



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA



**PREPARACIÓN DE UN JUGO CLARIFICADO DE FRUTAS UTILIZANDO UN
CONCENTRADO ENZIMÁTICO DE GUAYABA Y PAPAYA**

Tutor Académico:

Prof. MSc. Carlos Alvarado Almarza

Autores:

Br. CAZORLA, Amarilis C.I: 19.000.299

Br. MARTINEZ, Keyra C.I:19.065.515

Valencia, Julio de 2012.



DEDICATORIA

Son muchas las personas a las que quisiera dedicar este trabajo, algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en el corazón; sin importar donde están o si llegan a leer estas líneas quiero darles gracias por formar parte de mi vida.

Dedico este trabajo:

A ti *Dios padre todopoderoso*, por darme la oportunidad de vivir, por darme la salud, la fe, la fortaleza y la esperanza para terminar este trabajo, por ser mi guía y no desampararme nunca, por hacer realidad este sueño, y por todo el amor con el que me rodeas. Esta tesis es para ti.

A mis *Padres*, porque creyeron en mi y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera. Esto es por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

A mi hermanito *Marcos Francisco* quien no está físicamente conmigo en este momento, pero que desde el cielo es la luz que ilumina mi vida, tus recuerdos y tus ocurrencias están conmigo, se que te hubiese gustado ver este logro hecho realidad, esto es para ti.

A mis hermanitas *Yurytza, Yesenia*, de quienes tuve un apoyo incondicional para salir adelante y culminar con esta meta.

A mi novio *José Ángel*, quien con su apoyo y sus consejos en los momentos más difíciles me impulsaba y motivaba a continuar y culminar esta meta.

A mis primas *Iraida, Carolina*, tío *José Miguel*, tía *Ana*, en fin a toda mi familia (son muchos nombres) a todos gracias por su apoyo, por depositar su confianza en mí y pensar que si lo lograría.

A *Cristopher Algarra*, mi amigo incondicional, quien en todo momento estuvo conmigo durante esta carrera, gracias por tus consejos por tu apoyo y por tu amistad, siempre supe que la pérdida de aquella regla T tenía un significado y era conocer la calidad de persona que eres, Gracias. Ahora si puedo decir: ¡Lo logramos!

No puedo terminar sin antes decirles que sin ustedes a mi lado no lo hubiera logrado, *Keyra Martínez, Marcos Cartagena, Luis Ortuño, Marycarmen Silva, Rosmary García, Heyrangis Guzmán, Dariana Devies*; tantos desvelos sirvieron de algo y aquí está el fruto los quiero.

Les agradezco a ustedes por estar en mi vida y haber compartido tantos momentos alegres y tristes pero que nos hacen crecer como persona.

Amarilis Cazorla.



DEDICATORIA

Este proyecto forma parte de una gran meta trazada, que no hubiese sido posible sin la ayuda de DIOS, a quien doy las gracias en todo momento por permitirme estar en el aquí y en el ahora, cumpliendo la misión que él tiene para mí en este mundo. También estoy plenamente agradecida con la ayuda de mi Virgencita Del Valle, a quien le debo mucho.

Se lo dedico a mi admirable y mejor amiga, mi mami y papi: *Neivis*. Lo has hecho perfecto. No tengo palabras para expresarte lo agradecida y orgullosa que me siento por ser tu hija. Solo puedo decirte que: “TE AMO MAMI, te honro, te bendigo y te agradezco profundamente, me llenas de energía”. Aquí estamos y seguiremos triunfando, como lo hemos venido haciendo hasta ahora.

Esto también fue posible gracias al apoyo de dos seres especiales, que han estado conmigo a lo largo de mi vida: mi *Abue Sonia* y *Tío Elvis*, llenando mi vida de valores, amor y apoyo. Es un logro que forma parte de mi familia, es uno de nuestros tantos logros, dedicado por ustedes y para ustedes: *mi abuelita Josefa, mi Padrino Orlando y mi Sony*, que aunque no estén presente físicamente, siempre vivirán en nuestros corazones. A mis tías *Lorena, Edith y Flor*; a mis Padrinos: *Erika y Gustavo*; también para mis primos *Elvis De Jesús, José Luis, Beysi, Maira*; sin dejar por pasar a los chiquitos de la casa que llenan mi vida de alegría: *Lonjina, Valeria, Ramsés y Luis Humberto*. A todos: GRACIAS, todo el apoyo brindado, ustedes me hacen tanto bien. LOS AMO.

Una dedicatoria muy especial para la *Sra. Lucrecia* y el *Sr. José*, dos abuelitos de Valencia que fueron clave en esto, gracias por tratarme como un miembro más de su familia.

A mi amiga *Ana Chacón*, por toda la ayuda manifestada en este proceso, te admiro y me llenas de inspiración, digna mujer luchadora.

Al *Sr. Fernando Guerrero* por su apoyo incondicional brindado a lo largo de mi carrera.

Para mis amigos de años: *Beiky Barboza, Patricia Flores, Yoveska González, Dacyl Berroterán, Adriany Solano, Leonardo Reyes, Ernesto Oropeza, Fernando Aloia, Gerardo Tremont, Robert Astudillo, Bonillo y Omar Peña*; quienes hemos venido creciendo juntos desde la adolescencia, brindándonos ánimo y apoyo; y ahora seguimos celebrando nuevos triunfos.

Para mi ilustre Universidad de Carabobo, y mis amigos de allí, con quienes he compartido muchísimos momentos a lo largo de la carrera: *Eymara García y familia, Leslie Sanabria, Maryangel Jiménez y familia, Joan Andrea Ruíz, Armeliz Ortega, Leonardo Mendoza, Carlos José Hernández, Daniel D' Arthenay, Emiro Landaeta*. Es una bendición tenerlos.

Puede que se me escapen muchas personas que hicieron posible este logro, hasta los que creyeron que no lo lograría, pero aquí estamos. ¡Gracias y bendiciones para todos!

Keyra Del Mar Martínez Parra.



AGRADECIMIENTOS

Primeramente a *Dios todo poderoso*, por el maravilloso regalo de la vida, manifestándose en todo momento, trayendo a seres maravillosos de luz, que nos brindaron su apoyo, aporte, ánimo y fuerza para que todo esto fuese posible.

Extendemos esta inmensa expresión de gratitud a nuestro tutor, profesor, maestro y amigo *Carlos Luis Alvarado Almarza*, por confiar en nosotras desde el comienzo, por permitirnos la oportunidad de formar parte de su línea de investigación, por todos sus conocimientos y enseñanzas brindadas, quien nos dio un apoyo incondicional, le agradecemos además sus consejos, su paciencia, palabras de aliento y esa amabilidad que le caracteriza, siempre dispuesto a ayudarnos con una sonrisa.

A la gran familia de nuestra Universidad de Carabobo, pasando por el Centro de Investigaciones Químicas de nuestra Facultad de Ingeniería, al *Dr. Pablo Bariccelli* y a la *Dra. Lisbeth Manganiello*. Por la Escuela de Ingeniería Química: al *Prof. Carlos Romero*, a la *Prof. Vicky Mujica*, a la *Prof. María Modroño*, a *Leída Díaz*, *Trina Padilla* y *Mary Padilla*, por ser personas tan colaboradoras y amables; así como el *Sr. Rafael*.

A todo el personal del Instituto de Ciencias Biomédicas (BIOMED-UC), donde fue posible lograr gran parte de este proyecto; con la especial ayuda brindada por parte del *Lic. David Torres*; al *Señor Cacique*, al *Prof. Francisco Rodríguez*, a la *Prof. Ledia Triana* y a la *Prof. Flor* por su gran ayuda y colaboración para realización de este trabajo. Al *personal de vigilancia*, por la amabilidad, cariño y las palabras de aliento recibidas.

A la *Ing. Peggy Londoño*, al *Ing. Gonzalo Rubín* y al *Prof. Vincenzo*, por su ayuda y colaboración en la realización de este trabajo de investigación.

A la *Sra. Sonia* y a la *Sra. Nevis*, por recibirme (Amarilis) en su casa, con gran amabilidad durante todo el tiempo de duración de los análisis experimentales, y su colaboración. ¡Muchas gracias!



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPITULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
3.1 Descripción del problema	4
3.2 Formulación del problema	7
3.2.1 Situación actual	8
3.2.2 Situación deseada	8
3.3 Objetivos	8
3.3.1 Objetivo general	8
3.3.2 Objetivos específicos	9
3.4 Justificación	9
3.5 Limitaciones	10
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	11
4.1 Antecedentes	11
4.2 Bases teóricas	19
4.2.1 La parchita	19
4.2.2 Enzimas	23
4.2.3 Sustancias pécticas	30
4.2.4 Enzimas pécticas	31
4.2.5 Actividad enzimática	34
4.2.6 Métodos de obtención de enzimas	37
4.2.7 Extracción y purificación	39
4.2.8 Aplicaciones de las enzimas pécticas en la manufactura de alimentos	40
4.2.9 Jugo	45
CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	48
5.1 Diseño de la investigación	48
5.2 Lugar de la investigación	49
5.3 Materiales y Equipos	49
5.4 Reactivos y Materias Primas	52



5.5	Desarrollo de la investigación.....	52
5.5.1	Obtener un concentrado enzimático a nivel de laboratorio utilizando guayaba y papaya.....	52
5.5.2	Mejorar el método de pH estático para la determinación de la actividad enzimática.....	54
5.5.3	Determinar la eficacia del concentrado enzimático en jugos de frutas, mediante un diseño experimental.....	56
5.5.4	Formular un jugo clarificado de frutas a partir del concentrado enzimático preparado.....	61
5.5.5	Evaluar las características sensoriales del jugo clarificado de frutas.....	61
5.5.6	Determinar los costos asociados a la extracción del concentrado así como de la elaboración de jugo preparado.....	62
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES		64
6.1	Obtener un concentrado enzimático a nivel de laboratorio utilizando guayaba y papaya.....	64
6.1.1	Eliminación de fenoles.....	64
6.1.2	Obtención del extracto enzimático.....	65
6.2	Mejorar el método de pH estático para la determinación de la actividad enzimática.....	66
6.3	Determinar la eficacia del concentrado enzimático en jugos de frutas, mediante un diseño experimental.....	71
6.4	Formular un jugo clarificado de frutas a partir del concentrado enzimático preparado.....	81
6.5	Evaluar las características sensoriales del jugo clarificado de frutas.....	83
6.6	Determinar los costos asociados a la extracción del concentrado así como de la elaboración de jugo preparado.....	88
6.6.1	Costos a nivel experimental para la extracción de 50 mL de concentrado enzimático.....	88
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		92
CONCLUSIONES		92
RECOMENDACIONES		93



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
APÉNDICE A. CÁLCULOS TÍPICOS.....	101
APÉNDICE B. DATOS EXPERIMENTALES	104
APÉNDICE C. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	108
APÉNDICE D. METODOS OPERATORIOS	115



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Uso industrial de las enzimas.....	5
Tabla 2.1	Análisis proximal del fruto de la parchita.	22
Tabla 2.2	Usos de las enzimas a nivel industrial.....	25
Tabla 2.3	Clasificación internacional de las enzimas.....	27
Tabla 2.4	Enzimas pécticas en el procesado de zumos.	42
Tabla 3.1	Cantidades de hidróxido de sodio necesario para preparar las soluciones titulantes a diferentes concentraciones.....	56
Tabla 3.2	Cantidades empleadas para la preparación de los jugos a diferentes concentraciones para obtener 100 mL	58
Tabla 3.3	Matriz de recolección de datos en una población muestra antes y después de la adición de del extracto enzimático en los jugos seleccionados.....	62
Tabla 4.1	Valores de pH para la medición de la actividad enzimática.....	69
Tabla 4.2	Actividad enzimática de pectinesterasa (UPE).....	71
Tabla 4.3	Análisis de varianza.....	71
Tabla 4.4	Análisis previo para la formulación del jugo clarificado.....	81
Tabla 4.5	Valores de absorbancia de los jugos.....	82
Tabla 4.6	Formulación para preparar 100 mL de jugo clarificado.....	83
Tabla 4.7	Costos asociados a la materia prima para obtener 50 mL de concentrado enzimático por cada fruta.....	89
Tabla 4.8	Costo asociado al reactivo utilizado en la eliminación de fenoles para obtener 50 mL de concentrado enzimático por cada fruta.....	89
Tabla 4.9	Costo de los reactivos involucrados en la preparación la solución para la extractora.....	89
Tabla 4.10	Costo asociado al reactivo utilizado en la purificación del concentrado...	89
Tabla 4.11	Costo total a nivel experimental para obtener 50 mL de concentrado enzimático.....	90
Tabla 4.12	Costos asociados a la materia prima para obtener 100 mL de jugo	



	clarificado al 45% v/v.....	90
Tabla 4.13	Costos asociados a los ingredientes para obtener 100 mL de jugo clarificado.....	90
Tabla 4.14	Costo total a nivel experimental para obtener 100 mL de jugo clarificado con concentrado enzimático de papaya.....	90
Tabla B.1	Datos experimentales necesarios para la determinación de la viscosidad del jugo de parchita sin concentrado enzimático.....	104
Tabla B.2	Datos experimentales necesarios para la determinación de la viscosidad del jugo de parchita con concentrado enzimático de guayaba.....	104
Tabla B.3	Datos experimentales necesarios para la determinación de la viscosidad del jugo de parchita con concentrado enzimático de papaya.....	106
Tabla B.4	Datos experimentales necesarios para la determinación de la viscosidad del jugo de parchita con concentrado enzimático de papaya (experimento decisivo)	107
Tabla C.1	Resultados experimentales de la actividad de la enzima pectinesterasa en el concentrado de guayaba.....	108
Tabla C.2	Resultados experimentales necesarios para determinar la actividad de la enzima pectinesterasa en el concentrado de papaya.....	108
Tabla C.3	Viscosidad del jugo de parchita sin concentrado enzimático.....	109
Tabla C.4	Interacciones para el diseño experimental del jugo de parchita utilizando el concentrado enzimático de guayaba.....	109
Tabla C.5	Interacciones para el primer diseño experimental del jugo de parchita utilizando el concentrado enzimático de papaya.....	110
Tabla C.6	Viscosidad del jugo de parchita para el sin concentrado enzimático para el segundo diseño experimental con papaya.....	111
Tabla C.7	Interacciones para el segundo diseño experimental del jugo de parchita utilizando el concentrado enzimático de papaya 2.	111
Tabla C.8	Evaluación hedónica del jugo sin concentrado enzimático.	114



Tabla C.9	Evaluación hedónica del jugo con concentrado enzimático.	114
-----------	---	-----



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Partes del fruto de la parchita.....	22
Figura 2.2	Diferencia entre los estados de transición de una reacción catalizada y no catalizada.....	26
Figura 2.3	Modelo de Emil Fisher “Llave Cerradura”.....	30
Figura 2.4	Modelo de <i>ajuste inducido</i> de Koshland.....	30
Figura 2.5	Esquema de actuación de la poligalacturonasa. Fuente: Whitaker (1994).....	32
Figura 2.6	Esquema de actuación de la pectinesterasa Fuente: Whitaker (1994).....	33
Figura 2.7	Esquema de actuación de la pectinliasa. Fuente: Whitaker (1994).....	34
Figura 3.1	Ultracentrifugadora.....	50
Figura 3.2	Liofilizador.....	50
Figura 3.3	Espectrómetro de masas.....	51
Figura 3.4	Nanopure.....	51
Figura 3.5	Obtención de la pulpa de la fruta.	57
Figura 3.2	Jugos para evaluar la viscosidad inicial.....	58
Figura 3.3	Jugos para evaluar la viscosidad final.	60
Figura 4.1	Medición de la actividad enzimática.....	67
Figura 4.2	Degradación de la pectina por acción de la pectinesterasa, hidrólisis del enlace éster del ácido poligalacturónico metilado.....	70
Figura 4.3	Efectos principales sobre la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de guayaba.....	72
Figura 4.4	Efectos principales sobre la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de guayaba.....	73
Figura 4.5	Gráfico de los residuales versus el orden de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de guayaba.....	74



Figura 4.6	Gráfico de los residuales versus el orden de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de papaya.....	74
Figura 4.7	Gráfico de Residuales versus los valores predichos de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de guayaba.....	75
Figura 4.8	Gráfico de Residuales versus los valores predichos de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático.....	75
Figura 4.9	Probabilidad normal de los residuos sobre la viscosidad del jugo de parchita.....	76
Figura 4.10	Probabilidad normal de los residuos sobre la viscosidad del jugo de parchita.....	77
Figura 4.11	Histograma de los residuales de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de guayaba.....	77
Figura 4.12	Histograma de los residuales de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de papaya.....	78
Figura 4.13	Efectos principales sobre la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de papaya 2.....	79
Figura 4.14	Gráfico de los residuales versus el orden de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de papaya 2.....	79
Figura 4.15	Gráfico de Residuales versus los valores predichos de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de Papaya...	80
Figura 4.16	Probabilidad normal de los residuos sobre la viscosidad del jugo de parchita (diseño experimental decisivo).....	80
Figura 4.17	Histograma de los residuales de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de papaya	81
Figura 4.18	Espectrofotómetro empleado para medir la absorbancia para apreciar la turbidez de los jugos.....	82
Figura 4.19	Evaluación del sabor para el jugo de parchita 45% v/v.....	85
Figura 4.20	Evaluación del sabor para el jugo de parchita 45% v/v	86
Figura 4.21	Evaluación del color para el jugo de parchita 45% v/v.....	87



Figura 4.22	Cambio en el color del jugo con la adición del concentrado enzimático. (A, jugo sin adición de concentrado enzimático. B: con concentrado enzimático).....	87
Figura 4.23	Evaluación de la apariencia para el jugo de parchita 45% v/v	88
Figura C.1	Resultados arrojados por el espectrómetro de masas para el concentrado enzimático de papaya empleado en la formulación del jugo	112
Figura C.2	Espectro de masas para el concentrado enzimático de papaya empleado en la formulación del jugo	113



RESUMEN

Las enzimas pécticas se utilizan para facilitar el prensado, la extracción del jugo y la clarificación. El objetivo de esta investigación se basó en la preparación de un jugo clarificado de frutas utilizando un concentrado enzimático de guayaba y papaya, realizando un mejoramiento del método de pH estático para determinar sus actividades enzimáticas. Posteriormente, se determinó la eficacia de estos concentrados en jugo de parchita (*Passiflora Edulis f. flavicarpa*) empleando un diseño experimental, donde se obtuvo que el jugo más eficaz fue el que contenía el concentrado enzimático de papaya. Por otra parte, se realizó la formulación del jugo clarificado, siguiendo las normas establecidas por COVENIN 1031-81 y el Codex Alimentarius (CODEX STAN 247-2005); se realizó una evaluación sensorial, la cual mostró resultados significativos en el color, olor y apariencia del jugo clarificado. Por último, se calcularon los costos a nivel experimental para la elaboración del jugo clarificado con concentrado enzimático de papaya, que resultó igual 11,194 BsF por cada 100 mL.

Palabras Claves: Enzimas pécticas, pectina, papaya, parchita, jugo, concentrado enzimático, clarificación.



INTRODUCCIÓN

Durante el procesado de frutos se liberan grandes cantidades de pectinas que pasan a los jugos. Las pectinas son polisacáridos de grados de ramificación y polimerización variable presentes en las células vegetales, son hidrocoloides negativos con alta tendencia a mantenerse en suspensión por largos periodos de tiempo y presentan gran capacidad de retención de agua, por ello contribuyen a la turbidez y viscosidad de los néctares, zumos y jugos e impiden la adecuada clarificación y filtración de estos productos (González *et al*, sf).

Existen enzimas empleadas en el procesamiento de vegetales, como son las pectinasas o enzimas pécticas que son un complejo formado por varias enzimas, presentes en diversas proporciones, capaces de actuar sobre las pectinas y sus derivados (Carrera, 2003).

En los extractos de pectinasas usados para la fabricación de jugos coexisten 3 enzimas: la pectinliasa (PL), la poligalacturonasa (PG) y la pectinesterasa (PE), las cuales son enzimas endógenas ya que están presentes en los alimentos, se obtienen directamente del fruto y son las responsables de los cambios de descomposición de los mismos como maduración de las frutas y el ablandamiento de las mismas (Rivas, 2010). La PL actúa sobre la pectina rompiendo los enlaces glucosídicos próximo a un grupo metil-éster, se encuentra esencialmente en el zumo de las frutas o vegetales; su función es la degradación de las pectinas. La PE libera metanol de los grupos carboxilos esterificados y transforman la pectina de bajo metóxilo y pectato. Por último la PG, que hidroliza los enlaces glucosídicos próximos a un grupo carboxilo libre (Whitaker, 1994).

La clarificación es una etapa muy importante dentro del procesamiento de jugos, pues con ella se eliminan los problemas de turbidez y viscosidad que en estos se generan. Además mediante la clarificación con enzimas pécticas pueden reducirse los inconvenientes causados por las pectinas en la extracción y prensado de la fruta lo que origina grandes pérdidas económicas en las industrias de elaboración de jugos; estas enzimas pueden incluso mejorar la calidad sensorial y la estabilidad de los productos acabados (Castino *et al*, 1990; Berta, 1991) citado por (González *et al*, sf).



En esta investigación se estudiará el efecto de las enzimas pectinolíticas sobre la clarificación de jugo de parchita, siendo seleccionada esta fruta en base a una investigación previa desarrollada por Rubín y Meijide, (2011).

La parchita, *Passiflora edulis*, es una fruta originaria de América Tropical, que se cultiva desde el norte de Argentina hasta México. Colombia es uno de los más importantes productores de fruta a nivel mundial, junto con Venezuela, Suráfrica, Kenya y Australia. En Perú, la parchita es la pasiflorácea de mayor demanda en el mercado doméstico; en 1994 se registraron 954 hectáreas sembradas, principalmente en los departamentos de Cajamarca y La Libertad (Passifloras, 2011).

Para esta investigación, se planteó la obtención de un jugo clarificado de frutas, empleando un concentrado enzimático de guayaba y papaya. Con la finalidad de alcanzar los objetivos propuestos, se procedió a obtener dos concentrados de enzimas pécticas, extraídos de guayaba y papaya. Se midió la actividad enzimática de cada uno, realizando un mejoramiento del método de pH estático propuesto por Argaiiz en 1996. Posteriormente, se empleó un diseño experimental para determinar la eficacia de los concentrados, utilizando el jugo de *Passiflora Edulis f. flavicarpa*, comúnmente conocida como Parchita o Maracuyá; para lo cual fue necesario analizar los cambios ocurridos al jugo antes y después de la adición del concentrado enzimático. Luego, partiendo del diseño experimental obtenido, se empleó una evaluación sensorial preliminar con el fin de obtener la formulación del jugo que se encuentre dentro de los estándares de la normas COVENIN 1031-81 y Codex Alimentarius (CODEX STAN 247-2005). Después de esto, para conocer las expectativas de aceptabilidad por parte del consumidor, se realizó una evaluación sensorial hedónica al jugo formulado, estudiando las diferencias con y sin adición del concentrado enzimático. Finalmente, se muestran los costos de obtención del jugo clarificado a nivel de laboratorio.



CAPITULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A continuación se muestra en forma detallada el planteamiento del problema, así como su formulación, justificación y objetivos planteados para llevar a cabo esta investigación.

3.1 Descripción del problema

Las enzimas son catalizadores biológicos, es decir proteínas que contienen la capacidad de acelerar ciertas reacciones químicas que se llevan a cabo en los seres vivos. Estas son productos de las células y por lo tanto pueden obtenerse a partir de tejidos animales, vegetales o mediante procesos de fermentación. El Centro de Investigaciones Químicas (C.I.Q.), de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, bajo el amparo de la línea de investigación de Biotecnología Industrial, debido a la creciente evolución de esta disciplina, se ha encargado los últimos años en profundizar los estudios de su temática: Producción de Enzimas; donde se han propuesto y logrado metodologías para la extracción de enzimas en frutas de procedencia nacional, y se desea continuar profundizando el estudio del uso de dichas enzimas para la clarificación de jugos.

Existen enzimas empleadas en el procesamiento de vegetales, como son las pectinasas o enzimas pécticas que son un complejo formado por varias enzimas, presentes en diversas proporciones, capaces de actuar sobre pectinas y sus derivados (Carrera, 2003).

En los extractos de pectinasas usados para la fabricación de jugos coexisten 3 enzimas: la pectinliasa (PL), la poligalacturonasa (PG) y la pectinesterasa (PE), las cuales son enzimas endógenas ya que están presentes en los alimentos, se obtienen directamente del fruto y son las responsables de los cambios de descomposición de los mismos como maduración de las frutas y el ablandamiento de las mismas. Estas tres enzimas en combinación hidrolizan la pectina, que es un polisacárido constituido principalmente por ácido galacturónico que se encuentra parcialmente metoxilado (Rivas, 2010).

De tal manera que la PL actúa sobre la pectina rompiendo los enlaces glucosídicos próximo a un grupo metil-éster, se encuentra esencialmente en el zumo de las frutas o vegetales; su función es la degradación de las pectinas. La PE libera metanol de los grupos carboxilos



esterificados y transforman la pectina de bajo metóxilo y pectato. Por último la PG, que hidroliza los enlaces glucosídicos próximos a un grupo carboxilo libre (Whitaker, 1994).

Las enzimas son aplicadas en su mayoría en industrias alimenticias, gracias a que son más las ventajas que presentan los métodos que las utilizan, como se puede apreciar en la tabla 1.1:

Tabla 1.1 Uso industrial de las enzimas

INDUSTRIA	ENZIMAS	USOS
Bebidas no alcohólicas	Pectinasas Glucosa-isomerasa Tannasa Glucosa-oxidasa	Mejoran la clarificación de jugos. Conversión de la glucosa en fructosa. Aumenta la solubilidad y disminuye la turbidez del té. Evita el oscurecimiento y los sabores desagradables.
Cárnicas	Papaína, Fiscina Bromelina	Ablandamiento de carnes. Producción de hidrolizados.
Panificación	Amilasa Proteasa Lipoxidasa Lactasa	Mejora la calidad del pan. Disminuye la viscosidad de la pasta. Produce una miga muy blanca Mejora la coloración de la superficie.
Cervecería	Amilasas Papaína, Pepsina	Usadas para licuar la pasta de malta. Evitan la turbidez durante la conservación de ciertos productos.
Vinificación	Pectinasas Glucosa-oxidasa	Mejoran la clarificación y extracción de jugos. Evitan el oscurecimiento y los sabores desagradables.
Láctea	Tripsina. Lactasa	Enmascara el gusto a óxido. Fabricación de leche deslactosada, evita la cristalización de leche concentrada.

Fuente: León y Rosero (2009).



Las enzimas pécticas inicialmente se utilizaron para la clarificación de jugo de manzana. En la actualidad se utilizan para el procesamiento de muchas otras frutas. Durante la extracción de jugos, cuando se desintegran los tejidos vegetales, una parte de la pectina pasa a la solución, una se satura con el jugo y otra se queda en las paredes celulares. Las enzimas pécticas se utilizan para facilitar el prensado, la extracción del jugo y la clarificación ayudando a la separación del precipitado floculante (Rivas, 2010). Obteniendo así un jugo clarificado, el cual, es un líquido no diluido, no concentrado ni fermentado, obtenido al procesar algunas clases de frutas frescas, sanas, maduras y limpias, al cual se le ha eliminado la turbidez (León y Rosero 2009).

La clarificación es una etapa importante en el procesamiento de jugos de frutas y también se puede realizar mediante el proceso de filtración por membranas, que posee muchas ventajas sobre los procesos tradicionales, este incluye la producción de un jugo clarificado con retención de enzimas dependiendo del tamaño de poro de la membrana. La filtración por membrana puede también ser continua y automatizada. Además no requiere la adición o remoción de los agentes clarificantes (Girard y Fukumoto, 2000). A pesar de tener tantas ventajas sobre las propiedades finales de los jugos, las membranas resultan muy costosas, generando un incremento en los costos para la producción y en el producto final.

En cuanto a las desventajas, son las inherentes a los fenómenos de polarización por concentración y de ensuciamiento de la membrana que provocan largos ciclos de limpieza y pueden ocasionar la reducción de la vida útil de la membrana. Además, es interesante destacar que los procesos convencionales de separación con membranas generalmente son poco selectivos (Barriuso, 2007).

La presencia de sustancias pécticas (fundamentalmente pectinas) en el zumo de frutas, origina importantes problemas en su procesamiento industrial. Ello se debe a que, por su escasa solubilidad, retienen el jugo espesándolo y disminuyendo el rendimiento de la extracción. Para evitar este problema, las industrias dedicadas al procesamiento de jugos de frutas utilizan enzimas pectinolíticas (Yegres, *et. al.*, 2001).

Los jugos clarificados producidos en Venezuela se obtienen mediante la aplicación de técnicas de filtración por membranas o ultrafiltración, que a pesar de ser un procedimiento



novedoso, vigente y capaz de mantener la calidad del producto, requiere de mucha cautela y supervisión en las condiciones ambientales lo que hace una opción costosa; anudado a esto los altos precios asociados a la adquisición de las membranas, generan incrementos en el producto final, lo que resulta inaccesible para un grupo de consumidores que no pueden disfrutar de las bondades del producto.

La empresa “Del Monte Andina C.A.”, fabrica un jugo de manzana 100% clarificado elaborado y envasado en una planta venezolana, a diferencia de los que actualmente están en el mercado, que son importados. El concentrado, libre de pulpa, se extrae directamente de la fruta luego de un proceso de filtración para la clarificación (www.delmonte.com.ve).

Dado que el país cuenta con una alta producción de frutas que contienen enzimas pécticas, el estudio de la extracción de enzimas por medios alternos, se fortalece, buscando que el mismo sea de alta calidad y de elevada competitividad dentro de los estándares exigidos por la industria de alimentos, en específico en la producción de jugos (Rubín y Meijide, 2011).

Se propone el estudio del concentrado de enzimas pécticas, extraído de frutas tropicales como la guayaba y la papaya, obtenido de una investigación previa; este se utilizará para la preparación de un jugo clarificado, es decir con menor viscosidad, mayor brillo, mejor apariencia y que además aporte beneficios a la salud de los consumidores, efectuando las técnicas que promuevan el avance de este proceso.

Con esta investigación, también se desea proporcionar un nuevo aporte al C.I.Q. para continuar con su evolución y seguir abriendo caminos factibles, que sirvan de base y apoyo para futuras investigaciones en el amplio uso de las enzimas, y así disminuir los costos de operación y producción de jugos clarificados en el país, empleando la biotecnología.

3.2 Formulación del problema

La línea de investigación de Biotecnología Industrial del C.I.Q. de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, en su área de Producción de Enzimas, cuenta con la obtención de un concentrado enzimático extraído de frutas de origen nacional, desarrollado en investigaciones anteriores. El cual se desea emplear para la elaboración de un jugo clarificado; brindando con este estudio un nuevo aporte al C.I.Q. para continuar con su



evolución y que este proyecto sirva de base y apoyo para futuras investigaciones en el área. Debido a que el país no cuenta con la producción de jugos clarificados mediante el uso de enzimas extraídas de forma natural, empleando la biotecnología; esta investigación promete contribuir con ése desarrollo tecnológico para el futuro.

3.2.1 Situación actual

La línea de investigación de Biotecnología Industrial, perteneciente al C.I.Q. de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, ha logrado metodologías para la extracción de enzimas pécticas en frutas y desea profundizar la investigación en el uso de dichas enzimas para la clarificación de jugos.

3.2.2 Situación deseada

Se desea implementar un método para obtener un jugo de frutas de fuente nacional, clarificado, es decir, con una apariencia más homogénea, de sabor agradable; empleando un concentrado enzimático de guayaba y papaya, extraído de forma natural y que además aporte beneficios a la salud de los consumidores. Brindando con este estudio un nuevo aporte al C.I.Q. para continuar con su evolución y que este sirva de base y apoyo para futuras investigaciones en el uso de las enzimas, y así disminuir los costos de operación y mejorar la tecnología aplicada en producción de jugos clarificados en el país, empleando la biotecnología.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo general

Preparar un jugo clarificado de frutas utilizando un concentrado enzimático de guayaba y papaya.



