



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y SOLUBILIZACIÓN DE LOS  
PRECIPITADOS FORMADOS EN EL JUGO CLARIFICADO DE ARAZÁ  
(*Eugenia stipitata*) OBTENIDO POR PROCESOS ENZIMÁTICOS Y  
MEMBRANARIOS”**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO**

**PRESENTADO POR**

**SANDRA ELIZABETH LÓPEZ SAMPEDRO**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2011**

## **DEDICATORIA**

*Esta tesis, se la dedico a mi muñequita  
SAYRED a mis papitos JUANITO Y  
TERESITA, a mis hermanos JUAN Y MARCO  
a mi gordito AARON y a EDGUITAR, las  
personas más importantes en mi vida.*

*Por su amor y apoyo incondicional, LOS AMO  
MUCHO.*

## **AGRADECIMIENTO**

*Agradezco infinitamente a Dios por haberme regalado la dicha de ser madre, por la sabiduría y la constancia para alcanzar todas las metas propuestas en mi vida.*

*A mis padres por haberme dado la vida, por brindarme su incondicional apoyo y guiarme con sus sabios consejos en todo momento. A mis hermanos, mi gordito y al amor de mi vida Edgar, por estar siempre a mi lado y a toda mi familia por su cariño.*

*Al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias y por su intermedio al Departamento de Nutrición y Calidad, que me brindó la oportunidad para desarrollar mi Proyecto de Titulación. A la ESPOCH y a sus docentes por su ayuda durante mi formación profesional..*

*A la Ingeniera Beatriz Brito por su invaluable apoyo y amistad, a la Dra. Susana Espín, a la Dra Olga Lucero por su ayuda y amistad, al Dr. Carlos Pilamunga por su colaboración y conocimientos.*

*A mis compañeros tesisistas del INIAP por brindarme momentos muy agradables durante la realización de mi tesis, en especial a Joha por su amistad y ayuda.*

Yo Sandra Elizabeth López Sampedro soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados, expuestos en esta tesis, y el patrimonio intelectual de la tesis de grado pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO y al INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS.

---

SANDRA ELIZABETH LOPEZ SAMPEDRO

La presente investigación contó con el auspicio financiero del Programa de Fortalecimiento Institucional. Componente V: Plan e Investigaciones para Agroindustria, Energía y Nutrición. Proyecto: Valorización de cultivos y materias primas, para respaldar las certificaciones de origen; desarrollar y aplicar procesos tecnológico y agroindustriales, a través de sistemas integrados de calidad, sanidad e inocuidad, a lo largo de la cadena agroproductiva. El que se ejecuta en el Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias - INIAP.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AOAC	Asociación of Oficial Analytical chemist.
BCA	Bloques completamente al azar
C:	Cromaticidad
°C	Grados centígrados
CORPEI:	Corporación de Promoción de Exportaciones
Cp:	Centipoise
cSt:	Centistokes
CV	Coefficiente de variación
C <sub>x</sub>	Exo-celulosa
C <sub>1</sub>	Endo-celulosa
ds	Desviación estándar
FRV:	Factor de reducción volumétrica
g	Gramos.
h	Hora.
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
IO	Índice de oscurecimiento
Kcal	Kilocalorías
L	Litros.
M	Muestra
MFT	Microfiltración tangencial
MIAA:	Materia insoluble en alcohol y agua
mg	Miligramos
min	Minutos.
mL	Mililitro
mm	Milímetros
NTU:	Nefelometric Turbidity Unit
%	Porcentaje.
% (p/p)	Porcentaje peso/peso.
P <sub>E</sub>	Pectinesterasa
pH	Potencial de hidrógeno.
P <sub>G</sub>	Poligalacturonasa
P <sub>L</sub>	Pectinliasa
ppm	Partes por millón.
RPM	Revolución por minuto
SIS	Sólidos Insolubles en Suspensión
T	Tratamientos
UF	Ultrafiltración
Σ	Sumatoria
μm	Micras

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	x
INTRODUCCIÓN	xi
<b>1 MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.1 ARAZÁ (Eugenia stipitata) .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA ..	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.1.2 PRINCIPALES PLAGAS Y ENFERMEDADES .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.1.3 MANEJO POSCOSECHA .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.1.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.1.5 USOS .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.2 LA PARED CELULAR DE LOS VEGETALES;	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.2.1 COMPONENTES DE LA PARED CELULAR .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.2.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA PARED CELULAR DE ARAZÁ. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.3 LAS PROTEÍNAS .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.3.1 CLASIFICACIÓN .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.3.2 ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.3.3 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.3.3.1 Propiedades Funcionales.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.4 LAS ENZIMAS .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.4.1 PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.4.2 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.4.2.1 Papaína.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.4.2.2 Aplicaciones de la papaína en la industria alimentaria	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.4.2.3 Hidrólisis enzimática de las proteínas ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.4.3 ENZIMAS HIDROLÍTICAS .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.4.3.1 Clasificación de las enzimas hidrolíticas	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

1.4.3.2	Preparaciones enzimáticas comerciales ..	¡Error! Marcador no definido.
1.4.3.3	Utilización de las preparaciones enzimáticas comerciales .....	¡Error! Marcador no definido.
1.5	TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS.....	¡Error! Marcador no definido.
1.5.1	PROCESOS DE SEPARACIÓN .....	¡Error! Marcador no definido.
1.5.2	PRINCIPIOS Y MODOS DE OPERACIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
1.5.3	MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL.....	¡Error! Marcador no definido.
2	PARTE EXPERIMENTAL.....	¡Error! Marcador no definido.
2.1	LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2	MATERIALES .....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.1	MATERIA PRIMA .....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.2	MATERIAL DE LABORATORIO.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.3	EQUIPOS .....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.4	REACTIVOS.....	¡Error! Marcador no definido.
2.3	MÉTODOS .....	¡Error! Marcador no definido.
2.3.1	FASE I. Extracción y caracterización del precipitado del jugo clarificado de arazá.....	¡Error! Marcador no definido.
2.3.1.1	Factores de estudio, tratamientos y diseño experimental .....	¡Error! Marcador no definido.
2.3.1.2	Métodos específicos de manejo del experimento ...	¡Error! Marcador no definido.
2.3.2	FASE II Realización de ensayos con la preparación enzimática comercial Rapidasse TF y fortificación para obtener un jugo clarificado estable .....	¡Error! Marcador no definido.
2.3.2.1	Factores de estudio, tratamientos y procedimiento.	¡Error! Marcador no definido.
2.3.2.2	Manejo del experimento .....	¡Error! Marcador no definido.
2.3.2.3	Procedimiento .....	¡Error! Marcador no definido.
2.3.2.4	Procedimiento .....	¡Error! Marcador no definido.
2.3.2.5	Cálculos .....	¡Error! Marcador no definido.
2.3.2.6	Obtención del jugo clarificado estable....	¡Error! Marcador no definido.
3	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	¡Error! Marcador no definido.
3.1	ENSAYOS PRELIMINARES .....	¡Error! Marcador no definido.
3.2	FASE I: OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PRECIPITADO DEL PERMEADO DE ARAZÁ.....	¡Error! Marcador no definido.



3.2.1	IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS.....	¡Error! Marcador no definido.
3.2.2	IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	¡Error! Marcador no definido.
3.2.2.1	Contenido de aminoácidos y proteína.....	¡Error! Marcador no definido.
3.2.3	IDENTIFICACIÓN DE MINERALES.....	¡Error! Marcador no definido.
3.2.4	Identificación de los principales componentes presentes en el precipitado extraído del permeado de arazá .....	¡Error! Marcador no definido.
3.3	FASE II: ENSAYOS CON LA PREPARACIÓN ENZIMÁTICA COMERCIAL RAPIDASSE TF FORTIFICADA PARA OBTENER UN JUGO CLARIFICADO ESTABLE POR MFT .....	¡Error! Marcador no definido.
3.3.1	TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE LA PULPA DE ARAZÁ.....	¡Error! Marcador no definido.
3.3.2	OBTENCIÓN DEL JUGO CLARIFICADO POR MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL Y la VIDA DE ANAQUEL .....	¡Error! Marcador no definido.
4	CONCLUSIONES .....	¡Error! Marcador no definido.
5	RECOMENDACIONES .....	¡Error! Marcador no definido.
6	RESUMEN Y SUMMARY.....	¡Error! Marcador no definido.
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	¡Error! Marcador no definido.

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Plagas que afectan a la planta de arazá ( <i>Eugenia stipitata</i> )...	2
TABLA No. 2	Caracterización física para los 3 clones de arazá.....	3
TABLA No. 3	Composición química del arazá.....	4
TABLA No. 4	Caracterización química de la pared celular purificada en la pulpa de arazá.....	7
TABLA No. 5	Clasificación de las proteínas según su composición, solubilidad y función.....	9
TABLA No. 6	Fuerzas de unión encontradas en las proteínas.....	10
TABLA No. 7	Propiedades de la papaína.....	28
TABLA No. 8	Procesos de separación y sus características.....	37
TABLA No. 9	Composición nutricional del permeado y retenido de arazá obtenidos del proceso de MFT.....	40
TABLA No. 10	Tratamientos para el proceso de extracción.....	44
TABLA No. 11	Esquema de análisis de varianza.....	45
TABLA No. 12	Condiciones de trabajo del equipo HPLC shimadzu para aminoácidos.....	49
TABLA No. 13	Ensayos para la optimización del tratamiento de la pulpa de arazá.....	53

**ÍNDICE DE CUADROS**

CUADRO No. 1	Rendimiento y contenido de proteína del precipitado formado en el jugo clarificado de arazá.....	59
CUADRO No. 2	Rendimiento en la extracción del de precipitado del permeado del concentrado de arazá.....	61
CUADRO No. 3	Color en el precipitado de arazá secado en dos condiciones.....	62
CUADRO No. 4	Resultados de las pruebas para identificación de carbohidratos.....	63
CUADRO No. 5	Resultados de las pruebas para la identificación de proteínas.....	65
CUADRO No. 6	Comparación de la composición aminoacídica de las muestras de larvas y del precipitado.....	67
CUADRO No. 7	Contenido de proteína para las muestras de larvas y precipitado .....	69
CUADRO No. 8	Resultado de la identificación de minerales.....	71
CUADRO No. 9	Caracterización de las principales actividades enzimáticas de la preparación comercial rapidasse TF.....	73
CUADRO No. 10	Control de calidad de los tratamientos con la preparación comercial fortificada en la pulpa de arazá.....	75

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Análisis del contenido de aminoácidos en las larvas de la mosca ( <i>Anastrepha striata</i> ) y el precipitado del permeado de arazá.....	68
---------------	---	----

**ÍNDICE DE FIGURAS**

FIGURA No. 1	Planta y fruto de arazá.....	1
FIGURA No. 2	Azúcares componentes de los polisacáridos insolubles de la pared celular.....	7
FIGURA No. 3	Curva de progreso de una reacción enzimática.....	25
FIGURA No. 4	Rangos de separación de diversos procesos con base a sus propiedades.....	35
FIGURA No. 5	Esquema de un módulo de microfiltración tangencial.....	38
FIGURA No. 6	Tipos de filtración.....	39
FIGURA No. 7	Esquema de la obtención del jugo clarificado de arazá.....	42
FIGURA No. 8	Esquema de la marcha bioquímica para carbohidratos.....	46
FIGURA No. 9	Disposición de los 10 puntos experimentales en torno a la circunferencia.....	53
FIGURANo.10	Esquema del equipo piloto de microfiltración tangencial.....	58

**ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS**

FOTOGRAFÍA No. 1	Identificación de carbohidratos.....	64
FOTOGRAFÍA No. 2	Prueba de la ninhidrina .....	65
FOTOGRAFÍA No. 3	Larvas en el fruto de arazá .....	66
FOTOGRAFÍA No. 4	Larvas extraídas y lavadas.....	66
FOTOGRAFÍA No. 5	Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución para el análisis de aminoácidos.....	70
FOTOGRAFÍA No. 6	Identificación de minerales.....	71
FOTOGRAFÍA No. 7	Obtención del jugo clarificado de arazá por microfiltración tangencial.....	77
FOTOGRAFÍA No. 8	Seguimiento de la estabilidad.....	78
FOTOGRAFÍA No. 9	Jugo clarificado de arazá estable.....	79

**ÍNDICE DE ANEXOS**

ANEXO No. 1	Análisis estadístico para sólidos solubles.....	92
ANEXO No. 2	Análisis estadístico para turbidez .....	93
ANEXO No. 3	Análisis estadístico para control de pH.....	94
ANEXO No. 4	Análisis estadístico para viscosidad cinemática.....	95
ANEXO No. 5	Análisis estadístico para sólidos insolubles en suspensión	96
ANEXO No. 6	Manual de uso del equipo de microfiltración tangencial...	97
ANEXO No. 7	Diagramas de los parámetros del color instrumental I, a, b, °h.....	102
ANEXO No. 8	Ejemplos de condiciones óptimas para jugos de fruta obtenidos por microfiltración tangencial (escala laboratorio o planta piloto)	103

## INTRODUCCIÓN

Las frutas amazónicas fueron identificadas como una alternativa productiva desde mediados de la década de los años 80. Frutas tales como el arazá (*Eugenia stipitata*), son parte de la gran diversidad presente en la región amazónica y han ganado mercado en la última década. En el contexto mundial el mercado de productos exóticos (frescos y procesados) ha crecido continuamente (Hernández, *et al.* 2007).

El principal país importador de jugos tropicales es Estados Unidos con una participación del 16 % en segundo lugar Japón con 11 %. Ecuador ocupa el décimo lugar como exportador, con un 3 % de participación en el mercado mundial y con una tasa de crecimiento anual del 18 % a partir del año 2000. En la actualidad no existe un mercado totalmente explotado e industrializado; es aquí donde existe la oportunidad de satisfacer los nichos presentes y futuros, especialmente por la tendencia de consumir productos naturales exóticos que en la actualidad está vigente. La posibilidad de procesar el arazá se ha constituido en una alternativa importante para posicionarse y ampliar el mercado (CORPEI, 2007).

El arazá debido a sus propiedades no solo como fruta (aroma, color, sabor, textura, etc.) sino por su versatilidad en el cultivo y su ámbito comercial despierta el interés para estudiarlo y buscar maneras de aprovechar sus cualidades. Debido a su alto contenido de



pulpa, se lo puede utilizar para preparar en mezclas de jugos con otras frutas, néctares, helados, cócteles y licores. También tiene buen potencial para la extracción de sus principios aromáticos, por su olor muy agradable y exótico, por lo cual podría ser utilizada en la industria de perfumes (Hernández, 2006).

Diversos estudios realizados en Colombia, coinciden en que ésta fruta tiene un tiempo de vida en anaquel relativamente corto. Así, cuando los frutos son cosechados en su madurez fisiológica y almacenados a 24 °C, la madurez sensorial se presenta luego de 4 días. Después de 6 días hay un deterioro marcado en sus características organolépticas. Cuando la temperatura de almacenamiento es de 18 °C la madurez sensorial ocurre luego de 5 días. Se ha encontrado que el fruto sufre daños por frío a temperaturas por debajo de 12 °C (Narváez, 2003).

El tratamiento enzimático ofrece una alternativa válida para superar inconvenientes en la obtención de los jugos, debido a la alta consistencia de las pulpas, ya que las sustancias pécticas que están presentes en todos los tejidos de las plantas como constituyentes de la pared celular, son los que le otorgan firmeza al fruto y se liberan en el proceso de despulpado (Girard, 2000).

La tecnología de microfiltración por membranas posee una gran gama de aplicaciones, ya que ha adquirido importancia en el procesamiento de los alimentos. Se basa en el principio de la separación física por el tamaño del poro que tiene la membrana, el cual determina hasta qué punto son eliminados los sólidos disueltos, la turbidez y los microorganismos. En este proceso los sólidos responsables de la saturación de las membranas corresponden a los polisacáridos provenientes de la pared celular de las frutas, constituidos principalmente por celulosa, hemicelulosa, pectina, lignina y una pequeña cantidad de proteínas (proteínas de estructura, enzimas), compuestos fenólicos, pigmentos, lípidos y minerales; los mismos que cumplen un rol importante en el proceso para la obtención de un producto innovador, como es el caso de los jugos clarificados de frutas. (Binetti, *et al.* 2004)

Como se puede apreciar en el ANEXO No. 8, se presenta una recopilación de los estudios que se han realizado en el Ecuador y en otros países, para establecer las condiciones óptimas a escala de laboratorio y de planta piloto para la obtención de jugos mediante tecnologías de membranas.

Durante el establecimiento de la vida de anaquel del jugo clarificado de arazá, refrigerado o congelado, se ha evidenciado la formación de precipitados con una composición desconocida, los cuales afectan las características relacionadas a la calidad física de este producto.

Estudios preliminares realizados en el INIAP señalan que la formación de estos precipitados, se debe a la cristalización de los ácidos orgánicos (málico, oxálico y cítrico) o sus correspondientes sales, lo cual podría ser producto de las interacciones moleculares, reacciones fermentativas, cambios en el pH y la presencia de ciertos iones metálicos; además de los azúcares ligados a otros componentes, como es el caso de las proteínas de origen vegetal propia de la fruta o de origen animal, como podría ser el caso de las larvas de las moscas, que son imperceptibles a simple vista durante la selección y el despulpado de la fruta.

Con el presente trabajo se espera resolver este problema tecnológico, que no se ha presentado en las investigaciones realizadas por el INIAP en la obtención de los jugos clarificados de uvilla, granadilla y del mango. Por tal razón, es importante realizar la extracción del precipitado y conocer su composición a través de la caracterización bioquímica y la utilización de pruebas específicas de identificación. Información que servirá para fortificar a la preparación enzimática comercial seleccionada para la pulpa de arazá, con el compuesto determinado, que se utilizará en el pre tratamiento que se realiza anterior a la microfiltración tangencial, y de esta manera evaluar la estabilidad del jugo clarificado obtenido.



## CAPÍTULO I

### 1 MARCO TEÓRICO

#### 1.1 ARAZÁ (*Eugenia stipitata*)



FIGURA. No.1 PLANTA Y FRUTO DEL ARAZÁ

El arazá, mostrado en la FIGURA. No 1; es originario de la región amazónica occidental comprendida entre los ríos Marañón y Ucayali y en las proximidades de Requena y el nacimiento del río Amazonas. La mayor diversidad genética de *Eugenia stipitata* se registra en el sudoeste de la Amazonía. La clasificación taxonómica del arazá es la siguiente: (7)

División:      Fanerógamas  
Subdivisión:  Angiospermas  
Clase:         Dicotiledoneas  
Orden:         Myrtaceas  
Familia:       Myrtaceae  
Género:        *Eugenia*  
Especie:       *stipitata*

El arazá se produce en las tres regiones del Ecuador: región norte (Cascales, Lago Agrio, Shushufindi, Sacha, Coca, Loreto), región centro (Archidona, Tena, Mera, Puyo, Palora, Macas, Sucúa, Logroño, Méndez, Gualaquiza) y región sur (Yantzaza, El Bangui,

Nangaritza, Centinela del Cóndor). (5)

### 1.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA

Es un árbol de 12 - 15 m de altura y follaje disperso. La floración y las ramas nuevas presentan abundante pubosidad, distribuida uniformemente. La cara inferior de las hojas presenta pelusas duras de 0,5 mm de largo. (9)

Las hojas son delgadas, fuertes, elípticas y con el ápice bien marcado. Los racimos de flores se conforman de dos a cuatro flores pedunculadas. La polinización es entomófila. Los frutos son bayas globosas y deprimidas, miden de 8 a 12 cm de diámetro y en su madurez presentan una coloración amarilla-dorada. La pulpa es amarilla, incluso el mesocarpio y los tejidos que rodean las semillas. (7)

### 1.1.2 PRINCIPALES PLAGAS Y ENFERMEDADES

En la TABLA No 1, se presentan las principales plagas que afectan a la planta de arazá.

**TABLA No 1. PLAGAS QUE AFECTAN A LA PLANTA DE ARAZÁ (*Eugenia stipitata*)**

Nombre	Consecuencias	Control
Mosca de la fruta ( <i>Anastrepha striata</i> )	Las larvas de la mosca nacen y se desarrollan en el interior de la fruta, se alimentan de la pulpa.	Mediante aspersiones de insecticidas. Es importante eliminar los frutos que caen.
Ácaro de los cogollos ( <i>Tegunutes guabae</i> )	Es una arañita, casi invisible, que ataca a los cogollos tiernos, absorbe su savia, inocula la toxina causante de la toxemia. Aparecen puntos amarillos y deformación de las hojas.	Kelthane, como fungicida y acaricida.
Gusano negro ( <i>Mimallo amilia</i> )	Las larvas, con sus propios excrementos, en la base de las hojas, fabrican una cápsula café oscura en la que viven y se desarrollan hasta convertirse en pupas y luego en mariposa. En el estado larvario se alimentan del follaje de los arbustos.	Mediante insecticidas o mediante control biológico, con un tipo de avispa.

FUENTE: PROEXANT, 2005

### 1.1.3 MANEJO POSCOSECHA

La fruta que viene del campo y no es clasificada inmediatamente debe almacenarse en un

lugar fresco, preferentemente en cuartos fríos con temperaturas de 5 a 10 °C, por un periodo máximo de 20 días. (7)

El fruto continúa el proceso fisiológico y madura después de cosechado, pero el recolectado maduro tiene más aroma. Luego de cosechado debe colocarse en cajas de hasta tres hileras de frutos cada una, debe transportarse con cuidado, para evitar la deformación de la fruta. (1)

La selección del fruto se realiza durante la cosecha o en la mesa de clasificación. Las frutas se clasifican por su tamaño, el diámetro promedio es de 7,6 cm y el peso promedio de 200 g, de acuerdo con esto se pueden clasificar en: Especial (diámetro 8 cm, peso 230 g, coloración amarilla), Extra (diámetro 7 cm, peso 200 g, coloración ligeramente amarilla), Fancy (no cumple con los requisitos anteriores). En cualquier caso la fruta debe estar sin magulladuras o daños por hongos, insectos o manipuleo. (2)

En la TABLA No 2, se presenta los resultados de la caracterización física para tres clones recolectados por el INIAP, se trabajó con el clon 003.

**TABLA No 2. CARACTERIZACIÓN FÍSICA PARA LOS 3 CLONES DE ARAZA**

<b>Clon*</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Largo (cm)</b>	<b>Diámetro (cm)</b>	<b>Relación L/D</b>	<b>Firmeza fruta (kgf)</b>
001	202,80 ± 60,86	7,52 ± 1,04	7,57 ± 1,04	1,00 ± 0,08	2,41 ± 0,61
002	115,64 ± 67,87	5,63 ± 1,38	6,18 ± 1,57	0,91 ± 0,13	1,76 ± 0,60
003	182,26 ± 57,29	7,50 ± 0,98	8,70 ± 0,98	0,98 ± 0,16	1,60 ± 0,45

FUENTE: TOLEDO D. 2010

#### 1.1.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA

A continuación en la TABLA No 3, se presenta la composición química de 100 g de pulpa de arazá en fresco.

**TABLA No 3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ARAZÁ, EN BASE FRESCA**

ANÁLISIS	ARAZÁ	
Humedad (%)	95,12	
Cenizas (%)	0,14	
Extracto Etéreo (%)	0,04	
Proteína (%)	0,71	
Fibra Cruda (%)	0,37	
Carbohidratos totales (%)	3,62	
pH	2,79	
Acidez Titulable (% ácido málico)	2,79	
Sólidos Solubles (° Brix)	4,40	
Azúcar Total (%)	1,89	
Vitamina A (UI/100 g)	150,21	
Vitamina C (mg/100g)	36,84	
Polifenoles Totales (mg/100 g)	121,16	
Carotenoides Totales (mg/100 g)	0,27	
Antocianinas (mg/100 g)	0,04	
Actividad Antioxidante ( $\mu$ mol equivalente trolox/g)	5,00	
Minerales	Calcio ( $\mu$ g/g)	100,00
	Magnesio( $\mu$ g/g)	47,00
	Potasio ( $\mu$ g/g)	500,00
	Fósforo ( $\mu$ g/g)	100,00
	Sodio ( $\mu$ g/g)	9,00
	Hierro ( $\mu$ g/g)	1,00
	Zinc ( $\mu$ g/g)	2,00
	Selenio ( $\mu$ g/kg)	0,02
	Cadmio ( $\mu$ g/kg)	4,00
	Plomo ( $\mu$ g/kg)	40,00

FUENTE: BRITO, B., *et al.* Plegable N. 301 INIAP

### 1.1.5 USOS

El fruto de arazá es más adecuado para el procesamiento y/o industrialización. Difícilmente se consume la fruta en fresco, por causa de su elevada acidez (pH 2,66 a 3,43). La única manera posible de manipular esta fruta es procesarla enseguida después de la cosecha. La pulpa de arazá, debido a su bajo contenido en materia seca, es adecuada para la elaboración de productos en la línea de las pulpas y los jugos, como son jugos pulposos y clarificados, refrescos, dulce, néctar, jalea y licor. (8)

Esta fruta tiene un alto rendimiento de pulpa, alrededor del 60 al 70 %, se puede utilizar para combinarse con otros frutales, aunque el sabor y aroma característico del arazá se

pierde fácilmente con la cocción. En la Región Amazónica Ecuatoriana se han desarrollado pequeñas empresas agroindustriales, que utilizan la pulpa del arazá para la elaboración de mermeladas combinadas con otras frutas, especialmente con papaya y piña. También se utiliza como saborizante de bebidas y cócteles, en reemplazo de otras frutas como la naranjilla, el maracuyá y la piña. La piel de la fruta de arazá contiene aceites esenciales de gran aroma, con potenciales usos en la industria cosmética. (5)

## **1.2 LA PARED CELULAR DE LOS VEGETALES**

La pared celular de los vegetales constituye una envoltura resistente y extensible que rodea al plasma, es una estructura dinámica que permite el desarrollo de las células jóvenes, determinando su tamaño y forma. (38)

Constituye un sistema tampón entre el medio exterior y el contenido protoplasmático, este es un compartimiento permeable al agua y a los metabolitos auxiliares del cual el citoplasma toma los elementos necesarios para su metabolismo y retorna componentes que ella los elabora, como son las secreciones y los desperdicios; además ella asegura la rigidez y la cohesión de las células en oposición a los choques osmóticos. (25)

### **1.2.1 COMPONENTES DE LA PARED CELULAR**

La pared celular de los vegetales está constituida esencialmente de polisacáridos y lignina, una pequeña cantidad de proteínas (proteínas de estructura, enzimas), compuestos fenólicos, pigmentos, lípidos y minerales. (4)

Las células vegetales contienen una gran variedad de proteínas, que funcionan como catalizadores de las reacciones que se efectúan en las células (es el caso de las enzimas), o como componente estructural de ellas (en el lado de las membranas). Las proteínas están constituidas por un conjunto de numerosas moléculas de diferentes aminoácidos. (26)

El almidón, es el principal polisacárido de reserva que se encuentra en la célula vegetal, se sintetiza en los cloroplastos y en los órganos no fotosintéticos, como los amiloplastos.



