

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

Martínez, K.; Cazorla, A.; Escobar, J.; Alvarado, C

Centro de Investigaciones Químicas. Laboratorio de Biotecnología Industrial (LABIOT)  
Facultad de Ingeniería. Universidad de Carabobo  
Valencia. Estado Carabobo. Venezuela  
[jejmescobar06@gmail.com](mailto:jejmescobar06@gmail.com) [c\\_alvarado\\_almarza@yahoo.es](mailto:c_alvarado_almarza@yahoo.es)

**Resumen:** La investigación se centró en el procedimiento para la preparación de un jugo clarificado de frutas utilizando un concentrado enzimático de guayaba y papaya. Este jugo fue a base de *Passiflora edulis f. flavicarpa*, comúnmente conocida como parchita o maracuyá amarillo, el cual se preparó tomando como referencia las Normas COVENIN y Codex Alimentarius (CODEX STAN 247-2005). Inicialmente, se prepararon dos concentrados de enzimas pécticas, extraídos de frutas como la guayaba y la papaya, los cuales se le midió su actividad enzimática. Posteriormente, se evaluó la eficacia de los concentrados, antes y después de su incorporación al jugo de parchita, mediante un arreglo factorial mixto aleatorizado 2x3x3, para luego proceder a realizar las pruebas sensoriales y hedónicas, que cumplan con las normas antes mencionadas, para conocer la aceptabilidad y preferencia del producto por parte de consumidores expertos en el área de catación. Entre las conclusiones más relevantes, se tiene que el concentrado enzimático de papaya resultó ser mejor agente clarificante respecto al de guayaba, observándose un mejoramiento en la apariencia y disminución en la turbidez.

**Palabras clave:** actividad enzimática, clarificación, enzimas pécticas, pruebas sensoriales.

## PREPARATION OF A CLARIFIED JUICE OF FRUITS USING AN ENZYMATIC CONCENTRATE OF GUAVA AND PAPAYA

**Abstract:** The research consisted in the process for the preparation of a clarified juice of fruits using an enzymatic concentrate of guava and papaya. This juice was made of *Passiflora Edulis f. flavicarpa*, commonly known as passion fruit, which was prepared citing the COVENIN Standards and Codex Alimentarius (CODEX STAN 247-2005). Firstly, two pectics enzymes concentrate were prepared, and then extracted from guava and papaya fruits, which measured its enzymatic activity. Later, an experimental design was realized to evaluate the efficacy of the concentrates, earlier and after its incorporation to the passion fruit juice, and then to proceed to realize sensory and hedonic tests, that comply with the standards earlier mentioned, to know the acceptability and preference of the product (with and without the presence of the enzymatic concentrate) by consumers. Between the most significant conclusions, it has to the enzymatic concentrate of papaya turned out to be a better fining agent in comparison with the guava, represents an improvement in the appearance and decrease of the cloudiness.

**Keywords:** enzymatic activity, clarification, pectic enzymes, sensory tests.

## INTRODUCCIÓN

Durante el procesamiento de los jugos, los tejidos vegetales se desintegran y se liberan cantidades importantes de pectinas, las cuales son moléculas de naturaleza proteica capaces de sintetizar las sustancias pécticas (polímeros ácidos y neutros muy ramificados, que pertenecen al grupo de los heteropolisacáridos vegetales, compuesto de una cadena lineal de moléculas de ácido D-galacturónico, obtenidos de bagazos de frutas, capaces de formar geles viscosos), mediante reacciones bioquímicas y de hidrólisis, aumentando la velocidad de degradación del sustrato al generar un complejo afin enzima-sustrato, que tiene origen en la zona activa de la molécula, siendo una región tridimensional conformada por una cadena secuencial de aminoácidos orientados para permanecer activos y enlazarse con el sustrato correspondiente (Meijide y Rubín, 2011). Una parte de estas pectinas permanece en suspensión, otra se satura con el jugo, mientras que el resto permanece en solución, contribuyendo a la turbidez y viscosidad de la bebida, siendo un problema durante su procesamiento, específicamente en la etapa de clarificación. Las primeras enzimas empleadas en la industria de jugos de frutas, fueron las pectinasas, las cuales se añaden con la finalidad de facilitar el prensado y la clarificación del producto (Del Moral *et al.*, 2015).

En los extractos de pectinasas, empleados en la producción de jugos, coexisten tres enzimas, la pectinesterasa (PE), la poligalacturonasa (PG) y la pectinliasa, (PL). Estas son enzimas exógenas, debido a que provienen de frutas, diferentes a las del jugo, y son las responsables de los cambios de descomposición, maduración y ablandamiento de la fruta en sí (Rivas, 2010). Estas se emplean ampliamente en la

industria de alimentos para aumentar la eficiencia de procesos extractivos, estabilización de productos y mejoramiento del sabor; a su vez, poseen una considerable aplicación comercial en la desintegración de tejidos de plantas, particularmente en el procesamiento de frutas y vegetales (Rodríguez y Serrat, 2008).

La PE libera metanol de los grupos carboxilos esterificados y transforman la pectina de bajo pectato y metóxilo, mientras que la PG hidroliza los enlaces glucosídicos próximos a un grupo carboxilo libre y la PL actúa sobre la pectina rompiendo los enlaces glucosídicos cercanos a un grupo metil-éster (Whitaker, 1994).

La calidad sensorial de los jugos está relacionada con la turbidez, sedimentos y sólidos suspendidos presentes en el mismo, por tanto, es de suma importancia el empleo de enzimas pectinolíticas de fuentes naturales y no sintéticos, por los efectos beneficiosos que aporta al jugo ya que elimina las causas de turbidez, mejora los atributos del jugo y favorece la precipitación de compuestos no deseados en el producto. De esta manera se obtiene un producto de calidad y que tenga posicionamiento y aceptación en el mercado.

