



Universidad del Azuay
Facultad de Ciencia y Tecnología
Escuela de Ingeniería en Alimentos

**“Actividad proteolítica de extractos enzimáticos
provenientes de especies vegetales y su aplicación en
la clarificación de jugos de frutas”**

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de Ingeniera en
Alimentos**

Autores:

**Adriana Elizabeth Andrade Silva
Diana Patricia Vidal León**

Directora:

María Elena Cazar Ramírez

Cuenca-Ecuador

2011

DEDICATORIA

Queremos dedicar este trabajo a nuestros padres por su apoyo incondicional, por creer en nosotras y por ser nuestro ejemplo a seguir a lo largo de estos años.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer principalmente a la Dra. María Elena Cazar por la confianza depositada en nosotras, por su amistad y por su acertada dirección.

De igual manera nuestros agradecimientos al Dr. Piercósimo Tripaldi y al Ing. Claudio Sanchez por aportar con sus conocimientos para la elaboración de éste trabajo de tesis.

Y de manera muy especial a Carlos Reyna, Ximena Orellan, Diego Vidal, María Fernanda Rosales y Mónica Tinoco por su confianza, por su apoyo y porque de una u otra manera han colaborado en la realización de esta tesis.

Finalmente agradecemos a Dios por darnos fuerza, sabiduría y paciencia para la realización de este trabajo.

RESUMEN

Para evaluar el potencial de los extractos enzimáticos como clarificantes de jugos y su actividad proteolítica se utilizaron dos técnicas espectrofotométricas. Se recolectaron especies en la zona del Austro: *Vasconcellea X heilbornii* (Babaco), *Vasconcellea sp* (Siglalón), *Vasconcellea pubescens* (Chamburo) y *Ficus carica* (Higo). La técnica descrita por Arnon fue estandarizada a las condiciones de laboratorio. Además, se desarrolló un diseño de mezclas y se obtuvo una formulación de látex de frutos que presenta una promisoría actividad proteolítica para clarificar los jugos. Se demostró que el fruto *Vasconcella pubescens* (Chamburo) tiene la mejor actividad proteolítica y poder clarificante, en comparación con las demás especies en estudio.

ABSTRACT

The aim of the present work to assess the potential of enzymatic extracts from vegetal species as juice clarifiers. Vegetal species from the Ecuadorian South Highlands were gathered: *Vasconcellea X heilbornii* (Babaco) *Vasconcellea sp* (Siglalón) *Vasconcellea pubescens* (Chamburo) and *Ficus carica* (Higo).

To assess the proteolytic activity two spectrophotometric techniques were evaluated. The methodology described by Arnon was standardized to our lab conditions.

The latex from *Vasconcellea pubescens* (Chamburo) displays the higher proteolytic activity, compared with the species included in the study. Besides, a mixture design was developed, obtaining a mixture from latex with a high proteolytic activity and potential as juice clarifier.

INDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Índice de contenidos.....	vi
Índice de Tablas.....	x
Índice de Figuras.....	xii
Introducción.....	1

CAPÍTULO I: ENZIMAS

Introducción.....	4
1.1 Concepto y generalidades.....	4
1.2 Clasificación de las Enzimas.....	5
1.2.1 Oxidorreductasas.....	5
1.2.2 Trans-ferasas.....	5
1.2.3 Hidrolasas.....	5
1.2.4 Liasas.....	5
1.2.5 Isomerasas.....	6
1.2.6 Ligasas.....	6
1.3 Nomenclatura de las Enzimas.....	6
1.4 Fuentes naturales de extracción de enzimas.....	7
1.4.1 Enzimas de origen vegetal.....	7
1.4.2 Enzimas de origen animal.....	9
1.4.3 Enzimas de origen microbiano.....	11
1.5 Aplicaciones de las enzimas en transformación de alimentos.....	13
1.5.1 Panadería.....	13
1.5.2 Cervecería.....	14
1.5.3 Fabricación de zumos.....	14
1.5.4 Refinado de azúcar.....	15
1.5.5 Otras aplicaciones.....	15

CAPÍTULO II: DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO

Introducción.....	16
2.1 Caricáceas: Generalidades y distribución de las especies de Caricáceas en el Ecuador.....	16
2.2 Aspectos botánicos relevantes en la diferenciación de especies del género Caricácea.....	18
2.2.1 Ficus carica L. (Higo) características generales.....	18
2.2.1.1 Aplicaciones de los productos derivados del Higo...	18
2.2.1.2 Enzimas de Ficus carica.....	19
2.2.2 Vasconcellea pubescens (Chamburo).....	19
2.2.2.1 Aplicaciones de los productos derivados del Chamburo.....	20
2.2.3 Vasconcellea sp (Siglalón).....	20
2.2.3.1 Aplicaciones de los productos derivados del Siglalón.....	21
2.2.4 Vasconcellea X heilbornii (Babaco).....	21
2.2.4.1 Aplicaciones de los productos derivados del Babaco.....	22
2.3 Especies utilizadas para elaboración de jugos.....	22
2.3.1 Naranja.....	22
2.3.2 Manzana (Pirus malus L.).....	24
2.4 Jugos Naturales.....	25
2.4.1 Jugo de manzana.....	26
2.4.2 Jugo de naranja (lulo).....	26
2.4.3 Beneficios de los jugos de frutas.....	26

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

Introducción.....	27
3.1 Obtención y preparación de material vegetal.....	27
3.2 Estandarización del ensayo para determinar la actividad proteolítica.....	28
3.2.1 Determinación de la Actividad Proteolítica según Rocha et al (2010).....	28
3.2.2 Determinación de la actividad proteolítica de pulpa de frutos.....	29
3.2.2.1 Materiales y reactivos.....	29
3.2.2.2 Preparación de reactivos.....	30
3.2.2.3 Preparación de las muestras.....	31
3.2.2.4 Desarrollo de la curva de calibración para actividad proteolítica.....	31
3.2.2.5 Determinación de actividad enzimática en muestras vegetales (látex y frutos).....	34
3.3 Obtención industrial de jugos de frutas.....	35
3.3.1 Materiales y reactivos.....	35
3.3.2 Preparación de los jugos de frutas.....	36
3.4 Diseño de mezclas para evaluación de actividad proteolítica de mezclas de látex.....	37
3.5 Análisis sensorial.....	38

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Actividad Proteolítica de látex y pulpa de especies vegetales.....	39
4.1.1 Desarrollo de la curva de calibración.....	39
4.2 Determinación de actividad proteolítica en muestras vegetales.....	40
4.3 Aplicación de Diseño de Mezclas para Clarificación de jugos.....	41
4.4 Mezclas de látex de frutos con potencial clarificante de jugos.....	44
4.5 Análisis Sensorial.....	44

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

5.1 Estandarización de método para la determinación de la actividad proteolítica en látex y pulpa de especies vegetales.....	46
5.2 Análisis de la actividad proteolítica de extractos enzimáticos obtenidos de especies vegetales y su aplicación como clarificantes de jugos de frutas.....	47
5.3 Estudio de la aceptación de los jugos clarificados mediante un análisis sensorial con un panel no entrenado.....	48
Conclusiones y Recomendaciones.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Enzimas producidas por vegetales, su acción y aplicación industrial. (Badui, 2006).....	8
Tabla 2: Enzimas de origen animal, su acción y su adaptación industrial. (Badui, 2006).....	10
Tabla 3: Enzimas producidas por bacterias, levaduras y hongos y aplicaciones en industria alimentaria. (Badui, 2006).....	12
Tabla 4: Características morfológicas de las Caricáceas presentes en Ecuador.....	17
Tabla 5: Características morfológicas de la especie de Naranjilla. Fuente: Urbina, 2008.....	23
Tabla 6: Características morfológicas de la especie de Manzana. Fuente: Recalde, 2010.....	24
Tabla 7: Diseño de Mezclas Simplex Aumentado (Lundstedt et al, 1998). X1: Látex de higo; X2: Látex de chamburo y X3: Látex de babaco.....	37
Tabla 8: Resultados de las lecturas de la Curva de calibración.....	39
Tabla 9: Determinación de la Actividad Proteolítica en muestras de frutos. 1:Vasconcellea X heilbornii (Babaco), a:verde b: maduro; 2: Vasconcellea sp (Siglalón), a: verde, b: maduro; 3: Vasconcella pubescens (Chamburo) , a: verde, b: maduro y 4: Ficus carica (Higo).....	40
Tabla 10: Determinación de la Actividad Proteolítica en muestras de látex. Descripción.- 1:Vasconcellea X heilbornii (Babaco), 2: Vasconcellea sp (Siglalón) 3: Vasconcella pubescens (Chamburo) y 4: Ficus carica (Higo).....	41
Tabla 11: Resultados de las lecturas de transmitancia. Descripción.- 1:Vasconcellea X heilbornii (Babaco), 2: Vasconcellea sp (Siglalón) 3: Vasconcella pubescens (Chamburo) y 4: Ficus carica (Higo).....	42
Tabla 12: Diseño de mezclas para pruebas de actividad proteolítica.....	42
Tabla 13: Actividad proteolítica de mezclas en el jugo de naranjilla.....	43

Tabla 14: Actividad proteolítica de mezclas en el jugo de manzana.....	43
Tabla 15: Mezclas promisorias para la clarificación de jugos.....	44
Tabla 16: Evaluación sensorial de jugo de naranjilla. Resultados expresados en porcentajes.....	45
Tabla 17: Evaluación sensorial de jugo de manzana. Resultados expresados en porcentajes.....	45

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ficus carica L. (Higo).....	18
Figura 2. Vasconcella pubescens (Chamburo).....	19
Figura 3. Vasconcellea sp (Siglalón).....	20
Figura 4. Vasconcellea X heilbornii (Babaco).....	21
Figura 5. Látex de los frutos en estudio.....	28
Figura 6. Reactivos.....	30
Figura 7. Adición de caseína a los tubos.....	32
Figura 8. Centrifugación de los tubos.....	33
Figura 9. Lecturas registradas en el espectrofotómetro.....	34
Figura 10. Curva de calibración.....	40
Figura 11. Resultados del análisis sensorial por atributos del jugo naranja.....	49
Figura 12. Resultados del análisis sensorial por atributos del jugo manzana.....	50

Andrade Silva Adriana Elizabeth

Vidal León Diana Patricia

Trabajo de Graduación

Cazar Ramírez María Elena

septiembre del 2011

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS PROVENIENTES DE ESPECIES VEGETALES Y SU APLICACIÓN EN LA CLARIFICACIÓN DE JUGOS DE FRUTAS

INTRODUCCIÓN

La producción de jugos de frutas se ha incrementado rápidamente en muchos países en los últimos años. Algunos factores que contribuyen al desarrollo de esta industria, son:

- Mejoras en el método de manufactura y desarrollo de mejores equipos de procesamiento.
- Un mejor conocimiento en la utilización de los productos naturales.
- Programas amplios de publicidad y mercadeo.
- Mantenimiento de la composición, nutrición y calidad bacteriológica del producto, así como productos saludables y agradables.
- Mejoras del empaque y del método de distribución.