El almidón es un polímero de glucosa que existe en dos formas: la amilosa, una molécula esencialmente lineal y la amilopectina, una molécula muy ramificada que posee una cadena de mucha longitud. (32)

Los taninos, son un grupo heterogéneo de sustancias complejas polihidroxifenólicas. Un buen agente tonificante posee un peso molecular entre 500 y 3.000, conteniendo suficientes grupos fenólicos para formar efectivos cruces con las proteínas. Son muy solubles en agua, dando una reacción ácida por lo que se les denomina ácidos tánicos ya que están compuestos por ácidos fenólicos en su mayoría, solubles en alcohol, glicerina o acetona, insolubles en solventes apolares como éter, cloroformo, benceno, disulfuro de carbono. (30)

Los grupos fenólicos son los responsables de sus propiedades astringente y aséptica. Los polisacáridos que forman parte de la pared celular pueden ser homo o heteropolímeros, constituidos por encadenamientos lineales o ramificados de azúcares neutros de seis átomos de carbono (hexosas o metil-pentosas), de cinco átomos de carbono (pentosas) y azúcares ácidos de seis átomos de carbono (ácidos urónicos). En la FIGURA No 2, se presentan los azúcares componentes de los polisacáridos. (4)

### 1.2.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA PARED CELULAR DE ARAZÁ

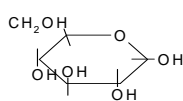
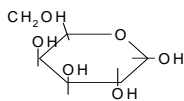
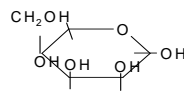
La pared celular de la pulpa del arazá fue extraída y purificada, es conocida como materia insoluble en alcohol y agua (MIAA). La caracterización química de la pared celular purificada comprendió los siguientes análisis: hemicelulosa, celulosa, lignina, almidón, proteína, cenizas y la pectina insoluble.

Los valores promedios se reportan en la TABLA No 4 para cada uno de los componentes. (3)

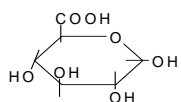
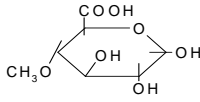
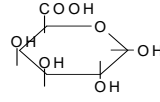
**FIGURA No 2. AZÚCARES COMPONENTES DE LOS POLISACÁRIDOS INSOLUBLES DE LA PARED CELULAR**

## Azúcares de 6 átomos de carbono

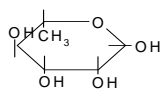
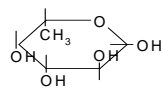
## Hexosas

*D-glucosa**D-galactosa**D-mannosa*

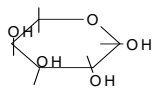
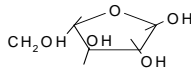
## Ácidos Urónicos

*Ácido D-glucurónico**Ácido 4-O-metil-D-glucurónico**Ácido D-galacturónico*

## Desoxi-6-hexosas

*L-ramnosa**L-fructosa*

## Azúcares de 5 átomos de carbono

*D-xilosa**L-arabinosa*

FUENTE: SAMANIEGO, INIAP 2003

TABLA No 4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA PARED CELULAR PURIFICADA, EN LA PULPA DE ARAZÁ

ANÁLISIS*	MIAA DEL ARAZÁ
Hemicelulosa (%)	11,18 ± 0,37
Celulosa (%)	24,55 ± 0,37
Lignina (%)	17,94 ± 0,90
Almidón (%)	3,49 ± 0,01
Proteína (%)	15,92 ± 0,01
Cenizas (%)	3,28 ± 0,01
Pectina Insoluble (%)	23,65 ± 0,88

FUENTE: LAVERDE J. 2011

## 1.3 LAS PROTEÍNAS

Las proteínas son polímeros de alto peso molecular, de aproximadamente  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$  Dalton, cuando se solubilizan son de dimensiones coloidales. Tienen propiedades anfotéricas y su hidrólisis completa produce una mezcla de aminoácidos. Todas las proteínas contienen carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo y algunas de ellas contienen hierro, cobre o zinc. La presencia de nitrógeno es una característica importante, ya que imparte a las proteínas muchas de sus propiedades específicas. (6)

Las proteínas con un alto contenido de ácido glutámico y aspártico tienen su punto isoeléctrico en un intervalo de pH ácido, mientras que las que contienen altas concentraciones de lisina y arginina, lo tienen a pH alcalino. (10)

La forma y la intensidad de ionización de los grupos ionizables, desempeñan un papel muy importante en su estabilidad, al igual que en sus características y propiedades funcionales. Debido a que están constituidas por aminoácidos, las proteínas también desarrollan una carga neta que depende de la influencia de los diferentes grupos radicales ionizables y del pH al que se encuentren. (10)

### 1.3.1 CLASIFICACIÓN

La complejidad y la diversidad son las características predominantes de las proteínas, por lo que resulta difícil establecer una clasificación rigurosa. Los criterios más usuales están basados en la composición, la forma, la solubilidad y la función biológica de las proteínas. Como se muestra en la TABLA No 5.

Dentro del grupo de las proteínas clasificadas por su solubilidad, las albúminas solubles en agua y las globulinas, solubles en soluciones salinas diluidas, son las más importantes. Esto se debe a que la mayoría de las enzimas, hormonas, y otros polímeros de gran importancia biológica pertenecen a estas dos clases de proteínas. (6)

**TABLA No 5. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SEGÚN SU COMPOSICIÓN, SOLUBILIDAD Y FUNCIÓN**

Clasificación	Propiedades	Ejemplo
<b>A. Por su composición</b>		
1. Simple	Contiene solo aminoácidos	Insulina
2. Conjugada	Contiene una fracción no proteica	
a) Metaloproteínas	Pigmentos	Mioglobina, hemoglobina
b) Glucoproteínas	Contiene carbohidratos	Inmunoglobulinas, fracción 7S de la soya, caseína k, mucina
c) Fosfoproteínas	Contiene fósforo	Caseínas de la leche, flavoproteínas, pepsina
d) Lipoproteínas	Contiene lípidos	Lipovitelina de la yema del huevo
e) Nucleoproteínas	Contiene ác. nucleicos	Virus, genes
<b>B. Por su forma</b>		
1. Globular	Esféricas u ovoides	Albúmina de huevo
2. Fibrosa	Forman fibras de tejido conectivo Proteína de ligamentos y tendones Pelo, lana, uñas, cuernos Proteína muscular Responsable de la coagulación de la sangre	Colágeno Elastina Queratina Miosina y Actina Fibrinógeno
<b>C. Por su solubilidad</b>		
1. Albúmina	Solubles en agua y soluciones salinas.	$\alpha$ -Lactalbúmina de la leche, ovoalbúmina del huevo
2. Globulinas	Poco solubles en agua, solubles en sol. salinas	Miosina del músculo, globulina del plasma
3. Histonas	Alto contenido de aminoácidos básicos No coagulan por el calor	Proteínas unidas a ác. nucleicos
4. Gluteninas	Insolubles en agua y alcohol. Solubles en álcalis y ác. débiles	Gluten del trigo
5. Prolaminas	Solubles en 70% de alcohol	Zeína del maíz, gliadina del trigo
6. Escleroproteínas	Insolubles en la mayoría de los solventes	Todas las proteínas clasificadas en B-2 en esta tabla
<b>D. Por su función</b>		
1. Estructural	Forma parte estructural del cuerpo	Proteínas clasificadas como B-2
2. Enzimas	Catalizan reacciones	Lipasas, proteasas
3. Hormonas	Mensajeros químicos	Insulina, glucagón
4. Toxinas	Proteínas dañinas, generadas por microorganismos	Toxina botulínica
5. Anticuerpos	Proteínas protectoras elaboradas por el organismo	$\alpha$ -globulina de la sangre
6. Transporte de O <sub>2</sub>	Transporta O <sub>2</sub> de los pulmones a los tejidos Almacén de O <sub>2</sub> en el músculo	Hemoglobina Mioglobina

FUENTE: ANGLEMIER MONTGOMERY A.1989

## 1.3.2 ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL

Las propiedades y características de las proteínas, ya sean inmunológicas, enzimáticas, nutritivas, hormonales, etc., dependen fundamentalmente de la conformación en que se encuentran. Para que una proteína tenga una determinada actividad biológica es necesario que adquiera una conformación específica y única. La destrucción de dicha conformación trae consigo la pérdida de su actividad. (16)

Cuatro estructuras de las proteínas están estabilizadas por diferentes tipos de uniones químicas que se muestran en la TABLA No 6. Los enlaces covalentes son los responsables de la estructura básica de las proteínas. Se producen como resultado de un reparto de electrones dos o más átomos, son los de menor longitud y los de mayor energía. El establecimiento de uniones covalentes entre residuos de cisteína limita el número de estructuras proteicas posibles y contribuye a su estabilización. (6)

**TABLA No 6. FUERZAS DE UNIÓN ENCONTRADAS EN LAS PROTEÍNAS.**

<b>Tipo</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Energía (Kcal/mol)</b>	<b>Grupos que interaccionan</b>
Covalente	Reparto de electrones	30-100	C-C, C-N, C=O, C-H S-S, C-N-C
Puentes iónicos	Atracción coulombica entre grupos cargados opuestamente	10-20	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , -COO <sup>-</sup> , NFT
Puentes de hidrógeno	El hidrógeno repartido entre 2 átomos electronegativos	2-10	N-H O=C, OH
Fuerzas atractivas Van der Waals	Inducción mutua de momentos dipolares en grupos apolares	1- 3	Grupos apolares

FUENTE: CHEFTEL, et al 1989

Los puentes iónicos se forman por una atracción entre grupos cargados de signo opuesto y son las uniones polares más fuertes que existen en las proteínas. Los puentes de hidrógeno son los más débiles y sin embargo, desempeñan un papel muy importante en la estructura de las proteínas. Las fuerzas de atracción de Van der Waals se producen por la inducción de un momento dipolar entre grupos eléctricamente apolares. (12)

La organización de una proteína viene definida por cuatro niveles estructurales denominados: estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. Cada una de estas informa de la disposición de la anterior en el espacio.

#### a) Estructura primaria

Determinada por la forma secuencial y ordenada en que se encuentran distribuidos los aminoácidos a lo largo de la cadena de proteína, es una propiedad altamente reproducible, controlada genéticamente y única para cada fracción proteica. Muchas de las propiedades y características de las proteínas dependen de la secuencia y tipo de aminoácidos que contengan. La presencia de una gran cantidad de aminoácidos hidrófobos determina la escasa solubilidad de las proteínas en agua, mientras que los hidrófilos hacen que éstas se solubilicen rápidamente. (29)

Debido a la influencia de los diferentes grupos radicales, la estructura primaria determina en gran medida el tipo y la intensidad de las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas.

#### b) Estructura Secundaria

Se refiere a la ordenación regular y periódica en el espacio de las cadenas polipeptídicas a lo largo de una dirección, lo que es evidente en las proteínas fibrosas, que poseen una conformación extendida. Termodinámicamente corresponde a un sistema estable y organizado con un mínimo de energía libre. Esta conformación depende de la polaridad, hidrofobicidad y del conjunto estérico de las cadenas laterales. (36)

Existen tres principales tipos de estructuras secundarias de las proteínas: la hélice  $\alpha$ , la conformación  $\beta$  y la hélice del colágeno, todas están estabilizadas por diferentes fuerzas, siendo las más importantes las electrostáticas, los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrófobas y las interacciones dipolo-dipolo.

La gran mayoría de las proteínas tiende a formar hélices  $\alpha$  en las que una vuelta completa de la hélice contiene aproximadamente 36 aminoácidos. Las hélices  $\alpha$  presentan la menor energía libre y por lo tanto es la forma más estable de estructura secundaria de una proteína. (16)

### c) Estructura terciaria

Esta estructura se refiere al modo en que la cadena polipeptídica se curva o se pliega para formar una estructura estrechamente compacta, características de las proteínas globulares. En este caso las principales fuerzas que contribuyen a la estabilidad de la estructura son los enlaces disulfuro (S-S), los hidrófobos y los enlaces iónicos. (26)

Los grupos radicales de los diferentes aminoácidos desempeñan un papel muy importante ya que el grado de estructura terciaria que la proteína adquiera dependerá de su naturaleza, de su tamaño y de los efectos estéticos que ejerzan. De todos los puentes y enlaces que intervienen en la estructura terciaria, el enlace de sulfuro (S-S) es el más fuerte y se forma cuando dos moléculas de cisteína se oxidan, lo que le imparte una alta estabilidad a la proteína. (27)

Cuando las proteínas se disuelven en agua tienden a adquirir una estructura con una energía libre mínima. Esto les confiere una mayor estabilidad y determina que los aminoácidos no polares se orienten hacia el centro o al interior de la proteína. Mientras que los polares lo hacen hacia el exterior en contacto con el agua. (27)

#### d) Estructura Cuaternaria

Esta estructura informa de la unión de varias cadenas polipeptídicas con estructura terciaria, mediante enlaces débiles (no covalentes), para formar un complejo proteico. Cada una de estas cadenas polipeptídicas recibe el nombre de protómero, cuyo número varía desde dos como en la hexoquinasa, cuatro en la hemoglobina o muchos como la cápsida del virus de la poliomielitis, que consta de 60 unidades proteicas. (25)

### 1.3.3 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

En los aminoácidos y las proteínas se hallan grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo, hidroxilo, indol e imidazol, además del imino y carbonilo del enlace peptídico. Estos grupos funcionales son capaces de reaccionar con otros compuestos del medio y entre sí, originando enlaces inter o intramoleculares, que determinan las propiedades físicas y químicas de las proteínas. Muchas de estas propiedades dependen también de factores extrínsecos, como el pH, la temperatura, la presencia de sales, etc. (36 )

- **Peso Molecular**

El peso molecular de las proteínas puede variar desde 6000 Dalton, como es el caso de la insulina, hasta varios cientos de miles como el de algunas fracciones proteicas de la soya. La velocidad de sedimentación de una proteína en solución depende directamente de su peso molecular, forma, densidad, velocidad aplicada, viscosidad y densidad del solvente en que se encuentra. El peso molecular varía de acuerdo con el estado de agregación en que se encuentren. (11)

- **Composición**

Las uniones peptídicas de las proteínas son hidrolizadas en presencia de ácidos y bases fuertes y también ciertas enzimas. Cuando se calienta una solución proteica durante varias horas en HCl 6 N, las proteínas se hidrolizan completamente en sus aminoácidos



constituyentes. También se obtiene una hidrólisis total a ebullición a 90 °C, la solución en NaOH 5N.

Las enzimas proteolíticas catalizan la rotura de la unión peptídica. Cada enzima proteolítica posee su propia especificidad, es decir, ataca preferentemente ciertos tipos de uniones. La hidrólisis parcial de las proteínas produce cadenas cortas de péptidos que contienen unos pocos residuos de aminoácidos. Estos péptidos también pueden obtenerse por síntesis, a partir de aminoácidos. (19)

- Cuantificación

Existen varios métodos para la cuantificación de proteínas pero la mayoría tiene como principio alguna reacción química característica de los grupos radicales de los diferentes aminoácidos. Varios reactivos como el ácido nítrico, el sulfato de cobre, la  $\beta$ -naftoquinona sulfonato, dan reacciones coloreadas con las proteínas y algunas de ellas tienen también utilidad en las determinaciones cuantitativas: El método de Kjeldahl es el más utilizado en la mayoría de análisis cuantitativos de proteínas y en muchas ocasiones se toma como referencia de comparación cuando se usan otras técnicas. (11)

- Desnaturalización

Se define como toda modificación en la conformación de la proteína. Por lo tanto, implica una destrucción en mayor o menor grado de las uniones de valencia secundarias responsables de la conformación propia de la proteína original, sin que se produzca ruptura de las uniones covalentes o proteólisis. (27)

Cada proteína tiene una diferente sensibilidad a los agentes desnaturalizantes, dependiendo de la facilidad con que éstos afecten la estructura tridimensional del polipéptido. Las proteínas desnaturalizadas presentan características y propiedades distintas a las de las proteínas en forma nativa, en cuanto a la solubilidad, movilidad electroforética, propiedades espectroscópicas en el infrarrojo y el ultravioleta, punto isoelectrico, la viscosidad de sus dispersiones aumenta y sus propiedades biológicas se

pierden. Estas diferencias están muy relacionadas con el método usado para la desnaturalización. (6)

Las operaciones más importantes que se emplean durante el procesamiento de los alimentos y que pueden inducir la desnaturalización de las proteínas son el calentamiento, la presión, la irradiación, el congelamiento, los esfuerzos mecánicos, el pH ácido o alcalino y la presencia de sales. En general cualquier agente químico capaz de romper puentes de hidrógeno e hidrófobos pueden causar la desnaturalización de las proteínas, la urea, el clorhidrato de guanidina, los detergentes, el alcohol, la acetona y otras sustancias inducen este fenómeno. Es importante en el procesamiento de alimentos, ya que puede contribuir tanto a la textura como al sabor de muchos productos alimenticios. (36)

- Interacción proteína-proteína.

Este tipo de interacción es común en alimentos con un alto contenido de proteína. En algunos casos es necesario propiciar las condiciones para que se efectúen, ya que esto hace que muchos productos sean más estables, como en el caso de la interacción que sucede con la caseína y la  $\beta$ -lactoglobulina durante la manufactura de leches concentradas y evaporadas. Otros ejemplos de interacciones proteína-proteína se observan en las micelas de la leche, las proteínas de la soya, la contracción muscular, las reacciones entre anticuerpo y antígeno y la formación del complejo enzima-sustrato. (24)

Las principales fuerzas que contribuyen a estas interacciones son las uniones hidrófobas orientadas en forma ordenada, que hacen que se produzcan grandes complejos de proteína. La estructura cuaternaria de las proteínas es el resultado de este tipo de interacción, que es muy común en alimentos con un alto contenido de proteínas. (27)

Desde el punto de vista nutricional, la formación de estas uniones intra o intermoleculares, rebaja la digestibilidad del nitrógeno, el coeficiente de eficacia proteica y el valor biológico de la proteína afectada. Además, puede quedar muy reducida la disponibilidad nutricional de la mayor parte de los aminoácidos y especialmente de la

lisina. Estas uniones covalentes glutamil-lisil o aspartil-lisil impiden, por bloqueo estérico, que las proteasas alcancen los sitios de hidrólisis y retardan así la digestión in vivo de las proteínas. (6)

- Interacción proteína-polisacárido

En general, las reacciones entre carbohidratos y proteínas son de origen iónico. Debido a que las proteínas y los polisacáridos tienen características coloidales, pueden formar agregados con estructuras tridimensionales muy firmes cuya estabilidad es función de la fuerza iónica, del pH del sistema y de la relación proteína-carbohidrato. La mayoría de propiedades y características físicas de los alimentos dependen de ellas. (6)

Sin embargo algunos carbohidratos utilizados como aditivos alimentarios (alginatos, pectinas y carrageninas), tienen grupos funcionales muy reactivos, como carboxilos y sulfatos, que pueden fácilmente interaccionar con los diferentes grupos activos de las proteínas y reducir su digestibilidad, ya que el complejo proteína-carbohidrato que se produce es difícil de atacar por las enzimas proteolíticas del sistema digestivo. (25)

- Interacción proteína-lípido

Los lípidos pueden interaccionar de diferente manera con las proteínas, básicamente a través de puentes hidrófobos o iónicos, aunque también existen puentes salinos. Las lipoproteínas, tienen una función importante en los tejidos vivos e influyen en las propiedades físicas y funcionales de los alimentos. Cada proteína tiene diferente capacidad emulsionante, que depende en gran medida del balance de aminoácidos hidrófobos/hidrófilos y del método empleado en su obtención. Por ejemplo, el uso de caseinatos y derivados de la soya en la manufactura de embutidos y cárnicos. (11) (35)

Sin embargo, existen casos en los que se forman uniones covalentes entre los productos de oxidación de los lípidos y proteínas. En algunos alimentos, tales como los pescados congelados y deshidratados, las harinas de pescado, las harinas de semillas de oleaginosas, etc., puede producirse la oxidación de los lípidos, seguida de una interacción

covalente proteína-lípido. Las reacciones lípido-proteína puede originar efectos nutricionales desfavorables. (6)

- Hidrofobicidad

La solubilidad de las proteínas en el agua, depende esencialmente de la distribución de los grupos polares y apolares de la cadena lateral de los aminoácidos que la constituyen. La hidrofobicidad de las proteínas, lo mismo que la de los aminoácidos y péptidos, puede determinarse a partir de las solubilidades respectivas en el agua y un solvente menos polar como el etanol. (24)

### **1.3.3.1 Propiedades Funcionales**

El término "propiedad funcional" se define como toda propiedad físico-química que afecta el comportamiento y las características de un alimento y por tanto contribuye a la calidad del producto final. Estas propiedades dependen en gran parte de las interacciones de las proteínas con otros constituyentes de los alimentos, como carbohidratos, lípidos, agua y sales. En ellas también influyen el pH, la temperatura, la fuerza iónica, la constante dieléctrica del medio, la concentración, el tipo de proteína y el tratamiento térmico previo que sufrió el polímero durante su obtención. (51)

Las proteínas vegetales, especialmente las de soya, poseen propiedades emulsionantes, estabilizadoras y de absorción de grasa. En la elaboración de derivados cárnicos, las proteínas de soya forman una estructura que retiene simultáneamente agua y grasa, y mantienen la estabilidad y consistencia del producto cocido. Asimismo, estas proteínas facilitan la absorción de agua de los productos horneados con lo que se evita, en parte la pérdida de volumen y humedad. (11)

Las proteínas son nutrientes primordiales pero también contribuyen al desarrollo del color y el sabor, por participar en la reacción de Maillard y otras reacciones de pardeamiento. Además, juegan un papel importante en el comportamiento físico de los alimentos durante su preparación, transformación o almacenamiento. Las propiedades

funcionales de las proteínas alimenticias, pueden clasificarse en tres grupos principales: Propiedades de hidratación, propiedades dependientes de las interacciones proteína-proteína y propiedades superficiales. (37)

a) Propiedades de hidratación

Para utilizar los concentrados y aislados deshidratados de proteína, hay que hidratarlos. El comportamiento físico-químico y reológico de las proteínas y los otros constituyentes del alimento, está influenciado, no sólo por la presencia de agua sino también por la actividad de la misma. Los grados de hidratación que presentan varias proteínas se deben en parte a las diferencias que existen en la relación de aminoácidos polares y no polares de cada proteína y además a factores extrínsecos como el pH, la fuerza iónica y la temperatura. (34)

Los aminoácidos polares son los grupos que ejercen una mayor influencia en las interacciones proteína-agua, pueden ser de naturaleza catiónica, amónica y no iónica. Los sitios activos más importantes de los aminoácidos con capacidad para formar puentes de hidrógeno son los  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$  (los radicales pueden encontrarse en cadena alifática o fenólica),  $>\text{C}=\text{O}$  y  $-\text{NH}-$ , tienen una mayor capacidad de retención de agua cuando se encuentran en forma iónica, por lo que la influencia del pH del sistema en que se encuentran es fundamental. (55)

La presencia de sales ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KCl}$ ) influye en forma determinante en la solubilidad, la viscosidad, la hidratación y la gelificación de las proteínas, lo cual está estrechamente relacionado con el hecho de que algunas sales pueden interaccionar con los grupos o sitios activos que retienen agua. La cantidad de sales que se unen con la molécula de proteína es una función de la actividad de agua del sistema, mientras que la cantidad de agua retenida por las proteínas es una función de la concentración de sales. (12)

## b) Solubilidad

La solubilidad de las proteínas está determinada por tres factores principales: su grado de hidratación, densidad y distribución de cargas a lo largo de la cadena y la presencia de compuestos no proteicos como fosfatos, carbohidratos o lípidos que pueden tener un efecto estabilizante. Las proteínas son electrolitos de alto peso molecular y de un gran orden estructural, por tanto son muy susceptibles a cambios profundos en su solubilidad cuando se altera alguno de los tres factores mencionados. Los principales agentes capaces de inducir dichos cambios son la fuerza iónica, el pH, las propiedades dieléctricas del solvente y la temperatura. (36)

La solubilidad de las proteínas también depende de factores intrínsecos como la relación aminoácidos hidrófobos-hidrófilos, su secuencia de aminoácidos o estructura primaria y la longitud de la cadena polipeptídicas. (24)

Desde el punto de vista práctico los datos sobre las características de solubilidad son muy útiles para determinar las condiciones óptimas de extracción y purificación de las proteínas, así como para la separación de fracciones proteicas. La solubilidad bajo distintas condiciones, también proporciona una buena indicación de las aplicaciones potenciales de las proteínas. Esto se debe al hecho de que el grado de insolubilidad es la medida más práctica de la desnaturalización, cuando la proteína muestra un descenso en la capacidad gelificante, emulsionante y de formación de espumas. (6)

La insolubilización completa de las proteínas da lugar a su precipitación, lo que sucede cuando varias moléculas del polipéptido llegan a estar en contacto muy íntimo, de tal manera que forman grandes agregados de menor solubilidad que la de las moléculas en solución. Esto se puede lograr al ajustar el pH al punto isoelectrico de la proteína por la adición de sales  $MgSO_4$ ,  $(NH_4)_2 SO_4$  y  $K_2SO_4$ , o ciertos solventes como el etanol y la acetona. (37)

Entre los factores extrínsecos que afectan la solubilidad de las proteínas y que pueden ser modificados para obtener las propiedades deseadas de solubilidad, se mencionan:

- Efecto de la fuerza iónica

Dentro de un cierto intervalo de bajas concentraciones, las sales incrementan la solubilidad de muchas proteínas, fenómeno que recibe el nombre de solubilización por salado. Los cationes y aniones de las sales neutras tienen afinidad por los grupos iónicos radicales provenientes de los aminoácidos ionizables, por lo que evitan la interacción entre moléculas de proteína a través de sus grupos cargados. Al inhibir dicha interacción aumenta considerablemente y se produce la solubilización de las proteínas. (11)

Por el contrario, si se aumenta considerablemente la fuerza iónica del sistema, se logra reducir la solubilidad hasta producir la precipitación de las proteínas, fenómeno que es llamado insolubilización por salado. En este caso se considera que las sales en concentraciones elevadas tienen un efecto deshidratante sobre las proteínas, lo que se refleja en que la proteína pierde parte del agua que la rodea y que sirve como agente estabilizante. (39)

Las sales de los iones divalentes tales como el  $MgSO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$  y  $K_2SO_4$  son mucho más eficaces en la precipitación de las proteínas que las sales de iones monovalentes como  $NaCl$ ,  $NH_4Cl$  y  $KCl$ .