3.3.2 Objetivos específicos

1. Obtener un concentrado enzimático a nivel de laboratorio utilizando guayaba y papaya.
2. Mejorar el método de pH estático para la determinación de la actividad enzimática.
3. Determinar la eficacia del concentrado enzimático en jugos de frutas, mediante un diseño experimental.
4. Formular un jugo de frutas clarificado a partir del concentrado enzimático preparado.
5. Evaluar las características sensoriales del jugo clarificado de frutas.
6. Determinar los costos asociados a la extracción del concentrado así como de la elaboración del jugo preparado.

3.4 Justificación

Las empresas de jugos de frutas desarrollan cada vez más principios en sus procesos para incrementar la conservación de las características sensoriales y nutricionales de la materia prima, así como una producción con un rendimiento para satisfacer los requerimientos del consumidor en lo referente a productos saludables, de buen sabor y a precios accesibles.

La obtención de un jugo de frutas de fuente nacional clarificado utilizando un concentrado de enzimas pécicas de guayaba y papaya, es la base que argumenta principalmente esta investigación, con esto se proporcionará un método efectivo para obtener un producto sin turbidez y de agradable sabor, que además se encuentre dentro de los patrones requeridos.

En el ámbito ecológico, es de gran importancia pues al aplicar esta técnica se minimiza el impacto ambiental, ya que la forma de obtención es de manera natural y los desechos que se generarían son vegetales.

A nivel social, se puede brindar un producto nacional a un costo accesible con beneficios para la salud de los consumidores, gracias a las propiedades de la parchita. Sus hojas y sus flores tiernas o secas tienen propiedades calmantes, por lo que sus infusiones son muy utilizadas para controlar la excitación nerviosa, los estados depresivos, el insomnio, la



neurastenia y el histerismo. También se usa en casos de hipertensión. El jugo de la parchita tiene bajo contenido de pectina (0,24 g/ 100 ml), taninos (36,6 g/ 100 ml) y almidón (0,41 g/ 100 ml); posee un buen contenido de azúcares totales de los cuales la mayoría son reductores. El jugo de la parchita es una fuente importante de potasio (5.500 mg/ 100 g) y de hierro (10,8 mg/100 g). Los contenidos de niacina (3,23 mg/ 100 g), riboflavina (0,09 mg/ 100 g) y ácido ascórbico (24 mg/100 g).

Con esta investigación, se proyecta brindar una metodología para la obtención de un jugo clarificado con el concentrado de enzimas pécticas, que fortalezca los conocimientos teóricos y tecnológicos de la Ingeniería Química. En lo particular, se aspira aportar un avance significativo a la línea de Biotecnología Industrial del C.I.Q., de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, específicamente útil para futuras investigaciones que permitan lograr disminuir los costos de operación y producción de jugos clarificados en el país, empleando la biotecnología.

3.5 Limitaciones

Durante la realización de este trabajo podrían presentarse algunas limitaciones como:

- El período de cosechas de las frutas, ya que su recolección se da en ciertas temporadas; incrementando los costos en el mercado en época de escases.
- Falta de acceso a investigaciones anteriores, puesto que en el país, los métodos de clarificación de jugos que utilizan extracción enzimática natural, han sido poco empleados.
- Disponibilidad de reactivos y equipos para llevar a cabo la realización de los objetivos planteados.



CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

Seguidamente se presentan investigaciones realizadas anteriormente junto con aspectos teóricos que fundamentan la presente investigación.

4.1 Antecedentes

Norjana y Noor (2011) trataron el Jugo de Durian con la enzima pectinasa a diferentes concentraciones las cuales fueron 0; 0,025; 0,05; 0,075 y 0,1% en un tiempo de incubación de 1 a 3 horas. Se investigaron los efectos del tratamiento de enzimas diferentes y la duración de incubación de varios parámetros (por ejemplo, el rendimiento de jugo, pH, sólidos solubles totales, viscosidad, color y sensorial evaluación). El jugo resultó ser de color amarillo claro de manera similar a la leche de soja. De acuerdo a los resultados obtenidos se observó un incremento del 35% en el rendimiento del jugo cuando se utilizó la enzima pectinasa, aquí la disminución de los grados Brix fue significativamente mayor y significativo la disminución de la viscosidad y los valores de tono. Los resultados de la evaluación sensorial mostraron que el jugo tratado con la concentración de enzima a 0,05% y 3 como tiempo de incubación fue el preferido por los panelistas. Este trabajo es de gran importancia para el desarrollo de la presente investigación, pues co éste se tiene una diferencia para establecer comparaciones entre los resultados obtenidos.

Por otro lado, Meijide y Rubín (2011), brindan una metodología importante para la extracción de un concentrado de enzimas pécticas y su posterior utilización en la clarificación de jugos. Ellos obtuvieron un concentrado enzimático de guayaba y papaya. Realizaron la extracción enzimática empleando cloruro de sodio y se determinó la actividad enzimática aplicando la metodología expuesta por Argáiz (1996). El extracto enzimático obtenido, se empleó como clarificante en jugos de parchita y uva. Para realizar la determinación de la eficacia de los concentrados de pectinasas, a pH y viscosidad, además de una encuesta hedónica para el suministro de información del nivel de agradabilidad respecto a la apreciación sensorial (Brillo, Aroma, textura) en los jugos previo y post la adición del extracto. Del trabajo en mención, surge la presente investigación, tomando en



cuenta las recomendaciones planteadas en la extracción del concentrado enzimático y con la diferencia de profundizar más en el aspecto de clarificación.

No obstante, en el trabajo realizado por Nicemol, *et. al.* (2008) se empleó una metodología de superficie de respuesta (RSM) para establecer las condiciones óptimas para la clarificación enzimática de jugo de zapote. La poligalacturonasa obtenida del *Streptomyces lydicus* había sido purificada y se utilizó para el tratamiento. Las variables independientes fueron la temperatura entre 30 y 45 °C, concentración de la enzima de 0,5 a 1,5 U, y el tiempo de tratamiento entre 30 y 90 min, cuyos efectos sobre la viscosidad y claridad de los jugos fueron evaluados utilizando un diseño de Box-Behnken. Los modelos de regresión significativa que describen los cambios de viscosidad y claridad con respecto a las variables independientes se obtuvieron con el coeficiente de determinación, R^2 superior a 0,8. Sobre la base de superficies de respuesta y trazados de contorno, las condiciones óptimas para aclarar el jugo de níspero fueron concentración de la enzima 1,15 U, la temperatura de incubación de 34 grados °C, y tiempo de incubación 70 min. Esta investigación presenta como objetivo principal la clarificación de jugos de frutas, para ello se utilizó una enzima péctica extraída de manera natural de cierto microorganismo; lo que hace que tenga semejanza con el trabajo de investigación; diferenciándose en que el concentrado de pectinasas que se pretende lograr, será extraído de frutas como la guayaba y papaya, y de igual manera aplicarlo para la clarificación de un jugo de frutas.

Por otra parte, Flores (2004) sometió el jugo de maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) a un proceso térmico de pasteurización cuyo objetivo fue maximizar la retención de características sensoriales (color y sabor). Las cinéticas de la inactivación de la pectinesterasa, degradación de ácido ascórbico, cambio de sabor fueron de primer orden y la cinética de degradación de color de orden cero; se obtuvieron los valores D y z para cada parámetro evaluado. Para la inactivación de la pectinesterasa el valor $z = 42.2^\circ \text{C}$, la degradación de ácido ascórbico $z = 61.58^\circ \text{C}$, tiempo inactivación térmica de la pectinesterasa $z = 34.20^\circ \text{C}$ y el cambio de sabor $z = 48.92^\circ \text{C}$. A partir de los parámetros evaluados, se encontró el proceso óptimo de pasteurización el cual fue de 14 min a 90°C . Posteriormente se formuló la bebida funcional de maracuyá con la adición de fibra dietética



soluble: inulina y oligofruktosa y se evaluó su degradación por tratamiento térmico aplicando el baremo seleccionado: 14 min a 90° C. La degradación de la fibra dietética soluble fue mayor en la oligofruktosa (33.96 %) que en la inulina (23.55 %) debido a la alta acidez de jugo y a la aplicación del tratamiento térmico. En relación a nuestro trabajo tiene gran importancia, pues se obtuvo una bebida de frutas y se observaron los cambios cuando se le aplicaba un tratamiento térmico con la enzima pectinesterasa, luego de esto se realizó la formulación de la bebida y se evaluaron las características sensoriales de la misma, los cuales suministran información necesaria que sirve como base para el desarrollo de nuestra investigación, ya que la misma presenta objetivos similares.

En contraste, Gómez (2004) estudió la dependencia en la temperatura de los cambios en atributos sensoriales, degradación de ácido ascórbico e inactivación enzimática durante el tratamiento de pasteurización en puré y néctar de tamarindo. La cinética de la degradación de la vitamina C no fue posible realizarse, debido a su baja concentración presente en la fruta. Respecto a la inactivación enzimática, pudo obtener que a mayor temperatura de tratamiento, menor es el tiempo necesario para inactivar la enzima pectinesterasa, sin producir cambios de sabor y color. A pesar de no estar relacionado directamente con la investigación, este aporte ofrece una referencia importante; ya que en él se empleó la metodología del pH estático de Argaiz, obteniendo un valor de 0,083 y 0,040 UPE para la actividad enzimática del puré y néctar de tamarindo, respectivamente.

Así mismo, Pinto y Lescano (2002) estudiaron el efecto sobre la turbidez de diez variables que controlan el proceso de clarificación por flotación en el jugo de manzana, usando técnicas estadísticas de diseño experimental. Los resultados de un diseño de diagnóstico por medio de un arreglo factorial fraccionado $2 \cdot 10^{-5}$, indicaron que las más relevantes son la concentración de gelatina y el tiempo medio de retención en el floculador. Con la metodología de superficie de respuesta, obtuvieron una ecuación cuadrática que ajustó la turbidez del jugo claro en función de estas dos variables. Además se estimó el que podría ser el mejor valor de turbidez (177,3 NTU), siendo el mínimo de una superficie que semeja una sección de paraboloides, a una concentración de gelatina de $16,5 \times 10^{-2} \text{ Kg/m}^3$ (16,5 g/Hl) y a un tiempo medio de retención en el floculador de $10,68 \times 10^2 \text{ s}$ (17,8 min). La congelación del jugo turbio y elementos de bronce en el equipo de flotación fueron factores



no considerados en el diseño experimental y que no habrían permitido alcanzar un nivel óptimo de turbidez y clarificación del jugo de manzana. Tiene cierta semejanza con la presente investigación, ya que se pretende estudiar el cambio de la turbidez en el proceso de clarificación de jugos aplicando técnicas de diseño experimental.

También, Minguez, *et al.* (2002), estudiaron los cambios en la actividad enzimática y la composición de enzimas presentes en los frutos de oliva (variedad hojiblanca) durante la maduración, así como los cambios en la textura de las mismas, como variables que pueden afectar en proceso de producción de aceite de oliva virgen. Para ello estudiaron el efecto de la pectinesterasa (PE), en esta se pudo observar que la actividad aumentó con la madurez hasta llegar a un pico, cuando la síntesis de la fruta se convirtió en marca (girando la etapa del color) se redujo. Por el contrario cuando se estudió el efecto de la poligalacturonasa (PG) la actividad en la fruta madura y verde disminuyó drásticamente (etapa de pequeños puntos rojos) y luego aumentó, alcanzando un máximo en la fruta madura y negro, luego se observaron cambios paralelos en la textura de las aceitunas relacionados a las actividades enzimáticas de endo-y exo-PG, junto con una disminución en el grado de esterificación de la materia péctica, que podría estar asociada con la acción física. La distribución de las fracciones pécticas en la materia prima y los cambios durante el proceso de extracción del aceite de oliva mostró el papel de la acción física PG en los frutos que se relaciona con la producción de aceite extraído. Como se dijo anteriormente estudiaron el efecto de enzimas como la pectinesterasa en frutos de oliva, a través de la determinación de la actividad catalítica de la misma; en el presente trabajo se procederá de manera similar solo que para la determinación de la actividad enzimática de la guayaba y papaya.

Asimismo, Narvaez *et al.* (2006) determinó la actividad de la enzima poligalacturonasa extraída de la corteza de la pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). Para la extracción se empleó un *buffer* fosfato de sodio 20 mM pH 5,0 con NaCl 0,5 M a una temperatura de 40°C, dado que se concluyó que es el sistema más efectivo para la extracción, obteniendo los siguientes resultados óptimos de la constante aparente de Michaelis-Menten y la velocidad máxima para esta enzima fue de 2,9 unidades de ácido poligalacturónico/mL y



0,076 nmol de azúcares reductores/s, respectivamente, indicando así la presencia de poligalacturonasa en el fruto, siendo una de las causas del ablandamiento de este fruto.

Mejia-Cordova (2001) empleó el chile jalapeño para realizar un extracto enzimático de pectinesterasa, a fin de estudiar la estabilidad térmica y observar las condiciones de inactivación de las pectinesterasa. El experimento siguió la metodología propuesta por Mejia-Cordova: se preparó un extracto de chile jalapeño empleando como solvente para la extracción NaCl, luego se realizó una diálisis para eliminar el NaCl del extracto y se sometieron a temperaturas de 55 °C a 95 °C durante distintos tiempos de 5 min a 60 min, por lo que se concluyó que la mejor concentración de NaCl para la extracción enzimática fue de 2,0 M a 2,5 M y a temperaturas de 85°C a 95°C, ocurre un 95% de disminución de la actividad enzimática.

Por otro lado, Soriano (2004), realizó análisis en sistemas pectinolíticos bacterianos, por medio del aislamiento y caracterización de las pectinasas pela de *Paenibacillus* sp. BP-23 de YypA de *Bacillus subtilis*. Se ha caracterizado la producción de enzimas degradadores de pectina por *Paenibacillus* sp. B-23. La máxima producción y secreción de pectinasas tiene lugar en medios suplementados con pectina, ejerciendo este polisacárido un notable efecto inductor. Por el contrario, la producción de pectinasas en *Paenibacillus* sp. BP-23 está reprimida por glucosa, además la producción y secreción de pectinasas por la cepa *Bacillus* sp. BP-7 ha sido caracterizada. Los niveles absolutos de actividad obtenidos fueron notablemente inferiores a los mostrados por *Paenibacillus* sp. BP-23. La producción de pectinasas por *Bacillus* sp. BP-7 esta inducida por pectina y no representa represión por glucosa.

De la misma manera, (Méndez, 2006) comparó la eficacia del uso de tres niveles de enzima clarificante pectinasa y el clarificante Poly lact en el proceso de estabilización de vino de naranja y su comparación con un vino comercial elaborado a nivel artesanal. El estudio se realizó de agosto a septiembre de 2006 en la Planta Agroindustrial de Investigación y Desarrollo y en el Centro de Evaluación de Alimentos de Zamorano. Se utilizaron 450 naranjas dulces variedad Valencia. El diseño experimental que se usó fue de bloques completos al azar (BCA), cada muestra se analizó por triplicado. Se usó la enzima pectinasa en tres



concentraciones 0.01%, 0.02% y 0.03% y agente clarificante Poly lact en una sola concentración (1.8 g /6 L). Se realizó un análisis sensorial para evaluar los atributos de color, aroma, sabor, sabor residual y aceptación general. Se realizaron análisis de turbidez usando espectrofotometría y análisis de claridad y color con el Colorflex Hunter Lab. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los análisis físicos de claridad, color y turbidez. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) para los atributos sensoriales de aroma, sabor, sabor residual y apariencia general entre los tratamientos pero sí entre estos y el vino comercial. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) para el atributo sensorial de color entre los tratamientos y el control y el vino comercial. Se concluye que el uso combinado de la enzima pectinasa y Poly lact es beneficioso para el proceso de estabilización de vino de naranja.

En contraste, (Da Silva *et al.*, 2004) estudiaron el método de ultrafiltración, utilizando membranas sintéticas de polisulfonas, con el fin de concentrar pectinasas obtenidas por un proceso de fermentación inmerso. Los caldos pectinolíticos producidos por *Aspergillus oryzae* CCT 3940 fueron sometidos a ultrafiltración en un sistema tangencial con membranas de peso molecular medio entre 10.000 y 30.000 g/mol. También fue evaluado el efecto de la adición de solución acuosa de NaCl, entre 1,0 y $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹, sobre el caldo enzimático, con la finalidad de aumentar la selectividad de las membranas. Considerando la actividad enzimática y el contenido proteínico de los fermentados, las membranas polisulfónicas de 10.000 g/mol mostraron mayor selectividad, observándose un efecto favorable de la solución acuosa de NaCl, a partir de concentraciones de $1,5 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹. Estos resultados parecen estar relacionados con la distribución del peso molecular de las proteínas con los poros de las membranas. A diferencia de la presente investigación utilizaron el método de ultrafiltración para concentrar enzimas pécticas, mientras que en esta se extrajeron las mismas enzimas para la clarificación de jugos, sin embargo brindan importante información sobre las enzimas pécticas y la microfiltración que sirve para sustentar el desarrollo de este trabajo.

Por otro lado, Yegres *et al.* (2001) estudiaron la posibilidad de desarrollar un proceso de producción de enzimas pécticas, vía artificial empleando un método de fermentación a partir de la utilización del microorganismo *Aspergillus niger* CH₄ en la cáscara de mazorca de cacao como materia prima, el estudio de fermentación se realizó en medio sólido y bajo parámetros experimentales predeterminados, en fermentadores de 500 mL con 30 g de



cáscaras (peso húmedo), dichos parámetros fueron: tamaño de partícula 16mesh, 30°C, pH 4,8 y 70% de humedad. Los extractos brutos recuperados a las 48 h por prensado (6 toneladas/cm²) del cultivo sólido (medio + micelio), y con una actividad de 0,19 UI/mL de proteínas. Dicho estudio expuso que las cáscaras de cacao sin adición de nutrientes forman un medio de cultivo adecuado para la producción de pectinasas a partir del hongo *Aspergillus Níger* CH₄.

(Menéndez et al.; 2006) evaluaron la producción de CO₂ y el desarrollo del color como indicadores de la maduración, así como la actividad de α -amilasa, poligalacturonasa (PG) y pectinmetilesterasa (PME), con relación a la presencia de diversos componentes responsables del sabor agridulce (sólidos solubles, azúcares, ácidos orgánicos y pH) característico del maracuyá. Los resultados mostraron que la maduración continuó después de su separación de la planta en la semana 8 DA (después de la antesis). La actividad de la α -amilasa y PG se elevó en la semana 9 DA y la de PG se incrementó nuevamente al final del desarrollo del fruto. La actividad de la PME también presentó dos valores máximos en las semanas 8 y 11 DA. El incremento en conjunto de las actividades de las enzimas indica el cambio de color y elevación de la producción de CO₂, que generan un incremento en los azúcares y ácidos orgánicos, alguno de los cuales pueden ser responsables del sabor característico del maracuyá. Tiene cierta semejanza con la presente investigación ya que se estudia el efecto de las enzimas pécticas sobre la parchita o maracuyá así como sus actividades.

En contraste, Dueñas *et al.* (2008) basó sus investigaciones en la búsqueda de condiciones de extracción para el aumento de la actividad de las enzimas responsables del ablandamiento excesivo de la pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*), como la celulasa y la xilanasas, pectinasas dicha búsqueda resultó en que el mejor sistema de extracción fue el buffer fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,0, al realizar las mediciones de actividad enzimática para la celulasa fue necesario incubar durante 60 min a 37 °C, con un volumen de extracto enzimático crudo de 30 μ L, empleando buffer acetato 100 mM a pH 5,0; los valores de constante aparente de MichaelisMenten y velocidades máxima fueron 0,279 mg/mL y 0,00014 nmol glucosa/min, respectivamente. Para determinar la actividad de



xilanasa se establecieron 15 min de tiempo de incubación, a 50 °C, empleando 30 μ L de extracto enzimático crudo a pH 4,0 (buffer acetato 100 mM); los valores de la constante aparente de Michaelis Menten y velocidad máxima para xilanasa fueron 0,073 mg/mL y 0,0011 nmol glucosa/min, respectivamente.

Igualmente (Flórez *et al.*, s.f) cuantificaron y caracterizaron histológica y morfológicamente las partes del fruto de maracuyá. Luego se purificaron las paredes celulares de la pulpa, como materia insoluble alcohol (MIA), a este le analizaron químicamente los principales compuestos y de acuerdo con estos resultados seleccionaron 12 actividades enzimáticas que se seleccionaron en 21 enzimas comerciales y cuyo efecto se estudió sobre la MIA y la pulpa. Con respecto a lo anterior y con la metodología aplicada, lograron obtener un conocimiento biológico y químico del maracuyá mucho más completo, además lograron incrementar apreciablemente la licuefacción de los polisacáridos presentes. Este trabajo brinda beneficiosos aportes a la presente investigación, pues aunque la metodología no se asemeja se estudia el efecto de las enzimas en los compuestos de la parchita y ofrece importante información acerca de la fruta antes mencionada.

También (Robles, *s.f.*) seleccionaron y caracterizaron un determinado estado de madurez de la berenjena y determinar el efecto enzima poligalacturonasa (PG) sobre la pulpa para obtener el mayor rendimiento de zumo, el cual fue caracterizado física química, microbiológica y sensorialmente durante el almacenamiento. Evaluaron cinco estados de madurez de la berenjena (*Solanum melangena*) que comprendió de verde hasta maduro, seleccionándose el fruto maduro, el cual fue utilizado para el tratamiento enzimático y la obtención de zumo. Este estado presentó un índice de madurez de 6,0 con un contenido de humedad de 92,78 por ciento, carbohidratos 4,2 por ciento y proteínas 1,74 por ciento. La actividad de la PG fue de 292 U/ml a 30°C y pH 5,0 utilizando el método iodimétrico. El mejor resultado se obtuvo al hidrolizar la pulpa con 0,03 por ciento de PG a 50°C/90 min, con el cual se logró un rendimiento de 83,39 por ciento después del prensado y 78,86 por ciento después del centrifugado, en base a la pulpa acondicionada. El zumo fue almacenado en frascos de vidrio transparente de 180 ml por 60 días a temperatura ambiente y



refrigeración, seleccionándose como más estable los zumos almacenados a refrigeración (4 °C), caracterizándose sensorialmente como bueno, en los atributos sabor y aroma y presentando un color amarillo claro; en este trabajo a pesar de no trabajarse con la enzima pectinesterasa, brinda una metodología e información importante para la determinación de la poligalacturonasa así como su actividad y los resultados sirven para comparar la eficacia de ambas enzimas en la clarificación de jugos y sumos.

Finalmente, Cancino, *et al.* (sf) clarificaron jugo de uva mediante el uso de microfiltración. Para ello se emplearon una membrana de cerámica multitubular de 0.2 μm , con un área de filtración de 0,001220473 m^2 y jugo de uva comercial. Los resultados obtenidos mostraron la efectividad de dicho proceso, lográndose una reducción en la turbidez en un 99.3%, manteniendo constantes el contenido de azúcar (medido en grados Brix), pH y conductividad en el jugo antes y luego del proceso. Por otro lado, el producto clarificado presentó un aumento en los parámetros de color como son, L^* , a^* y b^* , en comparación a los del jugo inicial, lo que indica que la utilización de una membrana de cerámica es efectiva en un proceso de clarificación, logrando separar y retener moléculas de gran tamaño responsables de los altos valores de turbidez y precipitados en el jugo durante su almacenamiento. Este trabajo presenta información importante para el desarrollo de la investigación, pues se realizó la clarificación de un jugo utilizando microfiltración, mientras que en este caso se realizará la clarificación de manera natural utilizando enzimas pécticas; analizando estos dos tipos de clarificación se pueden establecer diferencias y semejanzas en cuanto a los parámetros involucrados en la clarificación del mismo.

4.2 Bases teóricas

4.2.1 La parchita

4.2.1.1 Origen

El maracuyá amarillo, *Passiflora edulis*, también llamado fruta de la pasión, es originario del trapecio amazónico, especialmente de Brasil, que es el mayor productor mundial. La fruta se caracteriza por su intenso sabor y su alta acidez, razones por las cuales se utiliza como base para preparar bebidas industrializadas. La variedad dulce, *passiflora alata*, puede llegar a posicionarse en el mercado de frutas frescas exóticas, compitiendo con



productos tales como la granadilla (*passiflora ligularis*) y el maracuyá morado de África Oriental, por tener una pulpa ligeramente ácida (15-25 Brix) y más azucarada. Esta variedad crece en forma silvestre desde el sur de Brasil hasta Perú y Ecuador, pero es fácilmente domesticable para uso comercial. Su producción tiene las mismas características que la del maracuyá amarillo, pero es más resistente a las enfermedades y genera mayores costos de mano de obra. La parchita es la única fruta que contiene un porcentaje de hidratos de carbono que va de 0.5 hasta 3, lo que en los jugos resulta un incremento en la viscosidad (Nagy, *et al.*, 1990) citado por (Bates y Morris, 2001).

El ciclo de crecimiento de la semilla de maracuyá toma de ocho a nueve meses. A partir del noveno mes comienza su período de cosecha, dependiendo del suelo y de las condiciones climáticas. La temperatura óptima es 26°C, pero se produce en un rango entre 21 y 32 °C. El maracuyá necesita más de ocho horas de luz diarias para empezar su florecimiento. En regiones tropicales y húmedas, el crecimiento de esta fruta es continuo, aunque se concentra en la mitad del año, mientras que en regiones tropicales el período de cosecha ocurre dos veces al año: la primera durante meses secos, con una producción baja, y la segunda durante los meses húmedos, con una producción alta. El maracuyá se exporta en estado fresco y procesado, especialmente como néctar, jalea, mermelada, jugo y concentrado. No obstante, la mayor proporción del comercio internacional se realiza con jugo o concentrado, en sus formas concentrado (50° Brix) y simple (14° Brix). Cabe resaltar que el jugo de maracuyá es el tercer jugo exótico en importancia, después de los jugos de mango y de piña (Corporación Colombia Internacional, s.f).

4.2.1.2 Generalidades

La parchita, *Passiflora edulis*, es una fruta originaria de América Tropical, que se cultiva desde el norte de Argentina hasta México (Leal, 1990). Colombia es uno de los más importantes productores de fruta a nivel mundial, junto con Venezuela, Suráfrica, Kenya y Australia. En Perú, la parchita es la pasiflorácea de mayor demanda en el mercado doméstico; en 1994 se registraron 954 ha sembradas, principalmente en los departamentos de Cajamarca y La Libertad.



La parchita es una de las frutas más procesadas y el jugo es muy consumido, su cultivo es muy popular sobre todo en las regiones tropicales (Nagy, *et al.*, 1990) citado por (Bates y Morris, 2001).

4.2.1.3 Composición

(Passifloras, 2011) dice que: la parchita está compuesta por el exocarpio o corteza dura (28,2%), el mesocarpio o corteza blanca y esponjosa (17,5%), el endocarpio o pulpa comestible (44,7%) y las semillas (8,7%) (figura 2.1). La fruta se considera de bajo rendimiento para consumo directo (las partes comestibles representan sólo 53,4% del peso total) y para la industria (que utiliza sólo el endocarpio). Comparado con el maracuyá (*Passiflora edulis*), se requieren 3 partes más de fruta para la preparación de la misma cantidad de jugo (Castro, 1997). El análisis proximal indica que la fruta posee un alto contenido de fibra y extracto no nitrogenado (E.N.N); la semilla es rica en proteína (Tabla 2.1). Aunque la densidad y el pH del jugo cambian según el índice de madurez de la fruta, los valores promedio son 1,067 y 4,6 g/ml, respectivamente; los ácidos encontrados en el jugo son: cítrico (10,8 meq/100 ml) y málico (0,5 meq/ 100 ml) (Sandoval *et al.*, 1985) citado por (Passifloras, 2011).

El jugo de la parchita tiene bajo contenido de pectina (0,24 g/ 100 ml), taninos (36,6 g/ 100 mL) y almidón (0,41 g/ 100 ml); posee un buen contenido de azúcares totales (13,07 g/ 100 mL) aunque cambia con el índice de madurez, de los cuales la mayoría son reductores (7,35 g/ 100 mL). El jugo no es apto para la producción de bebidas fermentadas con un contenido alcohólico mayor del 8% (Sandoval *et al.* 1985). La fructosa es el azúcar en mayor proporción en el jugo (5 %), seguido por la sacarosa (2,6 %) y la k-glucosa (2,5 %). Según Góngora-López y Young-López (1956), citados por Leal (1990), 100 g de parchita comestible poseen 46 calorías (Passifloras, 2011).

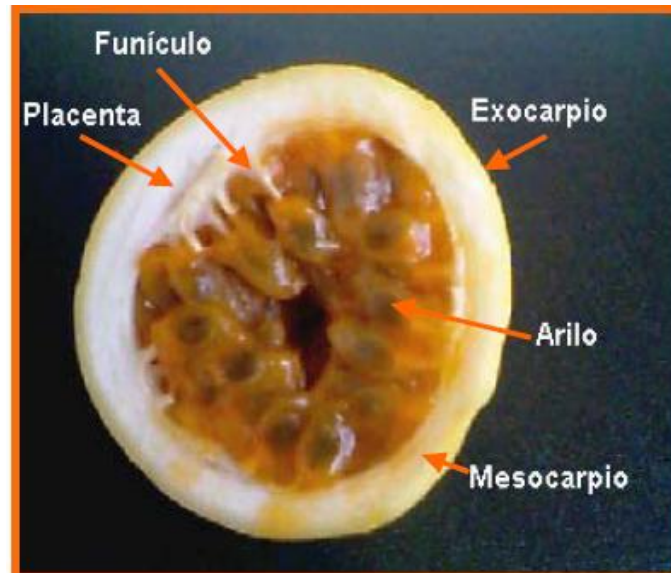


Figura 2.1 Partes del fruto de la parchita

Fuente: (Flores *et al.*, s.f)

Tabla 2.1 Análisis proximal del fruto de la parchita (%)

	Cáscara	Arilo	Semilla	Jugo
Humedad	13,90	4,22	10,73	82,74
Extracto etéreo	0,35	1,48	7,74	
Fibra bruta	48,41	15,96	34,57	
Proteína	3,79	4,63	15,22	1,09
Cenizas	4,00	3,98	2,23	0,87
E.N.N	29,55	69,74	29,51	

Fuente: Sandoval *et al.* (1985) citado por (Passifloras, 2011).

El jugo de la parchita es una fuente importante de K (5,500 mg/ 100 g) y de hierro (10,8 mg/100 g). Los contenidos de niacina (3,23 mg/ 100 g), riboflavina (0,09 mg/ 100 g) y ácido ascórbico (24 mg/100 g) (Passifloras, 2011).



4.2.1.4 Propiedades de la parchita

Sus hojas y sus flores tiernas o secas tienen propiedades calmantes, por lo que sus infusiones son muy utilizadas para controlar la excitación nerviosa, los estados depresivos, el insomnio, la neurastenia y el histerismo. Sus cataplasmas se emplean en el tratamiento de las quemaduras y heridas. También se usan en casos de hipertensión.

4.2.2 Enzimas

4.2.2.1 Definición

Una enzima es una proteína con propiedades catalíticas que posee un amplio poder específico de activación, estas son capaces de catalizar reacciones bioquímicas disminuyendo la energía de activación lo que favorece la cinética de la reacción provocando un aumento de la velocidad de reacción.

Casi todas las reacciones químicas de las células son catalizadas por enzimas, con la particularidad de que cada enzima solo cataliza una reacción, por lo que existirían tantas enzimas como reacciones, y no se consumen en el proceso (Whitaker, 1994).

Actualmente se conoce la existencia de más de 2000 enzimas, de las cuales muchas ya han sido aisladas, purificadas y cristalizadas; su estructura química es de carácter proteínico globular.

La gran mayoría de las enzimas tiene la capacidad de catalizar reacciones más o menos específicas, es decir, su intervalo de acción se limita a un determinado tipo de compuesto que debe reunir ciertas características para que pueda ser utilizado como sustrato, además su especificidad de catálisis es única, pues es mucho mayor que la de otros compuestos orgánicos e inorgánicos que se emplean en los distintos procesos industriales.

