

INACTIVACION TERMICA DE LAS PROTEINASAS DEL CARDO *CYNARA HUMILIS* L.: CONSTANTES CINETICAS Y TERMODINAMICAS:

(THERMAL INACTIVATION OF PROTEINASES FROM THE FLOWERS OF THE CARDOON
CYNARA HUMILIS L.: KINETIC AND THERMODYNAMIC PARAMETERS).

por

A. MARCOS, M. A. ESTEBAN, E. MARTINEZ, M. ALCALA y J. FERNANDEZ-SALGUERO

Departamento de tecnología y bioquímica de los alimentos.
Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba (España).

S u m m a r y .

*A milk-clotting crude extract was obtained from the flowers of the cardoon *Cynara humilis* with buffer of citric acid 0,1 M/disodium phosphate 0,2 M (pH = 5,0). Thermal inactivation data were obtained after an activation period of 15 days at refrigeration temperature. For each thermal shock, the loss of milk-clotting activity was determined as a function of the treatment period. The kinetics of the process suggests the existence of two independent first-order reactions derived from the inactivation of two proteinases with different thermostability.*

The thermodynamic parameters of the activated state have been derived from the kinetic data on the thermolabile and the thermostable proteinases.

R e s u m e n :

*De las flores del cardo *Cynara humilis* se ha obtenido, con tampón de ácido cítrico 0,1 M/fosfato disódico 0,2 M (pH = 5,0), un extracto bruto coagulante de la leche. Después de un período de activación de 15 días a temperatura de refrigeración se obtuvieron datos de inactivación térmica, determinando la pérdida de actividad coagulante a diversas temperaturas y tiempos de calentamiento. La cinética del proceso in-*

Recibido para publicación el 7-10-1980.

dica la existencia de dos reacciones independientes de primer orden, debidas a la inactivación de dos proteinasas de diferente termoestabilidad. A partir de los datos cinéticos relativos a las proteinasas termolábil y termorresistente se han computado los parámetros termodinámicos del estado activado.

Introducción.

Diversas variedades de queso de oveja se elaboran artesanalmente en España y Portugal empleando como coagulante tradicional de la leche extractos acuosos de macerados de flores desecadas de cardos del género *Cynara* (Vieira de Sá y Barbosa⁸; Anónimo¹). Las principales especies de cardos empleadas con tal fin son el cardo hortense *Cynara cardunculus* y el cardo silvestre *C. humilis*. Investigadores portugueses han estudiado la actividad coagulante y proteolítica de los extractos del cardo *C. cardunculus* y su uso en la fabricación de diversos tipos de queso (Vieira de Sá *et al.*⁹).

También se ha determinado la actividad coagulante de los extractos de *C. humilis* y la influencia en la misma de la concentración de enzima, temperatura, pH, diferentes combinaciones de temperatura-pH y concentración de iones Ca^{2+} (Martínez y Esteban⁵), así como la actividad proteolítica sobre la caseína ovina y la influencia de la concentración de ClNa en la hidrólisis relativa de la α_s - y β -caseína (Serrano y Marcos⁶).

Una importante propiedad de los coagulantes de la leche, de interés tecnológico en quesería, es la de su estabilidad térmica. La determinación de los parámetros cinéticos y termodinámicos de la desnaturalización térmica de las proteinasas de un extracto bruto de flores de cardos *C. humilis* ha sido el objetivo del presente estudio.

Material y métodos.

Extracto enzimático bruto. Al término de la primavera de 1980 se recogieron en la provincia de Córdoba cardos silvestres de la especie *Cynara humilis*. En el laboratorio se cortó con tijera la parte pigmentada de las flores frescas y el tejido se homogeneizó en batidora con cinco partes (p/v) de tampón de ácido cítrico 0,1 M/fosfato disódico 0,2 M, de pH 5,0. Después de dejarlo en maceración durante la noche, a temperatura de refrigeración, el homogeneizado fue exprimido a través de cuatro capas de gasa y el filtrado fue centrifugado a 5.000 r. p. m./15 min. El sobrenadante se diluyó a continuación añadiéndole tres volúmenes iguales de tampón de citrato-fosfato. Bajo agitación magnética, alícuotas de 1,0 ml de extracto diluido se

depositaron en ampollas de pequeño diámetro y pared muy delgada, que seguidamente se cerraron a la llama. Las ampollas se mantuvieron a temperatura de refrigeración durante 15 días, hasta alcanzar la máxima actividad enzimática (tiempo de coagulación, según Berridge³, de 3 min. aproximadamente).