- Efecto del pH

Dependiendo del pH del sistema, las proteínas pueden actuar como cationes o como aniones, de tal manera que al tener la misma carga eléctrica desarrollan fuerzas de repulsión entre ellas lo que repercute en un aumento de su solubilidad y estabilidad. La solubilidad de las proteínas globulares está muy influenciada por el pH del medio en el que se encuentran: es mínima en su punto isoeléctrico, pero aumenta considerablemente al alejarse de él. En el punto isoeléctrico, las fuerzas de repulsión son mínimas, lo que hace que las proteínas tiendan a agregarse con su consecuente precipitación final. No todas las proteínas son insolubles en su punto isoeléctrico como sucede con las proteínas del suero de la leche. (41)

- Efecto de los solventes

Los solventes no acuosos ejercen una influencia muy marcada en la estabilidad y la solubilidad de las proteínas, de tal manera que la constante dieléctrica del medio en que se disuelven, es un factor determinante. La fuerza de atracción entre dos moléculas de proteína puede aumentar si se colocan en un solvente con un valor bajo de constante dieléctrica. (38)

- Efecto de la temperatura

Dentro de un intervalo limitado de 0 a 40 °C, la solubilidad de la mayoría de las proteínas se incrementa con el aumento de la temperatura, sin embargo hay algunas excepciones como la caseína de la leche que es más soluble a 0 que a 25 °C. La mayoría de las proteínas son inestables a temperaturas mayores de 40-50 °C. (24)

#### **1.4 LAS ENZIMAS**

Una enzima es una proteína de origen natural que cataliza reacciones biológicas con un alto grado de especificidad. Todas las enzimas conocidas son de origen proteico y como la mayoría de los catalizadores solo aceleran la velocidad de aquellas reacciones que termodinámicamente son posibles, multiplicando su velocidad por un millón de veces o aún más. (41)

La estructura química de toda enzima es de carácter proteico globular y puede o no requerir otra molécula llamada cofactor para desarrollar su actividad biológica. Debido a su naturaleza proteica, a las enzimas les afectan los mismos factores que a las proteínas: temperatura, solventes, sales, pH, etc., que modifican la estructura química con la consecuente pérdida de su actividad catalítica. La fracción no proteica es parte integral del centro activo de la enzima, es una molécula de bajo peso molecular, muy estable al calor y se encuentra libre o unida a la parte proteica. (40)



#### 1.4.1 PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS

- Especificidad.

La especificidad de las enzimas es muy importante en el procesamiento de alimentos, donde es deseable modificar solo un componente. Las enzimas son altamente específicas tanto en la reacción que catalizan como en la selección de las sustancias reaccionantes, denominadas sustratos. Una enzima cataliza normalmente una sola reacción química o un grupo de reacciones estrechamente relacionadas. El grado de especificidad del sustrato es normalmente elevado y a veces prácticamente absoluto. (16)

La especificidad de las enzimas se divide en cuatro grupos: estereoquímica, baja, de grupo y absoluta. La estereoquímica se refiere a que normalmente las enzimas utilizan D o L isómeros como sustrato, los aminoácidos pertenecen a la serie L, por lo que las enzimas tienen una especificidad estereoquímica con estos sustratos. La especificidad baja se presenta cuando las enzimas atacan un determinado tipo de enlace químico sin importar la naturaleza del sustrato. Las enzimas con especificidad de grupo actúan sobre un sustrato que contiene un determinado enlace y un grupo químico específico a lado de dicho enlace. Y la especificidad absoluta es la más común, consiste en que la enzima utiliza una sola y muy específica sustancia como sustrato. (12)

- Nomenclatura

El nombre de una enzima suele derivarse del sustrato o de la reacción química que cataliza, con la palabra terminada en -asa. Por ejemplo, lactasa proviene de su sustrato lactosa; alcohol deshidrogenasa proviene de la reacción que cataliza que consiste en "deshidrogenar" el alcohol; ADN polimerasa proviene también de la reacción que cataliza que consiste en polimerizar el ADN. (56)

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular ha desarrollado una nomenclatura para identificar a las enzimas, basada en los denominados Números EC. De este modo, cada enzima queda registrada por una secuencia de cuatro números

precedidos por las letras "EC". El primer número clasifica a la enzima según su mecanismo de acción. A continuación se indican las seis grandes clases de enzimas existentes en la actualidad: (16)

- ✓ EC1 Oxidorreductasas: catalizan reacciones de oxidorreducción o redox. Precisan la colaboración de las coenzimas de oxidorreducción ( $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ , FAD) que aceptan o ceden los electrones correspondientes. Tras la acción catalítica, estas coenzimas quedan modificadas en su grado de oxidación, por lo que deben ser recicladas antes de volver a efectuar una nueva reacción catalítica. Ejemplos: deshidrogenasas, peroxidasas.
- ✓ EC2 Transferasas: transfieren grupos activos (obtenidos de la ruptura de ciertas moléculas) a otras sustancias receptoras. Suelen actuar en procesos de interconversión de monosacáridos, aminoácidos, etc. Ejemplos: transaminasas, quinasas.
- ✓ EC3 Hidrolasas: catalizan reacciones de hidrólisis con la consiguiente obtención de monómeros a partir de polímeros. Actúan en la digestión de los alimentos, previamente a otras fases de su degradación. La palabra hidrólisis se deriva de hidro  $\rightarrow$  'agua' y lisis  $\rightarrow$  'disolución'. Ejemplos: glucosidasas, lipasas, esterasas.
- ✓ EC4 Liasas: catalizan reacciones en las que se eliminan grupos  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$  para formar un doble enlace o añadirse a un doble enlace. Ejemplos: descarboxilasas, liasas.
- ✓ EC5 Isomerasas: actúan sobre determinadas moléculas obteniendo de ellas sus isómeros funcionales o de posición, es decir, catalizan la racemización y cambios de posición de un grupo en determinada molécula obteniendo formas isoméricas. Suelen actuar en procesos de interconversión. Ejemplo: epimerasas (mutasa).
- ✓ EC6 Ligasas: catalizan la degradación o síntesis de los enlaces denominados "fuertes" mediante el acoplamiento a moléculas de alto valor energético como el ATP. Ejemplos: sintetasas, carboxilasas.

- Sitio Activo

El sitio activo de una enzima es aquella porción de aminoácidos de la proteína que participa en el proceso catalítico, está formado por ciertos aminoácidos que forman un micro ambiente catalizador dentro de la propia molécula del polipéptido. Las enzimas adquieren su poder catalítico cuando presentan una estructura secundaria y terciaria muy específica, de tal manera que los aminoácidos componentes del sitio activo se encuentran vecinales formando dicho micro ambiente. (57)

La participación de aminoácidos del sitio activo en la reacción enzimática implica, en algunos casos, la formación de un compuesto intermediario enzima-sustrato unido covalentemente. En el sitio activo de muchas enzimas hidrolíticas participan aminoácidos nucleófilos, cuya característica principal es su tendencia a donar un par de electrones. Los grupos más importantes son el hidroxilo de la serina, el sulfhidrilo de la cisteína, el imidazol de la histidina y el carboxilo de los ácidos aspártico y glutámico. (42)

Al igual que en las proteínas, las estructuras conformacionales de las enzimas están estabilizadas por puentes de hidrógeno, uniones iónicas e hidrófobas y en algunos casos enlaces disulfuro. La acción de temperaturas extremas, solventes, condiciones drásticas de pH, fuerza iónica y de varios agentes químicos, produce la desnaturalización de la enzima, lo que origina la pérdida de su actividad. Cuando el efecto del agente desnaturizante no es muy fuerte, la enzima puede nuevamente regenerar su actividad al adquirir otra vez su estructura tridimensional de origen. (12)

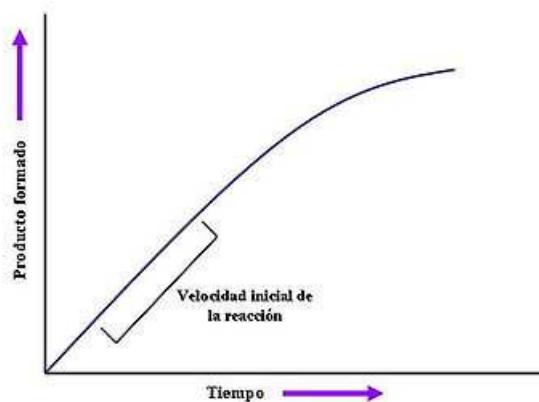
- Cinética de las reacciones enzimáticas

La cinética enzimática es el estudio de cómo las enzimas se unen a sus sustratos y los transforman en productos. Los datos de equilibrios utilizados en los estudios cinéticos son obtenidos mediante ensayos enzimáticos. (55)

La velocidad de la reacción de las enzimas depende de las condiciones de la solución y de la concentración de sustrato. Aquellas condiciones que desnaturalizan una proteína, como temperaturas elevadas, pH extremo o altas concentraciones de sal, dificultan o impiden la actividad enzimática, mientras que elevadas concentraciones de sustrato tienden a incrementar la actividad. (10)

Las enzimas catalizan reacciones biológicas e influyen en la velocidad a la cual se obtiene el equilibrio, pero no afectan el equilibrio global de la reacción. La potencia catalítica de una preparación enzimática se mide en términos de "unidades" que son definidas arbitrariamente. Con el fin de uniformizar esta medición, se utiliza la unidad internacional (UI) de actividad enzimática, definida como la cantidad de enzima que se requiere para transformar en producto, un micromol de sustrato, por minuto, en las condiciones de pH y temperatura óptimas para cada enzima. La concentración de sustrato debe ser tal que la enzima se encuentre actuando con su velocidad máxima, lo que equivale a las condiciones de saturación. (43)

En la FIGURA No 3, se aprecia la curva de la velocidad de reacción versus la concentración del sustrato, generalmente tienen la forma de una hipérbola y sugieren la posibilidad de que la reacción dependa de alguna manera de una disociación simple. La teoría de Michaelis y Menten se basa en la idea de tal disociación.



**FIGURA No 3. CURVA DE PROGRESO DE UNA REACCIÓN ENZIMÁTICA**

### 1.4.2 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Las proteasas son enzimas que degradan las proteínas mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos dando como resultado cadenas más cortas (péptidos) o aminoácidos libres, son utilizados en varios tipos de industria, como en cervecería, ablandamiento de carnes, fabricación de detergentes, tratamiento de cuero y fabricación de quesos. (46)

Según su origen, las proteasas utilizadas industrialmente pueden ser de origen animal, como la renina que es el enzima que produce la coagulación de las proteínas de la leche para formar el queso y que se obtiene del cuarto estómago de los terneros (cuajo); vegetales, como la papaína, que se utiliza como digestivo y ablandador de carnes y que procede de la papaya; las microbianas que son obtenidas a partir del cultivo de hongos y sobre todo bacterias, como la subtilisina, procedente de *Bacillus licheniformis* que se utiliza como agente de limpieza; y las proteasas de otras bacterias y hongos se emplean, en menor escala, como adyuvantes de la digestión en piensos para animales y como ablandadores de carnes. (54)

La proteasa más utilizada es la papaína. Se ha demostrado que una mezcla de papaína y proteasa obtenida de la bacteria *Serratia marcesens* es más efectiva para eliminar la turbidez de la cerveza que ninguna de los enzimas por separado. (46)

Estas enzimas hidrolizan las proteínas en forma ordenada ya que tienen especificidad para un determinado enlace peptídico. Existen dos tipos de proteasas: Las endopeptidasas que hidrolizan los enlaces peptídicos internos de las proteínas y las exopeptidasas que atacan sus aminoácidos terminales. (12)

Otra manera de clasificar a las proteasas es por la naturaleza química de su sitio activo. Sobre la base de este concepto, estas enzimas se clasifican en 4 grupos: serino proteasas, sulfhidrilo proteasas, metaloenzimas y proteasas acidas. El primer grupo tienen un residuo seril específico en su sitio activo. En este grupo están comprendidas la tripsina, quimotripsina, elastasa y subtilisina. Todas son endopeptidasas. El segundo grupo

comprende a las sulfhidrilo proteasas, cuya actividad depende de la presencia de uno o más grupos sulfhidrilos en el sitio activo. (12)

La papaína y algunas proteasas microbianas pertenecen a este grupo. El tercer grupo comprende a las metaloenzimas, cuya actividad depende de la presencia de un metal, usualmente en una relación estequiométrica con la molécula de proteína. El metal puede estar fuerte o débilmente enlazado, en este último caso puede ser removido por una corta diálisis. El cuarto grupo comprende las proteasas ácidas, caracterizadas por la presencia de dos grupos carboxilo en el sitio activo. La pepsina, renina y muchas proteasas microbianas activas a pH ácidos, pertenecen a este grupo. (42)

#### **1.4.2.1 Papaína**

La papaína, se caracteriza por ser un polvo amorfo, granuloso de color blanco, grisáceo o parduzco; ligeramente higroscópico e insoluble en agua y en la mayoría de solventes orgánicos; es soluble en alcohol etílico y metílico. La papaína bruta, contiene un poco de agua, glúcidos, ácidos orgánicos y una mezcla de enzimas, donde destacan las denominadas proteasas que actúan rompiendo los enlaces peptídicos en cualquier lugar de la cadena peptídica en la que se hallen situados (endopeptidasas). También contiene pequeñas cantidades de otros enzimas: papaya peptidasa A, lipasa y lisozima (enzima que rompe las paredes de las células bacterianas). (47)

Las propiedades de la papaína se presenta en la TABLA No 7, es una sulfhidrilo proteasa proveniente del látex de la papaya, en cuyo sitio activo se encuentran en forma característica y secuencial los aminoácidos, Cys (25), His (159) y Asp (158). Cys (25) es esencial para su actividad y la oxidación por agentes oxidantes o por metales pesados inhiben a la enzima. La misma es restaurada por agentes reductores como el EDTA. (25)

La estabilidad y actividad de esta endopeptidasa en solución cubre un amplio rango de condiciones: pH 4 a 10 y temperatura sobre los 70 °C, su actividad desciende a valores de pH inferiores a 3 y superiores a 11. La enzima es muy estable a elevadas temperaturas

en comparación con otras enzimas proteolíticas, tiene un amplio rango de especificidad, hidroliza tanto las proteínas como los pequeños péptidos. (41) (44)

**TABLA No 7. PROPIEDADES DE LA PAPAÍNA**

<b>Enzima</b>	<b>Papaína</b>
Número EC	3.4.22.2
Fuente	Carica papaya
Actividad enzimática	3,18 UA/ mg proteína
Tipo de acción	Endopeptidasa
PH óptimo	4,5 - 7,0
Temperatura óptima	50 - 75 °C
Aminoácidos específicos	Amplia
Sitio activo	Cisteína
Inactivación enzimática	90 °C, 10 min
Activadores	Agentes reductores, compuestos tiol, EDTA
Inhibidores	Agentes oxidantes, reactivos sulfhidrilo, metales pesados

FUENTE: VILLACRES E. 2001

#### **1.4.2.2 Aplicaciones de la papaína en la industria alimentaria**

La acción de la enzima papaína tiene por objetivo la demolición de proteínas específicas presentes en el intermedio de producción, las moléculas mayormente responsables de fenómenos que pueden inducir anomalías y una depreciación grave en la cerveza. El coadyuvante específico garantiza la estabilización clarificante del producto acabado y garantiza la presencia de las mejores características sensoriales que surgen durante la adecuada transformación. La enzima es totalmente inerte con respecto a los parámetros organolépticos y garantiza el alcance de la mejor calidad para la acción exclusiva de clarificación y estabilización. (42)

La papaína es muy activa en la hidrólisis de amidas y esteres, rara vez produce un sabor amargo en los hidrolizados proteicos, es fuertemente inhibida por reactivos o condiciones

que modifiquen el grupo funcional sulfhidrilo y por los oligopéptidos Proteasas microbianas. (45)

En base a su pH óptimo estas enzimas se clasifican en: ácidas, neutras y alcalinas. Las procedentes de hongos son el grupo más importante de preparaciones comerciales que tienen aplicación en panificación, procesamiento de alimentos, modificación de proteínas, alimentos para animales e industria farmacéutica. *Aspergillus oryzae* es la fuente predominante de este grupo de enzimas, cuya afinidad por los residuos de aminoácidos hidrofóbicos es una ventaja para minimizar el sabor amargo en las proteínas hidrolizadas, no son muy termoestables e hidrolizan polipéptidos a péptidos de peso molecular más bajo. (45)

El pH óptimo del complejo enzimático está en el rango de 5,0 - 7,0 y la temperatura óptima está alrededor de 50 °C. Las proteasas ácidas tienen un pH óptimo en el rango de 3-4, muchas de ellas contienen residuos de aspartato en su sitio activo esta especificidad hacia los residuos de aminoácidos aromáticos; tienen aplicación en la hidrólisis de la proteína de soya para la elaboración de salsa, mejoramiento de las propiedades de panificación y como un auxiliar digestivo. Las proteasas alcalinas tienen un pH óptimo en el rango de 7 a 9, son menos sensibles al EDTA que las proteasas neutras. (45)

#### **1.4.2.3 Hidrólisis enzimática de las proteínas**

Las proteínas vegetales pueden modificarse química o enzimáticamente para obtener ciertos beneficios y ventajas en cuanto a sus propiedades funcionales, nutricionales, organolépticas y para lograr un mejor conocimiento de las propiedades físico-químicas. La modificación química de proteínas alimenticias o forrajes, puede producir serios inconvenientes e incluso llegar a la alteración del valor nutricional debido a la formación de derivados de aminoácidos tóxicos y a la contaminación con los reactivos utilizados. (25)

La utilización creciente de enzimas para modificar las propiedades funcionales, es prometedor para la industria alimenticia. Las ventajas de usar proteasas comparada a



otros agentes incluyen: su especificidad, efectividad a bajas concentraciones y condiciones moderadas de pH y temperatura, no son tóxicas, pueden inactivarse cuando la reacción ha alcanzado el grado de hidrólisis deseado, sin que sea necesario eliminarlas del producto final y las reacciones o productos indeseables producidos por proteólisis enzimática son mínimos. (39)

La hidrólisis limitada, origina péptidos más pequeños y una menor estructura secundaria, lo cual contribuye a mejorar ciertas propiedades funcionales como la solubilidad, la capacidad emulsionante y espumante, estas últimas son muy similares a las producidas por las albúminas del huevo y son empleadas en la fabricación de dulces, pasteles, merengues y otros alimentos similares de la industria confitera. (24)

El perfil de solubilidad de las proteínas parcialmente hidrolizadas mejora en toda la escala de pH porque no se forman agregados voluminosos en el punto isoeléctrico, los péptidos formados son más hidrófilos y solvatados. Sin embargo cuando el grado de hidrólisis excede del 3 al 5 %, la viscosidad y espesor de las películas proteicas adsorbidas resultan aparentemente insuficientes para estabilizar las emulsiones y espumas. (12)

La hidrólisis de proteínas puede producir péptidos hidrófobos amargos, con residuos de leucina o fenilalanina terminales. El sabor amargo es pronunciado si muchos péptidos de bajo peso molecular (menor que 6 KDalton) son producidos. Es factible prevenir la formación de estos compuestos amargos, usando proteasas que minimicen su producción y limitando el tiempo de reacción proteolítico. (45)

Hay dos clases de hidrolizados proteicos, los hidrolizados altamente funcionales y los hidrolizados altamente solubles. Los primeros son normalmente incorporados en los productos a una baja velocidad y el impacto del sabor amargo no es importante. Los hidrolizados altamente solubles se incorporan a una alta velocidad, por ejemplo en las bebidas fortificadas y alimentos para dietas especiales, en estos casos un estricto control del sabor amargo es importante. (40)

### 1.4.3 ENZIMAS HIDROLÍTICAS

Las enzimas hidrolíticas constituyen un grupo de enzimas de importancia primordial en el procesamiento de alimentos, estas actúan específicamente produciendo reacciones de ruptura o fraccionamiento de los sustratos por hidrólisis. (14)

Las enzimas hidrolíticas actúan desdoblado los enlaces glicosídicos de los polisacáridos insolubles de la pared celular, estas enzimas son utilizadas en la industria de los alimentos en procesos como: extracción y clarificación de jugos, estabilidad de vegetales y frutas, licuefacción y maceración de frutas, etc. Pudiendo ser aplicadas en la degradación de la pared celular de la piel o cáscara de las frutas, con el objeto de aumentar los rendimientos. (3)

La utilización de estas enzimas en la Industria Alimentaria para obtener un efecto tecnológico determinado está ampliamente extendido, en el procesamiento de frutas son muy utilizadas con el objetivo de despolimerizar en diversos grados los polisacáridos insolubles que componen las paredes celulares, además constituyen una herramienta apreciable para la determinación estructural de los polímeros parietales permitiendo deducir sus interacciones en la pared celular. (22)

En el procesamiento de frutas se distinguen cuatro estados de degradación de los tejidos por estas enzimas, que corresponden a diferentes objetivos tecnológicos:

- **Maceración**, que consiste en la separación de las células del tejido por lisis del cemento péctico intercelular, estas células se mantienen en suspensión, ciertos autores reservan la apelación de néctares a los productos elaborados por esta técnica.
- **Desintegración**, que degrada parcialmente las paredes celulares y las sustancias pécticas.

- **Licuefacción**, en la cual el objetivo es disolver completamente las paredes celulares.
- **Sacarificación**, que consiste en inducir la licuefacción para obtener en los jugos azúcares simples (mono y disacáridos).

#### 1.4.3.1 Clasificación de las enzimas hidrolíticas

Las enzimas hidrolíticas a pesar de sus diversos orígenes (champiñones, levaduras, mohos, bacterias, vegetales superiores, animales) pueden ser clasificadas en tres categorías, de acuerdo a la función de su modo de acción: (33)

- **Exo-enzimas**, que presentan una acción sobre las extremidades generalmente no reductoras de los polisacáridos, liberando monómeros o dímeros.
- **Endo-enzimas**, que rompen los enlaces glicosídicos al azar en la cadena del polisacárido, liberando oligómeros.
- **Oxidasas**, que intervienen sobre todo a nivel de los dímeros y glucósidos en la aglucona.

Otras enzimas como las esterasas potencializan la acción de las enzimas hidrolíticas eliminando los sustituyentes susceptibles de ser bloqueados, como son los grupos metilo y acetilo.