Según su especificidad se las ha dividido en cuatro grandes grupos; especificidad estereoquímica, baja especificidad, especificidad de grupo y especificidad absoluta.

En relación a su velocidad de acción, algunas de ellas tienen la capacidad de transformar más de un millón de moléculas de sustrato, por segundo, por molécula de enzima; cabe indicar que al igual que otros catalizadores solo aceleran la velocidad de aquellas reacciones que termodinámicamente son posibles.



La potencia o actividad de una enzima no puede medirse en términos de su concentración, ya que puede estar presente pero en forma desnaturalizada y sin funcionalidad; por esta razón se emplea la Unidad Internacional de Actividad Enzimática, definida como la cantidad de enzima que se requiere para transformar en producto una micromol de sustrato por minuto (León y Rosero 2009).

4.2.2.2 Características generales de las enzimas

- No sufren modificación al final de la reacción.
- No cambian la constante de equilibrio de una reacción química.
- Son muy específicas.
- Aceleran varios órdenes de magnitud mayor con respecto a la reacción no catalizada.
- Actúan en condiciones moderadas de presión y temperatura.

4.2.2.3 Uso industrial de las enzimas

De las miles de enzimas conocidas, solo algunas se producen en escala industrial para emplearse en la manufactura tanto de alimentos como de las materias primas para su elaboración.

Cada día aumenta el número de reacciones que se efectúan por rutas enzimáticas, y esta tendencia seguramente aumentara a medida que existan más catalizadores de este tipo en el comercio, a precios accesibles.

El empleo de enzimas tiene muchas ventajas:

- Son de origen natural y por lo tanto no deben ser tóxicas.
- Son muy específicas en su manera de actuar, por lo que no propician reacciones secundarias indeseables.
- Funcionan en condiciones moderadas de temperatura y pH y no requieren de condiciones de procesamiento drásticas que puedan alterar la naturaleza del alimento, ni del equipo muy costoso.
- Actúan a bajas concentraciones.
- Su velocidad puede ser controlada al ajustar el pH, la temperatura y la concentración de enzimas.



- Son fácilmente inactivadas una vez alcanzado el grado de transformación deseado.

Por otra parte la limitante es que algunas de ellas son muy caras y difíciles de conseguir, sin embargo es conveniente hacer un balance de las ventajas y las desventajas que trae consigo llevar a cabo una determinada reacción con enzimas, o con otros métodos físicos o químicos (León y Rosero 2009).

Tabla 2.2 Usos de las enzimas a nivel industrial

INDUSTRIA	ENZIMAS	USOS
Bebidas no alcohólicas	Pectinasas Glucosa-isomerasa Tannasa Glucosa-oxidasa	Mejoran la clarificación de jugos. Conversión de la glucosa en fructosa. Aumenta la solubilidad y disminuye la turbidez del té. Evita el oscurecimiento y los sabores desagradables.
Cárnicas	Papaína, Fiscina Bromelina	Ablandamiento de carnes. Producción de hidrolizados.
Panificación	Amilasa Proteasa Lipoxidasa Lactasa	Mejora la calidad del pan. Disminuye la viscosidad de la pasta. Produce una miga muy blanca Mejora la coloración de la superficie.
Cervecería	Amilasas Papaína, Pepsina	Usadas para licuar la pasta de malta. Evitan la turbidez durante la conservación de ciertos productos.
Vinificación	Pectinasas Glucosa-oxidasa	Mejoran la clarificación y extracción de jugos. Evitan el oscurecimiento y los sabores desagradables.
Láctea	Tripsina. Lactasa	Enmascara el gusto a óxido. Fabricación de leche deslactosada, evita la cristalización de leche concentrada.

Fuente: León y Rosero, 2009.

4.2.2.4 Las enzimas como catalizadores

La función principal de las enzimas es actuar como catalizadores de las reacciones de los seres vivos; como tales catalizadores tienen ciertas características que vamos a estudiar a continuación. Todas las reacciones químicas tienen lugar porque cierta fracción de la población de moléculas reactantes poseen la suficiente energía como para alcanzar un estado activado, llamado *estado de transición*, en el que es muy elevada la probabilidad de que se rompan o se establezcan enlaces para formar los productos. Este estado de transición reside en la cima de la barrera energética que separa los reactantes de los productos, como muestra la figura 2.3. En ella se observa el diagrama de energía para una reacción química, no catalizada y catalizada, donde la *energía libre de activación* es la cantidad de energía necesaria para llevar todas las moléculas de un mol de sustancia, a una temperatura determinada, al estado de transición.

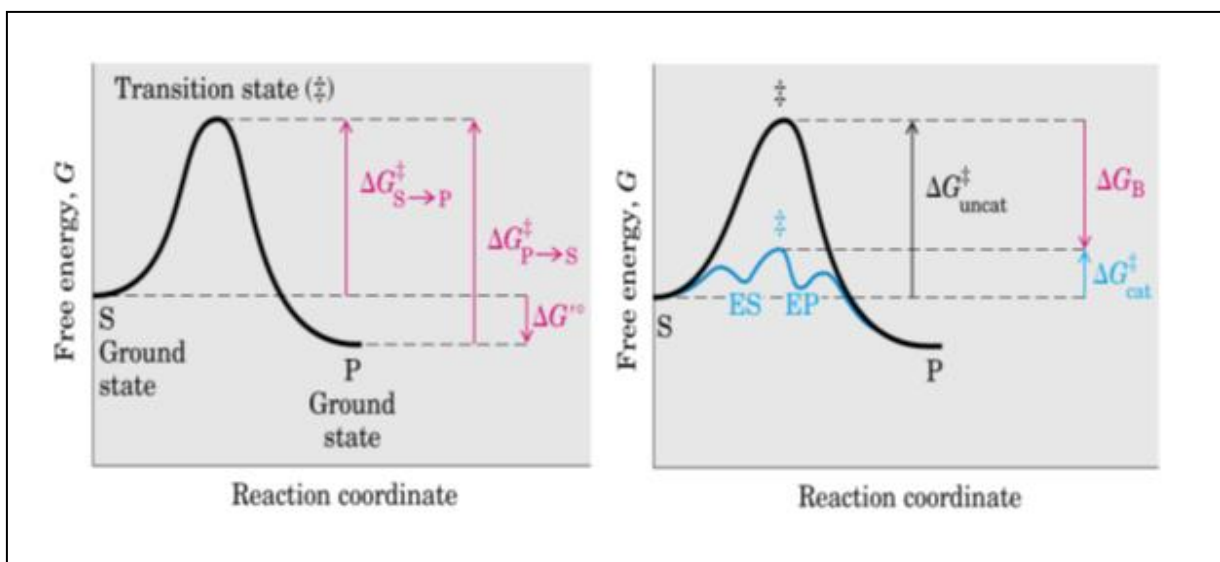


Figura 2.2 Diferencia entre los estados de transición de una reacción catalizada y no catalizada. Fuente: Itescam (2012).

4.2.2.5 Clasificación sistemática de las enzimas

La tabla 2.3 muestra la clasificación internacional para los seis grupos que se citan a continuación: oxido-reductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.



Tabla 2.3 Clasificación internacional de las enzimas.

N°	Clase	Tipo de reacción Catalizada
1	Oxido-reductasas	Transferencia de electrones
2	Transferasas	Transferencia de reacciones
3	Hidrolasas	Hidrólisis de reacciones (transferencia de grupos funcionales con agua)
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces o formación por remoción de grupos.
5	Isomerasas	Transferencia de grupos que contienen moléculas para producir formas isoméricas
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N por condensación de reacciones.

Fuente: Itescam (2012).

❖ **Oxido-reductasas:**

Catalizan reacciones de oxido-reducción, las que implican la ganancia (o reducción) o pérdida de electrones (u oxidación). Las más importantes son las deshidrogenasas y las oxidasas

❖ **Transferasas:**

Transfieren grupos funcionales de una molécula a otra. Ej.: quinasas; transfieren fosfatos del atp a otra molécula.

❖ **Hidrolasas:**

Rompen varios tipos de enlaces introduciendo radicales -h y -oh.

❖ **Liasas:**

Adicionan grupos funcionales a los dobles enlaces.



❖ **Isomerasas:**

Convierten los sustratos isómeros unos en otros.

❖ **Ligasas o sintasas**

Forman diversos tipos de enlaces aprovechando la energía de la ruptura del atp. Ej: polimerasas

A cada enzima se le asigna un número con cuatro dígitos. Los tres primeros indican la clase, subclase y sub-subclase, respectivamente, y el último es un número de orden.

4.2.2.6 Cofactores enzimáticos

La actividad de algunas enzimas depende solamente de su estructura como proteína, mientras que otras necesitan, además, uno o más componentes no proteicos, llamados **cofactores**. El cofactor puede ser un *ion metálico* o bien una molécula orgánica, llamada *coenzima*, aunque algunas enzimas necesitan de ambos. El cofactor puede estar fuertemente unido a la proteína (suele ser el ión metálico, aunque puede igualmente ser un coenzima) y recibe entonces el nombre grupo prostético, o débilmente unido, por lo que en realidad actúa como un sustrato específico de la enzima (*co-sustrato*; suele ser una molécula orgánica, coenzima).

El complejo enzima-cofactor catalíticamente activo recibe el nombre de *holoenzima*. Cuando se separa el cofactor, la proteína restante, que por sí misma es inactiva catalíticamente, se designa con el nombre de *apoenzima*.



En las enzimas el cofactor puede actuar como centro catalítico primario, grupo puente para reunir el sustrato y la enzima ó agente estabilizante de la actividad enzimática (conformación).

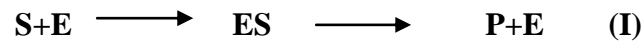
Por su parte, cada uno de los **coenzimas** catalogados suele contener en su estructura, alguna *vitamina* (sustancias orgánicas que, en cantidades mínimas, son vitales para el funcionamiento de todas las células, y deben figurar en la dieta de algunas especies) o molécula derivada de ella.



Las coenzimas actúan por lo general como transportadores intermedios de átomos específicos o de electrones.

4.2.2.7 Modelos de actuación de las enzimas

Para explicar la actividad catalítica de las enzimas, se ha propuesto un mecanismo general, en dos etapas:



En la primera etapa, la enzima (E) se une a la molécula de sustrato (S), para formar el complejo enzima-sustrato (ES). En una segunda etapa, el complejo se fragmenta dando lugar al producto (P) y a la enzima (E), que vuelve a estar disponible para reaccionar con otra molécula de sustrato.

Por lo general, la molécula de enzima es mucho mayor que la del sustrato por lo que sólo una pequeña parte de la enzima está implicada en la formación del complejo; esta región que interacciona con el sustrato y en la que tiene lugar la reacción, se denomina *sitio activo* de la enzima. El sitio activo es un dominio tridimensional de la enzima con una distribución de los grupos única para posibilitar la unión a su sustrato específico. Dichos grupos del enzima no tienen por qué ser necesariamente consecutivos en la secuencia de la proteína y reciben el nombre de *centros catalíticos*.

El modelo más conocido sobre el mecanismo de reacción de las enzimas es el de **Fischer**, quien propuso que la molécula de sustrato se adapta al centro activo de la enzima del mismo modo que lo haría una llave al encajar en una cerradura, es decir, que tienen una relación estructural complementaria. No obstante, esta hipótesis tiene ciertas limitaciones, así si el centro activo posee una estructura prediseñada para el sustrato, en caso de que sea un proceso reversible, dicho sitio activo también debería estar perfectamente diseñado para que encaje el producto de la reacción. De la misma forma, la teoría de la llave-cerradura tampoco explica bien algunos fenómenos de inhibición enzimática.

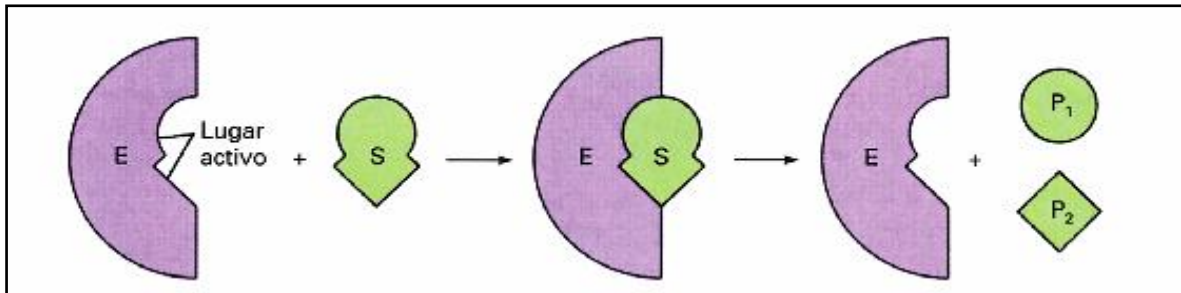


Figura 2.3 Modelo de Emil Fisher “Llave Cerradura”. Fuente: Itescam (2012).

Otra hipótesis más aceptada actualmente es la del *enzima flexible* o de *ajuste inducido* (**modelo de Koshland**), que sugiere que el sitio activo no necesita ser una cavidad geoméricamente rígida y preexistente, sino que dicho sitio activo debe tener una disposición espacial, precisa y específica, de ciertos grupos de la enzima que al interactuar con el sustrato se adaptan y ajustan a su estructura.

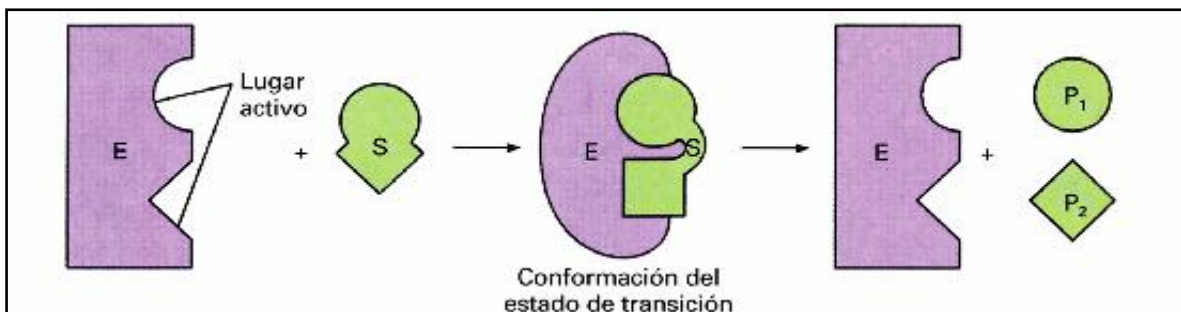


Figura 2.4 Modelo de *ajuste inducido* de Koshland. Fuente: Itescam (2012)

4.2.3 Sustancias pécticas

4.2.3.1 Definición

Es un componente esencial de las paredes de las plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas, siendo el constituyente principal de la lámina media de la pared primaria, capaz de mantener unidas las células en las plantas. Estas sustancias pertenecen al grupo poliurónidos, ya que son de polisacáridos con alto contenido de cadenas de α -1,4 ácido poligalacturónico, y en una concentración menor de ramnosa, galactosa y arabinosa. Sustancias complejas de carbohidratos coloidales, gran cantidad de unidades de ácido anhidro galacturónico, los grupos carboxilos de los ácidos poligalacturónicos, pueden estar



parcialmente esterificados por grupos metilos y parcialmente o completamente neutralizados por una o más bases (Kertsz *et al.*, 1944).

El término general “sustancias pécticas” se aplica no sólo a las pectinas, pero casi todo lo que resulta de los procesos de degradación que impliquen la pectina que tienen lugar en las frutas maduras, incluidas las formas solubles (Ashurst, 2005).

4.2.3.2 Clasificación de las sustancias pécticas

❖ **Protopectinas**

Son las sustancias insolubles en agua que forman parte de las membranas celulares, las cuales forman productos pectinas o ácidos pécticos al someterse a hidrolisis fuertes.

❖ **Ácidos pectínicos**

Son los ácidos poligalacturónicos coloidales, que poseen una proporción significativa de grupos metil-ester, son capaces de producir en bajo contenido de metóxilo ácidos o geles con azúcar, las sales de estos ácidos se denominan pectinados.

❖ **Pectinas**

Son ácidos pectínicos solubles en agua con alto contenido de esteres metílicos, además de un alto grado de neutralización, dichos ácidos son capaces de formar geles con azúcar y ácido bajo condiciones adecuadas.

❖ **Ácidos pécticos**

Son las sustancias pectínicas compuestas en su mayoría por ácidos poligalacturónico coloidal y están esencialmente libres de grupos metil ester. Las sales de ácidos pécticos son llamados pectatos ácidos (Hodge y Osman, 1976).

4.2.4 Enzimas pécticas

4.2.4.1 Definición

Son proteínas capaces de sintetizar, degradar y catalizar las reacciones bioquímicas producidas por las pectinas, por medio del ataque sobre la estructura del galacturoano de las sustancias pécticas (Whitaker, 1994).

4.2.4.2 Clasificación de las enzimas pécticas

❖ Poligalacturonasa

Es una enzima que hidroliza acoplamientos glucosídicos α (1-4) de las sustancias pécticas empleando agua (figura 2.6). Sintetiza las de bajo metóxilo haciendo un corte hidrolítico que puede encontrarse al degradar las sustancias pécticas al azar (endo) liberando oligómeros, o bien, por su extremo no reductor de cadena polimérica de la pectina (exo) liberando monómeros y dímeros. El pH óptimo de las poligalacturonasas y el subgrupo polimetilgalacturonasas (rompen los enlaces glucosídicos α (1-4) de moléculas de pectina altamente esterificados) se encuentra en un rango de 4,5 a 5,0 (Whitaker, 1994; Nagodawithana and Reed, 1993). El término 'endo' se refiere a aquellas poligalacturonasas que actúan al azar dentro de la cadena; y 'exo', a aquellas en las que el ataque es secuencial a lo largo de la longitud de la cadena de partida en un extremo (Ashurst, 2005).

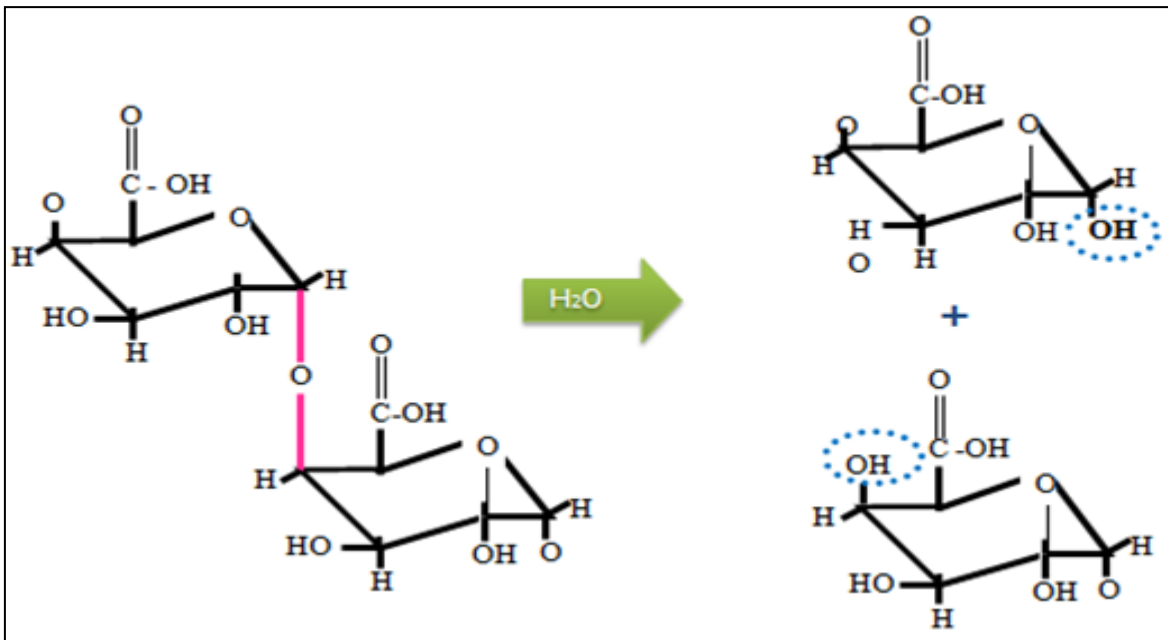


Figura 2.5 Esquema de actuación de la poligalacturonasa. Fuente: Whitaker (1994).

❖ Pectinesterasa

Liberan metanol de los grupos carboxilos esterificados (figura 2.7) y transforman la pectina en pectina de bajo metoxilo y pectato (Pilnik, 1978). Las pectinesterasas de las plantas,

tienen la capacidad de atacar en el extremo no reductor o al lado de un grupo carboxilo libre y proceder a lo largo de la molécula por un solo mecanismo de cadena, creando los bloques de ácido galacturónico esterificados que son extremadamente sensibles al calcio. Las irregularidades en la cadena galacturónica, tal como monómeros acetilados, los grupos éster transformados en amidas o reducidos al alcohol primario, y la aparición de regiones pilosas, inhiben la actividad de la pectinesterasa, la misma es altamente específica para el ester metílico del ácido poligalacturónico. Otros esteres son atacados muy lentamente, y es importante resaltar que el índice de desesterificación de la pectina depende de la longitud de cadena (Whitaker, 1994; Nagodawithana and Reed, 1993).

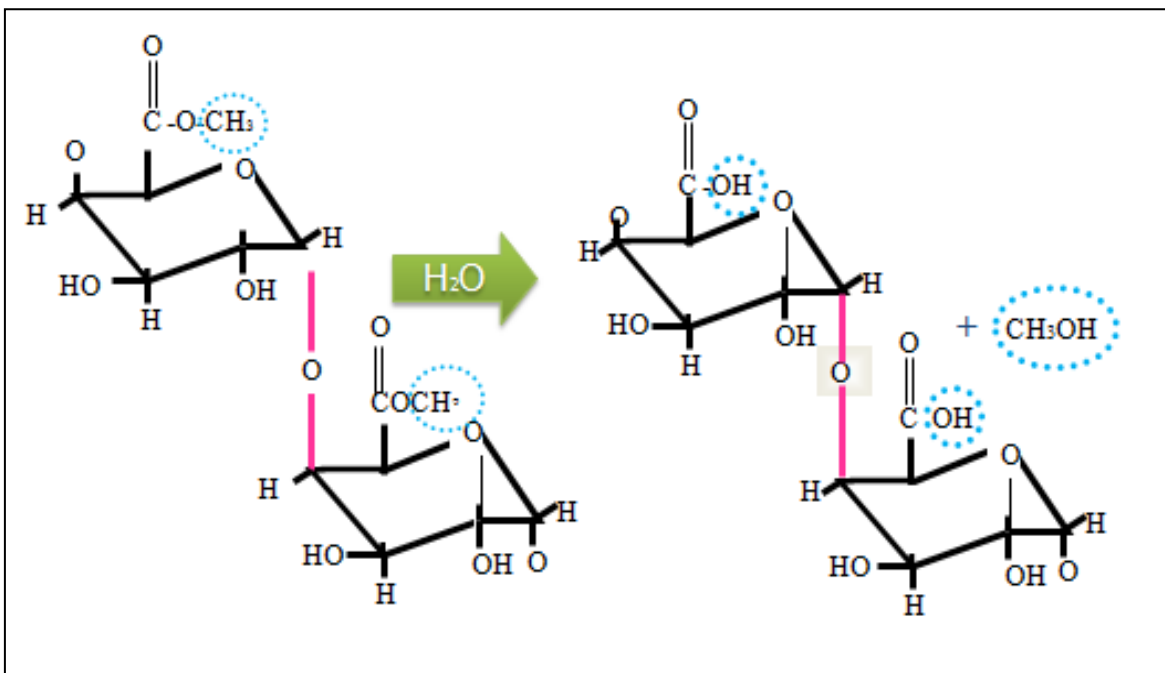


Figura 2.6 Esquema de actuación de la pectinesterasa Fuente: Whitaker (1994).

❖ Pectinliasa

Rompen los enlaces glucosídicos próximos a un grupo metil éster, por eliminación (Pilnik, 1978). La pectinliasa (PL) es un complejo enzimático que consiste en la enzima endopectinliasa, donde su mejor sustrato es medido a $\text{pH} > 7$, es la pectina completamente esterificada, según como se ha estudiado de acuerdo a la afinidad y a los límites de degradación. En valores de pH más bajos, la afinidad por pectinas menos altamente esterificadas aumenta y

se denotan marcados estímulos producidos por el calcio y otros cationes. Este comportamiento hace que una enzima de este tipo sea completamente útil para el procesamiento de frutas, a su vez estas enzimas necesitan los grupos de éster metílico, las endopectin-liasa son inactivadas por los ésteres de glicol y pectatos amidados (Whitaker, 1994; Nagodawithana and Reed, 1993).

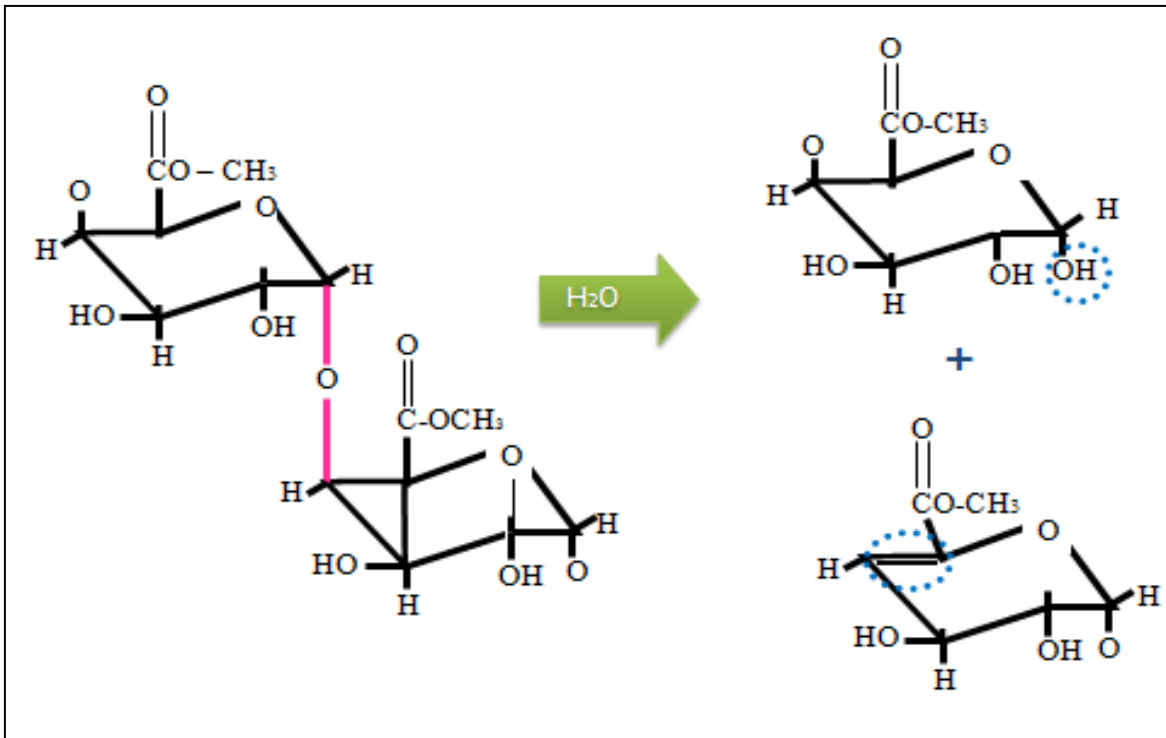


Figura 2.7 Esquema de actuación de la pectinliasa. Fuente: Whitaker (1994).

4.2.5 Actividad enzimática

4.2.5.1 Definición

Es la cantidad de enzima que se requiere para transformar en producto un micromol de sustrato por minuto, en las condiciones óptimas de pH y temperatura; la concentración de sustrato deberá ser aquella en que la enzima se encuentre actuando con su velocidad máxima, es decir a las condiciones de saturación (Nagodawithana and Reed, 1993; Flickinger and Drew, 1999).



2.2.1.1 Actividad enzimática específica

"La actividad específica" se define en términos de unidades de enzima por miligramo de proteína enzimática. Una unidad de enzima es la cantidad de sustrato convertido en producto por unidad de tiempo bajo condiciones de reacción específicas de pH y temperatura (Argaiz, 1996).

4.2.5.2 Actividades de las enzimas pécticas

La actividad de pectinesterasa se manifiesta con la producción de grupos carboxilo libres y metanol libre, el aumento de grupos carboxilo libres se controla fácilmente mediante una valoración a valores de pH por debajo de 4,5, mientras que el aumento de metanol libre puede ser medido por cromatografía de gas líquido (GLC). Sin embargo, cada vez es más conveniente, aunque menos sensible, la cromatografía líquida de alta selectividad.

Una unidad de actividad de pectinesterasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de grupos carboxilo libres o metanol por minuto bajo condiciones de ensayo específicas. Grupos de carboxilo libres distribuidos al azar o en bloques, que han sido obtenidos por pectinesterasas, se pueden distinguir por cromatografía de intercambio iónico, de alto rendimiento, del sustrato o mediante la medición de la afinidad por los iones de calcio, que es mucho más fuerte en el caso de la distribución en bloques. Muchas pruebas semicuantitativas son sensibles y convenientes al observar un cambio de pH en una solución de pectina neutralizada (Argaiz, 1996; Rubín y Mejjide, 2011).

❖ Actividad de pectinesterasa

La actividad de pectinesterasa se manifiesta con la producción de grupos carboxilo libres y metanol libre, el aumento de grupos carboxilo libres se controla fácilmente mediante una valoración a valores de pH por debajo de 4,5, mientras que el aumento de metanol libre puede ser medido por cromatografía de gas líquido (GLC). Sin embargo, cada vez es más conveniente, aunque menos sensible, la cromatografía líquida de alta selectividad (Whitaker, 1994; Nagodawithana and Reed, 1993).



❖ Actividad de poligalacturonasa

Rodríguez, *et. al.*, (2006) indican que: “la poligalacturonasa (PG) genera ruptura del enlace a-1,4-glicosídico del ácido péctico. La actividad de ésta puede ser endo (degradación al azar de la cadena pectídica, EC 3.2.1.15) o exo (degradación de los extremos libres no reductores de la cadena pectídica, EC 3.2.1.67). El resultado final de esta actividad es la pérdida de la integridad celular y el incremento de la concentración de polisacáridos solubles.

Existen publicaciones sobre el comportamiento que presenta la PG en la maduración y su relación con el ablandamiento de diferentes frutos como pera, tomate, fresa, kiwi pimentón, banano, durian, guayaba, arracacha, cuatro frutos silvestres de Zimbabwe y mango. En estos estudios se ha determinado la participación de PG en los procesos de maduración, observando que el máximo de actividad enzimática coincide con el máximo climatérico.

La actividad enzimática de PG fue determinada por medida espectrofotométrica de los azúcares reductores generados tras la acción de la enzima sobre el ácido. Con el objeto de obtener una máxima actividad se evaluó el efecto del tiempo de incubación, del volumen del extracto enzimático, de la concentración salina, del pH, la temperatura y la concentración de ácido poligalacturónico”.

La actividad poligalacturonasa fue valorada determinando la liberación de grupos reductores. Las mezclas de reacción, que contenían 0,5 ml de extracto enzimático y 0,5 ml de ácido poligalacturónico (sal sódica) al 0,5 % en tampón acetato 0,1 M, pH 5,0 y EDTA 0,005 M, fueron incubadas 30 minutos en agitación a 37 °C, determinándose los azúcares reductores liberados a partir de un banco de soluciones de glucosa (Whitaker, 1994; Nagodawithana and Reed, 1993; Guevara, 1997).

❖ Actividad de liasas

Las actividades pectín y pectato liasa (PNL y PL respectivamente) fueron medidas espectrofotométricamente, determinando el incremento en absorbancia a 235 nm de los productos 4,5-insaturados de las reacciones, y por viscosimetría, a 37 °C para 10 mm de reacción. Las actividades pectín liasa y pectato liasa también fueron valoradas midiendo el descenso en la viscosidad de las mezclas de reacción (Guevara, 1997).