Inactivación térmica de las enzimas. Para determinar el efecto de la temperatura sobre las proteinasas del extracto de cardo, gradillas de ampollas con extracto fueron sumergidas en un baño de agua mantenida con termostato Thermomix 1441E (B. Braun Melsungen AG) a diversas temperaturas constantes ($\pm 0,01^\circ \text{C}$). A diferentes tiempos de incubación se retiraron del baño pares de ampollas e inmediatamente se sumergieron en baño de agua con hielo, donde permanecieron hasta el momento de determinar la actividad coagulante residual del extracto calentado. La actividad coagulante inicial se determinó sobre extracto blanco (tiempo de calentamiento cero) contenido en ampollas introducidas directamente en el baño de hielo.

Determinación de la actividad coagulante. La actividad coagulante de la leche se determinó a 32°C según describe Berridge³. El substrato: leche descremada en polvo reconstituída (al 12 p. 100, p/v) en Cl_2Ca 10 mM, fue ajustado a pH 6,40 con ácido láctico al 10 p. 100 ó con NaOH 0,1 M. En el interior de tubos de ensayo con 10 ml de substrato de Berridge³ atemperado, se desintegraron las ampollas de extracto con ayuda de un forceps apropiado. Tras tres inversiones los tubos se incubaron hasta observar la floculación, cronometrándose el tiempo de coagulación.

Cálculos cinéticos y termodinámicos. Los métodos gráficos y matemáticos empleados en los cálculos cinéticos y termodinámicos se han basado en los procedimientos descritos por Whitaker¹⁰, Lund⁴ y Stumbo⁷.

Resultados y discusión.

Cinética de la reacción.

La velocidad de desnaturalización de las enzimas, en ausencia de factores perturbadores como la proteólisis, generalmente se debe a una reacción monomolecular y sigue por tanto una cinética de reacción de primer orden, expresable matemáticamente por la ecuación:

$$\ln \frac{(A_0)}{(A)} = k t \quad (1)$$

en la que (A_0) y (A) son, respectivamente, las actividades a los tiempos t_0 y t , siendo k la constante de velocidad de reacción específica.

MARCOS *et al.*: INACTIVACION TERMICA DE LAS PROTEINASAS DEL CARDO.

Para determinar gráficamente el orden de reacción aparente de la desnaturalización proteica, el método usualmente seguido por los tecnólogos de los alimentos para representar los datos de inactivación térmica de las enzimas es análogo al de las curvas de tiempo de muerte térmica de los microorganismos, representándose en ordenadas (a escala logarítmica) el porcentaje de actividad enzimática residual frente al tiempo de calentamiento (en abscisas a escala aritmética).

Siguiendo este método, en la figura 1 se representan los datos de inactivación térmica, a diversas temperaturas y tiempos, de las proteinasas coagulantes de la leche de un extracto bruto activado (en tampón de ácido cítrico 0,1 M/fosfato disódico 0,2 M, de pH 5,0) de flores de cardos *Cynara humilis*. Considerando que el tiempo de coagulación de la leche (TC) es inversamente proporcional a la actividad coagulante, el porcentaje de actividad coagulante residual viene dado por la relación:

$$\frac{100 TC_0}{TC} \quad (2)$$

en la que (TC_0) y (TC) son, respectivamente, los tiempos de coagulación de la leche a los tiempos de calentamiento t_0 y t .

En las curvas de inactivación a las diversas temperaturas se observan dos fases sucesivas de inactivación lineal, que indican que la cinética de reacción es de primer orden y que la actividad coagulante del extracto de cardo no se debe a una enzima homogénea. Este tipo de curvas refleja la existencia de dos reacciones independientes, ambas de primer orden, causantes de la inactivación térmica de dos proteinasas de diferente termoestabilidad. La primera fase lineal (de mayor pendiente) corresponde a la inactivación de una proteinasa relativamente termolábil; y la segunda fase (de menor pendiente) a la inactivación de otra proteinasa más termorresistente.