La importancia económica de esta industria es establecida por su valor como alimento teniendo en cuenta los conocimientos científicos obtenidos en la producción y comercialización del jugo de frutas. Los productos estándares de jugos de frutas están siendo modificados, la tendencia tiene un gran énfasis en la calidad y utilización de productos naturales. La conservación de energía, el control de desperdicios, y la eficiencia de la manufactura presenta un desafío importante a la industria de jugos de frutas. Además, como los estándares de vida alrededor del mundo continúan creciendo, la

demanda del jugo de frutas también continuará aumentando. Actualmente, en la Industria de Bebidas se utilizan diversas sustancias clarificantes, tales como:

- Bentonita.
- Gelatina.
- Sílica gel.
- Polivinilpoli-pirrolidona (PVPP).
- Mezclas de Enzimas (SCOTTZYME PEC 5 L).

Todas estas sustancias se combinan con tecnologías como la nano filtración, ultrafiltración, etc., para obtener bebidas clarificadas de excelente calidad y atractivas para el consumidor. La mayoría de estas sustancias son utilizadas en la Industria de vinos y cervezas. En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances que se han visto reflejados en muchas de sus aplicaciones industriales, como en la obtención de productos químicos, en la industria alimentaria y farmacéutica.

Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos. Las aplicaciones comerciales de las enzimas se conocen en todo el mundo. Uno de los campos con un éxito sin precedentes, desde el punto de vista microbiológico, enzimológico, bioquímico, químico y farmacéutico, fue la transformación de esteroides por vía enzimática en la década de los años 40 a los 50. La utilización de microorganismos completos con actividad catalítica para la deshidrogenación, aromatización del anillo A, eliminación de cadenas laterales y la hidroxilación en la molécula esteroideal dio lugar a la síntesis químico-biológica de importantes hormonas como los cortico-esteroides; así floreció una de las industrias más rentables en esa época.

Los procesos biocatalíticos normalmente involucran el cultivo y uso de microorganismos y el uso de enzimas aisladas solubles o inmovilizadas en medios acuosos o inorgánicos que contienen compuestos orgánicos como sustrato. En estos procesos las enzimas alteran la estructura de los sustratos o sintetizan nuevos compuestos. Estos procesos pueden ser

llevados a cabo a pequeña escala, como por ejemplo en la producción de esteroides, o bien a gran escala como sería la utilización de invertasa para la obtención de jarabes fructosados.

Debido a la importancia del estudio de las enzimas clarificantes y su actividad proteolítica, se ha planteado el presente trabajo de investigación con los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el potencial de extractos enzimáticos de especies vegetales como clarificantes de jugos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Recolectar especímenes vegetales en diferentes sectores del Austro Ecuatoriano.
- Obtener muestras de látex de las diferentes muestras recolectadas.
- Estandarizar un método espectroscópico para evaluar la actividad proteolítica del látex de especies vegetales.
- Elaborar jugos pasteurizados de frutas y utilizarlos como sustratos para probar la actividad proteolítica del látex de las especies vegetales en estudio.
- Probar el potencial del látex obtenido de las especies en estudio como clarificador de jugos

CAPÍTULO I

ENZIMAS

Introducción

En este capítulo se abordarán todos los conceptos relacionados con las enzimas, sus generalidades, clasificación y nomenclatura. Además, se incluye información acerca de las fuentes naturales de extracción de enzimas y su aplicación en la transformación de los alimentos.

1.1 Concepto y generalidades

Las enzimas son proteínas que actúa como catalizadores biológicos, llevando a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades, no se consumen durante la reacción, presentan un elevado grado de especificidad. Debido a su naturaleza química, a las enzimas les afectan los mismos factores que alteran a las proteínas; por esta razón, para actuar en forma óptima, cada una requiere de ciertas condiciones de temperatura, de pH, de fuerza iónica, etc. (Badui, 2006)

En la actualidad existen más de 2000 enzimas, de las cuales muchas han sido aisladas, purificadas y cristalizadas; su estructura química es de carácter proteico globular. Su especificidad de catálisis es única pues es mucho mayor que la de la gran mayoría de compuestos orgánicos e inorgánicos que se emplean en los distintos procesos industriales (Badui, 2006).

En relación a su velocidad de acción, algunas de ellas tienen la capacidad de transformar más de un millón de moléculas de sustrato, por segundo, por

molécula de enzima. La aplicación de las enzimas en los alimentos se enfoca a la conservación de alimentos o de sus componentes, como también en algunos cambios químicos que sufren los alimentos, cambios que pueden resultar beneficiosos como la maduración de las frutas o perjudiciales como la oxidación de ácidos grasos o el oscurecimiento enzimático. (Lucas, 2009)

Así mismo el uso más eficiente de materias primas y el mejoramiento de la calidad sensorial de los alimentos como la textura y el sabor. Se han utilizado enzimas para producir alimentos bajos en calorías y eliminar compuestos antinutricionales de ciertas materias primas. (Lucas, 2009)

1.2 Clasificación de las Enzimas

Las enzimas se dividen en seis grupos principales:

1.2.1 Oxidorreductasas.- Son las enzimas comprometidas en la oxidación de los sistemas biológicos. Este grupo incluye las enzimas denominadas como *deshidrogenasas*, *reductasas*, *oxidasas*, *oxigenasas*, así como las *hidroxilasas* y la enzima *catalasa*.

1.2.2 Transferasas- Son enzimas que catalizan la transferencia de varios grupos químicos (metilo, acetilo, aldehído, cetona, amino, fosfato, etc.) de un sustrato a otro.

1.2.3 Hidrolasas.- Son las responsables de la rotura hidrolítica de uniones. Su nombre común se forma mediante el agregado del sufijo –asa al nombre del sustrato; por ejemplo: *lipasas*, *proteinasas*, *pectinestearasas*, *amilasas*, *maltasas*, etc.

1.2.4 Liasas.- También catalizan la rotura de uniones, pero no por hidrólisis. Algunas eliminan grupos de sus sustratos, dejando dobles ligaduras. Ejemplos: las *carboxilasas* (descarboxilasas), *aldolasas*, *hidratasas*

1.2.5 Isomerasas.- Transforman a sustratos de una forma isométrica a otra. Las racemasas y las epimerasas pertenecen a este grupo.

1.2.6 Ligasas.- Reciben este nombre un grupo de enzimas que catalizan ciertos tipos de síntesis. (Braverman, 1980)

1.3 Nomenclatura de las Enzimas

La nomenclatura enzimática ha sido poco sistemática, y carece de los lineamientos necesarios para darles nombres adecuados. Existen muchas enzimas cuyos nombres no ofrecen ninguna información sobre su actividad o sus propiedades como es el nombre de la tripsina, la quimotripsina, la pepsina y otras. Unas se han asignado con el nombre del descubridor, otras como la papaína, de acuerdo con su procedencia, y en otros casos, como la lactasa, según el sustrato que se utiliza, que en este caso es la lactosa. (Avilez, 2009)

Debido a la falta de homogeneidad en la nomenclatura, se integró la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica, que desarrollo un método que identifique cada una con cuatro dígitos. La nomenclatura asociada a los dígitos se presenta a continuación:

Primer dígito: Indica a qué grupo de las seis clases de enzimas pertenece.

Segundo dígito: Corresponde a la subclase de enzima, por ejemplo; las hidrolasas se refiere al tipo de enlace que hidroliza: el 3.1 es de enlaces éster, el 3.2 de enlaces glucosídicos y el 3.4 de enlaces peptídicos.

Tercer dígito: Es una subdivisión y ofrece más información con respecto al sustrato que utiliza la enzima. Por lo tanto, si se tiene una hidrolasa de uniones éster (3.1), el tercer número indicara si se trata de un enlace éster carboxílico (3.1.1), tioéster (3.1.2), monofosfato (3.1.3), etc.

Cuarto dígito: Indica específicamente la acción de la enzima. (Badui, 2006)

1.4 Fuentes naturales de extracción de enzimas

Las enzimas pueden extraerse a partir de material vegetal, animal y microbiano. Las enzimas de tipo vegetal, se encuentran las proteasas, carbohidrasas, las enzimas de tipo animal están las esterasas y las enzimas del tipo microbiano provienen de bacterias y hongos, (Arias y Lastra, 2009). A continuación se detallan cada una de las diferentes fuentes de extracción.

1.4.1 Enzimas de origen vegetal

Entre las enzimas de tipo vegetal se encuentran las proteasas y carbohidrasas. Estas enzimas descomponen residuos de azúcares de carbohidratos superiores, α -amilasas y β -amilasa. La papaína, la ficina y la bromelina, son proteasas de origen vegetal, se extrae del látex de la papaya, higo y piña respectivamente son usadas para el ablandamiento de las carnes, clarificación de jugos y en la elaboración de la cerveza. (Badui, 2006)

Las lipasas que son extraídas de las semillas de soya, ricino, algodón y cereales como trigo y maíz. En la leche hay una lipasa naturalmente activa, encapsuladas en los glóbulos grasos y otra lipasa que se activa por tratamiento mecánico como la agitación y la homogeneización. (Braverman, 1980)

Las lipasas son usadas para el desdoblamiento de lípidos y en el desgrasado de proteínas. También son usadas en la leche sin pasteurizar para la producción de quesos, aunque estos se tienen que madurar por largos periodos para asegurar la destrucción de microorganismos patógenos. (Badui, 2006). A continuación se presenta un resumen de las principales enzimas de origen vegetal, con información referente a sus sustratos, modo de acción y aplicación industrial.

Tabla 1: Enzimas producidas por vegetales, su acción y aplicación industrial. (Badui, 2006)

ENZIMA	SUSTRATO	MODO DE ACCION	APLICACIÓN INDUSTRIAL
Amilasa	Malta germinada	Convierte el almidón del endospermo en azúcares fermentables por levaduras para la elaboración de la cerveza	El proceso del malteado incrementa el contenido de amilasas para hidrolizar el almidón que proviene de la malta y otros cereales
	Papa	Convierte el almidón en azúcar	Un precalentamiento activa la enzima, lo que produce un aumento de azúcares y de la dulzura.
Peroxidasa	Vegetales	Causa olores indeseables durante el almacenamiento	Los tratamientos térmicos inactiva las enzimas
Mirosinasa	Mostaza, rábano	Convierte los tioglucósidos en isotiocianatos y azúcares cuando el alimento sufre daños físicos en su tejido; los tioglucósidos son responsables del aroma.	Para optimizar la retención del olor hay que cortar el alimento justo antes de consumirse
Esterasa	Fruta	Produce ésteres durante la maduración que son responsables del olor y el sabor.	El sabor, el olor y la textura de las frutas determinan las condiciones de cosecha, almacenamiento y procesamiento.
Aliinasa	Cebolla y ajo	Produce los olores al actuar sobre sus correspondientes precursores cuando el tejido se daña mecánicamente.	Para optimizar la retención del olor hay que cortar el alimento justo antes de consumirse.
Polifenol-Oxidasa.	Frutas y vegetales	Oscurecimiento aeróbico del alimento durante el daño físico del tejido.	Las frutas se pueden proteger por la adición de SO ₂ , ác. Ascórbico y cítrico, o bien al evitar su exposición al oxígeno.