La actividad de las enzimas liasas se puede medir mediante el análisis del aumento de la absorción de luz a 232 nm, debido a la formación del doble enlace en los extremos no reductores de las nuevas moléculas. La diferencia entre las endopectato liasas y endopectin liasas, es posible gracias a la elección de pectinas de bajo o alto metoxilo, respectivamente, como sustratos. Es de suma importancia tener cuidado de utilizar las soluciones transparentes de pectina, ya que cualquier cambio en la turbidez por la degradación de la pectina afectaría a los valores medidos. Las actividades exo y endo, la velocidad inicial, y el grado de despolimerización se miden en esta forma. Para una unidad de liasa se libera 1 micromol de productos insaturados por minuto bajo condiciones específicas de operación (Whitaker, 1994; Nagodawithana and Reed, 1993; Rubín y Meijide, 2011).

4.2.6 Métodos de obtención de enzimas

4.2.6.1 Vía fermentativa: microbiana

El tipo de enzima péctica producida por los hongos fitopatógenos parece depender del pH del entorno en el que el patógeno crece: el pH afecta marcadamente a la estabilidad de las enzimas producidas y también parece influir en la producción de las liasas. Generalmente, a pHs ácidos se producen mayores niveles de poligalacturonasas (cuyo pH óptimo de actividad suele ser ácido), mientras que el aumento del pH del medio promueve el descenso en la producción de poligalacturonasas y aumento en liasas (cuyo pH óptimo de actividad suele ser mayor) (Guevara, 1997).

Los hongos normalmente producen poligalacturonasas y/o pectín liasa y las bacterias pectato liasas. No obstante, algunos hongos como *Fusarium solani*, *Aspergillus nidulans* y *Amycolata* producen pectato liasas y algunas bacterias como *Pseudomonas* producen pectín liasas. En algunos casos, como en *Erwinia carotovora*, se ha descrito la producción de pectín y pectato liasa por el mismo organismo) (Guevara, 1997).

4.2.6.2 Vía extracción

En el área de manufactura de enzimas son más comunes los métodos de producción por fermentación utilizando microbios, levaduras, hongos, entre otros. Sin embargo existe otra alternativa, que a pesar de no poseer rendimientos tan óptimos como la producción de



enzimas por medios fermentativos, ha servido de base en numerosos avances tecnológicos, dicha metodología es la extracción de enzimas de tejidos vegetales y animales (Whitaker, 1994).

❖ **Animal**

La técnica más empleada es la obtención de un extracto crudo del cual se pretende aislar la proteína de interés, empleando una solución buffer para la homogenización el tejido, a fin de realizar una extracción acuosa de algunos componentes celulares, seguido de un centrifugado diferencial y selección de la sub-fracción celular y aislamiento de un orgánulo específico (Whitaker, 1994; Nagodawithana and Reed, 1993).

❖ **Vegetal**

Existen diversos métodos biotecnológicos sencillos que han sido utilizados para la extracción enzimática, dando como resultado la extracción de pectinesterasa, proteasas bromelaina y papaína, poligalacturonasas, entre otros. Sin embargo, presenta un reto a la enzimología, ya que la fuerza necesaria para destruir las paredes celulares, es muy elevada, lo que puede provocar la desnaturalización de las enzimas deseadas durante este proceso, es por ello que el número de enzimas aisladas, es pequeño en comparación con el existente, además los compuestos fenólicos presentes en las plantas, al ser oxidados enzimáticamente por la existencia de oxígeno molecular, pueden inactivar las enzimas. Es por ello que se debe establecer factores importantes como la composición, fuerza iónica, pH, temperatura del medio, al igual que la selección del buffer empleado para la realización de dicho proceso a fin de no desnaturalizar o degradar la enzima. La forma de selección de las condiciones de operación se realiza mediante pruebas piloto, empleando combinación de diferentes reactivos que formarán al buffer, al igual que la variación de temperatura y los demás factores influyentes, hasta conseguir el medio más idóneo que genere la mayor actividad enzimática después de la extracción (Whitaker, 1994; Nagodawithana and Reed, 1993).



4.2.7 Extracción y purificación

4.2.7.1 Métodos de extracción de enzimas pécticas

Las enzimas son generalmente extraídas de tampones de soluciones de pH. Sodio o fosfato de potasio o tampones de acetato han sido siempre populares para amortiguamiento cerca de pH fisiológico (Reed y Nagodawithana, 1995; Trevan *et al.*, 1990; Grandison and Lewis, 1996; Dechow, 1989).

El *buffer* fosfato de sodio 20 mM pH 7,0 con NaCl 0,5 M se constituyó en el sistema más efectivo para la extracción. Para retirar sustancias reductoras que interfieren en la técnica de cuantificación de azúcares reductores y para eliminar fenoles que pueden inactivar la PG, se homogeneizaron 5 g de corteza con 25 mL de acetona a -8 °C, se filtró sobre tela y el retenido se lavó dos veces con 25 mL de acetona a -8 °C. El residuo blanco fue resuspendido en 25 mL de *buffer* fosfatos 20 mM, pH 7,0 y colocado en agitación continua por 24 horas a 2 °C. Posteriormente, se centrifugó a 8.000 rpm durante 30 min a 4 °C, y el sobrenadante fue empleado para la cuantificación de proteína y las medidas de actividad de PG (Rodríguez, *et. al.*, 2006).

El preparado enzimático fue sometido a filtración en gel y cromatografía de intercambio aniónico en una columna de origen 15Q a pH 7,1 para obtener la proteína homogénea. La cromatografía de intercambio aniónico nos ha permitido obtener pectina liasa homogénea (Semenova, *et. al.*, 2006).

4.2.7.2 Purificación de enzimas pécticas

El primer paso para una purificación de la enzima es casi siempre la extracción de proteínas a partir de células o tejidos. Los métodos empleados dependerán en cierta medida en el naturaleza del material con el que las enzimas se van a extraer (Reed y Nagodawithana, 1995).

Con el fin de determinar la eficacia de la purificación, cada paso en el procedimiento de extracción debe ser monitoreado para la actividad enzimática. El monitoreo se puede lograr de muchas maneras, pero generalmente implica una medida de la disminución en el sustrato, o el aumento de productos específicos para la enzima (Harisha, 2007).



Una primera purificación, mediante precipitación con sulfato amónico (40- 100 % de saturación), filtración en gel en una columna Superdex 75HR1030, e isoelectro enfoque preparativo en un rango 7-11, permitió la obtención de una fracción homogénea con la liasa de pI 9,2 (Guevara, 1997).

Al realizar la extracción enzimática, el extracto contiene gran cantidad de agentes contaminantes generalmente de índole proteica, inclusive solo de un 0,01% a 1% del concentrado enzimático representa el valor proteico respectivo de la enzima, por esta razón se purifica el extracto a partir de la estabilidad de la enzima bajo condiciones adversas (Rubín y Meijide, 2011).

Cromatografía de Afinidad de Metálicos Inmovilizados (IMAC) se ha utilizado para la purificación de tipo natural y proteínas recombinantes (Arteiro, *et al.*, 2008).

4.2.8 Aplicaciones de las enzimas pécticas en la manufactura de alimentos

Las pectinasas se han utilizado para la producción de zumo de fruta desde 1930. Durante los años se han empleado enzimas con casi todas las frutas. El propósito de la utilización de enzimas es la siguiente: mejorar el rendimiento de zumo, licuar la fruta entera y lograr máxima utilización de la materia prima, mejorar el color y aroma, aclarar el jugo y romper todos los carbohidratos solubles como pectina, hemicelulosa y almidón (Reed y Nagodawithana, 1995).

Las pectinasas desempeñan un importante papel en la industria de alimentos, en la extracción y clarificación de jugos de frutas y vinos, en la maceración de vegetales y frutas, visando facilitar los procesos de extracción de diferentes óleos vegetales y en la producción de alimentos infantiles. Otra importante aplicación de las pectinasas está en la industria textil, específicamente en el tratamiento de fibras naturales como rami y lino. Como aplicación potencial de las pectinasas se estudia actualmente su empleo en la extracción de aceites esenciales de frutas cítricas, productos de alto valor comercial (Silva, *et. al*, 2004).



Gutierrez y Barbosa, (2003) indican que: “las pectinasas son enzimas que se utilizan cada vez más en el jugo, el vino y las industrias del petróleo. Las pectinasas disponibles en el mercado son una mezcla de pectinesterasas (PEs), poligalacturonasas (PGs), pectinliasas (PLs), y hemicelulasas. Para degradar una molécula de la pectina por completo, PE y PG deben actuar juntas para liberar el metanol como subproducto de la acción de PE. La pectinliasa, sin embargo, es una pectina capaz de romperse por sí misma sin la acción de las otras dos enzimas”.

Semenova, *et. al*, (2006), expresan en sus resultados que la preparación de pectina liasa de *Pavetta canescens* es muy competitivo con los preparados enzimáticos comerciales de la biotecnología por diversos procesos, incluida la preparación y la clarificación de jugos. Cabe destacar que la ventaja de la preparación de pectina liasa es la seguridad de los productos alimenticios. La actividad de los preparados comerciales se relaciona con la presencia de poligalacturonasa y pectina esterasa. La cantidad de pectina esterasa en estos preparativos es muy alta (10.8% del contenido total de proteínas). La catálisis del sustrato con la esterasa de pectina se asocia con la liberación de metanol. Sin embargo, la presencia de metanol en los productos alimenticios no es deseable. Por lo tanto, es necesario controlar la cantidad de pectina esterasa en la preparación industrial.

La aplicación de enzimas conduce a la degradación de las frutas o la extracción selectiva de algunos de sus componentes, lo que permite la creación de nuevos tipos de productos acabados y derivados de frutas (Flickinger and Drew, 1999).

López y Modrego, (1994) exponen que: la tecnología enzimática ha supuesto una mejora considerable en los aspectos del procesado de frutas que se relacionan en la tabla 2.4.



Tabla 2.4 Enzimas péclicas en el procesado de zumos.

<i>Proceso</i>	<i>Efecto/Aplicación</i>	<i>Enzimas</i>
Clarificación	Reducción de la viscosidad, eliminación de turbios	Pectina esterasa
	Zumo de manzana Sidra (industria francesa)	Poligalacturonasa Pectina liasa
Maceración	Separación de células sin alterar sus paredes	Poligalacturonasa
	Purés: néctares Alimentos infantiles Productos lácteos	Pectina liasa
Extracción	Reducción de la viscosidad	Pectina esterasa
	Mejora del rendimiento	Poligalacturonasa
	Mejora del color	Pectina liasa
Licuefacción	Degradación de las paredes celulares: zumos clarificados, turbios o pulposos	Pectinasas Hemicelulasas Celulasas
	Reducción de arabanos insolubles	Eliminación de cadenas ramificadas de arabanos Concentrados de zumo de manzana o pera

Fuente: López y Modrego, 1994.

4.2.8.1 Clarificación de zumos

La clarificación de los zumos, que se define como la reducción de la viscosidad y la eliminación del material enturbiante, está principalmente aplicada a la producción de zumo de manzana y se desarrolla mediante la actuación enzimática del complejo PE/endo-PG o por la actividad exclusiva de la PL debido a altos grados en pectinas de alto GE (grado de esterificación) que se encuentran en la manzana (López y Modrego, 1994), si se requiere un jugo claro, las enzimas pueden ser añadidas para acelerar el proceso natural (Ashurst, 2005).



El fenómeno de la clarificación se produce debido a que las enzimas pécticas solubilizan parte de la pectina negativamente cargada que abriga a proteínas cargadas positivamente, dejando expuestas ciertas partes de su núcleo. Estas partículas desestabilizadas coagulan y precipitan por interacciones electrostáticas. La posibilidad de desarrollar este proceso a temperatura de hasta 50°C ahorra tiempo y enzima, y evita problemas de contaminación y fermentaciones no deseadas.

Una vez clarificado, el zumo puede ser concentrado sin que formen geles de pectina, si bien el zumo de manzanas de principio de temporadas puede contener almidón, el cual puede espesar después del calentamiento del zumo y/o flocular durante su concentración. La concentración de zumos es una práctica habitual de cara a conseguir un almacenamiento, transporte y manipulación más fácil y económica (López y Modrego, 1994).

La inducción de la clarificación del jugo después de la ruptura de pectina, por pectinasas y la disminución de la viscosidad jugo, se han traducido en un proceso más corto, mejorando considerablemente la calidad de la industria de zumo de manzana. Las enzimas se han aplicado a frutas como la pera, grosella negro, fresa, frambuesa, cereza, maracuyá, arándano y la uva (Flickinger and Drew, 1999).

4.2.8.2 Extracción de zumos

Ashurst, (2005) indica que: “el jugo recién exprimido de fruta es la respuesta natural a la verdad con todos los requisitos de un refresco: saciar la sed, sabroso fresco, sano, nutritivo y, por supuesto, natural. Así que ¿por qué debería haber sido necesario mirar más hacia la creación de tipos de sabores diferentes y la gran cantidad de variedades de bebidas que han aparecido en los últimos años en los mercados de bebidas de todo el mundo? La necesidad, siendo la madre de la invención, ha sido la fuerza impulsora en todo esto. En los primeros años de la industria no había una verdadera necesidad para los fabricantes de bebidas no alcohólicas, con el fin de mantenerse en el negocio, para controlar una gran amenaza para su comercio, el de la fermentación microbiana y el deterioro del producto embotellado”.

Las mezclas resultantes de la trituración y estrujamiento de la mayoría de las frutas blandas (mora, fresa, frambuesa, plátano, etc.) no son fáciles de prensar por lo que la utilización de



pectinasas sobre estas mezclas ha sido una práctica habitual en las últimas décadas para facilitar el prensado y asegurar altos rendimientos de zumo y pigmentos. Estas frutas tienen alto contenido de pectina, los cuales confieren a los zumos una viscosidad tan alta que éste se adhiere a la pulpa generando una masa semi gelificada de la cual es muy difícil extraer el zumo. Cuando se utilizan pectinasas, la estructura de gel se desintegra, la viscosidad del zumo disminuye drásticamente y el rendimiento en la extracción del zumo se aumenta considerablemente. Además la estructura del tejido vegetal es alterada y esto permite a los pigmentos abandonar las estructuras que les retiene y difundir al zumo, con lo cual el rendimiento en la extracción del color también es mejorado. La extracción del zumo mediante alteración enzimática ha llegado también a ser un proceso habitual en el procesado de uva y manzana (López y Modrego, 1994).

Las enzimas pectinasas, celulasas y hemicelulasas, pueden aumentar el rendimiento de zumo de extracción y mejorar la concentración después de la disminución de la viscosidad del zumo (Flickinger and Drew 1999).

La cantidad de enzimas que se necesita para la extracción depende directamente del contenido en pectina de la fruta. Además, en frutas tales como las bayas, la alta acidez, obliga a la utilización de enzimas con una alta estabilidad a pH bajos. Las enzimas aplicadas en la mejora de la extracción son las mismas que se utilizan en los procesos de clarificación, por lo que se supone que degradan la pectina y hacen que ésta pierda su capacidad para atrapar agua, la cual se recupera como zumo (López y Modrego, 1994).

Las pectinasas degradan la pectina que causa la gelificación de la pulpa, facilitando el proceso de filtración. Este proceso se ha aplicado también para aumentar el rendimiento del prensado en la producción de aceite de oliva, palma y coco (Contreras, 2003).

4.2.8.3 Licuefacción de zumos

A través de la utilización de enzimas pécticas, hemicelulíticos y celulíticos las paredes celulares de los purés de frutas tropicales y verduras pueden ser degradadas hasta conseguir una total licuefacción. De esta forma se pueden lograr rendimientos superiores al 90% en la obtención de zumo. Además debido a la solubilización de los polisacáridos de la pared celular, el peso seco de los zumos se ve fuertemente aumentado. Dependiendo de la



accesibilidad que los componentes de la pared celular presentan a las enzimas se consigue obtener zumos clarificados (papaya), turbios (melocotón) o pulposos (zanahoria). Tras el tratamiento enzimático, se puede conseguir la separación del zumo por centrifugación o filtrado, pudiéndose clarificar el zumo resultante mediante los métodos descritos en el apartado anterior (López y Modrego, 1994; León y Alonso 2009).

En las etapas de clarificación, tratamiento de la pulpa, licuado y maceración se utilizan enzimas exógenas o agregadas para mejorar tales operaciones. Ciertas enzimas endógenas de las frutas y vegetales como pectinesterasa, poligalacturonasa y pectato liasa cumplen funciones tecnológicas en ciertas etapas (Rivas, et al., 2004).

4.2.9 Jugo

Según el Ministerio de Salud en su reglamento relacionado con producción, procesamiento, transporte, almacenamiento y comercialización de vegetales como frutas y hortalizas elaboradas, “jugo es el líquido obtenido al exprimir algunas clases de frutas frescas, maduras, limpias, sin diluir, concentrar, ni fermentar, el cual es apto para consumo directo. También se considera jugos los productos obtenidos a partir de jugos concentrados, congelados, deshidratados, a los cuales se le ha agregado solamente agua en cantidad tal que restituya la eliminada en su proceso”.

El Codex Alimentarius define el jugo como " líquido sin fermentar, pero fermentable, destinado al consumo directo, obtenido por el procedimiento mecánico a partir de frutos maduros, conservados exclusivamente por medios físicos. El zumo puede ser turbio o claro. El zumo podrá haber sido concentrado y reconstituido después con agua adecuada para el propósito de mantener la composición esencial y factores de calidad del zumo. La adición de azúcares o ácidos se puede permitir, sino que debe ser aprobada en la norma individual" (Bates, *et al.*, 2001).

La forma tradicional de preparar los jugos de frutas y vegetales es por exprimido y prensado de la pulpa. El jugo prensado crudo es un líquido viscoso con una turbidez persistente debida a la presencia de fragmentos de la pared celular de las frutas y/o



vegetales, y a complejos de estos fragmentos, con proteínas citoplasmáticas (Rivas, *et al.*, 2004).

Los sólidos en suspensión comúnmente llamados “pulpa”, corresponden a fragmentos de paredes de tejido que contiene el jugo. Estas paredes celulares son constituidas por sustancias como pectina, celulosa, hemicelulosa, lignina y otros constituyentes menores (proteínas, ácidos fenólicos, taninos, etc.) (León y Rosero, 2009).

4.2.9.1 Pre tratamientos

Los diferentes tipos de fruta, debido a su naturaleza, forma, tamaño, características de cosecha y así sucesivamente, pueden requerir un tratamiento especializado durante el proceso. En todos los casos, sin embargo, la operación implica una serie de etapas: la obtención de la fuente de fruta en un estado correcto de madurez, expresando el jugo de la manera más eficiente posible, y luego, si es necesario, tratar el jugo con enzimas de aclaración, seguido por una etapa de filtración adecuado antes de la concentración y el embalaje final o el almacenamiento (Ashurst, 2005).

Hay una serie de operaciones unitarias que intervienen en la conversión de fruta entera al jugo deseado, puré, o producto de pasta. Manipulación de frutas depende del diseño del proceso. Si la materia prima se destina a múltiples usos, como mercado de productos frescos, de procesamiento de pieza entera, los productos adicionales y el jugo, el diagrama de flujo que difieren mucho de uno para una planta de zumos de sólo. En algunas circunstancias, la limpieza, clasificación e inspección preceden en la planta de almacenamiento o las operaciones se puede revertir o repetida inmediatamente antes de hacer el jugo (Bates, *et al.*, 2001).

Los pre-tratamientos utilizados en la clarificación de jugos de frutas, tienen todos por objeto disminuir la carga de los sólidos insolubles en suspensión (SIS). La influencia de los SIS es crítica para el rendimiento del proceso de microfiltración.

Los pre-tratamientos se pueden dividir en 2 categorías: físicos y enzimáticos. Entre los procesos físicos tenemos la decantación, la centrifugación, el tamizaje y la filtración, como pre-procesos que permite la eliminación de los sólidos insolubles en suspensión. Su



desventaja es la generación de desechos difícilmente utilizables y muchas veces costosos de eliminar.

Los tratamientos enzimáticos utilizan mezclas de enzimas para solubilizar los sólidos insolubles (León y Rosero 2009).

La logística de producción, cosecha, transporte y dictado de la maduración que muchas frutas que se celebrará antes de hacer el jugo. La ventana de cosecha estacional puede ser mucho más corto que el tiempo necesario procesar la totalidad de cultivos anuales y estabilizar el jugo resultante y los productos acabados (Bates, *et al.*, 2001).

4.2.9.2 Jugo clarificado

Según el Ministerio de Salud en su reglamento relacionado con producción, procesamiento, transporte, almacenamiento y comercialización de vegetales como frutas y hortalizas elaboradas, “jugo clarificado es el líquido no diluido, no concentrado ni fermentado, obtenido al procesar algunas clases de frutas frescas, sanas, maduras y limpias, al cual se le ha eliminado la turbidez por métodos físicos o químicos aprobados”.

Jugos clarificados, donde la pectina activa ha sido eliminada mediante el tratamiento enzimático como una parte integral del proceso, logrando brillo. Son filtrados para eliminar levaduras y mohos directamente por el uso de filtros de membrana; luego son pasteurizados para esterilizar (Ashurst, 2005).



CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se presentan de forma ordenada y detallada cada una de las acciones que van orientadas al cumplimiento satisfactorio de los objetivos planteados en el trabajo de investigación, así como las estrategias mediante las cuales se realizará este estudio.

5.1 Diseño de la investigación

De acuerdo a los objetivos planteados en la investigación y su nivel de complejidad, se trata de un estudio de tipo descriptivo, es decir, se miden las propiedades o conceptos con el fin de especificar las propiedades importantes. En este trabajo se quiere obtener un concentrado enzimático extraído de la guayaba y papaya, de igual manera medir la eficacia de dicho concentrado en la clarificación de jugos frutas, y así describir los demás objetivos presentados, se hace una integración de las mediciones de cada una de las variables involucradas para indicar el comportamiento de las propiedades y como se manifiesta el fenómeno estudiado a partir de sus características (Zorrilla, 1993).

En lo que se refiere al tipo de investigación, se trata de una investigación de tipo experimental, pues se manipulan las variables a diferentes condiciones de operación, para luego obtener una combinación de factores que garanticen las mejores condiciones de extracción de pectinasas (Sampieri, 1997).

A continuación se presentan las fases metodológicas de esta investigación para dar cumplimiento al objetivo general:

- *Obtener un concentrado de enzimático a nivel de laboratorio, utilizando guayaba y papaya.
- *Mejorar el método de pH estático para la determinación de la actividad enzimática.
- *Determinar la eficacia del concentrado enzimático en jugos de frutas, mediante un diseño experimental.
- *Formular un jugo de frutas clarificado a partir del concentrado enzimático preparado.
- *Evaluar las características sensoriales del jugo clarificado de frutas, mediante un análisis sensorial hedónico.



*Determinar los costos asociados a la extracción del concentrado de enzimas pécticas así como del jugo preparado, mediante una recolección de datos de los costos de materia prima y reactiva involucrados en la extracción del concentrado enzimático.

5.2 Lugar de la investigación

Los experimentos fueron llevados a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC), ubicado en Maracay, Edo. Aragua, conjunto con el Laboratorio de Biotecnología Industrial de Facultad de Ingeniería, de la Universidad de Carabobo, Campus Bárbula-Valencia. Asociado a la línea de investigación de Biotecnología industrial de C.I.Q de la Universidad de Carabobo.

5.3 Materiales y Equipos

- Beaker
- Papel de filtro
- Embudo
- Termómetro
- Micropipeta
- Balanza analítica digital
- Plancha de agitación
- pH-metro
- Viscosímetro de Ostwald
- Ultracentrifugadora:

Es un aparato que aplica una fuerza centrífuga sostenida (esto es, una fuerza producida por rotación) para impeler la materia hacia afuera del centro de rotación. Este principio se utiliza para separar partículas en un medio líquido por sedimentación. Esta máquina se utiliza, sobre todo, para la separación de mezclas heterogéneas líquido-sólidas y de mezclas líquidas como son los líquidos insolubles entre sí con distintos pesos específicos. Se utilizó una ultracentrífuga Beckman Coulter con un rotor de JA-20 (figura 3.1).



Figura 3.1 Ultracentrifugadora.

- Liofilizador:

La liofilización es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, pero preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada.



Figura 3.2 Liofilizador

- Espectrómetro de masas:

Instrumento que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga (m/z). Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto, o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto. Con frecuencia se encuentra como detector de un cromatógrafo de gases, en una técnica híbrida conocida por sus iniciales en inglés, GC-MS.



Figura 3.3 Espectrómetro de masas

- Nanopure:

Es un equipo para eliminar los cationes del agua, como los de sodio, calcio, hierro, cobre, etc; aniones como el carbonato, fluoruro, cloruro, entre otros, mediante un proceso de intercambio iónico.



Figura 3.4 Nanopure



5.4 Reactivos y Materias Primas

A continuación se muestra una lista de los reactivos utilizados durante la investigación:

- Cloruro de sodio (NaCl)
- Sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Pectina cítrica
- Acetona
- Agua nanopure

Básicamente la materia prima utilizada son frutas. Para la elaboración de los concentrados enzimáticos se empleó guayaba (*Psidium guajava*) y papaya (*Carica papaya*), mientras que para la elaboración del jugo se usó la parchita (*Passiflora edulis*).

5.5 Desarrollo de la investigación

5.5.1 Obtener un concentrado enzimático a nivel de laboratorio utilizando guayaba y papaya.

5.5.1.1 Preparación de la solución de extractora de cloruro de sodio (NaCl) 1,5 M

Inicialmente se procedió a pesar la cantidad de NaCl necesaria para preparar un litro de solución a 1,5 M, utilizando una balanza analítica digital, este procedimiento se realizó en una fiola del mismo volumen, la cual, contenía agua destilada; se agregaron estos cristales en la fiola, e inmediatamente se inició el proceso de agitación constante y homogénea sobre una plancha de agitación magnética, y se llevó a cabo hasta observar la disolución de todos los cristales (Flores, 2004).

5.5.1.2 Preparación de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1,5 M

Se procedió a pesar la cantidad correspondiente de NaOH necesaria para preparar un litro de solución 1,5 M, utilizando una balanza analítica digital, se agregaron a una fiola de 1 L, la cual contenía agua destilada y se inició un proceso de agitación constante, en una plancha de agitación magnética, hasta disolución completa de los cristales de hidróxido de sodio (NaOH) (Flores, 2004).



5.5.1.3 Ajuste del pH de la solución de extractora de cloruro de sodio (NaCl) 1,5 M a 7,8

Para ajustar el pH de la solución extractora, se empleó la solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1.5M, la cual, se fue adicionando gota a gota a la primera hasta obtener el pH deseado (7.8) haciendo uso de una micropipeta de 20 μ L (Flores, 2004).

Para la obtención de los gramos de cloruro de sodio utilizados se empleó la siguiente fórmula:

$$g_{NaCl} = C_{sol} * PM_{NaCl} * V_{sol} \quad (1)$$

Donde:

g_{NaCl} : masa de cloruro de sodio (g).

C_{sol} : concentración de la solución extractora (mol/L).

PM_{NaCl} : peso molecular del compuesto cloruro de sodio (NaCl) (g/mol).

V_{sol} : volumen de la solución extractora (L).

$$C_{NaOH} = \frac{M_{NaOH}}{PM_{NaOH} * V_{NaOH}} \quad (2)$$

Donde:

C_{NaOH} : concentración de hidróxido de sodio (mol/L).

m_{NaOH} : masa de hidróxido de sodio (g).

V_{NaOH} : volumen de la solución de hidróxido de sodio (L).

5.5.1.4 Preparación de la muestra

Se procedió a lavar y pelar las frutas obtenidas en un mercado local. Posteriormente se utilizó un extractor de jugos para la obtención de la pulpa limpia y libre de semillas, esta pulpa fue recolectada en un beacker de 50 mL. Luego se pesaron 2 porciones de 30 g por cada tipo de fruta, haciendo uso de una balanza analítica digital y se colocaron en una cava con hielo para mantener las muestras a una temperaturas de 4 °C (Flores, 2004).



5.5.1.5 Eliminación de Fenoles

Se tomaron 30 g de la muestra preparada y se agregaron en un embudo, el cual contenía dos capas de papel de filtro de tamaño igual a 15 cm de diámetro; se realizaron 4 lavados con 5 mL de acetona, la cual se encontraba almacenada en una nevera a una temperatura de -20°C . Finalmente se retiró el papel de filtro con la pulpa lavada con acetona y se colocó en un beaker de 50 mL (Espinal, 2010).

5.5.1.6 Extracción del concentrado enzimático

Se introdujo un agitador magnético al beaker donde se encontraba la muestra sin fenoles, seguidamente se colocó en plancha de agitación magnética para iniciar el mezclado, mientras se añadían poco a poco 30 mL de solución extractora de cloruro de sodio (NaCl) 1,5 M de pH 7,8. Luego haciendo uso de una micropipeta de 100 μL se fue adicionado gota a gota solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1,5 M hasta obtener un pH de 7,8, medido con el pH-metro.

Luego se colocó la solución en tubos de centrifuga para un rotor JA-20 y fue sometido a un centrifugado de 7000 rpm durante 45,00 min, en una ultracentrifugadora. El sobrenadante obtenido se filtró haciendo uso de un embudo con una capa de papel de filtro, y se recolectó en un beaker para someterse a un proceso de fraccionamiento con la adición de sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, a un 30% de saturación. Seguidamente se vertió este extracto en tubos de centrifugado 20 J y se sometieron nuevamente a un centrifugado a razón de 7000 rpm, por 45 min. En último lugar, se decantó el precipitado para finalmente ser recolectado en un beaker 50 mL el extracto enzimático purificado (Flores, 2004; 1980; Mondal *et al.*, 2009; Ashurst, 2005; Rubín y Meijide, 2011).

5.5.2 Mejorar el método de pH estático para la determinación de la actividad enzimática.

5.5.2.1 Determinación de la actividad enzimática

La medición de actividad enzimática de la pectinesterasa se realizó mediante la técnica del pH estático reportada por Argáiz en 1996. Se tomó una alícuota de concentrado enzimático igual a $(10,00 \pm 0,05)$ mL y se mezclaron con una solución de pectina cítrica al 1% en NaCl 1 M ajustando el pH a 7,8 tras la adición de cada gota de pectina (Gómez, 2004); utilizando



para esto una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2,07 M. Seguidamente se midió el pH y se tituló cada muestra con solución de NaOH 0,0004 N, que se fue adicionando con una micropipeta de 100 μ L hasta alcanzar un pH igual a 7,8 en cada muestra (Argaiz, 1996).

Cabe destacar que este procedimiento se repitió cinco veces más, variando la concentración de la solución titulante de NaOH (Tabla 3.1), para seleccionar las mejores condiciones de medición de actividad enzimática en cada fruta.

5.5.2.2 Preparación de la solución de pectina cítrica al 1% en NaCl 1 M

En una fiola de 1000 mL, colocada sobre una plancha de agitación magnética, se agregó inicialmente 600 mL de agua nanopure, y se adicionó un agitador magnético junto con 58,4898 g de cloruro de sodio (NaCl), que fueron pesados haciendo uso de una balanza analítica digital y se mantuvo en agitación constante hasta que los cristales fueron disueltos, una vez que se disolvió todo el sólido, se procedió a agregar 10 g de pectina cítrica pesados de igual manera con la balanza analítica digital, finalmente se adicionó agua nanopure para completar el volumen final deseado y se mantuvo en agitación por 1 h (Flores, 2004). Puesto que los grumos de pectina formados no se disolvieron en su totalidad, se procedió a disolverlos haciendo uso de un mortero y se dejó en agitación durante 30 min más.

5.5.2.3 Preparación de las soluciones de NaOH titulante

En una fiola de 500 mL se agregó agua nanopure hasta conseguir el volumen deseado, posteriormente se adicionó una muestra de 0,0008 g de NaOH con agitación durante 30 min hasta que los cristales fueron disueltos en su totalidad (Argaiz, 1996).

Es importante señalar que este procedimiento se realizó de la misma manera para las demás concentraciones de NaOH empleadas, mostrándose en la Tabla 3.1.