En la presente investigación, se planteó como objetivo preparar un jugo clarificado de parchita (*P. edulis f. flavicarpa*) empleando concentrados enzimáticos de papaya y guayaba, de procedencia nacional. A estos últimos se les determinó su actividad enzimática, para luego evaluar su efecto en la clarificación del zumo de parchita mediante un análisis factorial, seguido de las respectivas evaluaciones sensoriales a los jugos, según las normas establecidas; así como también, la realización de pruebas hedónicas para conocer la preferencia y

aceptabilidad del producto por parte de los consumidores.

La razón para la producción de este jugo clarificado es abastecer la región central de Venezuela con un producto refrescante, libre de aditivos químicos y accesibles para los consumidores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de un concentrado enzimático a base de guayaba y papaya a nivel de laboratorio

Las frutas fueron compradas en un mercado local, se lavaron con agua caliente, se pelaron y se les retiró las semillas. Se procesaron dos porciones de 30 g de cada pulpa por separado, sometiéndolas a calentamiento en baño de maría; para finalmente conservarlas a 4 °C (Flores, 2004).

Cada una de las porciones de fruta procesada se colocó en un embudo con doble capa de papel de filtro; y posteriormente se les realizaron cuatro (04) lavados con 5 mL de acetona a -20 °C con el fin de eliminar los fenoles (Espinal, 2010).

Posteriormente, se procedió a la extracción del concentrado enzimático mediante la adición controlada de 30 mL de solución extractora de cloruro de sodio (NaCl) 1,5 M, ajustada a pH 7,8 con hidróxido de sodio (NaOH) 1,5 M (Flores, 2004). El lixiviado resultante, se centrifugó a 7000 rpm durante 45 min. El sobrenadante obtenido se filtró y recolectó en dos partes iguales. Una de estas partes se purificó con sulfato de amonio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ , a 30% de saturación; mientras que la otra, no se purificó. Seguidamente, se centrifugó la muestra purificada a 7000 rpm durante 45 min. Por

último, se decantó el precipitado y se recolectó el extracto enzimático purificado (Flores, 2004; Mondal *et al.*, 2009; Ashurst, 2005).

### Mejoramiento del método de pH estático para la determinación de la actividad enzimática

La medición de actividad enzimática de la pectinesterasa se realizó a partir de la técnica del pH estático (Argaiz y López-Malo, 1996). Se tomó por triplicado, una alícuota de 10 mL de extracto enzimático purificado de cada fruta. Seguidamente, se adicionó gota a gota una solución de pectina cítrica al 1% en NaCl 1M, ajustando el pH a 7,8; con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2,07 M (Gómez, 2004). En la experiencia se utilizó un pH-metro marca OAKTON. Luego, se agitó la mezcla durante treinta (30) minutos y se midió el pH.

Finalmente se tituló cada muestra con una solución de NaOH 0,0004 N, con una micropipeta de 100  $\mu\text{L}$  hasta alcanzar el pH igual a 7,8 en cada muestra (Argaiz y López-Malo, 1996).

Para obtener diferentes valores de actividad enzimática en ambas frutas, se evaluaron cinco concentraciones distintas de la solución titulante de NaOH con concentraciones comprendidas en un rango entre 0,0004 N y 0,5 N.

### Determinación de la eficacia del concentrado enzimático en jugos de frutas, mediante un arreglo factorial

La selección del jugo de frutas a ser clarificado se realizó con base a la propuesta de Del Moral *et al.* (2015), quienes compararon los efectos de la acción enzimática sobre la clarificación de diferentes jugos de frutas, realizados por

diferentes investigadores, considerando los parámetros de viscosidad, turbidez y brillo en los jugos (ver tabla 1).

**Tabla 1. Efectos de la acción enzimática en la clarificación de jugo de frutas**

Referencia	Materia prima	Efectos de la acción enzimática	Autores
"Clarificación de jugo de uva empleando enzimas pécticas y microfiltración"	Jugo de uva	Aumento de parámetros de color. Reducción de turbidez.	Cancino, et al. (2003)
"Biotecnología Alimentaria"	Jugo de manzana	Reducción de turbidez. Disminución de viscosidad.	López y Modrego (1994)
"Extracción y clarificación del zumo de maracuyá ( <i>Passiflora edulis</i> ) mediante enzimas pectolíticas"	Jugo de parchita	Disminución de viscosidad. Aumento de brillo. Eliminación de grumos por filtración.	Santamaría y Villacis (2000)
"Uso de enzimas y filtración por gravedad para la clarificación de muestras diluidas de jugo de cactus ( <i>Opuntia boldinghii</i> Britton y Rose), naranja y toronja"	Jugo de naranja	Eliminación de la deposición de sedimentos. Disminución de viscosidad.	Padrón y Moreno (2010)

De todas las frutas señaladas, la parchita (*P. edulis*) mostró diversas actividades enzimáticas y es más accesible en cuanto a disponibilidad, por lo que se procedió a su compra en un mercado local, en donde se seleccionaron las frutas más frescas, maduras y de buena calidad.

Éstas se lavaron y se cortaron con una espátula, donde se le extrajo la pulpa, para luego procesarla en un extractor de jugos, con la finalidad de separar la pulpa de las semillas.

Luego se prepararon, por triplicado, jugos de parchita con tres concentraciones distintas (ver tabla 2), para un total de nueve

unidades experimentales. En la preparación de los jugos se utilizó agua ultrapura de 18,3 MOhm.

**Tabla 2. Cantidades necesarias para la preparación de los jugos a diferentes concentraciones**

Cantidad de jugos	Volumen total (mL)	Soluciones acuosas (% v/v)
3	100	20
3	100	30
3	100	40

Posteriormente, se evaluó el efecto del concentrado enzimático de guayaba sobre la clarificación de los jugos de parchita. Para ello se aplicaron tres dosis distintas de concentrado enzimático de guayaba sobre cada uno de los jugos de parchita de concentración al 20 % v/v. El mismo procedimiento se aplicó para los jugos de parchita de 30 % y 40 % v/v. Todo esto se realizó bajo un arreglo factorial (ver tabla 3).