1.4.2 Enzimas de origen animal

Entre las enzimas de tipo animal encontramos a la esterasa y lipasa; producidas en la mucosa gástrica y el páncreas. Las mismas que son usadas en la producción de aroma de quesos, crema, mantequilla, margarina y productos de chocolatería.

La hidrógeno-peróxido-oxido-reductasa o mejor conocida como catalasa, son extraídas del hígado del vacuno y porcino. Son utilizadas como antioxidantes de productos líquidos y pastosos, como mantequilla, mayonesa y grasa animal, también son utilizados en la elaboración de *vinos* impidiendo el crecimiento de microorganismos aerobios y la formación de exceso de acidez volátil. Las fosfatasas se obtienen de tejidos animales óseo y muscular. La tripsina, la pectasas y la quimotripsina se producen en el páncreas. (Arias y Lastra, 2009)

A continuación se presenta un resumen de las principales enzimas de origen animal, con información referente a sus sustratos, modo de acción y aplicación industrial.

Tabla 2: Enzimas de origen animal, su acción y su adaptación industrial. (Badui, 2006).

ENZIMA	SUSTRATO	ACCION	APLICACIÓN INDUSTRIAL
Catepsina.	Carne.	Cambios autocatalíticos en el tejido, lo que resulta en un ablandamiento natural sin un cambio visible en la membrana externa de la fibra muscular.	La carne es almacenada a 4°C para su ablandamiento. Las irradiaciones controlan el crecimiento microbiano y permiten usar temperaturas más elevadas para acelerar el ablandamiento.
Invertasa.	Miel.	Las abejas producen en forma normal azúcar invertido.	Las abejas construyen los paneles para lograr una máxima producción de azúcar invertido en la miel.
Lipasa.	Leche.	Hidroliza las grasas y produce un sabor desagradable en productos lácteos.	Los tratamientos térmicos desnaturalizan la enzima.
	Queso.	Hidroliza las grasas y produce sabores deseables característicos.	Se usa la leche sin pasteurizar para la producción de quesos, aunque éstos se tienen que madurar por largos periodos para asegurar la destrucción de microorganismos patógenos.

1.4.3 Enzimas de origen microbiano

Las enzimas del tipo microbiano provienen de bacterias y de hongos. Entre estas encontramos a las amilasas, glucamilasas, glucosaisomerasas, proteasas, pectinasas y otros como agarasas, quitinasas, alginasas, lipasas, y esterases procedentes de microorganismos de ambientes acuáticos.

La mayoría de estas enzimas tienen aplicación biotecnológicas, se utilizan frecuentemente para mejorar procesos, por ejemplo, para facilitar el empleo de nuevos tipos de materias primas o las propiedades físicas de un material con el objeto de poder procesarlo más fácilmente, ya sea aumentando su solubilidad o disminuyendo su viscosidad de forma que se facilite su transporte durante el procesado.

También son utilizadas para mejorar el producto; por ejemplo, cambiando el color, aroma, textura, sabor o vida útil de un alimento, con el fin de que resulte más aceptable para el consumidor (Rivera y García, 2007). De los hongos principalmente son extraídas las lipasas, pero algunas de las lipasas también son extraídas de las bacterias. Son usadas para la producción de aromas de quesos, mantequillas y margarinas. (León; *et al*, 2000)

A continuación se presenta un resumen de las principales enzimas de origen microbiano, con información referente a sus sustratos, tipos de enzimas y aplicación industrial.

Tabla 3: Enzimas producidas por bacterias, levaduras y hongos y aplicaciones en industria alimentaria. (Badui, 2006)

MICROORGANISMOS	SUSTRATO	TIPO DE ENZIMA	APLICACIÓN INDUSTRIAL
BACTERIAS	<i>Bacillus subtilis</i>	Carbohidrasa	Panificación y Molinería, para mejorarlos por modificación de su almidón.
			Fermentación de cerveza
		Proteasa	Cerveza (mantención de transparencia).
			Galletas (modificar la masa) Hidrolizados proteicos
LEVADURAS	<i>Saccharomyces sp.</i>	Invertasa	Industria de azúcar (máxima producción)
HONGOS	<i>Aspergillus oryzae</i>	Carbohidrasa	Jarabes hidrolizados de almidón
			Cerveza (eliminación de almidón)
			Jugos de fruta (clarificación)
			Jarabe de chocolate (control de viscosidad)
		Carbohidrasa y Proteasa	Panificación y galletería (modificación de masa)
		Proteasa	Ablandadora de carne
	<i>Aspergillus niger</i>	Carbohidrasa	Sacarificación de restos de destilería
		Celulasa	Concentrado líquido de café (control de viscosidad)
		Glucosa-oxidasa y Catalasa	Huevo seco (eliminación de glucosa) Derivados de frutas y hortalizas, vinos y cervezas (eliminación de oxígeno)
		Pectinasa Pectinest.	Jugos de fruta y vinos (producción y clarificación)
Lipasa	Queso		

1.5 Aplicaciones de las enzimas en transformación de alimentos

La utilización de enzimas en los alimentos presenta una serie de ventajas para la transformación de alimentos. La gran especificidad de acción que tienen las enzimas hace que no se produzcan reacciones laterales imprevistas. Asimismo se puede trabajar en condiciones moderadas, especialmente de temperatura, lo cual evita alteraciones de los componentes más lábiles del alimento.

Las enzimas pueden inactivarse fácilmente cuando se considere que ya han cumplido su misión en el proceso de elaboración del alimento. Las enzimas utilizadas dependen de la industria y del tipo de acción que se desee obtener, siendo éste un campo en franca expansión. A continuación se mencionan algunas aplicaciones en la industria alimentaria. (Lucas, 2009)

1.5.1 Panadería

En panadería se utiliza la lipoxidasa, simultáneamente como blanqueante de la harina y para mejorar su comportamiento en el amasado. La forma en la que se añade es usualmente como harina de soya o de otras leguminosas. Para facilitar la acción de la levadura, se añade amilasa, normalmente en forma de harina de malta, aunque en algunos países se utilizan enzimas procedentes de mohos ya que la adición de malta altera algo el color del pan. (Arias y Lastra, 2009). Eventualmente se utilizan también proteasas para romper la estructura del gluten y mejorar la plasticidad de la masa. Este tratamiento es importante en la fabricación de bizcochos. (Castellanos;*et al* 2004)

1.5.2 Cervecería

En la industria de la cervecería la enzima mayor utilizada es la papaína, que fragmenta las proteínas presentes en la cerveza y evitando que ésta se enturbie durante el almacenamiento o la refrigeración. Esta enzima se obtiene de la papaya. Un enzima semejante es la bromelina que se obtiene de la piña tropical.

El proceso fundamental de la fabricación de la cerveza es la rotura del almidón para formar azúcares sencillos que luego serán fermentados por las levaduras esto es realizado por las amilasas presentes en la malta, que pueden añadirse de fuentes externas, aunque lo usual es lo contrario, que la actividad propia de la malta permita transformar aún más almidón del que contiene. Cuando esto es así, las industrias cerveceras añaden almidón de patata o de arroz para aprovechar al máximo la actividad enzimática. (Arias y Lastra, 2009)

1.5.3 Fabricación de zumos

La pulpa de las frutas hace que los zumos sean turbios y demasiado viscosos, produciéndose también ocasionalmente problemas en la extracción y en su eventual concentración. Esto se debe a la presencia de pectinas que pueden destruirse por la acción de enzimas presentes en el propio zumo o bien por enzimas añadidas obtenidas de fuentes externas. Esta destrucción requiere la actuación de varios enzimas, una de las cuales produce metanol, que es tóxico, aunque la cantidad producida no llegue a ser preocupante para la salud. (Arroyo, 2002)

Enzimas utilizadas en la fabricación de jugos de frutas:

La bromelina o la papaína se extraen del látex de la piña y de la papaya son utilizadas para la clarificación de los jugos, las enzimas se usan en estado líquido y tiene una duración mínima de seis meses estando refrigeración. (Badui, 2006)

La fumarasa que permiten la obtención industrial de edulcorantes alimentarios como el aspartamo, fructooligosacáridos, diversos dipéptidos, a partir de los zumos de frutas.

1.5.4 Refinado de azúcar

En el refinado de la azúcar la extracción de la sacarosa, a partir de la melaza de la remolacha azucarera puede complicarse por la presencia de rafinosa, un trisacárido que previene la cristalización. Para incrementar la recuperación del azúcar y mejorar el proceso, la rafinosa puede degradarse enzimáticamente. El resultado de esta degradación es doble; por un lado favorece la cristalización y por otro produce sacarosa como uno de los productos de la hidrólisis. (Badui, 2006)

1.5.5 Otras aplicaciones

Los enzimas se utilizan en la industria alimentaria de muchas otras formas, en aplicaciones menos importantes que las citadas anteriormente. Por ejemplo en la fabricación de productos derivados de huevos, las trazas de glucosa presentes, que podrían oscurecerlos, se eliminan con la acción combinada de dos enzimas, la glucosa-oxidasa y la catalasa.

Por otra parte, la papaína y bromelaína, enzimas que rompen las proteínas, se pueden utilizar, fundamentalmente durante el cocinado doméstico, para ablandar la carne. Algunas enzimas, como la lactoperoxidasa, podrían utilizarse en la conservación de productos lácteos. (Arias y Lastra, 2009)

CAPÍTULO II

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO

Introducción

En este capítulo se abordarán todos los conceptos relacionados con las características generales y aspectos botánicos de las especies en estudio. Además, se describe morfológicamente a las especies utilizadas para la elaboración de jugos y los beneficios de los jugos de frutas.

2.1 Caricáceas: Generalidades y distribución de las especies de Caricáceas en el Ecuador

Características Generales

Ecuador y Colombia son los centros de origen de la mayoría de las especies de Caricáceas. En Colombia las papayuelas de altura se encuentran como árboles individuales o en pequeños grupos del campesinado. Sin embargo, en Chile, son una fuente importante de exportación. (Caetano, et al., 2008)

El sur del Ecuador está considerado como centro de biodiversidad de los papayas de montaña, especies andinas del recién rehabilitado género *Vasconcella*, familia Caricaceae. Estas especies de *Vasconcella* crecen en su mayor parte en estado silvestre, sobre 1000 msnm., e incluyen a *Vasconcella cundinamarcensi*, *V. stipulata*, *V. × heilbornii*, *V. candicans*, *V. weberbaueri*, *V. monoica*, *V. microcarpa*, *V. parviflora* y la nueva especie endémica *V. palandensis* (Scheldeman et al., 2003)

El género *Vasconcellea* tiene su origen en Sudamérica a diferencia de la papaya que según reportes se originó en Centroamérica. Las especies más conocidas y comercializadas incluyen al babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. *pentagona*) y en menor grado papayuela (*V. pubescens*) conocida como papaya chilena. Estas especies tienen un buen grado de comercialización y constituyen una alternativa de agronegocio para la región. Desafortunadamente la mayoría de especies se encuentran en estado silvestre y amenazado por un alto grado de erosión genética. (Morales, et al., 2004)

A continuación se describen las características morfológicas generales de las caricáceas presentes en Ecuador.