El porcentaje de la actividad coagulante inicial del extracto que corresponde a cada proteinasa individual puede determinarse extrapolando las curvas de inactivación de menor pendiente al tiempo cero (t_0), como muestra la figura 1. El punto de intersección del eje de ordenadas indica que casi la mitad (45 p. 100) de la actividad coagulante del extracto se debe a la proteinasa termorresistente; y el resto (55 por 100), a la proteinasa termolábil.

Constantes de velocidad de inactivación.

Las constantes de velocidad de inactivación de ambas proteinasas a las diferentes temperaturas estudiadas, dependen de las pendientes de las curvas cinéticas (figura 1). En el método de resistencia térmica las pendientes se expresan en valores D o tiempos de reducción decimal (tiempo de calentamiento requerido a cada temperatura para inactivar el 90 p. 100 de una u otra proteinasa o para que las curvas cinéticas traspasen un ciclo logarítmico en la figura 1).

MARCOS *et al.*: INACTIVACION TERMICA DE LAS PROTEINASAS DEL CARDO.

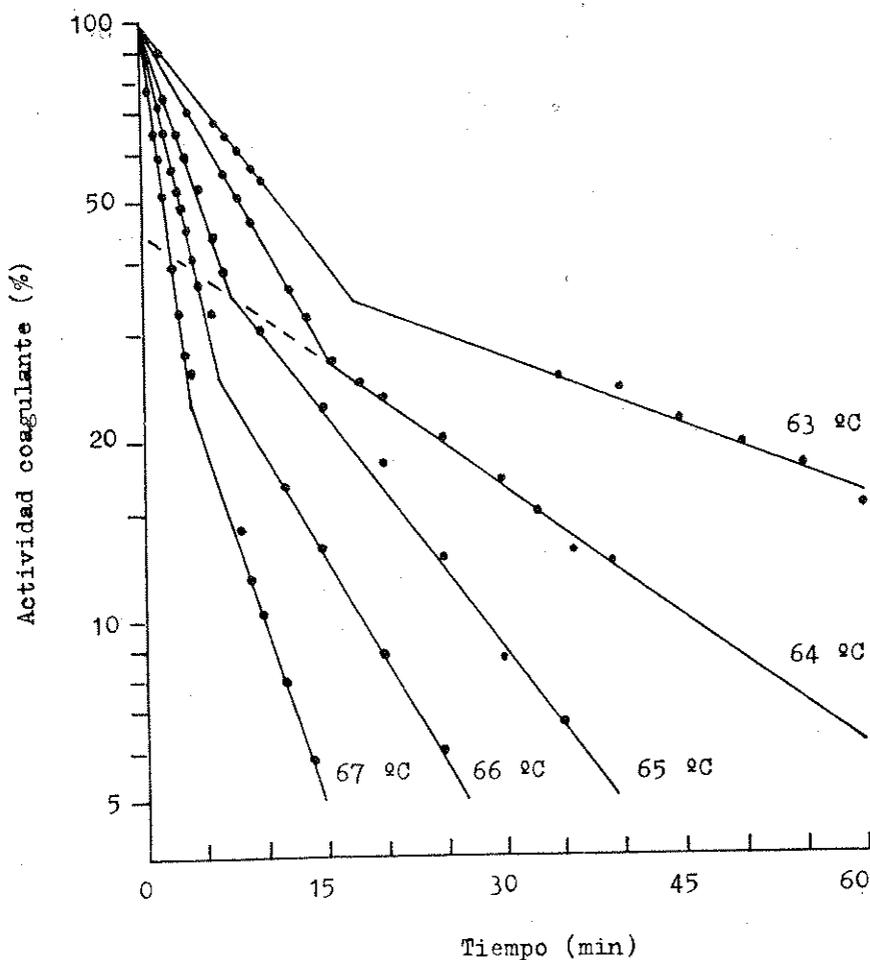


FIGURA 1. Velocidad de desnaturalización térmica de las proteinasas del cardo *Cynara humilis* a diversas temperaturas, en extracto bruto obtenido con tampon de ácido cítrico 0,1 M/ fosfato disódico 0,2 M, de pH 5,0.

