

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PECTINASA OBTENIDA DE LA PULPA DE
GUANÁBANA (*annona murucata l.*) Y CHIRIMOYA (*annona cherimola l.*) Y SU
APLICACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE JUGO**

NORA MILENA GARCIA ULLOA

NELCY MARIANA CELY

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA
CIENCIAS BÁSICAS- QUÍMICA
BOGOTA D.C
2020**

ACEPTACION POR PARTE DEL JURADO

Jurado del trabajo: Ph.D. Nahury Yamile Castellanos

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PECTINASA OBTENIDA DE LA PULPA DE
GUANÁBANA (*Annona muricata L.*) Y CHIRIMOYA (*Annona cherimola L.*) Y SU
APLICACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE JUGO**

NORA MILENA GACIA ULLOA

NELCY MARIANA CELY

Trabajo de grado para optar por el título de Químico

Directora de trabajo de grado

PhD PAULA ANDREA MÉNDEZ

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA
CEAD JOSÉ ACEVEDO Y GÓMEZ
PROGRAMA DE QUÍMICA
BOGOTA D.C
2020**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PECTINASA OBTENIDA DE LA PULPA DE
GUANÁBANA (*Annona muricata L.*) Y CHIRIMOYA (*Annona cherimola L.*) Y SU
APLICACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE JUGO**

NORA MILENA GARCIA ULLOA

NELCY MARIANA CELY

“Prohibida la reproducción sin la autorización expresa del autor (a)”

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABERTA Y A DISTANCIA
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA**

BOGOTA D.C

2020

DEDICATORIAS

Dedicamos este logro primero a Dios y la virgen santísima quienes con su infinito poder nos han regalado valor, fuerza y sabiduría en el transcurso del camino recorrido para lograr alcanzar este proyecto de conocimiento, el cual no fue fácil por las diferentes circunstancias del destino presentadas en el recorrido, pero que de su mano hoy vemos con inmensa alegría que todo hasta aquí ha sido un aprendizaje espiritual, académico y personal.

Dedico este trabajo a mi pequeño ángel (Jazmín Sofía Valderrama Cely) quien empezó conmigo esta travesía creciendo en mi vientre pero que finalmente me ha acompañado desde el cielo por lo que le puedo decir lo hemos logrado.

A mi esposo (José Valderrama) por su inmenso amor, apoyo y sacrificio y a mis dos hijas (Victoria y Sofía Valderrama) por su amor en cada momento por ser mi motivación más grande enseñándome a enfrentar cada paso recordándome siempre la esperanza para lograr mi objetivo.

Nelcy M. Cely

Mi tesis la dedico:

A mi esposo Miguel Ángel por su apoyo que, aunque hemos pasado momentos difíciles y que el proyecto que había emprendido no era fácil, estuvo ahí alentándome, apoyándome y creyendo en mi capacidad de superación.

A mis hijos Laura y Cristopher quienes son mi motor y mi inspiración de salir adelante y alcanzar mis metas.

A mi madre Alcira quien con sus palabras me alentaban a continuar con el objetivo planteado de culminar una carrera profesional.

Nora M. García.

Agradecimientos

Agradezco primero a Dios por darme valor, sabiduría y fortaleza en este camino forjado a partir de conocimiento y enriquecido con entrega y dedicación, a mis padres y hermanos por su infinito apoyo y colaboración cuando lo necesite, pero especialmente agradezco a mi esposo e hijas quienes con su amor, paciencia y sacrificio me han dado la fuerza suficiente para continuar a pesar de los altibajos presentados a lo largo de este camino y quienes además con su apoyo incondicional han permitido que este sueño se haga realidad.

A la universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD) en general a sus docentes quienes impartieron conocimiento con dedicación para mi futura vida profesional, pero en especial a la directora del trabajo de grado Paula Andrea Méndez por su apoyo, comprensión, su tiempo y conocimiento compartido en cada oportunidad durante este proceso.

A mi compañera de tesis quien siempre estuvo hay para apoyarme en cada momento, le digo gracias porque en verdad fue la mejor compañera y amiga de equipo con la que pude trabajar.

Nelcy M. Cely

Agradezco a Dios por bendecir mi vida y guiarme en todo momento en los pasos que di durante la carrera, además que nos permitió terminar este proyecto a pesar de las complicaciones y percances que tuvimos.

Agradezco a mi esposo, hijos y madre que me apoyaron en este proyecto y que este logro es en gran parte gracias a ustedes ya que sin sus palabras de aliento y comprensión no lo hubiera logrado.

Deseo expresar mi mayor agradecimiento a la directora de Grado Paula Andrea Méndez porque con su apoyo, dedicación y conocimiento he logrado desarrollar mi tesis con éxito, mejor de lo que esperaba y una gran parte del desarrollo se lo debo a usted. Que Dios la bendiga.

Agradezco a mi compañera de tesis por su confianza, apoyo y haber formado un equipo ejemplar para lograr nuestros objetivos, gracias por compartir todo este tiempo y sobre todo por escogerme en acompañarte en este proyecto.

Nora M. García

Resumen

La pectinasa, es una de las enzimas utilizadas para degradar las sustancias pécticas, se obtiene principalmente de microorganismos y bacterias; sin embargo, dada la importancia en la industria alimenticia, es de interés explorar nuevas fuentes de obtención. La guanábana (*Annona muricata* L.) ha sido estudiada en estado de madurez medio (cáscara de color amarillo-verde); sin embargo, no se tienen registros de la extracción de pectinasas en su estado de madurez avanzado (oscurecimiento de la cáscara) ni la chirimoya (*annona cherimola*). Por lo anterior, es de interés estudiar frutas de la misma familia, y además explorar el uso de las frutas que no son aptas para el consumo humano. Por ello, el objetivo de la presente investigación fue determinar la extracción, cuantificación, purificación y actividad enzimática de la enzima pectinesterasa extraída de guanábana (*annona muricata* L) y chirimoya (*annona cherimola*) en dos estados fisiológicos (buen estado y mal estado).

Se determinó que hay mayor contenido de enzima pectinasa en la chirimoya (*annona cherimola*), con respecto al encontrado en guanábana (*annona muricata*), pero los máximos niveles de actividad de pectinasa se encontraron en muestras de guanábana en mal estado y buen estado, extraídas en buffer de fosfato ($2,17 \pm 0,14$ UI/mL, y $1,92 \pm 0,29$ UI/mL), respectivamente. Además, las muestras con menor actividad enzimática fueron las muestras de chirimoya en sus dos estados con valores de $0,92 \pm 0,14$ UI/mL, es decir que 1U es la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de ácido galacturónico a una temperatura óptima de 40°C.

La pectinasa extraída fue activa a pH 4,0 donde las muestras que presentaron mayor actividad fueron chirimoya (*annona cherimola*), en buen estado, extraída en buffer acetato ($27,33 \pm 0,29$ UI/mL), y guanábana (*annona cherimola* L.), en mal estado, extraída en buffer fosfato ($27,00 \pm 0,87$ UI/mL) la capacidad de la enzima en la clarificación del jugo de mora se midió espectrofotométricamente a 660 nm dando como resultado que la enzima pectinasa extraída en este estudio es apta para clarificar un jugo de fruta.

Abstract

Pectinase is one of the most enzymes used to degrade pectic substances, it is obtained mainly from microorganisms and bacteria. However, due to the importance in the food industry, it has had an interest to explore new sources to obtain this. Soursop (*Annona muricata L.*) has been studied in a medium maturity stage (yellow-green peel); however, there are no records of the extraction of pectinases in its advanced stage of maturity (skin darkening) or custard apple (*Annona cherimola*). Therefore, it has been of interest to study fruits of the same family, also to explore the use of fruits that are not suitable for human consumption. Therefore, the objective of the present research was to determine the extraction, quantification, purification and enzymatic activity of the pectinesterase enzyme extracted from soursop (*Annona muricata L.*) and custard apple (*Annona cherimola*) in two physiological states (good and poor).

It was determined that there is a higher content of pectinase enzyme in custard apple (*Annona cherimola*), in comparison to the soursop (*Annona muricata*), but the maximum levels of pectinase activity were found in samples of soursop in poor and good condition, which was extracted in phosphate buffer ($2,17 \pm 0,14$ UI / mL, and $1,92 \pm 0,29$ UI / mL), respectively. In addition, the samples with the lowest enzymatic activity were custard apple samples in their two states with values of $0,92 \pm 0,14$ UI / mL, that is, 1U is the amount of enzyme that releases 1 μ mol of galacturonic acid at an optimum temperature of 40 ° C.

The extracted pectinase presented activity at pH 4.0, where the samples with highest activity were cherimoya (*Annona cherimola*) in good condition extracted in acetate buffer ($27,33 \pm 0,29$ IU / mL), and soursop (*Annona cherimola L.*) in poor condition extracted in phosphate buffer ($27,00 \pm 0,87$ IU / mL), the capacity of the enzyme in clarifying the blackberry juice was measured spectrophotometrically at 660 nm, and the result evidenced that pectinase enzyme extracted in this study was suitable for clarifying a fruit juice.

Abreviaturas

g	Gramos
Kg	Kilogramos
°C	Grados centígrados
m	Metros
cm	Centímetros
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
msnm	Metros sobre el nivel del mar
ATP	Adenosin trifosfato
pH	Potencial de hidrógeno
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio
Cu	Cobre
M	Molar
N	Normal
PG	Poligalacturonasas
PMG	Polimetilgalacturonasas
PE	Pectinaesterasa
PGL	Poligalacturonato liasa
PL	Pectatoliasas
CH ₃ COO ⁻ Na ⁺	Acetato de sodio
CH ₃ COOH	Ácido acético
NaOH	Hidróxido de sodio
H ₂ O	Agua
rpm	Revoluciones por minuto
min	Minuto
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico
K ₂ HPO ₄	Fosfato dipotásico
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monosódico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato disódico
UV	Uv visible
CuSO ₄	Sulfato de cobre

OVA	Ovoalbúmina
mg	Miligramo
BF	Buffer Fosfato
BA	Buffer Acetato
GB	Guanábana en buen estado
GM	Guanábana en mal estado
CHB	Chirimoya en buen estado
CHM	Chirimoya en mal estado
S	Sustrato
P	Productos
E	Enzima
p/v	Peso/volumen
NaCl	Cloruro de sodio
SDS	sodio dodecil sulfato
TCA	Ácido tricloroacético
EDTA	Etilendiaminotetraacético
Na	Sodio
N ₂ L	Nitrógeno Líquido
pMF	Previo a la madurez fisiológica
MF	Madurez fisiológica
H ₃ O ⁺	Iones hidronio
PGA	Ácido poliglicólico
pI	Punto isoeléctrico
Tris-HCl	Clorhidrato de Tris

Contenido

Resumen.....	7
Abstract.....	8
Contenido.....	11
1. INTRODUCCION.....	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. OBJETIVOS.....	24
General.....	24
Específicos.....	24
5. MARCO CONCEPTUAL Y TEÓRICO.....	25
5.1. MATERIA PRIMA.....	25
5.2. ENZIMAS.....	26
5.2.1. Elementos relevantes en el mecanismo de acción de las enzimas.....	27
5.2.2. Tipo de enzimas.....	28
5.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS.....	29
5.4. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN.....	30
5.4.1. Precipitación.....	30
5.4.2. Ultrafiltración:.....	31
5.4.3. Cromatografía de intercambio iónico.....	31
5.4.4. Electroforesis en gel.....	32
5.5. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	32
5.5.1. Método de Kjeldahl (determinación de contenido de nitrógeno).....	32
5.5.2. Método de biuret.....	32
5.5.3. Método de lowry.....	33
5.5.4. Método de Bradford.....	33
5.5.5. Método de UV-visible.....	33
5.6. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	34
5.6.1. Generalidades.....	34
5.6.2. Efectos de la temperatura y pH.....	34
5.7. PECTINASAS.....	35
5.7.1. Clasificación de las pectinasas.....	35
5.7.2. Pectinesterasas:.....	37

5.7.3.	Depolimerasas: (poligalacturonasas)	37
5.7.4.	Propiedades fisicoquímicas	38
5.7.5.	Fuentes de obtención de la enzima pectinasa	38
5.7.6.	Condiciones de actividad y estabilidad de la pectinasa	40
5.7.6.1.	Efecto del medio	40
5.7.6.2.	Efecto de la temperatura	40
5.7.6.3.	Efecto del pH	41
5.7.6.4.	Efecto de iones divalentes, aditivos e inhibidores	41
5.7.7.	Aplicaciones de la enzima pectinasa	42
5.7.8.	Turbidez de los jugos.....	44
5.7.9.	Clarificación jugo	45
6.	METODOLOGÍA.....	46
6.1.	Extracción y caracterización de la enzima pectinasa	46
6.1.1.	Materia prima.....	46
6.1.2.	Preparación de la materia prima.....	47
6.1.4.	Caracterización de la proteína	50
6.2.	Purificación de la enzima	51
6.2.1.	Por precipitación	51
6.2.2.	Por cromatografía de intercambio iónico	51
6.3.	Actividad enzimática: efecto del pH y la temperatura.....	53
6.3.1.	Efecto de la temperatura	53
6.3.2.	Efecto del pH	54
6.4.	Aplicación de la enzima.....	55
6.4.1.	Comportamiento del pH de la pectina en el tiempo.....	55
6.4.2.	Extracción de jugo de mora.....	55
6.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
7.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	57
7.1.	Preparación de la materia prima.....	57
7.2.	Extracción de la pectinasa y determinación del contenido de proteína.....	58
7.2.1.	Contenido de proteína en las muestras después de la extracción	62
7.3.	Purificación de la enzima del extracto crudo por precipitación	66
7.4.	Purificación de la enzima por cromatografía de intercambio iónico (CII).....	70
7.5.	Actividad enzimática: efecto del pH y la temperatura.....	74

7.5.1.	Efecto de la temperatura	74
7.5.2.	Efecto del pH	78
7.6.	Aplicación de la enzima	84
7.6.1.	Comportamiento del pH de la pectina en el tiempo (Desesterificacion).....	84
7.6.2.	Extracción de jugo de mora.....	87
8.	CONCLUSIONES	90
9.	PERSPECTIVAS	92
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
11.	ANEXOS	103

Lista de tablas

Tabla 1. Propiedades bioquímicas de ciertas enzimas de origen microbiano y de frutas.....	41
Tabla 2. cantidades utilizadas para desarrollar la curva de calibración.	51
Tabla 3. Categorización de los frutos de guanábana (<i>Annona muricata</i> . L)	57
Tabla 4. Características observadas para los frutos de chirimoya (<i>annona cherimola</i>).	58
Tabla 5. Contenido de proteína en el extracto crudo de guanábana en buen estado (GB) y en mal estado (GM); y chirimoya en buen estado (CHB) y en mal estado (CHM) después de la extracción con BF y BA.....	63
Tabla 6. Contenido de proteína después de la purificación por precipitación de guanábana en buen estado (GB) y en mal estado (GM); y chirimoya en buen estado (CHB) y en mal estado (CHM).	68
Tabla 7. Contenido de proteína después de la purificación por Sephadex, % proteína en 0,05g purificados con acetona y % proteína relación proteína-pulpa	72
Tabla 8. Comparación del contenido de proteína en el extracto crudo, después de precipitar con acetona y después de purificar por Sephadex	72
Tabla 9: comparación de actividad enzimática de diferentes fuentes de extracción de pectinasa después de los métodos de purificación por precipitación y CII.	73
Tabla 10. Actividad de pectinasa de diferentes fuentes vegetales y diferentes condiciones de extracción.....	82
Tabla 11. Resultados clarificación del jugo de mora.....	87

Lista de figuras y gráficas

Figura 1. a) Guanábana (<i>Anona muricata</i> L.), tomado de: Colombia mágica, https://www.colombiamagica.co y b) Chirimoya (<i>Annona cherimola</i> L.), tomado de: Frutas exóticas, https://www.taringa.net	26
Figura 2. <i>Reacción del biuret. Fuente: tomado de (Quinde Fuentes & Sánchez, 2013).</i>	33
Figura 3. Modo de acción de las pectinasas. a). R = H para PG (poligalacturonasas) y CH ₃ para PMG (polimetilgalacturonasas), b) PE (pectina esterasa), c) R = H para PGL (poligalacturonato liasa) y -CH ₃ para PL (pectina liasa). Tomada de (Garg et al., 2016).....	36
Figura 4. Estructura de la pectina. Fuente: tomado de (Beltrán Gómez, Fonseca Aldana, & Guerrero León, 2007).....	36
Figura 5. Acción de la pectinesterasa sobre la pectina. Fuente: tomado de (Beltrán Gómez et al., 2007)	37
Figura 6. Acción de la depolimerasa sobre la pectina. Fuente: tomado de (Beltrán Gómez et al., 2007)	38
Figura 7. algunas de las industrias en la que se aplican las pectinasas.	44
Figura 8 . Curva de calibración OVA en agua (H ₂ O). Fuente autoría propia.	61
Figura 9. Curva de calibración de OVA en buffer de fosfato pH 7,1 y 0,1 M (BF). Fuente autoría propia.	61
Figura 10. Curva de calibración de OVA en buffer de acetato pH 5,3 y 0,1 M (BA). Fuente autoría propia.	62
Figura 11. Contenido de proteína en el extracto crudo de guanábana en buen estado (GB) y en mal estado (GM); y chirimoya en buen estado (CHB) y en mal estado (CHM) después de la extracción con BF y BA.....	63
Figura 12. Contenido de proteína después de la purificación por precipitación de guanábana en buen estado (GB) y en mal estado (GM); y chirimoya en buen estado (CHB) y en mal estado (CHM) en BA Y BF.	68
Figura 13. Curvas de la purificación Fracción vs Absorbancia (280 nm) para las muestras BF-GB, BA-GB, BF-GM, BA-GM, BF-CHB, BA-CHB, BF-CHM y BA-CHM.....	70
Figura 14. Curvas de Actividad enzimática Buffer Fosfato para las muestras BF-GM, BF-GM, BF-CHB, BF-CHM.....	75
Figura 15. Curvas de Actividad enzimática Buffer Acetato para las muestras BA-CHB, BA-CHM, BA-GB, BA-GM.	76
Figura 16. Curvas de Actividad enzimática pH Buffer Fosfato para las muestras BF-GM, BF-GM, BF-CHB, BF-CHM.....	79

