grains at 5 °C/34% RH. Moreover, the inactivation of the enzyme followed biphasic first-order kinetics with a heat-labile moiety and another heat resistant, and was highly dependent on the moisture content and the heating temperature, since it was almost completely inactivated in the first few minutes under the treatment of high humidity and temperature. The storage of *P. vulgaris* SA029 material beans at high temperature and high relative humidity for 4 months decreased the activity of the soluble and ionic fractions of the peroxidase enzyme, which could favor the bean hardening.

**Key words:** thermal inactivation kinetics, hardening, activation energy, peroxidase, *Phaseolus vulgaris*.

### Resumo

A peroxidase é uma das enzimas possivelmente relacionada com o aperto de feijão *Phaseolus vulgaris* durante o armazenamento a temperaturas e humidades

relativamente elevadas. Foi avaliado o efeito do armazenamento na actividade de peroxidase solúvel, iónica e covalentemente ligado aos grãos de feijão *P. vulgaris* material SA029 e foi estudada a cinética de inactivação térmica de peroxidase solúvel nesta matriz. Os grãos recém-colhidas foram divididos em três lotes, um foi analisado imediatamente e os outros dois foram armazenadas durante 120 dias sob diferentes condições: 5 °C/34% HR e 37 °C/75% HR. Para determinar a cinética de inactivação, a farinha de grãos (ajustado para 17 e 24% de humidade) foi aquecida na gama de temperaturas de 75 a 95 °C durante períodos de 1 a 32 minutos, e, em seguida, procedeu para determinar a actividade residual da peroxidase. A enzima peroxidase solúvel e fraccões iónicas mostrou uma diminuição significativa das suas actividades, 75 e 65%, respectivamente, durante o armazenamento a 37 °C/75% de HR, enquanto que permaneceram sem alterações significativas nos grãos armazenados 5 °C/34% HR. Além disso, a inactivação da enzima observou uma cinética bifásica de primeira ordem, com uma fracção termolábeis e outro resistente ao calor, e era altamente dependente do teor de humidade e a temperatura de aquecimento, observou-se que à humidade e temperatura elevada extinguiu-se a atividade da enzima quase completamente nos primeiros minutos de tratamento. Armazenar *P. vulgaris* feijões materiais SA029 a alta temperatura e alta humidade relativa durante quatro meses, diminuiu significativamente a actividade das fraccões solúveis e iónicos da enzima peroxidase, que poderiam melhorar o endurecimento grão.

**Palavras-chave:** cinética de inativação térmica, endurecimento, energia de ativação, peroxidase, *Phaseolus vulgaris*.

## Introducción

*Phaseolus vulgaris* L., es la leguminosa más consumida a nivel mundial después de la soya, es una fuente importante de proteína, carbohidratos complejos y fibra. Las variedades de granos negros de *P. vulgaris* son además una rica fuente de componentes antioxidantes como ácidos hidroxicinámicos; flavonoles; antocianinas y proantocianinas, entre otros, que ayudan en la prevención de enfermedades crónicas, tales como cáncer, afecciones cardiovasculares, obesidad y diabetes (Hangen y Bennink, 2002; Gálvez *et al.*, 2007). A pesar de estos beneficios, el consumo de los granos de *P. vulgaris* es afectado

## Introduction

*Phaseolus vulgaris* L., is the legume with more consumption worldwide after soy, with an important source of proteins, complex carbohydrates and fiber. The varieties of black grains of *P. vulgaris* are rich source of antioxidant components such as hydroxycinnamic acids, flavonols, anthocyanin and proanthocyanins, among others, which help in the prevention of chronic diseases such as cancer, heart diseases, obesity and diabetes (Hangen and Bennink, 2002; Gálvez *et al.*, 2007). In spite of these benefits, the consumption of *P. vulgaris* is negatively affected by the hardening generated during the

negativamente por el endurecimiento generado durante el almacenamiento prolongado a alta temperatura y alta humedad relativa. Este defecto, conocido a nivel mundial como “duro de cocer” (hard to cook), reduce la palatabilidad y el valor nutricional de los granos, e incrementa el gasto de combustible por los largos tiempos de cocción (Martin-Cabrejas *et al.*, 1999; Njoroge *et al.*, 2015).

El fenómeno “duro de cocer” ha sido ampliamente investigado; sin embargo, aún no se comprende totalmente su mecanismo bioquímico. Una de las hipótesis propuestas afirma que las altas temperaturas y altas humedades relativas generan estrés en el grano y en consecuencia pueden activar sistemas de defensa que promuevan la liberación de los ácidos hidroxicinámicos a partir de sus derivados conjugados y/o de la síntesis a base de aminoácidos como la L-fenilalanina y L-tirosina (Srisuma *et al.*, 1991; García *et al.*, 1998; Mujica *et al.*, 2012). Los ácidos hidroxicinámicos, liberados o sintetizados, principalmente el ácido ferúlico, pueden luego unirse a polisacáridos o a proteínas de la pared celular y participar en reacciones de entrecruzamiento vía acoplamiento oxidativo por acción de las peroxidasas, incrementando la rigidez de la pared y la resistencia a la separación celular durante la cocción, produciendo así el endurecimiento (Lewis y Yamamoto 1990; Edreva 1991).

Las peroxidasas pertenecen al grupo de las oxido-reductasas y catalizan reacciones bisustrato de carácter redox, utilizando peróxido de

extended storing at high temperature and high relative humidity. This defect known as hard to cook, reduces the palatability and nutritional value of grains, and increases the fuel consumption by the extended cooking time (Martin-Cabrejas *et al.*, 1999; Njoroge *et al.*, 2015).

The hard-to-know phenomenon has been widely studied; however, its biochemical mechanism is not completely known. One of the proposed hypothesis affirms that high temperatures and high relative humidity generate stress in the grain; consequently, the hypothesis might activate defense systems that would promote the release of hydroxycinnamic acids after the conjugated derivate and/or synthesis based on amino acids such as L-phenylalanine and L-tyrosine (Srisuma *et al.*, 1991; García *et al.*, 1998; Mujica *et al.*, 2012). Released or synthesized hydroxycinnamic acids, mainly ferulic acid, might derivate to polysaccharides or to proteins of the cellular wall and participate in crossing reactions with oxidative coupling by action of peroxidases, thus, increasing the wall rigidity and resistance to the cellular division during cooking, causing the hardening (Lewis and Yamamoto 1990; Edreva 1991).

Peroxidasas belong to the group of oxide-reductase and catalyze bisubstrate reactions redox type, using hydrogen peroxidase as oxidant. A peroxidase system is constituted by a group of isoenzymes with similar molecular weights with a marked difference in the thermal resistance.

hidrógeno como oxidante. El sistema de las peroxidasa está constituido por un conjunto de isoenzimas de pesos moleculares parecidos, pero de marcada diferencia en la resistencia térmica. Las peroxidasa pueden encontrarse en forma soluble en el fluido apoplástico y unidas iónica o covalentemente a la pared celular en la materia de origen vegetal (Thongsook y Barrett, 2005), estas isoformas tienen diferentes pesos moleculares, punto isoeléctrico, especificidad de sustrato y estabilidad térmica. La principal función de las peroxidasa en las plantas es la reducción del peróxido de hidrógeno a expensas de la oxidación de los compuestos fenólicos, lo cual es fundamental en la biosíntesis de la lignina, y además afecta las propiedades mecánicas de las paredes celulares relacionadas con la extensión y la adhesión entre células, así como con la resistencia a enfermedades y la respuesta a daños físicos (Fry 1986; Brownleader *et al.*, 2000).