Aspecto	Árboles o arbustos con tallos blandos, poseen látex lechoso; dioicos, raro monoicos.
Hojas	Alternas, grandes, palmadas, largamente pecioladas, sin estípulas.
Flores	Solitarias, o en cimas, imperfectas, raro perfectas, hipóginas.
Perianto	Cáliz, 5 sépalos soldados; corola, 5 pétalos libres o soldados.
Androceo	Estambres, 5-10 libres, soldados a los pétalos.
Gineceo	Ovario súpero, carpelos, 5 soldados, óvulos ∞ , parietales. Estilo corto con 5 estigmas.
Fruto	Baya.
Semillas	Endosperma oleoso, embrión recto.

Tabla 4: Características morfológicas de las Caricáceas presentes en Ecuador (Morales, et al., 2004)

2.2 Aspectos botánicos relevantes en la diferenciación de especies del género Caricácea.

2.2.1 *Ficus carica* L. (Higo) características generales



Figura 1: *Ficus carica* L. (Higo)

Si bien la historia antigua de los higos se centra en torno a la región mediterránea, y es más cultivado en climas templados-suaves, tiene su lugar en la horticultura tropical y subtropical. Identificados botánicamente como *Ficus carica* L. (Familia *Moraceae*), es único en un género que abarca quizás más de 1,000 especies, en su mayoría gigantes "árboles de caucho", y preferentemente tropicales. Es casi universalmente conocido en Inglés simplemente como *fig*, *common fig*, o *edible fig*. El nombre es muy similar en francés (*Figue*), en alemán (*Feige*), en italiano y portugués (*figo*). En español, es *higo* o *brevo*. Los haitianos le dan el nombre, *figue France*, para distinguirla de los pequeños plátanos secos llamados "figs". (De la Torre et al, 2008)

2.2.1.1 Aplicaciones de los productos derivados del higo

- Alimenticio: El futo maduro y las semillas son comestibles, se usan para preparar dulces y coladas.
- Medicinal: El fruto es utilizado para tratar la irritación del hígado. La infusión de las hojas se bebe como purgante, incrementa la fertilidad de la mujer, también trata problemas de las vías respiratorias y el dolor del estómago.

Las ramas son usadas para tratar afecciones al útero e inflamaciones de los ovarios. Las hojas, en infusión, se usan en baños. (De la Torre *et al*, 2008)

2.2.1.2 Enzimas de *Ficus carica*

La ficina, enzima mayoritaria de *F. carica* es una enzima perteneciente al grupo de las hidrolasas. Esta enzima actúa sobre enlace peptídicos y es de naturaleza de cisteína-endopeptinasa. Se encuentra en el látex del fruto verde del higo. El uso de esta enzima evita la turbidez durante la conservación de ciertos productos. (Badui, 2006).

La ficina tiene hidrólisis preferencial por los aminoácidos aromáticos. Tiene un pH óptimo de 5-8 que varía de acuerdo al sustrato. La temperatura óptima esta alrededor de los 60°C, inactivándose completamente a los 80°C. (Carrera, 2003)

2.2.2 *Vasconcellea pubescens* (Chamburo)



Figura 2. *Vasconcellea pubescens* (Chamburo)

Esta especie se encuentra distribuida desde Panamá hasta Chile; de carne firme y fragancia penetrante agradable, con contenido medio de papaína. Puede consumirse fresca y cocida como dulces y mermeladas, se propaga

por semillas, es tolerante a nemátodos y resistente al virus del anillado, constituyéndose en fuente potencial de genes transferibles a la papaya. La planta alcanza hasta 10 m de altura, se distingue de la papaya principalmente por la forma de las hojas y flores, el fruto es amarillo de 5 a 20 cm de longitud. (De la Torre *et al*, 2008)

2.2.2.1 Aplicaciones de los productos derivados del Chamburo

- Alimenticio: El fruto es comestible, se usa para preparar dulces, frescos y bebidas.
- Medicinal: El látex se usa, en combinación con otras hierbas para el tratamiento de algún tipo de cáncer. (De la Torre *et al*, 2008)

2.2.3 *Vasconcellea* sp (Siglalón)



Figura 3. *Vasconcellea* sp (Siglalón)

Esta especie se encuentra en alturas de 1600 a 2500 m.s.n.m., su fruto es amarillo con 10 - 11 lados, con aroma fuerte y agradable; en la mayoría de los casos se consume procesada como dulces o mermeladas; los frutos inmaduros son ricos en papaína. Se considera, junto con *V. pubescens* la especie más relacionada con *C. papaya*; ambos podrían aportar genes

importantes para la solución de problemas agronómicos, patológicos o de calidad en la papaya. (De la Torre *et al*, 2008).

2.2.3.1 Aplicaciones de los productos derivados del Siglalón

- Alimenticio: El mesocarpo del fruto es comestible, se usa para preparar dulce.
- Alimento de vertebrados: El fruto es alimento de loras. (De la Torre *et al*, 2008)

2.2.4 *Vasconcellea X heilbornii* (Babaco)



Figura 4. *Vasconcellea X heilbornii* (Babaco)

Esta especie es un híbrido natural entre *V. pubescens* y *V. stipulata*, es la papayuela de mayor difusión comercial, especialmente en Ecuador y sur de Colombia, introducida a Nueva Zelanda, Australia, Israel, Italia, California, Grecia y Brasil. Su fruto apomíctico, similar a una papaya de cinco lados, es de muy buen sabor al madurar, especialmente si se consume como jugo; tiene excelentes perspectivas de mercado; hasta el momento se reconocen pocos cultivares de Babaco y, esas selecciones han sido poco difundidas. (De la Torre *et al*, 2008)

2.2.4.1 Aplicaciones de los productos derivados del Babaco

- Alimenticio: El mesocarpo del fruto es comestible, se usa para preparar dulces, mermeladas, jugos y bebidas. (De la Torre *et al*, 2008)

2.3 Especies utilizadas para elaboración de jugos

2.3.1 Naranjilla

La naranjilla es originaria de la región Interandina específicamente del Sur de Colombia, Ecuador y Perú, prospera mejor en los valles andinos húmedos comprendidos, entre los 1200 y 2100 m. s. n. m. . Los principales productores mundiales de esta fruta exótica son en orden de importancia por volumen esta Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela y existen cultivos en menor escala en Panamá, Costa Rica y Guatemala. (Urbina, 2008).

En el Ecuador las principales zonas de producción de esta especie se encuentran distribuidas desde la frontera de Colombia, hasta el Sur de la provincia de Loja. Las principales zonas de producción, están en las provincias de Morona Santiago, Pastaza, Tungurahua, Pichincha, Imbabura, y en menor escala en la provincia Bolívar. Los híbridos mayormente cultivados son Híbrido Puyo e Híbrido Mera. En variedades las más importantes son: Baeza, Septentrional, Bola, Común, y Baeza Roja. (Urbina, 2008).

A continuación se describen las características morfológicas de la especie.

Raíz	Es pivotante, fibrosa y superficial, penetra en el suelo a una profundidad de 40 a 50 cm y presenta desarrollo de raíces laterales
Tallo	Es un arbusto leñoso cilíndrico, es verde cuando esta joven luego se vuelve leñoso y de color café en la madurez. Dependiendo de la variedad presenta o no espinas, las ramas alcanzan un diámetro de unos 5 cm., son fibrosos y resistentes con vellosidades que dan la apariencia de terciopelo, las cuales se pierden al llegar la madurez.
Hojas	Son palmeadas, alternas y forman un ángulo de inserción hacia abajo, para captar mejor la fotosíntesis de forma oblonga, ovalada, las nervaduras son prominentes de color morado cuando están jóvenes y se tornan de color café o amarillo pálido al llegar al estado adulto. Las hojas son grandes pueden alcanzar hasta 50 cm de largo y 35 cm. de ancho el tamaño depende del sombrero al cual están sometidas las hojas.
Flores	Las flores son hermafroditas agrupadas en inflorescencias, cima escorpoide tipo de drepaño y la inflorescencia indefinida en que los pedúnculos son de longitudes desiguales y terminan casi todas en un mismo plano.
Frutos	La corteza es de color amarillo intenso o naranja, cuando alcanza su madurez, la pulpa es de color verde oscuro lleno de semillas el tamaño del fruto puede llegar a 8 cm. de diámetro con un peso entre 80 – 100 g.
Semillas	Son pequeñas en forma de lenteja de color amarillo pálido y/o color crema, el promedio de semillas por fruto de 990 lo cual significa un peso de 22 g ósea 2.2 miligramos por semilla.

Tabla 5: Características morfológicas de la especie de Naranjilla. (Urbina, 2008)

2.3.2 Manzana (*Pirus malus L.*)

La manzana *Pirus malus L.*, pertenece a la familia rosácea; esta familia incluye más de 200 especies de plantas arbustivas y herbáceas, distribuidas generalmente en las regiones templadas alrededor del mundo (Recalde,2010)

A continuación se describen las características morfológicas de la especie.

Raíz	Raíz superficial, menos ramificada que en peral.
Tallo	Tronco derecho que normalmente alcanza de 2 a 2,5 m. de altura, con corteza cubierta de lenticelas, lisa, adherida, de color ceniciento verdoso sobre los ramos y escamosa y gris parda sobre las partes viejas del árbol. Tiene una vida de unos 60-80 años. Las ramas se insertan en ángulo abierto sobre el tallo, de color verde oscuro, a veces tendiendo a negruzco o violáceo. Los brotes jóvenes terminan con frecuencia en una espina.
Hojas	Son ovales, cortamente acuminadas, aserradas, con dientes obtusos, blandas, con el haz verde claro y tomentosas, de doble longitud que el pecíolo, con 4-8 nervios alternados y bien desarrollados.
Flores	Son grandes, casi sentadas o cortamente pedunculadas, que se abren unos días antes que las hojas. Son hermafroditas, de color rosa pálido, a veces blanco y en número de 3-6 unidas en corimbo.
Floración	Tiene lugar en primavera, generalmente por abril o mayo, las manzanas más precoces maduran en junio, aunque existen razas que mantienen el fruto durante la mayor parte del invierno e incluso se llegan a recoger en marzo o abril.
Fruto	Es globoso, con pedúnculo corto y numerosas semillas de color pardo o amarillo brillante.