Figura 17. Curvas de Actividad enzimática pH Buffer Acetato para las muestras BA-CHB, BA-CHM, BA-GB, BA-GM.....	80
Figura 18. degradación de la pectina por acción de la pectinestereasa mediante hidrolisis. (Martinez, K.; Cazorla, A.; Escobar, J.; Alvarado, 2017)	85
Figura 19. Efecto de la desesterificación de la pectina, por acción de la enzima extraída a pH 7,1 BF con GB, GM, CHB y CHM, en el tiempo.....	85
Figura 20. Efecto de la desesterificación de la pectina, por acción de la enzima extraída a pH 5,3 BA con GB, GM, CHB y CHM, en el tiempo.....	86
Figura 21: Comparación del efecto de la desesterificación en la pectina, por acción de las enzimas extraídas a pH diferente con GB , GM, CHB y CHM, en el tiempo.	86

Lista de imágenes

Imagen 1. Guanábana (<i>Annona muricata</i> L) en buen estado. Fuente: autoría propia.....	46
Imagen 2. Guanábana (<i>Annona muricata</i> L) en mal estado. Fuente: Autoría propia.....	47
Imagen 3. a) Chirimoya (<i>Annona chelimola</i>) en buen estado y b) Chirimoya (<i>Annona cherimola</i>) en mal estado. Fuente: autoría propia.....	47
Imagen 4. Despulpado de la guanábana (<i>Annona muricata</i> L.). Fuente: autoría propia.....	48
Imagen 5. Peso guanábana en buen estado (GB). Fuente: autoría propia.....	48
Imagen 6. Muestra de guanábana (<i>Annona muricata</i> L.) en buen estado con a) Buffer fosfato (BF-GB) y b) Buffer acetato. Fuente: autoría propia.	49
Imagen 7. Proceso de centrifugación de las muestras durante 10 min a 5000 rpm. Fuente: autoría propia.	50
Imagen 8. Filtrado y conservación de cada una de las muestras en buffer fosfato y acetato. Fuente: autoría propia.....	50
Imagen 9: purificación de la enzima pectinasa por cromatografía de intercambio iónico. Fuente: autoría propia.....	53
Imagen 10. efecto de la temperatura. A) adición de la enzima pectinasa a la pectina a la temperatura correspondiente, B) titulación con NaOH después de inactivar por 10 min en hielo. Fuente: autoría propia.	54
Imagen 11. extracción jugo de mora con enzima purificada por sephadex. Fuente: autoría propia.	56
Imagen 12. Corteza de la guanábana en mal estado (izquierda), pulpa de la guanábana en buen estado (derecha). Fuente: autoría propia.....	57
Imagen 13. a) Corteza de chirimoya en buen estado y b) Corteza y pulpa de chirimoya en mal estado. Fuente: autoría propia.	58
Imagen 14. extracción de enzima guanábana en buen estado, buffer fosfato (izquierda) buffer acetato (derecha). Fuente: autoría propia.....	59
Imagen 15. Extracción enzima buffer acetato (derecha) y fosfato (izquierda) chirimoya en buen estado. Fuente: autoría propia.	59
Imagen 16. Extracción pectinesterasa chirimoya en mal estado, arriba buffer fosfato abajo buffer acetato. Fuente: autoría propia.	60
Imagen 17. Apariencia de la muestra durante (izquierda) y después (derecha) de la purificación por precipitación de las muestras de guanábana. Fuente: autoría propia.	66
Imagen 18. Apariencia de la muestra durante (izquierda) y después (derecha) de la purificación por precipitación de las muestras de chirimoya. Fuente: autoría propia.	67

Imagen 19. Clarificación de jugo de mora con la enzima pectinasa extraída por Sephadex. Fuente Autoría propia 87

Imagen 20. Jugo de mora con la enzima pectinasa Vs jugo de mora sin adición de enzima pectinasa. Fuente autoría propia. 88

1. INTRODUCCION

La guanábana (*annona muricata L*) es una fruta tropical que tiene características óptimas de consumo fresco y para elaboración de productos terminados como mermeladas y jugos (Avila de Hernandez, 2014). Sin embargo, este fruto tiene diferentes problemas para su conservación postcosecha, generalmente se cosechan en un punto de madurez fisiológica (verde oscuro a verde mate) que coincide con su tamaño máximo, porque al dejarlos madurar en el árbol sufren daños como la disminución de las propiedades fisicoquímicas, además, si se cosechan antes de la madurez fisiológica estos frutos no maduran bien y la pulpa generalmente tiene sabor amargo. Es un producto que representa en gran medida pérdidas por prácticas inadecuadas en su manipulación, por lo tanto es un material vegetal importante para ser estudiado (Jiménez-zurita, Balois-morales, Alia-tejacal, Juárez-lópez, & Jiménez-ruíz, 2017)

La chirimoya (*annona cherimola*) es una fruta propia de climas tropicales y semi tropicales, se destaca por ser una fruta con potencial de exportación colectada en la etapa de madurez fisiológica y no en madurez de consumo, sin embargo, debido a su corta vida postcosecha pierde rápidamente sus atributos físicos y químicos; por esta razón se ha visto restringida su oportunidad de mercado, ya que después de siete u ocho días los frutos se ablandan como consecuencia de la producción de etileno y se ve reflejado en el grado de sensibilidad al transporte y almacenamiento por lo que su deterioro es notable (Carrasco, 2013).

La guanábana (*annona muricata L*) y la chirimoya (*annona cherimola*) son frutos que pertenecen al género *Annona* y a la familia *Annonaceae*, son frutas climatéricas de producción en nuestro país, que en su mayoría terminan siendo desperdiciadas y por lo tanto una fuente de contaminación agroindustrial. De allí la importancia de explorar alternativas para su aprovechamiento debido a que aún no se ha desarrollado una estrategia postcosecha eficiente para evitar los diferentes problemas que se presentan en el manejo del fruto como el ablandamiento acelerado durante el almacenamiento, dada su alta tasa de respiración y producción de etileno que aceleran su maduración. Otra característica visible en el proceso de maduración de la chirimoya (*annona cherimola*) y la guanábana (*annona muricata L*) es la reducción de la firmeza que es asociada al incremento en la actividad de las enzimas pectinolíticas que degradan las paredes celulares, además debido a la alta sensibilidad al frío no son posibles períodos largos de almacenamiento, lo que hace difícil su comercialización (Sucapuca, 2013) (Jiménez-zurita et al., 2017)

Las enzimas pécticas o pectinasas representan alrededor de un cuarto en la producción mundial de enzimas alimentarias y se encuentran entre las enzimas industriales más importantes, tienen aplicaciones en la industria alimentaria como en el proceso de preparación de jugos de fruta y clarificación de bebidas, en la industria textil, tratamiento de aguas residuales, desaglomerado de fibras vegetales, pulpa y fabricación de papel

además de la fermentación de café y té entre muchas otras (Zohdi & Amid, 2013). La pectinasa es una enzima que se extrae principalmente de bacterias, levaduras, hongos y plantas, estas últimas tienden a ser más termoestables que las de origen microbiano (García Calvo, 2015). Debido a las numerosas aplicaciones de la pectinasa, se han buscado nuevas fuentes para la obtención de enzimas que permitan el aprovechamiento de los residuos agroindustriales y minimizar la contaminación.

Las pectinasas se clasifican según el sustrato preferido (pectina, ácido péctico u oligo-D-galacturonato). El mecanismo de degradación se da vía eliminación trans o hidrólisis; y el tipo de escisión es aleatorio [endo-] o terminal [exo-] (Handa, 2016) por otro lado, estas enzimas degradan la pectina que forma parte de la pared vegetal liberando así el jugo retenido, aumentando su rendimiento y mejorando la calidad, debido a su mecanismo de acción degradan los enlaces 1,4- α -D-galacturónicos de la pectina y de acuerdo a esto se clasifican en pectinesterasas (PE), poligalacturonasas (PLG) y pectatoliasas (PL) donde las dos primeras se pueden obtener de origen vegetal o microbiano pero esta última es solo sintetizada por microorganismos (Aviles Muso, 2016).

Las extracciones enzimáticas se deben realizar en condiciones óptimas para lograr una alta actividad enzimática y estabilidad debido a que esta enzima es sensible al calor y la actividad disminuye a temperaturas por encima y por debajo de la óptima causando la desnaturalización de la estructura terciaria de la pectinasa. Las enzimas tienen grupos iónicos en su sitio activo que deben estar en una forma estable y la variación en el pH del medio da como resultado cambios en la forma iónica del sitio activo que afecta la velocidad de reacción y disminuye la actividad enzimática, de ahí la importancia que el medio para los ensayos de actividad este a un pH óptimo (Zohdi & Amid, 2013)

Los jugos extraídos de fruta por lo general presentan turbidez debido a la presencia de residuos sólidos de los tejidos vegetales que se desintegran y liberan grandes cantidades de pectina (Martínez, K.; Cazorla, A.; Escobar, J.; Alvarado, 2017), para la fabricación de jugos se le aplica un tratamiento enzimático con enzimas como: la pectinesterasa (PE) que libera metanol de los grupos carboxilos esterificados y transforma la pectina de bajo metoxilo y pectato, poligalacturonasa (PLG) que hidroliza los enlaces glucosídicos próximos a un grupo carboxilo libre y pectinliasa (PL) que actúa sobre la pectina rompiendo enlaces glucosídicos próximos a un grupo metil-éster, la cual se encuentra especialmente en el zumo de frutas y vegetales. Este grupo de enzimas ayudan a hidrolizar las sustancias pécticas aumentando el rendimiento del jugo, eliminando la turbidez y reduciendo la viscosidad (clarificación)(Cazorla, Amarilis & Martínez, 2012). De esta manera, las enzimas son catalizadores biológicos que realizan reacciones bioquímicas a velocidades altas con un alto grado de especificidad y son responsables de algunos cambios químicos de los alimentos, por lo que es de gran importancia su estudio (García Calvo, 2015)

Los jugos de frutas son naturalmente turbios y viscosos en diferentes grados, esto se da especialmente por la presencia de polisacáridos (pectina, celulosa, hemicelulosas, lignina y almidón), proteínas tanino y metales. La apariencia en el jugo de fruta es un factor determinante para los consumidores que viene dado por la alta concentración de pectina la cual conduce a coloides en formación que constituye uno de los principales problemas. Durante el procesamiento de un jugo de frutas se ha probado el uso exitoso de enzimas pectinolíticas en la clarificación reduciendo los inconvenientes, producidos no solo por el sustrato involucrado que puede presentar diferentes concentraciones de pectina, celulosa, hemicelulosas, lignina y otros componentes que originan pérdidas económicas a las industrias de elaboración de jugos (Handa, 2016)(Cazorla, Amarilis & Martinez, 2012).

La principal orientación de las pectinasas está dada hacia la fracción insoluble y soluble de los jugos crudos, las cuales se emplean con éxito para clarificar jugos evitando la gelificación o turbidez, tratar pulpas de fruta para incrementar el rendimiento y extracción de jugo, reducir la viscosidad de los zumos para obtener un producto más estable y concentrado (Avila de Hernandez, 2014).

Teniendo en cuenta la importancia de la enzima PE, el objetivo del presente trabajo fue la extracción, purificación y caracterización de la actividad enzimática de la pectinasa, a partir de frutas exóticas como guanábana (*Annona muricata L.*) y chirimoya (*annona cherimola L.*) en estado óptimo de consumo (buen estado) y en condiciones de no consumo (en mal estado), para determinar el contenido de proteína y establecer la actividad enzimática a través del efecto de la temperatura y pH, lo cual se realizó utilizando como sustrato pectina y mediante un proceso experimental de titulación potenciométrica; donde se evalúa la acción de la enzima en el sustrato, y se titula el ácido obtenido por la acción enzimática de hidrólisis de la enzima; se tuvo en cuenta para determinar la actividad de la enzima la ecuación descritas por Maca & Osorio, (2013) & Díaz-Cruz, C. A; Regalado, C; Morales-Sánchez, E; Velazquez, G; Amaya-Llano, (2016). Para el desarrollo de la investigación se planteó la obtención de un concentrado enzimático de guanábana (*annona muricata L*) en buen estado y mal estado, así como de chirimoya (*annona cherimola*), se hizo la purificación por precipitación con solvente y cromatografía de intercambio iónico, se midió la actividad enzimática de cada concentrado realizando pruebas a diferentes temperaturas en el rango 21°C a 80°C y pH de 4,0 a 8,0, respectivamente; finalmente, se determinó su potencial aplicación utilizando jugo de mora.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una alternativa para aprovechar las propiedades nutritivas de las frutas y alargar el tiempo de vida de estas, es convertirlas en productos como mermeladas, jaleas, jugos u otro tipo de conservas. Para ello es necesario llevar a cabo un proceso de extracción, el cual no es eficiente a través de la acción mecánica; ya que la composición química de la célula vegetal tiene como principal componente una estructura de celulosa, hemicelulosa y pectinas, formando un sistema rígido que dificulta una extracción eficiente del jugo. Ante ello, surge como solución la biocatálisis o uso de las enzimas para la catálisis de reacciones químicas; este proceso ha logrado atención a nivel industrial, debido al potencial biotecnológico que presenta y a sus ventajas como bajo costo de producción y procesos limpios y amigables con el ambiente.

El uso de la enzimas como las pectinas y sus derivados: la PE, PG y la PL que se obtienen directamente de los frutos y son las responsables de su maduración, ablandamiento y descomposición (Cazorla, Amarilis & Martinez, 2012), han sido de interés en el campo de extracción de jugos, clarificación y procesos de filtrado de los mismos (Rajdeo, K., 2016), dado que permiten hidrolizar las sustancias pécticas, mejorando el rendimiento en la obtención de jugos y propiciando mejores propiedades organolépticas y de sabor (Florina D., & Margarida M., 2018). La principal fuente de extracción de la enzima es a través de fuentes microbianas como hongos y bacterias, utilizando procesos de fermentación sumergida y fermentación en estado sólido; sin embargo, aunque son los más utilizados actualmente a nivel industrial, aún existen limitantes, como la optimización de los medios de fermentación, el control de pH y temperatura (Sandhya, Sumantha, Szakacs, & Pandey, 2005); lo cual crea una ventana de estudio para mejorar estos procesos o buscar alternativas diferentes a las fuentes microbianas para obtener la pectinasa (Ahmed et al., 2016).

Teniendo en cuenta que en Colombia hay gran variedad de frutas exóticas y que el consumo de frutas no es igual a la oferta en época de cosecha; además, que la guanábana (*Annona muricata* L.) ha sido estudiada con fines para la extracción de pectina en su estado de madurez (color amarillo-verde), y que pertenece a la familia *Annonaceae*. Surge la pregunta si la chirimoya (*Annona cherimola*.) en estado de madurez (color amarillo-verde), también contiene la enzima pectinasa en una concentración menor o igual a la guanábana (*Annona muricata* L.); además, si las frutas en estado avanzado de madurez (oscurecimiento de la cáscara) tienen un menor o igual contenido de la enzima pectinasa; con el propósito de estudiar la actividad de la enzima en el proceso de hidrólisis de la pectina y de extracción del jugo natural.

3. JUSTIFICACIÓN

En Colombia se cultiva gran variedad de frutas exóticas, debido a los diferentes climas y condiciones geográficas que presenta nuestro país especialmente los departamentos como Huila, Valle del Cauca, Tolima, Boyacá, Antioquia y Cundinamarca los cuales son productores de un gran número de especies y variedades frutícolas (ICA, 2014). Algunas de estas frutas han ingresado al mercado internacional como productos de exportación; sin embargo, esto no ha sido suficiente para abarcar la oferta de estos productos. Actualmente, existen tecnologías para la preservación de frutas, pero en Colombia aún no se han adoptado, por lo cual, muchas de las frutas sufren daños durante el proceso de transporte y almacenamiento, lo cual conlleva a la acumulación de desechos naturales sin uso industrial. Algunos ejemplos de ello son la naranja, aguacate, mango, y guanábana. Dada la importancia nutricional de las frutas, una alternativa para preservar sus propiedades y alargar el tiempo de vida de estas, es convertirlas en productos como mermeladas, jaleas, jugos u otro tipo de conservas, que disminuyan la pérdida económica y el impacto ambiental. (Cazorla, Amarilis & Martinez, 2012)

Por ello, como alternativa se propone la extracción de pectinasa desde pulpas de frutas. Actualmente, se conocen procesos de extracción a partir de la pulpa de algunas frutas como papaya (*Carica papaya* L.) (Fayyaz, Asbi, Ghazali, Man, & Jinap, 1994), pitaya roja (*Hylocereus polyrhizus*) (Zohdi & Amid, 2013), guanábana (*Annona muricata*) (Arbaisah, Asbi, Junainah, & Jamilah, 1997), limón (*Citrus limon*) (Macdonald, Evans, & Spencer, 1993), mandarina (Rillo et al., 1992), durazno (*Prunus armeniaca* L.) (Özler, Karakuş, & Pekyardimci, 2008); y verduras como el tomate (Pressey & Woods, 1992), o tubérculos como la papa (Montañez Sáenz et al., 2000). De esta manera para el presente trabajo se obtuvieron frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) y chirimoya (*Annona cherimola* L.) del mercado mayorista de la ciudad de Bogotá en el sector el Restrepo teniendo en cuenta las etapas de maduración comercial, para busca complementar estudios previos acerca de la extracción de pectinasa desde guanábana (*Annona muricata* L.) en estado de maduración avanzado o no apto para el consumo; y dado que la chirimoya (*Annona cherimola*) es una fruta que pertenece a la misma familia de la guanábana, *Annonaceae*, es de interés estudiar sus propiedades fisicoquímicas, como la presencia de la enzima pectinasa. De esta manera se busca alternativas diferentes a las microbianas para la extracción de pectinasa, el aprovechamiento de frutas en estado de descomposición y explorar nuevas frutas que permitan la obtención de la pectinasa; una enzima de gran importancia para la industria de alimentos. Además, el aprovechamiento de frutas en mal estado, las cuales terminan como desechos naturales, generando un impacto ambiental y pérdidas económicas para los productores.