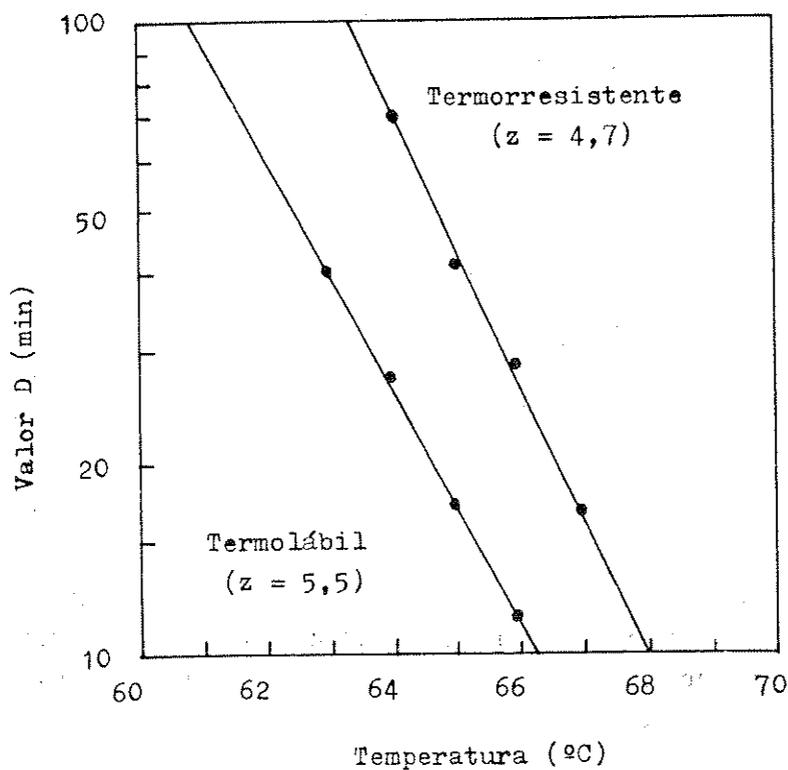


FIGURA 2. Inactivación térmica de las proteinasas del cardo *C. humilis* en función de la temperatura.

Los valores D a diversas temperaturas, de las proteinasas del extracto de cardo, representados en la figura 2, se han determinado midiendo gráficamente las pendientes de las curvas cinéticas de la figura 1.

Usando la ecuación (1) pueden calcularse también las constantes de velocidad de reacción específica (k). Estas se encuentran relacionadas con los valores D de acuerdo con la ecuación (3):

$$k = \frac{2,303}{D} \quad (3)$$

Mediante (3) se han calculado las constantes de velocidad de inactivación a las diferentes temperaturas experimentales de las dos proteinasas del extracto de cardo (cuadro II).

Los tiempos medios ($t_{\frac{1}{2}}$) o vidas medias (tiempos de calentamiento requeridos a las diferentes temperaturas para reducir la actividad al 50 p. 100 del valor inicial) pueden calcularse a su vez según la ecuación (4):

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0,693}{k} \quad (4)$$

Las constantes de velocidad a 65° C (cuadro I) indican que, a dicha temperatura, la inactivación de la proteinasa termolábil es aproximadamente dos veces y media más rápida que la de la proteinasa termorresistente.

Sabiendo las constantes de velocidad (valores D o $t_{\frac{1}{2}}$) a una temperatura dada, puede calcularse el porcentaje de la actividad inicial remanente tras un tiempo de calentamiento (t) cualquiera a tal temperatura, aplicando una de las ecuaciones siguientes:

$$A = \frac{A_o}{10^n} \quad (5)$$

$$A = \frac{A_o}{2^{n'}} \quad (6)$$

en las que (A_o) y (A) son, respectivamente, los porcentajes de actividad inicial y de actividad residual al tiempo t de calentamiento, siendo n y n' , respectivamente, el número de reducciones decimales ($n = t/D$) y el número de vidas medias ($n' = t/t_{\frac{1}{2}}$).