Tabla 3.1 Cantidades de hidróxido de sodio necesario para preparar las soluciones titulantes a diferentes concentraciones.

Muestras	Normalidad de la solución de NaOH ($n \pm 0,0001$) N	Masa de NaOH ($m \pm 0,0001$) g
A	0,0004	0,0008
B	0,009	0,720
C	0,001	0,04
D	0,01	0,02
E	0,05	1,0

5.5.2.4 Definición de la unidad de pectinesterasa (UPE)

La unidad de pectinesterasa (UPE) fue definida como el número de miliequivalentes de ester hidrolizados por minuto y mililitro de muestra, a pH 7,8 y se expresó en UPE/ mL (Flores, 2004).

$$\frac{UPE}{mL} = \frac{v * \frac{N}{1000}}{t * a} * 10^6 \quad (3)$$

Donde:

v: volumen gastado de NaOH empleado para titular (mL).

N: normalidad de NaOH (eq/L)

t: tiempo de agitación (min).

a: alícuota (mL)

5.5.3 Determinar la eficacia del concentrado enzimático en jugos de frutas, mediante un diseño experimental.

5.5.3.1 Elección de los jugos de frutas utilizados

En esta investigación se estudió el efecto de las enzimas pécticas sobre la clarificación de jugo de parchita, porque además de ser una fruta de producción nacional, se cuenta con varias fuentes de investigaciones anteriores con este fruto, siendo seleccionada esta fruta en base a una investigación previa desarrollada por Rubín y Mejjide (2011).

Se conoce que frente a la existencia de diversos factores en un diseño experimental, surge una interacción entre estos, que puede o no afectar las propiedades como si se tratara de una nueva variable de interés. Para la determinación de la eficacia del concentrado enzimático en jugos de frutas, se procedió a realizar un diseño experimental de 3^2 , variando la cantidad de concentrado enzimático y la concentración de los jugos, para estudiar el comportamiento de las viscosidades de estos.

5.5.3.2 Preparación del jugo

La norma COVENIN 1031-81 en sus consideraciones generales de néctares y jugos de frutas, plantea la concentración para un jugo con la pulpa finamente dividida y tamizada en un contenido no menor de 15 % ni mayor de 40 %.

Primero se procedió a lavar las parchitas (*Passiflora edulis*) frescas, seleccionadas y obtenidas en un mercado local, luego se cortaron y con la ayuda de una espátula se le extrajo la pulpa, para luego procesarla en un extractor de jugos, el cual se encarga de triturar la fruta y separar las semillas de la misma, para obtener así la pulpa de fruta (Figura 3.5).



Figura 3.5. Obtención de la pulpa de la fruta.

Se procedió a preparar los jugos agregando las cantidades de pulpa de fruta y de agua nanopure en un beaker de 100 mL, con un agitador magnético para iniciar la mezcla sobre una plancha de agitación. Cabe destacar que las cantidades de pulpa de fruta y de agua

dependían de las concentraciones requeridas para elaboración del jugo, las cuales se contemplan en la Tabla 3.2.

El procedimiento antes expuesto se utilizó para preparar los otros jugos a las concentraciones deseadas para obtener tres jugos por cada concentración.

Tabla 3.2 Cantidades empleadas para la preparación de los jugos a diferentes concentraciones para obtener 100 mL.

Porcentaje volumen volumen (% v/v±1)	Volumen de pulpa de fruta (v±1)mL	Agua Nanopure (A±1) mL
20	20	80
30	30	70
35	35	65
40	40	60
45	45	55

5.5.3.3 Medición y análisis de la viscosidad inicial

Se tomaron tres de los jugos preparados, uno por cada concentración, en la Figura 3.6 se muestran los jugos de concentraciones iguales a 20, 30 y 40 % v/v. Luego se procedió a medir las viscosidades iniciales, como se muestran en el apéndice C, Tablas C.1 y C.4.



Figura 3.6 Jugos para evaluar la viscosidad inicial.
(De izquierda a derecha: 20% v/v, 30 % v/v y 40% v/v).

❖ Medición de la viscosidad

Para la medición de la viscosidad, se procedió a determinar la densidad de cada uno de los jugos preparados, así como de la sustancia de referencia (agua destilada); para ello se tomó



un picnómetro y seguidamente se determinó su masa haciendo uso de una balanza analítica digital, el cual, se registró junto con el volumen del mismo, posteriormente se añadió la cantidad de jugo al picnómetro y se pesó nuevamente.

Para determinar la masa del jugo se utilizó la siguiente ecuación:

$$m_{\text{jugo}} = m_{\text{piclleno}} - m_{\text{picvacio}} \quad (4)$$

Donde:

m_{jugo} : masa del jugo (kg).

m_{piclleno} : masa del picnómetro lleno (kg).

m_{picvacio} : masa del picnómetro vacío (kg).

Luego se determinó la densidad del jugo haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$\rho_{\text{jugo}} = \frac{m_{\text{jugo}}}{V_{\text{pic}}} \quad (5)$$

Donde:

V_{pic} : volumen del picnómetro (mL).

La viscosidad se determinó utilizando un viscosímetro de Ostwald, haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$\mu_{\text{jugo}} = \mu_{\text{agua.dest}} \frac{\rho_{\text{jugo}} \times t_{\text{jugo}}}{\rho_{\text{agua.dest}} \times t_{\text{agua.dest}}} \quad (6)$$

Donde:

μ_{jugo} : viscosidad del jugo (cP).

ρ_{jugo} : densidad del jugo (kg/m^3).

T_{jugo} : tiempo de descenso del jugo en el viscosímetro (s).

$\mu_{\text{agua.dest}}$: viscosidad del agua destilada (cP).

$\rho_{\text{agua.dest}}$: densidad del agua destilada (kg/m^3).

$t_{\text{agua.dest}}$: tiempo de descenso del agua destilada en el viscosímetro (s).

El procedimiento empleado para la determinación de la viscosidad consistió en agregar 5 mL de jugo dentro del viscosímetro, luego se succionó con la ayuda de una inyectora por el otro extremo y con un cronómetro se midió el tiempo de flujo del jugo a través del tubo capilar bajo la influencia de la gravedad. De igual forma se utilizó para medir la densidad de la sustancia de referencia.

5.5.3.4 Adición del concentrado enzimático a los jugos

Una vez preestablecidas las cantidades de concentración de los jugos, se procedió a agregarles el concentrado enzimático variando sus cantidades con la finalidad de realizar un diseño experimental, tomando en cuenta también una variación en la cantidad de concentrado enzimático. De manera tal, de poder efectuar las interacciones entre estos dos niveles, utilizando un diseño experimental para cada jugo de parchita, con concentrado enzimático de guayaba y papaya. Las muestras resultantes de cada interacción se colocaron en beakers de 100 mL y se agitaron durante un tiempo de 10 min. Luego se dejaron actuar por un periodo de tiempo de 5 h.

5.5.3.5 Medición y análisis de la viscosidad final

Después del período de actuación se midió nuevamente el valor final de viscosidad representados en las Tablas C.2, C.3 y C.5.



Figura 3.7 Jugos para evaluar la viscosidad final.
(De izquierda a derecha: 20% v/v, 30 % v/v y 40% v/v)



5.5.4 Formular un jugo clarificado de frutas a partir del concentrado enzimático preparado.

Para la realización de este objetivo fue necesario poner en claro diversas normas para la elaboración de jugos, como lo son las normas COVENIN 1031-81 y el CODEX ALIMENTARIUS (CODEX STAN 247-2005); ambas establecen las características esenciales que deben tener los componentes de un néctar o jugo de frutas, así como las particularidades de dicho producto.

Para preparar un jugo se debe tener en cuenta la adecuada proporción de los diferentes ingredientes que lo componen como lo son: pulpa de fruta, azúcar o edulcorante, conservante y en este caso concentrado enzimático o sustancia clarificante. La norma general del CODEX para zumos (jugos) y néctares de fruta (CODEX STAN 247-2005) indica que el contenido mínimo de jugo de parchita debe ser 25 % v/v en pulpa y el nivel de grados Brix requerido debe encontrarse en un rango entre 12 y 40.

Se realizaron previas formulaciones según estas normas y los resultados obtenidos en el objetivo anterior, con el fin de conocer la cantidad de azúcar necesaria para que los grados Brix del jugo se encontraran en lo estipulado por la norma. Se realizó una evaluación sensorial preliminar, un ensayo simple para seleccionar y seguir la formulación, manejando la información sobre las expectativas de aceptabilidad del consumidor.

Es importante señalar que antes de realizar la formulación del jugo se hizo una liofilización al concentrado enzimático de papaya, para eliminar el agua presente y poder realizar un ensayo de espectrometría de masas (Figura 3.3), para así determinar la composición del mismo y verificar si el jugo puede ser apto para su consumo.

5.5.5 Evaluar las características sensoriales del jugo clarificado de frutas.

5.5.5.1 Análisis de las propiedades sensoriales iniciales

Se procedió a visualizar las muestras para obtener cualitativamente las propiedades sensoriales de cada una, infiriendo acerca del sabor, olor, color y apariencia.



5.5.5.2 Análisis de las propiedades sensoriales finales

Para el análisis de las propiedades sensoriales finales se procedió a elaborar una matriz de valoración para una población de 10 individuos, en edades comprendidas entre 18 a 40 años, con el objetivo de clasificar de forma discriminativa, descriptiva y afectiva el jugo de parchita, antes y después de la adición del concentrado enzimático, Figuras C.6 y C.7, respectivamente.

La herramienta utilizada para la recolección de los datos muestra la forma y estructura observada en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Matriz de recolección de datos en una población muestra antes y después de la adición de del extracto enzimático en los jugos seleccionados.

Ponderación	Criterio
9	Me gusta extremadamente
8	Me gusta mucho
7	Me gusta moderadamente
6	Me gusta levemente
5	No me gusta ni me disgusta
4	Me disgusta levemente
3	Me disgusta moderadamente
2	Me disgusta mucho
1	Me disgusta extremadamente

Fuente: (Liria, 2007; Kemp, *et. al.*, 2009; Lawless 2010).

5.5.6 Determinar los costos asociados a la extracción del concentrado así como de la elaboración de jugo preparado.

5.5.6.1 Evaluación de costos a nivel experimental

Para determinar los costos asociados a la extracción enzimática y preparación del jugo, primero se debe investigar el precio de las materias primas y de los reactivos empleados. Luego, se establece la cantidad gastada de materia prima y reactivos, a nivel experimental,



para obtener 50 mL de concentrado enzimático y 100 mL de pulpa para elaborar el jugo. El costo total se determina como se indica en la ecuación 7:

$$\text{Costo} = \text{Cantidad} * \text{precio} \quad (7)$$

Donde:

Costo: costo individual de cada materia prima o reactivo (BsF).

Cantidad: alícuota utilizada de materia prima o reactivo (Kg o L).

Precio: valor de la materia prima o reactivo (BsF/Kg o BsF/L).

Al obtener los costos individuales se obtuvo el costo total de la extracción a nivel de laboratorio como la sumatoria de cada uno de ellos (Jiménez, 2003; Blank y Tarquin, 1999).



CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En esta sección se presentan y se analizan los resultados experimentales obtenidos en la realización de cada una de las fases metodológicas de esta investigación, para el cumplimiento satisfactorio del objetivo general.

6.1 Obtener un concentrado enzimático a nivel de laboratorio utilizando guayaba y papaya.

6.1.1 Eliminación de fenoles.

Para la eliminación de fenoles se tomó la muestra preparada y se agregaron en un embudo, el cual contenía dos capas de papel de filtro; se realizaron 4 lavados con 5 mL de acetona a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, medidos haciendo uso de un cilindro graduado de 10 mL, finalmente se retiró el papel de filtro con la pulpa lavada con acetona y se coloca en un beacker de 50mL (Tucker *et al.*; 1980).

Los compuestos fenólicos o polifenólicos constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y funciones fisiológicas. Su estructura química más frecuente es la de polímeros o ligninas insolubles. La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuesto químico del que se trate, situándose en el interior de las células (vacuolas) o en la pared celular (Espinal, 2010).

La eliminación fenólica es llevada a cabo, dado que puede inducir la inactivación de las enzimas, en este caso las enzimas pécticas (Turker, 1980). Esta inactivación es caracterizada por el pardeamiento representado por la aparición de color en los frutos, el cual, es un proceso químico que se da al producirse la enzima polifenolxidasa PFO, que oxida los compuestos polifenólicos en presencia de oxígeno molecular (O_2) para formar las quinonas y los compuestos pardos conocidos como melaninas (Espinal, 2010).

La eliminación de fenoles se lleva a cabo a través de una extracción binaria, siendo el principio fundamental de este tipo de extracción: la solubilidad de las sustancias presentes



en el sistema de extracción, generando un medio miscible, entre las sustancias afines, e inmiscibilidad respectivamente para aquellas no afines, debido a la naturaleza y fuerzas de interacción molecular entre los componentes del sistema de extracción. Los fenoles son caracterizadas por tener un grupo fenilo (C_6H_5) y al menos un hidroxilo ($-OH$), lo cual hace de este compuesto polar un grupo inductivo ($-I$), además forman enlaces de puente de hidrogeno en estado líquido, siendo el átomo de hidrogeno aledaño al átomo de oxígeno, presente en la molécula, un átomo con déficit de densidad electrónica, cargado parcialmente positivo, de esta forma es atraído por el grupo carbonilo, presente en la molécula de acetona ($(CH_3)_2CO$), dado que el oxígeno presente adquiere densidad electrónica, por lo cual es polarizado negativamente, induciendo de esta manera el arrastre de las moléculas fenólicas al realizar la adición del solvente aprótico (Wade, 2004).

Adicionalmente ocurre la reacción minoritaria, donde se adiciona agua al grupo carbonilo al agregar el solvente extractor en el medio, dicha reacción ocurre entre la mencionada sustancia y el agua presente en el sistema, dado que el dipolo formado durante la resonancia es estabilizado por el efecto inductivo generado por los dos grupos metilos de la acetona, haciendo de este compuesto más estable, menos electrofílico y por ende menos reactivo e incluso es necesario de un medio más ácido para el favorecimiento de la reacción (Wade, 2004).

6.1.2 Obtención del extracto enzimático

Como punto de partida para la extracción del concentrado enzimático se establecieron dos condiciones principales de operación que garantizaron la actividad enzimática, estas fueron: temperaturas bajas, alrededor de los $4^{\circ}C$, y un grado de acidez medido en un rango de pH que va de (7-9); ambas condiciones con la finalidad de no desnaturalizar la enzima, es decir, no perder la actividad enzimática de la misma; se estableció un pH de 7,8 ya que para este valor la actividad enzimática es óptima (Gómez, 2004), para llegar a este valor se empleó una solución hidróxido de sodio (NaOH) 1,5 M.



También es importante resaltar que para la obtención de la enzima, es primordial la degradación de la membrana celular, puesto que la enzima es de tipo intracelular para ello se empleó la destrucción mecánica sin dañar la enzima (Whitaker, 1994).

La adición de cloruro de sodio se realizó para la solubilización de las proteínas, es decir, de las enzimas, utilizando la fuerza iónica de la sal para de esta manera facilitar la extracción de las mismas; creando una transferencia de masa, nivelar los sistemas, al ocurrir la migración de enzimas fuera de la membrana celular, ya permeabilizada por la acción mecánica aplicada al mismo (Argaiz, 1996).

La muestra fue centrifugada con la finalidad de separar totalmente la pulpa de las fases acuosa y orgánica.

Seguidamente se procedió a realizar un fraccionamiento con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, esto para producir la absorción de agua al hidratar en los cristales de sulfato de amonio y así lograr una mayor definición de las fases, y se retiraron dichos cristales mediante una centrifugación y un posterior decantado (Whitaker, 1994).

El fraccionamiento con sulfato amónico es una etapa extremadamente efectiva en la purificación de las enzimas, la técnica permitió reducir el volumen de material. Este método depende de la capacidad que presentan las concentraciones elevadas de sulfato amónico para captar las moléculas de agua presentes y así evitan de manera efectiva la solvatación de las proteínas (Cerón *et al.*, 2009).

6.2 Mejorar el método de pH estático para la determinación de la actividad enzimática.

El método del pH estático (Argaiz, 1996), indica mantener la muestra al pH óptimo para la medición de la actividad de PE. La actividad de la enzima depende de la concentración de iones de hidrógeno del medio, ya que esto afecta el grado de ionización de los aminoácidos del sitio activo del sustrato, o del complejo enzima-sustrato; todo esto llega a influir en la afinidad que tenga la enzima por el sustrato. Todas las enzimas presentan una máxima

actividad catalítica a un cierto valor óptimo de pH en un intervalo de 5,0 a 8,0 (Badui, 1990).

Para la determinación de la actividad enzimática (Figura 4.1), definida (UPE) como el número de miliequivalentes de éster hidrolizados por minuto y mililitro de muestra, se midió la acción de la enzima sobre el sustrato por esta razón se usó la solución de pectina cítrica al 1% en NaCl 1 M para favorecer la acción de enzimas en el medio del sustrato, dicha adición redujo el pH de la muestra bruscamente, por lo cual se reguló inmediatamente el mismo con una solución de NaOH 2,07 M hasta alcanzar de nuevo el pH óptimo de acción de pectinerasas (Nagodawithana, 1996).



Figura 4.1. Medición de la actividad enzimática.

La estabilidad del pH depende del origen de la enzima, su pH óptimo se encuentra entre 6,0 y 8,0 y a menudo se requiere la adición de cloruro de sodio (NaCl) para que la catálisis sea máxima. En cuanto a su reacción sobre las pectinas, el grado de metoxilación de la molécula de pectina parece ser un factor importante en la degradación, algunas isoformas de PE son más activas con moléculas de alto grado de metoxilación, mientras que otras no lo son (Espinal, 2010).

Rubín y Meijide (2011), hacen mención al trabajo realizado por Warrilow y Jones (1995), los cuales señalan que: “la fuerza iónica se ha conocido como un factor que afecta la



actividad de PE, además se ha determinado que cada isoforma de la enzima podrá requerir una concentración de NaCl distinta para alcanzar un nivel de actividad óptimo”. Explican también que: “para la hidrólisis del grupo éster del ácido galacturónico, la PE debe producir un complejo enzima-sustrato catalíticamente activo; sin embargo, a ciertos valores de pH se pueden originar cargas positivas en la PE que producen un complejo no específico catalíticamente inactivo debido a fuerzas electrostáticas, el efecto activante ejercido por los cationes consiste en proteger las cargas negativas de la pectina y así reducir la formación de complejo inactivo”.

Según Espinal (2010) el NaCl puede llegar a tener un efecto de inhibición en altas concentraciones, por lo que lo emplean al 10% p/v. Rubín y Meijide (2011), manifiestan que haber utilizado una solución de NaCl 2 M, pudo ser clave en la baja actividad enzimática obtenida. Tomando en cuenta estas premisas, se empleó una solución de NaCl 1,5 M.

Se trabajó con un pH igual a 7,8 considerando las condiciones reportadas por Gómez (2004), el cual es muy cercano a los valores empleados en investigaciones de papaya y guayaba (Rubín y Meijide, 2011); papaya (Bravo, 1981), guayaba (Mondal, 2009) y maracuyá (Flores, 2004) con un pH de 7,5.

La muestra se dejó en agitación constante durante 30 min, donde se observó que hubo un descenso en el pH, en la Tabla 4.1, se representa el pH de las muestras de concentrado enzimático de guayaba y papaya empleadas en los ensayos realizados. Es importante señalar que las muestras representadas como A, B, C, D y E, se refieren a la concentración de NaOH empleado para la titulación (Tabla 3.1).



Tabla 4.1 Valores de pH para la medición de la actividad enzimática.

Concentrado enzimático	Muestra	pH Inicial	pH después de agitar	pH después de la titulación
Guayaba	A	7,81	7,10	7,80
	A	7,80	7,00	7,80
	B	7,80	7,11	7,81
	B	7,82	7,16	7,82
	C	7,80	6,90	7,80
	C	7,79	6,87	7,80
	D	7,81	7,24	7,80
	D	7,82	7,25	7,81
	E	7,81	7,22	7,81
	E	7,80	7,30	7,80
Papaya	A	7,82	7,25	7,80
	A	7,81	7,30	7,79
	B	7,8	7,41	7,80
	B	7,82	7,3	7,81
	C	7,84	7,39	7,80
	C	7,82	7,57	7,81
	D	7,83	7,52	7,82
	D	7,81	7,31	7,82
	E	7,82	7,59	7,81
	E	7,84	7,2	7,83

La disminución del pH, está asociado a la labor catalizadora de la enzima sobre la pectina cítrica. Como se muestra en la Figura 4.2, la PE al hidrolizar los enlaces éster metílico (COOCH_3), libera metanol (CH_3OH) de los grupos carboxilos esterificados y transforma la pectina metoxilada en pectina de bajo metóxilo (Espinal, 2010).

Los valores de los ensayos realizados para la medición de la actividad enzimática de la guayaba y papaya, se contemplan en el Apéndice C, Tablas C.1 y C.2, respectivamente.

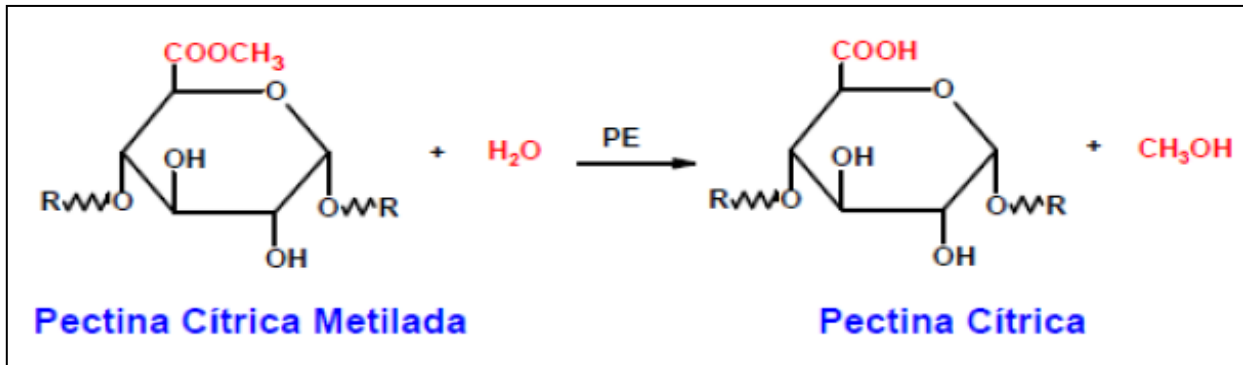


Figura 4.2 Degradación de la pectina por acción de la pectinesterasa, hidrólisis del enlace éster del ácido poligalacturónico metilado. Fuente: (Espinal, 2010).

Es importante destacar que para lograr un mejoramiento en la medición del método de pH estático, se realizaron ensayos preliminares variando las condiciones de operación hasta lograr la mayor actividad enzimática. Se trabajó con soluciones titulantes de NaOH de diversas concentraciones comprendidas en un rango entre 0,0004 N y 0,5 N, para cuantificar los enlaces éster metílicos hidrolizados de los concentrados enzimáticos de guayaba y papaya; se observó que los resultados obtenidos de mayor actividad enzimática, al regular el pH de las soluciones, fue cuando se tituló la muestra de guayaba con una solución de NaOH 0,001 N y la de la papaya con 0,0004 N.

Como se aprecia en la Tabla 4.2, se obtuvo que los resultados de mayor valor para la medición de la actividad enzimática de la papaya y guayaba, fueron más altos que la actividad reportada por Rubín y Mejjide (2011): con valores de 0,0057 UPE/mL para la guayaba y 0,0033 UPE/mL para la papaya, a pesar de haber empleado la misma metodología, lo que afirma el mejoramiento del método realizado en esta investigación.

Sin embargo, la actividad enzimática obtenida para la guayaba resultó inferior a la reportada por Mondal (2009) para la misma fruta, cuyo valor fue de 3,1; lo mismo ocurre con la papaya, en el estudio de Bravo (1981), donde la actividad alcanzada fue de 6,3. La razón que se atribuye a estas diferencias, es que las metodologías empleadas son distintas a la utilizada en esta investigación, en cuanto a reactivos materiales y métodos.



Tabla 4.2 Actividad enzimática de pectinesterasa.

Concentrado	Actividad Enzimática (UPE/mL)
Guayaba C	1,0667
Guayaba C	1,3333
Papaya A	5,3333
Papaya A	5,0667

Finalmente, se realizó un análisis de varianza utilizando con la herramienta Excel de Microsoft Office, para comprobar la hipótesis nula de que las medias entre las actividades enzimáticas de las frutas son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las actividades difiere de las demás en cuanto a su valor esperado para las frutas.

Al contemplar estos valores en la Tabla 4.3, se observa que el valor crítico para F, es mucho menor que el obtenido para F. Este contraste es fundamental en el estudio de los resultados experimentales, porque nos permite comprender en los resultados, la diferencia que existe entre los valores obtenidos para la actividad de cada fruta. Por lo tanto queda descartada la hipótesis nula.

Tabla 4.3 Análisis de varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	23,8668253	1	23,8668253	1276,106	3,663E-6	7,7086474
Dentro de los grupos	0,07481141	4	0,01870285			
Total	23,9416367	5				

6.3 Determinar la eficacia del concentrado enzimático en jugos de frutas, mediante un diseño experimental.

Para la determinación de la eficacia del concentrado enzimático en jugos de frutas, se procedió a realizar un diseño experimental de 3², preparando diferentes formulaciones de



jugo de parchita, variando la cantidad de concentrado enzimático y la concentración de jugo estudiando la respuesta de las viscosidades de los jugos (Tablas C.4 y C.5).

Comparando la Tabla C.4, con los valores de viscosidades iniciales, mostrados en la tabla C.3, se puede observar que no existe disminución de esta propiedad. Por el contrario, se visualiza un aumento de la misma, lo cual puede atribuirse a que el concentrado enzimático de guayaba no es lo suficientemente eficaz para esas concentraciones de jugo de parchita.

Igual sucede con las viscosidades referidas al concentrado de papaya, contempladas en la tabla C.5. Sin embargo, en esta última se percibe que en ciertas corridas existe una disminución en la propiedad de estudio.

Analizando la Figura 4.3, se observa que las cuatro curvas de concentración de enzimas se cruzan entre sí, esto indica según Montgomery (1996), que existe interacción entre las variables de estudio, es decir que a medida que se varía la cantidad de concentrado enzimático y concentración del jugo, se modifica la viscosidad. Esto es indicativo del efecto de acción de la enzima sobre las pectinas, y en sí sobre la clarificación.

Del mismo modo, ocurre en la Figura 4.4, donde existe interacción entre el sistema entre la cantidad de pulpa y la cantidad de extracto enzimático de papaya agregado.

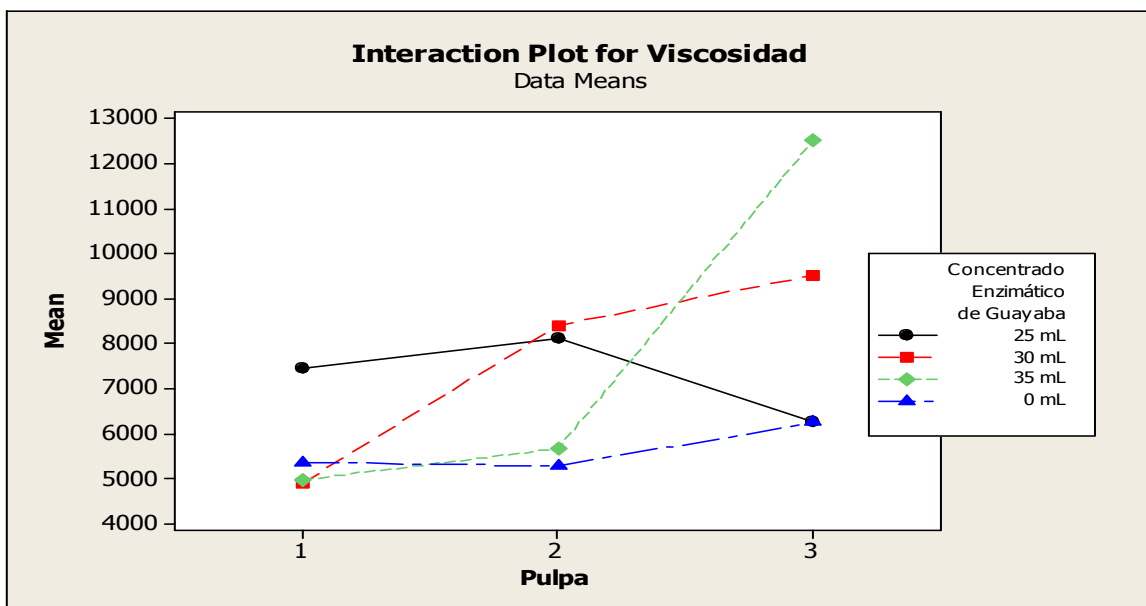


Figura 4.3 Efectos principales sobre la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de guayaba.

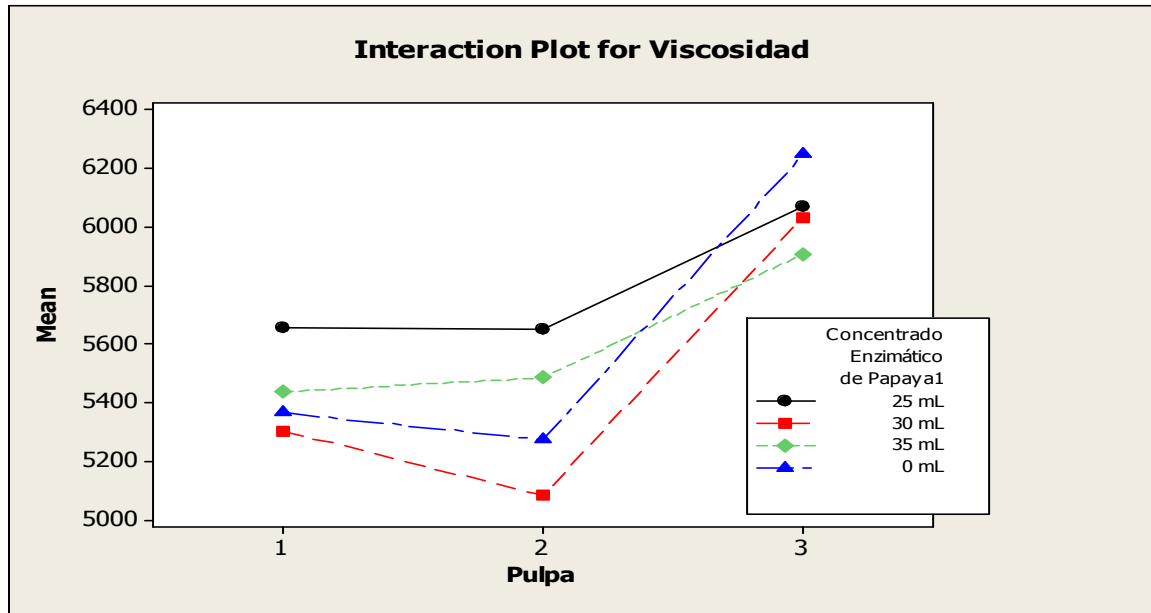


Figura 4.4 Efectos principales sobre la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de papaya.

Examinando en la Figura 4.5 el gráfico de residuales versus el orden de la observación, sugiere que las observaciones 3 y 6 son puntos fuera de rango en el sentido vertical, es decir, valores fuera del rango establecido; mientras que para la Figura 4.6 se presentan los valores fuera de rango para los valores 3 y 18. Sin embargo no se muestran problemas graves con respecto a la normalidad. De igual forma sucede con la Figura 4.6 que presenta valores fuera de rango en los puntos 3 y 18.

El gráfico de residuales versus valores predichos mostrado en las Figuras 4.7 y Figura 4.8 sugiere que la varianza de los errores no es constante con respecto a la viscosidad que es nuestra variable de respuesta, esto debido a que los puntos no siguen un patrón definido.