4. OBJETIVOS

General

Comparar la actividad enzimática de la pectinasa obtenida a partir de frutas exóticas como guanábana (*Annona muricata L.*) y chirimoya (*annona cherimola L.*), en el proceso de hidrólisis de pectina y de extracción de jugo natural con el fin de establecer el tipo y estado de fruta con mayor actividad.

Específicos

- ❖ Determinar el contenido de enzima pectinasa de chirimoya (*Annona cherimola.*) en comparación con lo reportado y obtenido con la guanábana (*Annona muricata L.*).
- ❖ Establecer la actividad enzimática de la pectinasa obtenida a partir de chirimoya (*Annona cherimola.*) y guanábana (*Annona muricata L.*); a través del estudio del efecto del pH y temperatura.
- ❖ Evaluar la actividad enzimática de las diferentes pectinasas determinadas en el proceso de hidrólisis de pectina y la extracción de jugo natural.

5. MARCO CONCEPTUAL Y TEÓRICO

5.1. MATERIA PRIMA

En Colombia, la familia Annonaceae se representa por 206 especies y 137 en la región amazónica los cuales son conocidos generalmente por frutos de guanábana y chirimoya, siendo este último un cultivo que tolera suelos desde arenosos hasta franco arcillosos el cual se caracteriza por un árbol semicaducifolio de altura entre los 3 y 7 m, por otro lado, la planta de guanábana se origina en regiones tropicales de América el cual es un árbol alto, ramificado y frondoso (Jiménez-zurita et al., 2017) (Avila de Hernandez, 2014).

La guanábana (*Annona muricata* L.) *Figura 1(a)*) es una fruta perteneciente a la familia Annonaceae y clasificado como climatérico la cual tiene un adecuado desarrollo a temperaturas entre 25 y 28°C, altitudes no mayores a 1200 msnm y humedad relativa entre 60 y 80%, tiene una forma oblonga cónica el cual puede llegar medir entre 10 y 30 cm y un peso de 1 a 5 kg, este fruto requiere un especial cuidado en su manejo debido a que necesita condiciones específicas de temperatura, humedad, empaque y almacenamiento por su susceptibilidad a daños físicos, químicos y microbiológicos, debido a lo anterior se ha hecho necesario generar mayor información sobre el metabolismo de este fruto y las técnicas adecuadas de conservación para mantener los estándares de calidad en los mercados (Jiménez-zurita et al., 2017)(Guan, 2010).

Los frutos de chirimoya (*Annona cherimola*.), son globosos a los que se les conoce cinco formas: lisa, impresa, mamilata, tuberculata y umbonata, tienen un peso en término medio de 250 a 800 g, su color característico es verde-amarillento dado por la clorofila de los tejidos de la piel, (*Figura 1 (b)*), una de las características está reflejada en el alto grado de sensibilidad debido a que se ablandan rápidamente después de su cosecha como consecuencia de la acelerada producción de etileno, es por ello que es una fruta altamente perecedera generando la pérdida rápida de sus atributos fisicoquímicos, por lo anterior generalmente estos frutos son colectados en su madurez fisiológica y no en su madurez de consumo (Carrasco, 2013)(Sucapuca, 2013).

La *Annona muricata* L. es una planta tropical que pertenece a la familia *Annonaceae*. Tiene gran importancia debido a sus propiedades medicinales y actividad biológica de algunos de sus metabolitos y extractos. Dado el valor del contenido de su pulpa, esta fruta es de interés en varias áreas de estudio como medicina, biología, farmacología, química, entre otras (Coria-téllez, Montalvo-gonzalez, Yahia, & Obledo-vázquez, 2016). Esta fruta, ha sido caracterizada, encontrándose que presenta tres tipos de enzimas, la pectinasa, la catalasa y la peroxidasa (Badrie & Schauss, 2010). Por otro lado se encuentra la chirimoya (*Annona cherimola*.) es una fruta que pertenece a la misma familia de la guanábana (Guerrero, 2007), siendo una fruta exótica originaria de los andes, entre Perú y Ecuador; es de interés estudiar sus propiedades fisicoquímicas, parámetros de los cuales se destacan el color,

tamaño, firmeza de la pulpa; características altamente afectadas por la presencia de la enzima pectinasa, su pH tiende a disminuir a medida que el fruto madura, presentando un comportamiento inverso con respecto a la acidez titulable total (Carrasco, 2013).

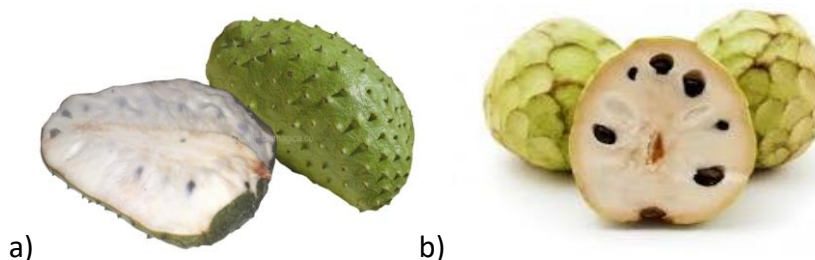


Figura 1. a) *Guanábana (Anona muricata L.)*, tomado de: *Colombia mágica*, <https://www.colombiamagica.co> y b) *Chirimoya (Annona cherimola L.)*, tomado de: *Frutas exóticas*, <https://www.taringa.net>

De acuerdo con las normas técnicas colombianas NTC 756 - Frutas y hortalizas frescas. Toma de muestras y la NTC 5208 - Frutas frescas. Guanábana. Especificaciones; el estado de madurez de consumo de las frutas frescas está dado por sus características de apariencia, consistencia, textura, sabor y aroma. Al hablar de apariencia, el fruto debe estar libre de manchas causadas por el sol, textura no blanda, y los rudimentos estelares no deben estar quebrados, o al menos estos defectos no deben cubrir el 25% de la superficie. En cuanto a propiedades fisicoquímicas, la consistencia de un fruto en estado de madurez fisiológica se es de 5,72 kgf/cm, el valor mínimo de sólidos solubles totales es de 13,5 °Brix y el valor de pH tiene un valor mínimo de 3,38. Por su parte, la coloración verde y verde mate, determinan un estado apto para consumo. Dado que no existe una norma específica para la Chirimoya, se tuvo en cuenta las normas anteriormente mencionadas.

5.2. ENZIMAS

Las enzimas son biomoléculas formadas a partir de largas cadenas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, se caracterizan por ser catalizadores biológicos que desarrollan reacciones sintéticas y de degradación en los organismos vivos a altas velocidades, presentando un alto poder catalítico característica que las hace más atractiva para actividades comerciales (Bhardwaj, Degrassi, & Bhardwaj, 2017). Presentan la ventaja que pueden ser recuperadas y tienen un alto grado de especificidad a sustratos. Dentro de sus principales características se tiene su poder catalítico, evitan alterar el equilibrio de la reacción, trabajan en bajas concentraciones, se pueden recuperar sin alteraciones, son

realmente activas y específicas, y su actividad catalítica puede ser regulada (Peña & Quirasco, 2014) (Badui Dergal, 2006).

Las enzimas en diferentes casos se forman por una parte proteica llamada apoenzima y una no proteica llamada cofactor (Cevallos, G.; Chafra, 2015); dada esta característica, las proteínas presentan un centro activo por el cual interactúan con las moléculas del sustrato.

Por otro lado, las enzimas han tenido aplicabilidad en la industria de los alimentos como aditivos para mejorar su aspecto, textura, sabores y en general sus propiedades organolépticas y regenerar el proceso de fabricación. Su aplicación se ha extendido dentro de la industria alimentaria en el desarrollo de envases activos y biosensores, así mismo los sectores de esta industria que emplean enzimas son: el sector del almidón y azúcar, los productos lácteos, la panificación y productos de trigo, las industrias de las grasas y aceites, los productos cárnicos, la industria cervecera, además de los jugos y vinos (Moral, Ramírez-coutiño, & García-gómez, 2015).

5.2.1. Elementos relevantes en el mecanismo de acción de las enzimas

Energía de activación: se conoce como la energía que deben tener las moléculas para iniciar la reacción en donde se produce la transformación de unas moléculas iniciales llamadas sustratos (S) en sustancias finales o productos (P) dadas en las reacciones bioquímicas.

Biocatalizador: dentro de su función esta disminuir la cantidad de energía necesaria para que se produzca una reacción química en un ser vivo, la ventaja que presentan es que no se alteran en el proceso, además actúan de dos formas:

1. Se fijan en el sustrato: debilitan sus enlaces y facilitan su ruptura.
2. Atraen hacia su superficie los reactivos lo cual facilita su encuentro y por lo tanto su reacción.

Reacciones enzimáticas: están dadas por la unión de la enzima (E) y el sustrato (S) formando el complejo enzima-sustrato (ES) para finalmente transformarse el sustrato (S) en producto (P) y así queda sola la enzima (E) para unirse nuevamente al sustrato (Orozco, 2012)(García & Chafra, 2015).

Constante de equilibrio: siempre tiene un valor constante el cual se define por la velocidad de la reacción en uno u otro sentido, independientemente de este o no presente el catalizador. Se da de la siguiente forma:

$$K = [P]/[S]$$

Donde:

K= Constante de equilibrio

[P]= Concentración de producto

[S]= Concentración de sustrato

5.2.2. Tipo de enzimas

- **Hidrolasas:** estas enzimas catalizan reacciones por hidrólisis, es decir, que rompen enlaces covalentes por la introducción de una molécula de agua. Algunas de estas son amilasas, esterasas, glicosidasas, lipasas, proteasas, entre otras. Usadas frecuentemente en la industria alimentaria como aditivos (Garcia & Chafra, 2015)(Badui Dergal, 2006).
- **Las carbohidrasas** es uno de los grupos más usados en la industria de alimentos en la producción de endulzantes obtenidos de almidón usados como enmascaramiento de gustos amargos o desagradables, este grupo también es utilizado en los derivados de panificación con el objetivo de evitar el endurecimiento Por otro lado, las proteasas que deshacen enlaces peptídicos y combinan los aminoácidos de proteínas establecen a nivel industrial un grupo usado para darle cuerpo y sabor a la cerveza, en el proceso de panificación mejora la textura y aumenta el volumen, en el queso da sabor de maduración.
- **Transferasas:** se caracterizan por catalizar reacciones de transferencia de grupos funcionales entre las moléculas, las más estudiadas son las glicosil, aminoy foto-transferasas. Tienen gran importancia en la elaboración de alimentos que aportan a la salud del consumidor, generan azúcares que tienen utilidad como prebióticos y estos favorecen los microorganismos del intestino (Peña & Quirasco, 2014).
- **Oxidoreductasas:** están ligadas a las reacciones de óxido reducción por lo que son catalizadas por ellas. Dentro de este grupo se conocen las deshidrogenasas, oxidasas, oxigenasas y peroxidasas. Esta coenzima interviene en el proceso de Oxidación de alimentos (oscurecimiento de frutas), también interviene en la degeneración de las vitaminas.
- **Liasas:** se caracterizan por romper enlaces sin añadirles agua, forman dobles enlaces por eliminación de o adición de grupos de doble enlace. Dentro de estas se encuentran las aldosas, descorboxilasas, deshidratasas y pectina liasa.

- **Isomerasas:** las reacciones de isomerización molecular son catalizadas por este tipo de enzimas, entre ellas se encuentran las epimerasas, racemasas y mutasas. inicialmente usadas para la fabricación de jarabes azucarados a nivel industrial.
- **Ligasas:** catalizan la unión de dos moléculas utilizando la energía lograda por la degradación del adenosín trifosfato (ATP). Se encuentra dentro de este grupo carboxilasas, peptosintetasas (Cevallos, G.; Chafra, 2015)(Badui Dergal, 2006) (Peña & Quirasco, 2014).
- **Pectinasa:** Son un complejo de enzimas que degradan en conjunto a la pectina, un polímero de tipo heteropolisacárido que se puede encontrar en la pared celular de las plantas principalmente en la lámina media (Cevallos, G.; Chafra, 2015).

5.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS

Las proteínas tienen una primera etapa de extracción que es su liberación de las células que lo contienen. Hay diferentes métodos de ruptura mecánica de los que podemos nombrar: 1. Trituración con arena, 2. Trituración en mezclador de alta velocidad, 3. Homogeneización a pistón, 4. Prensa francesa, 5. Sonicación, y 6. Congelación con nitrógeno líquido y macerado.

Por otro lado, se deben utilizar procedimientos como, extraer con buffer que tenga SDS (sodio dodecil sulfato), extraer con Ácido tricloroacético (TCA) frío al 10% (p/v), adicionar inhibidores de peptidasas al buffer de extracción, trabajar a baja temperatura durante períodos cortos de tiempo, utilizar los buffers con pH por debajo o por encima del óptimo, agregar agentes protectores como el dimetilsulfóxido y glicerol, también se puede adicionar agentes quelantes como el Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) para remover los cationes bivalente, todo lo anterior con el fin de prevenir la proteólisis durante la extracción (Quinde & Sánchez, 2013).

La purificación de una enzima es uno de los procesos más importantes debido a la separación de centenares de proteínas por una célula, por lo tanto, es necesario conocer la química de cada molécula y la naturaleza del medio cromatográfico que se utilizó para la separación. Tener en cuenta la solubilidad de cada proteína es uno de los métodos eficaces y más simples porque varía entre cada proteína (Cucaita Vasquez N A, 2010). Para llegar a un grado de purificación alto y un rendimiento elevado es necesario seguir una cadena de etapas que darán este resultado porque no existe una técnica única o un conjunto de métodos por los cuales todas y cada una de las proteínas se puedan aislar (Quinde Fuentes & Sánchez, 2013).

5.4. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN

Dentro de los métodos más utilizados para purificar enzimas se encuentra: la precipitación, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, y electroforesis. La ultrafiltración se da por diferencia en el peso molecular; y las demás por interacciones electrostáticas. Es importante considerar que, durante la purificación y el almacenamiento siguiente de la proteína, se pueden presentar procesos que afectan la calidad: desnaturalización, degradación, agregación y pérdida de función. Cuidar el método de purificación que permita purificar rápido la proteína y bajo condiciones estables garantiza la estabilidad de la enzima y una purificación exitosa, de acuerdo con las recomendaciones de Carbajal, A. (2016).

5.4.1. Precipitación

Es usada en proteínas como proceso para separar a través de la adición de sales, inducida al cambio de pH o potencial iónico, y añadiendo solventes orgánicos. Después de esto, el precipitado se puede rescatar por dos métodos: filtración, por lavado o por re suspensión en un buffer adecuado (Handa, 2016). La precipitación se puede dar por:

- **Precipitación por punto isoeléctrico:** Este procedimiento consisten en realizar un ajuste de pH de una solución en el parámetro cercano o igual al punto isoeléctrico de la enzima estudiada. Este proceso se concluye cuando las cargas positivas como negativas presentes en la superficie se neutralizan unas con otras.
- **Precipitación por salado o “salting-out”:** Este método puede estabilizar la proteína contra la desnaturalización, este método no es igual que por ajuste de pH por lo tanto se debe utilizar una inicial y continuar con la otra con el fin de obtener una mejor purificación de las proteínas, por otro lado, esta técnica depende de la estructura de la proteína en cuando si es hidrofóbica o no. En los diferentes estudios realizados para el proceso de precipitación de enzimas o proteínas se ha concluidos que el sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ es la mejor sal, debido a su solubilidad y las pocas variaciones que presentan en el rango de temperatura de 0 a 30°C, adicionalmente la enzima es estable en el tiempo en soluciones de sal de 2 a 3 M (Proteinas, 2017)(Handa, 2016).
- **Precipitación por solventes orgánicos:** esta precipitación viene dada porque el solvente presenta una constante dieléctrica menor que la del agua por lo tanto se produce un aumento en las fuerzas de atracción entre cagas opuestas y

disminución en el grado de ionización de los radicales de las proteínas. En este caso se deben tener en cuenta características del solvente como: que sea completamente miscible en agua, no reaccione con las proteínas, que sea un buen agente precipitante y debe ser seguro (Ochoa, 2010).

5.4.2. Ultrafiltración:

En esta técnica el agua y diferentes moléculas de bajo peso molecular se pasan por una membrana parcialmente permeable utilizando energía transmembranal a través de métodos como la centrifugación y de presiones elevadas. Las membranas de ultrafiltración cuentan con poros muy pequeños que pueden diferenciar la dimensión y estructura de las moléculas disueltas, además son determinadas según la masa molecular de los solutos a detener. La purificación de proteínas se puede llevar a cabo por esta técnica utilizando métodos acoplados por ejemplo para la purificación de enzimas pécticas hay investigaciones que muestran resultados satisfactorios aplicando ultrafiltración y cromatografía de intercambio iónico para la recuperación pectinasas (Rojas Muñoz, 2009).