**Tabla 3. Cantidades de concentrado enzimático necesarios para la clarificación de los jugos a diferentes concentraciones**

% v/v	Volumen de concentrado (mL)		
	1	2	3
20	25	30	35
30	30	35	25
40	35	25	30

Seguidamente se midió el pH y la viscosidad de las mezclas resultante. El mismo procedimiento se realizó para evaluar el efecto del concentrado enzimático de papaya sobre la clarificación de los jugos de parchita. Finalmente, se evaluó el cambio en la viscosidad del jugo de parchita, variando el contenido de su pulpa empleada para su preparación (a valores de 35, 40 y 45 mL); y por otro lado, se agregó solamente concentrado enzimático de papaya al jugo

(30, 35 y 40 mL), midiéndose posteriormente su viscosidad.

### Formulación de un jugo clarificado de frutas a partir del concentrado enzimático preparado

Se realizaron formulaciones previas según las Normas COVENIN 1031-81 y CODEX ALIMENTARIUS (CODEX STAN 247-2005), con el fin de determinar las proporciones adecuadas de los diferentes ingredientes que componen a los zumos y néctares de fruta: pulpa de fruta, azúcar o edulcorante, conservante y en este caso, concentrado enzimático o agente clarificante.

La norma general del CODEX para zumos (jugos) y néctares de fruta (CODEX STAN 247-2005) indican que el contenido mínimo de jugo de parchita debe ser 25 % v/v en pulpa y el nivel mínimo de grados Brix requerido es 12.

A los jugos se les realizó medición de absorbancia para determinar el grado de turbidez de los mismos.

### Evaluación de las características sensoriales del jugo clarificado de frutas

Se procedió a realizar pruebas sensoriales de los diferentes jugos, infiriéndose cualitativamente acerca del olor, color, sabor y aspecto (Liria, 2007; González *et al.*, 2014).

Para el análisis de las propiedades sensoriales finales, se procedió a elaborar una matriz de valoración para una población de 10 individuos, escogidos al azar, en edades comprendidas entre 18 a 30 años, con la finalidad de clasificar, de forma discriminatoria, descriptiva y afectiva, el jugo de parchita antes y después, de la adición del concentrado enzimático. Se escogieron

10 individuos por tratarse de un modelo de efectos al azar, según lo establece Surco y Alvarado (2011).

Para la prueba hedónica, se utilizó la tabla 4, donde se pondera el criterio sensorial de las personas de la muestra.

**Tabla 4. Matriz de prueba hedónica para la ponderación de los criterios sensoriales de los individuos de la muestra**

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

Fuente: (Liria, 2007; Kemp *et al.*, 2009; Lawless 2010; González *et al.*, 2014)

En la tabla 5 se muestra la evaluación hedónica de la muestra poblacional, para el jugo sin concentrado enzimático.

**Tabla 5. Matriz de recolección de datos de la muestra, antes de la adición del concentrado enzimático en el jugo seleccionado**

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

De igual forma, se recolectaron los datos para el jugo con concentrado enzimático, los cuales se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6. Matriz de recolección de datos de la muestra, después de la adición del concentrado enzimático en el jugo seleccionado**

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

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### Obtención de un concentrado enzimático a nivel de laboratorio a base de guayaba y papaya

La eliminación fenólica se realizó para inactivar la enzima polifenoloxidasas PFO, responsable del pardeamiento (Pérez, 2003). Esta inactivación se observó en las frutas, puesto que se visualizó un pardeamiento en las mismas, el cual es un proceso químico que se da al producirse la enzima polifenoloxidasas PFO, que oxida los compuestos polifenólicos en presencia de oxígeno molecular ( $O_2$ ) para formar las quinonas y los compuestos pardos conocidos como melaninas (Espinal, 2010).

La eliminación de fenoles se llevó a cabo a través de una extracción binaria, siendo el principio fundamental de este tipo de extracción la solubilidad de las sustancias presentes en el sistema de extracción, generando un medio miscible, entre las sustancias afines, e inmiscible para aquellas no afines, debido a la naturaleza y fuerzas de interacción molecular entre los componentes del sistema de extracción.

Para la extracción del concentrado enzimático se establecieron dos condiciones principales de operación para garantizar la actividad enzimática: temperaturas bajas, aproximadamente  $4^\circ C$ , y un rango de pH comprendido entre 7 y 9. Estas condiciones fueron indispensables para no desnaturalizar la enzima, es decir, no perder la actividad enzimática de la misma. El pH fijado, dentro del rango establecido, fue de 7,8; siendo óptima la actividad enzimática (Gómez, 2004). También es importante resaltar, que para la obtención de la enzima, fue primordial degradar la membrana celular, puesto que la enzima es de tipo intracelular, por lo que se empleó la destrucción mecánica sin dañar la enzima (Whitaker, 1994).

La adición de cloruro de sodio se realizó para solubilizar las enzimas, empleando la fuerza iónica de la sal para facilitar la extracción de las mismas (Argaiz y López-Malo, 1996).

La muestra se centrifugó para separar la pulpa de las fases acuosa y orgánica. Luego, se procedió a purificar con sulfato de amonio  $(NH_4)_2SO_4$ , para lograr absorber el agua mediante la hidratación de los cristales de esta sal y así lograr una definición mayor de las fases (Cerón *et al.*, 2009; Whitaker, 1994). Cabe destacar que lo explicado anteriormente, forma parte de una modificación de los métodos descritos en la metodología, ya que se obtuvo un método más efectivo a partir del aporte individual de varios investigadores en el área.

Finalmente, se obtuvo un concentrado enzimático de enzimas pécticas (PE, PG y PL); y se caracterizó la medida de la actividad enzimática de la PE, que de acuerdo a Nagodawithana y Reed (1993), es la que se encuentra en mayor proporción respecto a las tres.