#### 1.4.3.2 Preparaciones enzimáticas comerciales

Los cócteles o preparaciones enzimáticas comerciales, están constituidos por una mezcla de enzimas, los cuales están compuestos principalmente de hemicelulasas, celulasas y pectinasas. Son muy utilizadas en la industria de los alimentos en el procesado de frutas y vegetales, las cuales producen una licuefacción y sacarificación de las paredes celulares de los tejidos en las pulpas de las frutas, degradando la lamela media y la pared celular,

liberando las vacuolas y el citoplasma, e hidrolizando los polisacáridos insolubles mediante la acción sinérgica de las enzimas celulíticas y pectinolíticas. (3) (22)

En la industria de procesamiento de las frutas y legumbres, las preparaciones enzimáticas comerciales se utilizan con el fin de mejorar la calidad de los productos existentes o definir nuevos productos, estos cócteles son generalmente sobrenadantes de cultivos de microorganismos (esencialmente del hongo *Aspergillus niger*) en los cuales las actividades principales ya están determinadas. (31)

La tendencia actual es la de promover las preparaciones enzimáticas comerciales donde la asociación de enzimas están formuladas “bajo medida” para un tipo de sustrato dado y un efecto tecnológico buscado. Este procedimiento necesita de un buen conocimiento de la estructura fina de la pared celular en la medida que esta condicione la textura de los productos a transformar; esto permite definir el tipo de enzima que se hará actuar. Al iniciar el uso de estas preparaciones, parecía juicioso aprender de manera precisa la aptitud de las enzimas purificadas o en mezcla para hidrolizar la materia parietal, esto permitió luego definir la mejor estrategia de utilización de las preparaciones enzimáticas comerciales en el material fresco. (17)

#### **1.4.3.3 Utilización de las preparaciones enzimáticas comerciales**

Las preparaciones enzimáticas comerciales son muy utilizadas en el procesamiento de frutas y vegetales. Massiot *et. al.* (1984), utilizaron una preparación pectinolítica, sp 249 de *Aspergillus aculeatus*, y una preparación celulolítica, Celuclast de *Trichoderma reesei*, para degradar las paredes celulares de la zanahoria, ellas hidrolizaron un 95 % de los polisacáridos combinando las dos enzimas y sacarificándolos en un 67 %. La fracción péctica rápidamente solubilizada está representada por un rhamnogalacturonano de alto peso molecular, asociado a los arabinanos, la celulosa se degradó más lentamente en celobiosa y glucosa. (22)

Sreenath *et. al.* (1984), observaron igualmente que la asociación de enzimas pectolíticas y celulolíticas libera fragmentos pécticos de alto peso molecular y oligosacáridos de

glucanos. Aspinall *et. al.* (1980), utilizando una preparación comercial, Pectinex Ultra SP-1, que incluye péctinasas, hemicelulasas y celulasas, solubilizaron un 33 % de las paredes celulares del mango en donde el 36 % de los ácidos galacturónicos y los azúcares neutros totales provienen más bien de la celulosa que de las fracciones pécticas. (22)

En otros trabajos realizados en el INIAP sobre microfiltración, en pulpa de uvilla se empleó el tratamiento enzimático con 50 ppm con la preparación comercial Klerzyme 150, se alcanzó el FRV óptimo de 4,6 a los 36,8 min del proceso y se obtuvieron 9,42 kg de jugo clarificado, con un rendimiento de jugo clarificado a pulpa del 77,59 %. (13)

Para el arazá las condiciones óptimas de la MFT, con la pulpa refinada y enzimada de arazá fueron 350 ppm de la preparación Rapidasse TF con un rendimiento del 71 %. (23)

## **1.5 TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS**

Se conoce como Tecnología de Membranas a un gran grupo de operaciones, en las que se emplean membranas semipermeables para la separación, concentración o fraccionamiento de partículas que se encuentran en solución. (24)

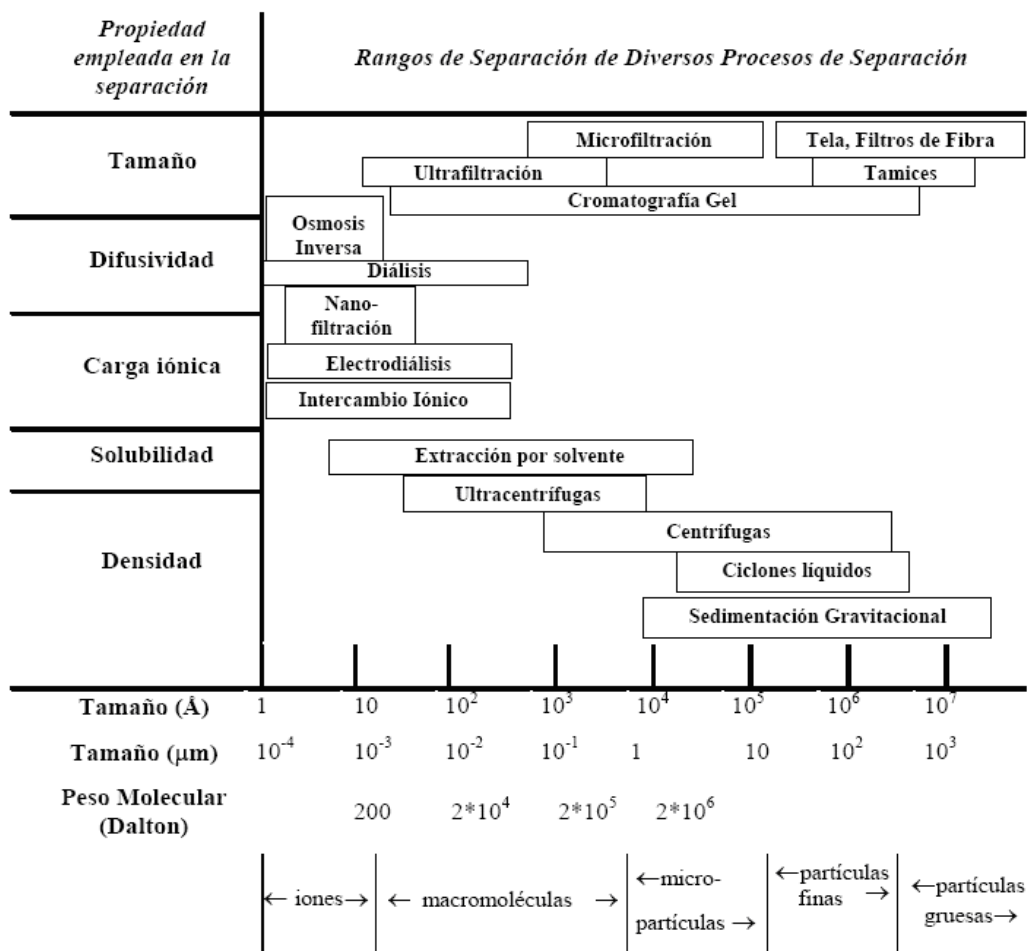
La tecnología de membranas a nivel mundial se encuentra en permanente evolución; continuamente se encuentran más aplicaciones en la industria alimentaria y en la biotecnológica, así como, en el tratamiento de efluentes, en la actualidad es muy clara la influencia en el desarrollo de nuevos tipos de membranas, que tendrá en el futuro, sobre los procesos de separación. (18)

Los procesos que utilizan membranas semipermeables constituyen un grupo de tecnologías limpias, de característica modular, con bajos requerimientos energéticos y que preservan la calidad y la funcionalidad de los productos a separar o concentrar, además, que no requieren la aplicación de calor para efectuar los cambios de las fases, lo que minimiza el riesgo de daño a los productos termolábiles, así como, la pérdida de aromas que concomitantemente acompaña a la eliminación de sustancias volátiles. (18)

1.5.1 PROCESOS DE SEPARACIÓN

En la tecnología de membranas la separación se basa principalmente en el tamaño molecular y en menor medida en la forma y la carga. Los cuatro principales procesos son la ósmosis inversa (hiperfiltración), nanofiltración, ultrafiltración y microfiltración. Se pueden considerar como un espectro de procesos continuo, sin fronteras claras entre ellos. En la actualidad existe una gran selección de membranas que cubre todo ese espectro. En la FIGURA No 4 se ilustran estos procesos y como están relacionados con la filtración de las partículas. (26)

FIGURA Nº 4. RANGOS DE SEPARACIÓN DE DIVERSOS PROCESOS, CON BASE A SUS PROPIEDADES



FUENTE: BRENNAN, 2006

La tecnología de membranas tiene muchas ventajas, comparada con otras técnicas de separación convencionales. La principal ventaja, es que la separación se puede realizar en condiciones térmicas ambientales, sin aumentar la temperatura; por lo tanto, es adecuada para productos sensibles a los procesos con calor, al aumentar la calidad del producto. El costo de operación, mantenimiento y mano de obra es menor que en los procesos térmicos; se puede separar de forma continua y discontinua, además que permite la combinación con otros procesos. (15)

Una desventaja importante de la tecnología de membranas es el fouling y/o colmataje, que es el ensuciamiento de la membrana, con la consecuente disminución del flujo y el aumento del tiempo de filtración, que puede favorecer el crecimiento de microorganismos en la membrana, razón por la cual, se requiere de una limpieza más frecuente, incrementándose el costo y el tiempo entre las filtraciones. (17)

### 1.5.2 PRINCIPIOS Y MODOS DE OPERACIÓN

El principio básico de la filtración es la separación mediante el uso de membranas, la misma que se define como la separación de dos o más componentes que se encuentran en un fluido, basado principalmente en la diferencia del tamaño. Su uso convencional se refiere a la separación de partículas sólidas inmiscibles en el líquido o en fluidos gaseosos. (28)

El papel primario de una membrana es actuar como una barrera selectiva, que permita el paso de ciertos componentes y retiene otros componentes de una mezcla. Lo que implica que, la fase retenida sea enriquecida en uno o más componentes. (28)

Los procesos membranarios constituyen una serie de técnicas de separación, que consisten en emplear un gradiente, ya sea de presión o electrostático, para forzar el paso de componentes de una disolución a través de una membrana porosa semipermeable, para que se obtenga una separación sobre la base del tamaño e incluso de la carga molecular. Las operaciones de membranas pueden utilizarse para concentrar o purificar una solución o una suspensión y para fraccionar una mezcla. (20)

La alimentación o suministro, se aplica a uno de los lados de la membrana sometida a una determinada presión. En la mayoría de los casos, el alimento fluye en una dirección paralela a la superficie de la membrana, donde la corriente que pasa a través de la membrana por efecto de la presión recibe el nombre de permeado (filtrado) y la corriente que sale tras haberse eliminado la cantidad de permeado recibe el nombre de retenido (concentrado). Los diferentes tipos de procesos para la separación, de acuerdo al tamaño de las partículas y el rango de operación de la presión se resumen en la TABLA No 8.

**TABLA N° 8. PROCESOS DE SEPARACIÓN Y SUS CARACTERÍSTICAS**

<b>Proceso de Separación</b>	<b>Tamaño de la partícula separada (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Presión de operación (bar)</b>	<b>Retenido</b>	<b>Permeado</b>
<b>Microfiltración (MF)</b>	0,1- 10,0	0,1 - 5,0	Partículas	Disolventes, componentes diluidos.
<b>Ultrafiltración (UF)</b>	0,1 - 0,005	1,0 - 10,0	Partículas y macromoléculas	Disolventes, componentes diluidos con masa molecular pequeña, iones.
<b>Nanofiltración (NF)</b>	0,005 - 0,0005	10,0 - 50,0	Partículas, sustancias diluidas, iones polivalentes.	Disolventes, componentes diluidos con masa molecular muy pequeña, iones monovalentes.
<b>Osmosis inversa (Hiperfiltración) (OI)</b>	< 0,0005	10,0 - 100,0	Partículas y todos los componentes diluidos.	Solamente disolventes (agua, metanol, etanol).

FUENTE: SCHIRG, 2001

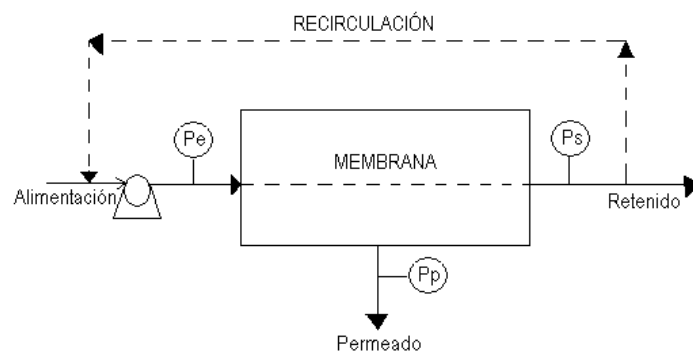
La presión requerida para forzar el paso a través de la membrana suele ser proporcional al tamaño de los poros siendo necesario incrementar sustancialmente su magnitud a medida que el tamaño de éstos decrece, por lo cual es necesario incrementar sustancialmente su magnitud a medida que éste disminuye. (15)



### 1.5.3 MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL

La microfiltración tangencial (MFT), es una técnica de separación por membranas que consiste en la filtración tangencial de una solución a través de una membrana en función del tamaño de las partículas, la que permite retener partículas cuyo diámetro se encuentra entre 0,1 y 10  $\mu\text{m}$ , con el fin de remover la mayoría de macropartículas, tales como bacterias, coloides, esporas, hongos, levaduras, etc.; por lo que la MFT es considerada como una técnica de pasteurización en frío que mantiene las propiedades organolépticas del producto. (20)

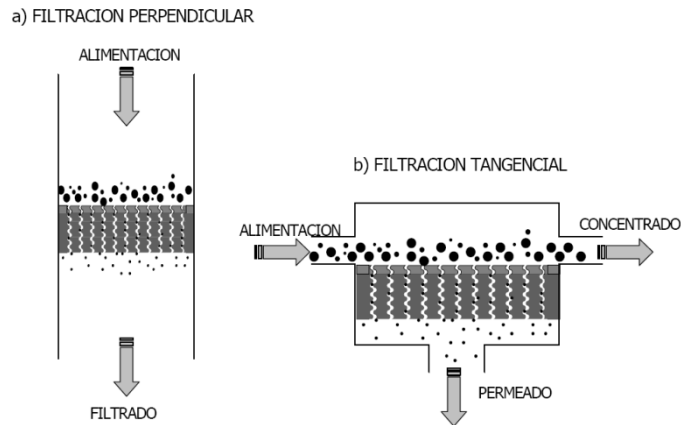
En la FIGURA N° 5 se esquematiza un proceso de MFT.



**FIGURA No 5. ESQUEMA DE UN MÓDULO DE MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL**

Mediante la MFT se obtiene dos productos, el permeado y el retenido. El permeado es la fase de la alimentación que ha traspasado la membrana semipermeable y que se encuentra libre de microorganismos, y el retenido es la fase de la alimentación que no traspasó la membrana semipermeable y que contiene una alta concentración de partículas. Esto sucede, debido a una diferencia de presión entre las dos fases.

El proceso de filtración puede ser realizado bajo dos configuraciones diferentes, la frontal y la tangencial, como se muestra en la FIGURA No 6. (18)



**FIGURA No 6. TIPOS DE FILTRACIÓN**

Es importante señalar que en la filtración frontal las especies retenidas se acumulan en la interfase membrana-solución en una capa cuya resistencia se opone a la fuerza impulsora (presión). En consecuencia, el flujo del permeado disminuye si la diferencia de presión se mantiene constante o causa el aumento de la diferencia de presión si el flujo del permeado se mantiene constante. Como resultado, el proceso de filtración frontal debe ser parado periódicamente para el lavado de la membrana. (17)

La filtración tangencial ha intentado aliviar el inconveniente de la filtración frontal y se ha convertido en una opción muy viable a escala industrial, ya que gracias a este tipo de filtración, la alimentación líquida fluye paralelamente a la superficie de la membrana, lo que provoca que la misma alimentación barra continuamente la superficie del medio filtrante. Esta modalidad disminuye drásticamente el depósito e incrustación de solutos en la membrana. Como resultado, se produce un efectivo control del fenómeno de polarización por concentración, aumentando la eficiencia de la separación. Esta técnica es más eficiente que el proceso tradicional de filtración perpendicular, lo que permite procesar mayores volúmenes de alimentación en forma continua o batch. (17)

A continuación en la TABLA No 9 se presenta la composición nutricional del permeado y el retenido del jugo clarificado de arazá.

**TABLA N ° 9. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL PERMEADO Y RETENIDO DE ARAZÁ, OBTENIDOS DEL PROCESO DE MFT**

ANÁLISIS*			MUESTRAS DE ARAZÁ	
			JUGO CLARIFICADO (PERMEADO)	CONCENTRADO (RETENIDO)
Vitamina C (mg/100 ml)			14,50 ± 0,25	54,76 ± 0,80
Minerales	Macro elementos mg/100ml	Calcio	6,63 ± 0,20	6,82 ± 0,51
		Magnesio	3,53 ± 0,10	6,82 ± 0,01
		Sodio	0,22 ± 0,09	0,62 ± 0,11
		Potasio	40,33 ± 0,07	47,11 ± 1,01
		Fósforo	6,13 ± 0,40	14,26 ± 1,19
	Micro elementos µg/100 ml	Cobre	34,00 ± 2,00	50,00 ± 0,20
		Hierro	131,00 ± 0,95	248,00 ± 1,01
		Manganeso	40,00 ± 1,30	50,00 ± 0,13
		Zinc	110,00 ± 1,05	136,00 ± 0,12
	Azúcares totales (g/ 100 ml)			4,02 ± 0,04
Azúcares reductores (g/ 100 ml)			2,88 ± 0,03	4,87 ± 0,02
Polifenoles totales (mg/ 100 ml)			52,66 ± 0,20	62,22 ± 0,63
Carotenoides totales (mg/100 ml)			0,28 ± 0,07	0,47 ± 0,04

\* En base fresca ± desviación estándar, n = 3 repeticiones  
FUENTE: LAVERDE, J. 2011

## **CAPÍTULO II**

### **2 PARTE EXPERIMENTAL**

#### **2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN.**

La presente investigación se llevó a cabo en:

- Departamento de Nutrición y Calidad en la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP.
- Laboratorio de Bioquímica y Bromatología de la Facultad de Ciencias, de la ESPOCH.

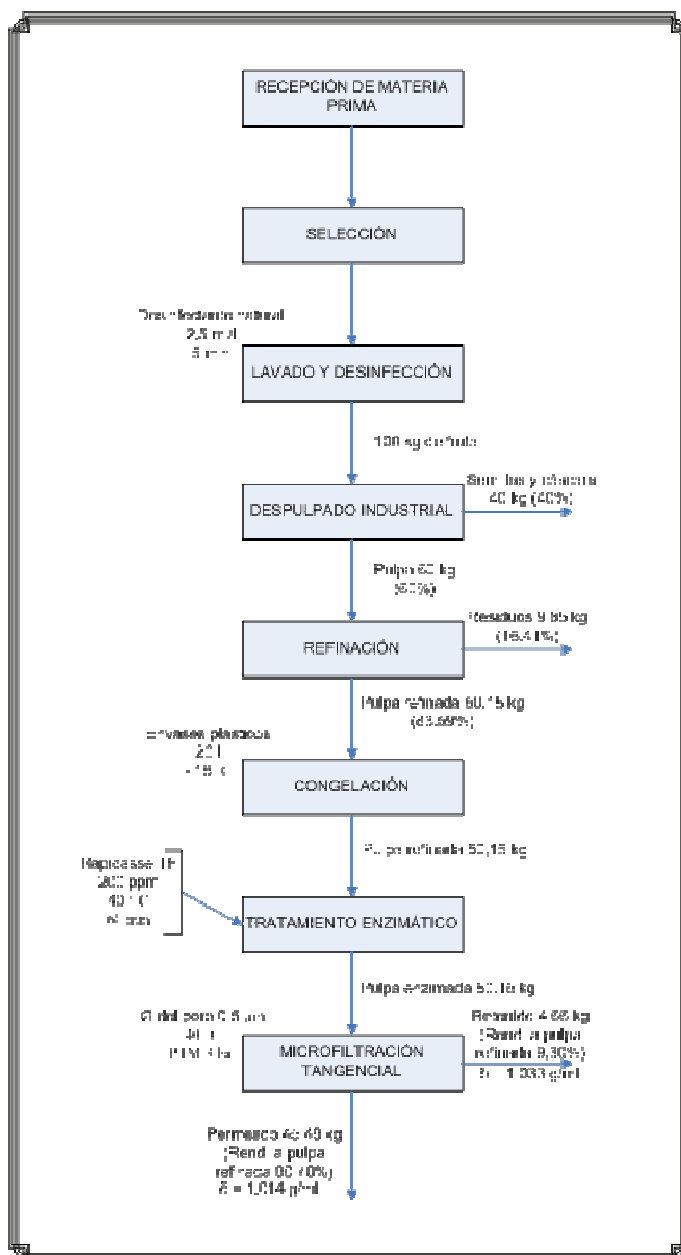
#### **2.2 MATERIALES**

##### **2.2.1 MATERIA PRIMA**

- Jugo clarificado de arazá
- Pulpa congelada (- 18 °C) de arazá
- Preparación enzimática comercial Rapidasse TF
- Papaína, marca Fluka, 3,16 U/mg proteína

El esquema para la elaboración del jugo clarificado de arazá se presenta en la FIGURA No 7.

FIGURA No 7 . ESQUEMA DE LA OBTENCIÓN DEL JUGO CLARIFICADO DE ARAZÁ



FUENTE: LAVERDE, J. 2010

### 2.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

- Agitadores
- Balones y probetas
- Bureta y vasos de precipitación
- Cajas petri y tubos de ensayo
- Desecador
- Embudos
- Erlenmeyers
- Espátulas, gradillas, trípode
- Kitasato
- Material de aseo

- Material de protección
- Papel filtro e indicador
- Pera de succión
- Pipetas tipo Eppendorf
- Pipetas graduadas y volumétricas
- Puntas desechables
- Soportes y pinzas
- Varillas de agitación

### 2.2.3 EQUIPOS

- Agitadores magnéticos
- Balanza analítica
- Cámara fotográfica, computadora
- Cronómetros
- Cuarto de refrigeración
- Cuarto de congelación
- Equipo de microfiltración tangencial.
- Espectrofotómetro UV-VIS
- Estufa, incubador
- Medidor de Color, Tec-PCM/PSM
- Medidor de turbidez
- Mufla, pH Metro
- Placas agitadoras
- Refractómetro
- Tubos de centrifuga graduados
- Termómetro digital
- Turbidímetro
- Ultracentrífuga
- Viscosímetros Cannon Frenske

### 2.2.4 REACTIVOS

- Ácido acético  $C_2H_4O_2$
- Ácido clorhídrico  $HCl$
- Ácido nítrico  $HNO_3$
- Ácido sulfúrico  $H_2SO_4$
- Cal  $Ca(OH)_2$
- Cloruro de Bario  $Ba_2Cl$
- Etanol  $CH_3-CH_2-OH$
- Ferrocianuro potásico  $C_6FeK_4N_6$
- Hidróxido de amonio  $NH_4OH$
- Hidróxido de sodio  $NaOH$
- Lugol,  $I_2+KI$
- Molibdato amónico  $(NH_4)Mo_7O_{24}$
- Nitrato de plata al 2 %  $AgNO_3$
- Oxalato de amonio  $C_2H_8N_2O_4$
- Reactivo de Barfoed
- Reactivo de Benedict
- Reactivo de Fehling
- Reactivo de Millon
- Reactivo de Molisch
- Reactivo de Seliwanoff
- Reactivo glioxílico.
- Solución de Sulfato de cobre  $CuSO_4$
- Sosa caústica  $NaOH$
- Tiocianato amónico al 4 %  $NH_4 SCN$

## 2.3 MÉTODOS

La investigación se realizó en dos fases experimentales:

### 2.3.1 FASE I. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PRECIPITADO DEL JUGO CLARIFICADO DE ARAZÁ.

#### 2.3.1.1 Factores de estudio, tratamientos y diseño experimental

Para realizar la extracción del precipitado, se sometió el mismo a 3 diferentes condiciones, a las cuales se las expresa como factores en estudio.

Factor A: Temperatura del jugo

T1: 4 °C                      T2: 18 °C                      T3: 32 °C

Factor B: Tiempo de centrifugación

t1: 30 min                      t2: 60 min

Factor C: Revoluciones por minuto de la centrífuga

R1: 6.000                      R2: 8.000

En la TABLA No 10 se presenta los 12 tratamientos.

**TABLA No 10. TRATAMIENTOS PARA EL PROCESO DE EXTRACCIÓN**

<b>Código</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción</b>
1	T <sub>1</sub> t <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	4° C x 30min x 6000 rpm
2	T <sub>1</sub> t <sub>2</sub> R <sub>1</sub>	4° C x 60min x 6000 rpm
3	T <sub>1</sub> t <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	4° C x 30min x 8000 rpm
4	T <sub>1</sub> t <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	4° C x 60min x 8000 rpm
5	T <sub>2</sub> t <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	18° C x 30min x 6000 rpm
6	T <sub>2</sub> t <sub>2</sub> R <sub>1</sub>	18° C x 60min x 6000 rpm
7	T <sub>2</sub> t <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	18° C x 30min x 8000 rpm
8	T <sub>2</sub> t <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	18° C x 60min x 8000 rpm
9	T <sub>3</sub> t <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	32° C x 30min x 6000 rpm
10	T <sub>3</sub> t <sub>2</sub> R <sub>1</sub>	32° C x 60min x 6000 rpm
11	T <sub>3</sub> t <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	32° C x 30min x 8000 rpm
12	T <sub>3</sub> t <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	32° C x 60min x 8000 rpm

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (BCA) con tres observaciones.

**TABLA No 11. ESQUEMA DEL ANÁLISIS DE VARIANZA**

<b>ADEVA</b>	
<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
<b>Total</b>	35
<b>Tratamientos</b>	11
<b>Repeticiones (r)</b>	2
<b>Error</b>	22

Se determinó el coeficiente de variación en porcentaje (CV %). Para los tratamientos se realizó la prueba de significación de Tukey al 5 %.

### **2.3.1.2 Métodos específicos de manejo del experimento**

Se realizó la extracción del precipitado descongelado, a tres temperaturas y se centrifugó el jugo clarificado bajo dos condiciones de tiempo y de revoluciones del equipo.