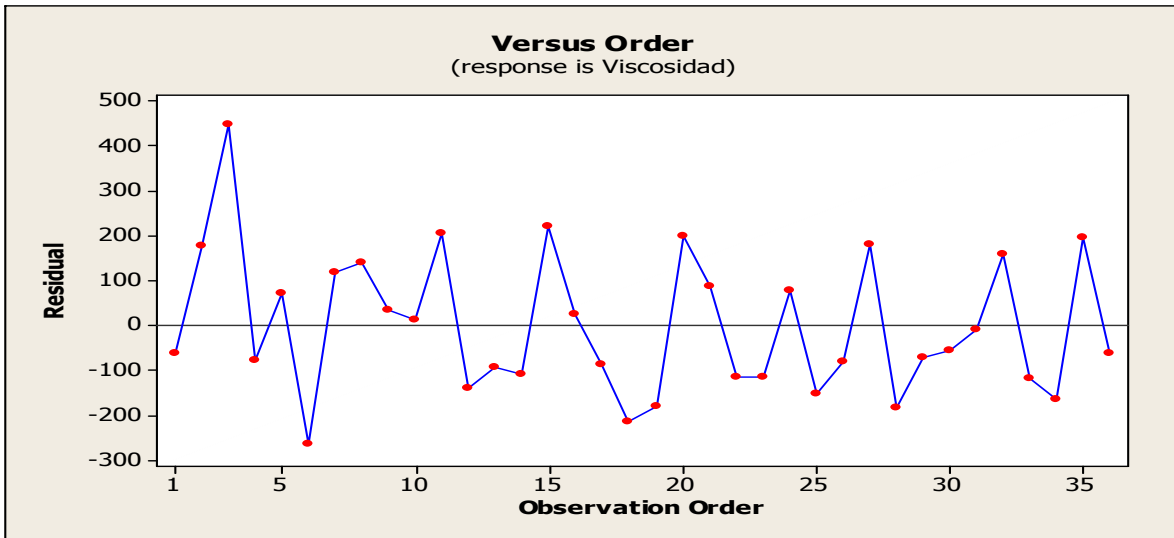


Figura 4.5 Gráfico de los residuales versus el orden de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de guayaba.

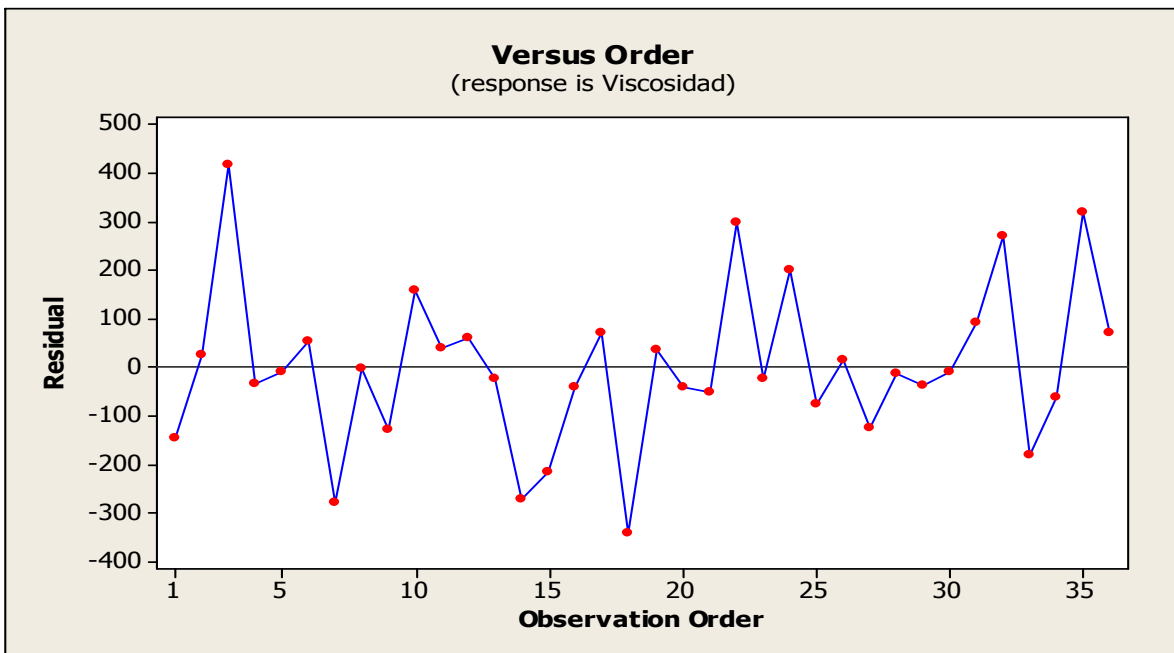


Figura 4.6 Gráfico de los residuales versus el orden de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de papaya.

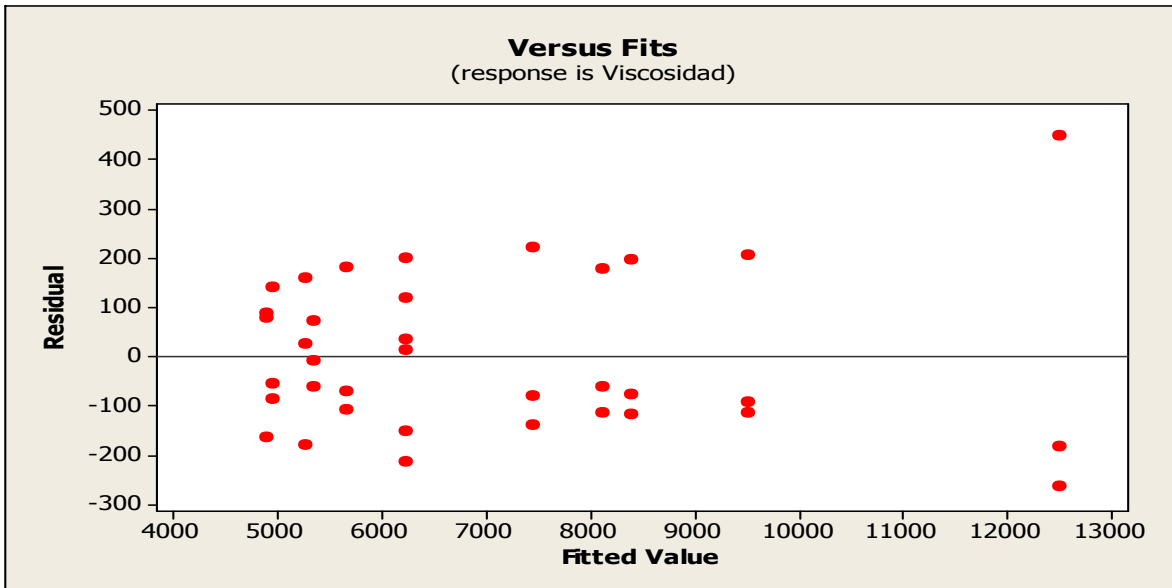


Figura 4.7 Gráfico de Residuales versus los valores predichos de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de guayaba.

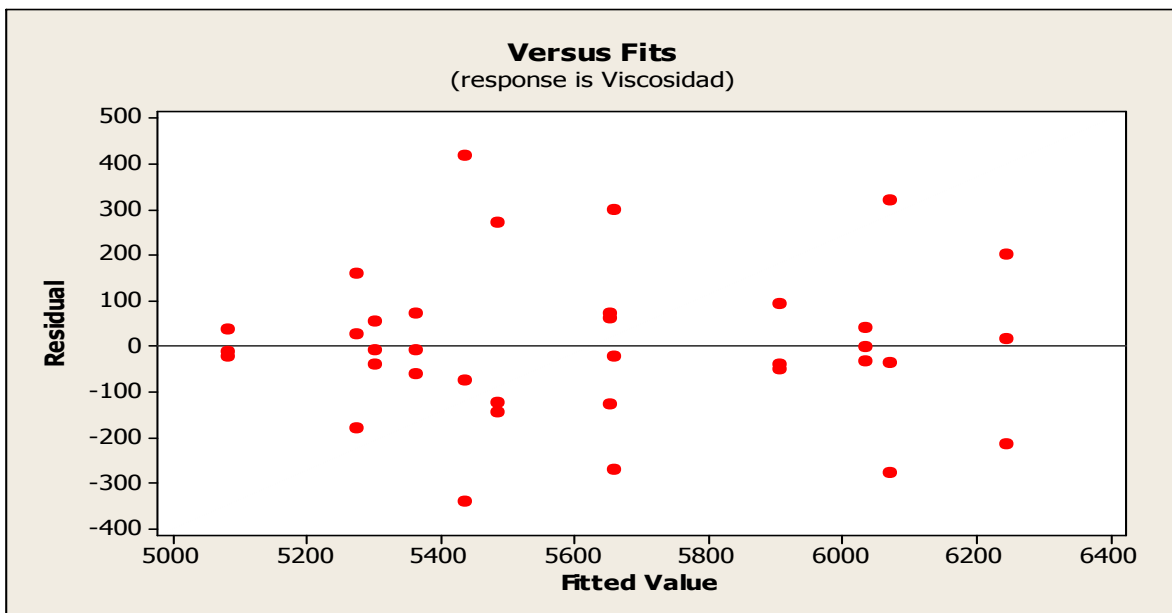


Figura 4.8 Gráfico de Residuales versus los valores predichos de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de papaya.

Las Figuras 4.9 y 4.10, representan las gráficas de probabilidad normal tanto de la viscosidad arrojada para las muestras tratadas con extracto enzimático de guayaba y papaya, respectivamente. Dichas gráficas arrojaron una distribución normal adecuada, pues los puntos siguen la tendencia de una línea recta, por lo que se verifica que no existe



sospecha de algún problema con la normalidad de los datos utilizados para el análisis estadístico, y se verifica la hipótesis de que las variables son influyentes en la viscosidad del producto final.

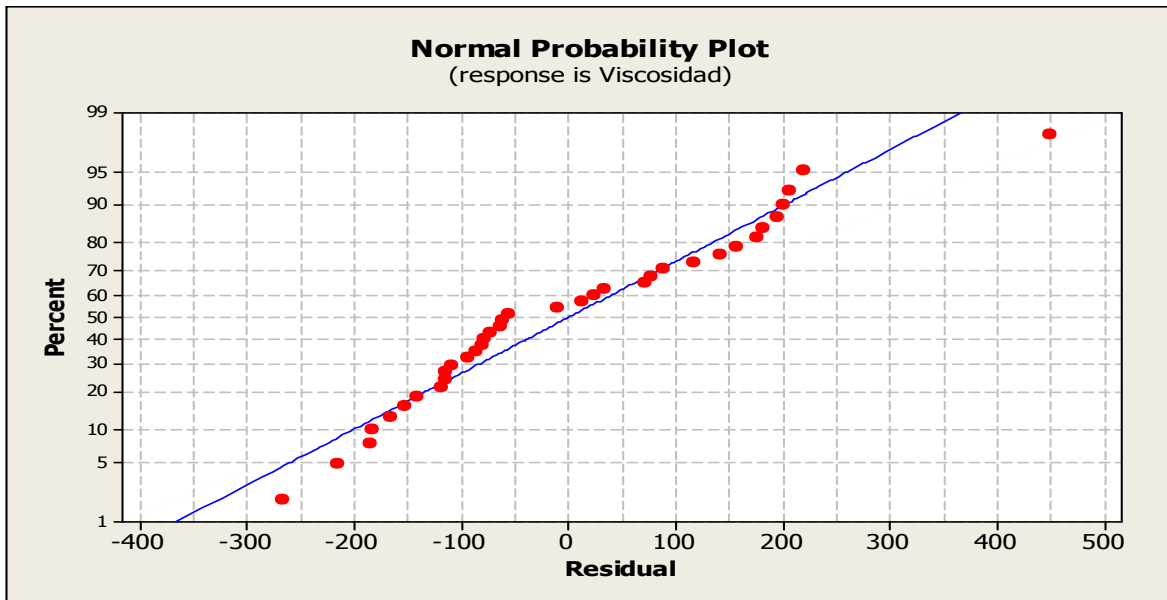


Figura 4.9 Probabilidad normal de los residuos sobre la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de guayaba.

Observando las Figuras 4.11 y 4.12 se puede decir que no hay problemas graves con respecto a la normalidad, lo que corrobora lo mostrado en las figuras 4.9 y 4.10; sin embargo el grafico de la figura 4.11 no presenta completa simetría.

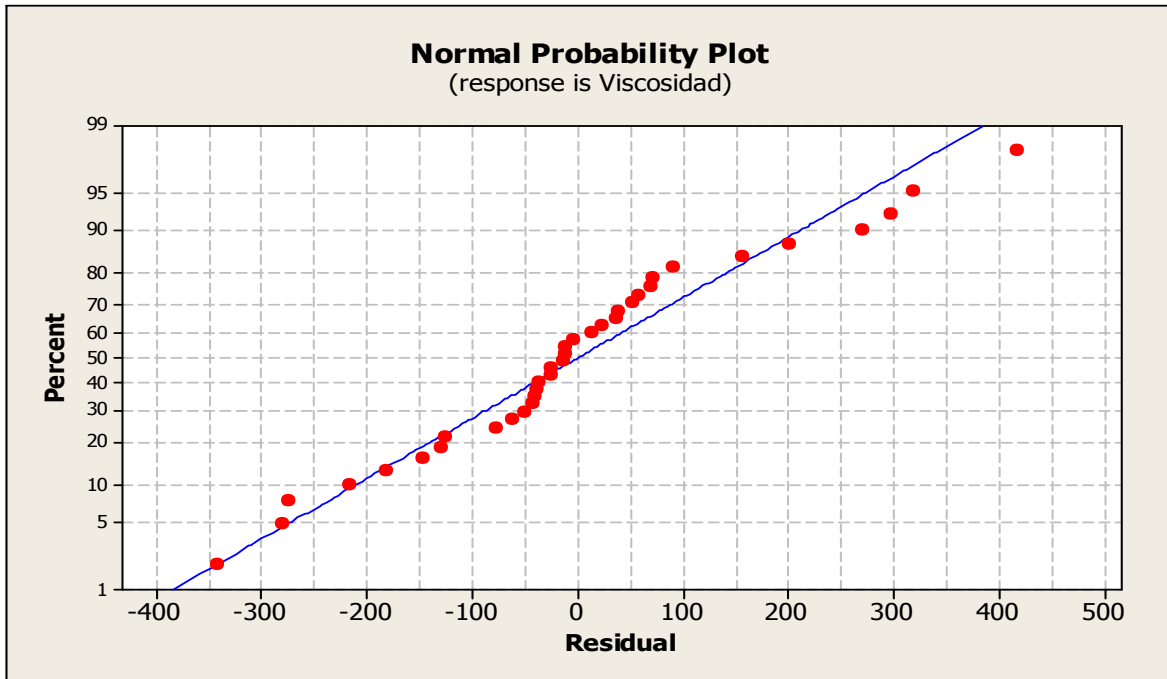


Figura 4.10 Probabilidad normal de los residuos sobre la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de papaya.

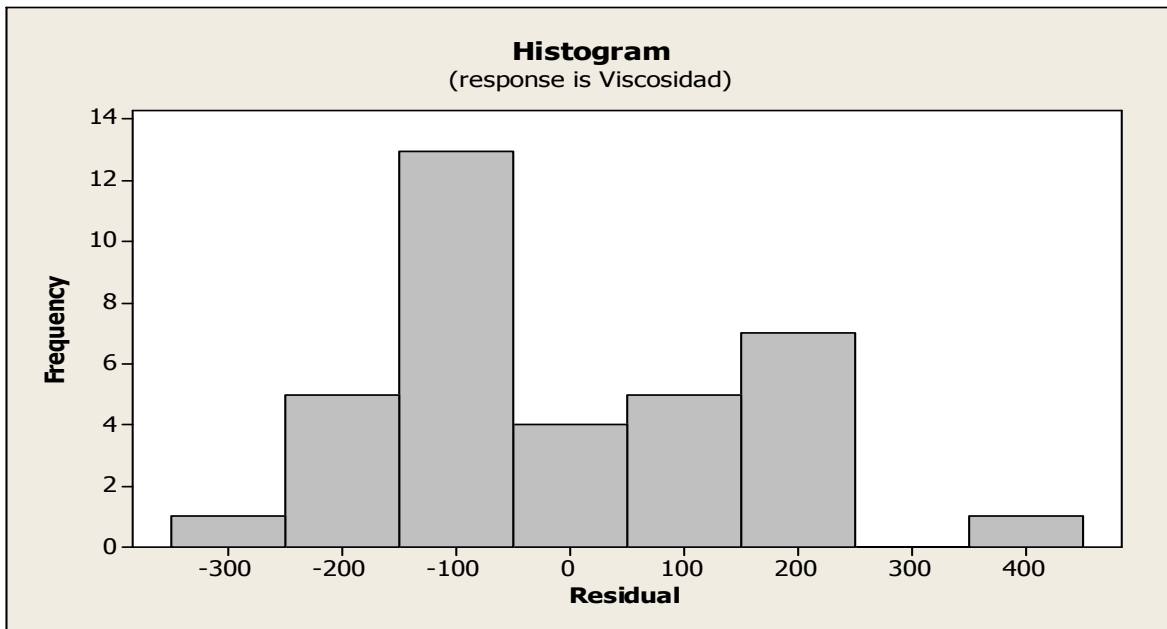


Figura 4.11 Histograma de los residuales de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de guayaba.

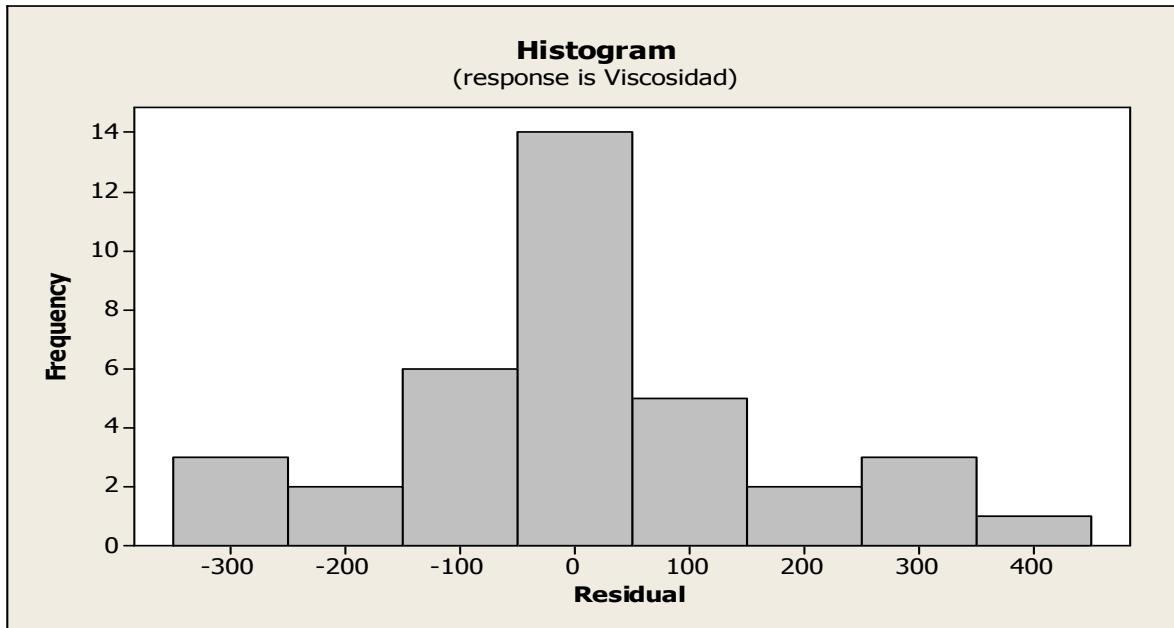


Figura 4.12 Histograma de los residuales de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de papaya.

De acuerdo a las graficas que van desde la 4.3 hasta la 4.12, se puede deducir que las que presentan una mejor distribución en cuanto a los efectos, normalidad y residuales de la variable de respuesta son las referidas a los experimentos realizados con concentrado enzimático de papaya, donde a medida que se aumentaban las concentraciones de jugo y de enzima, disminuía la viscosidad.

Con la finalidad de corroborar lo dicho anteriormente, se realizó un diseño experimental decisivo también de 3^2 , empleando el jugo de parchita sólo concentrado enzimático de papaya, aumentando las cantidades de este, como se muestra en la Tabla C.7

Al realizar el segundo ensayo de papaya y comparar los valores de la tabla C.7 con los de las propiedades iniciales, contempladas en la Tabla C.6, se observa que hubo una disminución de la viscosidad en la mayoría de las interacciones, lo que quiere decir que el uso del concentrado de esta fruta es eficaz para la clarificación del jugo de parchita.

Como se puede observar en la Figura 4.13 existe una mejor interacción entre las variables de estudio, pues se visualiza la intersección de cada una de las rectas entre sí, mientras que la Figura 4.14 muestra dos valores fuera de rango en 1 y 6, sin embargo esto no implica problemas graves en cuanto a la normalidad.

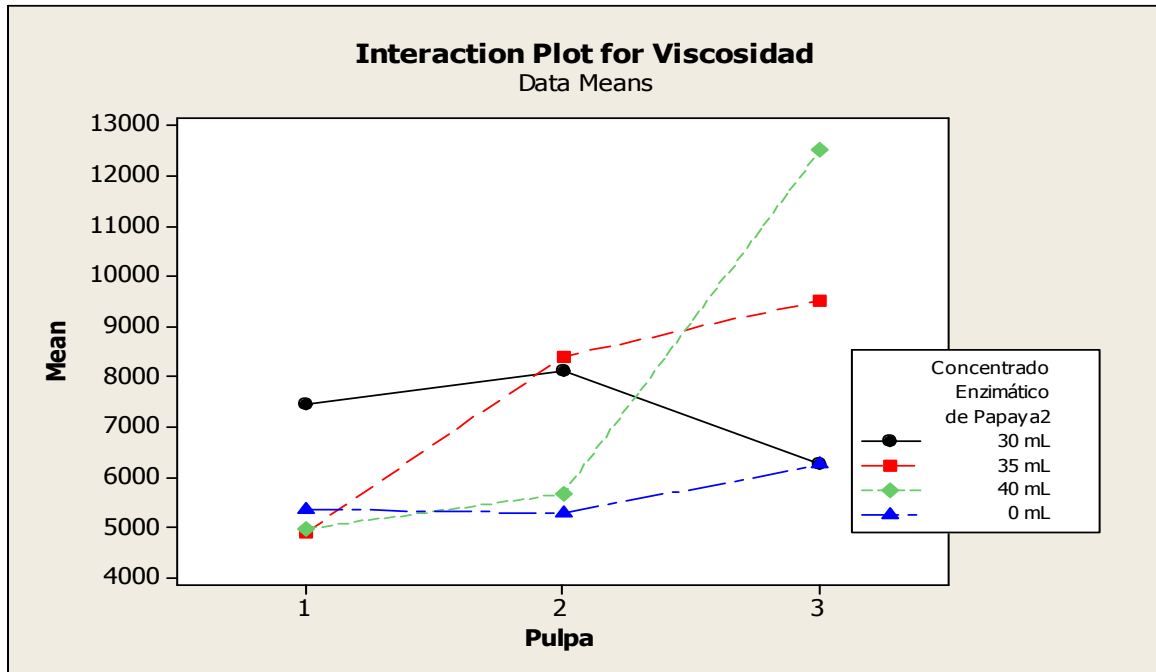


Figura 4.13 Efectos principales sobre la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de papaya (diseño experimental decisivo).

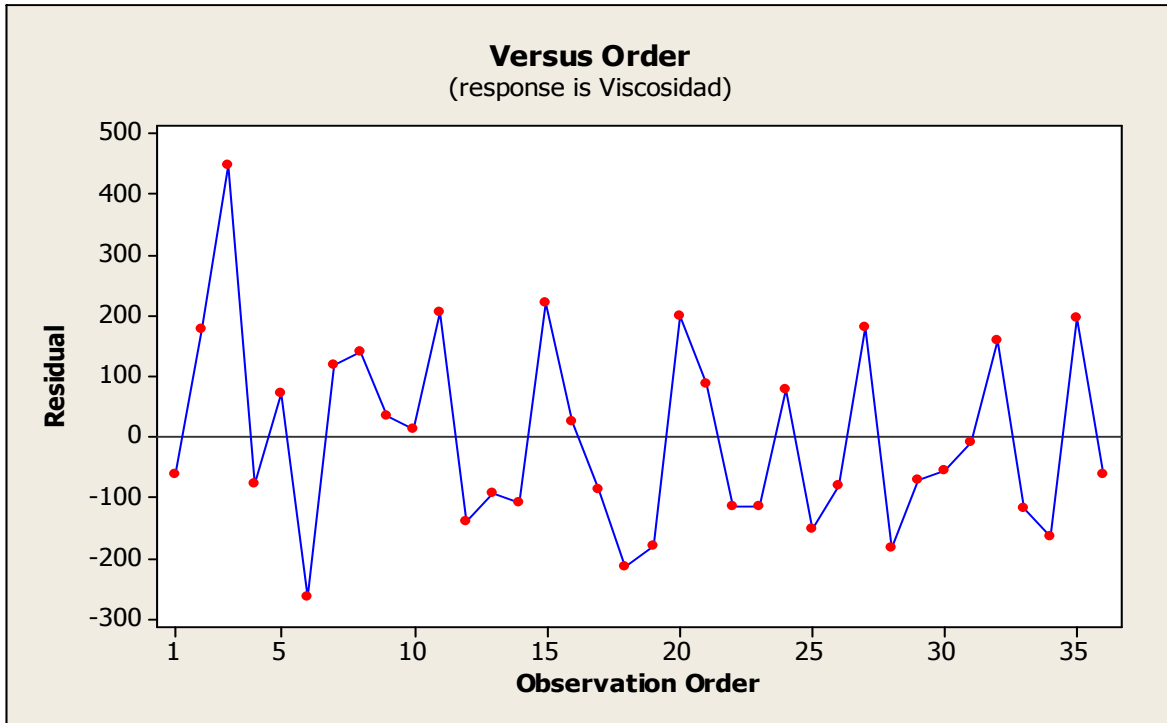


Figura 4.14 Gráfico de los residuales versus el orden de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de papaya (diseño experimental decisivo).



Las Figuras 4.15, 4.16, y 4.17 al igual que las primeras tratadas con concentrado enzimático de papaya no reflejan problemas graves en cuanto a la normalidad, pues la variable de respuesta muestra un comportamiento muy similar a las obtenidas del primer experimento.

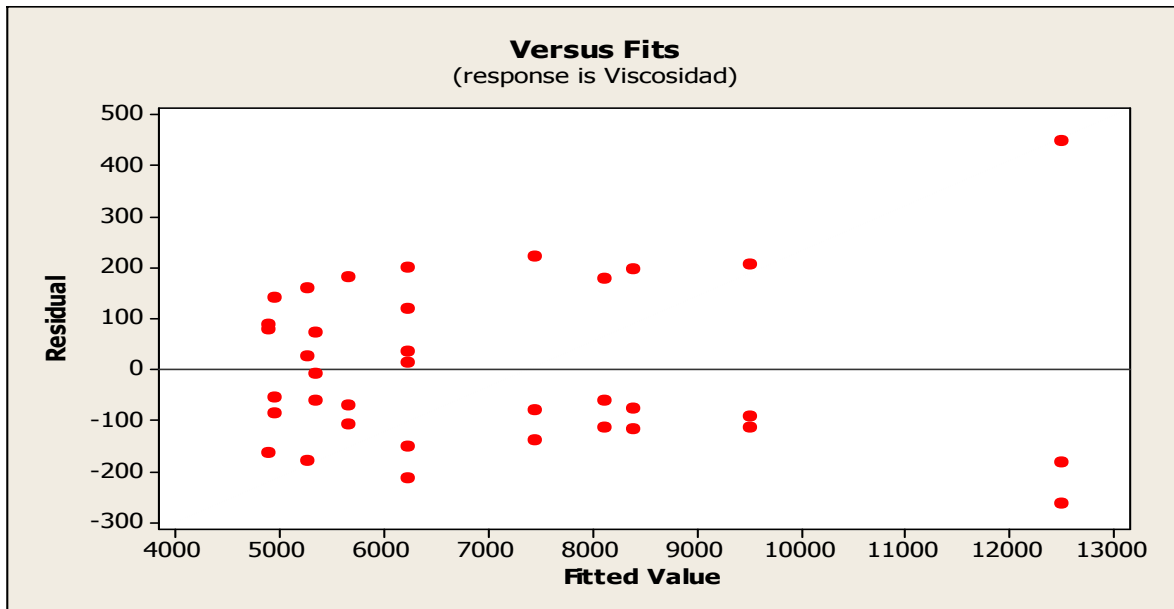


Figura 4.15 Gráfico de Residuales versus los valores predichos de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de papaya (diseño experimental decisivo).

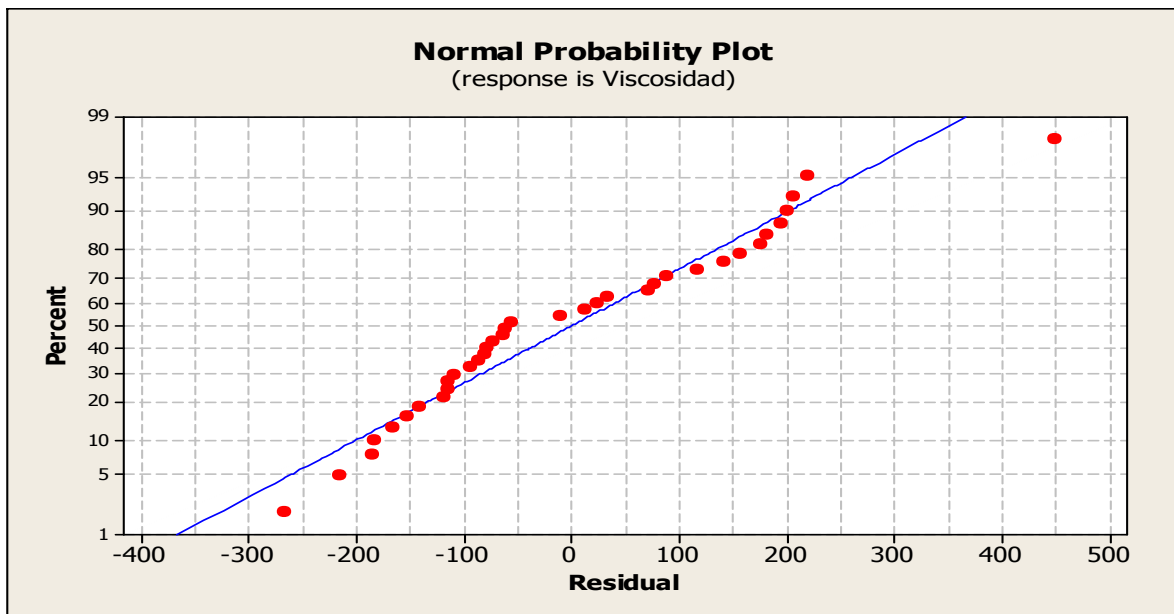


Figura 4.16 Probabilidad normal de los residuos sobre la viscosidad del jugo de parchita(diseño experimental decisivo).