### Mejoramiento del método de pH estático para la determinación de la actividad enzimática

El método del pH estático, se realizó para mantener la muestra al pH óptimo para la medición de la actividad de PE. Ésta depende mucho de la concentración de iones de hidrógeno del medio, ya que afecta el grado de ionización de los aminoácidos del sitio activo del sustrato, o del complejo enzima-sustrato. Todo esto influye en la afinidad que tenga la enzima por el sustrato (Argaiz y López-Malo, 1996).

Para la determinación de la actividad enzimática (cuyas unidades vienen dadas en UPE), definida como el número de miliequivalentes de éster hidrolizados por minuto y mililitro de muestra, se midió la acción de la enzima sobre el sustrato. Se usó la solución de pectina cítrica al 1% en NaCl 1 M, para favorecer la acción de enzimas en el medio del sustrato. Dicha adición redujo el pH de la muestra bruscamente, por lo cual se reguló inmediatamente el mismo con una solución de NaOH 2,07 M hasta alcanzar de nuevo el pH óptimo de acción de pectinesterasas (Nagodawithana y Reed, 1993).

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

Se trabajó con un pH igual a 7,8 considerando las condiciones reportadas por Gómez (2004), el cual es muy cercano a los

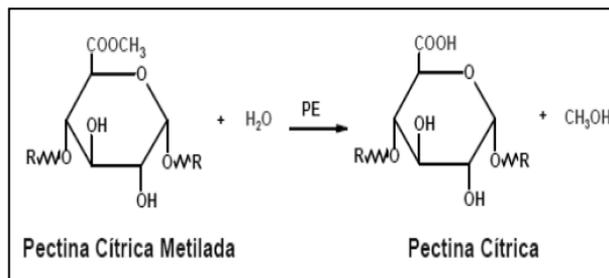
valores empleados en investigaciones con papaya (Bravo, 1981), guayaba (Mondal, 2009) y maracuyá (Flores, 2004) con un pH de 7,5 y Del Moral *et al.* (2015).

La muestra se dejó en agitación constante durante media hora, donde se observó que hubo una disminución del pH. Estos valores se contemplan en la tabla 7.

**Tabla 7. Valores de pH para la medición de la actividad enzimática**

Muestra	pH inicial (pH <sub>i</sub> ± 0,01) adim	pH después de 30 min de agitación (pH <sub>ag</sub> ± 0,01) adim	pH después de la titulación (pH <sub>t</sub> ± 0,01) adim
Guayaba 1	7,82	6,98	7,80
Guayaba 2	7,79	6,79	7,81
Guayaba 3	7,83	6,88	7,79
Papaya 1	7,82	6,65	7,78
Papaya 2	7,81	6,90	7,80
Papaya 3	7,80	6,88	7,79

La disminución del pH, está asociada a la labor catalizadora de la enzima sobre la pectina cítrica. Como se observa en la figura 1, la PE al hidrolizar los enlaces éster metílico (-COOCH<sub>3</sub>), en medio ácido, libera metanol (CH<sub>3</sub>OH) de los grupos carboxilos esterificados y transforma la pectina metoxilada en pectina de bajo metóxilo, el cual presenta bajo pH (Espinal, 2010).



**Figura 1. Degradación de la pectina por acción de la pectinesterasa mediante hidrólisis (Meijide y Rubín, 2011).**

Se observó que los resultados obtenidos de mayor actividad enzimática, al regular el pH

de las soluciones, fue cuando se tituló la muestra de guayaba con una solución de NaOH 0,001 N y la de la papaya con 0,0004 N. Los resultados alcanzados para la actividad enzimática de la guayaba y papaya, se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8. Actividad enzimática promedio de la pectinesterasa (UPE)**

Concentrado	Actividad enzimática
Guayaba 1	1,067
Guayaba 2	1,333
Guayaba 3	1,167
Papaya 1	5,333
Papaya 2	5,067
Papaya 3	5,133

Los resultados obtenidos fueron más altos que la actividad enzimática reportada por Del Moral *et al.* (2015), con valores de 0,006 UPE para la guayaba y 0,003 UPE para la papaya; con metodología similar. No obstante, la actividad enzimática obtenida para la guayaba resultó ser inferior a la reportada por Mondal *et al.* (2009) para la misma fruta, cuyo valor fue de 3,1; lo mismo ocurre con la papaya, en el estudio de Bravo (1981), donde la actividad alcanzada fue de 6,3.

La razón que se atribuye a estas diferencias, es que la metodología usada fue diferente a la utilizada en esta investigación, puesto que se trabajó con un pH de 7,8 y no de 7,5 como hicieron los investigadores antes mencionados.

### Determinación de la eficacia del concentrado enzimático en jugos de frutas, mediante un arreglo factorial

Se prepararon diferentes formulaciones de jugo, variando la variedad del concentrado enzimático (A), cantidad de concentrado enzimático (B) y cantidad de pulpa (C), con el objetivo de evaluar el porcentaje de

reducción de la viscosidad en los tratamientos experimentales. Para ello se realizó un arreglo factorial mixto aleatorizado 2x3x3 por triplicado, para un total de 54 experimentos. Primeramente, se procedió a determinar el pH, la viscosidad y densidad del jugo sin concentrado enzimático (tabla 9), luego las viscosidades del jugo utilizando el concentrado enzimático de guayaba y posteriormente utilizando concentrado enzimático de papaya (tablas 10 y 11 respectivamente).