5.4.3. Cromatografía de intercambio iónico

Las enzimas pueden dividirse en función de su carga inicial mediante este proceso en donde una proteína con carga positiva neta a pH 7 por lo general se une a una columna de perlas que contenga grupos carboxilo, mientras que una con carga negativa fluye a través de la misma. Es decir que una proteína que no tiene carga neta a un pH equivalente a su punto isoeléctrico (pI) no puede interactuar con la matriz o fase estacionaria cargada, a un pH por encima del punto isoeléctrico una proteína puede unirse a una matriz cargada positivamente mientras que a un pH por debajo de su pI la proteína se puede unir a una matriz cargada negativamente (Mayolo-Deloisa, K., & Martínez, L.M., & Rito-Palomares, 2012). Las columnas utilizadas para proteínas cargadas positivamente son las de carboximetilcelulosa con carga negativa, y para el caso de las proteínas con cargas negativas pueden separarse con columnas de dietilaminoetil celulosa cargada positivamente (On & Whitaker, 2012). Según Carbajal, A. (2016) en su trabajo purificación de proteínas afirma que todas las proteínas pueden unirse a columnas de intercambio catiónico como aniónico del pH del buffer si se ajusta adecuadamente (Cucaita Vasquez N A, 2010).

5.4.4. Electroforesis en gel

La electroforesis consiste en la velocidad de migración de una proteína (o cualquier molécula) en un campo eléctrico la cual depende de la intensidad del mismo, la carga neta sobre la proteína y el coeficiente de fricción. Las separaciones electroforéticas por lo general se llevan a cabo en geles porque sirven como tamiz molecular, lo cual mejora la separación, por lo que las moléculas que son pequeñas en comparación con los poros en gel se mueven fácilmente a través del mismo y las moléculas más grandes que los poros del gel son casi inmóviles. Generalmente, se realiza en una placa delgada y vertical de poliacrilamida (Cucaita Vasquez N A, 2010).

5.5. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

5.5.1. Método de Kjeldahl (determinación de contenido de nitrógeno)

Está básicamente basado en la determinación de nitrógeno protico, se caracteriza por ser muy exacto, pero se utiliza poco debido a que una de sus desventajas es que es lento para la determinación de proteínas totales en clínica, pero se usa mucho en la determinación de proteínas en alimentos (Roca, P; Oliver, J; Rodriguez, 2003).

5.5.2. Método de biuret

Este método es generalmente conocido porque forma complejos de coloración azul con sales de Cu^+ . El biuret reacciona con proteínas que en su estructura cuentan con al menos dos enlaces peptídicos o dos grupos amida continuos, grupos que son suficientes para reducir el Cu^{2+} a Cu^+ , por lo tanto, la reacción del biuret permite la determinación cuantitativa de proteína total por espectrometría siendo los puntos máximos de absorción electromagnética entre 330nm y 540 nm, siendo esta primera longitud de onda (330nm) a la que presenta mayor sensibilidad, y también es más fácil que presente interferencia por la aparición de otros compuestos. Por otro lado, la fuerza de la coloración es directamente proporcional al total de proteínas (enlaces peptídicos). Finalmente este método creado por la ley de Beer determina la cuantificación de proteínas con una curva de calibración (Yanira & Jabel, 2014)(Quinde Fuentes & Sánchez, 2013) que se puede construir con ovoalbúmina u otro estándar.

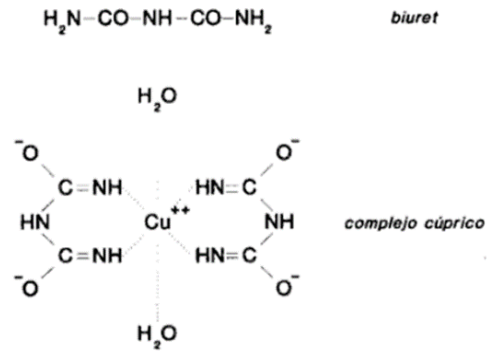


Figura 2. Reacción del biuret. Fuente: tomado de (Quinde Fuentes & Sánchez, 2013).

5.5.3. Método de lowry

Emplea tres sistemas para causar la coloración por existencia de proteínas, en primer lugar es similar al método de biuret por lo tanto este forma complejos de coordinación con dos enlaces peptídicos sucesivos de las proteínas para dar el color azul, en segundo lugar el compuesto reduce el reactivo de Folin-Ciocalteu dando un color azul más fuerte que el anterior y en el tercer lugar el reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con los restos de tirosinil de la cadena polipeptídica el cual produce un color azul en consecuencia de la reducción del fosfomolibdato en medio básico. Este método es mayormente más sensible que el de biuret en el cual se pueden utilizar lecturas de absorción en el espectro de entre 500 y 700 nm (Proteínas, 2017).

5.5.4. Método de Bradford

Está fundamentado en la unión de las proteínas al colorante azul brillante de coomassie G-250, el cual provoca el desplazamiento mayor de absorción de este compuesto de 465 nm (rojo) a 595 nm (azul), por lo que se mide la absorbancia del complejo proteína-colorante a 595nm. Este método depende básicamente de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas (Proteínas, 2017).

5.5.5. Método de UV-visible

Este método es utilizado ampliamente en los sectores biotecnológico y alimentario debido a que ayuda a obtener la concentración de las proteínas de forma sencilla y rápida evitando la destrucción de las muestras. Siendo además una técnica de cuantificación que permite la determinación de concentración de proteínas totales (Valiño Llamazares, Virginia; Valiente Barroso & San Roman, María; Ibañez Mendizabal, Raquel y Ortiz Uribe, 2014). El fundamento de la espectrometría se debe a la capacidad de las moléculas para absorber las radiaciones dentro del UV- visible y esta eficiencia de absorber depende de la estructura atómica y las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, constante dieléctrica y

temperatura), por esto es un instrumento importante para la determinación y caracterización de biomoléculas (Díaz et al., 2011). En el caso de las proteínas estas absorben en el ultravioleta cercano a 280 nm debido a la presencia de aminoácidos como triptófano y tirosina. Sin embargo, tiene como desventaja la presencia de interferencias como otros cromóforos (Walker, 1948).

5.6. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

5.6.1. Generalidades

La acción de la enzima o actividad enzimática, se puede determinar a través de la medida de la velocidad con que se consume el sustrato o se produce el producto, en presencia de la enzima bajo condiciones adecuadas. La actividad enzimática depende de factores como concentración del sustrato, concentración de la enzima, temperatura, pH, fuerza iónica, y presencia de inhibidores o activadores (Quesada, 2013). Estos factores son de importancia, dado que de ellos depende la desactivación y estabilidad de la enzima.

La actividad de la enzima se ve afectada por el sustrato de acuerdo a la concentración. Así, cuando se tienen concentraciones bajas de sustrato, la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración del mismo, y se presenta una reacción de primer orden. A medianas concentraciones de sustrato, se tienen reacciones de orden mixto, y a concentraciones altas de sustrato, la reacción es de orden cero, dado que se da la saturación de la enzima con el sustrato, por lo tanto, entre más alta sea la concentración del sustrato, mayores son las posibilidades que la enzima interactúe con este (Quesada, 2013).

Lo anterior se define a través del comportamiento cinético de Michaelis-Menten; sin embargo, no todas las enzimas presentan estos comportamientos. Por ejemplo, las haloenzimas, las cuales se componen de la proteína (apoenzima) y el grupo prostético no proteico (cofactor o coenzima); las enzimas alostéricas, que presentan otro sitio específico adicional al sitio activo (García & Chafra, 2015).

5.6.2. Efectos de la temperatura y pH

Temperatura

Es un factor determinante en la actuación de las enzimas debido a que cada una tiene una temperatura óptima en donde por encima o por debajo de esta afecta la actividad enzimática, haciéndola más lenta (Orozco, 2012). El aumento de la temperatura genera

un aumento de la velocidad de reacción hasta una temperatura óptima; porque conforme la temperatura aumenta el movimiento molecular también se incrementa, y así mismo las colisiones entre enzima y sustrato, pero al ser proteínas tienen un límite de temperatura en el cual se desnaturalizan y pierden su efectividad lo cual se puede dar con temperaturas superiores a 45 °C, dependiendo de la naturaleza de la enzima (Quesada, 2013).

El pH

El pH afecta la actividad enzimática dado que cada enzima tiene un pH o intervalo de pH óptimo diferente y cuando este varía la funcionalidad de la enzima se altera. Dado que el carácter iónico puede ser afectado por cambios en el comportamiento de los grupos amino y carboxilo en la superficie proteica, afectando así las propiedades catalíticas de una enzima. Por lo anterior, se debe estudiar el pH óptimo de la enzima y definir las condiciones óptimas para no desnaturalizar la enzima (Orozco, 2012).

5.7. PECTINASAS

Las pectinasas son enzimas en crecimiento del sector biotecnológico que son producidas por vegetales, frutas y microorganismos como hongos, bacterias, levaduras, insectos, nematodos y protozoos (Bhardwaj et al., 2017); estas enzimas pectinolíticas son un grupo heterogéneo que hidroliza las sustancias pécticas presentes en las plantas las cuales han sido ampliamente estudiadas al ser utilizadas y distribuidas a gran escala (Mangesh N Kothari & Baig, 2013). Las enzimas pécticas en las plantas son importantes debido a que dentro de su función está el alargamiento y el crecimiento celular, así como la maduración de la fruta. (A Ramdas Shet,; S. Vijaykumar Desai, 2018)(Alimardani-theuil, Gainvorschlaiss, & Duchiron, 2011).

Son utilizadas en la industria de alimentos para la obtención de pulpas, cervezas, vinos y jugos debido a que son las responsables de la degradación de largas y complejas moléculas que forman la pectina (Quesada, 2013). Las enzimas pécticas, incluyen pectinasa, pectinmetilesterasa, endo- y exo-poligalacturonasas, pectinacetilesterasa, ramnogalacturonasa, endo- y exo-arabinasas, se usan en la extracción y clarificación de jugos de frutas y vegetales, (Sharma, Patel, & Sharma, 2014). A continuación, se describen:

5.7.1. Clasificación de las pectinasas

Las pectinasas se clasifican en tres grupos según su mecanismo: las encargadas de la desesterificación, dentro de estas se encuentran las que remueven los grupos metoxilo

que hacen parte de la pectina formando ácido péptico las cuales se llaman **pectinesterasas (PE)**, las despolimerizantes, que combaten el ácido galacturónico que se encuentra en la pectina, descomponiendo los enlaces α -1,4, estas son catalogadas como **hidrolasas** (poligalacturonasas (PG) y polimetilgalacturonasas (PMG)), y las **liasas** (poligalacturonato liasa (PGL) y polimetilgalacturonato liasa) las cuales se encargan de catalizar la escisión de un enlace -1,4-glucosido en ácido péptico y pectina por reacción de trans-eliminación creando galacturonatos insaturados y galacturonatos de metilo, en la Figura 3 se puede apreciar cada uno de los mecanismos de reacción de estas enzimas (Garg et al., 2016), (Quesada, 2013), (Biz et al., 2014) (Alimardani-theuil et al., 2011).

Cabe resaltar que en las industrias las pectinasas ácidas se usan durante la extracción y clarificación de jugos de fruta, mientras que las pectinasas alcalofílicas se usan en el desgomado de fibras y tratamiento de aguas (Patil & Chaudhari, 2010). Principalmente estas enzimas son las responsables de la degradación de las moléculas largas y complejas llamadas pectina (Figura 4), (Handa, 2016)

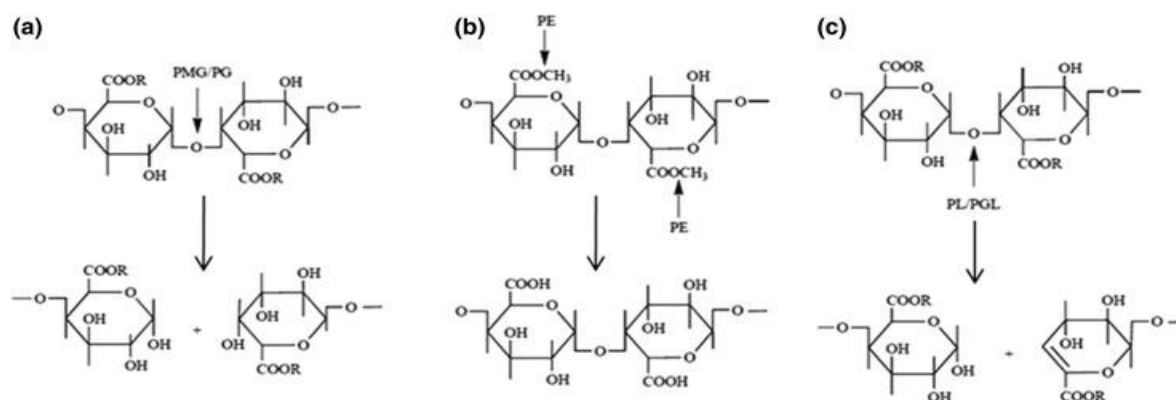


Figura 3. Modo de acción de las pectinasas. **a)** R = H para PG (poligalacturonasas) y CH_3 para PMG (polimetilgalacturonasas), **b)** PE (pectina esterasa), **c)** R = H para PGL (poligalacturonato liasa) y $-\text{CH}_3$ para PL (pectina liasa). Tomada de (Garg et al., 2016)

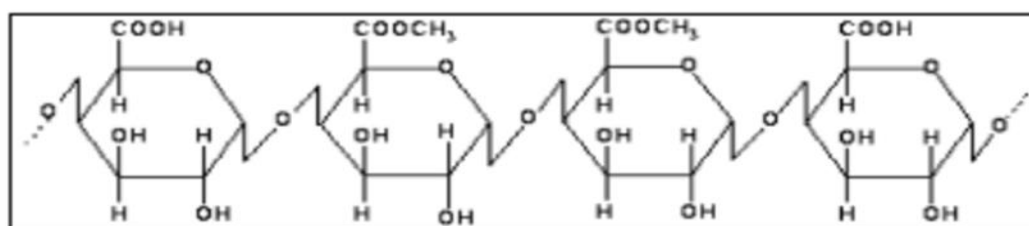


Figura 4. Estructura de la pectina. Fuente: tomado de (Beltrán Gómez, Fonseca Aldana, & Guerrero León, 2007)

Como se mencionó anteriormente las enzimas pécticas se clasifican en desesterificación (pectinesterasas) y despolimerización (pectinasas: hidrolasas y liasas) en función de su mecanismo de degradación. A continuación, se amplía la información acerca de estas enzimas.

5.7.2. Pectinesterasas:

Catalizan la desesterificación del grupo metoxilo de la pectina que forma el ácido péctico, Figura 5, en frutas y vegetales durante las fases de maduración, procesamiento y reserva; además, se involucran en los cambios de la sustancia péctica (Garg et al., 2016)(A Ramdas Shet,; S. Vijaykumar Desai, 2018).

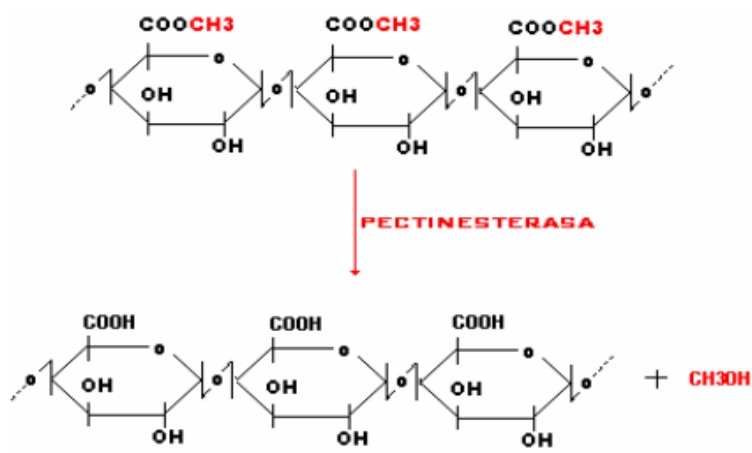


Figura 5. Acción de la pectinesterasa sobre la pectina. Fuente: tomado de (Beltrán Gómez et al., 2007)

5.7.3. Depolimerasas: (poligalacturonasas)

Dividen enlaces α -(1,4)-glucosídico en ácido péctico en medio de las moléculas simples de ácido galacturónico por hidrólisis (hidrolasas) de sustancias pécticas o por β -eliminación (liasas) (Khan, Nakkeeran, & Umesh-kumar, 2013). Se subdivide en dos tipos: Endopoligalacturonasa que catalizan la hidrólisis aleatoria de enlaces glucosídicos α -(1,4)-ácido y la poligalacturonasa que cataliza el hidrólisis en forma secuencial de α -(1,4)-glucosídico en enlaces sobre ácido péctico, Figura 6 (P. Kumar & Suneetha, 2014)(A Ramdas Shet,; S. Vijaykumar Desai, 2018).

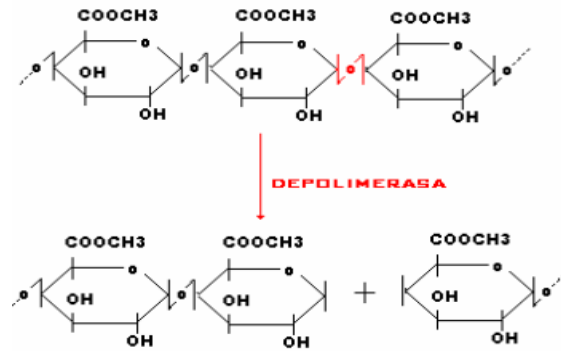


Figura 6. Acción de la depolimerasa sobre la pectina. Fuente: tomado de (Beltrán Gómez et al., 2007)

5.7.4. Propiedades fisicoquímicas

Las pectinas son clasificadas como proteínas de tamaño medio, con pesos moleculares de entre 25-54 kDa, estas son activas como monómeros. El punto isoelectrico (pI) de la enzimas pectinesterasa o pectinasa puede variar de entre 3,1 y 11 valores que se han encontrado en PE fúngicas y vegetales, por lo tanto los valores de pls alcalinos o neutros presentes en pectinasa de vegetales se puede explicar como el alto grado de asociación con la pared celular ligeramente ácida. Según lo anterior se ha establecido por diferentes estudios de investigación que las PE fúngicas tienen valores de pI mas ácidos que las de origen vegetal y la mayoría de las enzimas pécticas de origen bacteriano. Por lo tanto el valor de pH óptimo de esta enzima varía desde alcalino para las enzimas pécticas de origen vegetal o bacteriano hasta ácido para la mayoría de origen fúngico (Vita, 2013).