CUADRO I. Parámetros cinéticos de la inactivación térmica (63-67 °C) de las proteinasas del cardo *Cynara humilis*, en tampón de ácido cítrico 0,1 M/ fosfato disódico 0,2 M, de pH 5,0.

Método	Proteínasa	p. 100	Velocidades de reacción a 65° C	Dependencia de la temperatura
Resistencia térmica			D_{65} (min)	z (°C)
	Termolábil	55	17,00	5,5
	Termorresistente	45	43,65	4,7
Ecuación de Arrhenius			k ($\times 10^2 \text{ min}^{-1}$)	E_a (kcal mol^{-1})
	Termolábil		13,55	96
	Termorresistente		5,28	112
Q_{10}			k ($\times 10^2 \text{ min}^{-1}$)	Q_{10}
	Termolábil		13,55	66
	Termorresistente		5,28	134

Aplicando la ecuación (5) a los datos del cuadro I tendremos que, después del calentamiento del extracto a 65° C durante (*p. e.*) 30 min, aproximadamente el 1 p. 100 de la actividad coagulante inicial del extracto de cardo es retenida por la proteinasa termolábil residual, y que aproximadamente el 9 p. 100 de la actividad es retenida por la proteinasa termorresistente residual. Como consecuencia del calentamiento la actividad del extracto ha experimentado en total alrededor de 1D al haberse reducido el porcentaje de la actividad inicial de la proteinasa termolábil 1,76D, y el porcentaje de la actividad inicial de la proteinasa termorresistente, 0,69D.

Tecnológicamente suele considerarse inactivada una enzima cuando su actividad se reduce a la milésima parte, actividad residual que se consigue aplicando un proceso $3D$ o $10t_{\frac{1}{2}}$

Dependencia térmica de la cinética.

Existen tres métodos principales para expresar cuantitativamente el efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción: 1) el de resistencia térmica; 2) la ecuación de Arrhenius y 3) el Q_{10} .

Los términos usados en cada uno de los tres métodos, para describir la respuesta de la cinética de un sistema al cambio de temperatura, son interconvertibles matemáticamente.

En el método de resistencia térmica, la influencia de la temperatura sobre la velocidad de inactivación enzimática puede determinarse gráficamente representando los valores D a escala logarítmica, frente a las temperaturas de calentamiento a escala aritmética (figura 2). Para cada proteinasa se obtiene una línea recta que queda caracterizada conociendo el valor D a una temperatura dada (*p. e.*, el valor D_{65} (°C) interpolado que figura en el cuadro I) y la pendiente de la recta. La pendiente, que refleja la dependencia térmica de la velocidad de inactivación, se expresa mediante el valor z o incremento de temperatura necesario para reducir el valor D a la décima parte. En el cuadro I se indican los valores z correspondientes a las dos proteinasas del extracto de cardo.

Aunque, en general, las enzimas más termoestables suelen mostrar menor dependencia de la temperatura que las termolábiles, en la figura 2 puede verse que la enzima más termorresistente muestra mayor pendiente ($z = 4,7$) que la termolábil ($z = 5,5$) y por tanto también mayor dependencia de la temperatura. Según las constantes de velocidad a las diferentes temperaturas (cuadro II), a 65 - 2° C la proteinasa termolábil se inactiva con una rapidez 2,97 veces superior a la termorresistente, mientras que a 65 + 2° C la velocidad relativa de inactivación sólo es 2,24 veces superior; relación que tiende a ser progresivamente menor a medida que se eleva la temperatura.