Tabla 6: Características morfológicas de la especie de Manzana. (Recalde, 2010)

2.4 Jugos Naturales

En la actualidad, la importancia que poseen los jugos de frutas dentro del mercado mundial de alimentos a incrementado notablemente, además, nuestro país tiene una alta disponibilidad de materia prima para la obtención de jugos de manzana, naranjilla, naranja, tomate de árbol etc. La elaboración de jugos permite el aprovechamiento de frutas que no satisfacen las exigencias del mercado en fresco, pero cuyos defectos menores no son impedimento para que se les empleen en la obtención de este tipo de producto. (Moyano *et al*, 2001)

En la actualidad se comercializan los jugos de frutas bajo cuatro modalidades:

- Jugo Natural Integral (o pulposo)
- Jugo Natural Clarificado
- Jugo Concentrado Integral (o pulposo)
- Jugo Concentrado Clarificado

La importancia relativa de cada uno de estos jugos está dada en función de la preferencia particular de cada mercado. Tanto uno como el otro presentan ventajas y desventajas comparativas. El jugo integral posee el inconveniente de que con el transcurso del tiempo aparece un pequeño sedimento de pulpa lo que puede crear en el consumidor la idea de que el jugo está alterado o es de baja calidad mientras que en los clarificados ello no ocurre.

Por otra parte el jugo clarificado tiene el inconveniente de carecer de "cuerpo" y sus propiedades organolépticas difieren del jugo de frutas recién obtenido por la ausencia de la pulpa en suspensión, la cual le imparte, además del cuerpo, un grado especial de palatabilidad. A su vez la ausencia de turbidez (pulpa en suspensión) puede llevar a pensar al consumidor que los mismos son elaborados a base de esencias y que no se trata de jugos naturales. (Moyano *et al*, 2001)

2.4.1 Jugo de manzana.

El concentrado, libre de pulpa, se extrae directamente de la fruta para conservar su pureza luego de un cuidadoso proceso de filtración. Para los entrenadores deportivos la manzana es una poderosa y extraordinaria fuente de energía. De allí que este jugo 100% clarificado sea recomendable para quienes, luego de disfrutar del ejercicio buscan la manera natural de recuperar energía con un producto que les asegure la hidratación, y sin preservativos. (Moyano *et al*, 2001)

2.4.2 Jugo de naranjilla (lulo).

La elaboración del jugo de naranjilla es un proceso sencillo donde se extrae directamente la pulpa para conservar sus características y luego se procede a un proceso de filtración. El jugo de lulo es una excelente opción si quiere eliminar las toxinas presentes en su organismo. Además, esta fruta facilita la eliminación del ácido úrico y es rica en Vitamina C. (Vasco, 2008)

2.4.3 Beneficios de los jugos de frutas

- Su alto contenido de hierro le confiere propiedades diuréticas y tonificantes para el organismo.
- Cuando se consume a diario, ayuda a conciliar el sueño.
- Alivia los síntomas de enfermedades nerviosas.
- Por ser una fuente importante de fósforo y vitamina A, colabora en la formación de cabello, uñas, y huesos fuertes.
- El ácido que contiene puede disminuir en forma discreta los niveles altos de colesterol malo. (Vasco, 2008)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Introducción

En el siguiente capítulo se describirá la metodología experimental utilizada en el desarrollo del presente trabajo de investigación. Los métodos incluyen: selección y preparación de los materiales vegetales, obtención de los diferentes látex, estandarización del ensayo para la determinación de actividad enzimática, preparación de los jugos naturales y diseño de mezclas para optimizar la mezcla con mejor potencial clarificante de jugos.

3.1 Obtención y preparación de material vegetal

Los diferentes materiales vegetales utilizados para el desarrollo experimental del presente estudio fueron adquiridos en los diferentes cantones de la provincia del Azuay. Se utilizaron tres especies de Caricáceas y *Ficus carica* L. En Bulán (Paute) y Girón se adquirieron tres especies de Caricáceas; *Vasconcellea X heilbornii* (Babaco), *Vasconcellea sp* (Siglalón) y *Vasconcella pubescens* (Chamburo). *Ficus carica* (Higo) fue adquirido en mercados locales de Cuenca.

Previa su utilización, el material vegetal fue lavado, secado y seccionado por la mitad. Para las pruebas de actividad enzimática se utilizó pulpa y látex de las especies incluidas en el estudio. Para la obtención de pulpa se removieron las semillas y las fibras. Posteriormente, la pulpa fue licuada hasta obtener una pasta homogénea.



Figura 5. Látex de los frutos en estudio

El látex fue colectado de las diferentes especies en estudio mediante cortes longitudinales en el fruto no cosechado usando un cuchillo de acero inoxidable. El látex fue colectado en recipientes colocados alrededor del fruto. El material fue transferido a envases de vidrio y almacenado a -20°C .

3.2 Estandarización del ensayo para determinar la actividad proteolítica

Para la determinación de la actividad proteolítica en las diferentes especies de estudio se evaluaron dos técnicas, las cuales se describen a continuación:

3.2.1 Determinación de la Actividad Proteolítica según Rocha *et al* (2010)

La presente técnica se obtuvo del trabajo de Rocha *et al*, (2010); donde se presenta la caracterización cinética y fisicoquímica de una proteína aspártica aislada de frutos de *Salpichoria organifolia*. El método descrito utiliza como materia de ensayo frutos triturados con etanol a -8°C . El precipitado obtenido se resuspende en buffer fosfato 50mM de pH 7 (a 4°C), estandarizando el extracto al 15% p/V. La determinación de la actividad enzimática se realiza utilizando como sustrato protéico hemoglobina al 2% (p/V).

Para realizar el ensayo, se incubaron 200µL del extracto crudo con 4µL de una solución de CaCl₂ (1M) a 40°C. Después de un lapso de 5 minutos se agregaron 200µL de solución de hemoglobina desnaturalizada al 2% (p/V) (pH 3.50). Se procedió a incubar por un tiempo de 10 minutos para posteriormente detener la reacción con la adición de 700µL de TCA al 5% (p/V). Se conservó en reposo por 20 minutos en baño de hielo. Por último se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos. Para leer la absorbancia se utilizó 5mL del sobrenadante con adición de 0.3mL de reactivo de Folin a 750nm en un espectrofotómetro UV-VIS.

3.2.2 Determinación de la actividad proteolítica de pulpa de frutos

La actividad proteolítica de frutos fue realizada según la técnica descrita por Arnon R. (1970). A continuación se describen los requerimientos de material, preparación de reactivos y muestras y el desarrollo del ensayo.

3.2.2.1 Materiales y reactivos

Reactivos	Materiales
L-cisteína, SIGMA, C-4424	Cubetas para
Tris Ultra Puro, Invitrogen. Cat No 15504-020	espectrofotómetro, desechables.
Caseína, SIGMA C-7920	Tubos Falcon de 50 y 15 mL
EDTA, sal disódica. J.T.Baker. CAS No 6381-92-6	Puntas desechables de 0,1 y 1 mL
Papaína de <i>Carica papaya</i> , Fluka, 76222	Fundas resellables
NaOH 1 N	Vórtex
HCl 0,1 N	Centrífuga 1-14000rpm
Latex de frutos.	Baño María
	Espectrofotómetro UV-VIS

3.2.2.2 Preparación de reactivos:

- Buffer Tris – HCL 50 mM pH 8: Adicionar 0,6057 g a 100 ml de agua destilada. Agitar por 3 a 5 minutos hasta disolver completamente. Ajuste el pH con HCl 1,0 M hasta pH 8,0. Almacene en frascos de vidrio a temperatura ambiente. No es necesario prepararla en fresco.
- 20mM EDTA 50mM cisteína, pH8: Adicionar 0,0606g de cisteína y 0,0744g de EDTA (sal disodica) a 10ml de agua destilada y agitar hasta disolver. Ajustar a pH 8 con NaOH 1N. Preparar en fresco.
- TCA 5% (V/V): Adicionar 24,30 g de TCA a 300 ml de agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente. No es necesario prepararlo en fresco.
- Solución de caseína 1%: Adicionar 1g de caseína a 100 ml de buffer tris – HCl. Colocar la botella de vidrio en agua hirviendo por 15 minutos y luego utilizar una barra agitadora hasta disolver. Esta solución es estable por una semana si se conserva en refrigerador.
- Solución de papaína (0,20 mg/ml): Adicionar 0,01g de papaína a 50 ml de buffer, colocar en un vaso pequeño y mezclar la solución con una barra agitadora. Preparar en fresco.



Figura 6. Reactivos

3.2.2.3 Preparación de las muestras

Se procedió a dividir la fruta disponible en 3 – 4 réplicas. Se lavó, secó y cortó por la mitad el materia vegetal, y se extrajeron las semillas y las fibras. Posteriormente se licuó la pulpa hasta obtener un puré homogéneo. La pulpa fue almacenada a -20°C, en fundas resellables, previo su registro de grados brix y pH. Para la preparación del ensayo, la pulpa fue descongelada a temperatura ambiente.

Se preparó una dilución de la pulpa con buffer Tris (ver 3.2.2.2). La concentración se ajustó en función del grado de madurez de los frutos (40% para pulpa madura y 30% para pulpa verde). Posteriormente, se procedió a agitar la muestra a alta velocidad por pocos segundos utilizando un vórtex, evitando la formación de espuma. Previo al ensayo, las muestras fueron mantenidas en baño de hielo.

3.2.2.4 Desarrollo de la curva de calibración para actividad proteolítica

A continuación se especifican los pasos a seguir para el desarrollo de la curva de calibración para la determinación de actividad proteolítica en pulpa de frutos.

Preparación de soluciones estándar de papaína

Para el desarrollo de la curva de calibración con soluciones estándar de papaína se sigue el esquema presentado a continuación:

Tubo No	Solución de papaína (mL)	EDTA-Cisteína (mL)	Buffer Tris (mL)	Volumen Final(mL)
1	0	0.2	2.0	2.2
2	0.1	0.2	1.9	2.2
3	0.4	0.2	1.6	2.2
4	0.8	0.2	1.2	2.2
5	1.2	0.2	0.8	2.2
6	1.6	0.2	0.4	2.2
7	2.0	0.2	0	2.2
Blanco	0	0.2	0	0.2

Desarrollo de la reacción enzimática para las soluciones estándar de papaína.

Para el desarrollo de la reacción enzimática se siguen los siguientes pasos:

- Incubar los tubos falcon con las soluciones estándar a 37 °C en baño María por 5 minutos. Incubar el frasco con solución caseína al 1% (aprox. 100 mL) en baño María.
- Iniciar la reacción con la adición de 1 ml de caseína al 1% a cada tubo en el baño María. Esta adición debe realizarse en intervalos regulares, para finalizar la reacción enzimática en 10 minutos. En nuestro ensayo se utilizaron intervalos de 1' 15".



Figura 7. Adición de caseína a los tubos

- La reacción se detiene cuando se alcanza el tiempo final de 10 min. con la adición de 3 mL de Ácido Tricloroacético al 5% (v/v).
- A continuación, se presenta el esquema referente a los tiempos utilizados para el desarrollo de la reacción enzimática en los tubos y el blanco.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	Blanco
Tiempo adición Caseína	0	1'15	2'30	3'45	5'00	6'15	7'30	8'45
STOP TCA	0	1'15	2'30	3'45	5'00	6'15	7'30	8'45

- Posterior a la adición de TCA, colocar 0.1 mL de solución de papaína al blanco. Los tubos se dejan reposar a temperatura ambiente por 40 minutos.
- Los tubos son centrifugados a 5000 rpm de 5 a 10 minutos o hasta separar totalmente el sobrenadante.