5.7.5. Fuentes de obtención de la enzima pectinasa

La obtención de enzimas está dada principalmente de tejido animal, tejidos vegetales o por microorganismos seleccionados utilizando el proceso de fermentación. Las enzimas más utilizadas en la industria de alimentos son las que provienen de fuentes microbianas (*Bacillus*, *Aspergillus*, *Amycolata*, entre otros), ya que son más estables y su producción es más segura y conveniente (Moral et al., 2015)(Khan et al., 2013). Sin embargo, dada la importancia de las pectinasas en la industria alimenticia para su uso en la preparación de jugos, mejoras en el proceso de filtración, refinamiento de las pectinas para su uso como gelificantes, proveer propiedades organolépticas a los jugos y vinos, entre otras; las investigaciones han tomado atención en explorar nuevas alternativas para su extracción. Dentro de estas se encuentra el uso de la pulpa de algunas frutas como papaya (*Carica papaya L.*), pitaya roja (*Hylocereus polyrhizus*) (Zohdi & Amid, 2013), guanábana (*Anona muricata*), limón (*Citrus limon*), mandarina, durazno (*Prunus armeniaca L.*); y verduras como el tomate, o tubérculos como la papa (Rodríguez Nieto, Jeimy Marcela, & Restrepo Sánchez, 2011).

Las pectinasas son producidas por una gran cantidad de organismos como las bacterias y levaduras, pero el mundo microbiano ha sido muy heterogéneo en la capacidad para sintetizar diferentes tipos de enzimas pectolíticas con diferentes mecanismos de acción y propiedades bioquímicas. Esta fuente ha sido primera en ser explorada y donde se ha establecido que las enzimas pécticas son producidas tanto por microorganismos procariotas los cuáles sintetizan principalmente pectinasas alcalinas y eucariotas que son principalmente hongos que sintetizan pectinasas ácidas (Handa, 2016).

Dentro de la fuente microbiana (hongos, bacterias) encontramos: *Aspergillus Niger* especie fúngica más utilizada para la producción industrial de enzimas pectinolíticas la cual ha sido genéticamente modificada para producir enzimas más puras y sin efecto secundarios; (Khan et al., 2013) (A Ramdas Shet,; S. Vijaykumar Desai, 2018), por otro lado, también han ganado importancia los géneros *Rhizopus*, los *Ascomycetus* y *Basidiomycetes* principalmente los hongos blancos y en mal estado. Dentro de las bacterias se tiene de usos más comunes a: *Bacillus licheniformis*, *Aeromas cavi* y *Lactobacillus*; finalmente las levaduras más comunes para la extracción de pectinasas son *Saccharomyces* y *Candida* (Handa, 2016).

A nivel microbiano, la pectinasa se obtiene por el método de fermentación sumergida y fermentación en estado sólido. El primero es el más utilizado a escala industrial, y surge en las décadas de 1940s como necesidad a la producción de antibióticos a gran escala; sin embargo, tiene como desventaja la optimización de la composición del medio, dado que los organismos o especies microbianas tienen sus condiciones óptimas para permitir una producción eficiente de enzima (Ahmed et al., 2016). En el segundo método se obtiene un rendimiento mayor del proceso de obtención de la enzima (Chaudhri & Suneetha, 2019). La fermentación sumergida involucra los procesos donde el hongo o bacteria están sumergidos en la fase acuosa, y la segunda, es similar a la anterior con la diferencia que el hongo o bacteria está unido a soportes insolubles en agua (A Ramdas Shet,; S. Vijaykumar Desai, 2018),(Handa, 2016).

Por otro lado, se tiene las exploraciones y estudios para la extracción y obtención de enzimas pectinasas de la pulpa o componentes de fruta. El procedimiento para la obtención de pectinas de pulpa de fruta, consiste en despulpar la fruta y llevar a cabo un tratamiento con sales (sulfato de amonio, cloruro de sodio, entre otras) de la pulpa, a una temperatura baja (0-4 °C), para evitar la desnaturalización de la enzima, y luego de esto se centrifuga para separar la enzima de los otros componentes vegetales. La enzima se purifica a través de varios procesos con el propósito de caracterizar su actividad y llevar a cabo su función (Joshi, Parmar, & Rana, 2011).

Sin embargo, hay factores que afectan la producción de pectinasa al seleccionar la fuente microbiana, como concentración de nutrientes, pH, temperatura, contenido de humedad, e iones metálicos son las condiciones limitantes en la producción de esta enzima (Chaudhri & Suneetha, 2019), (Handa, 2016), por otro lado la producción aumenta debido a la presencia de tensoactivos los cuales favorecen la permeabilidad de la membrana celular que conduce a la secreción de la enzima. El sustrato del medio de cultivo como el salvado de trigo, la torta de semillas de algodón, el cloruro de amonio, el extracto de levadura y el ácido poliglicólico (PGA) aumentan la producción de pectinasa (Chaudhri & Suneetha, 2019).

Dependiendo del requerimiento de pH para una actividad enzimática óptima las enzimas pectinasas también se clasifican en pectinasa ácida y alcalina. Las pectinasas ácidas son útiles en la extracción, clarificación y licuefacción de jugo de frutas y vinos, y las pectinasas alcalinas se utilizan ampliamente en la industria textil, la industria de la pulpa y el papel además para mejorar la calidad del té negro. (Khatri, B. P., Bhattarai, T., Shrestha, S., & Maharjan, J. (2015).

5.7.6. Condiciones de actividad y estabilidad de la pectinasa

5.7.6.1. Efecto del medio

Una gran variedad de factores fisicoquímicos afecta la producción y estabilidad de las pectinasas. La producción de esta enzima por microbios se ve muy influenciada principalmente por los componentes del medio, especialmente la fuente de nitrógeno y carbono como los minerales, además de factores físicos como la temperatura, el pH, la agitación, y la densidad del inocuo los cuales también afectan la extracción de pectinasas de origen vegetal (Handa, 2016).

5.7.6.2. Efecto de la temperatura

Se conoce que cada una de las fuentes de producción de pectinasas tiene como principal característica un rango particular de temperatura en el cual se determina la actividad máxima a las enzimas extraídas, y cuando la temperatura se altera por debajo o por encima de este valor óptimo, la actividad disminuye. La activación e inactivación de la enzima es la temperatura, la cual está dada para su activación en rangos de 30 a 76°C dependiendo de la fuente de obtención, por ejemplo la temperatura óptima de 30° a 37°C aproximadamente para *Bacillus*, (Handa, 2016), la inactivación completa se presenta por calentamiento entre 65 y 90 °C durante 1 a 5 minutos.

5.7.6.3. Efecto del pH

Generalmente, la actividad y estabilidad óptima de las pectinasas comerciales se encuentran en rangos de pH entre 4 a 7, pero el pH óptimo de las diferentes enzimas pécticas varía considerablemente; puede ir desde alcalino para la mayoría de pectinasas de origen vegetal o bacteriano, y ácido para la mayoría de origen fúngico (Vita, 2013). Sin embargo, se ha establecido que el pH óptimo de la enzima pectinasa depende del origen de la misma, la pectinasa vegetal muestra un rango óptimo entre pH 6,5 y 9,5 lo que indica q esta es una enzima de naturaleza alcalina (Chaudhri & Suneetha, 2019).

5.7.6.4. Efecto de iones divalentes, aditivos e inhibidores

Los iones metálicos afectan la catálisis enzimática modificando el flujo de electrones en la reacción del sustrato enzimático o cambian la orientación del sustrato en referencia al grupo funcional del sitio activo. Se sabe que hay enzimas bacterianas que dependen de algunos iones divalentes por lo que se espera que la actividad enzimática se inhiba en presencia de alguno de esos aditivos los cuales pueden conducir a un proceso de producción de la enzima más rentable (Handa, 2016). La Tabla 1 muestra las propiedades bioquímicas de ciertas enzimas de origen microbiano y de frutas.

Tabla 1. Propiedades bioquímicas de ciertas enzimas de origen microbiano y de frutas.

Pectinasa	Especie/Fruta	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Otras propiedades	Referencia
PG	<i>Aspergillus Níger</i>	6.5-7.0	35	Rango de trabajo 4.5-8	(Gummadi & Panda, 2003)
PG	<i>Rhizopus stolonifer</i>	5.0	45	*PM=57 kDa	
PGL	<i>Amycolata sp.</i>	10.25	30-35	PM=31 kDa, pl=10	
PGL	<i>Bacillus macerans</i>	9.0	60	PM=35 kDa, **pl=10.3	
PG	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	4.2	50	PM=43 kDa, pl=5.4	
PE	Guanábana (<i>Anona muricata</i>)	7.0-8.0	60	Especificidad: 0.0843 mg/mL	(Arbaisah et al., 1997)

PME	Mandarina	9.0	62	$K_m=0.84$ mg/mL	(Rillo et al., 1992)
PE	Limón (<i>Citrus limon</i>)	5-6	60-70	PM=35 kDa, **pI=11	(Macdonald et al., 1993)
PE	Papaya (<i>Carica papaya</i> L.)	7.5	No se reporta	PM=32 kDa	(Fayyaz et al., 1994)
PE	Tomates	7.5	No se reporta	Composición de aminoácidos	(Pressey & Woods, 1992)
PE	Albaricoque Malatya (<i>Prunus armeniaca</i> L.) o durazno	9.0	60	$K_m=0.77$ mM	(Özler et al., 2008)
Pectinasa	Pitaya roja (<i>Hylocereus polyrhizus</i>)	8.0	5	$K_m=15.31$ U/mg	(Zohdi & Amid, 2013)

*PM: peso molecular. **pI: punto isoeléctrico. PG: poligalacturonasa. PGL: pectatoliasa. PE: pectinestereasa. PME: pectinmetilestereasa.

5.7.7. Aplicaciones de la enzima pectinasa

En los últimos años, las enzimas pectinesterasas han sido aplicadas en diferentes industrias como la alimentaria, de detergentes, papelería, farmacéutica, panadería, textil, entre otras, debido a que tienen ventajas frente a los catalizadores no biológicos. Algunos de los procesos industriales en los que se aplican las enzimas son: industria del almidón y el azúcar, productos lácteos, panadería, productoras de jugo de frutas, procesamiento de carne, industria cervecera, jugos y vinos, industria de grasas y aceites (Moral et al., 2015), (Bhardwaj et al., 2017), (Biz et al., 2014), (Chaudhri & Suneetha, 2019).

Las enzimas pécticas son utilizadas con diferentes propósitos entre ellos están: la extracción, clarificación y concentración de jugos de frutas para aumentar el rendimiento y reducir la viscosidad, elaboración de vinos donde juegan un papel importante en la extracción, clarificación y rendimiento del jugo, facilitando la filtración, los cuales al ser tratados enzimáticamente muestran más estabilidad; extracción de aceites vegetales y esenciales, sabores y pigmentos a partir de material vegetal, tratamiento de fibras de la

industria textil, producción de papel, fermentación de café y té, además para el tratamiento de aguas residuales con contenido de pectina (Quinde & Sánchez, 2013), (Bhardwaj et al., 2017), (Biz et al., 2014), (P. Kumar & Suneetha, 2014).

En la clarificación de jugos y el procesamiento de la pulpa de fruta, las pectinasas degradan la pectina y causan la gelificación de la pulpa, facilitando el proceso de filtración (Vita, 2013), además es de gran utilidad en la producción de bebidas frutales concentradas debido a su gran capacidad de estabilizar emulsiones, suspensiones y espumas (Franchi, 2016). Por otro lado, en la industria textil el uso de la enzima pectinasa en conjugación con amilasas, lipasas, celulasas y otras enzimas hemicelulolíticas, eliminan agentes de encolado y ayudan a disminuir el uso de productos químicos facilitando una menor descarga de desechos químicos al medio ambiente, mejora la seguridad de los trabajadores y la calidad de la tela (Bhardwaj et al., 2017), (Patil & Chaudhari, 2010).

Las pectinasas también se utilizan en las biorrefinerías para hidrolizar la pectina presente en los residuos agroindustriales ricos en pectinas, por otro lado, en la extracción de aceites vegetales de oliva, girasol, coco y palma; ya que el uso de preparaciones enzimáticas de pectinasas aumenta el rendimiento y el contenido de polifenoles y vitamina E, mejorando la calidad organoléptica. En la producción de alimentos para animales, el uso de pectinasas disminuye la viscosidad de la alimentación y aumenta la absorción de nutrientes, de esta manera el tratamiento con enzimas en la alimentación mejora la digestibilidad de la misma, a través de una serie de mecanismos como la hidrólisis directa, mejoras en la palatabilidad y cambios en la viscosidad intestinal (Garg et al., 2016), (Bhardwaj et al., 2017).

Otras de las aplicaciones como mencionamos anteriormente son la fermentación de café y té, donde el tratamiento con pectinasa acelera la fermentación y evita la formación de espuma de los polvos de té instantáneo debido a la destrucción de las pectinas. En la industria del papel, durante su fabricación, la pectinasa puede depolimerizar polímeros constituidos de ácido galacturónico, y posteriormente disminuir la demanda catiónica de soluciones de pectina en el filtrado del blanqueo con peróxido de pulpa por tratamiento termo mecánico. Por otro lado, para la purificación de virus en plantas en donde este es restringido al floema, las enzimas como las pectinasa y las celulasas, pueden usarse para liberar el virus de los tejidos (Bhardwaj et al., 2017), (Franchi, 2016), (Kohli & Gupta, 2015).

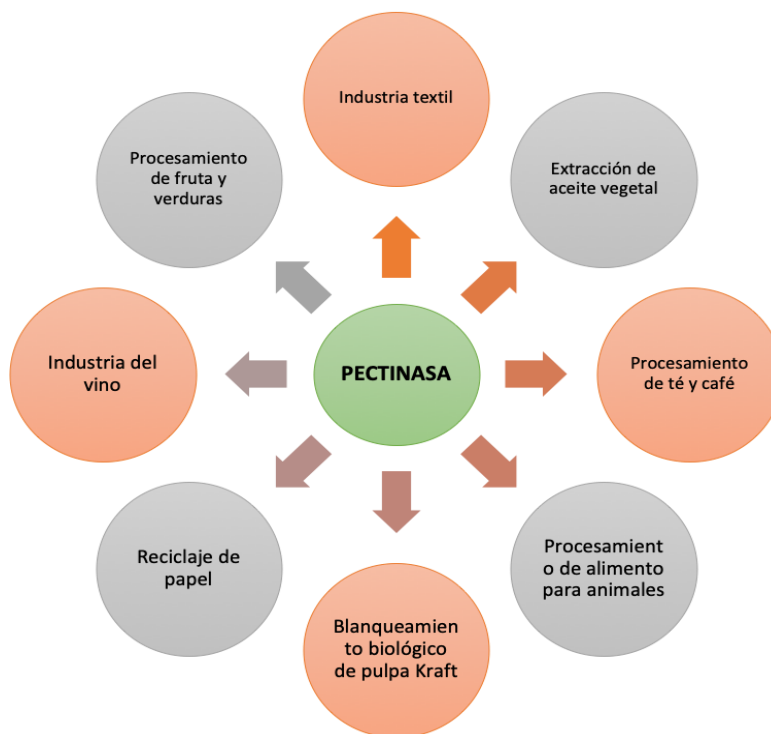


Figura 7. algunas de las industrias en la que se aplican las pectinasas.

5.7.8. Turbidez de los jugos

La turbidez de los jugos y pulpas de fruta son un factor importante debido a que esto presenta un efecto significativo en los flujos de permeado, siendo esta una medida de dispersión de la luz en un medio translúcido, esta medida de dispersión da la absorbancia aparente la cual es proporcional a la densidad de partículas suspendidas.

Las dispersiones que emiten la turbidez depende de la forma, tamaño y composición mineral de las partículas, de su índice de refracción relativo y en cierta medida de la fase líquida (Quesada, 2013).

Por lo tanto, para la clarificación de jugos se han determinado pre-tratamientos enzimáticos con pectinasa las cuales logran degradar la pectina y en efecto ayudan a reducir la turbidez del jugo, facilitando la filtración por la disminución de viscosidad; cabe destacar que el sabor y olor propio de la materia prima no se ven afectados por el tratamiento enzimático (Quesada, 2013).

La turbidez puede deberse a la presencia de fragmentos celulares insolubles originados a partir de sus tejidos pulpareos o componentes que no están totalmente disueltos. Estos componentes pueden ser coloides como la pectina, celulosa, hemicelulosa, almidón, proteína, lignina, etc., liberados durante la maceración enzimática de preimpresión. Estos materiales insolubles, que representan muchas de las características de sabor, aroma y

color del jugo de fruta, pueden variar en tamaño desde microescala hasta fragmentos de pulpa más grandes (F Danalache; P, 2018).

5.7.9. Clarificación jugo

La clarificación del jugo de fruta consta de un proceso de filtración para eliminar la pulpa de fruta, este puede ser extraído por centrifugación o por tratamiento enzimático. La centrifugación logra la separación de las partículas en suspensión por diferencia de densidad a través de una fuerza giratoria. Por su parte, la clarificación con enzimas se basa en la hidrólisis de sustancias pécticas que disminuyen la viscosidad de los jugos y facilita la filtración (Ajayi AA, 2014). Las enzimas pécticas por lo general ayudan a obtener jugo clarificado el cual no es concentrado ni fermentado, debido a que las pectinasas ayudan a facilitar el prensado, la extracción del jugo y la clarificación, al separar el precipitado floculante que se produce en alguna clase de frutas (Quesada, 2013).