Basado en una posible relación entre la actividad de las peroxidasa y el endurecimiento de los granos de *P. vulgaris*, se puede inferir que la inactivación de este tipo de enzima podría utilizarse como una estrategia para prevenir o reducir este defecto. Por consiguiente, esta investigación se planteó evaluar el efecto del almacenamiento sobre la actividad de la peroxidasa soluble y de las peroxidasa iónica y covalentemente enlazadas en los granos de *P. vulgaris*, así como estudiar la cinética de inactivación térmica de la peroxidasa soluble en esta matriz.

Peroxidases might be as soluble in the apoplasmic fluid and joined with covalent bond to the cellular wall with vegetal origin (Thongsook and Barrett, 2005), these isoforms have different molecular weights, isoelectric point, substrate specificity and thermal stability. The main function of peroxidases in the plants is the reduction of hydrogen peroxide due to the oxidation of phenol compounds, which is important to the biosynthesis of lignin, and affects the mechanical properties of cellular walls related to the extension and adhesion among cells, as well as the resistance to diseases and the response to physical damages (Fry 1986; Brownleader *et al.*, 2000).

Based in a possible relationship between the peroxidase activity and the hardening of *P. vulgaris* grains, it can be inferred that the inactivation of this type of enzymes might be used as a strategy to prevent or reduce this effect. Consequently, the aim of this research was to evaluate the storing effect on the activity of soluble peroxidase, ionic peroxidase and bounded covalent peroxidase in grains of *P. vulgaris*, as well as to study the kinetics of thermal inactivation of soluble peroxidase in this matrix.

## Materials and methods

### Plant material

A recently harvested sample of *P. vulgaris* (material SA029) was used, supplied by the National Center of Livestock Research (CENIAP), Venezuela. This sample was stored in freezing conditions ( $4 \pm 2$  °C) until proceeding the essays.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Se utilizó una muestra recién cosechada de *P. vulgaris* (material SA029), suministrada por el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), Venezuela. Esta muestra fue almacenada en condiciones de refrigeración ( $4 \pm 2$  °C) hasta el momento de realizar los ensayos.

La investigación se realizó en dos etapas, la primera consistió en evaluar el efecto del almacenamiento sobre las actividades de la peroxidasa soluble y de las peroxidases iónica y covalentemente enlazadas en los granos de *P. vulgaris* y su relación con el endurecimiento de los mismos. En la segunda etapa se estudió la cinética de inactivación térmica de la peroxidasa soluble en granos de *P. vulgaris* recién cosechados.

### **Etapas I: evaluación del efecto del almacenamiento sobre las actividades de la peroxidasa soluble y de las peroxidases iónica y covalentemente enlazadas en los granos de *P. vulgaris***

Los granos recién cosechados se dividieron en tres lotes, uno se analizó de inmediato (testigo) y los otros dos se almacenaron por 120 días bajo condiciones diferentes: 5 °C/34% HR (baja temperatura/baja humedad) y 37 °C/75% HR (alta temperatura/alta humedad); esta última con el fin de promover el endurecimiento (García *et al.*, 1998). Las cámaras de almacenamiento consistieron en peceras de vidrio con una capacidad de 130 L, dentro de las cuales se

The research was divided into two phases; the first consisted on evaluating the storing on the activities of soluble peroxidase, ionic peroxidase and bounded covalent in grains of *P. vulgaris* and their relation to the hardening. The second phase consisted on studying the thermal inactivation kinetics of soluble peroxidase in recently harvested *P. vulgaris* grains.

### **Phase I: evaluation of the storing effect on the activities of soluble peroxidase, ionic peroxidase and bounded covalent peroxidase in *P. vulgaris* grains**

The recently harvested grains were divided into three parts, one was analyzed immediately (witness) and the other two were stored for 120 days at different conditions: 5 °C/34% RH (low temperature/low humidity) and 37 °C/75% RH (high temperature/high humidity); this last with the aim of promoting hardening (García *et al.*, 1998). Storing chambers consisted on glass fish tanks with 130 L capacity, on which were place saturated saline solutions of MgCl<sub>2</sub> and NaCl to reach values of relatively humidity of 34 and 75%, respectively, according to Greenspan (1977), Bell and Labuza (2000) and Greenspan (1977). Once in the tanks, the grains were put on perforated plastic trays.

### **Peroxidase activity**

It was determined according to the modified Yang and Uchiyama method (2000). For this reason, 0.5 g of the sample were suspended, consisting on ground grains with a particle size lower to 0.5 mm in 20 mL of partially frozen sodium phosphate buffer 0.1 M (pH 6.5) with 0.5% of polyvinylpyrrolidone.

colocaron soluciones salinas saturadas de  $MgCl_2$  y NaCl para alcanzar valores de humedad relativa de 34 y 75%, respectivamente, de acuerdo a lo calculado por Greenspan (1977), Bell y Labuza (2000) y Greenspan (1977). Dentro de las peceras, los granos se colocaron sobre bandejas plásticas perforadas.

### Actividad de las peroxidasas

Se determinó de acuerdo al método de Yang y Uchiyama (2000) modificado. Para ello, se suspendieron 0,5 g de muestra, consistente en granos molidos hasta un tamaño de partícula inferior a 0,5 mm, en 20 mL de buffer fosfato de sodio 0,1 M (pH 6,5) parcialmente congelado, con 0,5% de polivinilpirrolidona. Se homogenizó por 30 s a 15000 rpm en un Polytron 3100 (Kinematica, EE.UU) y luego se centrifugó a 20000 g por 20 min a 4 °C en una ultracentrifuga Optima-L100 XP (Beckman, EE.UU). El sobrenadante se utilizó para medir la actividad de la peroxidasa soluble, con el sistema extracto enzimático-guayacol-peróxido de hidrogeno.

El residuo proveniente de la extracción de la peroxidasa soluble se lavó cinco veces con 20 mL de buffer fosfato de sodio 0,1 M, seguidamente se adicionaron 20 mL de NaCl 1 M en buffer fosfato de sodio 0,1 M y se dejó en reposo toda la noche a 4 °C, luego se centrifugó a 25000 g por 20 min a 4 °C. El sobrenadante se usó para medir la actividad de la peroxidasa iónicamente enlazada a la pared celular y el residuo se lavó dos veces con 20 mL de buffer fosfato de sodio 0,1 M. La peroxidasa covalentemente enlazada a la pared celular se extrajo

It was homogenized for 30 s at 15000 rpm in Polytron 3100 (Kinematica, EE.UU) and was then centrifuged at 20000 g for 20 min at 4 °C in an Optimum. L 100 XP ultracentrifuge (Beckman, EE.UU). The supernatant was used to measure the activity of soluble peroxidase with the system of enzymatic-guaiac extract- hydrogen peroxide.

The residue resulted from the extraction of soluble peroxidase was washed five times with 20 mL of sodium phosphate buffer 0.1 M, later 20 mL of NaCl 1 M were added in sodium phosphate buffer 0.1 M and set aside all night at 4 °C, then it was centrifuged at 25000 g for 20 min at 4 °C. The supernatant was used to measure the activity of the ionic peroxidase bounded to the cellular wall, and the residue was washed twice with 20 mL of sodium phosphate buffer 0.1 M. Covalent peroxidase bounded to the cellular wall was extracted suspending this residue in 10 mL of acetate buffer 0.1 M (pH 4.0) with 60 ppm of cellulase (Sigma, EE.UU) and 60 ppm of pectinase (Merck, Germany) during all night. Later, it was centrifuged at 25000 g for 20 min at 4 °C and the supernatant was filtered with acetate buffer 0.1 M (pH 4.0) for 5 h. The activity of each type of peroxidase was quantified using the system of enzymatic-guaiac extract- hydrogen peroxide, for which were mixed 2.7 mL of substrate solution with 0.3 mL of extract in a quartz bowl. Passed 5 s, absorbance was measured at 470 nm every 15 s for 180 s using a spectrophotometer DU 640 (Beckman, EE.UU). The