**Tabla 9. Propiedades iniciales de los jugos de maracuyá**

Muestra	pH	Densidad, $\rho$ (g/mL)	Viscosidad, $\mu$ (cP)
1	2,77	1,007	5365,548
2	2,76	1,018	5275,572
3	2,85	1,029	6246,935

**Tabla 10. Propiedades físicas promedio de los jugos de maracuyá con el concentrado enzimático a base de guayaba**

Muestra	% v/v	Concentrado (mL)	pH final	$\rho$ jugo (g/mL)	$\mu$ jugo (Cp)
1	20	25	2,95	0,990	7456,175
1	30	30	2,89	0,998	8400,552
1	40	35	2,88	1,012	12512,387
2	20	30	2,98	1,007	4906,299
2	30	35	3,00	1,027	5720,823
2	40	25	3,04	0,997	6062,758
3	20	35	3,02	1,028	4969,640
3	30	25	2,88	1,028	8121,421
3	40	30	2,87	1,024	9618,928

**Tabla 11. Propiedades físicas promedio de los jugos de maracuyá con el concentrado enzimático a base de papaya**

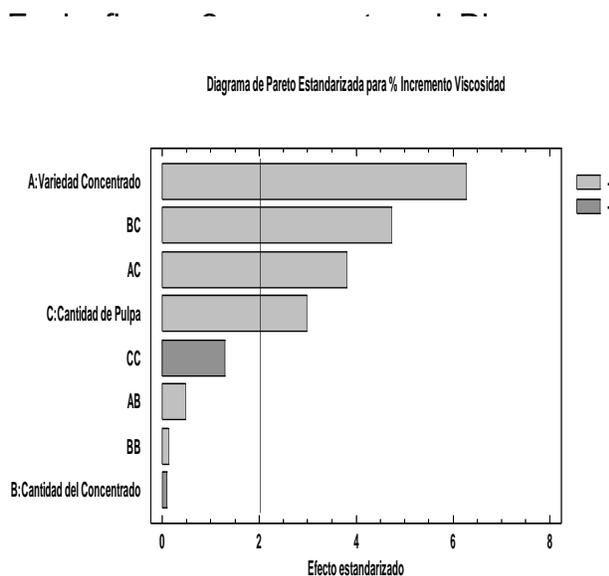
Muestra	% v/v	Concentrado (mL)	pH final	$\rho$ jugo (g/mL)	$\mu$ jugo (cP)
1	20	25	2,92	1,025	5659,120
1	30	30	2,95	1,010	5084,562
1	40	35	3,00	0,999	5907,112
2	20	30	3,02	1,027	5304,279
2	30	35	2,91	1,034	5486,742
2	40	25	2,91	1,038	6071,235
3	20	35	2,96	1,029	5366,192
3	30	25	2,92	1,031	5653,203
3	40	30	2,94	1,034	6034,608

Para evaluar la eficacia de los concentrados enzimáticos, se determinó la disminución en la viscosidad de las bebidas.

En la tabla 12 se muestran los factores involucrados en la evaluación estadística, indicando su variable codificada y la variable real.

**Tabla 12. Factores, variable codificada y real del análisis estadístico involucrado en el estudio**

Factor	Variable codificada	Variable real
Variedad de concentrado (A)	-1	Guayaba
Variedad de concentrado (A)	+1	Papaya
Cantidad de concentrado (B)	-1	25
Cantidad de concentrado (B)	0	30
Cantidad de concentrado (B)	+1	35
Cantidad de pulpa (C)	-1	20
Cantidad de pulpa (C)	0	30
Cantidad de pulpa (C)	+1	40



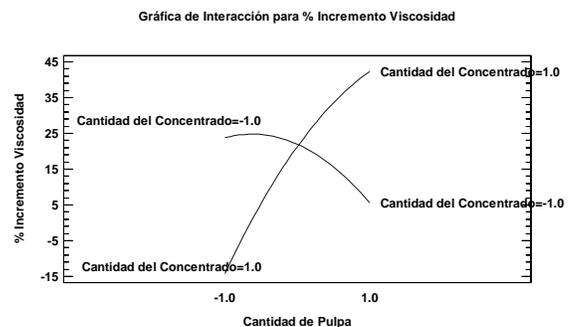
**Figura 2. Diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de reducción de la viscosidad de los jugos**

Donde:

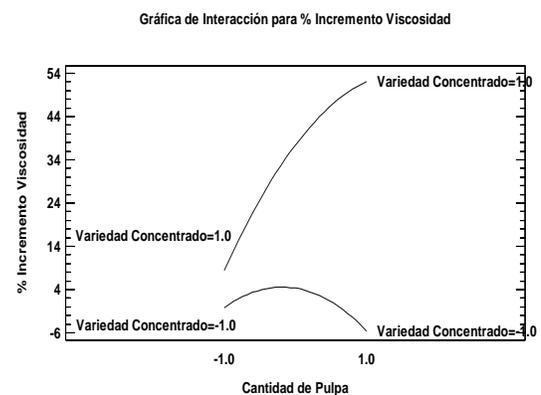
- BC: interacciones BxC.
- AC: interacciones AxC.
- CC: interacciones CxC.
- AB: interacciones AxB.
- BB: interacciones BxB.

En este se muestra que el efecto estandarizado indica que la variable de respuesta es afectada por el cambio de uno de los factores. Se observa que los efectos Variedad de concentrado (A) y Cantidad de pulpa (C); así como las interacciones BxC y AxC son diferentes estadísticamente ( $P < 0,05$ ). Esto muestra que hay diferencias en los concentrados de ambas frutas, y en las cantidades de pulpa empleada, lo que se traduce en que tienen distinta actividad enzimática, y por tanto, distinto efecto en la clarificación la cual consiste en la remoción de las sustancias pécticas que ocasionan la turbidez de los jugos.