El tratamiento enzimático ayuda a aumentar la claridad del jugo, se observa que un aumento en la concentración de la enzima ayuda a aumentar la velocidad de clarificación al exponer parte de la proteína cargada positivamente, (Sharma et al., 2014), por otro lado el proceso de clarificación está dado por el proceso en el que la pectinasa promueve la degradación de la capa externa de la pectina que contribuye a la exposición de las proteínas generando desestabilización electrostática de la suspensión causando zonas cargadas positivamente y zonas cargadas negativamente sobre las partículas lo que provoca la interacción y precipitación de las mismas (Franchi, 2016).

Por lo tanto, la clarificación es un paso importante en el procesamiento del jugo de frutas y se consigue con mayor frecuencia mediante tratamiento enzimático. (M N Kothari, Kulkarni, Maid, & Baig, 2013) donde la temperatura que se utilice en este proceso sea lo suficientemente alta para garantizar una reactividad enzimática óptima, por lo que la despectinización mediante el uso de pectinasa se ha presentado como una alternativa para reducir la turbidez de los jugos de fruta (Sandri, Fontana, Barfknecht, & Moura, 2011).

El mecanismo de clarificación enzimática en los jugos cítricos establece como un proceso de desesterificación de la pectina que procede en su coagulación en forma de pectato de calcio. Mecanismo que pasa naturalmente en determinados jugos cítricos debido a la presencia de PE endógena, pero este proceso natural se tarda mucho, por lo tanto es necesario agregar cantidades suplementarias de preparados comerciales con actividad de PE la cual debe ser activa al mismo pH del jugo que se a clarificar (Vita, 2013).

6. METODOLOGÍA

6.1. Extracción y caracterización de la enzima pectinasa

6.1.1. Materia prima

Los frutos de guanábana (*Annona muricata L.*) y chirimoya (*Annona chelimola L.*) se obtuvieron del mercado mayorista de la ciudad de Bogotá en el sector el Restrepo teniendo en cuenta las etapas de maduración comercial y las normas NTC 756 - Toma de muestras y la NTC 5208 - Frutas frescas. De acuerdo con la apariencia se tuvo en cuenta que el fruto estuviera libre de manchas causadas por el sol, textura poco blanda, y los rudimentos estelares en buen estado, es decir, que el 25% de estos defectos no cubrieran la superficie.

Guanábana (*Annona muricata L.*): para la extracción de la pulpa de esta fruta en estado de consumo, a lo cual nos referiremos en adelante como fruta en buen estado, se tuvo en cuenta características físicas como: color de corteza, el cual era verde mate, de consistencia poco blanda, con pulpa blanca de textura carnosa y jugosa como muestra la **Imagen 1**.



Imagen 1. Guanábana (*Annona muricata L.*) en buen estado. Fuente: autoría propia.

Para la última etapa de maduración o fruta no apta para el consumo, es decir, para las muestras de pulpa de guanábana (*Annona muricata L.*) en mal estado se tuvo en cuenta características físicas como: corteza de color marrón oscuro, consistencia y pulpa mayormente blanda, es decir, en grado de descomposición como se muestra en la Imagen 2.



Imagen 2. Guanábana (*Annona muricata* L) en mal estado. Fuente: Autoría propia.

Chirimoya (*Annona chelimola* L.):

Para la selección de estos frutos en buen estado se tuvo en cuenta características físicas como corteza de color verde, **Imagen 3(a)**, blandas al tacto, pulpa carnosa y de color blanco. La chirimoya en mal estado se seleccionó de características generales como coloración marrón en su mayoría, blanda al tacto y visualmente en descomposición, **Imagen 3 (b)**.

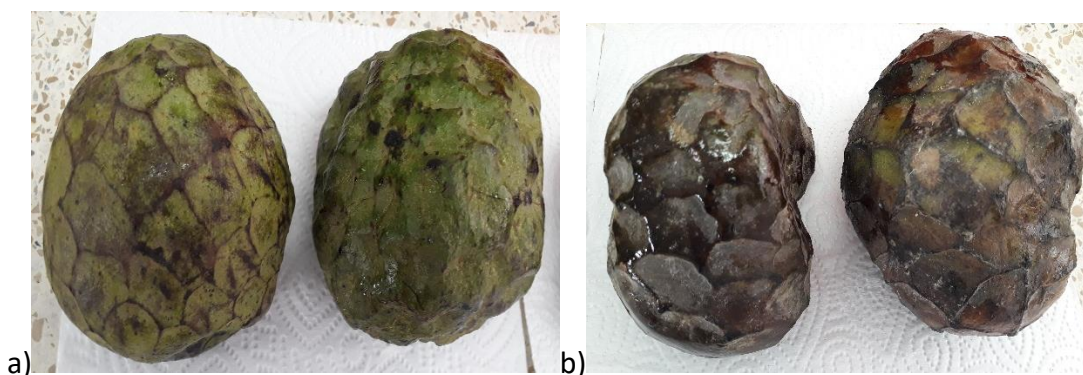


Imagen 3. a) Chirimoya (*Annona chelimola*) en buen estado y b) Chirimoya (*Annona chelimola*) en mal estado. Fuente: autoría propia.

6.1.2. Preparación de la materia prima

Para llevar a cabo la extracción de la enzima pectinasa, se obtuvo la pulpa de la guanábana (*Annona muricata* L.) en buen estado y mal estado; al igual que para la chirimoya (*Annona chirimola* L.) Para ello, se lavó los frutos con agua destilada, se hicieron pequeños cortes en la corteza y se obtuvo la pulpa retirando la corteza y las semillas de esta. Una vez se obtuvo la pulpa, (**Imagen 4**) se homogenizó a una temperatura de 4°C en un baño de hielo con ayuda de una varilla de agitación (Quinde Fuentes & Sánchez, 2013).



Imagen 4. Despulpado de la guanábana (*Annona muricata* L.). Fuente: autoría propia.

Preparación de muestras para la extracción de la enzima

Para la extracción de la enzima se siguió la metodología propuesta por Rodríguez Nieto, J. M, & Restrepo Sánchez, L. P (2011) & Carabali Miranda, I. L; Narvaez Cuenca, (2009) en su informe científico titulado “Extracción de enzimas pecticas del epicarpio de lulo (*Solanum quitoense* Lam) involucradas en el proceso de ablandamiento” y “Extracción y medida de actividad de pectin metil esterasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*), enzima relacionada con el ablandamiento” respectivamente , entonces según lo anterior la extracción de la enzima a partir de la pulpa de guanábana (*Annona muricata* L.) en buen estado y mal estado se desarrolló por triplicado; al igual que para la chirimoya (*Annona cherimola* L.). Se utilizó un diseño experimental factorial 2^3 , donde los factores son el pH, el tipo y estado de la fruta, y los niveles son dos (pH= 5,3 y 7,1), (fruta: guanábana (G) y chirimoya (CH)), y estado (bueno (B) y malo (M)), respectivamente. Para ello, se pesaron aproximadamente 50 g de pulpa de cada una de las frutas en una balanza marca OHAUS (PIONEER), (**Imagen 5**).

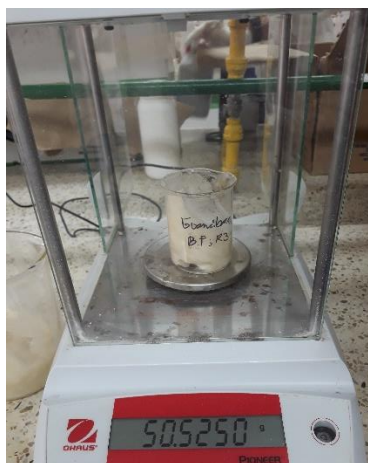


Imagen 5. Peso guanábana en buen estado (GB). Fuente: autoría propia.

6.1.3. Extracción de la proteína de la pulpa de las frutas

Cada una de las muestras de pulpa de fruta guanábana (*Annona muricata L.*) y chirimoya (*Annona cherimola*) en buen estado y en mal estado, se mezcló con 30 mL del buffer (fosfato o acetato, según el caso)(Rodríguez Nieto, Jeimy Marcela, & Restrepo Sánchez, 2011). Se utilizó un buffer de fosfato pH 7,1 de concentración 0,1 M, y un buffer de acetato a pH 5,3 de concentración 0,1M, conservando cada muestra en un baño de hielo se agitaron con ayuda de una varilla de agitación cada 5 minutos durante un período de tiempo de 1 hora. Ver Imagen 6. En adelante utilizaremos la siguiente nomenclatura:

- ❖ Buffer de fosfato + Guanábana en buen estado (BF-GB)
- ❖ Buffer de fosfato + Guanábana en mal estado (BF-GM)
- ❖ Buffer de acetato + Guanábana en buen estado (BA-GB)
- ❖ Buffer de acetato + Guanábana en mal estado (BA-GM)
- ❖ Buffer de fosfato + Chirimoya en buen estado (BF-CHB)
- ❖ Buffer de fosfato + Chirimoya en mal estado (BF-CHM)
- ❖ Buffer de acetato + Chirimoya en buen estado (BA-CHB)
- ❖ buffer de acetato + Chirimoya en mal estado (BA-CHM)

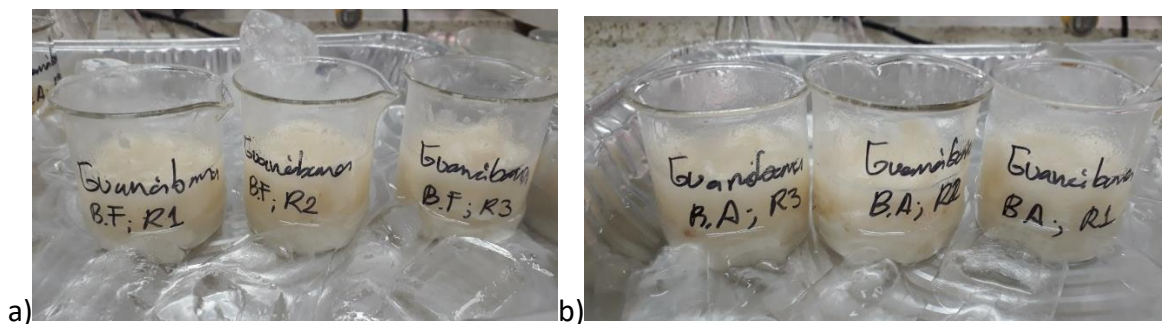


Imagen 6. Muestra de guanábana (*Annona muricata L.*) en buen estado con a) Buffer fosfato (BF-GB) y b) Buffer acetato. Fuente: autoría propia.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 5000 rpm en una centrifuga marca Thermo SCIENTIFIC (Imagen 7).



Imagen 7. Proceso de centrifugación de las muestras durante 10 min a 5000 rpm. Fuente: autoría propia.

Se recolectaron los sobrenadantes (extracto de enzima) de cada una de las muestras y se filtraron con filtro de celulosa manteniendo el filtrado en un baño de hielo. Se almacenaron las muestras en frascos de vidrio ámbar como se observa en la **Imagen 8**, y en nevera aproximadamente por 1 semana hasta continuar con los siguientes procedimientos (Dhembare, Kakad, & Rana, 2015), (Handa, 2016).



Imagen 8. Filtrado y conservación de cada una de las muestras en buffer fosfato y acetato. Fuente: autoría propia.

6.1.4. Caracterización de la proteína

Determinación del contenido de proteína

La determinación del contenido de proteína en los extractos crudos de las muestras de guanábana y chirimoya en buen y mal estado se llevó a cabo mediante el método de Biuret; el reactivo se preparó de acuerdo empleando la metodología de Chihuahua, A (2018). Esta prueba es general para polipéptidos y proteínas debido a que sirve para reconocer uniones peptídicas (Yanira & Jabel, 2014).

Se realizó una curva de calibración, utilizando como estándar la Ovoalbúmina (OVA, 1 mg/mL) en un rango de concentración entre 0,2 y 0,6 mg/mL como se indica en la Tabla 2. Cada concentración se incubó con el reactivo de Biuret durante 15 min a temperatura ambiente. Las muestras se midieron a una longitud de onda de 540 nm en un UV-vis espectrofotómetro RIGOL Ultra-3660

Tabla 2. cantidades utilizadas para desarrollar la curva de calibración.

Concentración OVA (mg/mL)	OVA (μl)	Agua o buffer (μl)	Biuret (μl)
0,2	400	1100	500
0,3	600	900	500
0,4	800	700	500
0,5	1000	500	500
0,6	1200	300	500
BLANCO	0	1500	500

6.2. Purificación de la enzima

6.2.1. Por precipitación

Una vez determinada la cantidad de proteína de los extractos crudos de las muestras de guanábana (*Annona muricata L.*) y chirimoya (*Annona cherimola*) en buen y en mal estado, se purificaron por precipitación con acetona (Handa, 2016), utilizando una relación en volumen (1:2, muestra: acetona) y en frío a una temperatura de 4 °C. Un precipitado fue obtenido, el cual se llevó a sequedad a temperatura ambiente en un desecador hasta peso constante, y posteriormente se almacenó en frascos de plástico para los siguientes ensayos.

Cuantificación de proteína

Para cuantificar la proteína de cada una de las muestras purificadas, se utilizó el método de Biuret. Para esto se pesaron 5 mg de muestra y se disolvieron en 25 mL de H₂O destilada, obteniéndose una concentración final del 0,02% p/v. Se tomó una alícuota de la solución anterior y se trató con el reactivo de Biuret, la mezcla se incubó durante 5 min y se leyó la absorbancia a 540 nm en un UV-vis espectrofotómetro RIGOL ultra-3600. Cada muestra se realizó por triplicado.

6.2.2. Por cromatografía de intercambio iónico

Para la purificación por cromatografía de intercambio iónico se realizó el procedimiento descrito por Zienkiewicz, Rejón, Alché, Rodríguez-garcía, & Castro, (2013) y Mangesh N

Kothari & Baig, (2013). Primero se activó el Sephadex G25 marca Sigma Aldrich con un buffer equilibrante compuesto de sales de fosfato a pH 7,5, concentración de 0,02 M y acida al 0,02%, se adicionó cantidad suficiente de Sephadex en un beaker y se mezcló con el buffer garantizando que 1cm de buffer se mantuviera por encima del sólido. El Sephadex G25 se adicionó en una jeringa de 10 mL hasta completar un alto de 4 cm y un ancho de 16 mm. La columna se equilibró durante un día, adicionando dicho buffer. Una vez se equilibró la columna, se preparó la muestra disolviéndola en el buffer equilibrante con una concentración final de 0,025 mg/mL. La muestra utilizada fue la obtenida después de la precipitación. La elución se inició con buffer equilibrante adicionando 10 mL y recolectando aproximadamente 4 mL como fracción 1 y 2. Se continuó la elución con aproximadamente 35 mL de un buffer fosfato pH 7,5 y concentración 0,02 M que contenía NaCl 0,05M, lográndose recolectar fracciones de 4 mL, tubos 3 a 8, Luego se continuó con buffer fosfato pH 7,5 y concentración 0,02 M que contenía NaCl 0,1 M, lográndose obtener fracciones de 4 mL, tubos 9 a 11. Finalmente, se utilizó un buffer de fosfato con NaCl 0,3 M, y se recolectaron las fracciones 12 a15. La columna se trató con 15 mL de buffer equilibrante, 10 mL de etanol al 10% y de nuevo con 10 mL de buffer equilibrante para limpiarla. La columna fue almacenada en buffer equilibrante en la nevera (**Imagen 9**).

Es importante resaltar que la purificación por Sephadex sólo se realizó con las muestras extraídas con buffer de fosfato a pH 7,1 para las frutas de GB, GM, CHB, CHM; y con el buffer de acetato pH 5,3 para la muestra CHB. Las demás muestras no fueron purificadas por esta metodología debido a que los experimentos fueron interrumpidos por la situación de emergencia sanitaria del COVID-19 por la cual atraviesa el país. Por ello, estos análisis son parte de las perspectivas de este trabajo.

Cuantificación de proteína

La presencia de proteína en las muestras recolectadas se determinó al medir con una celda de cuarzo la absorbancia a 280 nm en un UV-vis espectrofotómetro RIGOL ultra-3600. Esto se debe a que las proteínas purificadas contienen en su estructura residuos de aminoácidos como tirosina y triptófano que contribuyen a la absorbancia, permitiendo un método de análisis rápido y simple. Sin embargo, también se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente con el método de Biuret para determinar el contenido de proteína en el volumen total de las fracciones que contenían la proteína.

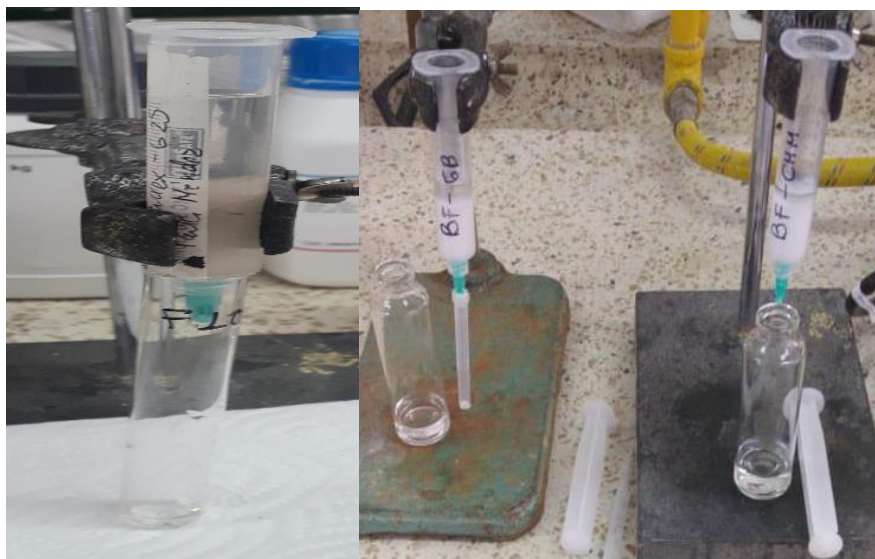


Imagen 9: purificación de la enzima pectinasa por cromatografía de intercambio iónico. Fuente: autoría propia.