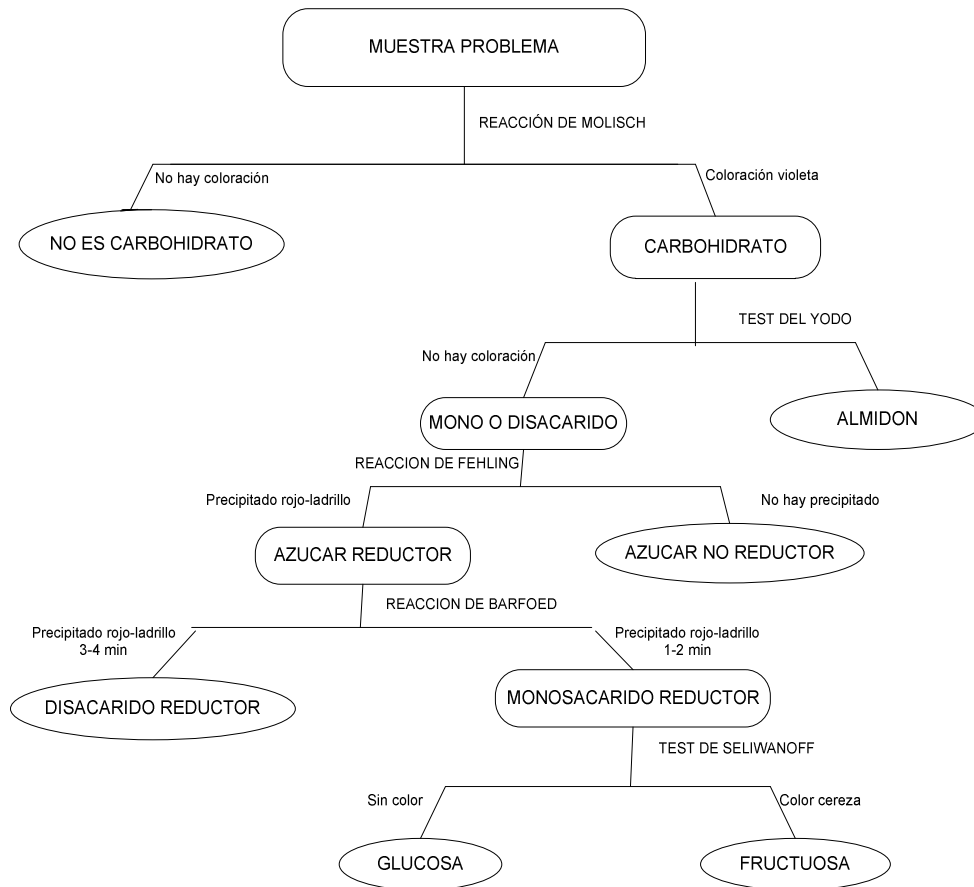
Se midió el color del precipitado extraído y secado a dos condiciones: en estufa por calor a 40 °C, y por medio de la liofilización. Con el fin de determinar la mejor forma de mantener las propiedades de este residuo. Posteriormente se emplearon métodos específicos para la identificación cualitativa de carbohidratos, proteínas y minerales presentes en las muestras. (48) (49)

Para la caracterización del precipitado se realizaron los siguientes análisis:

- a) **IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS:** para la identificación se empleo el esquema de la marcha bioquímica que se muestra en la FIGURA No 8. Para la cual se emplearon las pruebas cualitativas descritas a continuación. (21):



FIGURA No 8. ESQUEMA DE LA MARCHA BIOQUÍMICA PARA CARBOHIDRATOS.



FUENTE: ESPINOZA, 2006

- MOLISCH:** A 2 mL de la solución se añade dos gotas del reactivo de Molisch. Se mezcla bien y se inclina el tubo de ensayo dejando caer por las paredes 1 mL de  $H_2SO_4$  concentrado (no agitar). Una zona violeta aparece en la unión de los dos líquidos.
- FEHLING:** A un tubo con 2 mL de solución de Fehling, se adiciona 4 mL de agua destilada y se hierve. A la solución caliente se añade 1 mL de la muestra y se calienta nuevamente. La formación de un precipitado amarillo o anaranjado indica que la reacción es positiva.

- **BARFOED:** Se agrega 1 mL de la muestra problema a 2 mL del reactivo de Barfoed, se mezcla bien y se coloca en un baño de agua hirviente por 1 min. Se deja en reposo. La reducción se indica por la formación de un precipitado rojo de óxido cuproso. Si el precipitado no aparece luego de un minuto, hervir de nuevo, dejar en reposo por 15 min.
  - **SELIWANOFF:** A 2 mL del reactivo de Seliwanoff se agrega cuatro gotas de la solución de azúcar y se calienta por 1 min en un baño hirviente. Se observa la aparición de un color cereza con o sin separación de un precipitado rojo-pardo.
  - **YODO PARA ALMIDÓN Y DEXTRINAS:** A la muestra problema se agrega dos gotas de una solución de yodo-yodurada (lugol). Si existe almidón se producirá un color negro-azulado, para dextrinas y/o glucógeno se producirá un color rojo o marrón rojizo.
  - **YODO PARA CELULOSA:** A una porción de la muestra seca se añade una gota de  $H_2SO_4$  concentrado. Por otra parte añadir unas gotas de solución de lugol. Mezclar, si hay celulosa se producirá una línea negro-azulada en el punto en donde se unen los líquidos.
  - **AZUCARES NO REDUCTORES:** Poner 5 mL de la solución problema en un tubo de ensayo y añadir 3 mL de HCl diluído (10 %). Calentar a ebullición en un baño de agua por 2 min. Enfriar y añadir carbonato sódico sólido hasta neutralizar el ácido, luego realizar la prueba de Fehling, si es positiva indica la presencia de azúcares no reductores.
- b) **IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS:** Se identificó la presencia de proteínas y aminoácidos libres presentes en la muestra mediante diferentes reacciones.(49)
- **AMINOÁCIDOS LIBRES** en un papel filtro se coloca una fracción de la muestra, y sobre ésta se agrega de cinco a siete gotas de ninhidrina. Se coloca en estufa hasta que se seque por completo y si es positiva la reacción se produce un color morado.

- **BIURET:** A unos mililitros de la solución problema añadir 1 mL de solución de NaOH 10 % y 1 mL de solución de sulfato cúprico al 1 %. Se mezcla y se observa en caso positivo una coloración malva, rosa o violeta.
- **HELLER:** Se coloca en un tubo de ensayo 2 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado y se añade lentamente por las paredes dos mililitros de la solución de proteína sin mezclar, en la interfase se produce un anillo blanco.
- **MILLONS:** Se coloca 2 mL de la solución problema en un tubo de ensayo, añadir unas gotas del reactivo de millons y hervir en un baño de agua. La aparición de un color o precipitado rojo se toma como positivo.
- **SAKAGUCHI:** A 3 mL de la solución problema en un tubo de ensayo se añade 1 mL de NaOH 2M, dos gotas de  $\alpha$ -naftol en alcohol al 1 % y cuatro gotas de solución de hipoclorito sódico. Se agita con cuidado, en caso positivo se forma un color rojo brillante estable.
- **XANTOPROTÉICA:** A 2 mL de la solución problema se añade 1 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado. En caso positivo se observa un precipitado blanco, calentar y observar si se forma un color amarillo. Enfriar en corriente de agua fría y añadir con precaución NaOH al 10 %, en caso positivo se observará el cambio a color anaranjado.
- **GLIOXÍLICA:** Se mezcla en un tubo de ensayo 1 mL de reactivo glioxílico y 2 mL de solución problema; añadir por las paredes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, sin agitación. En el límite de separación de la mezcla aparece un anillo violeta. La reacción en general es muy lenta y no se da en presencia de nitratos, nitritos, cloratos y exceso de cloruros.
- **AMINOÁCIDOS HPLC:** Se pesa con exactitud 25 mg de muestra pulverizada en tubos con tapa de rosca recubierta de teflón.

Se añade 5 mL de HCl 6N y se agita. Se lleva a una estufa que este a 110 °C de temperatura por 22 horas.

Se concentra la muestra a sequedad en un rotavapor. Se elimina el ácido clorhídrico, lavando los balones con 2 mL de agua por tres veces.

Se disuelve el residuo seco del hidrolizado con 5 mL de solución buffer pH 2,2. Se guarda la muestra en refrigeración. Se prepara un blanco que consiste en solución tampón citrato, pH 2,2 y se coloca en un vial.

Se prepara la solución estándar con la misma solución tampón citrato y se pone en un vial. En la TABLA No 12 se presentan las condiciones de trabajo utilizadas en el INIAP para el análisis de aminoácidos (50).

**TABLA No 12. CONDICIONES DE TRABAJO DEL EQUIPO HPLC SHIMADZU PARA AMINOÁCIDOS**

<b>Parámetros</b>	<b>Condiciones</b>
Temperatura del horno	60 °C
Temperatura del enfriador de la muestra	4 °C
Flujo de solución de eluyente	0,60 m <sup>2</sup> /min
Longitud de excitación	350 nm
Longitud de emisión	450 nm
Volumen a inyectarse	5 ul
Tiempo de corrida	45 min

FUENTE: INIAP, LSAIA

- **ANÁLISIS DE PROTEÍNA:** Si se obtienen resultados positivos en la identificación cualitativa, se cuantificará el contenido proteico mediante el método de Kjeldhal.

#### ***Procedimiento***

- Se pesa un gramo de muestra y se registra el peso del papel y del papel más la muestra. (W<sub>2</sub>)
- Se añade 8 gramos de sulfato de sodio más 0,1 gramos de sulfato cúprico.

- Todo este contenido se coloca en cada balón al cual se añade 25 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.
- Cada balón con todo este contenido es llevado hasta las hornillas del equipo de Kjeldahl para su digestión, por un tiempo de 45 minutos a partir del momento que se clarifica la digestión.
- Luego de este tiempo son enfriados hasta que se cristalice el contenido de los balones.
- Una vez terminada la fase de digestión se procede a preparar la etapa de destilación para lo cual colocamos en los matraces erlenmeyer 50mL. de ácido bórico al 2,5 % y los colocamos en cada una de las terminales del equipo de destilación.
- En cada balón con la muestra cristalizada se coloca 25 mL de agua destilada más 8 mL de hidróxido de sodio al 50 % añadiendo también 3 lentejas de zinc, con todo esto contenido son llevados a las hornillas para dar comienzo a la fase de destilación.
- El amoníaco como producto de la destilación es receptado hasta un volumen de 20 mL en cada matraz.
- Se retira los matraces con su contenido, mientras que el residuo que se encuentra en el balón es desechado y se recupera las lentejas de zinc.
- Para la fase de titulación se arma el soporte universal con la bureta y el agitador magnético.
- En cada matraz se coloca 3 gotas del indicador.
- Las barras de agitación magnética son colocadas en el interior de cada matraz y llevados sobre el agitador magnético y se carga la bureta con HCl al 0,1 N.
- Se prende el agitador y se deja caer gota a gota el ácido clorhídrico hasta obtener un color grisáceo transparente que es el punto final de la titulación.
- El número de mililitros de HCl al 0,1 N. gastado se registra para el cálculo respectivo.

**Cálculos**

Porcentaje de Proteína:

$$\%P = \frac{NHCl * 0.014 * 100 * 6.25 * mLHCl}{W_2 - W_1}$$

Donde:

% P = % Proteína Bruta

$W_1$  = Peso del papel

$W_2$  = Peso del papel más muestra

0,014 = Miliequivalente del nitrógeno

6,25 = Factor de conversión de  $N_2$  en proteína

mL HCl = Consumo de ácido clorhídrico utilizados al titular

NHCl = Normalidad del ácido clorhídrico

**c) IDENTIFICACIÓN DE MINERALES**

Se calcinó en una sorbona la muestra contenida en un crisol de porcelana, hasta ausencia de humos, luego se incineró en una mufla y la ceniza obtenida se dividió en 2 partes (*a* y *b*), para proceder a la identificación.

Se disolvió la **parte a** en HCl 10 % y se filtró, recibiendo el filtrado en 4 tubos de ensayo para investigar la presencia de:

- **CALCIO:** A una parte del filtrado se añadió  $NH_4OH$  hasta que la mezcla sea neutra y se agregó igual volumen de solución de oxalato de amonio al 5 %. La presencia de un precipitado blanco indica la presencia de calcio.
- **SULFATO:** A una parte del filtrado se añade unas gotas de solución de  $BaCl_2$  al 10 %, en caso positivo se forma un precipitado blanco.
- **HIERRO FERROSO:** A una parte del filtrado se añadió gotas de solución de ferrocianuro potásico al 5 %, en caso positivo asoma un color azul.

- **HIERRO FÉRRICO:** A una parte del filtrado se añade pocas gotas de solución de tiocianato amónico al 4 %. En caso positivo aparece una coloración roja.

En la *parte b*, se disuelve en HNO<sub>3</sub> diluído y se filtró, recibiendo el filtrado en 3 tubos de ensayo, para investigar la presencia de:

- **CARBONATO:** La liberación de gas antes y durante la filtración indica la presencia de carbonato. El gas formado es el CO<sub>2</sub>.
- **CLORURO:** A una parte del filtrado se añade unas gotas de solución de nitrato de plata AgNO<sub>3</sub> al 2 % en caso positivo aparece un precipitado blanco (exponiéndolo a la luz se torna negro).
- **FOSFATO:** A una parte del filtrado se añade en exceso solución de molibdato amónico, calentar en baño de agua. En caso positivo aparece un color blanco con un precipitado amarillo.

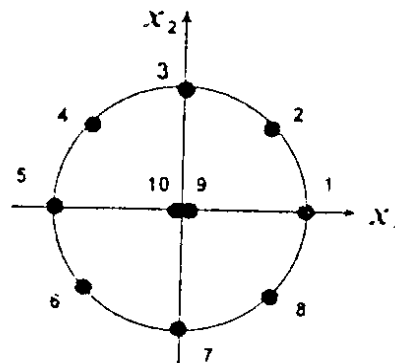
### 2.3.2 FASE II REALIZACIÓN DE ENSAYOS CON LA PREPARACIÓN ENZIMÁTICA COMERCIAL RAPIDASSE TF Y FORTIFICACIÓN PARA OBTENER UN JUGO CLARIFICADO ESTABLE

#### 2.3.2.1 Factores de estudio, tratamientos y procedimiento

Como en la Fase I se identificó el principal componente presente en el precipitado del permeado de arazá, en la Fase II se verificará la acción de una enzima proteolítica (papaína) en la pulpa enzimada previamente a las condiciones establecidas para el coctel enzimático Rapidasse TF, ajustándola a las concentraciones utilizadas por la industria.

Se planteó un plan de experiencia esférico con dos puntos centrales, como el presentado en la FIGURA No 9 a partir de los cuales se establecieron los diez tratamientos presentados en la TABLA No 13.

FIGURA No 9. DISPOSICIÓN DE LOS DIEZ PUNTOS EXPERIMENTALES EN TORNO A LA CIRCUNFERENCIA



FUENTE: GOUPY, 1999

TABLA No 13. ENSAYOS PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE LA PULPA DE ARAZÁ

Tratamientos	Tiempo min	Concentración Ppm
T1	45	50
T2	30	160
T3	80	1605
T4	0	275
T5	45	275
T6	45	275
T7	90	275
T8	30	390
T9	80	390
T10	45	500

Para la optimización del tratamiento enzimático fortificado se incubó las diferentes muestras de pulpa enzimada con el coctel Rapidasse TF, a la cual se agrega soluciones de papaína diluída en agua, utilizando diferentes concentraciones que van desde los 50 a 500 ppm y tiempos de incubación que varían desde los 0 a los 90 minutos, manteniendo el temperatura constante de 35 °C optimizada en un previo estudio. Posteriormente se procede a inactivar las enzimas mediante un proceso de pasteurización.

La pulpa tratada con la preparación enzimática comercial fortificada, se utilizará en el proceso de microfiltración tangencial para la obtención del jugo clarificado, en el cual se



establecerá la vida de anaquel mediante la medición semanal durante tres meses de la turbidez del jugo clarificado.

### **2.3.2.2 Manejo del experimento**

En los sobrenadantes resultantes del tratamiento enzimático se realizó el control de calidad mediante las siguientes determinaciones: pH, color, turbidez, viscosidad cinemática, sólidos solubles, sólidos insolubles en suspensión.

El porcentaje de solubilización más alto, obtenido de la acción del cóctel enzimático fortificado con papaína, a diferentes tiempos y concentraciones, determinó las mejores condiciones a las cuales debe realizarse la enzimación.

- **pH**

En el jugo clarificado se midió directamente con un medidor de pH.

- **DETERMINACIÓN DE COLOR**

El color se determina por el Sistema Hunter, se utiliza el equipo marca ColorTec-PCM<sup>TM</sup>. El color se reportará en L\* (luminosidad), a\* (rojo+, verde-) y b\* (amarillo+, azul-). La escala de parámetros L, a y b se usará para calcular en ángulo Hue (H), la cromaticidad (C) y el índice de oscurecimiento (IO).

Se coloca la muestra en una caja petri pequeña, tapar teniendo cuidado de no dejar grumos o burbujas en la caja. Luego se ubica el prisma del ColorTec-PCM/PSM sobre la superficie de la caja, tratando de cubrir toda la superficie. Se toma las lecturas en diferentes zonas de la caja. Anotar: L, a, b (51).

### *Cálculos*

$$H = \arctg(b/a)$$


$$C = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

$$IO = 100 * ((a + 1,75 * L) / (5,645 * L + a - 3,012 * b) - 0,31) / 0,172$$

#### • DETERMINACIÓN DE TURBIDEZ

El método más empleado para determinar la turbidez de una solución, es la nefelometría. Se basa en que al incidir en una muestra un rayo luminoso, las partículas en suspensión dispersan parte de la luz que penetra en la muestra. Esa luz dispersada se recoge sobre una célula fotoeléctrica provocando una corriente eléctrica en función de su intensidad, y por lo tanto, del grado de turbidez de la muestra. (50)

#### **Procedimiento**

- Se pulsa la tecla **M** y se busca el método VISOCOLOR
- Con la tecla  se establece el modo 921 Turbidez 10 – 400 FAU
- Se pulsa la tecla **Null Zero** y se ajusta la rueda de filtros a 6, colocar la cubeta de vidrio cilíndrica, limpia, con el valor blanco (la muestra sin tratar), en el fotómetro, se pulsa la tecla **Null Zero**.
- Se coloca en el fotómetro la cubeta cilíndrica de vidrio con la solución de muestra, y se pulsa la tecla **M** para realizar la lectura

#### • DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD CINEMÁTICA.

La viscosidad de los fluidos disminuye con el incremento con la temperatura, y por ello estos pueden fluir con mayor rapidez a través de un conducto. (52)

#### **Procedimiento**

- Se transvasa cinco mililitros de muestra por el capilar del viscosímetro de vidrio Cannon-Frenske.
- Se absorbe el líquido suavemente con una pera por el capilar hasta la parte superior.

- Se mide el tiempo que demora en pasar el líquido desde el enrase superior al enrase inferior del capilar del viscosímetro.
- Se realiza el mismo procedimiento con agua destilada para determinar la constante K del viscosímetro.

### **Cálculos**

La viscosidad cinemática se calcula de la siguiente manera:

$$\mu = K.t$$

$$K = \frac{k_{agua}}{t_{agua}}$$

Donde:

$\mu$	=	Viscosidad cinemática (cSt)
$K$	=	Constante del viscosímetro (cSt / s)
$K_{agua}$	=	0,884 cst, viscosidad del agua a 25 °C * (cSt)
$t$	=	Tiempo recorrido de la muestra (s)
$t_{agua}$	=	Tiempo recorrido del agua (s)

### **• DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES**

La concentración de sólidos solubles se mide por refractometría. La desviación del ángulo luminoso está relacionado con el contenido de elementos solubles presentes dentro de una muestra (azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes) (50).

#### ***Procedimiento***

- Se levanta la cubierta del refractómetro y se coloca dos o tres gotas de la muestra sobre el prisma de la superficie.
- Se lee la concentración de sólidos solubles en grados Brix y se lava con agua destilada y se seca suavemente con papel absorbente.

### ***Cálculos***

La concentración de sólidos solubles se expresa directamente el valor de la lectura expresada en ° Brix, se debe considerar si la muestra requirió dilución.

#### **• DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS INSOLUBLES EN SUSPENSIÓN**

Es un método que utiliza la propiedad de sedimentación de partículas con base a su masa, para la separación de las mismas en una solución. Para este análisis se utiliza la fuerza centrífuga constante para impeler la materia hacia fuera del centro de rotación y así separa las partículas insolubles del medio líquido por sedimentación. (53)

### ***Procedimiento***

- Pesar la pulpa enzimada en los tubos de centrífuga previamente pesados.
- Centrifugar a 3.500 rpm durante 15 minutos. Pasar el sobrenadante a un vaso o tubo.
- Escurrir todo el líquido sobre papel toalla teniendo cuidado de no perder muestra y pesar el tubo con el residuo.

### ***Cálculos***

Los sólidos insolubles en suspensión se calcula de la siguiente manera:

$$SIS(\%) = \frac{Pr - Pt}{Pm} * 100\%$$

Donde:

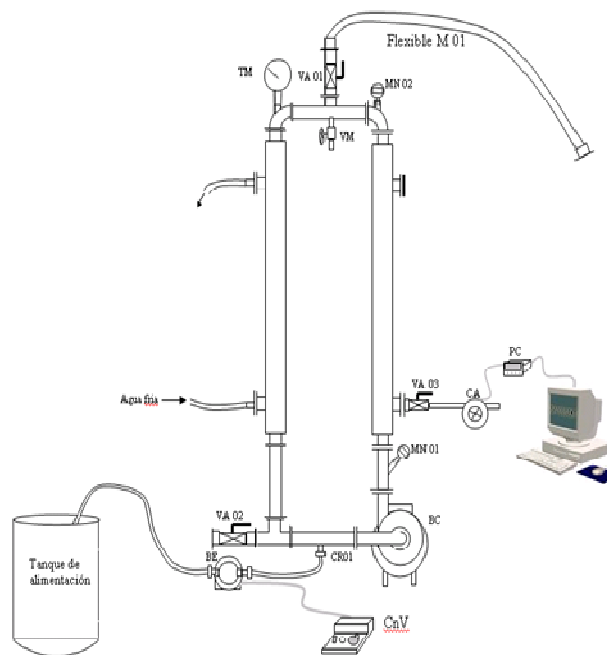
SIS	=	Sólidos insolubles en suspensión
Pr	=	Peso del tubo más residuo
Pt	=	Peso tubo vacío
Pm	=	Peso de la pulpa

### 2.3.2.3 Obtención del jugo clarificado estable

En la pulpa de arazá enzimada en las condiciones seleccionadas con el uso del cóctel enzimático fortificado, se realizó las pruebas en el equipo de microfiltración tangencial. La descripción del uso del equipo de resume a continuación.

Se trabajó con un módulo de micro filtración, construido en acero inoxidable AISI 304 L, que contiene en su interior una membrana de cerámica (Membralox, modelo IP 19-40,) en alfa-alumina, con diámetro de poro de  $0,5 \mu\text{m}$  y una área de filtración total de  $0,22 \text{ m}^2$ . En la FIGURA No 10 e muestra esquemáticamente el equipo de microfiltración empleado para obtener el jugo clarificado de arazá.

**FIGURA No 10 ESQUEMA DEL EQUIPO PILOTO DE MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL**



(FUENTE: MANUAL DEL EQUIPO PILOTO DE MICRO Y ULTRAFILTRACIÓN TANGENCIAL, 2006)

La pulpa tratada con la preparación enzimática comercial fortificada, se utilizará en el proceso de microfiltración tangencial para la obtención del jugo clarificado, en el cual se establecerá la vida de anaquel con el control de la turbidez quincenalmente durante un periodo de tres meses para verificar la ausencia de precipitado.

## CAPÍTULO III

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1 ENSAYOS PRELIMINARES

Debido que el contenido de proteína de la pulpa de arazá es de 0,71 %, relativamente alto, con relación al de otras frutas, se realizó la cuantificación de la misma a diferentes condiciones de extracción del precipitado obtenido del jugo clarificado o permeado, el cual se obtuvo por solubilización enzimática y tecnología membranaria, como es el caso de la microfiltración tangencial, que emplea una membrana con porosidad de 0,5  $\mu\text{m}$ , por el cual pueden pasar moléculas del tamaño de las proteínas.

Previo al análisis de la muestra del precipitado, se realizaron a diferentes condiciones de pH, temperatura y tiempo de descongelamiento del jugo clarificado de arazá, la extracción del precipitado. Los mejores rendimientos obtenidos experimentalmente se muestran en el CUADRO No 1 expresados en porcentaje peso/peso de muestra y en función del contenido de proteína, el cual se analizó por el método de micro Kjeldahl.

**CUADRO No 1. RENDIMIENTO Y CONTENIDO DE PROTEÍNA DEL PRECIPITADO FORMADO EN EL JUGO CLARIFICADO DE ARAZÁ**

<b>Cód.</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Rendimiento p/p (%)</b>	<b>*Proteína (mg/L)</b>
M1	18 °C-pH 6,5	0,002	8,32
M2	18 °C-2 días fermentado	0,864	2255,39
M3	Descongelado	0,518	714,88

\*REALIZADO POR INIAP-LSAIA

Todas las muestras se centrifugaron a 7000 rpm durante 20 minutos para separar las 2 fases y posteriormente se las secó en estufa con calor inducido a 40 °C durante 4 días, el rendimiento de la proteína se valoró a partir del peso seco del precipitado en relación al volumen de jugo clarificado.