Ahora bien, en las figuras 3 y 4, se muestran las gráficas de interacción de efectos BxC y AxC, ya que fueron las que mostraron diferencias significativas en el Diagrama de



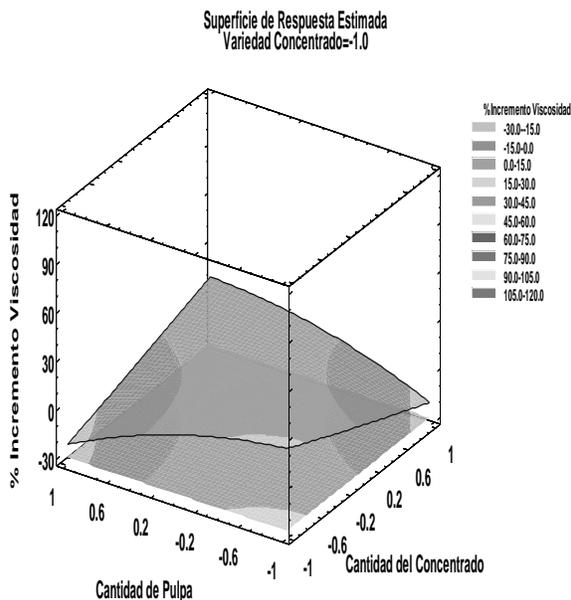
**Figura 3. Gráfica de interacción de**



**Figura 4. Gráfica de interacción de Variedad de concentrado (A) y Cantidad de Pulpa (C), AxC.**

Para estas interacciones, se muestra una tendencia de efecto cuadrático, en donde se indica que a pesar de que el efecto Cantidad de concentrado (B) no es significativo, su interacción con el resto de los efectos sí lo es. En el caso de la interacción Cantidad de Concentrado (B) y Cantidad de Pulpa (C), BxC un mayor valor de la cantidad de concentrado (1,0) y una mayor de cantidad de pulpa (1,0), aumenta el porcentaje de reducción de la viscosidad; y por otro lado, para la interacción de Variedad de concentrado (A) y Cantidad de Pulpa (C), AxC, un mayor valor de cantidad de pulpa y una variedad de concentrado empleando papaya, disminuyen los porcentajes de descenso en la viscosidad de los jugos.

En la superficie de respuesta mostrada en la figura 5, se indica la tendencia a un punto mínimo de los extremos con los menores valores en el descenso de la viscosidad, empleando la mayor cantidad de pulpa (30 mL) v la mayor cantidad de concentrado (40



**Figura 5. Superficie de respuesta estimada para el porcentaje de reducción en la viscosidad con variedad de concentrado papaya.**

En la tabla 13 se muestran los resultados para el segundo diseño experimental, en el que se evaluó la viscosidad para concentraciones superiores a las empleadas de jugo de parchita; así como el efecto del concentrado enzimático de papaya a concentraciones mayores, sobre esas mismas proporciones de jugo. Este nuevo diseño se realizó para conocer si a mayores concentraciones de jugo y de concentrado, el efecto enzimático refleja diferencias significativas, lo cual no se evidenció, por lo que, a concentraciones superiores, no se puede obtener una mejor clarificación.

**Tabla 13. Interacciones para el segundo diseño experimental del jugo de parchita sin concentrado enzimático y con concentrado de papaya**

Concentrado Enzimático de papaya (mL)	Pulpa (mL)	Viscosidad (cP)
0	35	3301,159
		3362,863
		2972,071
0	40	3684,515
		3302,646
		3529,703
0	45	3698,638
		3779,927
		3627,510
0	35	3301,159
		3362,863
		2972,071
0	40	3684,515
		3302,646
		3529,703
0	45	3698,638
		3779,927
		3627,510
30	35	3257,156
		3225,736
		3215,263
35	40	3679,683
		3394,279
		3445,244
40	45	3503,711
		3493,314
		3586,885

Los resultados para la evaluación estadística en este nuevo diseño indicó que no existen diferencias significativas para todos los

factores evaluados, A: cantidad de concentrado y B: cantidad de pulpa (ver figura 6), lo que indica que a partir de estos valores de concentrado enzimático y cantidad de pulpa, la viscosidad no varía significativamente. Es importante resaltar, que esto no significa que la papaya no tiene efecto, sino que para las concentraciones evaluadas no mostró efecto alguno en la variable viscosidad; por lo que este experimento se realizó con fines comparativos. Según reportan Bravo (1981)

por la Norma COVENIN y Códex Alimentarius, el cual es de 12.

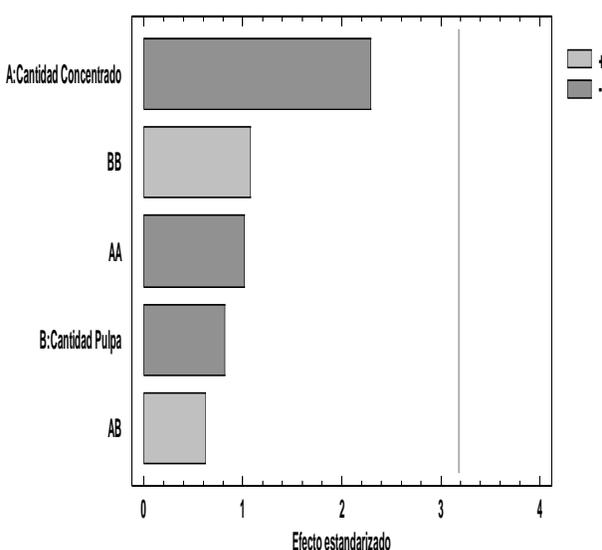
**Tabla 14. Análisis para la formulación del jugo clarificado**

% v/v Pulpa de parchita	Concentrado enzimático de papaya (mL)	Azúcar (g)	°Brix	Ácido ascórbico (ppm)
40	35	40	33,76	300
45	40	40	34,75	300

Los valores reportados de ácido ascórbico son los que establece el Códex Alimentarius para los valores de °Brix medidos.