CUADRO II. Parámetros termodinámicos del estado activado de la desnaturalización térmica (63-67 °C) de las proteinasas del cardo *Cynara humilis*, en tampón de ácido cítrico 0,1 M/ fosfato disódico 0,2 M, de pH 5,0

(°C)	Temperatura (°K)	Constantes de velocidad de reacción (k x 10 ⁴ s ⁻¹)	Energía libre $\Delta F \pm$ (cal mol ⁻¹)	Entalpía $\Delta H \pm$ (cal mol ⁻¹)	Entropía $\Delta S \pm$ (e. u.) ^a	Número de enlaces rotos (b)
..... Proteinasa termolábil						
63	336,15	9,60	24.397			
64	337,15	14,76	24.183			
65	338,15	22,34	23.978	95.614	212	19
66	339,15	34,22	23.654			
67	340,15	52,34	23.549			
..... Proteinasa termorresistente						
63	336,15	3,23	25.124			
64	337,15	5,36	24.862			
65	338,15	8,79	24.605	111.772	258	22
66	339,15	14,43	24.346			
67	340,15	23,40	24.093			

^a Unidades de entropía en cal mol⁻¹ o K⁻¹.

^b Número de enlaces no covalentes rotos durante la desnaturalización $\Delta H \pm / 5.000$, suponiendo que la $\Delta H \pm$ media por enlace sea de 5.000 cal mol⁻¹.

A partir de los valores z se han calculado también las energías de activación (E_a) y los coeficientes de temperatura (Q_{10}) expuestos en el cuadro I, mediante las siguientes ecuaciones de conversión:

$$E_a = \frac{2,303 RT(T + z)}{z} \quad (7)$$

en la que R es la constante universal de los gases ($1,987 \text{ cal mol}^{-1} \text{ } ^\circ\text{K}^{-1}$); y T , la temperatura absoluta de referencia ($^\circ\text{K}$), y

$$Q_{10} = \text{antilog} \frac{10}{z} \quad (8)$$

Parámetros termodinámicos del estado activado.

La teoría de las velocidades de reacción absoluta o teoría del estado de transición permite computar los datos cinéticos y determinar las constantes termodinámicas del estado activado, es decir, el cambio de entalpía (ΔH^\ddagger), de energía libre (ΔF^\ddagger) y de entropía (ΔS^\ddagger).

El cambio de entalpía (ΔH^\ddagger) se ha determinado representando gráficamente $\ln k (s^{-1})/T(^\circ\text{K})$ vs $1/T(^\circ\text{K} \times 10^4)$, en la figura 3. La pendiente de las rectas obtenidas es igual a $-\Delta H^\ddagger/R$.

El incremento de energía libre (ΔF^\ddagger) viene dado por la ecuación (9):

$$\Delta F^\ddagger = RT \ln \frac{k_B T}{k h} \quad (9)$$

en la que k_B es la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-16} \text{ erg } ^\circ\text{K}^{-1}$); y h , la constante de Planck ($6,624 \times 10^{-27} \text{ erg s}^{-1}$).

Conocidas ΔH^\ddagger y ΔF^\ddagger , la entropía (ΔS^\ddagger) puede calcularse mediante la ecuación:

$$\Delta S^\ddagger = \frac{\Delta H^\ddagger - \Delta F^\ddagger}{T} \quad (10)$$

Los resultados del estudio termodinámico del estado de transición se muestran en el cuadro II. Todos los valores de activación de la desnaturalización de las proteínas del cardo, en el caso de la enzima termorresistente, son más elevados que en el caso de la termolábil, siendo pequeña la diferencia de energía libre (ΔF^\ddagger), ya que el orden de magnitud de este parámetro es casi idéntico en diferentes proteínas ($22 \pm 5 \text{ kcal. mol}^{-1}$), a diferencia de ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger , que muestran mayores variaciones. En ambas proteínas los valores ΔF^\ddagger disminuyen ligeramente al aumentar la temperatura.