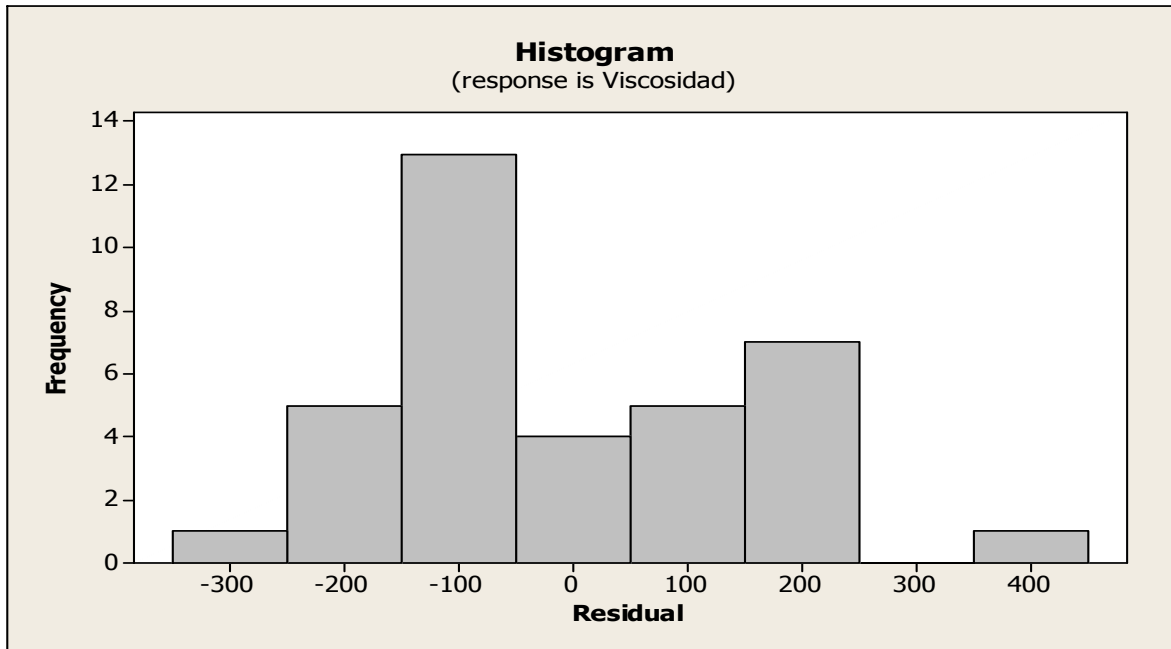


Figura 4.17. Histograma de los residuales de la viscosidad del jugo de parchita empleando concentrado enzimático de papaya (diseño experimental decisivo).

6.4 Formular un jugo clarificado de frutas a partir del concentrado enzimático preparado.

Luego de realizar la evaluación sensorial preliminar, se concluyó que el mejor sabor del jugo se logró al agregar 40 g de azúcar, observándose en la Tabla 4.4 que los grados Brix se encuentran dentro del rango requerido por la norma COVENIN (1031-81) y Códex Alimentarius (CODEX STAN-2005).

Tabla 4.4 Análisis previo para la formulación del jugo clarificado

% v/v Pulpa de Parchita	Concentrado Enzimático de Papaya (mL)	Azúcar (g)	°Brix
40	35	40	33,76
45	40	40	34,75

Luego se prepararon las formulaciones de la tabla anterior sin el concentrado enzimático. Esto con el fin de corroborar la absorbancia de las muestras, empleando un

espectrofotómetro (Figura 4.18); lo que permitió conocer la turbidez de los jugos antes y después de la adición de concentrado. Los resultados se contemplan en la Tabla 4.5, donde se puede apreciar mayor grado de disminución de la turbidez para el jugo de parchita de 45% v/v, que contenía 40 mL de concentrado enzimático de papaya.

La formulación para preparar 100 mL de jugo clarificado, quedó como se muestra en la tabla 4.5 de acuerdo a lo establecido por la noma CODEX STAN 247-2005.

Tabla 4.5. Valores de absorbancia de los jugos.

% v/v Pulpa de Parchita	Concentrado Enzimático de Papaya (mL)	Absorbancia
40	0	1,9533
	35	1,6175
45	0	1,9561
	40	1,2050



Figura 4.18 Espectrofotómetro empleado para medir la absorbancia para apreciar la turbidez de los jugos.



Tabla 4.6 Formulación para preparar 100 mL de jugo clarificado.

% v/v Pulpa de Parchita	Pulpa de Parchita (mL)	Agua (mL)	Concentrado Enzimático de Papaya (mL)	Azúcar (g)
45	45	55	40	40

Se realizó un ensayo de espectrometría de masas (Figura 3.3), para así determinar la composición del concentrado enzimático, lo cual arrojó que este no presentaba trazas de reactivos y así, el jugo puede ser consumido (Figuras C.1 y C.2).

6.5 Evaluar las características sensoriales del jugo clarificado de frutas.

Lyria (2007) indica que: “la evaluación sensorial de los alimentos es una disciplina científica usada para evocar, medir, analizar e interpretar reacciones hacia las características de los alimentos y materiales. Al consumir un alimento se estimulan diferentes sentidos:

- Estímulos visuales: color, forma, brillo del alimento.
- Estímulos olorosos percibidos por el epitelio olfativo: aromático, fetídico, ácido
- Estímulos gustativos percibidos por las papilas gustativas: dulce, salado, agrio, ácido.

La evaluación sensorial también nos proporciona información sobre la calidad de los alimentos evaluados y las expectativas de aceptabilidad de parte del consumidor”.

Las pruebas afectivas o hedónicas se refieren al grado de preferencia y aceptabilidad de un producto. Este tipo de pruebas nos permiten no sólo establecer si hay diferencias entre muestras, sino el sentido o magnitud de la misma. Esto nos permite mantener o modificar la característica diferencial (Lyria, 2007).

Consiste en pedirle a los panelistas que den su informe sobre el grado de satisfacción que tienen de un producto, al presentársele una escala hedónica o de satisfacción, pueden ser verbales o gráficas, la escala verbal va desde me gusta muchísimo hasta me disgusta muchísimo, las escalas deben ser impares con un punto intermedio de ni me gusta ni me disgusta (Hernández, 2005).



Se realizó una evaluación sensorial de tipo hedónica de escala verbal empleando una escala de 0 a 9 puntos. Se implementó en 10 individuos no entrenados, cuyos resultados son los mostrados en las Figuras C.8 y C.9, sin concentrado y con concentrado enzimático, respectivamente.

El jugo tuvo una calificación promedio, lo cual pone de relieve mayor aceptabilidad de los jugos con adición enzimática, al poseer un mayor valor promedio en la escala hedónica (Hernández, 2005). Obteniéndose un promedio de 8 para la escala hedónica del jugo con concentrado enzimático y 7, para el jugo sin concentrado.

En lo concerniente al sabor del jugo, como se aprecia en la Figura 4.19 se estima que el valor promedio obtenido para esta característica, sin concentrado es de 8, es decir, la mayoría de las personas integrantes de panel dieron como respuesta “me gusta mucho”. Mientras que para el jugo con concentrado el valor en esta escala disminuyó pues el valor promedio de 7, “me gusta moderadamente”, lo que quiere decir que hubo cierta variación en el sabor del jugo debido a la adición del concentrado enzimático.

Ahora bien con respecto al olor, como se aprecia en la Figura 4.20, a pesar de identificarse un aumento en la percepción de las fragancias propias de las frutas, agradó más el jugo que no contenía concentrado enzimático. Al jugo con concentrado agregado, se sentía un ligero aroma de la papaya, esto es debido a la adición de cloruro de sodio al ocurrir permeabilización de la membrana celular, generando así un medio acuoso como mecanismo de transporte para la liberación de aceites esenciales, terpenos, taninos y polifenoles a la superficie, permitiendo un mayor grado de detección de los aromas por el sentido del olfato (Rubín y Mejjide, 2011).

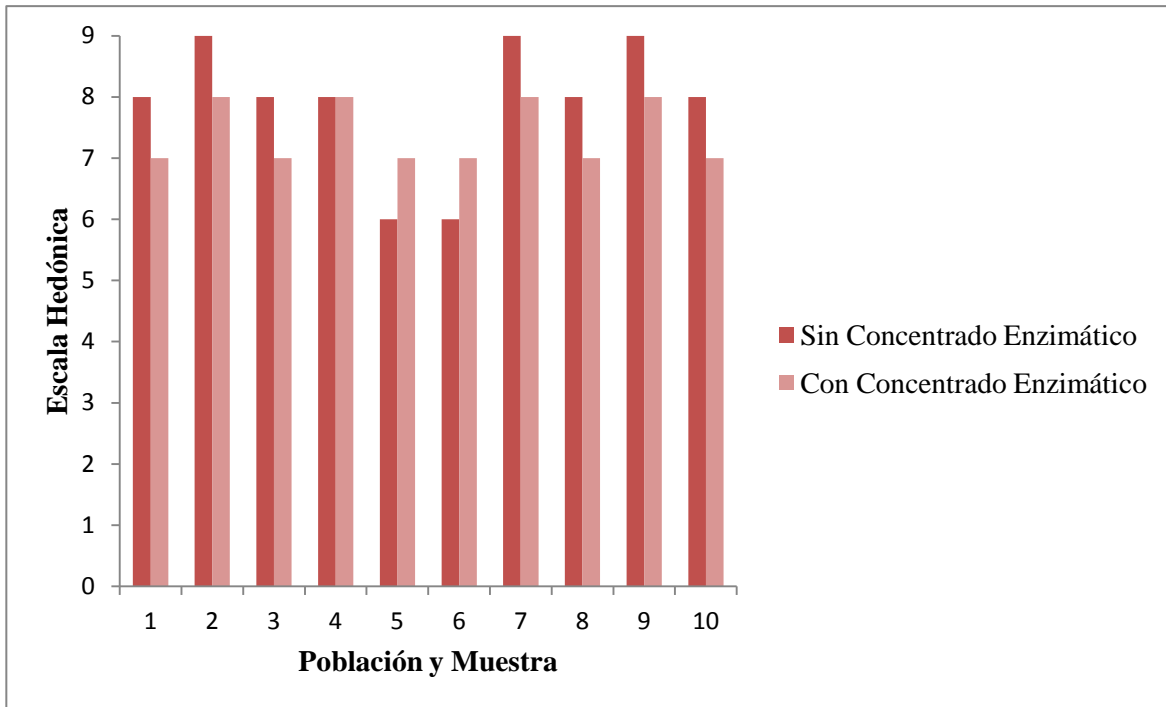


Figura 4.19 Evaluación del sabor para el jugo de parchita 45% v/v.

En el aspecto referente a la evaluación del color y apariencia, el resultado obtenido por el jugo con concentrado enzimático tuvo mayor receptividad, así como se contemplan en las Figuras 4.21 y 4.22, respectivamente. Se observó un mejoramiento en la apariencia, disminución de la turbidez, es decir, un buen aspecto visual, gran limpidez, transparencia y color, que es causado por la acción de las enzimas pécticas que presentan efectos beneficiosos, pues mejoran el brillo y luminosidad de producto final (Gonzales *et al.*, s.f.).

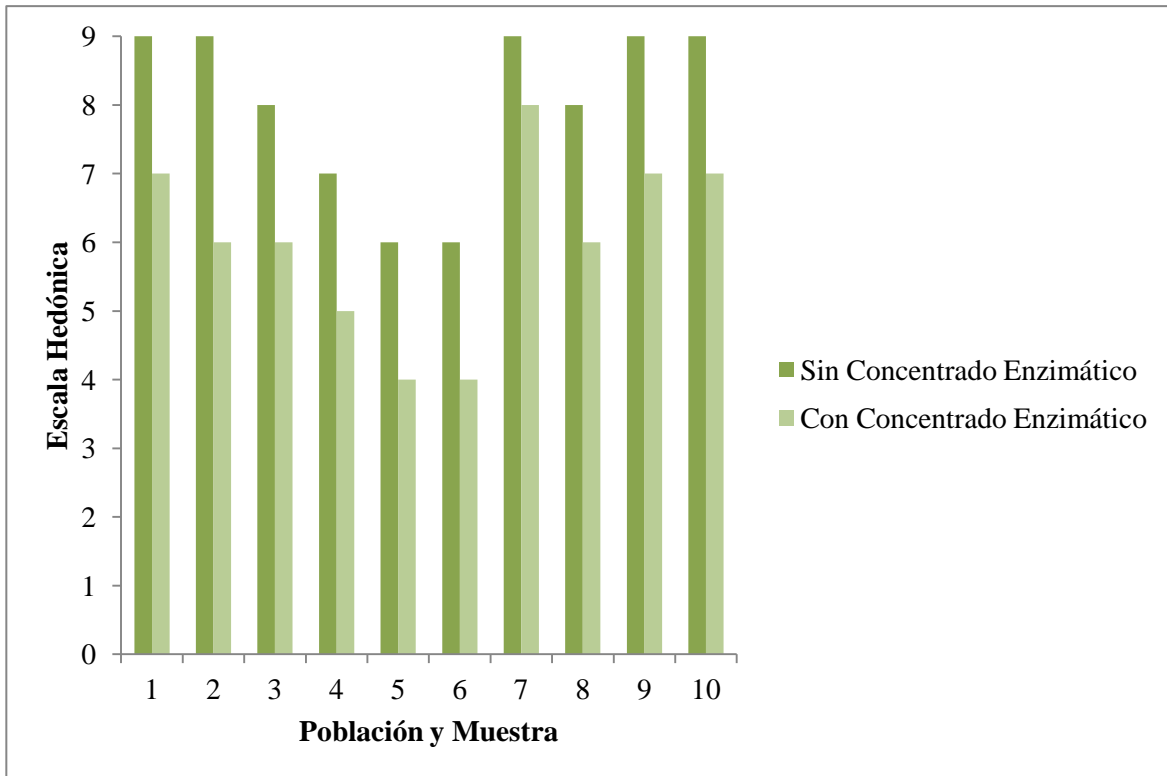


Figura 4.20 Evaluación del olor para el jugo de parchita 45% v/v.

La disminución en el efecto de textura en el jugo con adición de concentrado enzimático, al compararse con el jugo sin concentrado enzimático, lo que concuerda con lo mencionado por Rubín y Meijide (2011): “dado que el cambio de textura del jugo es consecuencia de la inhibición del poder gelificante que poseen los hidrocoloides (Costa, 2010), como lo es la pectina, capacidad catalizada por acción enzimática, de esta forma, al desesterificar este sustrato disminuye la textura”.

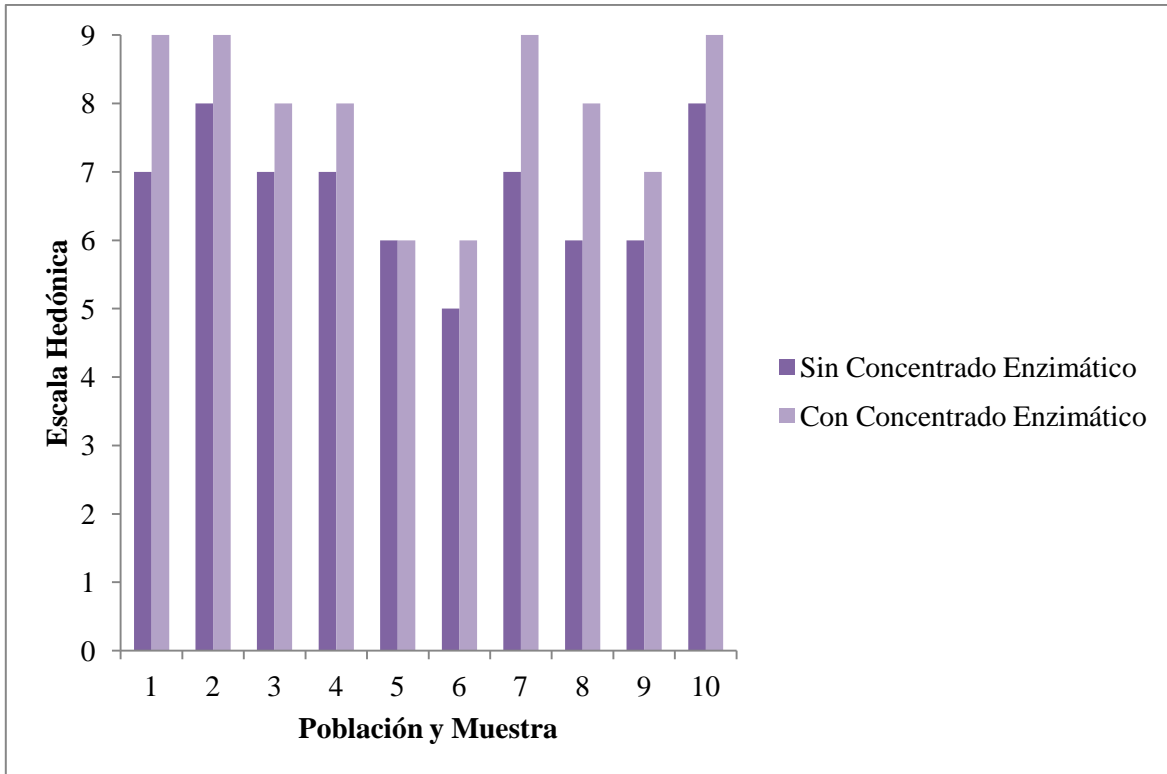


Figura 4.21 Evaluación del color para el jugo de parchita 45% v/v.

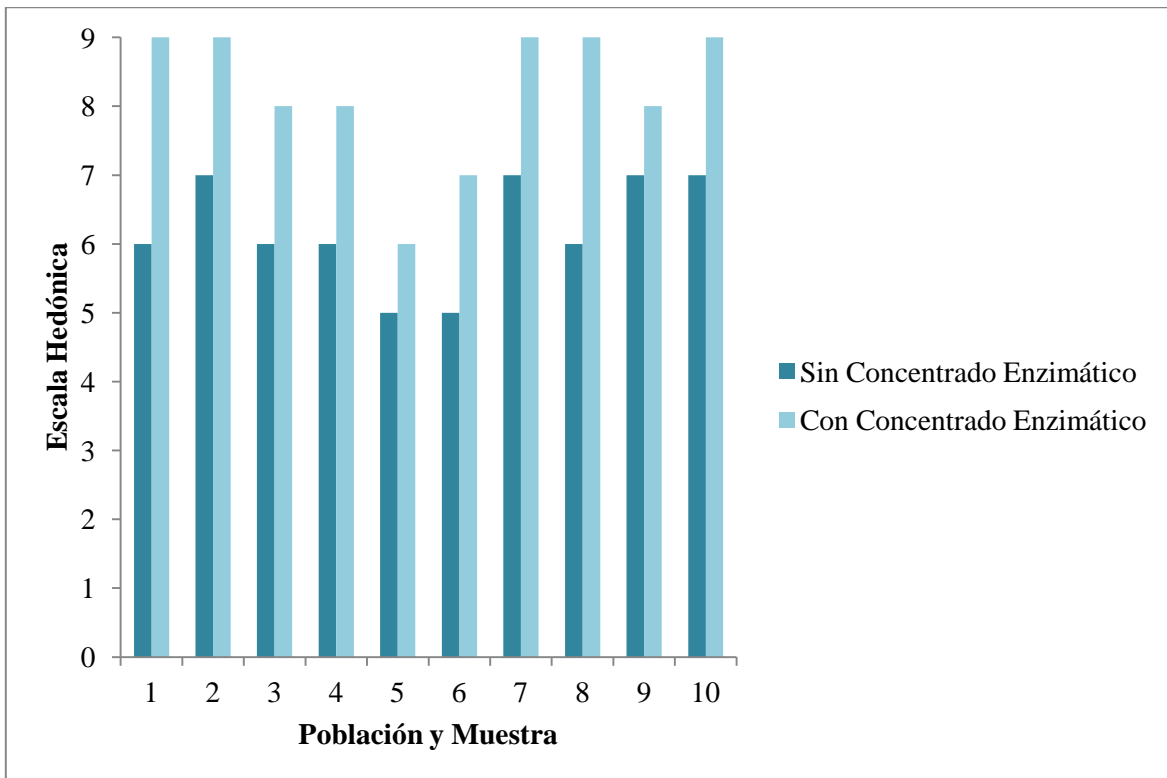


Figura 4.22 Evaluación de la apariencia para el jugo de parchita 45% v/v.

El empleo de enzimas pectinolíticas presenta efectos beneficiosos, ya que mejora el brillo y la luminosidad del producto final (Brillouet, 1990), al eliminar las causas de la turbidez, ya que las pectinas pueden llegar a suponer el 50% de la sustancia coloidal, y que su destrucción facilita la precipitación de proteínas, polímeros fenólicos y en menor medida de ácidos urónicos (Gonzales *et al.*, s.f.).

El cambio de color se puede apreciar en la Figura 4.22.

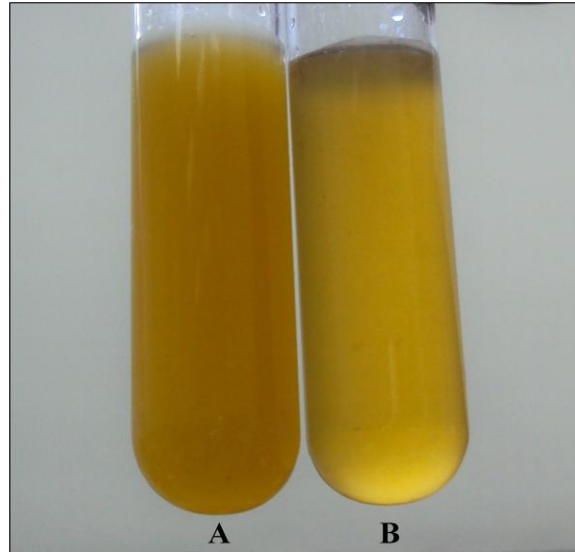


Figura 4.22 Cambio en el color del jugo con la adición del concentrado enzimático. (A, jugo sin adición de concentrado enzimático. B: con concentrado enzimático).

6.6 Determinar los costos asociados a la extracción del concentrado así como de la elaboración de jugo preparado.

6.6.1 Costos a nivel experimental para la extracción de 50 mL de concentrado enzimático.

Primeramente, se investiga en el mercado los precios de la guayaba y papaya, materia prima para la obtención del concentrado enzimático, los cuales se contemplan en la Tabla 4.25 con el costo asociado a la materia prima para realizar la extracción de 50 mL de concentrado cada fruta, resaltando que para eso se necesitan 60 g por cada una de estas.



Tabla 4.7 Costos asociados a la materia prima para obtener 50 mL de concentrado enzimático por cada fruta.

Materia Prima	Precio (BsF/kg)	Cantidad requerida (kg)	Total (BsF)
Guayaba	15,50	0,006	0,09
Papaya	17,50	0,006	0,10

Para el caso de los costos asociados a los reactivos empleados, se realiza de la misma manera anterior, sólo que estos han sido cotizados por la proveedora Scientech C.A. ubicada en Guacara - Edo. Carabobo. A continuación se muestran los valores tabulados por cada fase del proceso de extracción:

Tabla 4.8 Costo asociado al reactivo utilizado en la eliminación de fenoles para obtener 50 mL de concentrado enzimático por cada fruta.

Reactivo	Precio (BsF/L)	Cantidad requerida (L)	Total BsF
Acetona	350	0,006	2,10

Tabla 4.9 Costo de los reactivos involucrados en la preparación la solución para la extractora.

Reactivo	Precio (BsF/kg)	Cantidad requerida (kg)	Total BsF
NaCl	150	0,0053	0,90
NaOH	270	0,008	2,16

Tabla 4.10 Costo asociado al reactivo utilizado en la purificación del concentrado.

Reactivo	Precio (BsF/kg)	Cantidad requerida (kg)	Total BsF
Sulfato de amonio [(NH ₄) ₂ SO ₄]	300	0,009	2,70



Luego, al aplicar la ecuación con los datos obtenidos anteriormente, se consigue el costo total asociado a la extracción del concentrado por cada fruta, estos valores se muestran en la tabla 4.11.

Tabla 4.11 Costo total a nivel experimental para obtener 50 mL de concentrado enzimático.

Concentrado enzimático	Costos asociados a la materia prima (BsF)	Costos asociados a los reactivos (BsF)	Costo Total (BsF)
Guayaba	0,093	7,86	7,90
Papaya	0,105	7,86	7,90

Para obtener los costos asociados de 100 mL de jugo clarificado, se realiza de la misma manera que para obtener el concentrado. En las tablas 4.12 y 4. 13, se muestran el costo de materia prima y de los ingredientes, respectivamente.

Tabla 4.12 Costos asociados a la materia prima para obtener 100 mL de jugo clarificado al 45% v/v.

Materia Prima	Precio (BsF/kg)	Cantidad requerida (kg)	Total BsF
Parchita	20	0,135	2,70

Tabla 4.13 Costos asociados a los ingredientes para obtener 100 mL de jugo clarificado.

Materia Prima	Precio (BsF/kg) ó (BsF/L)	Cantidad requerida (kg) ó (L)	Total BsF
Agua	8,96	0,055	0,50
Azúcar	9	0,004	0,030

Tabla 4.14 Costo total a nivel experimental para obtener 100 mL de jugo clarificado con concentrado enzimático de papaya.

Costos asociados a la materia prima (BsF)	Costos asociados a los ingredientes (BsF)	Costos asociados al concentrado enzimático (BsF)	Costo Total (BsF)
2,7	0,5288	7,965	11,20



Por otra parte, se investigó el precio de las membranas de ultrafiltración, con el fin de establecer una comparación en líneas generales de cómo serían los costos al clarificar un jugo de dicha manera y de la forma planteada en esta investigación. En QuimiNet.com, se encontró que en México, el precio estimado para membranas de ultrafiltración con una fecha de validez del 03 de mayo de 2012 al 03 de junio de 2012, era igual a 3000 pesos mexicanos (MXP) / Litros.

Ahora bien, tomando en cuenta que $1 \text{ MXP} = 0,072291 \$$ y que $1 \$ = 4,30 \text{ BsF.}$, se realizó la conversión correspondiente, ver sección A.3.2, donde resultó que el costo para clarificar 100 mL de jugo empleando las membranas, es igual a 93,255 BsF. Es decir, un valor muchísimo más elevado que el obtenido empleando enzimas pécticas.

Sin embargo, queda como recomendación, realizar un estudio económico y comparativo a profundidad entre ambos métodos de clarificación, y estudiar la factibilidad a escala piloto de implementar una planta productora de jugos clarificados con enzimas pécticas.



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A continuación se muestran las conclusiones más importantes que se derivaron de los resultados obtenidos en la presente investigación, así como las recomendaciones necesarias que sirvan de base para una investigación futura.

CONCLUSIONES

1. El cloruro de sodio (NaCl) puede llegar a tener un efecto de inhibición en altas concentraciones. Por ello esta investigación se empleó a 1,5 M y resultó ser eficaz.
2. El pH óptimo para la extracción del concentrado enzimático es 7,8.
3. Las concentraciones de las soluciones titulantes de NaOH que mostraron los valores más altos para la actividad enzimática fueron 0,001N y 0,0004 N para la guayaba y papaya, respectivamente.
4. El mejoramiento del método permitió obtener actividades enzimáticas más altas que las reportadas en otra investigación donde emplearon el mismo método para las mismas frutas.
5. La viscosidad del jugo obtenida aplicando concentrado enzimático de papaya fue mayor que la obtenida utilizando concentrado enzimático de guayaba.
6. Existe un efecto importante entre la cantidad de pulpa y la cantidad de concentrado enzimático sobre la viscosidad.
7. Las gráficas obtenidas del diseño experimental indican que no existen problemas graves de normalidad entre las variables estudiadas.
8. El concentrado enzimático de papaya resultó ser mejor agente clarificante que el concentrado de guayaba.
9. La mejor formulación del jugo se obtuvo para 45% v/v en pulpa de parchita.
10. El jugo es apto para consumo ya que no contiene trazas de reactivos.
11. El jugo sin concentrado enzimático obtuvo valores mayores en cuanto al sabor comparado con el jugo con adición de concentrado enzimático.
12. El olor del jugo se presentó un leve aroma a papaya.
13. Se observó un mejoramiento en la apariencia y una disminución en la turbidez al jugo que contenía el concentrado enzimático.



14. El costo total de extracción de 50 mL de concentrado enzimático de papaya en el laboratorio es de 7,90 BsF.
15. El costo para la preparación de 100 mL de jugo clarificado en el laboratorio es 11,20 BsF

RECOMENDACIONES

- La obtención de la materia prima debe realizarse de forma fresca, para prevenir posibles reacciones oxidación y pardeamiento enzimático.
- Realizar la purificación del concentrado enzimático mediante una liofilización.
- Verificar mediante una cromatografía la presencia de las enzimas de interés.
- Conservar el extracto enzimático criogenizado o en condiciones que no provoquen la desnaturalización de las enzimas.
- Verificar la disminución de la turbidez midiendo la absorbancia del jugo, mediante un espectrofotómetro, realizando una curva de calibración para una mayor apreciación de los resultados obtenidos. O en su defecto, haciendo uso de un turbidímetro.
- Realizar un estudio de factibilidad a escala piloto para emplear una planta productora de jugos clarificados con enzimas pécticas.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilera, C.; (2003), **Cinética de inactivación enzimática y de degradación de sabor en función de la temperatura en jugo de piña**. Tesis pregrado. Universidad de Puebla. México.
2. Argáiz, A. y López-Malo, A., (1996), **Kinetics of first change on flavour, cooked flavour development and pectinesterase inactivation on mango and papaya nectars and purees**. *Fruit Processing* 6: 148-150.
3. Arteiro, J.; Freixo, M.; Karmali, A.; (2008), **Production of polygalacturonase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and its chromatographic behavior on immobilized metal chelates**. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (2008) 35:475–484.
4. Ashurst, P.; (2005), **Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices**. Second Edition. Blackwell Publishing. United Kingdom.
5. Badui, S. (2006), **Química de los Alimentos**. México, Pearson, (4 Ed) 301-362.
6. Bates, R.; Morris, J.; Crandall, P.; (2001), **Principles and practices of small - and medium - scale fruit juice processing**. Food Science and Human Nutrition Department University of Florida. FAO Agricultural Services Bulletin 146. United States.
7. Berradre, M.; Sulbarán, B.; Ojeda, G.; Fernández, V.; Martínez, J.; (2011), **Formulación y caracterización de bebida a base de jugo de uva de la variedad Malvasía**. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 2011, 28: 242-259. Universidad del Zulia. Venezuela.
8. Blank, L.; Tarquin, A.; (1999), **Ingeniería Económica**. Cuarta Edición. Editorial Mc Graw Hill. Colombia.
9. Bravo, C.S (1981), **Caracterización de las sustancias pécticas y enzimas pécticas de la lechosa (*Carica papaya* L) y su relación con la gelificación de la pulpa**. Vol. 126p. VE-UCV/FA. Maracay, Venezuela.
10. Cancino, B.; Ruby, R.; Astudillo, C.; (sf). **Clarificación de jugo de uva por microfiltración**. Escuela de Alimentos. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Waddington 716, Valparaíso, Chile. CREAS, Centro de Estudios de Alimentos Saludables.



11. Carrera, J.; (2003), **Producción y aplicación de enzimas industriales**. Facultad de **Ciencias Agropecuarias**, Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad del Cauca. Popayán Grupo de investigación Asubagroin. Vol 1 No.1. pp: 9-15.
12. Cerón, Á., Salamanca, C. y Martan, J. (2009), **Enzimas en la industria Alimentaria**. Tesis doctoral. Universidad del valle Cali, Colombia.
13. Codex alimentarius. Norma general del codex para zumos (jugos) y néctares de frutas (CODEX STAN 247-2005)
14. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) (1981). Néctares y frutas. Consideraciones generales.
15. Contreras, J.; (2003), **Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii***. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
16. Corporación Colombia Internacional (s.f.). **Maracuyá**. [Página web en línea]. Disponible en:
http://www.cci.org.co/cci/cci_x/Sim/Perfil%20de%20Productos/perfil%20producto%2019%20final.pdf. Consultado el: 20/01/2012.
17. De Rivas, A.; De Valles, Y.; (1984), **Evaluación sensorial de los alimentos**. Segunda edición. Yaracuy. Venezuela. Pp 15
18. Del Monte Andina. **Del Monte lanza jugo de manzana 100% clarificado**. [Artículo en línea]. Disponible en:
<http://www.delmonte.com.ve/Noticias/tabid/76/EntryId/59/Del-Monte-lanza-Jugo-de-Manzana-100-Clarificado.aspx>. Consultado el: 30/11/2011.
19. Del Villar, A.; Menéndez, O.; Campo, M. (2006), **Cambios en la actividad de la α -amilasa durante la maduración maracuyá amarillo (*Passiflora Edullis Flavicarpa degener*)**. Vol. 31 Red de revistas científicas, America Latina y el Caribe. España y Portugal.
20. Dueñas, Y.M; Narvaéz C.E; Restrepo L.P. (2007), **Inhibición de lesiones por frío de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) a través del choque térmico: catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas**. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. No.45-03, Bogotá
21. Espinal, M., (2010), **Capacidad antioxidante y ablandamiento de la guayaba Palmira**. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.