suspendiendo este residuo en 10 mL de buffer acetato 0,1 M (pH 4,0) con 60 ppm de celulasa (Sigma, EE.UU) y 60 ppm de pectinasa (Merck, Alemania) durante toda la noche. Seguidamente se centrifugó a 25000 g por 20 min a 4 °C y el sobrenadante se dializó con buffer acetato 0,1 M (pH 4,0) por 5 h. La actividad de cada tipo de peroxidasa se cuantificó con el sistema extracto enzimático-guayacol-peróxido de hidrogeno, para lo cual se mezclaron 2,7 mL de la solución sustrato con 0,3 mL del extracto en una cubeta de cuarzo. Después de 5 s, se midió la absorbancia a 470 nm cada 15 s durante 180 s con un espectrofotómetro DU 640 (Beckman, EE.UU). La solución sustrato consistió en 1% de guayacol y 1% de peróxido de hidrógeno (30% v/v) en buffer fosfato de sodio 0,1 M (pH 6,5). La actividad enzimática se calculó con la pendiente de la recta tangente a la parte inicial de la curva de absorbancia vs tiempo de reacción del sistema peroxidasa-peróxido de hidrógeno-guayacol.

#### **Análisis estadístico**

Las determinaciones de la actividad enzimática se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar. Se les aplicó un análisis de varianza de una vía ( $\alpha = 0,05$ ), utilizando el programa Statgraphics Centurion XV para Windows (Statgraphics, 2010) previa comprobación de los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia. La comparación de medias se hizo con la prueba de rango múltiple de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

#### **Etapas II: estudio de inactivación térmica de la peroxidasa soluble**

Este estudio se realizó con la harina de los granos, previamente

substrate solution consisted of 1% of guaiac and 1% of hydrogen peroxide (30% v/v) in sodium phosphate buffer 0.1 M (pH 6.5). The enzymatic activity was calculated with the descent of the pendent line at the initial area of the absorbance curve vs reaction time of the system of enzymatic-guaiac extract- hydrogen peroxide,

#### **Statistical analysis**

The determinations of the enzymatic activity were applied by triplicate and the results were expressed as average  $\pm$  standard deviation. One-way variance analysis was applied ( $\alpha = 0.05$ ), using Statgraphics Centurion XV software for Windows (Statgraphics, 2010) prior to testing of normality assumptions, homocedasticity and independence. Mean comparison was done using Duncan multiple rank test ( $\alpha = 0.05$ ).

#### **Phase II: study of thermal inactivation of soluble peroxidase**

This study was performed using the flour of grains, which was previously treated at two different humidity, 24 and 17%, since these corresponded to the humidity presented by the grains at the moment of the harvest and threshing, respectively. For preparing the flour, ground grains were used with a particle size inferior to 0.5 mm, and its humidity content was adjusted spraying the necessary water quantity on the flour, mixing simultaneously with an electric blender. The treated flour was stored in high-density polyethylene bags and frozen for 24 h before its use to guarantee the equilibrium and the homogenous distribution of water. The humidity content was determined by the method 925.10 of AOAC (2000).



acondicionada a dos humedades distintas, 24 y 17%, puesto que correspondieron a la humedad presentada por los granos en el momento de la cosecha y de la trilla, respectivamente. Para la preparación de la harina los granos fueron molidos hasta un tamaño de partícula inferior a 0,5 mm, y su contenido de humedad se ajustó rociando con un aspersor la cantidad de agua necesaria sobre la harina, mezclando simultáneamente con una batidora eléctrica. La harina acondicionada se almacenó en bolsas de polietileno de alta densidad y se refrigeró por 24 h antes de su uso, para asegurar el equilibrio y una distribución homogénea del agua. El contenido de humedad se determinó por el método 925.10 de la AOAC (2000).

### Tratamientos térmicos

Se empleó un diseño factorial 5 x 6, con cinco niveles de temperatura (75, 80, 85, 90 y 95 °C) y seis de tiempo de calentamiento (1, 2, 4, 8, 16 y 32 min), para un total de 30 tratamientos realizados por duplicado. Dos gramos de la harina acondicionada se distribuyeron uniformemente en una bolsa plástica multicapa (2 x 5 cm), para cada tratamiento, y se selló al vacío. Las bolsas fueron sumergidas en un baño de calentamiento D3165 (Kattermann, Alemania) con temperatura controlada y el tiempo se comenzó a contabilizar después de transcurridos 20 s, de acuerdo a lo señalado por Affrifah *et al.* (2005). Las bolsas fueron removidas del baño de acuerdo al tiempo de calentamiento y se enfriaron inmediatamente en un baño de agua con hielo por 5 min.

### Thermal treatments

A 5 x 6 factorial design was used with five levels of temperature (75, 80, 85, 90 and 95 °C) and six heating times (1, 2, 4, 8, 16 and 32 min), for a total of 30 treatments done by duplicate. Two grams of treated flour were distributed uniformly in a multi-layer plastic bag (2 x 5 cm) for each treatment and were vacuum sealed. Bags were immersed in a heating bath D3165 (Kattermann, Germany) with controlled temperature and the time started to count once past 20 s, according to what stated Affrifah *et al.* (2005). Bags were removed from the bath according to the heating time and were taken immediately to a water bath with ice for 5 min. The control sample was not submitted to thermal treatment and its peroxidase activity was considered as the initial value.

### Kinetic analysis of the data

The thermal inactivation of the enzymes was generally described as a first-order model, where;

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -k * t \quad (1)$$

Where,  $A$ : residual enzymatic activity,  $A_0$ : initial activity,  $k$ : velocity constant of thermal inactivation and  $t$ : heating time.

Based on equation 1, the value of the inactivation constant ( $k$ ) was determined for each temperature through a linear regression data analysis, after determining the residual enzymatic activity ( $A$ ) for each combination heating time-temperature. This last was calculated

La muestra testigo no se sometió a tratamiento térmico y su actividad de peroxidasa fue considerada como el valor inicial.

### **Análisis cinético de los datos**

La inactivación térmica de enzimas se describe generalmente con un modelo de primer orden, en la cual se cumple que:

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -k * t \quad (1)$$

Donde, A: actividad enzimática residual,  $A_0$ : Actividad inicial,  $k$ : constante de velocidad de inactivación térmica y  $t$ : tiempo de calentamiento.

Basado en la ecuación 1 se determinó el valor de la constante de inactivación ( $k$ ) para cada temperatura, a través de un análisis de regresión lineal de los datos, luego de determinar la actividad enzimática residual (A) para cada combinación tiempo de calentamiento-temperatura. Esta última se calculó con la pendiente de la recta tangente a la parte inicial de la curva de absorbancia vs tiempo de reacción del sistema peroxidasa-peróxido de hidrógeno-guayacol, y se expresó como porcentaje de la actividad enzimática inicial ( $A_0$ ).

### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza multifactorial (nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ ) para evaluar el efecto de los factores estudiados, tiempo y temperatura del tratamiento térmico, sobre la actividad enzimática residual. El programa utilizado fue el Statgraphics plus 4.0 para Windows (Statgraphics, 2010) y previamente se comprobó el cumplimiento de

with the tangent line after the initial area of the absorbance curve vs reaction time of the system of enzymatic-guaiac extract- hydrogen peroxide, and was expressed as percentage of the initial enzymatic activity ( $A_0$ ).

### **Statistical analysis**

A multifactorial variance analysis (significance level  $\alpha = 0.05$ ) was carried out to evaluate the effect of the studied factors, time and temperature of the thermal treatment, on the residual enzymatic activity. The software used was Statgraphics plus 4.0 for Windows (Statgraphics, 2010) and the fulfillment of the normality assumptions, homocedasticity and Independence, were tested. Mean comparison was done using Duncan multiple rank test ( $\alpha = 0.05$ ).