Figura 8. Centrifugación de los tubos

- La absorbancia de los tubos se registra en un espectrofotómetro, ajustado a una $\lambda = 275$ nm.



Figura 9. Lecturas registradas en el espectrofotómetro.

3.2.2.5 Determinación de actividad enzimática en muestras vegetales (látex y frutos)

A continuación se especifican los pasos a seguir para el desarrollo de la determinación de actividad proteolítica en pulpa y látex de frutos. Las muestras se preparan según lo descrito en 3.2.2.3.

- Se tomaron 0.1 mL de las soluciones de trabajo (látex o pulpa) y se sometieron a reacción enzimática, adicionando los reactivos que se listan en el procedimiento para el desarrollo de la curva estándar, en las siguientes proporciones:

Tubos	Solución de trabajo	EDTA-cisteína	Buffer Tris	Volumen final
Muestra	0.1 mL	0.2 mL	0.7 mL	1.0 mL
Blanco	0.1 mL	0.2 mL	0 mL	0.3 mL

Se desarrolla la reacción enzimática adicionando caseína según esquema presentado en 3.2.2.4. La reacción finaliza con la adición de TCA. La actividad proteolítica se mide en espectrofotómetro UV-VIS a $\lambda = 275$ nm. Los resultados obtenidos se interpolan en la curva de calibración obtenida según se describió previamente. La actividad proteolítica se expresa según la escala desarrollada en la curva de calibración.

3.3 Obtención industrial de jugos de frutas

La obtención de jugos de frutas naturales se realizó según procedimientos estandarizados. A continuación se describen los requerimientos de material, preparación de los jugos y el desarrollo del ensayo.

3.3.1 Materiales y reactivos

Elaboración de jugos de frutas	
Reactivos	Materiales
Frutas: Manzana y Naranja Azúcar Ácido Cítrico Benzoato de sodio Agua	Frascos de vidrio de 250 mL Hornilla Fluidificador 1.25 Lt Termómetro Cernidor/ Gasa Cucharas Ollas
Estandarización de acidez y contenido de azúcares	
Reactivos	Materiales
NaOH 0,1 N Fenolftaleína	Brixometro 0-60° Bureta 25 mL Pinzas Vasos de 100 mL Pipeta 10 mL

Posteriormente se procedió a medir grados Brix y Acidez para cada jugo. Con esta información se realizaron los cálculos respectivos para ajustar el nivel de azúcar y acidez a los siguientes parámetros (Norma INEN N° 436 : 2008 y N° 2337 : 2008):

- Jugo de Naranja Bx 25 ° y Acidez 0.5 %
- Jugo de Manzana Bx 26 ° y Acidez 0.4 %

Después se procedió a medir las cantidades calculadas de azúcar, agua y ácido y se dosificaron en cada jugo respectivamente. Consecutivamente se pausterizó cada jugo a 72 °C por un tiempo de 12 segundos. Enseguida se dosificó el conservante Benzoato de sodio 80 mg/L y se envasaron los jugos en frascos de 250 mL. Por último se dejó enfriar al ambiente y posteriormente en refrigeración. (Código E)

3.4 Diseño de mezclas para evaluación de actividad proteolítica de mezclas de látex

Para evaluar el potencial del látex de las especies en estudio, se realizó un diseño de mezclas con el fin de obtener un producto compuesto con las sustancias en estudio, que permita clarificar jugos naturales. Se utilizó un diseño Simplex Aumentado, cuyo esquema se presenta a continuación:

DISEÑO DE MEZCLAS SIMPLEX AUMENTADO										
X1	1	0	0	1/2	1/2	0	1/3	1/6	1/6	2/3
X2	0	1	0	1/2	0	1/2	1/3	1/6	2/3	1/6
X3	0	0	1	0	1/2	1/2	1/3	2/3	1/6	1/6

Tabla 7: Diseño de Mezclas Simplex Aumentado (Lundstedt et al, 1998). X1: Látex de *Ficus carica* (Higo); X2: Látex de *Vasconcella pubescens* (Chamburo) y X3: Látex de *Vasconcella X heilbornii* (Babaco)

3.5 Análisis sensorial

Los jugos preparados y que presenten el mejor atributo de apariencia mediante el proceso de clarificación fueron sometidos a un análisis sensorial mediante encuestas de aceptación ante un panel de catadores no entrenados. La catación se realizó con 37 estudiantes del Octavo Ciclo del Colegio “Asunción”. Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante herramientas de estadística descriptiva mediante el uso del software SPSS (versión 11.5).

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Actividad Proteolítica de látex y pulpa de especies vegetales

4.1.1 Desarrollo de la curva de calibración

Para el desarrollo de la Curva de Calibración se construyó una matriz de datos en base a las lecturas de absorbancia registradas para la reacción enzimática desarrollada con soluciones de papaína, a 275 nm La relación entre la concentración y la absorbancia se reporta a continuación:

CURVA DE CALIBRACIÓN	
Concentración papaína (mg)	Absorbancia
0,02	0,02
0,16	0,028
0,24	0,036
0,32	0,038
0,4	0,039

Tabla 8: Resultados de las lecturas de la Curva de calibración

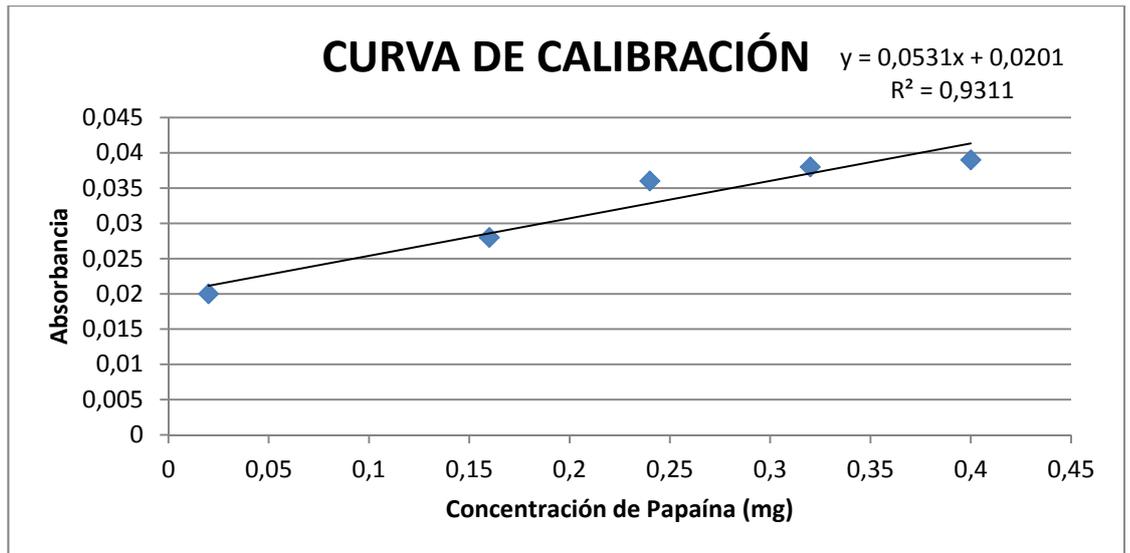


Figura 10. Curva de calibración

4.2 Determinación de actividad proteolítica en muestras vegetales

Para la determinación de actividad proteolítica en frutos y látex se construyó una matriz de datos en base a la ecuación obtenida de la curva de calibración (figura 10). El resultado de la absorbancia ($\lambda=275$ nm) permitió estimar la actividad proteolítica de las muestras en estudio. Los resultados se muestran a continuación:

Muestra	Absorbancia (nm)	Actividad Proteolítica
1 a	0,034	0,262
1 b	0	-0,379
2 a	0,101	1,524
2 b	0,536	9,716
3 a	0,101	1,524
3 b	0,14	2,258
4	0,035	0,281

Tabla 9: Determinación de la Actividad Proteolítica en muestras de frutos.

1: *Vasconcellea X heilbornii* (Babaco), a: verde b: maduro; 2: *Vasconcellea sp* (Siglalón), a: verde, b: maduro; 3: *Vasconcellea pubescens* (Chamburo), a: verde, b: maduro y 4: *Ficus carica* (Higo).

Muestra	Absorbancia (nm)	Actividad Proteolítica
1	0,1	1,505
2	0,098	1,467
3	0,095	1,411
4	0,102	1,542

Tabla 10: Determinación de la Actividad Proteolítica en muestras de látex. Descripción.- 1: *Vasconcellea X heilbornii* (Babaco), 2: *Vasconcellea sp* (Siglalón) 3: *Vasconcella pubescens* (Chamburo) y 4: *Ficus carica* (Higo).

4.3 Aplicación de Diseño de Mezclas para Clarificación de jugos

Con el fin de obtener la concentración óptima de papaína y de látex, aplicable a la clarificación de jugos, se desarrolló una estrategia con herramientas de diseño experimental. Se realizó una exploración de la concentración de látex de cada fruto, a concentraciones de 0.2%, 0.5% y 1%. El tiempo de clarificación se ensayó a niveles de: 12h, 24h y 36h.

De estas pruebas se determinó las condiciones adecuadas de fermentación: concentración 0,2% (v/v) y tiempo 24h. Para el desarrollo del diseño de mezclas para la clarificación de los jugos de manzana y naranjilla, se seleccionaron los tres látex que presentaron mejores características clarificantes de acuerdo al porcentaje de transmitancia medido en un espectrofotómetro UV ($\lambda = 420$ nm). Los resultados se presentan en el Tabla 11.

Tabla 11: Resultados de las lecturas de transmitancia. Descripción.- 1: *Vasconcellea X heilbornii* (Babaco), 2: *Vasconcellea sp* (Siglalón) 3: *Vasconcella pubescens* (Chamburo) y 4: *Ficus carica* (Higo).

Látex	Porcentaje de Transmitancia	
	Sin Centrifugar	Centrifugado
1	1,2	2,4
2	1,0	1,8
3	1,2	2,5
4	1,1	2,2

Las mezclas de látex formuladas en el laboratorio se prepararon pesando cantidades de látex de higo, chamburo y babaco; según el esquema adjunto.