Para la muestra M1 bajo las condiciones descritas, descongelada y mantenida a 18 °C y lavado el precipitado con agua destilada hasta pH 6,5, se obtuvo el rendimiento más bajo de proteína con 8,32 mg/L; ya que el pH al cual se realizó el análisis provocó la reducción de su contenido, en especial de la proteína hidrosoluble, los aminoácidos libres y los compuestos aminados; los cuales en el proceso de lavado fueron llevados al pH en el cual se encuentran más estables.

En la muestra M2 mantenida a temperatura ambiente durante dos días, presentó el rendimiento más alto en peso en relación a todas las muestras con 0,864 %; pues por proceso fermentativo, que se favorece por el contenido de azúcares y del nitrógeno, que ayuda a la formación de compuestos aminados asociados, los cuales se valoran por el análisis de proteína total micro Kjeldahl. El precipitado que se extrajo se pardeó debido a factores externos que influyeron directamente en las reacciones, como la acción del oxígeno del medio ambiente.

La muestra M3 sometida a un proceso de centrifugación, inmediatamente luego de su descongelación, presenta una concentración considerable de proteína pero no se halla en proporción a lo obtenido en la muestra M2, lo cual puede deberse a que en la muestra se limitaron los procesos de degradación por la condición de conservación a las que mantuvo (-18 °C).

Se toma como válido el precipitado obtenido en la muestra M3, debido a que se relaciona con el contenido de proteína en la pulpa fresca de arazá que es de 0,71 g en 100 mL mientras que en el jugo clarificado este valor se reduce a 0,071488 g en 100 mL, valor obtenido en el precipitado y considerando el rendimiento del proceso de extracción.

### 3.2 FASE I: OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PRECIPITADO DEL PERMEADO DE ARAZÁ

Para la extracción del precipitado del jugo clarificado (permeado) de arazá, obtenido por microfiltración tangencial, se sometió a las diferentes condiciones de temperatura, tiempo y velocidad de centrifugación, formándose dos fases: el sobrenadante y el precipitado. En la extracción se obtuvieron los precipitados a las diferentes condiciones correspondientes a los 12 tratamientos, las cuales se detallan en el acápite 2.3.1.2.

Los resultados obtenidos para el rendimiento de la extracción, reportado en gramos del precipitado seco por cien mililitros de jugo (%), se presentan en el CUADRO No 2.

**CUADRO No 2. RENDIMIENTO EN LA EXTRACCIÓN DEL PRECIPITADO DEL PERMEADO CONCENTRADO DE ARAZÁ**

<b>Código</b>	<b>Descripción</b>	<b>RENDIMIENTO %</b>
T <sub>1</sub>	4°C x 30min x 6000 rpm	7,28 ± 1,05 <sup>A</sup>
T <sub>2</sub>	4°C x 60min x 6000 rpm	6,16 ± 1,28 <sup>A</sup>
T <sub>3</sub>	4°C x 30min x 8000 rpm	7,88 ± 2,17 <sup>A</sup>
T <sub>4</sub>	4°C x 60min x 8000 rpm	8,84 ± 1,17 <sup>AB</sup>
T <sub>5</sub>	18°C x 30min x 6000 rpm	6,24 ± 3,50 <sup>A</sup>
T <sub>6</sub>	18°C x 60min x 6000 rpm	9,35 ± 2,35 <sup>AB</sup>
T <sub>7</sub>	18°C x 30min x 8000 rpm	10,62 ± 1,73 <sup>AB</sup>
T <sub>8</sub>	18°C x 60min x 8000 rpm	7,47 ± 2,33 <sup>A</sup>
T <sub>9</sub>	32°C x 30min x 6000 rpm	8,57 ± 0,71 <sup>AB</sup>
T <sub>10</sub>	32°C x 60min x 6000 rpm	9,71 ± 2,30 <sup>AB</sup>
T <sub>11</sub>	32°C x 30min x 8000 rpm	13,95 ± 1,72 <sup>B</sup>
T <sub>12</sub>	32°C x 60min x 8000 rpm	9,23 ± 1,13 <sup>AB</sup>

± desviación estándar de 3 repeticiones

El mayor rendimiento del precipitado se obtuvo a las condiciones propuestas en el tratamiento T<sub>11</sub> (32 °C x 30min x 8000 rpm) con 13,95 %. El análisis de Tukey (95 % de confianza), determinó que existe diferencia estadística significativa, habiéndose formado dos grupos homogéneos con el mismo nivel de significancia para T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>5</sub> y T<sub>8</sub>; T<sub>4</sub>, T<sub>6</sub>, T<sub>7</sub>, T<sub>9</sub>, T<sub>10</sub> y T<sub>12</sub>.

Debido a que la temperatura juega un papel determinante en las reacciones moleculares de degradación, principalmente, las que se dan lugar por la insolubilización de las proteínas que puede encontrarse presentes en los jugos microfiltrados. En los



tratamientos propuestos experimentalmente a 4 °C, se considera que el efecto de la baja temperatura limitó ciertas reacciones que pueden favorecer la aparición de compuestos indeseados al incrementarse este valor, por lo cual el rendimiento es menor.

En el caso de la velocidad de centrifugación y el tiempo, el efecto se da por la acción de la fuerza centrífuga propia del proceso empleado.

En el CUADRO No 3 se presenta los parámetros obtenidos y calculados para el color del precipitado, secado bajo dos condiciones, calor directo y liofilización. Información que se utilizará para decidir el extracto en el cual se realizará la caracterización e identificación de los compuestos presentes.

**CUADRO No 3. COLOR EN EL PRECIPITADO DE ARAZÁ SECADO EN DOS CONDICIONES**

Condiciones de secado	PARÁMETROS DEL COLOR					
	L	A	B	°H	C	IO
<b>Estufa 40 °C</b>						
<b>Promedio±ds</b>	29,56±2,16	2,76±0,53	8,69±1,83	71,59±6,68	9,16±1,59	40,91±7,62
<b>C.V. (%)</b>	7,32	19,29	21,07	9,33	17,37	18,61
<b>Liofilización</b>						
<b>70 bar, - 40 °C</b>						
<b>Promedio ± ds</b>	22,84±1,09	0,83±0,13	6,26±1,24	82,20±2,26	6,31±1,22	34,10±8,44
<b>C.V. (%)</b>	4,78	15,31	19,82	2,75	19,35	24,75

El parámetro *a* con un valor de 2,76 es mayor en la muestra secada en estufa con relación al valor de 0,83 obtenido en la muestra liofilizada, lo que indica que el precipitado tiende a un color rojo más oscuro. De acuerdo a la relación de los valores de *a* y *b*, se puede señalar que en el primer caso el color tiende a un rojo amarillento más oscuro (estufa) con relación al obtenido por liofilización; lo cual se corrobora con el valor mayor del índice de oscurecimiento (IO) con 40,91.

Se selecciona la liofilización como la mejor forma de concentrar el precipitado extraído, ya que se evita el pardeamiento, que puede afectar la identificación de las macro moléculas, en las siguientes etapas de la investigación.

### 3.2.1 IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS

En el CUADRO No 4 se presentan los resultados cualitativos obtenidos en la marcha bioquímica para la identificación de carbohidratos.

**CUADRO No 4. RESULTADO DE LAS PRUEBAS PARA IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS**

<b>PRUEBAS</b>	<b>PRECIPITADO*</b>
<b>Molisch</b>	Positivo
<b>Yodo</b>	Negativo
<b>Fehling</b>	Positivo
<b>Azúcares no reductores</b>	Positivo
<b>Barfoed</b>	Positivo
<b>Seliwanoff</b>	Positivo

\* En muestra liofilizada

La prueba de Molisch indica en general la presencia de azúcares, pues a pesar de que se dispone de una muestra liofilizada para evitar el pardeamiento por acción del calor, se identifican azúcares de tipo cristalino.

La ausencia de almidón se comprueba al realizar la reacción del Yodo, que verifica la presencia de cadenas de amilosa y amilopectina, la cual dio negativa.

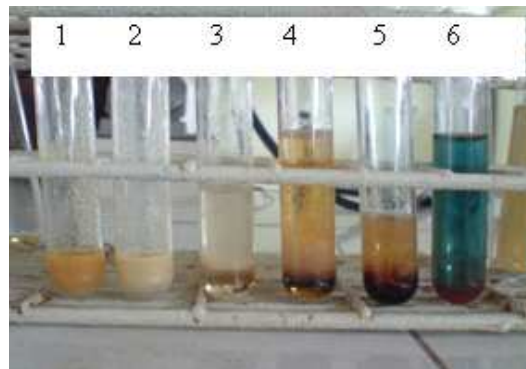
Las pruebas de Fehling, Barfoed, Seliwanoff y de Azúcares no reductores, dieron un resultado positivo, evidenciando así la ausencia de almidón y la presencia de azúcares del tipo fructuosa y sacarosa; estos azúcares por ser pequeños pueden hallarse asociados a otro tipo de moléculas o pueden reaccionar en el medio produciendo nuevos compuestos.

La fructuosa (deoxiazúcar) puede formar parte de glicoproteínas. La unión puede darse a través de un enlace O-glicosídico, o a un enlace N-glicosídico. No se considera que el azúcar ligado ejerza mayor efecto en la aparición del precipitado, ya que la elevada solubilidad de los azúcares simples en soluciones acuosas limita su aparición en el extracto analizado, por tal razón, se debe dirigir la identificación bioquímica hacia otro

tipo de compuestos que podrían ser proteínas, aminoácidos libres, o sales minerales propios de la fruta de arazá.

Los resultados de las reacciones cualitativas realizadas para el análisis de la identificación de los carbohidratos se observan en la FOTOGRAFÍA N° 1.

1. Yodo para celulosa
2. Yodo para almidón y dextrinas
3. Molisch
4. Seliwanoff
5. Barfoed
6. Fehling



**FOTOGRAFÍA No 1. IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS**

Cabe mencionar que pueden existir otro tipo de azúcares simples cuya nomenclatura depende de la posición de su grupo carbonilo, pero para conocer su estructura exacta y poder definir sus propiedades se requiere de un método específico de análisis.

### 3.2.2 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

A continuación, en el CUADRO No 5 se presentan los resultados cualitativos obtenidos para la identificación de proteínas y aminoácidos libres que se pudieron identificar en el precipitado del jugo clarificado de arazá.

La prueba de Biuret, indicativa de los enlaces peptídicos fue positiva. Con lo cual se evidencia la presencia de este tipo de enlaces, que pueden ser parte de cadenas proteicas propiamente dichas o de cadenas peptídicas (es decir formada por menos de 50 aminoácidos).

Con las pruebas de Millons, Sakaguchi, Glioxilica y Xantoprotéica, se muestra la presencia de tirosina, arginina, triptófano y fenilalanina.

CUADRO No 5. RESULTADO DE LAS PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

<b>PRUEBAS</b>	<b>PRECIPITADO</b>
<b>Biuret</b>	Positivo (péptidos)
<b>Millons</b>	Positivo (Tirosina)
<b>Heller</b>	Positivo (péptidos)
<b>Sakaguchi</b>	Positivo (Tirosina, Arginina)
<b>Xantoprotéica</b>	Positivo (Tirosina, Triptófano, Fenilalanina)
<b>Glioxílica</b>	Positivo (Triptófano)
<b>Azufre</b>	Negativo (Cisteína, Metionina)
<b>Ninhidrina</b>	Positivo (Aminoácidos libres)

En la identificación de Aminoácidos azufrados no se obtuvo un resultado positivo, indicando así que los aminoácidos, metionina y cisteína, se hallan escasamente en el precipitado, o incluso que su presencia es nula.

Al realizar la prueba de la Ninhidrina sobre un papel filtro cualitativo, se determinó que existen aminoácidos libres de manera general. La identificación y cuantificación de los aminoácidos se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), resultados que se presentan en el CUADRO No 6.

En la FOTOGRAFÍA No 2 se presenta la identificación cualitativa para aminoácidos libres.



FOTOGRAFÍA No 2. PRUEBA DE LA NINHIDRINA

### 3.2.2.1 Contenido de aminoácidos y proteína

El fruto de arazá de la variedad en estudio contiene en la pulpa larvas de mosca (*Anastrepha striata*) las cuales viven y se desarrollan en su interior, por tal razón para conocer su interferencia en la formación del precipitado se aisló dichas larvas del fruto tal como se muestra en las FOTOGRAFÍAS No 3 y 4.



**FOTOGRAFÍA No 3. LARVAS EN EL FRUTO DE ARAZÁ**



**FOTOGRAFÍA No 4. LARVAS EXTRAÍDAS Y LAVADAS**

En el CUADRO No 6 se presenta los resultados obtenidos para el contenido de aminoácidos obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), a excepción del triptófano, que requiere de otro tipo de hidrólisis para su cuantificación. Se reporta en las muestras de la larva de la mosca (*Anastrepha striata*) extraída de la fruta de arazá y del precipitado extraído del permeado de arazá.

**CUADRO No 6. COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN AMINOACIDICA DE LAS MUESTRAS DE LARVAS Y DEL PRECIPITADO**

ANÁLISIS	MUESTRAS	
	Larvas de mosca*	Precipitado**
<b>AMINOÁCIDOS</b>		
Ácido aspártico	4,75	0,09
Treonina	2,31	0,02
Serina	2,41	0,03
Ácido glutámico	7,10	2,56
Prolina	2,87	N.D.
Glicina	2,41	0,05
Alanina	4,85	0,13
Cisteína	N.D.	0,04
Valina	4,36	0,05
Metionina	1,98	0,05
Isoleucina	2,47	0,03
Leucina	3,81	0,04
Tirosina	3,13	0,11
Fenilalanina	8,28	0,28
Histidina	2,99	0,06
Lisina	4,57	0,03
Arginina	7,05	0,45

Realizado por LSAIA-INIAP

\*muestra seca y desengrasada

\*\*muestra liofilizada

N.D. no detectado

A partir de los resultados de la composición aminoacídica de la larva y el precipitado, se puede establecer que los aminoácidos de las larvas que se hallan en mayor porcentaje también se hallan mayoritariamente en la muestra del precipitado; siendo el ácido glutámico, la alanina, la fenilalanina y la arginina, los cuales poseen su punto isoeléctrico a un pH ácido.

Es importante recalcar, que cuando una proteína contiene elevadas concentraciones de ácido glutámico y se encuentra a un pH ácido, como es el caso del jugo clarificado de arazá (pH 2,67) alcanza su punto isoeléctrico provocando desnaturalización de la proteína, ya que la carga neta al ser nula pierde las características estructurales de una proteína, alterándose la estructura terciaria.

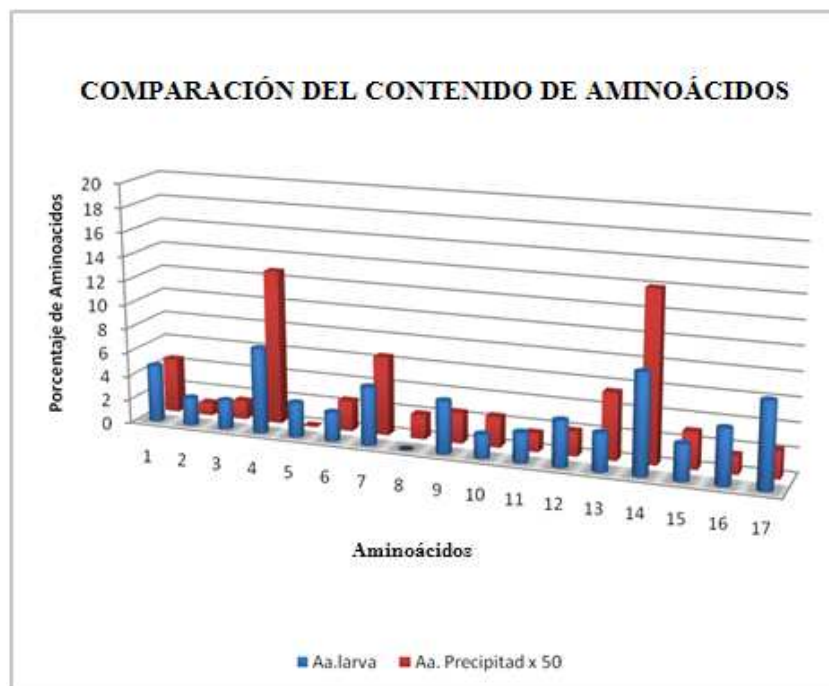
Para visualizar de mejor forma la comparación porcentual de las 2 muestras se realizó un gráfico de barras, en donde el porcentaje de aminoácidos que se encuentra en el precipitado se lo amplió a una escala 1:50. Se considera, que a pesar de existir una

retención mayoritaria de componentes con elevado peso molecular no degradados durante la enzimación, éstos pueden pasar a través de la membrana de 0,5  $\mu\text{m}$  y presentarse en el jugo clarificado, pero en concentraciones menores a las iniciales, guardando una estrecha relación, lo cual se visualiza en el GRÁFICO No 1.

**GRÁFICO No 1. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS EN LAS LARVAS DE LA MOSCA (*Anastrepha striata*) Y EL PRECIPITADO DEL PERMEADO DE ARAZÁ**

### AMINOÁCIDOS

1. Ácido aspártico
2. Treonina
3. Serina
4. Ácido glutámico
5. Prolina
6. Glicina
7. Alanina
8. Cisteína
9. Valina
10. Metionina
11. Isoleucina
12. Leucina
13. Tirosina
14. Fenilalanina
15. Histidina
16. Lisina
17. Arginina



La presencia de los aminoácidos se ve reflejada en las pruebas cualitativas realizadas en el acápite 3.1.2, a excepción del ácido glutámico y alanina, ya que para su identificación no se dispone de un método cualitativo específico.

Cabe indicar que en la metodología utilizada no se reporta el triptófano, la glutamina y la asparagina. A partir de los resultados de la composición aminoacídica de la larva y el precipitado, se puede establecer que los aminoácidos de las larvas que se hallan en mayor porcentaje también se hallan mayoritariamente en la muestra del precipitado; siendo estos

el ácido glutámico, la alanina, la fenilalanina y la arginina, los cuales poseen su punto isoeléctrico a un pH ácido.

Las dos muestras correspondientes a las larvas de la mosca y el precipitado, contienen los aminoácidos esenciales, por lo cual desde el punto de vista nutricional es una proteína de buena calidad, aunque esto se evidencia en mayor proporción en la composición aminoacídica de la larva. Aunque comercialmente, una proteína de origen animal, es una característica indeseada su presencia en un producto alimenticio de origen vegetal.

En el CUADRO No 7 se muestra la cuantificación de la proteína en las muestras correspondientes a las larvas y el precipitado. Obtenido por el método micro Kjeldahl y el tabulado a través de la sumatoria del contenido de aminoácidos presentes en las larvas de la mosca. En el precipitado se calculo a partir de la sumatoria de aminoácidos multiplicado por el factor 6,25 para la conversión de N<sub>2</sub> a proteína.

**CUADRO No 7. CONTENIDO DE PROTEÍNA PARA LAS MUESTRAS DE LARVAS Y PRECIPITADO**

ANÁLISIS	MUESTRAS	
	*Larvas de mosca	**Precipitado
<b>PROTEÍNA</b>	66,00%	29,27%
<b>PROTEÍNA (Σ AMINOÁCIDOS)</b>	65,34%	25,13%

Realizado por LSAIA-INIAP      \*muestra seca y desengrasada      \*\*muestra liofilizada

Como se puede observar, el contenido de proteína en las larvas es de 66,00 % mientras que el valor obtenido del porcentaje de aminoácidos es de 65,34 %, comprobándose que casi la totalidad de la proteína que se reporta corresponde al nitrógeno de tipo proteico; es decir que se halla formando parte de la cadena de aminoácidos.

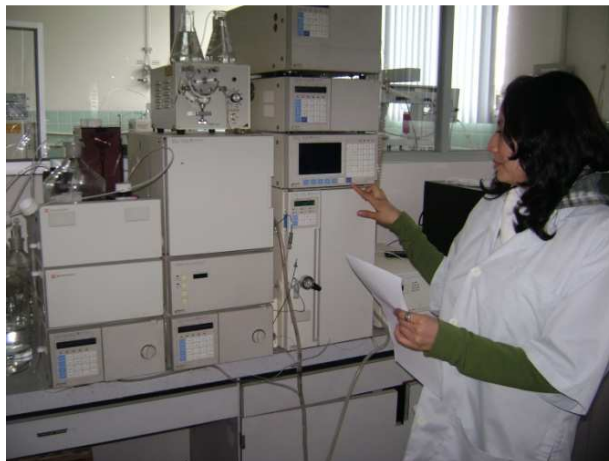
En tanto, que la proteína valorada en el precipitado es de 29,27 % y la obtenida a partir de la composición de aminoácidos se obtuvo un valor de 25,13 %, cuya diferencia puede corresponder a los tres aminoácidos que no se reportan, o a otros elementos que



contienen nitrógeno pero de tipo no proteico, como es el caso de las sales amoniacales, aminos, amida, entre otros.

Se complementa el análisis de estos resultados, señalando la diferencia en la sensibilidad de los métodos analíticos empleados para la determinación de proteína y aminoácidos, lo cual hace que la comparación entre los valores totales y las sumatorias tengan su respectivo margen de error.

En la FOTOGRAFÍA No 5 se presenta el Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución, instalado con el detector de fluorescencia y los accesorios utilizados para la cuantificación de los aminoácidos.



**FOTOGRAFÍA No 5. CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA RESOLUCIÓN PARA EL ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS**

### 3.2.3 IDENTIFICACIÓN DE MINERALES

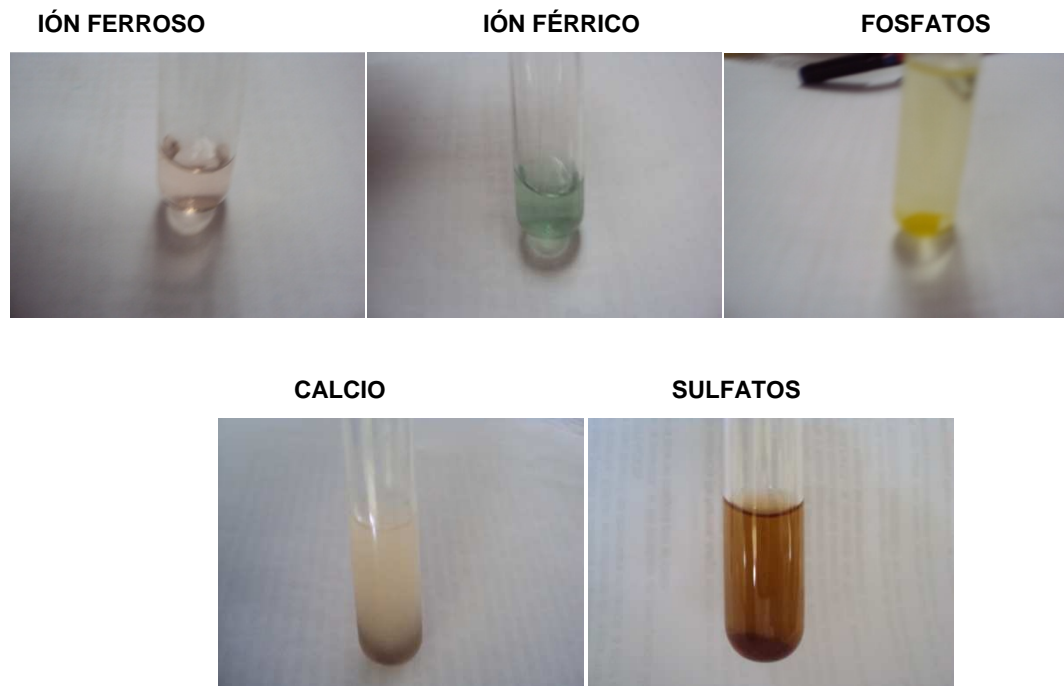
Posterior a la caracterización de los carbohidratos y las proteínas, se analizaron los minerales que puede encontrarse en la muestra del precipitado liofilizado, resultados que se presentan en el CUADRO No 8.

**CUADRO No 8. RESULTADO DE LA IDENTIFICACIÓN DE MINERALES**

<b>Ensayos</b>	<b>Muestra liofilizada</b>
Calcio	Positivo
Sulfatos	Positivo
Ión Ferroso	Positivo
Ión Férrico	Positivo
Carbonatos	Negativo
Cloruros	Negativo
Fosfatos	Positivo

Para la identificación de los minerales en el precipitado de arazá, se tomó como punto de referencia la composición química del jugo clarificado (permeado) de arazá reportado por Laverde, 2011, y citado en la TABLA No 9 del capítulo uno.

En la FOTOGRAFÍA No 6 se presentan los resultados correspondientes a la identificación cualitativa de los minerales.

**FOTOGRAFÍA No 6. IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE MINERALES**

La presencia de minerales en el precipitado resultó positiva para calcio, hierro, sulfatos y fosfatos. A partir de estos resultados se analizó la formación de los posibles compuestos a formarse. En el caso del sulfato ferroso o el sulfato férrico. Se descarta su influencia para formar el precipitado, ya que según lo expuesto por Yúfera (1997), se requiere de una concentración mayor a 5 mg/L y en el permeado se dispone de una concentración de 1,31 mg/L, siendo un contenido por debajo del requerido para que se produzcan las sales.

Se limita la posibilidad de formación de fosfatos de calcio o fosfato de hierro, debido al pH del permeado. No se tomaron como resultados significativos la presencia de minerales en la muestra, ya que de acuerdo a los datos de la composición del permeado únicamente se dispone de cantidades traza de los mismos, y para que se produzcan interferencias se necesita de un exceso de iones metálicos, pues se puede provocar quiebras metálicas que alteren el aspecto de los jugos clarificados.