## **Results and discussion**

### **Phase I: evaluation of the storing effect on the activities of soluble peroxidase, ionic peroxidase and bounded covalent peroxidase in the grains of *P. vulgaris***

According to the information shown on table 1, the activity of soluble peroxidase in grains stored at high temperature and relative high humidity (HTHH) reduced significantly ( $P \leq 0.05$ ) in 75% with the storing time, while the grains preserved at low temperature and low relative humidity (LTLH) kept constant; consequently, it can be deduced that this enzyme is related to the hardening of grains. Nevertheless, to confirm this hypothesis it is

los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia. La comparación de medias se hizo a través de la prueba de rango múltiple de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

necessary to carry out more studies in which the activity of soluble peroxidase is evaluated in shorter periods of time.

Likewise, Rivera *et al.* (1989) found a reduction of 30-50% in the activity of soluble peroxidase in grains of *P. vulgaris* kept at 30 °C/85% RH for three months, compared to grains stored at 15 °C/35% RH for three months. Likewise, Plhak *et al.* (1987) observed a significant reduction of the activity of soluble peroxidase in grains of *P. vulgaris* stored at 30 °C/80% RH for 12 months, at the same time these values resulted significantly lower to the ones found in grains kept at 15 °C/30% RH.

It is expected that the hardening of grains is associated to an increment of the activity of this enzyme and not to a reduction of it, since it catalyzes the reactions of the oxidative

## Resultados y discusión

### **Etapas I: evaluación del efecto del almacenamiento sobre las actividades de la peroxidasa soluble y de las peroxidases iónica y covalentemente enlazadas en los granos de *P. vulgaris***

De acuerdo a los resultados mostrados en el cuadro 1, la actividad de la peroxidasa soluble de los granos almacenados a alta temperatura y alta humedad relativa (ATAH) disminuyó significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en un 75% con el tiempo de almacenamiento, mientras que en los granos conservados

**Cuadro 1. Variación de la actividad de la peroxidasa soluble (PS), peroxidasa iónica (PI) y peroxidasa enlazada covalentemente a la pared celular (PC) en los granos de *Phaseolus vulgaris* L. material SA029 almacenados por cuatro meses.**

**Table 1. Variation of the activity of soluble peroxidase (SP), ionic peroxidase (IP) and bounded peroxidase covalent to the cellular wall (CW) in grains of *Phaseolus vulgaris* L. material SA029 stored for four months.**

Condición	Actividad PS (Abs·min <sup>-1</sup> .g)		Actividad PI (Abs·min <sup>-1</sup> .g)		Actividad PC (Abs·min <sup>-1</sup> .g)
Control	133,96±5,27	b	0,040±0,000	b	Nd
ATAH <sup>1</sup>	33,29±10,98	a	0,014±0,000	a	Nd
BTBH <sup>2</sup>	139,61±0,00	b	0,265±0,000	c	Nd

<sup>1</sup>ATAH: alta temperatura/alta humedad relativa. <sup>2</sup>BTBH: baja temperatura/baja humedad relativa. Letras diferentes en la misma columna, para cada tipo de peroxidasa, indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). <sup>3</sup>Nd: No detectada.

a baja temperatura y baja humedad relativa (BTBH) se mantuvo constante, por consiguiente, se podría deducir que esta enzima está relacionada con el endurecimiento de los granos. No obstante, para confirmar tal hipótesis es necesario realizar otros estudios en los cuales se evalúe la actividad de la peroxidasa soluble en lapsos de tiempo más cortos.

De igual modo, Rivera *et al.* (1989) encontraron una disminución de 30-50% en la actividad de la peroxidasa soluble en granos de *P. vulgaris* mantenidos a 30 °C/85% HR durante tres meses, al compararla con granos almacenados a 15 °C/35% HR también por tres meses. Asimismo, Plhak *et al.* (1987) observaron una disminución significativa de la actividad de la peroxidasa soluble en granos de *P. vulgaris* almacenados a 30 °C/80% HR por 12 meses, y a su vez estos valores resultaron significativamente menores a los encontrados en los granos mantenidos a 15 °C/30% HR.

Se esperaría que el endurecimiento de los granos se asocie a un aumento de la actividad de esta enzima y no a una reducción de la misma, debido a que esta cataliza las reacciones de acoplamiento oxidativo entre diversos compuestos fenólicos, y entre estos y algunos biopolímeros, que podrían conllevar a un aumento de la rigidez de la pared celular y por ende a la resistencia de los granos a ablandarse durante la cocción (Fry, 1986; Cardoso *et al.*, 2016; Siqueira *et al.*, 2016). Sin embargo, la actividad de la enzima pudo haberse incrementado puntualmente a lo largo del periodo evaluado, y luego disminuir por el

coupling among different phenolic compounds, and among these and some biopolymers that might cause an increment to a rigidity of the cellular wall; thus, the resistance of the grains to soften during cooking (Fry, 1986; Cardoso *et al.*, 2016; Siqueira *et al.*, 2016). However, the activity of the enzyme might have increased throughout the evaluated period, and then reduced by the effect of reactive species of the oxygen generated by the quinones, which at the same time produced by the oxidation of phenolic compounds. These radicals are extremely harmful for the cells since these might cause enzymatic inactivation, lipids peroxidation of the membrane and breakage of the DNA (Appel; 1993; Baziramakenga *et al.*, 1995).

The protection against free radicals is the most important way to prevent oxidative stress. In the case of the seeds, protecting mechanisms against the activity of species reactive to oxygen during storing are mainly enzymatic; among these mechanisms the most important is peroxidase, since is a detox enzyme of free radical (Bailly *et al.*, 1998; Goel *et al.*, 2003). Del Rio and Puppo (2009) affirmed that the cellular walls presented good oxidative metabolisms, and that the increment on its rigidity was based on dependent reactions of reactive species of oxygen.

In relation to the activity of ionic peroxidase, it was also found that it had a significant reduction ( $P \leq 0.05$ ), in 65% of grains-HTHH, as there was an increment in the grains-LTLH. On the other hand, in all samples the activity

efecto de las especies reactivas del oxígeno generadas por las quinonas, las cuales a su vez se produjeron por la oxidación de compuestos fenólicos. Estos radicales son extremadamente dañinos para las células puesto que pueden causar inactivación enzimática, peroxidación de los lípidos de la membrana y rompimientos en la estructura del ADN (Appel 1993; Baziramakenga *et al.*, 1995).

La protección contra los radicales libres es la forma más importante de prevenir el estrés oxidativo. En el caso de las semillas, los mecanismos protectores contra la actividad de las especies reactivas de oxígeno durante el almacenamiento son predominantemente enzimáticos; dentro de estos mecanismos, la peroxidasa es una importante enzima de detoxificación de radicales libres (Bailly *et al.*, 1998; Goel *et al.*, 2003). Del Río y Puppo (2009) afirmaron que las paredes celulares presentaron un gran metabolismo oxidativo, y que el aumento de su rigidez se basó en reacciones dependientes de especies reactivas del oxígeno.

Con relación a la actividad de la peroxidasa iónica, se encontró que también disminuyó significativamente ( $P \leq 0,05$ ), en un 65%, en los granos-ATAH, en tanto que aumentó en los granos-BTBH. Por otra parte, en todas las muestras, la actividad de la peroxidasa soluble fue aproximadamente tres órdenes de magnitud superior en comparación con la peroxidasa iónica, razón por la cual se seleccionó la primera de ellas para evaluar su cinética de inactivación térmica.

Con respecto a la peroxidasa covalentemente enlazada a la pared

de soluble peroxidase corresponded to three orders of magnitude, higher compared to the ionic peroxidase, reason for which the first of these was selected to evaluate its kinetic of thermal inactivation.