Experimento	<i>Ficus Carica</i> (Higo)	<i>Vasconcella pubescens</i> (Chamburo)	<i>Vasconcellea X heilbornii</i> (Babaco)
1	450	0	0
2	0	450	0
3	0	0	450
4	225	225	0
5	225	0	225
6	0	225	225
7	150	150	150
8	75	75	300
9	75	300	75
10	300	75	75

Tabla 12: Diseño de mezclas para pruebas de actividad proteolítica

A continuación se muestra los resultados en porcentaje de transmitancia del diseño de mezclas en los jugos:

Mezclas	Porcentaje de Transmitancia	
	Muestra sin centrifugar	Muestra centrifugada
4	7,8	18,3
5	7,7	17,7
6	7,8	17,2
7	7,1	19,9
8	5,4	12,3
9	5,4	16,3
10	7,9	18,1

Tabla 13: Actividad proteolítica de mezclas en el jugo de naranjilla

Mezclas	Porcentaje de Transmitancia	
	Muestra sin centrifugar	Muestra centrifugada
4	5,2	9,4
5	5,7	9,8
6	5,5	9,1
7	5,3	8,5
8	5,8	9,1
9	5,4	8,3
10	5,3	8,6

Tabla 14: Actividad proteolítica de mezclas en el jugo de manzana

4.4 Mezclas de látex de frutos con potencial clarificante de jugos

Según la evaluación experimental, las mezclas que presentaron mejores resultados en la clarificación de jugos fueron las siguientes:

Sustrato	Mezcla	Formulación		
		<i>Ficus Carica</i> (Higo)	<i>Vasconcella pubescens</i> (Chamburo)	<i>Vasconcellea X heilbornii</i> (Babaco)
Jugo de Naranja	7	1/3	1/3	1/3
Jugo de Manzana	5	1/2	-	1/2

Tabla 15: Mezclas promisorias para la clarificación de jugos.

4.5 Análisis Sensorial

Para el desarrollo del Análisis Sensorial se prepararon jugos con el mejor atributo de apariencia mediante el proceso de clarificación. Estos jugos fueron sometidos a un análisis sensorial mediante encuestas de aceptación ante un panel de 37 catadores no entrenados, 25 femeninos y 12 masculinos. Los resultados obtenidos fueron procesados mediante herramientas de estadística descriptiva con la ayuda del software SPSS (versión 11.5).

A continuación se muestran los porcentajes obtenidos en la aplicación de encuestas a los catadores.

Jugo de Naranja

Apreciación	Atributo			
	Sabor	Olor	Color	Textura
No me gusta	10,80	8,10	2,70	13,50
Ni me gusta ni me disgusta	29,70	51,40	35,10	43,20
Me gusta	59,50	40,50	62,20	43,20
Total	100	100	100	100

Tabla 16. Evaluación sensorial de jugo de naranja. Resultados expresados en porcentajes

Jugo de Manzana

Apreciación	Atributo			
	Sabor	Olor	Color	Textura
No me gusta	18,90	5,40	13,50	35,10
Ni me gusta ni me disgusta	18,90	40,50	51,40	35,10
Me gusta	62,20	54,10	35,10	27,90
Total	100	100	100	100

Tabla 17: Evaluación sensorial de jugo de manzana. Resultados expresados en porcentajes

CAPITULO V

DISCUSIÓN

5.1 Estandarización de método para la determinación de la actividad proteolítica en látex y pulpa de especies vegetales

Uno de los objetivos del presente trabajo de investigación fue estandarizar un método para cuantificar la actividad proteolítica de sustratos vegetales. Para el efecto se realizó una revisión bibliográfica y se desarrollaron pruebas de laboratorio, buscando adaptar las técnicas descritas en literatura a las condiciones experimentales.

Para el desarrollo del estudio de la actividad proteolítica de las especies en estudio se realizó la técnica de determinación actividad proteolítica según Rocha *et al* (2010); (ver 3.2.1), en la cual no se obtuvieron resultados aceptables, debido a que la técnica no rindió los resultados adecuados con las condiciones experimentales aplicadas.

Posteriormente se desarrolló la técnica descrita por Arnon (1970); (ver 3.2.2) con la cual se realizaron varios ensayos con todas las muestras en estudio, hasta estandarizar la técnica y obtener resultados confiables. La metodología estandarizada y presentada en este trabajo corresponde al método desarrollado por Arnón.

5.2 Análisis de la actividad proteolítica de extractos enzimáticos, y aplicación como clarificantes de jugos de frutas

El estudio de la actividad proteolítica de extractos enzimáticos y su aplicación como clarificantes de jugos permitió establecer el poder clarificante del látex de los frutos en estudio. La determinación experimental de actividad proteolítica permitió determinar que *Vasconcella pubescens* (Chamburo) tiene el mayor poder clarificante, en comparación con los frutos incluidos en estudio.

Con el fin de potenciar el efecto clarificante del látex de *V. pubescens* se desarrolló un estudio del efecto de mezclas de látex de *V. pubescens* y el látex de las especies con menor poder clarificante (ver Tabla 12). Los modelos desarrollados con jugo de naranjilla permitieron identificar a la mezcla de látex de: *Ficus carica*, *V. pubescens* y *Vasconcella X heilbornii* (1/3;1/3;1/3) cómo la más promisorio por su poder clarificante y además para el jugo de manzana se identificó como mejor mezcla de látex: *Ficus carica* y *Vasconcella X heilbornii* (1/2;1/2) (ver Tabla 15).

Se hicieron pruebas en de clarificación en muestras de jugos de naranjilla y manzana. La adición del látex de las mezclas bioactivas, en un porcentaje de 0,2%, permitió alcanzar niveles de transmitancia de 19,90% en jugo de naranjilla y 9,80% en jugo de manzana. Según los resultados obtenidos por Aguirre y Castillo (2009) se demostró que la enzima papaína, extraída de toronche (*Vasconcella stipulata*) permite la clarificación de un hectolitro de cerveza comercial con 11 gramos de la enzima papaína obtenida del fruto. Estos resultados nos permiten establecer el potencial de las Caricáceas originarias de la sierra ecuatoriana en la industria de bebidas.

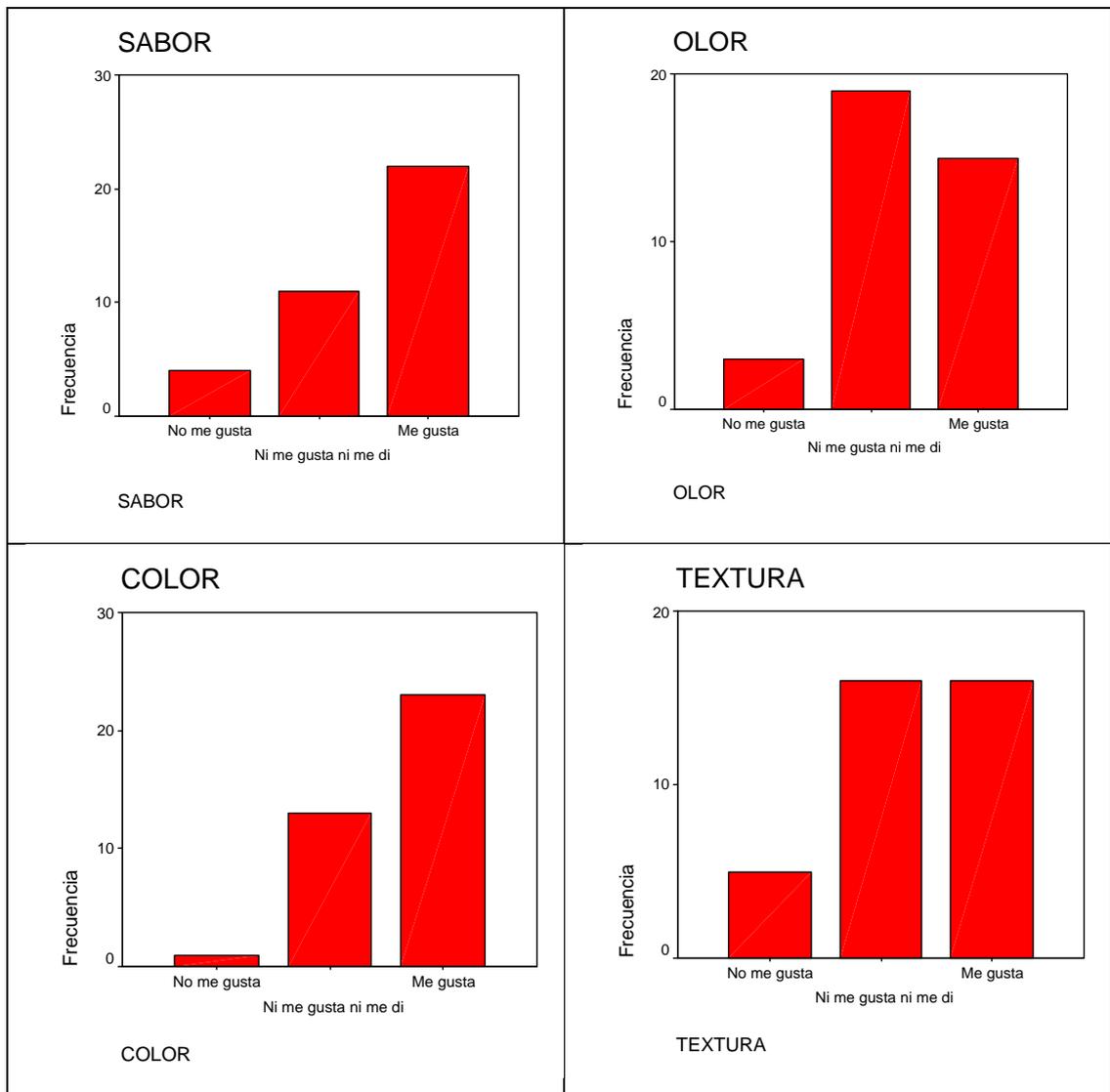
Existen pocos estudios realizados sobre la aplicación de la enzima papaína y ficina en la industria de bebidas como clarificante. Los datos publicados indican diferentes aplicaciones en la industria alimenticia, como la tenderización de carnes. Según Ramirez *et al* (2006) en sus resultados se

demuestra que la enzima papaína, extraída del latex de la papaya, tuvo mayor actividad proteolítica en comparación con otros ablandadores comerciales. Los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo experimental señalan a las especies incluidas en el estudio como fuentes de enzimas con gran potencial como clarificantes de jugos.