Luego se prepararon las formulaciones de la tabla anterior sin el concentrado enzimático. Esto con el fin de corroborar la absorbancia de las muestras, empleando un espectrofotómetro; lo que permitió conocer la turbidez de los jugos antes y después de la adición de concentrado, puesto que la absorbancia indica el nivel de remoción que hubo de las sustancias pécticas, lo que está asociado a la turbidez. Los resultados se contemplan en la tabla 15, donde se puede apreciar mayor grado de disminución de la absorbancia para el jugo de parchita de 45% v/v, que contenía 40 mL de concentrado enzimático de papaya.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Incremento en Viscosidad



**Figura 6. Diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de reducción de la viscosidad de los jugos en el segundo diseño experimental.**

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

Luego de realizar la evaluación sensorial preliminar, se concluyó que el mejor sabor del jugo se logró al agregar 40 g de azúcar, observándose en la tabla 14 que los grados Brix son mayores que el mínimo requerido

**Tabla 15. Valores de absorbancia de los jugos**

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

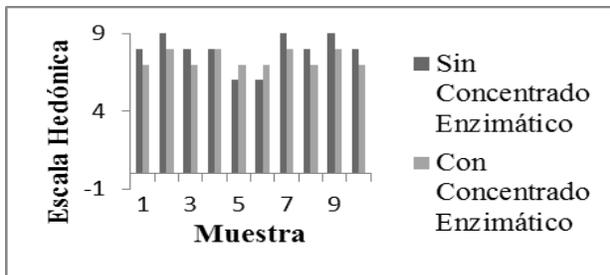
La formulación para preparar 100 de jugo clarificado, quedó como se muestra en la tabla 16.

**Tabla 16. Formulación para preparar 100 mL de jugo clarificado**

% v/v Pulpa de parchita	Pulpa de parchita (mL)	Agua (mL)	Concentrado enzimático de papaya (mL)	Azúcar (g)	Ácido ascórbico (ppm)
45	45	55	40	40	300

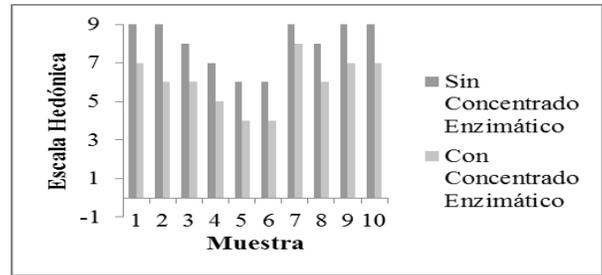
**Evaluación de las características sensoriales del jugo clarificado de frutas**

En lo concerniente al sabor del jugo, como se aprecia en la figura 7, se aprecia que el valor promedio obtenido para esta característica, sin concentrado es de 8, mientras que para el jugo con concentrado el valor en esta escala es de 7, lo que quiere decir que hubo cierta variación entre los sabores de los jugos debido a la adición del concentrado enzimático.



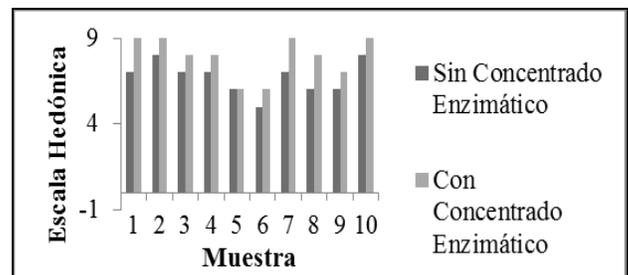
**Figura 7. Evaluación del sabor para el jugo de parchita 45% v/v.**

Con respecto al olor, así como se aprecia en la figura 8, a pesar de identificarse un incremento en la percepción de las fragancias propias de las frutas, agradó más el jugo que no contenía concentrado enzimático. Al jugo con concentrado agregado, se sentía un ligero aroma de la papaya, esto es debido a la adición de cloruro de sodio al ocurrir permeabilización de la membrana celular, generando así un medio acuoso como mecanismo de transporte para la liberación de aceites esenciales, taninos, terpenos y polifenoles a la superficie, permitiendo un mayor grado de detección de los aromas por el sentido del olfato.

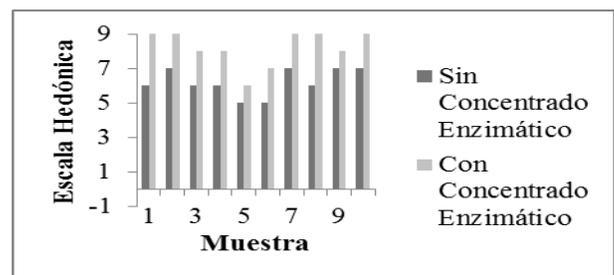


**Figura 8. Evaluación del olor para el jugo de parchita 45% v/v**

En el aspecto referente a la evaluación del color y apariencia, el resultado obtenido por el jugo con concentrado enzimático tuvo mayor aceptación, así como se contemplan en las figuras 9 y 10 respectivamente. Se observó un mejoramiento en la apariencia, disminución de la turbidez, es decir, un buen aspecto visual, gran limpidez, transparencia y color, que es ocasionado por la acción de enzimas pécticas que presentan efectos beneficiosos, pues mejoran el brillo y luminosidad del producto final (González et al., 2003).



**Figura 9. Evaluación del color para el jugo de parchita 45% v/v.**



**Figura 10. Evaluación de la apariencia para el jugo de parchita 45% v/v.**

El empleo de enzimas pectinolíticas presenta efectos beneficiosos, ya que mejora el brillo y la luminosidad del producto final (Brillouet *et al.*, 1990), al eliminar las causas de la turbidez, ya que las pectinas pueden llegar a suponer el 50% de la sustancia coloidal, y que su destrucción facilita la precipitación de proteínas, polímeros fenólicos y en menor medida, ácidos urónicos (González *et al.*, 2013).

## CONCLUSIONES

La eliminación de los fenoles logró inhibir la acción de la enzima polifenoloxidasas, responsable del pardeamiento. Las concentraciones de las soluciones titulantes de NaOH que mostraron los valores más altos para la actividad enzimática fueron 0,001N y 0,0004 N para la guayaba y papaya, respectivamente.