Regarding the covalent peroxidase bounded to the cellular wall, none activity was found in any of the analyzed samples. Nevertheless, it is yet not clear if the oxidative coupling of esterified polysaccharides with ferulic acid occurs directly in the cellular wall (*in muro*) or intra-cellular in Golgi apparatus (Kroon and Williamson, 1999; Verbelen and Vissenberg, 2007). In the latter, the covalent peroxidase bounded to the cellular wall might not be related to the hardening of *P. vulgaris* grains.

### **Phase II: study of the thermal inactivation of the soluble peroxidase**

Figure 1 shows a progressive reduction of the enzymatic activity when increasing the temperature and the heating time, being drastic in the first minutes and then gradual, typical behavior of first-order reactions and peroxidases of vegetal origin (Lemos *et al.*, 2000; Machado and Saraiva, 2002). In this sense, humidity of flour, temperature and heating time had a significant effect ( $P \leq 0,05$ ) on the residual activity of peroxidase, according to the variance analysis, with higher effect of flour humidity and lower in the heating time.

The highest reductions in the residual activity of peroxidase were obtained in the flour with 24% of humidity, since water favored the deploying of proteins during the

celular, no se detectó actividad en ninguna de las muestras analizadas. No obstante, aún no está claro si el acoplamiento oxidativo de polisacáridos esterificados con ácido ferúlico ocurre directamente en la pared celular (*in muro*) o intracelularmente en el aparato de Golgi (Kroon y Williamson, 1999; Verbelen y Vissenberg, 2007). En este último caso la peroxidasa covalentemente enlazada a la pared celular no estaría relacionada con el endurecimiento de los granos de *P. vulgaris*.

### **Etapas II: estudio de inactivación térmica de la peroxidasa soluble**

La figura 1 evidencia una reducción progresiva de la actividad enzimática al incrementar la temperatura y el tiempo de calentamiento, siendo drástica en los primeros minutos y luego gradual, comportamiento típico de reacciones de primer orden y de las peroxidases de origen vegetal (Lemos *et al.*, 2000; Machado y Saraiva, 2002). En este sentido, la humedad de la harina, la temperatura y el tiempo de calentamiento tuvieron un efecto significativo ( $P \leq 0,05$ ) sobre la actividad residual de la peroxidasa, de acuerdo al análisis de varianza, resultando mayor el efecto de la humedad de la harina y menor el del tiempo de calentamiento.

Las reducciones más elevadas en la actividad residual de la peroxidasa se consiguieron en la harina con 24% de humedad, debido a que el agua favoreció el desplegamiento de la proteína durante la desnaturalización térmica. Así, después de 32 min de calentamiento a 75 °C la actividad

thermal denaturalization. After 32 min of heating at 75 °C the residual activity was equal to 0.19 and 41.85% in samples with 24 and 17% of humidity, respectively. Likewise, after 32 min of heating at 80 °C, the residual activity was equal to 0.19 and 19.17% in samples with 24 and 17% of humidity, respectively. According to Parkin (1993), the sensitivity of an enzyme to the thermal inactivation depended on the water content of the medium, thus, the enzymes in humid and semi-humid food systems tended to be less stable to the heat.

The results agreed to the ones obtained by Rivera *et al.* (1989) who found that at a higher humidity content in flours of *P. vulgaris* higher the degree of thermal inactivation of soluble peroxidase. A similar effect of the humidity content on the enzymatic inactivation has been reported in different studies with other enzymes, such as phospholipase in soy (List *et al.*, 1990), myrosinase in canola seeds (Owusu-Ansah and Marianchuk, 1991) and lipase in rapeseed oil (Ponne *et al.*, 1996).

Kinetic parameters of thermal inactivation of soluble peroxidase in samples with different humidity contents were determined plotting the residual enzymatic activity in function to the heating time in a semi-logarithmic scale obtaining for most of the essayed temperatures two straight lines with different pending, which meant that it was a first-order kinetic and that the soluble peroxidase presented two fractions with different thermal resistance, one sensitive of labile-thermal and

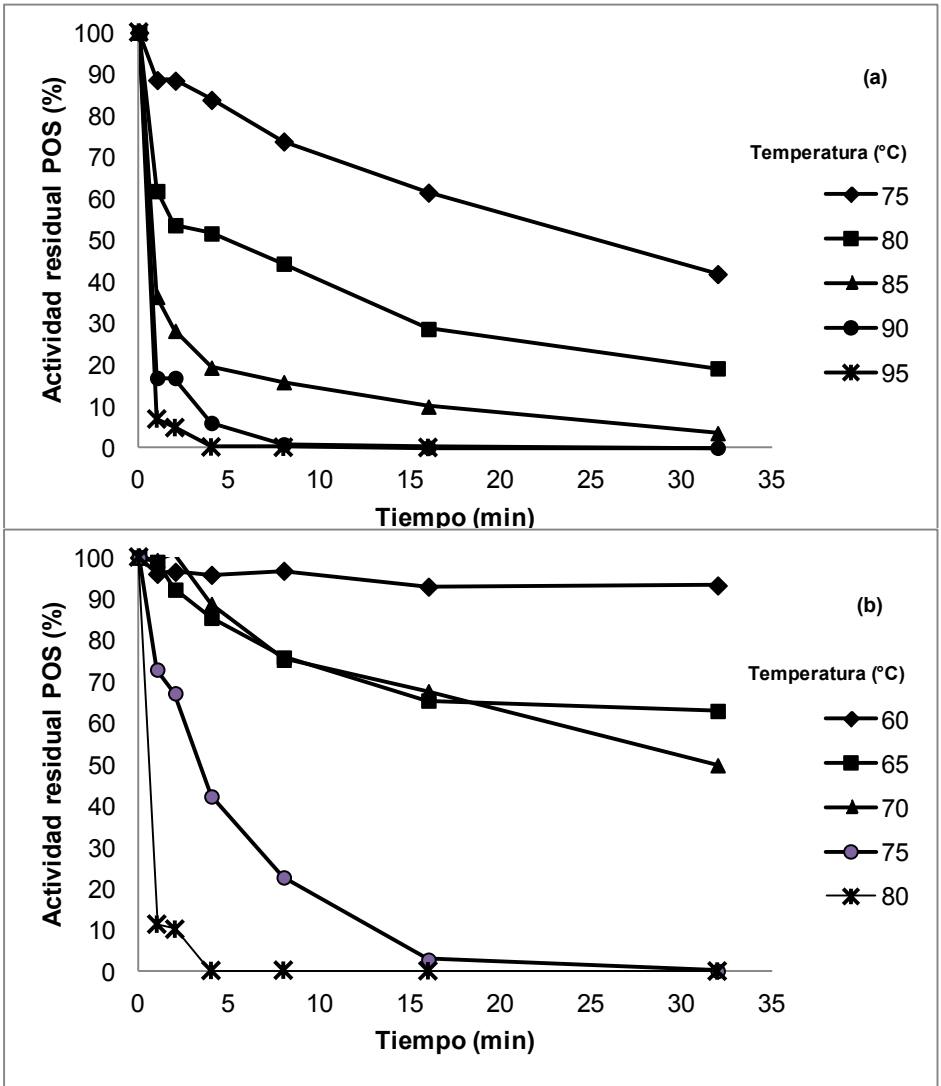


Figura 1. Inactivación térmica de la peroxidasa soluble en la harina de *P. vulgaris* con humedad del 17 (a) y 24% (b), como una función del tiempo y la temperatura.