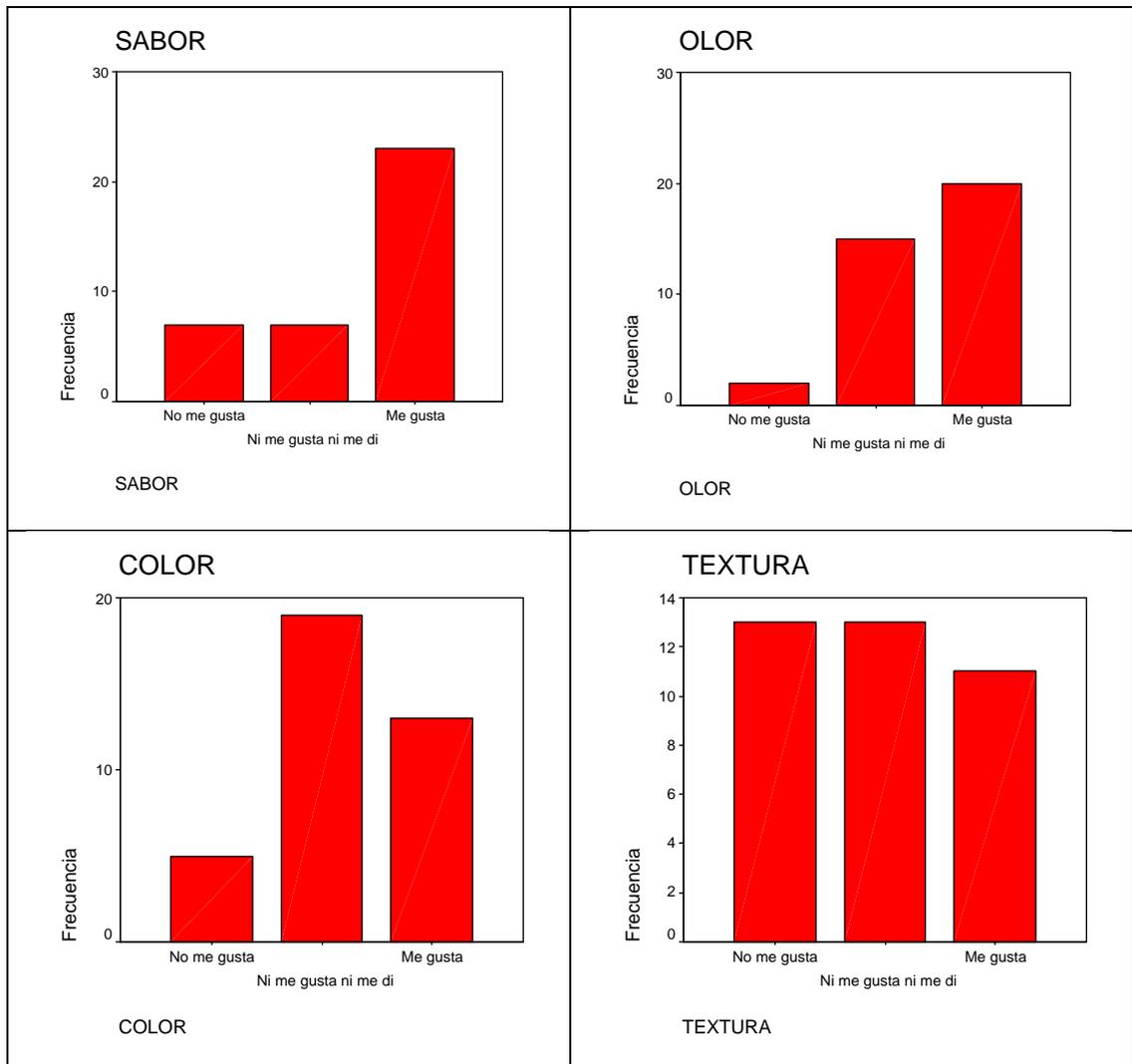
5.3 Estudio de la aceptación de los jugos clarificados mediante un análisis sensorial con un panel no entrenado

El presente estudio se realizó con estudiantes del Octavo Año del Colegio “La Asunción. La finalidad de este trabajo fue evaluar la aceptación de los jugos clarificados con la utilización de enzimas naturales. El grupo de catadores estuvo constituido por 12 hombres y 25 mujeres, con edad promedio de 12 años. Este grupo fue escogido ya que en la actualidad se busca incentivar la alimentación sana en los jóvenes. De acuerdo a sus atributos, los resultados para el jugo de naranjilla se muestran a continuación en gráficos de barras según Tabla 16:

Figura 11. Resultados del análisis sensorial por atributos del jugo naranjilla.



Como se observa en los gráficos anteriores el jugo de naranjilla tuvo una buena aceptación, debido a que se evidencia una buena aceptación por el panel de catadores. Los resultados referentes a la aceptación del jugo de manzana, presentados en Tabla 17, se presentan a continuación, mediante gráficos de barras, con el fin de visualizar el nivel de aceptación por atributos.

Figura 12. Resultados del análisis sensorial por atributos del jugo manzana

La textura y color tuvieron menor aceptación en este producto, debido a que la adición de látex al producto favoreció la aglutinación y desarrolló grumos. La adición de látex no influyó en el olor y sabor del jugo. Como se aprecia en los gráficos, éstos son los atributos que registran mejor aceptación en los catadores.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El desarrollo de la presente investigación condujo a las siguientes conclusiones y recomendaciones:

- ✓ Las especies recolectadas en los diferentes sectores del Austro Ecuatoriano, pertenecientes al género *Vasconcellea* producen látex con potencial para aplicaciones en la industria de los alimentos.
- ✓ El método de cuantificación de actividad enzimática, adaptado a las condiciones de laboratorio, puede ser utilizado en nuevos estudios orientados a evaluar la actividad enzimática de sustancias de origen natural.
- ✓ El látex de las especies incluidas en este estudio interviene en el proceso de clarificación de jugos. En este contexto se encontraron especies promisorias por la actividad proteolítica de sus extractos enzimáticos.
- ✓ Se recomienda continuar con estudios similares en especies vegetales y ampliar su ámbito hasta llegar a la identificación de las enzimas responsables de la actividad proteolítica observada en ensayos de laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

Referencias Bibliográficas:

- ARIAS, E. y J. Lastra, (2009), *Bioteología: tecnología enzimática*, El Cid Editor.
- ARNON, R. (1970), *Papain methods*, *Enzymol* 19, 226-242. Nitca Wang S., Hatti- Kaul R., and Kanasawud, P. 2006. "Purification of papain from Carica papaya latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation" *Enzyme and Microbial Technology*, 39 1103-1107.
- ARROYO, M. (2002), *Inmovilización de enzimas: fundamentos, métodos y aplicaciones*, Madrid, El Cid Editor
- AVILEZ, J. (2009), *Enzimas*, El Cid Editor
- BADUI, S.(2006), *Química de los Alimentos*, Addison Wesley Longman de México (Eds.).
- BRAVERMAN, J. (1980), *Introducción a la bioquímica de los alimentos*, El manual moderno s.a Editor
- DE LA TORRE, L.; Navarrete, H.; Muriel, P.; Macia, M. y H. Balslev (2008), *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. Quito & Aarhus.
- LUCAS, E.(2009), *Alimentos -- Procesos industriales. Food -- Biotechnology. Biotecnología*, El Cid Editor.

Referencias Electrónicas:

- CARRERA, J. (2003) *“Producción y aplicación de enzimas”* (En línea). Universidad del Cauca, Popayán, disponible en: www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol1/Ar11.pdf (Accesado el día 09 de enero del 2011)
- CAETANO, M.; Lagos, T.; Sandoval, C.; Posada, C. y D. Caetano (2008) *“Citogenética de especies de Vasconcellea (Caricaceae)”* (En línea). Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Valle del Cauca, Colombia, disponible en: http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?pid=S0120-28122008000400004&script=sci_arttext (Accesado el día 26 de enero del 2011)
- CASTELLANOS, O.; Ramirez, D. y V. Montañez (2004), *“Perspectiva en el desarrollo de las enzimas industriales a partir de la inteligencia tecnológica”*, (En línea). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá disponible en: http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?pid=S0120-56092006000200007&script=sci_arttext&tlng=es (Accesado el día 15 de marzo del 2011)
- LEÓN, J.; Pellón, F.; Unda, V.; David, J.; Anaya, C. y V. Mendoza (2000), *“Producción de enzimas extracelulares por bacterias aisladas de invertebrados marinos”*, (En línea) N°2 vol. 7. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/biologia/v07_n2/produccion_enzi.htm (Accesado el día 10 de marzo del 2011)
- MORALES, A.; Medina, D. y B. Yaguache (2004), *“Diversidad genética filogenética y distribución geográfica del género Vasconcellea en el sur del Ecuador”*. (En línea), Loja, Ecuador, disponible en: www.lyonia.org/downloadPDF.php?pdfID=2.241, (Accesado el día 15 de enero del 2011)

- MOYANO, C.; León, J.; Marchelli, E.; Gonzales, J. y P. Betancurt (2001), “*Jugo natural integral de manzana*”, (En línea), Uruguay, disponible en: http://latu30.latu.org.uy/pls/portal/latu_portal.cargo_docum.Get?df_nom_t_aba=bib_objetos_materiales@base.latu.org.uy&df_nom_campo_blob=objeto&df_nom_campo_nom_documento=tipo_objeto&df_rowid_registro=AAM0UAAEAAAA/AAi (Accesado el día 28 de enero del 2011)
- RECALDE, D. (2010), “*Elaboración de una bebida alcohólica fermentada de jícama (Smallanthus sonchifolius) y manzana (Pyrus malus L.)*”, (En línea), Quito, Ecuador, disponible en: <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/2465> (Accesado el día 18 de febrero del 2011)
- RIVERA, C. y F. García (2007), “*Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite*”, (En línea). México, disponible en: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2007_2/Enzimas_Aceite.pdf, (Accesado el día 20 de febrero del 2011)
- ROCHA, G.; Fernandez, G. y M. Parisi (2010) “*Estudios de caracterización cinética y fisicoquímica de una proteinasa Aspártica aislada de frutos maduros de Salpichroa origanifolia*” (En línea). Buenos Aires, Argentina, disponible en: www.scielo.cl/pdf/infotec/v21n2/art04.pdf (Accesado el día 26 de febrero del 2011)
- SCHELDEMAN, X.; Romero, J.; Van Damme, V.; Heyens, V. y P. Van Damme (2003) “*Potencial de papayas de altura (Vasconcella spp.) en el sur del Ecuador*” (En línea). Ecuador, disponible en: [http://www.lyonia.org/Archives/Lyonia%205\(1\)%202003\(1-100\)/Scheldeman,%20X.,%20%20J.P.%20Romero%20Motoche,%20V.%20Van%20Damme,%20V.%20Heyens%3B%20Lyonia%205\(1\)%202003\(73-80\).pdf](http://www.lyonia.org/Archives/Lyonia%205(1)%202003(1-100)/Scheldeman,%20X.,%20%20J.P.%20Romero%20Motoche,%20V.%20Van%20Damme,%20V.%20Heyens%3B%20Lyonia%205(1)%202003(73-80).pdf) , (Accesado el día 18 de febrero del 2011)

- URBINA, G. (2008) “*Evaluación agronómica de dos variedades y dos híbridos de naranjilla (Solanum quitoense lam) y su respuesta a dos densidades de plantación en julio moreno, Provincia Bolívar*” (En línea), Universidad Estatal de Bolívar, Guaranda, Ecuador, disponible en: www.biblioteca.ueb.edu.ec/handle/15001/189?mode=full (Accesado el día 22 de febrero del 2011)
- VASCO, A. (2008) “*Estudio de prefactibilidad para la instalación de una planta productora de jugos clarificados y jugos clarificados concentrados de mora, tomate de árbol y naranjilla, utilizando la tecnología de membranas*” (En línea), Escuela Politécnica Nacional, Ecuador, disponible en: [http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/658/1/CD-1598\(2008-07-15-01-32-41\).pdf](http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/658/1/CD-1598(2008-07-15-01-32-41).pdf)