22. Fernandez, A.; Florez, L.; Martinez, N.; **Hidrólisis enzimática de sólidos insolubles de la pulpa de maracuyá**. Departamento de Ingeniería de Alimentos. Universidad del Valle. Colombia. Universidad politécnica de Valencia. España.
23. Flickinger, M.; Drew, S.; (1999), **Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation**. Volumes 1-5. Wiley-Interscience. Editorial Board. United States of America. pp 1031, 1056,
24. Flores, E.; (2004), **Desarrollo de una Bebida Funcional de Maracuyá (Passiflora edulis f. flavicarpa)**. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas Puebla. México. [Artículo línea]. Disponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mca/flores_a_e/portada.html. Consultado el: 11/12/2011.
25. Girard, B.; Fukumoto, L. R. (2000), **Membrane Processing of Fruit Juices and Beverages: A Review, Critical Review in Food Science and Nutrition**, 40:2 pp 91-157.
26. Gómez, O.; (2004), **Dependencia en la temperatura de los cambios en atributos sensoriales, degradación de ácido ascórbico e inactivación enzimática durante el tratamiento de pasteurización en puré y néctar de tamarindo**. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas Puebla. México. [Artículo línea]. Disponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mca/gomez_p_o/portada.html. Consultado el: 17/12/2011.
27. Gonzalez, M.; Izcara, E.; Pérez, S.; Revilla, I. (s.f), **Efecto del uso de enzimas pectinolíticas sobre los aspectos tecnológicos y visuales de mostos e vinos**. X Congreso Brasileño de Viticultura y Enología, Universidad de Burgos. España.
28. Guevara, M.; (1997), **Regulación de Síntesis de Enzimas Pécticas en Fusarium oxysporum f. sp. radialis lycopersici. Purificación y Caracterización de Pectin y Pectato Liasas**. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas. Madrid.
29. Gutierrez, G.; Barbosa, G.; (2003), **Food Science and Food Biotechnology**. CRC Press.
30. Harisha, S.: (2007), **Biotechnology procedures and experiments handbook**. Infinity Science press llc. India.



31. Hernandez, E. (2005), **Evaluación sensorial**. Universidad Nacional Abierta y a distancia – UNAD. Bogotá. Pp 85-86
32. Hodge J. y Osman E., (1976). **Carbohydrates**. In O.R. Fennema, Editorial. Food Chemistry. Marcell Dekker. New York. pp 47.
33. Itescam, Enzimas. [Página Web en línea]. Disponible en: [http //www.itscam.edu.mx](http://www.itscam.edu.mx) [Consulta: 2012, Enero]
34. Jiménez, A. (2003), **Diseño de Procesos en Ingeniería Química**. Vol. 1. Editorial Reverté. Mexico.
35. Kemp, S.; Hollowood, T; Hort, J.; (2009), **Sensory Evaluation A practical handbook**. Editorial offices. Wiley-Blackwell. United Kingdom. pp 118-120, 130-136.
36. Kertsz, Z., (1944) **The pectin substances**. Interscience, New York.
37. Lawless, H.; (2010). **Sensory Evaluation of Food**. Springer.
38. León, G.; Rosero, E.; (2009), **Obtención de jugo clarificado de uvilla (physalis peruviana. l.), utilizando degradación enzimática y microfiltración tangencial**. Tesis pregrado. Universidad Técnica del Norte. Ecuador.
39. Lescano, C.; Pinto, J., (2002), **Aplicación de la metodología de superficie de respuesta en la optimización del proceso de clarificación de jugo de manzana**. Anales científicos UNA. Volumen L. Perú. pp. 101-115.
40. Lopez, J.; Modrego, A.; (1994), **La Biotecnología y su aplicación industrial en España**. Universidad Carlos III. Páginas consultadas: 195-197.
41. Lyria, M., (2007), **Guía para la evaluación Sensorial de los alimentos**. Proyecto AgroSalud (CIDA 7034161). Lima.
42. Meijide, R.; Rubín G.; (2011), **Obtención de un concentrado de pectinasas utilizando fuentes vegetales de procedencia nacional**. Tesis pregrado. Universidad de Carabobo. Venezuela.
43. Mejia-Cordova, J.C; Montañez, M.L; Reyes, C.N. (2001), **Extracción y estabilidad térmica de la pectinesterasa de chile jalapeño (Capsicum annum L.)**. Departamento de Investigación de Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autonoma de Coahuila. A.P 252. Mexico.



44. Méndez, M.; (2006), **Evaluación de la estabilidad del vino de naranja (citrus Sinersis) usando como agente una enzima clarificante.** Tesis pregrado. Zamorano carrera de Agroindustria.
45. Mondal. K.; Malhotra S.P.; Jain V.;Singh R. (2009), **Partial purification and characterization of pectinmethylesterase from ripening guava (Psidium guajava L.).** fruits vol. 31: 81–87. Acta Physiol Plant. Haryana, India.
46. Nagodawhitana, T; Reed, G. (1993), **Enzymes in Food Processing.** Tercera Edición. Foodscience and technology. International series. pp 7-67/ 363-392
47. Narvaez, C.E; Castro, J.P; Restrepo L.P. (2006) **Polygalacturonase Activity in Yellow Pitaya Peel (Acanthocereus pitajaya).**Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
48. Nicemol, J.; Sukumaran, R.; Prema, P.; (2008), **Optimization of Enzymatic Clarification of Sapodilla Juice: A Statistical Perspective.** Appl Biochem Biotechnol (2008) 151, 353-363.
49. Norjana, I.; Noor, A. (2011), **Quality attributes of durian (Durio zibethinus Murr) juice after pectinase enzyme treatment.** International Food Research Journal. Vol. 18(3)
50. Padrón, C.; Moreno, M.; (2010), **Evaluación del Uso de Enzimas y Filtración por Gravedad para la Clarificación de una Mezcla Diluida de Pulpa de Frutos de Cactus (Opuntia boldinghii Britton & Rose), jugos de naranja y toronja.** Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín 63(1): 5429-5439. (2010).
51. Passifloras (Mayo, 2011). [Página web en línea]. Disponible en: <http://passiflora2.blogspot.com/2011/05/composicion-de-la-parchita-o-maracuya.html>. Consultado el: 12//01/2012.
52. Pilnik, W., Voragen, A., and D, (1975). **Enzymic liquefaction of fruits and vegetables.** Bogota. Flussigesn Obst 42(11): 448-451
53. Rivas, C.; (2010), **Microencapsulacion y estabilización enzimática del jugo de Chirimoya “Anona Cherimola Mil”.** Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. DF. México.



54. Rivas, N.; Alvarado, C.; Martínez, Z.; (2004), **Enzimas Pécicas en la Manufactura de Jugos de frutas y vegetales**. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Centro de Investigación y Estudios de Postgrado. Valencia. Venezuela.
55. Robles, J.; (s.f), **Obtención de zumo de berenjena (Solanum melangena) mediante el uso de la enzima poligalacturonasa**. Universidad Antonio Guillermo Urrelo. Cajamarca.
56. Rodríguez, J.; Narváez, C.; Restrepo, L.; (2006), **Estudio de la Actividad Enzimática de Poligalacturonasa en la Corteza de Pitaya Amarilla (Acanthocereus pitajaya)**. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química. Bogotá.
57. Sampieri, R; Collado, C; Lucio, P. (1997), **Metodología de la investigación**. Mcgraw Hill. México. pp 184-185.
58. Schilling, S.; Toepfl, S.; Ludwig M.; Dietrich, H.; Dietrich, K.; Neidhart, S.; Schieber, A.; Carle, R.; (2007), **Comparative study of juice production by pulsed electric field treatment and enzymatic maceration of apple mash**. Eur Food Res Technol (2008) 226:1389–1398.
59. Semenova, M.; Sinitsyna, O.; Morozova, V.; Fedorova, E.; Gusakov, A.; Okunev, O.; Sokolova, L.; Koshelev, A.; Bubnova, T.; Vinetskii, Yu.; Sinitsyn, A.; (2006), **Use of a Preparation from Fungal Pectin Lyase in the Food Industry. Applied Biochemistry and Microbiology**. Vol. 42, No. 6, pp. 598–602. MAIK “Nauka /Interperiodica”. Russia.
60. Silva, C; Silveira, M; Rivera, R; Zen, M. (2004), **Concentración de pectinasas por ultrafiltración con membranas de polisulfonas**. Vol. 5 Revista Iberoamericana de polímeros. Caxias do sul, Brasil.
61. Soriano, M. (2004), **Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos aislamiento y caracterización de las pectinasas pela de Paenibacillus sp. BP-23 E YvpA de Bacillus Subtilis**. Tesis doctorado. Universidad de Barcelona. España.
62. Wade, L., (2004), **Química Orgánica**. Quinta Edición. Pearson Prentice Hall. España, pp. 57-67,774-780.
63. Whitaker, J. (1994), **Principles of enzymology for the food sciences**. Segunda edición. Marcel Dekker. Inc. Davis, California. pp. 426-435.



64. Yegres, S., Sanchez J., Belmar, M., Riveros, W. y Belmar, D., (2001), **Producción de enzimas pécticas, ensayos preliminares.** Vol. 13. N° 1:55-59. Saber. Universidad de Oriente. Cumaná. Venezuela.



APÉNDICE A. CÁLCULOS TÍPICOS

A.1 Obtención del concentrado y determinación de la actividad enzimática

A.1.1 Determinación de la cantidad de Cloruro de sodio necesario para la preparación de la solución 1.5 M

Para determinar la cantidad de cloruro de sodio (NaCl) necesaria para preparar una solución de 1 L y de concentración 1.5 M, se empleó la ecuación 1:

$$g_{NaCl} = 1.5 \frac{mol}{l} * 58,48 \frac{g}{mol} * 1l = 87,72g$$

De esta manera se calculó los gramos necesarios para preparar las diferentes soluciones utilizadas en la extracción y en la medición de la actividad enzimática.

A.1.2 Cálculo de la actividad enzimática para pectinesterasa

A fin de obtener el valor de la actividad enzimática de la pectinesterasa, se empleó la ecuación 3, para la muestra A de guayaba, de la tabla C.1, se tiene:

$$\frac{UPE}{mL} = \frac{60 * \frac{0,01}{1000}}{30 * 10} * 10^6 = 0,80000 \frac{UPE}{mL}$$

Finalmente se tiene, que el valor de actividad enzimática para la muestra de guayaba 1 es:

$$UPE = (0,80000 \pm 0.0007) UPE$$

Los resultados para todas las muestras se encuentran contenidos en la tabla C.1 y C.2, para la guayaba y la papaya, respectivamente.



A.2 Medición de las características iniciales y finales de los jugos antes y después de la adición del concentrado enzimático.

A.2.1 Viscosidad

Cálculo de la viscosidad del jugo de parchita sin adición de concentrado enzimático

Para determinar la masa del jugo se utilizó la ecuación 6:

$$m_{\text{jugo}} = 43,557 - 18,371 = 25,186 \text{ g}$$

Seguidamente se determinó la densidad con la ecuación 5:

$$\rho_{\text{jugoparchita}} = \frac{25,186\text{g}}{25} = 1,00744 \frac{\text{g}}{\text{m}^3}$$

$$\rho_{\text{jugoparchita}} = 1,00744 * 1000 = 1007,44 \frac{\text{Kg}}{\text{m}^3}$$

Posteriormente se determinó la viscosidad utilizando el viscosímetro de Ostwald, bajo el modelo que se basa en la ley de Poisseuille.

Sustituyendo en la ecuación 5 las densidades del jugo de parchita y agua destilada a 20 °C, la viscosidad según la temperatura de referencia y los respectivos tiempos promedios de descenso y despejando la viscosidad del fluido de trabajo, se tiene:

$$\mu = \frac{1,007 \frac{\text{Kg}}{\text{m}^3}}{25} * \frac{5.23\text{s} * 4446,88\text{cP}}{1007,56 \frac{\text{Kg}}{\text{m}^3} * 4,393383\text{s}} = 1,00744 \frac{\text{g}}{\text{m}^3}$$

Procediendo de igual forma se determinó la viscosidad de todas las muestras.



A.3 Costos asociados a la extracción del concentrado enzimático

A.3.1 Costo a nivel experimental

La ecuación 7, permite determinar el costo individual de materia prima y reactivos. Al sustituir los valores para la guayaba, se tiene:

$$\text{Costo}(\text{guayaba}) = 0,006 \text{ Kg} * 15,50 \frac{\text{BsF}}{\text{Kg}} = 0,093 \text{ BsF}$$

Luego, se realiza una sumatoria de todos los costos asociados a nivel de laboratorio. Para la elaboración de 100 mL de jugo, se realiza del mismo modo.

A.3.2 Costo de membranas de ultrafiltración

Precio estimado de las membranas de ultrafiltración: 3000 MXP / Litros

Para realizar la conversión, es necesario conocer que:

$$1 \text{ MXP} = 0,072291 \$$$

$$1 \$ = 4,30 \text{ BsF}$$

Entonces, transformando las unidades, el valor expresado en BsF., queda de la siguiente manera:

$$\frac{3000\text{MXP}}{\text{L}} * \frac{0,072291\$}{1\text{MXP}} * \frac{4,30\text{BsF}}{1\$} * \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} = 0,93255 \frac{\text{BsF}}{\text{mL}}$$

Para obtener 100 mL:

$$\frac{0,93255\text{BsF}}{\text{mL}} * 100\text{mL} = 93,255\text{BsF}$$



APÉNDICE B. DATOS EXPERIMENTALES

En esta sección se muestran los datos experimentales recaudados a través de los instrumentos de recolección de datos para llevar a cabo los objetivos planteados.

Tabla B.1: Datos experimentales necesarios para la determinación de la viscosidad del jugo de parchita sin concentrado enzimático.

%v/v pulpa	Masa picnómetro lleno	Tiempo de descenso(s)
20	43,557	5,21
		5,34
		5,26
30	48,827	5,28
		4,95
		5,15
40	44,98	5,28
		4,95
		5,15

Tabla B.2 Datos experimentales necesarios para la determinación de la viscosidad del jugo de parchita con concentrado enzimático de guayaba.

%v/v pulpa	Masa picnómetro lleno	Tiempo de descenso(s)
20	43,557	7,67
		7,31
		7,36
	43,534	4,91
		4,90
		8,66
	44,072	4,92
		4,70
		4,73



Tabla B.2 (Continuación) Datos experimentales necesarios para la determinación de la viscosidad del jugo de parchita con concentrado enzimático de guayaba.

% v/v pulpa	Masa picnómetro lleno	Tiempo de descenso(s)
30	43,827	8,52
		8,21
		8,25
	44,055	5,55
		5,63
		5,35
	44,062	7,99
		7,71
		7,76
40	43,659	12,68
		11,98
		12,06
	43,298	6,13
		6,05
		5,87
	43,966	9,40
		9,40
		9,09



Tabla B.3 Datos experimentales necesarios para la determinación de la viscosidad del jugo de parchita con concentrado enzimático de papaya.

% v/v pulpa	Masa picnómetro lleno	Tiempo de descenso(s)
20	43,995	5,77
		5,44
		5,20
	44,049	5,07
		5,10
		5,16
	44,097	5,63
		4,90
		4,95
30	43,611	5,02
		4,96
		4,97
	44,224	5,51
		5,11
		5,13
	44,157	5,48
		5,30
		5,49
40	43,350	5,81
		5,80
		5,94
	44,325	6,09
		5,75
		5,52
	44,228	5,81
		5,77
		5,74



Tabla B.4 Datos experimentales necesarios para la determinación de la viscosidad del jugo de parchita con concentrado enzimático de papaya (experimento decisivo).

%v/v pulpa	Masa picnómetro lleno	Tiempo de descenso(s)
35	43,811	3,21
		3,27
		2,89
	44,279	3,11
		3,08
		3,07
40	44,902	3,64
		3,72
		3,57
	43,586	3,57
		3,20
		3,42
45	43,507	3,64
		3,72
		3,57
	44,090	3,37
		3,36
		3,45



APÉNDICE C. RESULTADOS EXPERIMENTALES

A continuación se presentan los resultados experimentales obtenidos en la realización de la investigación.

Tabla C.1 Resultados experimentales de la actividad de la enzima pectinesterasa en el concentrado de guayaba.

Muestra	Normalidad del NaOH (eq/L)	Volumen gastado de NaOH (μ L)	Volumen gastado de NaOH (mL)	Unidades de pectinesterasa, (UPE/mL \pm 0,0007)
A	0,0004	60000	60	0,8000
A	0,0004	59200	59,2	0,7893
B	0,009	1103,2	1,1032	0,9456
B	0,009	1400	1,4	1,0500
C	0,001	32000	32	1,0667
C	0,001	40000	40	1,3333
D	0,01	2695	2,695	0,9982
D	0,01	2700	2,700	1,0000
E	0,05	1065	1,065	0,5325
E	0,05	1430	1,43	0,7150

Tabla C.2 Resultados experimentales necesarios para determinar la actividad de la enzima pectinesterasa en el concentrado de papaya.

Muestra	Normalidad del NaOH (eq/L)	Volumen gastado de NaOH (μ L)	Volumen gastado de NaOH (mL)	Unidades de pectinesterasa, (UPE/mL \pm 0,0007)
A	0,0004		400	5,3333
A	0,0004		380	5,0667
B	0,009	10000	10	3,0000
B	0,009	11000	11	3,3000
C	0,001		110	3,6667
C	0,001		100	3,3333
D	0,01	3000	3	1,0000
D	0,01	4000	4	1,3333
E	0,05	1000	1	1,6667
E	0,05	1400	1,4	2,3333



Tabla C.3 Viscosidad del jugo de parchita sin concentrado enzimático.

Concentrado Enzimático (mL)	Pulpa (mL)	Viscosidad (cP)
0	20	5304,46
	20	5436,82
	20	5355,37
	30	5433,36
	30	5093,77
	30	5299,58
	40	6032,00
	40	6448,00
	40	6260,80

Tabla C.4 Interacciones para el diseño experimental del jugo de parchita utilizando el concentrado enzimático de guayaba.

Concentrado Enzimático (mL)	Pulpa (mL)	Viscosidad (cP)
25	20	7676,36
		7316,06
		7376,11
	30	8297,97
		8007,18
		8059,11
	40	6364,55
		6281,48
		6094,60
30	20	4994,46
		4984,28
		4740,16
	30	8595,60
		8282,85
		8323,21
	40	9725,84
		9725,84
		9405,10



Tabla C.4 (Continuación). Interacciones para el diseño experimental del jugo de parchita utilizando el concentrado enzimático de guayaba.

Concentrado Enzimático (mL)	Pulpa (mL)	Viscosidad (cP)
35	20	5111,63
		4883,06
		4914,23
	30	5592,52
		5845,41
		5554,70
	40	12962,18
		12246,60
		12328,38

Tabla C.5 Interacciones para el primer diseño experimental del jugo de parchita utilizando el concentrado enzimático de papaya.

Concentrado Enzimático (mL)	Pulpa (mL)	Viscosidad (cP)
25	20	5956,06
		5634,95
		5386,35
	30	5712,27
		5524,64
		5722,69
	40	6389,49
		6032,77
		5791,45
30	20	5262,76
		5293,90
		5356,18
	30	5121,97
		5060,75
		5070,96
	40	6072,93
		6031,12
		5999,77



Tabla C.5 (Continuación). Interacciones para el primer diseño experimental del jugo de parchita utilizando el concentrado enzimático de papaya.

Concentrado Enzimático (mL)	Pulpa (mL)	Viscosidad (cP)
35	20	5854,97
		5095,80
		5147,80
	30	5758,47
		5340,43
		5361,33
	40	5866,72
		5856,62
		5997,99

Tabla C.6 Viscosidad del jugo de parchita para el sin concentrado enzimático para el segundo diseño experimental con papaya.

Concentrado Enzimático (mL)	Pulpa (mL)	Viscosidad (cP)
0	35	3301,159
		3362,863
		2972,071
0	40	3684,515
		3302,646
		3529,703
0	45	3698,638
		3779,927
		3627,510

Tabla C.7 Interacciones para el segundo diseño experimental del jugo de parchita utilizando el concentrado enzimático de papaya 2.

Concentrado Enzimático (mL)	Pulpa (mL)	Viscosidad (cP)
30	35	3257,156
		3225,736
		3215,263
35	40	3679,683
		3394,279
		3445,244
40	45	3503,711
		3493,314
		3586,885



Figura C.1 Resultados arrojados por el espectrómetro de masas para el concentrado enzimático de papaya empleado en la formulación del jugo.

RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
2.365	5.53	E:\DATABASE\NIST08.L 1-Propanamine, 3-chloro-N,N-dimethyl- yl- 1-Propanamine, 3-chloro-N,N-dimethyl- yl- Acetamide, N-(2,6-dimethylphenyl)- 2-(ethylamino)-	9387 9384 63750	000109-54-6 000109-54-6 007728-40-7	64 59 59
2.754	13.44	E:\DATABASE\NIST08.L Silane, diethoxydimethyl- 3,3-Dimethyl-1-phenylazetidione-4-t hione Benzene, isothiocyanato-	22684 52351 15282	000078-62-6 096594-26-2 000103-72-0	38 30 30
3.995	36.63	E:\DATABASE\NIST08.L Ethyltetramethylcyclopentadiene (3-Fluorophenyl)carbamic acid, 2-isopropyl-5-methylphenyl ester 2-Cyclopenten-1-one, 4-hydroxy-3-methyl-2-(2,4-pentadienyl)-, (Z)-(+)-	23568 126853 42896	057693-77-3 1000305-07-5 000487-67-2	46 43 43
4.373	9.20	E:\DATABASE\NIST08.L Benzamide, 3-methoxy-N-[4-(1-methylcyclopropyl)phenyl]- Acetic acid, 4-(7-methylidenebicyclo[3.3.1]non-2-en-3-yloxy)butyl ester Benzenemethanol, .alpha.,.alpha.,4-trimethyl-	121959 108751 23469	1000351-11-1 1000272-02-4 001197-01-9	38 35 25
4.751	2.15	E:\DATABASE\NIST08.L Disiloxane, 1,3-diethoxy-1,1,3,3-tetramethyl- 1,2-Benzisothiazole-3-acetic acid, methyl ester Benzenemethanol, .alpha.,.alpha.,4-trimethyl-	76784 64499 23469	018420-09-2 029876-70-8 001197-01-9	43 35 18
7.400	2.96	E:\DATABASE\NIST08.L Bicyclo[2.2.2]hept-2-ene-5-thiocarboxylic acid, S-(2-thienyl) ester 5,6-Epoxy-2,2-dimethyloct-7-ene-3-yne O-Ethyl S-vinyl methylphosphonothioate	97574 23418 34579	255820-14-5 1000222-68-1 128869-81-8	40 38 33
7.520	6.27	E:\DATABASE\NIST08.L Cyclohexene, 4-ethenyl-1,4-dimethyl- 1- Limonene Bicyclo[2.2.1]heptane, 7,7-dimethyl-2-methylene-	15608 15483 15693	001743-61-9 000138-86-3 000471-84-1	86 64 60
8.699	12.06	E:\DATABASE\NIST08.L Benzhydrazide, N2-(2-methoxy-5-nitrobenzylidene)- Benzenebutanoic acid, .gamma.-oxo-, methyl ester N'-(3-Pyridinylmethylene)benzohydrazide	135734 52822 78725	349572-84-5 025333-24-8 1000331-90-9	38 38 37
9.500	11.77	E:\DATABASE\NIST08.L anti-10-Methyl-endo-tricyclo[5.2.1.0(2.6)]decane 5-Hydroxymethyl-1,1,4a-trimethyl-6-methylenedecahydronaphthalen-2-ol 3-Pyridinecarbonitrile, 2-nitro-	23601 88599 23094	1000215-29-5 1000191-00-4 105151-36-8	25 22 18



Figura C.2 Espectro de masas para el concentrado enzimático de papaya empleado en la formulación del jugo.

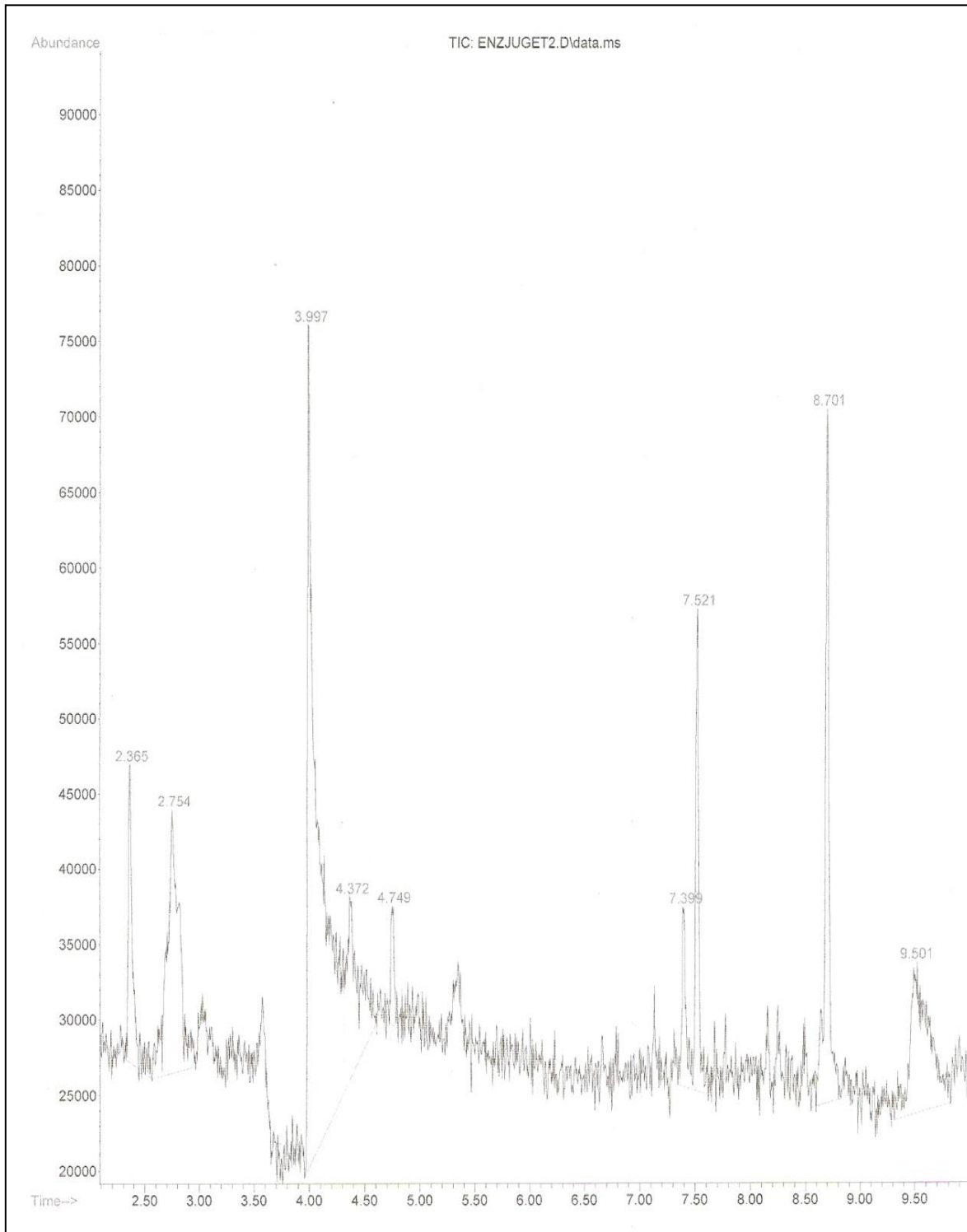




Tabla C.8 Evaluación hedónica del jugo sin concentrado enzimático.

Población y Muestra	Sabor	Olor	Color	Apariencia
1	8	9	7	6
2	9	9	8	7
3	8	8	7	6
4	8	7	7	6
5	6	6	6	5
6	6	6	5	5
7	9	9	7	7
8	8	8	6	6
9	9	9	6	7
10	8	9	8	7

Tabla C.9 Evaluación hedónica del jugo con concentrado enzimático.

Población y Muestra	Sabor	Olor	Color	Apariencia
1	7	7	9	9
2	8	6	9	9
3	7	6	8	8
4	8	5	8	8
5	7	4	6	6
6	7	4	6	7
7	8	8	9	9
8	7	6	8	9
9	8	7	7	8
10	7	7	9	9



APÉNDICE D. METODOS OPERATORIOS

En esta sección se muestran los métodos operatorios de cada uno de los equipos utilizados durante la fase experimental de este trabajo de investigación.

C.1 Método operatorio pH-metro.

Marca: Oakton.

- ✓ Presionar el botón de encendido (ON/OFF).
- ✓ Tomar la celda y desenroscar la tapa del recipiente que contiene la solución patrón a pH 4.
- ✓ Observar la lectura del pH en pantalla del equipo y comprobar que sea la correcta, de no ser así, verificar con muestras calibradas la lectura del pH correspondiente y calibrar.
- ✓ Lavar la superficie de la celda con agua destilada, usando para ello una piseta.
- ✓ Introducir la celda dentro el recipiente que contenga la solución a medir el pH.
- ✓ Observar en la pantalla del pHmetro lectura del pH, registrar este valor cuando indique un valor constante.
- ✓ Retirar la celda nuevamente y lavar la misma empleando una piseta, cuyo contenido sea agua destilada.
- ✓ Colocar en el recipiente previsto para la celda y enroscar la tapa.
- ✓ Realizar nuevamente la medición del grado de acidez el cual deberá estar en pH 4.
- ✓ Presionar el botón de apagado (ON/OFF).

C.2 Método operatorio de la centrifugadora.

Marca: Beckman.

Modelo: Coulter.

Velocidad angular: 9000 RPM.

Modelo del rotor: JA-20.



Tomar las muestras y colocarlas dentro de los tubos de centrifugado, luego pesarlas de dos en dos en una balanza analítica digital para equilibrar la masa de manera de que todos los tubos contengan la misma cantidad.

- ✓ Encender el equipo manipulando el interruptor ON-OFF
- ✓ Abrir la compuerta del equipo.
- ✓ Asignar valor de tipo de rotor en el teclado, pulsando ROTOR.
- ✓ Asignar el valor de la velocidad pulsando SPEED y suministrarlo mediante el teclado numérico.
- ✓ Asignar el valor de tiempo pulsando TIME y suministrarlo con el teclado numérico.
- ✓ Asignar el valor de Temperatura pulsando TEMP y suministrarlo con el teclado numérico.
- ✓ Esperar hasta que el equipo alcance la temperatura de operación suministrada.
- ✓ Colocar los tubos de centrifugado en el rotor de centrifugación
- ✓ Colocar el rotor en el centro del eje dentro de la centrifugadora, comprobar que se acople correctamente aplicando una fuerza hacia afuera.
- ✓ Coloque la tapa enroscable del rotor.
- ✓ Cierre la compuerta de la centrifugadora.
- ✓ Presione el botón START para comenzar con la centrifugación.

C.3 Método operatorio del extractor de jugos

Marca: Ultramar Turmix.

Modelo: TU04

Antes de empezar a utilizar el extractor, tenga a la mano las frutas lavadas y picadas.

- ✓ Asegurarse que las cuchillas se encuentren bien ajustadas.
- ✓ Tapar firmemente el extractor.
- ✓ Enchufar el extractor en el interruptor de corriente.
- ✓ Colocar un vaso para recolectar la pulpa de fruta a extraer.
- ✓ Encender el equipo colocando el interruptor en posición “ON”.
- ✓ Introducir la fruta poco a poco e irla aprisionando con el empujador.
- ✓ Repetir el paso anterior hasta obtener la cantidad deseada de pulpa de jugo.
- ✓ Apagar el equipo colocando el interruptor en posición “OFF”.



- ✓ Desenchufe el extractor.
- ✓ Ábralo y lave las piezas, limpie por fuera extractor con un paño suave y húmedo.
- ✓ Espere que se seque bien, ármelo y guárdelo.