Figure 1. Thermal inactivation of soluble peroxidase in flour of *P. vulgaris* with humidity of 17 (a) and 24% (b) as a function of time and temperature.

residual fue igual a 0,19 y 41,85% en las muestras con 24 y 17% de humedad, respectivamente. De igual forma, después de 32 min de calentamiento a 80 °C la actividad residual fue igual a 0,19 y 19,17% en las muestras con 24 y 17% de humedad, respectivamente. De acuerdo a Parkin (1993), la sensibilidad de una enzima a la inactivación térmica dependió del contenido de agua del medio, de manera que las enzimas en sistemas alimenticios húmedos y semi-húmedos tendieron a ser menos estables al calor.

Los resultados concordaron con los obtenidos por Rivera *et al.* (1989), quienes encontraron que a mayor contenido de humedad, en harinas de *P. vulgaris*, mayor fue el grado de inactivación térmica de la peroxidasa soluble. Un efecto similar del contenido de humedad sobre la inactivación enzimática ha sido reportado en varios estudios con otras enzimas, tales como fosfolipasa en soya (List *et al.*, 1990), mirosinasa en semillas de canola (Owusu-Ansah y Marianchuk, 1991) y lipasa en semillas de colza (Ponne *et al.*, 1996).

Los parámetros cinéticos de inactivación térmica de la peroxidasa soluble, en las muestras con diferentes contenidos de humedad, se determinaron graficando la actividad enzimática residual en función del tiempo de calentamiento en una escala semi-logarítmica, obteniéndose para la mayoría de las temperaturas ensayadas dos líneas rectas con pendientes diferentes, lo que significó, por un lado que se trató de una cinética de primer orden, y

the other thermal-resistance. In other words, the thermal inactivation of soluble peroxidase, independent from the humidity content, followed a first-order biphasic kinetic. This agreed to the information reported by different authors in vegetables such as peas, carrots, beans, broccoli and asparagus (Günes and Bayındırlı, 1993; Yemenicioğlu *et al.*, 1998; Morales-Blancas *et al.*, 2002).

The constant of thermal inactivation ( $k$ ) and the decimal reduction time ( $D$ ) are shown on table 2 and 3, where phase 1 corresponded to the thermal-sensitive fraction, and phase 2 to the thermal-resistant, only for temperatures of 80 and 75 °C in samples with 17 and 24% of humidity, respectively, on which were obtained a monophasic kinetic. Generally, the constant  $k$  increased with the temperature and the humidity content, while the necessary time to reduce the enzymatic activity in 90% ( $D$ ) reduced, as was expected.

The effect of the humidity content was the most intense; therefore, the increment of the constant  $k$  in 40 times its value, compared to the results at 80 °C with 17 and 24% of humidity. Likewise, the humidity content strengthened the temperature effect, since constant  $K$  increased in 11% in 75 to 80 °C in samples with 17% of humidity, and in 656% in samples with 24% of humidity.

On the other hand, the effect of the temperature on the enzymatic inactivation velocity was significant; thus, with humidity of 17% at 75 °C were required 68.7 min to reduce the activity of thermal-labile fraction in



por el otro que la peroxidasa soluble presentó dos fracciones con resistencia térmica diferente, una sensible o termo-lábil y otra termo-resistente. En otras palabras, la inactivación térmica de la peroxidasa soluble, independientemente del contenido de humedad, siguió una cinética bifásica de primer orden. Esto coincidió con lo reportado por diferentes autores en vegetales como guisantes, zanahorias, frijoles, brócoli y espárragos (Günes y Bayındırlı, 1993; Yemenicioğlu *et al.*, 1998; Morales-Blancas *et al.*, 2002).

La constante de inactivación térmica ( $k$ ) y el tiempo de reducción decimal ( $D$ ) se muestran en los cuadros 2 y 3, en donde la fase 1 correspondió a la fracción termo-sensible y la fase 2 a la termo-resistente. Únicamente para las temperaturas de 80 y 75 °C en las muestras con 17 y 24% de humedad, respectivamente, con las cuales se obtuvo una cinética monofásica. En general, la constante  $k$  se incrementó con la temperatura y con el contenido de humedad, mientras que el tiempo necesario para reducir la actividad enzimática en un 90% ( $D$ ) disminuyó, como era de esperarse.

El efecto del contenido de humedad fue el más intenso, y prueba de ello fue el incremento de la constante  $k$  en 40 veces su valor, al comparar los resultados a 80 °C con 17 y 24% de humedad. Asimismo, el contenido de humedad potenció el efecto de la temperatura, ya que la constante  $k$  aumentó en un 11% al pasar de 75 a 80 °C en las muestras con 17% de humedad, y en un 656% en las muestras con 24% de humedad.

Por otra parte, el efecto de la

90% and at 95 °C only 1.7 min were needed to achieve the same reduction. This effect can also be described with Arrhenius equation and the concept of activation energy, as indicated in figure 2 and on table 4. The activation energy for both humidity contents, presented similar values in the thermal-labile fraction and the thermal-resistance, and was in the typical Rank for the inactivation of enzymes, 50-150 Kcal mol<sup>-1</sup>, proposed by Parking (1993). Additionally, the activation energy increased with the humidity content of the sample in 35 and 28% in phases 1 and 2, respectively.

In relation to the constant value of thermal resistance ( $z$ ), it was found that it reduced when increasing the humidity content of the sample, fact that was expected because a change of lower temperature is required to reduce the value of  $D$  in 90% in the most humid sample. For this reason, in the sample with 17% of humidity, it was necessary an increase of the temperature of 11.6% to reduce in 90% the decimal reduction time ( $D$ ) of the enzymatic activity of the thermal-labile fraction; meanwhile, an increment of 7.9% was required to obtain the same reduction in the sample with 24% of humidity.

Yemenicioğlu *et al.* (1998) reported a  $z$  value equal to 14.1 °C and an activation energy of 36.4 kcal mol<sup>-1</sup> for the thermal-stable fraction of soluble peroxidase in green or immature grains of *P. vulgaris*, and indicated that the enzymatic inactivation depended on the changes of temperature. As in the current research, Yemenicioğlu *et al.* (1998) observed very similar values for the activation energy and  $z$  in thermal-labile and thermal-resistance fractions.

**Cuadro 2. Parámetros cinéticos de inactivación de la peroxidasa soluble en la harina de *Phaseolus vulgaris* L. material SA029 con 17% de humedad.**

**Table 2. Kinetic inactivation parameters of soluble peroxidase in flour of *Phaseolus vulgaris* L. material SA029 with 17% of humidity.**

T (°C)	k (min <sup>-1</sup> )	Fase 1 D (min)	R <sup>2</sup>	k (min <sup>-1</sup> )	Fase 2 D (min)	R <sup>2</sup>
75	0,0335	68,7	0,938	0,0036	639,6	0,999
80	0,0372	61,9	0,972	-	-	-
85	0,2076	11,1	0,994	0,0625	36,8	0,999
90	0,4481	5,1	0,981	0,1134	20,3	0,933
95	1,3765	1,7	0,938	0,2094	11,0	0,999

**Cuadro 3. Parámetros cinéticos de inactivación de la peroxidasa soluble en la harina de *Phaseolus vulgaris* L. material SA029 con 24% de humedad.**

**Table 3. Kinetic inactivation parameters of soluble peroxidase in flour of *Phaseolus vulgaris* L. material SA029 with 24% of humidity.**

T (°C)	k (min <sup>-1</sup> )	Fase 1 D (min)	R <sup>2</sup>	k (min <sup>-1</sup> )	Fase 2 D (min)	R <sup>2</sup>
60	0,0024	959,4	0,967	0,0002	11512,9	0,999
65	0,0363	63,4	0,975	0,0024	959,4	0,999
70	0,0397	58,0	0,999	0,0175	131,6	0,993
75	0,1964	11,7	0,994	-	-	-
80	1,4855	1,6	0,950	0,0697	33,0	0,974

temperatura sobre la velocidad de inactivación enzimática resultó significativo; así, por ejemplo, con una humedad del 17%, a 75 °C se requirieron 68,7 min para reducir la actividad de la fracción termo-lábil en un 90%, en tanto que a 95 °C se necesitaron solo 1,7 min para lograr la misma reducción. Este efecto también podría describirse con la ecuación de Arrhenius y el concepto de energía de activación, tal como se indica en la figura 2 y en el cuadro 4. La energía de activación, para ambos contenidos de humedad, presentó valores similares en la fracción termo-lábil y en la termo-resistente, y se encontró dentro del rango típico para la inactivación de enzimas, 50-150 Kcal mol<sup>-1</sup>, propuesto por Parkin (1993). Adicionalmente, la energía de activación se incrementó con el contenido de humedad de la muestra en un 35 y 28% en las fases 1 y 2, respectivamente.