El mejoramiento del método permitió obtener actividades enzimáticas más altas que las reportadas en otra investigación donde emplearon el mismo método para las mismas frutas. El concentrado enzimático de papaya resultó ser mejor agente clarificante que el concentrado de guayaba, de acuerdo al diseño experimental. La mejor formulación del jugo se obtuvo para 45% v/v en pulpa de parchita. El sabor del jugo cumple con las expectativas del panel de consumidores. El jugo presentó un leve aroma a papaya.

Se observó un mejoramiento en la apariencia y una disminución en la turbidez al jugo que contenía el concentrado enzimático.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal del Centro de Investigaciones Químicas (C.I.Q) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, por colaborar con

el desarrollo de esta investigación. Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (BIOMED).

## REFERENCIAS

Alvarado, C., Fernández, C., Jiménez, A. y Paucar, J. (2016). Clarificación de una bebida alcohólica a base de *Merey* (*Anacardium occidentale* L.) a partir de un concentrado enzimático. *Revista BioTecnología*, 20 (3), 12-27.

Argaiz, A. y López-Malo, A. (1996). Kinetics of first change on flavour, cooked flavour development and pectinesterase inactivation on mango and papaya nectars and purees. *Fruit Processing* 6: 148-150.

Ashurst, P. (2005). *Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices*. United Kingdom: Blackwell Publishing.

Bravo, C.S (1981). Caracterización de las sustancias pécticas y enzimas pécticas de la lechosa (*Carica papaya* L) y su relación con la gelificación de la pulpa. Vol. 126p. VE-UCV/FA.

Brillouet, J.M., Saulnier, L. y Montounet, M. (1990). Les polysaccharides pectiques et les enzymes de dégradation. *Rev. Fr. Oenol.*, 30 (122), 43-54.

Cancino, B., Ruby, R. y Astudillo, C. (2003). Clarificación de jugo de uva por microfiltración. Escuela de Alimentos. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Cerón, Á., Salamanca, C. y Martan, J. (2009). *Enzimas en la Industria Alimentaria*. Tesis doctoral, Universidad del Valle Cali.

Codex alimentarius. Norma general del codex para zumos (jugos) y néctares de frutas (CODEX STAN 247-2005). Consultado

el día 9 febrero del 2016 en [www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-standards/es\\_](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-standards/es_)

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) (1981). Néctares y frutas. Consideraciones generales. Consultado el día 9 febrero del 2016 en [www.sencamer.gov.ve/normas/1031-81.pdf](http://www.sencamer.gov.ve/normas/1031-81.pdf). Del Moral, S., Ramírez-Coutiño, L. y García-Gómez, M. (2015). Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2 (3), 94.

Espinal, M. (2010). Capacidad antioxidante y ablandamiento de la guayaba Palmira. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia.

Flores, E. (2004). Desarrollo de una bebida funcional de maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). Tesis de maestría, Universidad de las Américas Puebla.

Gómez, O. (2004). Dependencia en la temperatura de los cambios en atributos sensoriales, degradación de ácido ascórbico e inactivación enzimática durante el tratamiento de pasteurización en puré y néctar de tamarindo. Tesis de maestría, Universidad de las Américas Puebla.

González, M., Izcara, E., Pérez, S. y Revilla, I. (2003). Efecto del uso de enzimas pectinolíticas sobre los aspectos tecnológicos y visuales de mostos y vinos. X Congreso Brasileño de Viticultura y Enología, Universidad de Burgos, España.

González, V., Rodeiro, C., Sanmartín, C. y Vila, S. (2014). Introducción al análisis sensorial. Estudio hedónico del pan en el IES Mugardos. Ponencia presentada en el IV Concurso Incubadora de Sondaxes y Experimentos, Mugardos.

Kemp, S., Hollowood, T. y Hort, J. (2009). *Sensory Evaluation a Practical Handbook*. United Kingdom: Editorial Offices.

Lawless, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food*. Springer. USA: Editorial Springer-Verlag.

Liria, M., (2007). Guía para la evaluación sensorial de los alimentos. Proyecto AgroSalud (CIDA 7034161). Lima.

López, J. y Modrego, A. (1994). *La biotecnología y su aplicación industrial en España*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Meijide, R. y Rubín, G. (2011), Obtención de un concentrado de pectinasas utilizando fuentes vegetales de procedencia nacional. Tesis pregrado, Universidad de Carabobo.

Mondal, K., Malhotra, S., Jain, V. y Singh, R. (2009). Oxidative stress and antioxidant systems in Guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 15 (4), 328-334.

Nagodawithana, T. y Reed, G. (1993). *Enzymes in Food Processing*. Tercera Edición. Foodscience and technology. International Series, 7-67/ 363-392.

Padrón, C. y Moreno, M. (2010). Evaluación del uso de enzimas y filtración por gravedad para la clarificación de una mezcla diluida de pulpa de frutos de cactus (*Opuntia boldinghii* Britton y Rose), jugos de naranja y toronja. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 63 (1), 1.

Pérez, L. (2003). Aplicación de métodos combinados para el control del desarrollo del pardeamiento enzimático en pera (variedad BLANQUILLA) mínimamente procesada.

Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.

Rivas, C. (2010). Microencapsulación y estabilización enzimática del jugo de Chirimoya "Anona cherimola mil". Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional.

Rodríguez, O. y Serrat, M. (2008). Poligalacturonasas de levaduras: un producto biotecnológico de grandes potencialidades. Tecnología Química. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, 28 (1), 87.

Santamaría, S. y Villacis, A. (2000). Extracción y clarificación del zumo de maracuyá (*Passiflora edulis*) mediante la aplicación de enzimas pectolíticas". Tesis de maestría, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato.

Surco, J. y Alvarado, J. (2011). Estudio estadístico de pruebas sensoriales de harinas compuestas para panificación. Revista Boliviana de Química, 28 (2), 1-6.

Whitaker, J. (1994). Principles of enzymology for the food sciences. Segunda edición. Marcel Dekker. Inc. Davis, California, 426-435.

**Fecha de recepción:** 11 de agosto de 2016

**Fecha de aceptación:** 08 de febrero de 2017