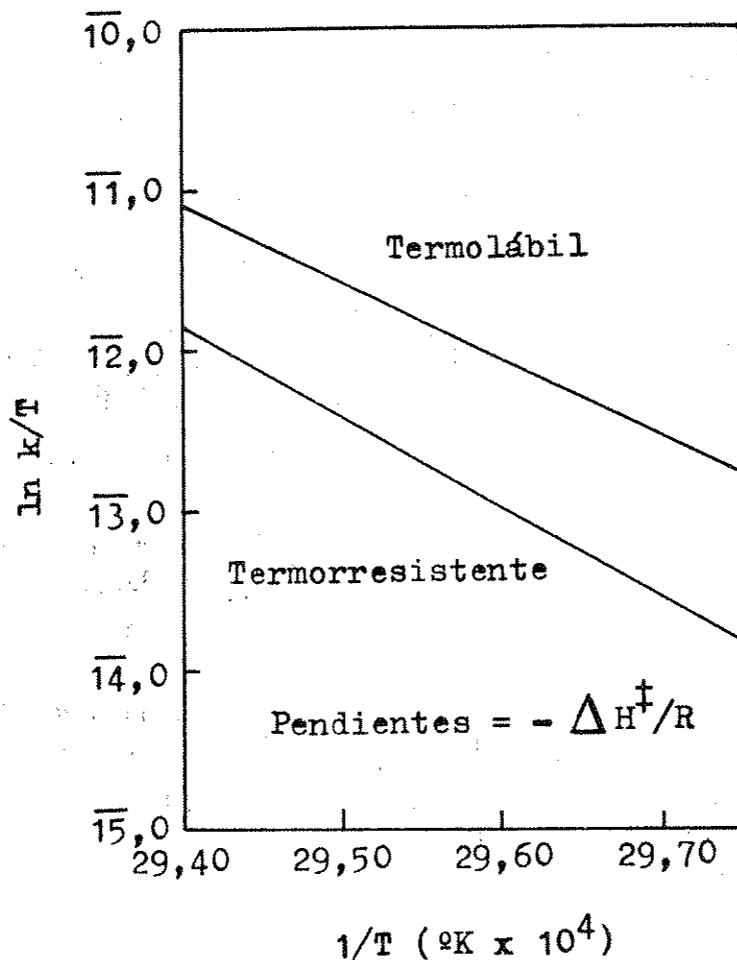


FIGURA 3. Efecto de la temperatura sobre las constantes de velocidad de desnaturalización de las proteinasas del cardo *C. humilis*.

Agradecimiento.

Emilia Martínez Galisteo desea expresar su gratitud a la Cooperativa Avícola de Córdoba, por haberle concedido una beca para realizar investigaciones en el Departamento de tecnología y bioquímica de los alimentos, de la Facultad de veterinaria de Córdoba.

Bibliografía.

1. Anónimo. Catálogo de quesos españoles. (2.^a ed.), Ministerio de Agricultura. Madrid (1974).
2. Barbosa, M., L. Vassal, E. Valles y G. Mocquot. L'utilisation d'extrait de *Cynara cardunculus* L. comme agent coagulant en fabrication de fromages à pâte molle et à pâte cuite. Le Lait, 54, 1-17 (1976).

3. Berridge, N. J. An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. *J. Dairy Res.*, 19, 328 (1952).
4. Lund, D. B. Heat processing. En *Physical principles of food preservation* (ed. M. Karel, O. R. Fennema and D. B. Lund), Marcel Dekker, Inc., New York (1975).
5. Martínez E. y M. A. Esteban. Actividad coagulante del extracto de la flor del cardo *Cynara humilis* L. *Arch. zootec*, 29, 107-116 (1980).
6. Serrano, E. y A. Marcos. Actividad proteolítica del extracto de la flor del cardo *Cynara humilis* L. *Arch. zootec*. 29, 11-22 (1980).
7. Stumbo, C. R. *Thermobacteriology in food processing*. 2nd ed., Academic Press, New York (1973).
8. Vieira de Sá, F. y M. Barbosa. Cheese-making with a vegetable rennet from Cardo (*Cynara cardunculus*). *J. Dairy Res.* 39, 335-343 (1972).
9. Vieira de Sá, F., B. Reis Machado, O. P. Rafael Pinto, I. M. Vicente da Cruz, M. J. Dias Carneiro, M. M. Antunes Barbosa y M. M. Costa Reis. *Maturação em queijo de ovelha-serra e serpa*. Instituto Nacional de Investigação Industrial, Química e Biología. Lisboa (1970).
10. Whitaker, J. R. *Principles of enzymology for the food sciences*. Marcel Dekker, Inc., New York (1972).