Con relación al valor de la constante de resistencia térmica ( $z$ ), se encontró que disminuyó al incrementar el contenido de humedad de la muestra, lo cual era de esperarse porque se requiere un cambio de temperatura menor para reducir el valor de  $D$  en un 90% en la muestra más húmeda. Un ejemplo de esto, fue que en la muestra con 17% de humedad fue necesario un aumento de la temperatura de 11,6 °C para reducir en un 90% el tiempo de reducción decimal ( $D$ ) de la actividad enzimática de la fracción termo-lábil, mientras que se requirió de un incremento de 7,9 °C para lograr esa misma reducción en la muestra con 24% de humedad.

## Conclusions

The storing of black beans of *P. vulgaris* at high temperatures and high relative humidity for four months reduced significantly the activity of soluble and ionic fractions of the peroxidase enzyme in 75 and 65%, respectively, which might have favored the hardening of the grain.

The thermal inactivation of soluble peroxidase in grains of *P. vulgaris* was highly dependent to the humidity content in the grain and the heating temperature, finding that at high humidity and temperature it inactivates almost completely in the first minutes of the treatment. On the other hand, the knowledge of kinetic of enzymatic inactivation allows predicting adequately the residual activity of a combination time-temperature or an inactivation requirement to estimate the heating time necessary at a specific temperature. This is basic information for the design of thermal processes destined to reduce the enzymatic activity.

## Acknowledgement

This research was supported by the Project 001-DAG-2009, financed by Universidad Centrocidental Lisandro Alvarado (UCLA), through the Scientific, Humanistic and Technological Development Board (CDCHT).

*End of English version*

---

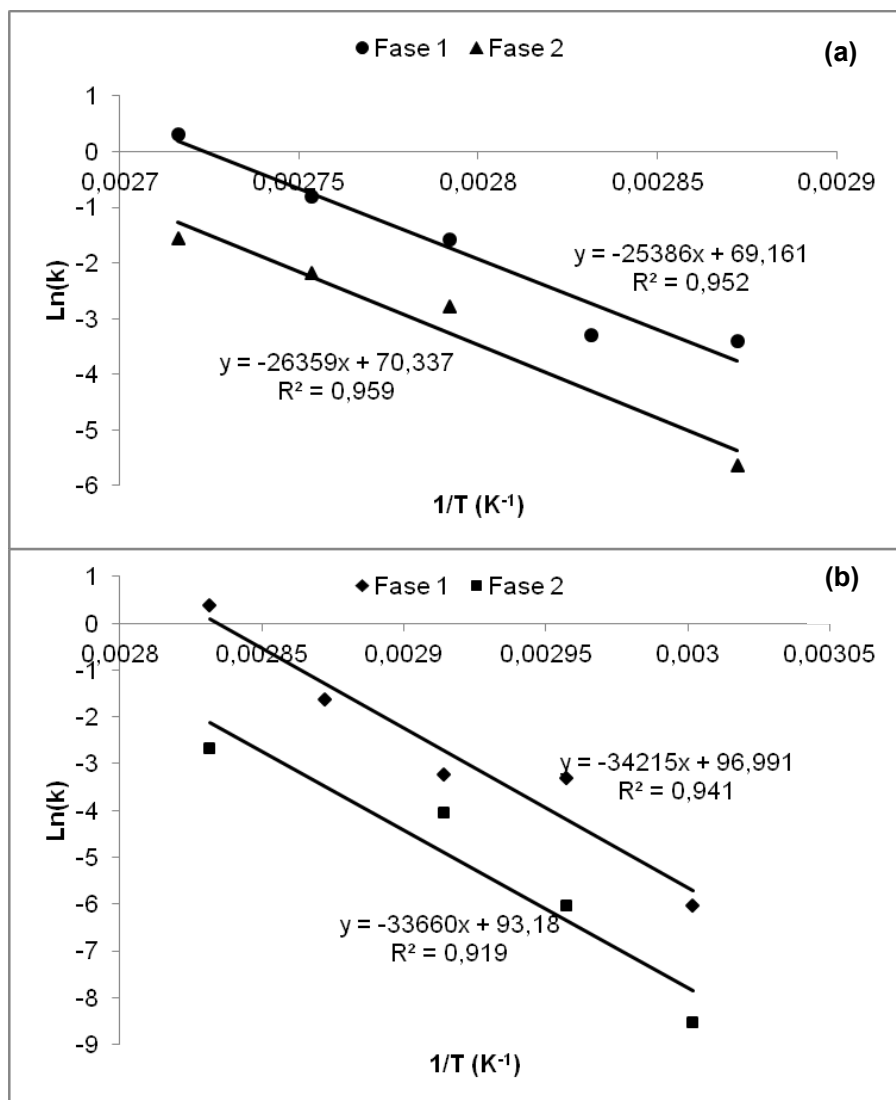


Figura 2. Dependencia térmica de la constante de inactivación (k) de la peroxidasa soluble en la harina de *Phaseolus vulgaris* L. con humedad del 17 (a) y 24% (b).

Figure 2. Thermal dependence of the inactivation constant (k) of soluble peroxidase in flour of *Phaseolus vulgaris* L. with humidity of 17 (a) and 24% (b).

**Cuadro 4. Energía de activación ( $E_a$ ) y valores de  $z$  necesarios para la inactivación de la peroxidasa soluble en harinas de *Phaseolus vulgaris* L., material SA029.**

**Table 4. Activation energy ( $E_a$ ) and  $z$  values necessary for the inactivation of soluble peroxidase in flours of *Phaseolus vulgaris* L. material SA029.**

Humedad (%)	Fase 1			Fase 2		
	$E_a$ (Kcal $\text{mol}^{-1}$ )	$z$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$R^2$	$E_a$ (Kcal $\text{mol}^{-1}$ )	$z$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$R^2$
17	50,4	11,6	0,952	52,4	11,2	0,959
24	68,0	7,9	0,941	66,9	8,1	0,919

Yemenicioğlu *et al.* (1998) reportaron un valor de  $z$  igual a  $14,1^{\circ}\text{C}$  y una energía de activación de  $36,4 \text{ kcal mol}^{-1}$  para la fracción termo-estable de la peroxidasa soluble en granos verdes o inmaduros de *P. vulgaris*, e indicaron que la inactivación enzimática fue altamente dependiente de los cambios de temperatura. Al igual que en esta investigación, Yemenicioğlu *et al.* (1998) observaron valores muy similares para la energía de activación y  $z$  en las fracciones termo-lábil y termo-resistente.

## Conclusiones

El almacenamiento del frijol negro de *P. vulgaris* a alta temperatura y alta humedad relativa por cuatro meses, disminuyó significativamente la actividad de las fracciones soluble e iónica de la enzima peroxidasa en 75 y 65%, respectivamente, lo que pudo favorecer el endurecimiento del grano.