6.3. Actividad enzimática: efecto del pH y la temperatura

6.3.1. Efecto de la temperatura

Para determinar la temperatura óptima de actividad de la enzima pectinasa se determinó su actividad a diferentes temperaturas (21, 37, 40, 50, 60, 70 y 80 °C). Se disolvieron 50 mg aproximadamente de pectina comercial en 10 mL de NaCl 0,2 M, una vez disuelta se adicionó dos gotas de fenoltaleína y se ajustó el pH a 7,0 con NaOH 0,05 M. Posteriormente, se pesaron aproximadamente 10 mg de la enzima purificada por precipitación, de las muestras de guanábana (*Annona muricata* L.) y chirimoya (*Annona cherimola*), y se disolvieron en 3 mL de NaCl 0,2M. Las muestras se realizaron por triplicado. Para el blanco se utilizó pectina sin enzima, bajo las mismas condiciones de operación.

Una vez disueltas las dos muestras, estas se sometieron a calentamiento a la respectiva temperatura por 15 minutos, se midió el pH de la pectina y se aseguró que conservara el pH 7,0. Se adicionó la enzima purificada a la solución de pectina y se agitó durante 1 min exacto utilizando un cronómetro. La enzima se inactivó durante 10 minutos en un baño hielo; se midió el pH de la solución y se tituló con NaOH 0,05M. (Imagen 10) (Garcia & Chafra, 2015), (Mangesh N Kothari & Baig, 2013). Cabe resaltar que durante todo el proceso las muestras deben permanecer con agitación magnética.

Para determinar la actividad a cada temperatura, es decir, la unidad de actividad enzimática, la cual se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un μmol

de grupos carbonilo/min, se utilizó la ecuación 1 (Maca & Osorio, 2013), (Joshi et al., 2011) & (Díaz-Cruz, C. A; Regalado, C; Morales-Sánchez, E; Velazquez, G; Amaya-Llano, 2016).

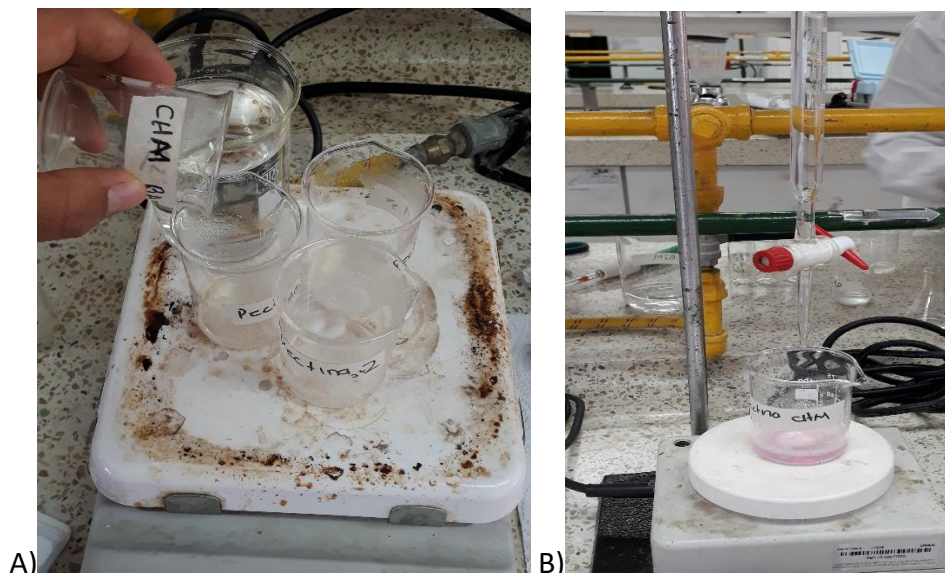


Imagen 10. efecto de la temperatura. A) adición de la enzima pectinasa a la pectina a la temperatura correspondiente, B) titulación con NaOH después de inactivar por 10 min en hielo.
 Fuente: autoría propia.

$$\begin{aligned}
 & \text{Unidad de actividad/mL (Upectinasa/mL)} \\
 & = \frac{(\text{mL NaOH muestra} - \text{mL NaOH blanco}) * (\text{molaridad NaOH}) * 1000}{(\text{Tiempo (min)}) * (\text{mL muestra})} \quad \text{Ecu. 1}
 \end{aligned}$$

6.3.2. Efecto del pH

Para determinar el pH óptimo de la actividad de la enzima se desarrollaron los ensayos a la temperatura óptima determinada previamente, y con buffer a diferentes pH (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0) (Mangesh N Kothari & Baig, 2013), soluciones que se obtuvieron utilizando diferentes buffer: buffer fosfato 0,02M, buffer fosfato 0,02M + ácido cítrico 0,02 M (Barragán et al., 2014). Se tomaron aproximadamente 50mg de pectina los cuales se disolvieron en 10 mL de los diferentes buffers. En otro recipiente se pesó 10 mg de enzima purificada por precipitación y se disolvió en 3 mL de NaCl 0,2 M; ambas soluciones se pusieron en agitación hasta disolver a una temperatura de 40°C durante 30 min, se midió pH de la pectina para asegurar que se mantenía el valor inicial de pH del buffer, se adicionó la enzima a la solución de pectina y se agitó durante 1 min exacto utilizando un cronómetro. Finalmente, se pusieron las muestras en baño de hielo durante 10 min para inactivar la enzima y se titularon con NaOH 0,05 M (Oumer & Abate, 2017). Todas las

muestras se realizaron por triplicado. Para cuantificar la actividad se utilizó la ecuación 2 (Díaz-Cruz, C. A; Regalado, C; Morales-Sánchez, E; Velazquez, G; Amaya-Llano, 2016).

$$\text{Unidad de actividad/mL(Upectinasa/mL)} = \frac{(\text{mL NaOH muestra}) * (\text{molaridad NaOH}) * 1000}{(\text{Tiempo (min)}) * (\text{mL muestra})} \quad \text{Ecu.2}$$

6.4. Aplicación de la enzima

6.4.1. Comportamiento del pH de la pectina en el tiempo

Una forma de establecer la acción de la pectinesterasa o pectinasa es a través de cambios de pH en el tiempo de una solución de pectina tratada con la proteína obtenida, lo cual se da por el proceso de la desesterificación mediada por la enzima, en la cual se libera al medio de solución metanol y forma grupos ácido carboxílico que disminuyen el pH (Cevallos, G.; Chafra, 2015). Para ello, se disolvieron aproximadamente 50 mg de pectina comercial en 10 mL de NaCl 0,2 M, una vez disuelta se ajustó el pH a 7,0 con NaOH 0,05 M. Posteriormente, se pesaron aproximadamente 10 mg de la enzima purificada por precipitación, de las muestras de guanábana (*Annona muricata L.*) y chirimoya (*Annona cherimola*), y se disolvieron en 3 mL de NaCl 0,2M.

Una vez disueltas las dos muestras, estas se sometieron a calentamiento a una temperatura de 37°C por 10 minutos, se midió de nuevo el pH de la solución de pectina y se ajustó el pH a 7,0 con NaOH 0,05 M. Se adicionó la enzima purificada a la solución de pectina y se midió el pH de la solución en el tiempo. Cabe resaltar que el experimento no se desarrolló a la temperatura óptima (40 °C) debido a que la velocidad de la reacción era mayor y no se podía tomar datos precisos con el potenciómetro para el desarrollo de la curva, porque no era un electrodo automático.

Estos resultados podrían complementarse con el comportamiento de la viscosidad de la pectina en presencia de la enzima obtenida. Sin embargo, los experimentos fueron interrumpidos por la situación de emergencia sanitaria del COVID-19 por la cual atraviesa el país. Por ello, estos análisis son parte de las perspectivas de este trabajo.

6.4.2. Extracción de jugo de mora

La aplicación de la enzima pectinestereasa en la extracción de jugo de mora se llevó a cabo pesando aproximadamente 10 g de mora en trozos, se adicionaron en probetas de 100 y 50 mL; seguidamente se les adicionó 20 mL de agua y luego 3mL de la enzima purificada por Sephadex, (Imagen 11), se midió el pH y se llevó a un baño maría por 30

minutos a 40°C. Posterior a ello, se dejaron a temperatura ambiente durante 1 hora; se midió el pH inicial y se midió la absorbancia. Cabe resaltar que la claridad de la solución se determinó midiendo la absorbancia a 630 nm utilizando un espectrofotómetro (UV / VIS) ultra-3600 Rigol para determinar la turbidez de cada solución; esto de acuerdo con la metodología de Cevallos, G; Chafra, (2015)

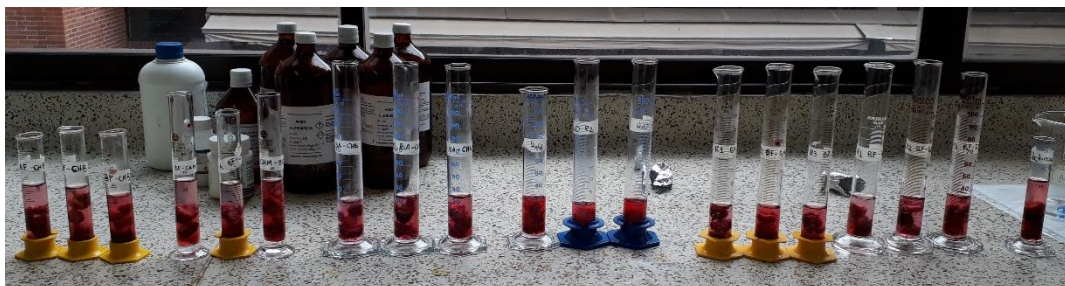


Imagen 11. extracción jugo de mora con enzima purificada por sephadex. Fuente: autoría propia.

6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis se desarrollaron por triplicado, lo cual consistió en tres muestras independientes para permitir una adecuada evaluación estadística. Los datos están representados como la media de tres repeticiones con su desviación estándar. Los resultados obtenidos se evaluaron mediante un análisis de varianza ANOVA simple y compuesta para cada una de las determinaciones realizadas. Se consideró un valor $p < 0.05$. Se utilizó la prueba de Kruskal -Wallis para la comparación de medias. Así como el grafico de caja y bigotes. Este análisis estadístico se realizó mediante el programa Statgraphics Centurión XV versión 15.2.06.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En el presente trabajo se extrajo la enzima pectinasa o pectinestereasa de la pulpa de las frutas guanábana (*Annona muricata. L*) y chirimoya (*Annona chelimola*), en buen estado y en mal estado; con el propósito de explorar alternativas para el uso de desechos agroindustriales y comparar la actividad enzimática de la enzima obtenida a partir de diferentes estados de maduración de fruta, tipo de fruta y pH utilizado en la extracción.

7.1. Preparación de la materia prima

De acuerdo con el trabajo de (Lo, H.; Perea, 2013) la guanábana se categoriza de acuerdo con las siguientes características descritas en la

Tabla 3. Teniendo en cuenta esto, para seleccionar la fruta se observó que la corteza de la guanábana en mal estado (GM) estuviera de color marrón con apariencia muy blanda y para la guanábana en buen estado (GB) que la cascara estuviera verde mate, que su pulpa fuera blanca y algodonosa, después de hacer este control visual se obtuvo la materia prima, es decir, la pulpa, después del tratamiento a una temperatura aproximada de 19°C durante 1 hora. La Imagen 12 muestra la apariencia de la guanábana en mal estado (GM) y la pulpa de una guanábana en buen estado (GB), y la tabla 3 la descripción.

Tabla 3. Categorización de los frutos de guanábana (*Annona muricata. L*)

Categoría	Apariencia
Guanábana en buen estado (GB) o madura	Piel verde mate, textura ligeramente dura, pulpa blanca, carnosa y brillante, sin daños o magulladuras.
Guanábana en mal estado (GM) o sobre madura	Corteza marrón que se rompe fácilmente, pulpa con textura totalmente blanda que presentaba cambio de color (blanco-marrón).



Imagen 12. Corteza de la guanábana en mal estado (izquierda), pulpa de la guanábana en buen estado (derecha). Fuente: autoría propia.

Dado que no se tienen reportes para la chirimoya, se tomó como referente las características observadas como se describen en la Tabla 4, esto teniendo presente que esta fruta pertenece a la familia *Anonácea*, al igual que la guanábana. La Imagen 13 muestra la apariencia para la chirimoya en buen estado (CHB) y en mal estado (CHM).

Tabla 4. Características observadas para los frutos de chirimoya (*annona cherimola*).

Categoría	Apariencia
Chirimoya en buen estado (CHB) o madura	Piel verde con poca intensidad, textura ligeramente dura, pulpa blanca, sin daños o magulladuras.
Chirimoya en mal estado (GM) o sobre madura	Corteza marrón con degradación física, pulpa con textura totalmente blanda que presentaba cambio de color (blanco-marrón).

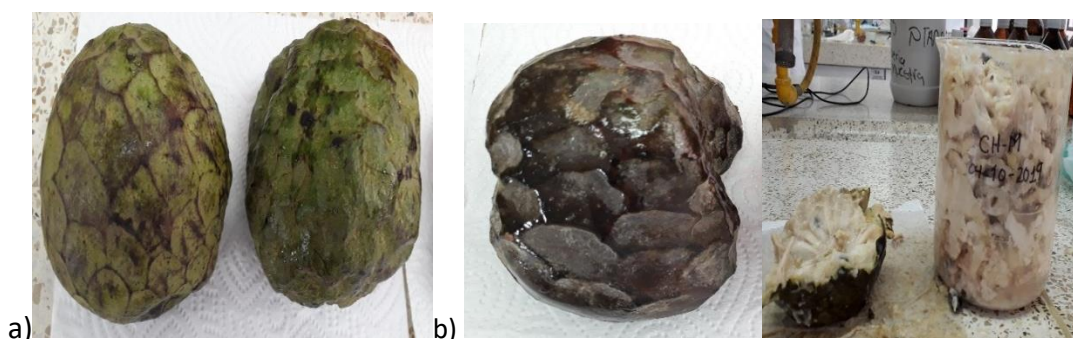


Imagen 13. a) Corteza de chirimoya en buen estado y b) Corteza y pulpa de chirimoya en mal estado. Fuente: autoría propia.

7.2. Extracción de la pectinasa y determinación del contenido de proteína

Como se mencionó en la metodología, la enzima se extrajo de las pulpas de dos frutas en estados de maduración diferente y a dos pH diferentes. Esto nos permite obtener un diseño factorial de tipo 2^3 , donde los factores son el pH, la fruta y el estado de la fruta, y los niveles son (5,3 y 7,1), guanábana (*annona muricata* L) y chirimoya (*annona cherimola*), buen estado y mal estado. La Imagen 14 muestra el proceso de extracción de la enzima de guanábana (*annona muricata* L), en dos buffers diferentes, donde se observaron cambios físicos en la pulpa como mayor globosidad en los gajitos de la pulpa, un mayor contenido de líquido a medida que se realizaba la agitación y un cambio leve de color de blanco a amarillo.

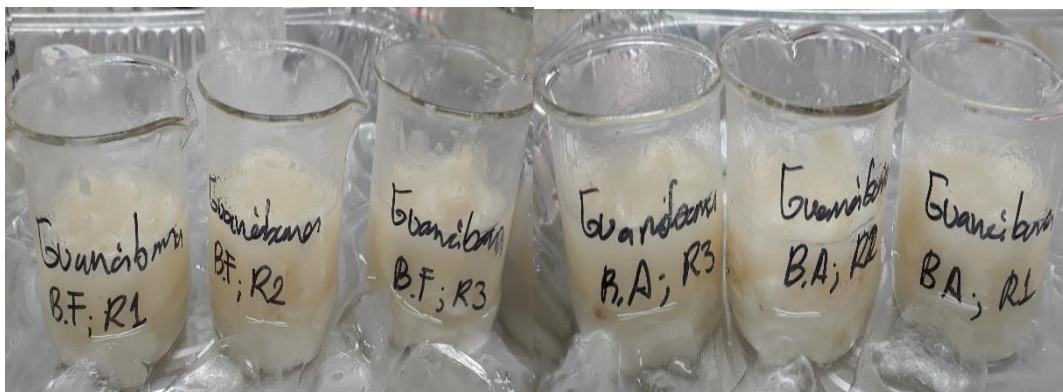


Imagen 14. extracción de enzima guanábana en buen estado, buffer fosfato (izquierda) buffer acetato (derecha). Fuente: autoría propia.

La Imagen 15 y la Imagen 16 muestran el proceso de extracción de la pectinasa a partir de la chirimoya (*annona cherimola*) en presencia de los dos buffers (Fosfato-Acetato). Se observa que la chirimoya (*annona cherimola*) toma una coloración amarilla-marrón debido al pardeamiento oxidativo que genera la enzima polifenoloxidasas en la pulpa de chirimoya (*annona cherimola*). El pardeamiento de frutas se observa cuando es cortada o pelada y esto se debe a la actividad oxidativa de las enzimas fenoloxidasas que oxidan los compuestos polifenólicos en presencia de oxígeno molecular (O_2) por lo tanto se debió hacer la eliminación fenólica antes de la extracción enzimática. El oscurecimiento en chirimoya (*annona cherimola*) ocurre en la pulpa y en la pulpa suspendida en jugo si este se deja en contacto con el oxígeno (Farfan Rodriguez, 2018), (Martinez, K.; Cazorla, A.; Escobar, J.; Alvarado, 2017), (Meijide, R.; Rubín, G.; Alvarado, 2016).