#### 3.2.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES PRESENTES EN EL PRECIPITADO EXTRAÍDO DEL PERMEADO DE ARAZÁ

Las preparaciones enzimáticas comerciales han sido desarrolladas para realizar modificaciones a nivel molecular, especialmente para frutas de clima templado; pero los efectos tecnológicos dependen principalmente de la composición de la pared celular que es propia de cada fruta.

Estas preparaciones comerciales están constituidas por una mezcla de enzimas, hidrolíticas, principalmente de hemicelulasas, celulasas y pectinasas, las cuales producen la liquefacción y sacarificación de las paredes celulares de los tejidos en las pulpas de las frutas, además, hidrolizan los polisacáridos insolubles mediante la acción sinérgica de las enzimas celulolíticas y pectinolíticas, principalmente.

El análisis utilizado al relacionar la composición de la pared celular del arazá y los valores correspondientes a las principales actividades enzimáticas de la preparaciones comerciales, sirvieron para seleccionar a la Rapidasse TF para el proceso de

solubilización enzimática, realizado por Laverde, 2011, como etapa previa a la obtención del permeado por microfiltración tangencial.

La caracterización de las principales actividades enzimáticas de la preparación comercial Rapidasse TF se presenta en el CUADRO No 9.

**CUADRO No 9. CARACTERIZACIÓN DE LAS PRINCIPALES ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LA PREPARACIÓN COMERCIAL RAPIDASSE TF**

Rapidasse TF	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA						
	Proteína (mg/ml)	P <sub>L</sub>	C <sub>x</sub>	C <sub>1</sub>	P <sub>G</sub>	P <sub>E</sub>	Exoara
UI/mg proteína	116,100	2,320	3,243	0,309	3,670	3,629	0,161

FUENTE: BRITO B, 2006; FONTAGRO, 2008

Debido a que en la pared celular de la pulpa de arazá sobresale el contenido de celulosa, se requiere que la preparación comercial tenga alta actividad Exo-celulosa (C<sub>x</sub>) y Endo-celulosa (C<sub>1</sub>), además por su alto contenido de pectina insoluble, debe tener actividades considerables de Pectinliasa (P<sub>L</sub>), Poligalacturonasa (P<sub>G</sub>) y Pectinesterasa (P<sub>E</sub>).

Después de realizar los análisis correspondientes a la identificación de las macromoléculas, se identificó que la proteína juega un rol determinante para la formación del precipitado, ya que a pesar de encontrarse otros compuestos, éstos no intervienen significativamente debido a sus características y a las concentraciones en las que se encuentran.

La preparación enzimática seleccionada normalmente no contiene una actividad proteolítica significativa, ya que su comercialización está orientada para las frutas y vegetales, las mismas que tienen bajas concentraciones de proteína para solubilizar. Razón por la cual se orienta la investigación hacia la fortificación de la preparación comercial Rapidasse TF con una proteasa de origen vegetal, como es el caso de la papaína.

La fortificación se realizó con la proteasa Papaína marca Fluka, que tiene un contenido de proteína del 88,19 % y una actividad de 3,18 U/mg. Seleccionada debido a las características especiales que le otorga sus propiedades físicas, como es la solubilidad alta en medio acuoso; la actividad proteolítica, que actúa sobre los enlaces endo y exopeptídicos; el pH a la cual actúa, que es de ácido a neutro. Además, que a nivel de las plantas procesadoras de alimentos, requieren utilizar aditivos de bajo costo y que sean accesibles en el mercado.

### **3.3 FASE II: ENSAYOS CON LA PREPARACIÓN ENZIMÁTICA COMERCIAL RAPIDASSE TF FORTIFICADA PARA OBTENER UN JUGO CLARIFICADO ESTABLE POR MFT**

#### **3.3.1 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE LA PULPA DE ARAZÁ**

Se utilizó la preparación enzimática Rapidasse TF a las condiciones optimizadas por Laverde, 2011 (40 °C, 200 ppm, 60 min), y que fue fortificada con distintas concentraciones de papaína en diferentes tiempos de enzimación, sobre la pulpa de arazá.

Los resultados del control de calidad, para las variables en los diez tratamientos, constituidos de acuerdo al plan de superficie de respuesta de diez puntos con dos puntos centrales, se presentan en el CUADRO No 9.

Para la determinación de los sólidos solubles, la turbidez, la viscosidad cinemática y el pH, se utilizó el sobrenadante obtenido del análisis de los sólidos insolubles en suspensión (SIS: centrifugación a 3500 rpm durante 40 minutos). Ya que es en la fase acuosa es donde se detecta el efecto de las enzimas sobre la solubilización de la pared celular de la pulpa de la fruta. Los resultados demostraron que a mayor concentración de la papaína y el tiempo de enzimación, existe un menor contenido de SIS.

**CUADRO No 10. CONTROL DE CALIDAD DE LOS TRATAMIENTOS CON LA PREPARACIÓN COMERCIAL FORTIFICADA EN LA PULPA DE ARAZÁ**

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN DE PAPAÍNA	TIEMPO	SIS	pH	VISCOSIDAD CINEMÁTICA	TURBIDEZ	SOLIDOS SOLUBLES
	(ppm)	(min)	(%)	(%)	(cSt)	(NTU)	(°Brix)
T <sub>1</sub>	50	45	37,38±0,92 <sup>C</sup>	2,88±0,02 <sup>AB</sup>	1,02±0,02 <sup>AB</sup>	30,33±2,08 <sup>C</sup>	4,67±0,12 <sup>A</sup>
T <sub>2</sub>	160	30	37,54±1,04 <sup>C</sup>	2,97±0,01 <sup>E</sup>	1,06±0,01 <sup>B</sup>	29,00±3,00 <sup>C</sup>	5,20±0,20 <sup>C</sup>
T <sub>3</sub>	160	80	35,50±0,53 <sup>ABC</sup>	2,85±0,02 <sup>A</sup>	1,02±0,03 <sup>AB</sup>	27,00±1,53 <sup>BC</sup>	4,90±0,10 <sup>AB</sup>
T <sub>4</sub>	275	0	36,16±1,19 <sup>BC</sup>	2,90±0,01 <sup>BCD</sup>	1,03±0,00 <sup>AB</sup>	27,67±1,53 <sup>C</sup>	4,93±0,06 <sup>ABC</sup>
T <sub>5</sub>	275	45	35,74±0,57 <sup>ABC</sup>	2,90±0,01 <sup>BCD</sup>	1,03±0,01 <sup>AB</sup>	26,00±1,00 <sup>BC</sup>	5,07±0,06 <sup>BC</sup>
T <sub>6</sub>	275	45	35,45±0,60 <sup>ABC</sup>	2,92±0,02 <sup>CD</sup>	1,02±0,01 <sup>A</sup>	28,00±1,73 <sup>C</sup>	5,03±0,06 <sup>BC</sup>
T <sub>7</sub>	275	90	35,60±1,21 <sup>ABC</sup>	2,93±0,01 <sup>D</sup>	1,04±0,01 <sup>AB</sup>	27,33±3,51 <sup>BC</sup>	5,07±0,12 <sup>BC</sup>
T <sub>8</sub>	390	30	33,84±1,08 <sup>A</sup>	2,98±0,01 <sup>E</sup>	1,05±0,02 <sup>AB</sup>	20,33±2,08 <sup>AB</sup>	4,97±0,06 <sup>BC</sup>
T <sub>9</sub>	390	80	33,60±0,06 <sup>A</sup>	2,89±0,01 <sup>BC</sup>	1,05±0,02 <sup>AB</sup>	18,33±2,52 <sup>A</sup>	4,93±0,06 <sup>ABC</sup>
T <sub>10</sub>	500	45	33,76±0,37 <sup>A</sup>	2,91±0,01 <sup>BCD</sup>	1,03±0,01 <sup>AB</sup>	26,67±1,53 <sup>BC</sup>	4,97±0,06 <sup>BC</sup>
Blanco	-	-	37,51±0,43	2,90±0,01	1,07±0,02	30,33±1,08,	4,67±0,12

± desviación estándar, n = 3 repeticiones

El análisis de Tukey (95 % de confianza), determinó que existe diferencia estadística significativa para los SIS, habiéndose formado grupos homogéneos con el mismo nivel de significancia para T<sub>8</sub>, T<sub>9</sub> y T<sub>10</sub>; T<sub>3</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>6</sub> y T<sub>7</sub>; T<sub>4</sub>; T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>.

En el tratamiento T<sub>9</sub>, con una concentración del cóctel enzimático de 390 ppm y un tiempo de 80 minutos se obtuvo la mayor solubilización con el 10,42 %, considerando el contenido de SIS del 33,60 % y del blanco de 37,51 %. En los tratamientos T<sub>5</sub> y T<sub>6</sub>, que corresponde a los dos puntos centrales, con una concentración del cóctel enzimático

comercial de 275 ppm y 45 minutos de tratamiento enzimático, los SIS fueron del 35,74 % y 35,45 %, respectivamente.

La pulpa de arazá tiene un bajo contenido de sólidos solubles, con 4,40 °Brix, habiéndose evidenciado un aumento notable en el permeado con valores de 5,33 °Brix, según Laverde, 2011. Pero al realizar el tratamiento enzimático, éste valor desciende hasta 4,67 °Brix, es decir se producen alteraciones en cuanto al contenido de azúcares, las diferencias estadísticas son significativas entre los grupos homogéneos formados.

Con base a los resultados obtenidos estadísticamente, los grupos homogéneos formados para el control de sólidos solubles corresponden a los tratamientos: T4 y T9; T5, T6, T7, T8 y T10, para los cuales no existen diferencias significativas de acuerdo al análisis de Tukey al 95 %.

Respecto al pH no existe un notable cambio ya que sus valores fluctúan en un rango de 2,85 a 2,97, con relación al blanco 2,90, que no presenta variación. Estadísticamente, los grupos homogéneos formados para el control de pH corresponden a los tratamientos: T4, T5, y T10; para los cuales no existe diferencias significativas de acuerdo al análisis de Tukey al 95 %.

En la turbidez el mayor valor medido es de 30,33 NTU, que se ve reducido notablemente en el tratamiento T9 con 18,33 NTU, resultado encontrado en el sobrenadante de la centrifugación, debido al efecto de la enzimación con el uso de la preparación enzimática fortificada.

Estadísticamente se formaron grupos homogéneos con los siguientes tratamientos: T3, T5, T7 y T10; T1, T2, T4 y T6; T8; T9; entre los cuales existen diferencias significativas de acuerdo al análisis estadístico de Tukey al 95 %.

La viscosidad cinemática de los tratamientos presentaron valores para el tratamiento T6 de 1,02 y el T2 de 1,06 cSt, en comparación con el obtenido para el blanco que fue de 1,07 cSt, que denota una pequeña reducción en relación a todos los tratamientos.

### 3.3.2 OBTENCIÓN DEL JUGO CLARIFICADO POR MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL Y LA VIDA DE ANAQUEL

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionó que en el tratamiento previo a la microfiltración tangencial, se debe someter la pulpa de arazá a la liquefacción enzimática a las siguientes condiciones: 350 ppm de Rapidasse TF, con 390 ppm de papaína, 60 minutos y 35 °C.

En la FOTOGRAFÍA No 7 se presenta el proceso de microfiltración tangencial para la obtención del jugo clarificado de arazá.



**FOTOGRAFÍA No 7. OBTENCIÓN DEL JUGO CLARIFICADO DE ARAZÁ POR MFT**

La microfiltración tangencial se realizó a las condiciones optimizadas por Laverde en el año 2011: presión transmembranaria 3 bar, 35 °C, membrana de cerámica de 0,5  $\mu\text{m}$ .

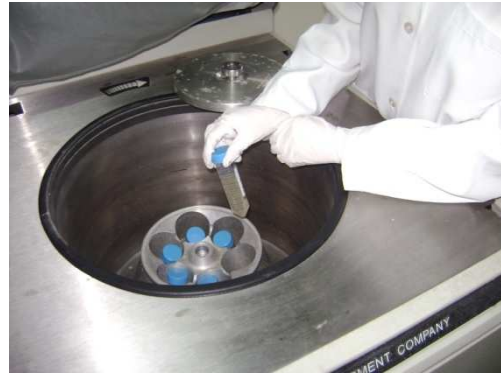
Para completar el estudio con la vida de anaquel, se recogió el jugo clarificado (permeado) de arazá en fundas plásticas estériles y frascos de vidrio, almacenándose en un cuarto frío a 8 °C y en congelación a -18 °C.

En la FOTOGRAFÍA No 8, se presenta las muestras del permeado donde se realizó el seguimiento de la estabilidad, en las cuales se analizó la turbidez y los sólidos insolubles en suspensión cada 15 días durante 3 meses.



Los resultados para la turbidez se reportan como menores a 10 NTU, que es la sensibilidad mínima detectada por el equipo. Para el contenido de SIS no se detectaron precipitados, pudiendo deberse a la sensibilidad del método gravimétrico empleado.

El permeado obtenido a las condiciones señaladas no presenta problemas de precipitación y turbidez detectable mediante los métodos probados para este tipo de control de calidad, los cuales se verifican subjetivamente al observar el jugo clarificado. En las FOTOGRAFÍA No 9 se presenta el permeado estable.



**FOTOGRAFÍA No 8. SEGUIMIENTO DE LA ESTABILIDAD**



**FOTOGRAFÍA No 9. JUGO CLARIFICADO DE ARAZÁ ESTABLE.**

## CAPÍTULO IV

### 4 CONCLUSIONES

1. Las condiciones a las cuales se obtiene el mayor rendimiento del 13,95 % en la extracción del precipitado del jugo clarificado de arazá fue la muestra sometida a 32 °C y centrifugado durante 30 minutos a 8000 rpm. Siendo la temperatura y el tiempo los factores que influyen mayoritariamente para la extracción.
2. Se comprueba que la liofilización es la mejor manera de secar una muestra, en este caso el precipitado extraído del permeado de arazá, ya que conserva las características originales sin degradaciones físicas y químicas.
3. La realización de pruebas bioquímicas específicas sobre el precipitado secado por liofilización, se pudo determinar la presencia de: carbohidratos (fructosa, sacarosa), proteína y aminoácidos libres, minerales (hierro, calcio), sulfatos y fosfatos. Al encontrarse en mayor cantidad, se determinó que la proteína es el bioelemento que influye significativamente en la formación del precipitado.
4. La naturaleza proteica del precipitado, es a causa de las larvas de *Anastrepha striata*, razón por la cual se escogió la papaína que es una enzima proteolítica de origen vegetal, habiéndose optimizado su concentración en 390 ppm, para lograr la mayor solubilización.
5. Para obtener el jugo clarificado estable se debe someter la pulpa de arazá a las siguientes condiciones de enzimación: concentración de 350 ppm de Rapidasse TF y con 390 ppm de papaína, durante 60 minutos a 35 °C, obteniéndose una solubilización del 10,42 %. Las condiciones de la microfiltración son las optimizadas por Laverde en el 2011: 2 bares de presión transmembranaria a 35 °C.

6. El jugo clarificado (permeado) de arazá es estable, sin la formación de precipitados pero con la susceptibilidad de contaminación microbiana, hasta 3 meses, a pesar de haberse empacado en fundas estériles y frascos de vidrio a 8 °C. La legislación nacional permite comercializar las bebidas naturales, que no han sido añadidas ningún tipo de conservante, hasta por 6 meses, dependiendo de las características propias de cada fruta.

## CAPÍTULO V

### 5 RECOMENDACIONES

1. Durante la ejecución de todo el proceso para la obtención del jugo clarificado es importante mantener la sanidad alimentaria, trabajando con Buenas Prácticas de Manufactura y de Higiene (BPM y BPH), con el fin de garantizar la inocuidad del producto.
2. Para la extracción de la pulpa de arazá se debe probar en un filtro prensa, con el fin de reducir el tamaño de las partículas de los polisacáridos, así como luego de la liquefacción enzimática se debería centrifugar la pulpa enzimada, con el fin de mejorar el rendimiento del proceso de microfiltración tangencial.
3. Realizar ensayos interlaboratorios para los análisis microbiológicos, para analizar la posibilidad de existencia de hongos acidófilos que puedan desarrollarse en el jugo clarificado de arazá.
4. Realizar investigaciones para ampliar el campo para la obtención de nuevos productos derivados de las frutas exóticas existentes en el país, debido a sus excelentes características organolépticas.
5. Los productos congelados a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  pueden conservarse estables hasta 12 meses, se recomienda hacer el seguimiento del control de calidad de las muestras congeladas del permeado de arazá.

## CAPÍTULO VI

### 6 RESUMEN Y SUMMARY

En la presente investigación se propuso estabilizar un jugo clarificado de arazá que presentó problemas de turbidez debido a la formación de precipitados de composición desconocida, constituyéndose en un problema tecnológico ya que afecta las propiedades organolépticas de éste producto obtenido en el INIAP.

Se empleó un método de tipo experimental, tomando muestras del precipitado liofilizadas y extraídas bajo diferentes condiciones de temperatura, tiempo y velocidad de centrifugación, en las cuales se realizaron pruebas bioquímicas específicas para determinar la composición del mismo y poder solubilizarlo para estabilizar el jugo.

Se encontró: fructosa, sacarosa, proteína, aminoácidos libres, hierro, calcio y fosfatos. Siendo la proteína la responsable del problema debido a las larvas de la mosca de fruta (*Anastrepha striata*), que se desarrollan en el interior del arazá. Para esto se utilizó una enzima proteolítica, la papaína, probada en concentraciones de 0 a 500 ppm y se analizó la estabilidad del jugo.

Al usar una concentración de 390 ppm de papaína se redujo la turbidez y se logró solubilizar en un 10,42% los sólidos insolubles en suspensión que se hallan en el jugo. Se debe tratar a la pulpa de arazá con una concentración de 350 ppm de la preparación enzimática comercial Rapidasse TF y 390 ppm de papaína durante 60 minutos a 35 °C para mejorar las condiciones de estabilidad.

Se estabilizó el jugo hasta los 3 meses de conservación sin aparición de turbidez mejorando sus características organolépticas.

## SUMMARY

The present research aimed to stabilize a clarified juice of arazá which presented problems of turbidity due to formation of precipitates of unknown composition. This was a technological problem since it affects the organoleptic properties of the product obtained in INIAP

An experimental method was used taking samples of the precipitate lyophilized and extracted under different conditions of temperature, time and speed of centrifugation in which specific biochemical tests were performed to determine its composition in order to solubilize and stabilize the juice.

It was found: fructose, sucrose, protein, amino acids, iron, calcium and phosphate. The protein was responsible for the problem because of the larvae of fruit fly (*Anastrepha striata*), which develops inside the arazá. For this a proteolytic enzyme was used, the papain which was tested in concentrations from 0 to 500 ppm and the stability of the juice was analyzed.

When using a concentration of 390 ppm of papain turbidity was decreased and the soluble suspended solids found in the juice were solubilized in a 10.42% . The pulp of arazá should be treated with a concentration of 350 ppm of commercial enzyme preparation Rapidasse TF and 390 ppm of papain for 60 minutes from 35 degrees centigrade to improve the conditions of stability.

The juice was stabilized up to 3 months of storage without the appearance of turbidity improving its organoleptic characteristics.

## CAPÍTULO VII

### 7. BIBLIOGRAFÍA

1. ANGLEMIER, A y MONTGOMERY. 1982. Aminoácidos, péptidos y proteínas En: Introducción a la ciencia de los alimentos. Tomo 1, ed M de la Torre. Editorial Reverté. Barcelona. Pp:240-398
2. ALBERSHEIM, P.,1978, “Concerning the structure and biosynthesis of the primary cell walls of plants”, Editorial Manners D.J., University Park Press, Baltimore, Estados Unidos, pp. 127-150.
3. ALVARADO, J.; AGUILERA, J, 2001, “Métodos para medir propiedades físicas e industriales de alimentos”, Editorial Acribia, Madrid, España, pp. 157, 329.
4. ALVARADO, J.D., 1996, “Principios de ingeniería aplicados a alimentos”, Ambato, Ecuador, p.p. 185, 182, 201-207.
5. ARTHEY, D.; ASHURST, P, 1997, “Procesado de Frutas”, Editorial Acribia, Zaragoza, España, p.p. 147-148.
6. ASIAIN, L., 1999, “Las técnicas de filtración tangencial y el medio ambiente”, [www.asiain-asesores.com/rev3/pag31.htm](http://www.asiain-asesores.com/rev3/pag31.htm),(Acceso: 02, 2007).
7. ASPINALL, G.O., 1980, “Chemistry of cell wall polysaccharides. In The biochemistry of plants”, Editorial Academic Press, New-York, Estados Unidos, pp. 473-500.



8. BADILLO, M., 2008, “Optimización de los parámetros de operación para la obtención de jugo clarificado de uvilla (*Physalis peruviana* L.) utilizando la microfiltración tangencial”, Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, EPN, Quito, Ecuador, pp. 26-27.
9. BARRERA, HERNANDEZ, 2004, “Bases Técnicas para el Aprovechamiento Agroindustrial de las Especies Nativas de la Amazonia”, 1ra edición, Editora Guadalupe Ltda., Bogotá, Colombia, pp. 11-20.
10. BELITZ, H.; GROSCH, W., 1992, “Química de los alimentos”, 2da Edición, Editorial Acribia, Zaragoza, España, p.p. 105 – 172.
11. BOYER, R., 2000, “Conceptos de Bioquímica”, Internacional Thomson Editores S.A., Buenos Aires, Argentina, pp.14-146.
12. BRENNAN, J., 2006, “Manual del procesado de los alimentos”, 1era Edición, Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 480 – 509.
13. BRITO, B., 2003, “Aplicación de nuevas tecnologías agroindustriales para el tratamiento de frutas tropicales y andinas de exportación”, Informe final del Proyecto INIAP-PROMSA IQ-CV-077, Quito-Ecuador, p. 20.
14. BRITO, B., 2006, Informe del primer año del proyecto binacional INIAP-Ecuador, CORPOICA-Colombia, FTG 14-03 “Fortalecimiento del manejo poscosecha de frutales exóticos exportables de interés para los países andinos”, Quito, Ecuador, pp. 19 – 20.
15. CASP A., ABRIL J., 2003, “Procesos de conservación de alimentos”, 2da Edición, Ediciones Mundi - Prensa, Madris, España, pp. 447 - 465.
16. CHACÓN A., 2006, “Tecnología de Membranas en la Industria Láctea”, *Agronomía Mesoamericana*, 17(2):243.

17. CHEFTEL, J.C. 1989. Proteínas Alimentarias. Editorial Acribia, S:A ZARAGOZA, p:339
18. CHERYAN, M., 1998, “Ultrafiltration and Microfiltration. Handbook. Lancaster”, Editorial Technomic, Pennsylvania, Estados Unidos, p.p. 118, 293.
19. CORPEI, 2005, “Naranjillas, Pitahaya, Arazá y Borojó con Agroquímicos“, [http://www.ceaecuador.org/imagesFTP/4740.fichas\\_Naranjilla\\_pitahaya\\_araza\\_y\\_borojo\\_con\\_Agroquimicos.pdf](http://www.ceaecuador.org/imagesFTP/4740.fichas_Naranjilla_pitahaya_araza_y_borojo_con_Agroquimicos.pdf), (Enero,2008)
20. COULTATE, T. P., 1984, “Alimentos. Química de sus componentes”, Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 25 – 27, 31 – 32, 36 – 39.
21. ESPINOZA, M. 2007. Manual de laboratorio de bioquímica. Riobamba (Ecuador). Pedagógica Freire. p. 26-28, 54-59.
22. FERREIRA, S.; GENTIL, D, 1999, “Arazá (Eugenia stipitata) Cultivo y utilización: Manual técnico”, Editorial A&C Impresores, Buenos Aires, Argentina, p.p. 8-65.e
23. FONTAGRO, 2008. Informe final del Proyecto FTG 14-03 “Fortalecimiento del manejo poscosecha de frutales exóticos exportables de interés para los países andinos”, Quito, Ecuador, pp. 60 – 67.
24. GEKAS, V., TRAGARDH, G., HALLSTROM, B., 1993, “Ultrafiltration membrane performance fundamentals”, Department of Food Engineering, Lund University, Swedish foundation for membrane technology, Lund, Suecia, pp. 15-20.
25. GIRARD, B.; FUKUMOTO, L. R., 2000, “Membrane Processing of Fruit Juices and Beverages”, A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40(2):91.

26. GOUPY, J., 1999, "Plans d'expériences pour surfaces de réponse.", Editorial Dunoud, Paris, Francia, p.p. 3, 165-169.
27. GREEN, D., PERRY, R., 2008, "Perry's chemical engineers' handbook", 8va Edición, Mc-Graw Hill, New York, Estados Unidos, s.p.
28. GUADIX, A., 2001, "Producción en Reactores de Membrana de Hidrolizados Enzimáticos de Proteínas Lácteas para Nutrición Enteral.", Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Doctorado en Química, Universidad de Granada, Granada, España, p. 245.
29. HART, M., NG, K., HUXSOLL, C., 1989, "Microfiltration of enzyme-treated apricot puree", Quality factors of fruits and vegetables: chemistry and technology", Collections ACS Symposium, pp. 357-367.
30. HERNÁNDEZ, M.; BARRERA, J.; CARRILLO, M., 2006, "Arazá", Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. Bogotá, Colombia, p. 13.
31. HUISMAN, I., 1998, "Crossflow microfiltration of particle suspensions. The influence of Hydrodynamics and Phyco-chemical Interactions". Lund University, Lund, Suecia, p.p. 15-21.
32. IIAP (Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana) / TCA (Tratado de Cooperación Amazónica) / SPT (Secretaría Pro Tempore), 1997, "Cultivo de Frutales nativos amazónicos", Manual para el extensionista. s.p.
33. INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos) / MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería) / SICA (Sistema de Integración Centroamérica), 2002, "Censo Nacional Agropecuario 3: Resultados Nacionales y Provinciales", página de internet, s.l., EC, s.e., s.p.

34. INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) / SENACYT (Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología). 2009. Informe del Proyecto (PIC 05-2006-2-002): “Aprovechamiento del potencial nutritivo y funcional de algunas frutas de la amazonía ecuatoriana”: Informe Técnico Final. Quito, Ecuador, 8 p.
35. KILARA, A., 1982, “Bocces Biochemistry. Enzymes and their Uses in the Processed Apple Industry”, A Review. Station Experiment Agricultural University, Editorial Park. P.A, Estados Unidos, pp.35-36.
36. LAVERDE, J. 2010. “Estudio de las condiciones óptimas para la obtención de jugo clarificado de arazá (*Eugenia Stipitata*), mediante procesos enzimático y membranario”. Quito (Ecuador). Tesis Ingeniero Agroindustrial. Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. 28-35. 65-68
37. LEHNINGER, Albert, 1981, “Bioquímica. Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular”, 2da Edición, Editorial Pueblo y Educación, Baltimore, Estados Unidos, p.p.98-114
38. MADRID, A., 2001. “Nuevo Manual de Industrias Alimenticias”. Tercera edición, Editorial Mundi Prensa, Madrid, España, p.p. 72-73, 314 – 315.
39. Manual ColorTec PCM/PSMTM, adaptado en el Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina-INIAP, s.p.
40. Manual Fotómetro MACHEREY – NAGEL, adaptado en el Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina-INIAP, s.p.
41. MINOLTA, 1994. “Precise color communication”, Minolta Co. Ltd. Ramsey NJ-USA.

42. PICHO, L., 2008, “Estudio de las condiciones óptimas de operación de operación para la obtención de jugo clarificado de granadilla (*Pasiflora ligularis*L.) a través de la microfiltración tangencial”, Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, EPN, Quito, Ecuador, pp. 7-23.
43. PINEDO, P.M.; RAMÍREZ, N.F; BLASCO, L.M, 1981, “Preliminary notes concerning the arazá (*Eugenia stipitata*)”, Native Fruit of the Peruvian Amazonia, M.A.A./INIA/IICA, 229(2)sp.
44. PROEXANT, 2005, “Arazá (Amazon Peach)”, [http://www.proexant.org.ec/HT\\_Araz%C3%A1.html](http://www.proexant.org.ec/HT_Araz%C3%A1.html), (Mayo, 2008).
45. PROEXANT, 2007, “Fortalecimiento del manejo postcosecha de frutales exóticos exportables de interés para los países andinos: Caracterización general en el ámbito interno e internacional”, Quito, Ecuador, p. 317.
46. RODRIGUEZ, M., 2002, “Desarrollo de una alternativa tecnológica para la obtención de cremogenados de chirimoya (*Annonacherimola*;Mill), guayaba (*Psidiumguajava* L.) y mango (*Mangífera indica*)”, Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico, ESPOCH, Riobamba, Ecuador, pp. 37-42.
47. SAMANIEGO, I., 2003, “Desarrollo de una Alternativa Tecnológica para la obtención de Pulpas tratadas Enzimáticamente de chirimoya (*annonacherimolamill*), guayaba (*psidiumguajava* l) y mango (*mangífera indica*)”, Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico, ESPOCH, Riobamba, Ecuador, pp. 36 - 43.
48. SCHIRG, P, 2001, “Introducción a la teoría y práctica de las técnicas de membranas”, <http://www.psprozesstechnik.ch>, (Julio, 2009).
49. SINGH y HELDMAN, 2001, Introduction to Food Engineering, Third edition, pp.144-161.

50. TOLEDO, D. 2010. “Determinación del valor nutritivo y funcional de tres clones seleccionados de arazá (*eugeniastipitata*) y seis de borojó (*borojoapatinoi*), y evaluación del proceso para la obtención de pulpas pasteurizadas y congeladas”. Quito (Ecuador). Tesis Ingeniero Agroindustrial. Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria.
51. VILLACRES, E. 2001. Obtención de un hidrolizado enzimático de alta funcionalidad a partir del chocho (*Lupinusmutabilis*). Tesis de Maestría previa la obtención del título de Magister en Ciencias de Alimentos. INIAP
52. VAILLANT F.; MILLAN P.; REYNES M, 1998, “Fruits: Caracterisation préliminaire des polysaccharides pariétaux de la pulpe de corossol et étude de leur dégradation enzymatique”, Edición, Editorial, Paris, Francia, pp.257-270.
53. VALERI, D, 2006, “La magia de las enzimas”, Énfasis Alimentación,18(72)78
54. VIGNALE, B.; MEZZERA, R, 2009, “Los frutos del bosque nativo son una nueva opción productiva”, [http://www.elicriso.it/es/naturaleza\\_sur\\_america/guayabo\\_%20pitanga/](http://www.elicriso.it/es/naturaleza_sur_america/guayabo_%20pitanga/), (Julio 2009).
55. VILLAREAL, L; CURIOR, R; VAILLANT, F., 1999, “Efecto de la microfiltración tangencial sobre las características nutricionales y funcionales del jugo de maracuyá”, Editorial Guimar, Quito, Ecuador, p.p.19-33
56. VORAGEN, A.G.J., SCHOLS, H.A.I., ET PILNIK, W, 1985, “Enzymiclysis of pectic substances in cell walls: some implications for fruit juice technology”. ACS Symposium series: Chemistry and Function of Pectins, p.p. 230-247.
57. WARD, O.P., 1984, “Hydrolytic Industrial Chemicals”. Biochemical National Institute for Higher Education, Dublin, Ireland, p.p. 819-833.

## ANEXOS

### ANEXO No 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA SÓLIDOS SOLUBLES

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
S. SOLUBLES	30	0,73	0,61	1,98

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,53	9	0,06	6,04	0,0004
Tratamientos	0,53	9	0,06	6,04	0,0004
Error	0,19	20	0,01		
Total	0,72	29			

**Test :Tukey Alfa: 0,05 DMS: 0,28428**

*Error: 0,0097 gl: 20*

Tratamientos	Mediasn					
1,00	4,67	3	A			
3,00	4,90	3	A	B		
9,00	4,93	3	A	B	C	
4,00	4,93	3	A	B	C	
10,00	4,97	3		B	C	
8,00	4,97	3		B	C	
6,00	5,03	3			B	C
5,00	5,07	3			B	C
7,00	5,07	3			B	C
2,00	5,20	3				C

## ANEXO No 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA TURBIDEZ

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
TURBIDEZ	30	0,78	0,68	9,24

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	413,47	9	45,94	7,83	0,0001
Tratamientos	413,47	9	45,94	7,83	0,0001
Error	117,33	20	5,87		
Total	530,80	29			

**Test :Tukey Alfa: 0,05 DMS: 7,00325**

*Error: 5,8667gl: 20*

Tratamientos	Mediasn			
9,00	18,33	3	A	
8,00	20,33	3	A	B
5,00	25,67	3	B	C
10,00	26,67	3	B	C
3,00	27,00	3	B	C
7,00	27,33	3	B	C
4,00	27,67	3		C
2,00	29,00	3		C
6,00	29,67	3		C
1,00	30,33	3		C



## ANEXO No 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA CONTROL DEL pH

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
pH	30	0,95	0,93	0,36

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,04	9	0,00	42,17	<0,0001
Tratamientos	0,04	9	0,00	42,17	<0,0001
Error	0,00	20	0,00		
Total	0,04	29			

**Test :Tukey Alfa: 0,05 DMS: 0,03032**

*Error: 0,0001gl: 20*

Tratamientos	Mediasn					
3,00	2,85	3	A			
1,00	2,88	3	A	B		
9,00	2,89	3	B	C		
5,00	2,90	3	B	C	D	
4,00	2,90	3	B	C	D	
10,00	2,91	3	B	C	D	
6,00	2,92	3			C	D
7,00	2,93	3				D
2,00	2,97	3				E
8,00	2,98	3				E

## ANEXO No 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA CONTROL DE VISCOSIDAD CINEMATICA

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Viscosidad	30	0,61	0,43	1,49

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,01	9	0,00	3,48	0,0097
Tratamientos	0,01	9	0,00	3,48	0,0097
Error	0,00	20	0,00		
Total	0,01	29			

**Test :Tukey Alfa: 0,05 DMS: 0,04448**

*Error: 0,0002 gl: 20*

Tratamientos	Mediasn			
6,00	1,01	3	A	
3,00	1,02	3	A	
1,00	1,02	3	A	B
4,00	1,03	3	A	B
10,00	1,03	3	A	B
5,00	1,03	3	A	B
7,00	1,04	3	A	B
9,00	1,05	3	A	B
8,00	1,05	3	A	B
2,00	1,06	3		B

## ANEXO No 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA SÓLIDOS INSOLUBLES EN SUSPENSIÓN

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
SIS	30	0,77	0,67	2,68

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	60,19	9	6,69	7,40	0,0001
Tratamientos	60,19	9	6,69	7,40	0,0001
Error	18,08	20	0,90		
Total	78,27	29			

**Test :Tukey Alfa: 0,05 DMS: 2,74926**

*Error: 0,9041 gl: 20*

Tratamientos	Mediasn				
9,00	33,60	3	A		
10,00	33,76	3	A		
8,00	33,84	3	A		
6,00	34,43	3	A	B	
3,00	35,50	3	A	B	C
7,00	35,60	3	A	B	C
4,00	36,15	3	A	B	C
5,00	36,67	3		B	C
1,00	37,38	3			C
2,00	37,54	3			C

*Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )*

**ANEXO No 6. MANUAL DEL INIAP: USO DEL EQUIPO PILOTO DE MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL****a) Características generales:**

- Material de construcción: acero inoxidable AISI 304 L y partes en tubo flexible de alta presión.
- Módulo de filtración: adaptado para membranas cerámicas de micro y ultrafiltración de marca Membralox® Modelo P-19-40.
- Superficie de filtración instalada: 0,24 m<sup>2</sup>.
- Flujo de perneado máximo con agua : 150 L.h<sup>-1</sup>.
- Viscosidad máxima de los fluidos a tratar: 1.500 cP.
- Presión transmembranaria máxima: 10 bar.
- Rango de temperatura : 10 °C a 110 °C.

**b) Operación:**

El objetivo es establecer la forma en la que se deben llevar a cabo las pruebas de microfiltración tangencial empleando el módulo, que se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Posiciones

VÁLVULAS	POSICIÓN A	POSICIÓN B	POSICIÓN C
VA01	Cerrada	Cerrada	Abierta
VA02	Cerrada	Cerrada	Abierta
VA03	Cerrada	Abierta	Cerrada

**c) Procedimiento de filtración tangencial**

- Acoplar el piloto a un tanque de alimentación limpio según los estándares para la industria de alimentos.
- Cerciorarse que el equipo está en posición A (ver la tabla 1) y que el medidor de flujo este en su posición en la salida del permeado.
- Abrir VA01 y colocar la manguera 1 en el tanque de alimentación.
- Llenar el tanque de alimentación con la solución a filtrar.

- Poner la manguera de succión en el tanque de alimentación y llenar el circuito poniendo la bomba de alimentación (BE) en posición "ON" y a una velocidad promedio. Cerciorarse de la ausencia de burbujas de aire en el circuito alzando la manguera flexible M 01 bien arriba del circuito.
- Poner la bomba (BE) a velocidad 0. Cerrar la llave VA01. Prender la bomba BC.
- Poner el equipo en posición B, abriendo la válvula VA03 para dejar salir el perneado. El momento de la apertura de VA03 debe ser registrado por el computador como el tiempo 0 del ensayo.
- Aumentar paulatinamente la velocidad de BE de 0,2 bar cada 30 segundos hasta alcanzar la presión transmembranaria deseada para el ensayo.
- Mediante ajustes en el flujo de agua en el intercambiador de calor, ajustar manualmente la temperatura del perneado al valor deseado.
- Medir el volumen del perneado cada 5 minutos y proseguir el ensayo en esta posición hasta alcanzar el FRV de consigna.
- Una vez alcanzado el FRV de consigna, abrir la válvula micrométrica VM para extraer retenido y mantener el FRV de consigna según fórmula.
- Cuando haya terminado el proceso de filtración, apagar todas las bombas y drenar totalmente el circuito abriendo la válvula VA01, VA02 y VA03 y proceder inmediatamente con el lavado del equipo.

#### **d) Limpieza y sanitización**

- Inmediatamente después de cada ensayo, se debe realizar un ciclo de lavado. Si por una razón de fuerza mayor, el ciclo de lavado no puede realizarse inmediatamente después del ensayo, mantener el circuito lleno con agua limpia, hasta que el ciclo de lavado pueda realizarse.
- Poner la válvula VA03 en la posición alta del módulo y cerrarla.
- Una vez terminado el ensayo y drenado el producto del circuito abriendo la válvula VA01, VA02 y VA03, llenar el circuito con las soluciones cerrando las válvulas VA02 y VA03 y dejando abierta la válvula VA01.
- Una vez el circuito lleno, apagar la bomba BE y prender la bomba BC. Cerciorarse que exista una pequeña presión dentro del circuito. Si los manómetros marcan 0,

prender la bomba BE hasta que la presión de salida al menos marque 0,2 bar. Apagar la bomba BE cuando la presión en el circuito es adecuada.

- Dejar recircular el tiempo definido a presión baja.
- Una vez terminada la recirculación a presión baja, abrir la válvula de salida del perneado VA03 y aumentar la velocidad de la bomba de alimentación (BE) hasta alcanzar una presión de salida de aproximadamente 2 bar.
- Cuando el tiempo haya terminado, drenar el equipo y pasar la siguiente solución según la tabla 2.

**Tabla 2.** Soluciones de limpieza

Sustancia	Tiempo	Temperatura	Procedimiento	Observaciones
Agua	10 min	>50 °C	Equipo en posición de recirculación de retenido (Pe = 0,2 bar)	
Agua	20 min	>50 °C	Equipo en posición de filtración (Pe = 2 bar)	
Disolución NaOH al 2 %	20 min	>50 °C	Equipo en posición de recirculación de retenido (Pe = 0,2 bar)	
Disolución NaOH al 2 %	20 min	>50 °C	Equipo en posición de filtración (Pe = 2 bar)	
Agua	10 min	>50 °C	Equipo en posición de recirculación de retenido (Pe = 0 bar)	
Agua	20 min	>50 °C	Equipo en posición de filtración (Pe = 2 bar)	Verificar que el pH del agua a la salida presente un pH adecuado
HACER PRUEBA DE PERMEABILIDAD CON AGUA DESIONIZADA. SI (PARAR LAVADO), NO (PROSEGUIR)				
Disolución HNO <sub>3</sub> al 1 %	20 min	>50 °C	Equipo en posición de recirculación de retenido (Pe = 0,2 bar)	
Disolución HNO <sub>3</sub> al 1 %	20 min	>50 °C	Equipo en posición de filtración (U = 5 m/s, Pe = 2 bar)	
Agua desionizada	10 min	>50 °C	Equipo en posición de recirculación de retenido (Pe = 0,2 bar)	
Agua desionizada	20 min	>50 °C	Equipo en posición de filtración (Pe = 2 bar)	Verificar que el agua a la salida sea pH 7. Hacer la prueba de permeabilidad
HACER PRUEBA DE PERMEABILIDAD CON AGUA DESIONIZADA SI (PARAR LAVADO), NO (PROSEGUIR)				
Retirar el modulo de la membrana y cerciorarse que ningún canal este tapado. En caso positivo, soplar con aire comprimido los canales y proseguir un nuevo ciclo de lavado.				

**NOTAS**

- El agua a utilizar en las pruebas de permeabilidad y el procedimiento de lavado del microfiltrador tangencial debe ser suavizada. No se debe utilizar otro tipo de agua.
- Por la naturaleza del equipo, no permitir que el mismo funcione en ausencia de materia prima o agua.
- La membrana debe mantenerse siempre húmeda, incluso cuando el equipo ha sido apagado. Si el equipo va estar más de una semana sin uso, drenar el equipo y cerrar todas las llaves.

**f) Procedimiento de la prueba de permeabilidad de la membrana al agua**

- Utilizando agua, realizar al menos cuatro determinaciones del flujo a diferentes presiones de salida (Ps) entre 0,5 y 3 bar. Para ello, mover el botón de control de velocidad de la bomba BE.
- Cuando la presión es estabilizada, medir con una probeta el volumen de agua (V) que se obtiene durante 30 segundos (t). Anotar la temperatura en el circuito (T) y la presión de entrada (PE). Entre cada determinación, permitir que la presión de entrada se estabilice (alrededor de 3 minutos).
- Calcular la permeabilidad de la siguiente manera para cada presión:

$$\text{Permeabilidad} = \frac{R}{A \cdot P_{tm}}$$

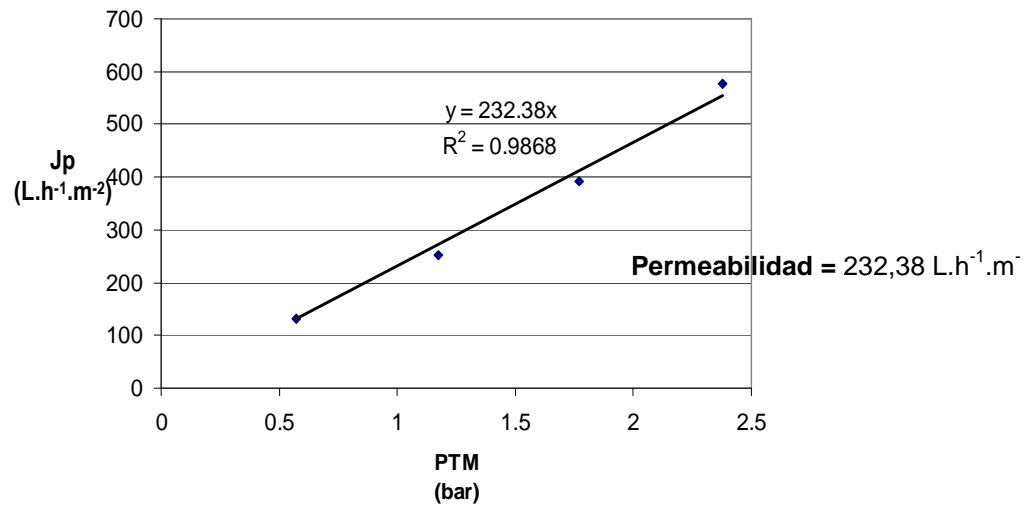
Donde:  $R$  (L/h) = Flujo de Agua =  $V / t$

$P_{TM}$  (bar) = Presión Transmembranaria =  $(P_e + P_s) / 2$

$A$  (m<sup>2</sup>) = Área de la Membrana = 0,22 m<sup>2</sup>

- Graficar el Flujo de Permeado (L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>) contra la Presión Transmembranaria. Realizar la recta de mejor ajuste: Flujo = m.PTM. La pendiente (m) corresponde al valor de permeabilidad. El r<sup>2</sup> debe ser superior a 0,90 presente en la tabla y figura.

- Si el valor de permeabilidad obtenido es inferior al menos 90 % del valor de permeabilidad máxima ( $232 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$ ) se debe ejecutar de nuevo el procedimiento de limpieza.



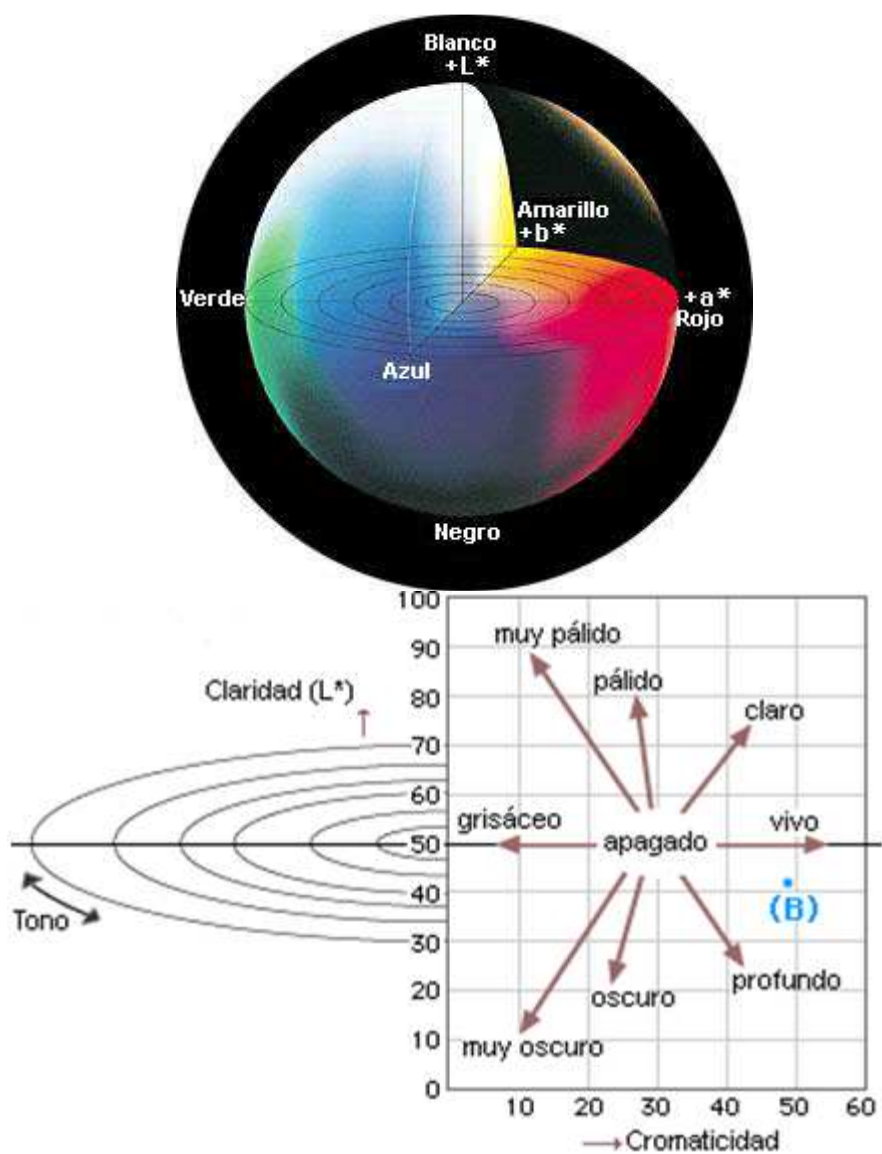
**Figura 1.** Relación entre la PTM y el Jp en la prueba de permeabilidad del equipo piloto con membrana de cerámica de  $0.5 \mu\text{m}$

**Tabla 3.** Prueba de permeabilidad del equipo piloto con membrana de cerámica de  $0,5 \mu\text{m}$

PE (bar)	PS (bar)	Flujo (mL/30 s)	Ptm (bar)	Jp (L.h <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup> )
0,58	0,56	240	0,57	130,91
1,07	1,28	460	1,18	250,91
1,56	1,98	720	1,77	392,73
2,06	2,70	1060	2,38	578,18



ANEXO No 7. DIAGRAMAS DE LOS PARÁMETROS DEL COLOR INSTRUMENTAL L, a, b, H



Fuente: Minolta, 1994

**ANEXO No 8. EJEMPLOS DE CONDICIONES ÓPTIMAS PARA JUGOS DE FRUTA OBTENIDOS POR MICROFILTRACION TANGENCIAL (ESCALA LABORATORIO O PLANTA PILOTO)**

Jugo	Membrana	TMP (bar)	U (ms <sup>-1</sup> )	T (°C)	FRV	Flujo de permeado (L h <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> )	Fuente
Manzana	Tubular Cerámica 0.1 mm	4.1	8	50	10	160-190	Fukumoto 1998
Naranja, limón	Tubular cerámica 0,5-0,8 mm	0.5-4.0	0.5-12	20-40	1	10-60	Capanelli 1994
Mandarina	Plana con marco polisulfona 0,1-0,2 mm	0.9-1.9	1-3.5	25	1	40-70	Chamchong 1991
Piña	Tubular cerámica 0,2 mm	1-5	1-4	30	1-3	52-60	Jaeger 1998 Itoua 1991
Albaricoque	Tubular cerámica 0,45 mm	2	3	50	1	80	Hartet 1989
Mango	Tubular cerámica 0,2 mm	1	4	20	5	55	Olle 1997
Maracuyá	Tubular cerámica 0,2 mm	1.5	7	36	3	50	Vaillant 1999
Mora	Tubular cerámica 0,2 mm	1.4-3.4	5	30	1.4-2.05	11.07-31.65	Yacelga 2007 EPN
Maracuyá	Tubular cerámica 0,2 mm	2.5	5	30	10-15	20-50	Villareal 1999 EPN
Naranjilla	Tubular cerámica 0,2 mm	2	5	30	4.51	57-170	Mosquera 2008 EPN-INIAP
Granadilla	Tubular cerámica 0,5 mm	2	5	30	7	50	Picho 2008 EPN-INIAP
Uvilla	Tubular cerámica 0,5 mm	2	5	35	12.5	20.6	Badillo 2008 EPN-INIAP
Arazá	Tubular cerámica 0,5 mm	3	5	40	5.39	175	Laverde 2011 EPN-INIAP