La inactivación térmica de la peroxidasa soluble en granos de *P. vulgaris* fue altamente dependiente del contenido de humedad en el grano y de la temperatura de calentamiento, encontrándose que a elevada humedad y temperatura se inactiva casi completamente en los primeros minutos de tratamiento. Por otra parte, el conocimiento de la cinética de inactivación enzimática permite predecir adecuadamente la actividad residual dada una combinación tiempo-temperatura, o también dado un requerimiento de inactivación estimar el tiempo de calentamiento necesario a una temperatura especificada. Esta es información básica para el diseño de procesos térmicos destinados a reducir la actividad enzimática.

## Agradecimiento

Esta investigación estuvo enmarcada dentro del proyecto 001-DAG-2009, financiado por la

Universidad Centrocidental Lisandro Alvarado (UCLA), a través del Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico (CDCHT).

## Literatura citada

- Affrifah, N., M. Chinnan and D. Phillips. 2005. Heat-moisture treatments of cowpea flour and their effects on phytase inactivation. *J. Food Sci.* 70:E98-E103.
- Appel, H. 1993. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *J. Chem. Ecol.* 19:1521-1552.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2000. *Official Methods of Analysis*. 15 th Edition. Washington. USA.
- Bailly, C., A. Benamar, F. Corbineau and D. Côme. 1998. Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. *Physiol. Plant* 104:646-652.
- Baziramakenga, R., G. Leroux and R. Simard. 1995. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *J. Chem. Ecol.* 21:1271-1285.
- Bell, L. and T. Labuza. 2000. *Moisture sorption*. 2nd Edition. American Association of Cereal Chemists, Inc. USA. p. 34-35.
- Brownleader, M., J. Hopkins, A. Mobasheri, P. Dey, P. Jackson and M. Trevan. 2000. Role of extensin peroxidase in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedling growth. *Planta* 210:668-676.
- Cardoso, M., V. Ziegler, C. Romano, G. Hornke, R. Tadeu and M. De Oliveira. 2016. Physicochemical properties and enzymatic bean grains dried at different temperatures and stored for 225 days. *Semin: Ciênc. Agrár.* 37:1295-1306.
- Del Rio, L. and A. Puppo. 2009. *Reactive oxygen species in plant signaling*. Berlin: Springer.
- Edreva, A. 1991. The tissue, ultrastructural or functional damage - a prerequisite for peroxidase induction. p 387-390. *In:* Lobarzewski J., H. Greppin, C. Penel and T. Gaspar (Eds.). *Biochemical molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. Geneva: Imprimerie.
- Fry, S. 1986. Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. *Planta* 157:111-123.
- Gálvez, L., M. Genovese and F. Lajolo. 2007. Polyphenols and antioxidant capacity of seed coat and cotyledon from Brazilian and Peruvian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 55:90-98.
- García, E., T. Filisetti, J. Udaeta and F. Lajolo. 1998. Hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris*): involvement of phenolic compounds and pectates. *J. Agric. Food Chem.* 46:2110-2116.
- Goel, A., A. Goel and I. Sheoran. 2003. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *J. Plant Physiol.* 160:1093-1100.
- Greenspan, L. 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *J. Res. Nbs. A Phys. Ch.* 81:89-102.
- Günes, B. and A. Bayindirli. 1993. Peroxidase and lipoxygenase inactivation during blanching of green beans, green peas and carrots. *Lebensm-Wiss Technol.* 26(5):406-410.
- Hangen, L. y M. Bennink. 2002. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutr. Cancer* 44:60-65.
- Kroon, P. y G. Williamson. 1999. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J. Sci. Food Agric.* 79:355-361.
- Lemos, M., J. Oliveira and J. Saraiva. 2000. Influence of pH on the thermal inactivation kinetics of horseradish peroxidase in aqueous solution. *Lebensm-Wiss Technol.* 33(5):362-368.
- Lewis, N. and E. Yamamoto. 1990. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:455-490.
- List, G., T. Mounts, A. Lanser and R. Holloway. 1990. Effect of moisture, microwave heating and live steam

- treatment on phospholipase D activity in soy beans and soy flakes. *JAACS* 67:867-871.
- Machado, F. and J. Saraiva. 2002. Inactivation and reactivation kinetics of horseradish peroxidase in phosphate buffer and buffer-dimethylformamide solutions. *J. Mol. Catal. B. Enzym* 19-20:451-457.
- Martin-Cabrejas, M., L. Jaime, C. Karanja, A. Downie, M. Parker, F. López-Andreu, G. Maina, R. Esteban, A. Smith and K. Waldron. 1999. Modifications to physicochemical and nutritional properties of hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris*) by extrusion cooking. *J. Agric. Food Chem.* 47:1174-1182.
- Morales-Blancas, E., V. Chandia and L. Cisneros-Zevallos. 2002. Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxygenase from broccoli, green asparagus and carrots. *J. Food Sci.* 67:146-154.
- Mujica, M., M. Granito y N. Soto. 2012. Variación de los compuestos fenólicos de *Phaseolus vulgaris* L. durante el almacenamiento y su relación con el endurecimiento. *Bioagro* 24:163-174.
- Njoroge, D., P. Kinyanjui, S. Christiaens, A. Shpigelman, A. Makokha, D. Silab and M. Hendrickx. 2015. Effect of storage conditions on pectic polysaccharides in common beans (*Phaseolus vulgaris*) in relation to the hard-to-cook defect. *Food Res. Int.* 76: 105-113.
- Owusu-Ansah, Y. and M. Marianchuk. 1991. Microwave inactivation of myrosinase in canola seed: A pilot plant study. *J. Food Sci.* 56:1372-1374.
- Parkin, L. 1993. Environmental effects on enzyme activity. p. 480. *In: Nagodawithana T., G. Reed (Eds.). Enzymes in food processing.* 3rd ed. San Diego: Academic Press, Inc.
- Plhak, L., D. Stanley, A. Hohlberg and J. Aguilera. 1987. Hard-to-cook defect in black beans-effect of pretreatment and storage condition on extractable and peroxidase activity. *Can. I. Food Sci. Tech. J.* 20:378-382.
- Ponne, C.T., A. Möller, L.M.M. Tijskens, P.V. Bartels and M.M.T. Meijer. 1996. Influence of microwave and steam heating on lipase activity and microstructure of rapeseed (*Brassica napus*). *J. Agric. Food Chem.* 44:2818-2824.
- Rivera, J., A. Hohlberg, J. Aguilera, L. Plhak and D. Stanley. 1989. Hard-to-cook defect in black beans-peroxidase characterization and effect of heat pretreatment and storage on enzyme inactivation. *Can. I. Food Sci. Tech. J.* 22:270-275.
- Siqueira, B., P. Bassinello, G. Malgaresi, W. Pereira and K. Fernandes. 2016. Analyses of technological and biochemical parameters related to the HTC phenomenon in carioca bean genotypes by the use of PCA. *LWT - Food Sci. Technol.* 65:939-945.
- Srisuma, N., S. Ruengsakulrach, M. Uebersax, M. Bennik and R. Hammerschmidt. 1991. Cell wall polysaccharides of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* 39:855-858.
- Statgraphics, C. 2010. Statgraphics® Centurion XVI user manual. StatPoint Technologies Inc, Warrenton.
- Thongsook, T. and M. Barrett. 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. Italica) peroxidases. *J. Agric. Food Chem.* 53:3206-3214.
- Verbelen, J. and K. Vissenberg. 2007. *The expanding cell.* Berlin: Springer. 297 p.
- Yang, J. and T. Uchiyama. 2000. Hydroxycinnamic acids and their dimers involved in the cessation of cell elongation in mentha suspension culture. *Biosci. Biotech. Bioch.* 64:1572-1579.
- Yemenicioğlu, A., M. Özkan y B. Cemeroglu. 1998. Thermal stabilities of peroxidases from fresh pinto beans. *J. Food Sci.* 63(6):987-990.