Imagen 15. Extracción enzima buffer acetato (derecha) y fosfato (izquierda) chirimoya en buen estado. Fuente: autoría propia.

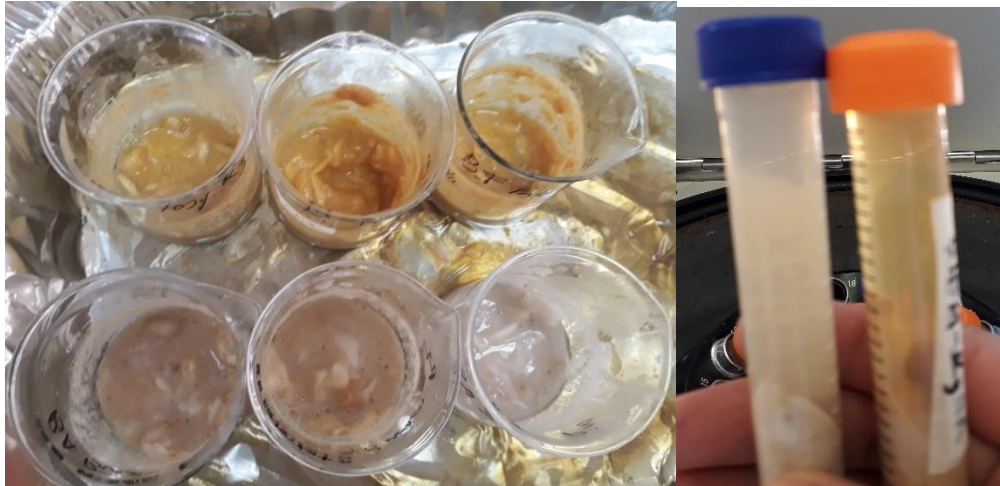


Imagen 16. Extracción pectinesterasa chirimoya en mal estado, arriba buffer fosfato abajo buffer acetato. Fuente: autoría propia.

El contenido de proteína se determinó por el método de Biuret y utilizando Ovoalbúmina (OVA) como estándar; para ello se desarrollaron curvas en buffer y en agua. Las Figura 8, Figura 9 y Figura 10 presentan las curvas obtenidas en cada caso, de lo que se puede analizar que hay mejor relación lineal en la curva de calibración de OVA cuando se prepara en agua con respecto a las que se desarrollaron en buffer, ya que el valor obtenido de R^2 para la curva de calibración de OVA en agua fue de 0,9989 comparado con el valor de R^2 obtenido en las soluciones preparadas de buffer BF de 0,954 y BA 0,9828. Estos valores indican que la relación lineal o el ajuste de la función de la regresión en el conjunto de datos de las soluciones preparadas en agua, se ajusta en un 99,98% de confiabilidad con respecto a los datos obtenidos; mientras que el valor obtenido para las soluciones preparadas con buffer fosfato BF se ajustan en un 95,4% y las preparadas en buffer acetato BA 98,2% de confiabilidad para explicar los datos teniendo en cuenta el método de mínimos cuadrados.

Teniendo en cuenta que el pH de desnaturalización de la ovoalbúmina se encuentra alrededor de 6,6 y que ésta depende del tipo y concentración de sales en el medio, el comportamiento de las soluciones preparadas en solución buffer se puede deber a una posible desnaturalización de la enzima en el medio trabajado (Skoog, D. A., Holler, J. H., Nieman, T. A, 2001).

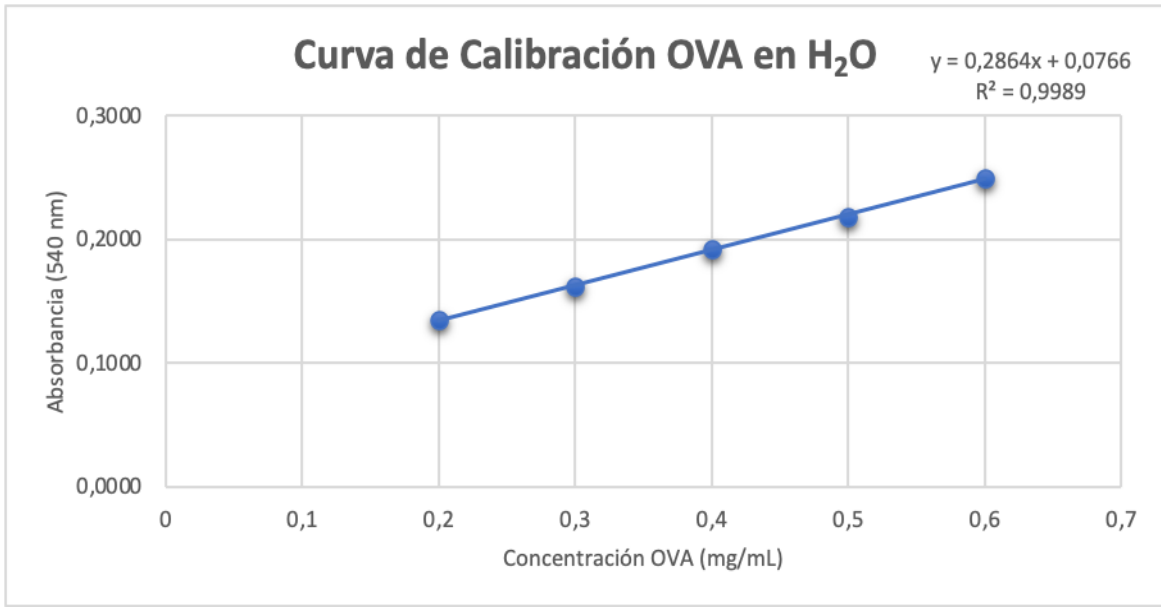


Figura 8 . Curva de calibración OVA en agua (H₂O). Fuente autoría propia.

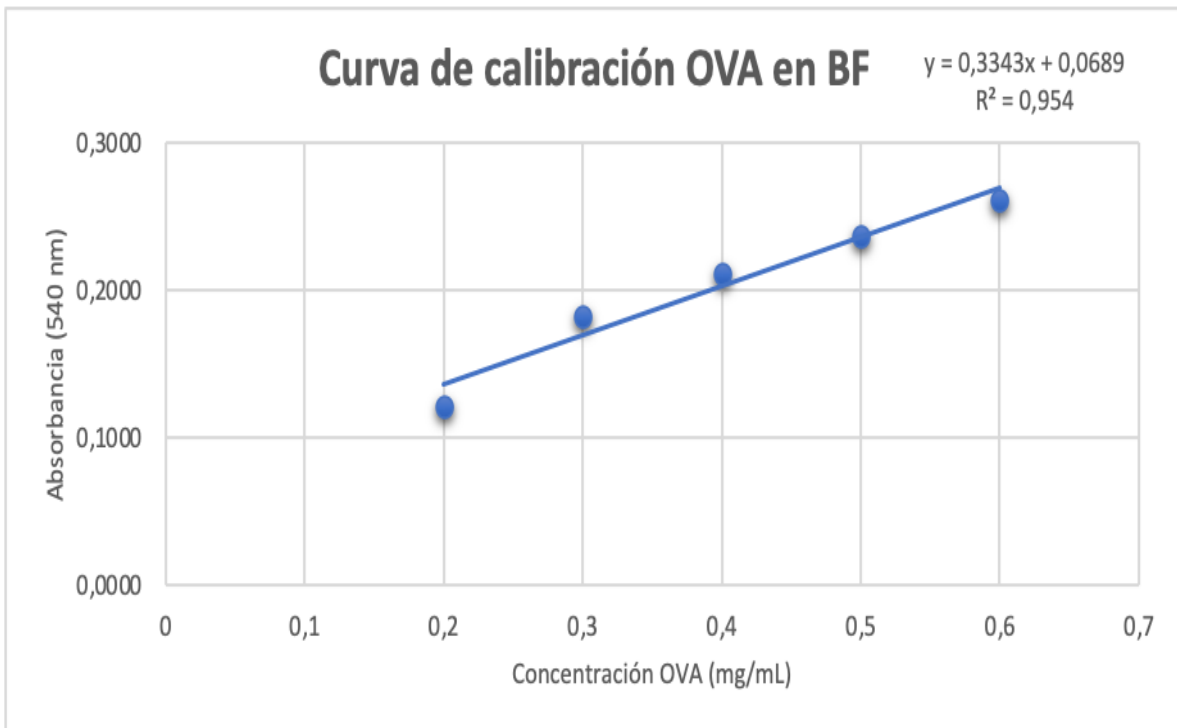


Figura 9. Curva de calibración de OVA en buffer de fosfato pH 7,1 y 0,1 M (BF). Fuente autoría propia.

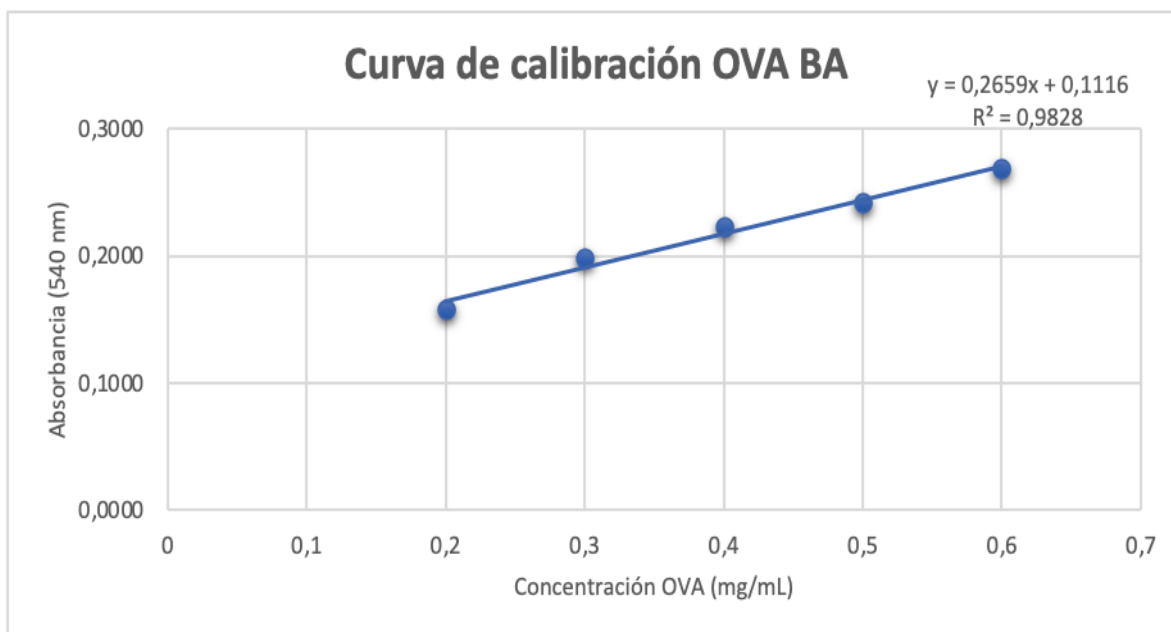


Figura 10. Curva de calibración de OVA en buffer de acetato pH 5,3 y 0,1 M (BA). Fuente autoría propia.

7.2.1. Contenido de proteína en las muestras después de la extracción

En la Tabla 5 y Figura 11, se muestran los resultados obtenidos del contenido de proteína en el extracto crudo después de la extracción presentes con buffer fosfato y acetato para guanábana (*annona murucata L*) en buen estado (GB) y mal estado (GM), al igual que para chirimoya (*annona cherimola*) en buen estado (CHB) y mal estado (CHM), de lo que se puede deducir técnicamente que hay diferencias significativas en el contenido de proteína obtenido en las muestras de guanábana y chirimoya en mal estado como se observa en tabla 5 donde se evidencia que el porcentaje de proteína con mayor concentración se encontró en las frutas en mal estado independientemente del pH de extracción de los buffers porque de acuerdo a los resultados estos no interfieren en el contenido de proteína obtenido.

Tabla 5. Contenido de proteína en el extracto crudo de guanábana en buen estado (GB) y en mal estado (GM); y chirimoya en buen estado (CHB) y en mal estado (CHM) después de la extracción con BF y BA.

Muestra	Contenido de proteína \pm DS (mg/mL) *	% Proteína \pm DS (%p/p) **
BF-GB	153,0 \pm 22,5	7,8 \pm 1,8
BF-CHB	104,9 \pm 33,1	5,9 \pm 3,1
BA-CHB	122,4 \pm 31,9	7,0 \pm 0,7
BA-GB	143,2 \pm 10,8	5,7 \pm 0,3
BF-GM	186,0 \pm 43,0	10,2 \pm 4,0
BA-GM	183,1 \pm 9,6	10,3 \pm 1,1
BA-CHM	277,4 \pm 40,3	19,5 \pm 4,3
BF-CHM	283,6 \pm 76,7	17,9 \pm 7,3

*Volumen total del extracto crudo. **Porcentaje de proteína en los 50 g de pulpa.

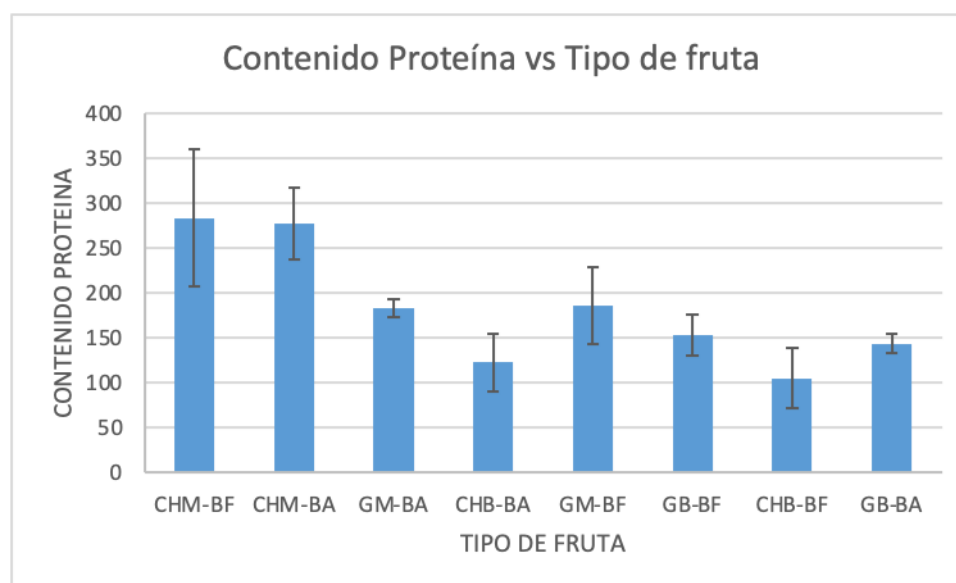


Figura 11. Contenido de proteína en el extracto crudo de guanábana en buen estado (GB) y en mal estado (GM); y chirimoya en buen estado (CHB) y en mal estado (CHM) después de la extracción con BF y BA.

Por lo tanto, de acuerdo con el análisis estadístico desarrollado a través de una ANOVA simple (ANEXO 1) comparando el factor tipo de fruta y pH se encuentra que no hay una diferencia significativa entre las medianas para un nivel de confianza del 95%. Se toma como referencia la prueba de Kruskal-Wallis y el gráfico de caja y bigotes con las muestras de las medianas, es decir, estos no son factores determinantes en el contenido de

proteína y extracción de la enzima pectinasa a partir de pulpa de chirimoya (*annonna cherimola*) y guanábana (*annonna muricata L*) en buen estado y mal estado.

Estos resultados difieren con lo encontrado por Arbaisah et al., (1997) donde evaluaron la extracción de enzima PE de guanábana en estado de madurez fisiológica utilizando NaCl 1,92 M además de lo encontrado por Rodriguez Nieto, J. M, & Restrepo Sánchez, (2011) en la extracción de enzimas pécticas del epicarpio de lulo (*Solanum quitoense Lam*) donde evaluaron la presencia de un aditivo sobre el buffer de extracción, ellos afirman se obtiene mayor eficiencia en la extracción de PE al utilizar un aditivo como el NaCl debido a que las enzimas se encuentran unidas a la pared celular de forma iónica por lo tanto establecen que es necesario el empleo de iones sodio (Na^+) en el buffer para obtener mayor rendimiento de proteína. Además, en el trabajo de Cazorla, Amarilis & Martinez, (2012) para la obtención de un preparado enzimático de guayaba y papaya, en la extracción adicionaron cloruro de sodio (NaCl) para una mayor solubilización de proteínas debido a que las enzimas utilizan la fuerza iónica de la sal para facilitar la extracción creando una transferencia de masa al migrar las enzimas fuera de la membrana celular, en otro estudio se observó que para una efectiva solubilización de la PE es necesaria la presencia de cloruro de sodio (NaCl) en los medios de extracción y sales amortiguadoras como el fósforo las cuales elevan la actividad de la enzima en el extracto crudo que se obtiene de la extracción de la proteína (Meijide, R.; Rubín, G.; Alvarado, 2016)

Por otro lado Contreras-Esquivel et al., (1999) afirman que el éxito en el proceso de extracción está estrechamente relacionado con la fuerza iónica de la solución de extracción, es decir que se deben tener en cuenta condiciones como concentración de NaCl, pH, tiempo de extracción, temperatura de extracción, adición de agentes quelantes y materia prima, los cuales afectan los procesos de extracción de la PE. Además Cazorla, Amarilis & Martinez, (2012) afirman que, aunque las sales amortiguadoras garantizan la extracción de proteínas deben tener una fuerza iónica alta para que sean capaces de liberar las enzimas ligadas a la pared celular sin necesidad de agregar sales, o por el contrario es importante la adición de cloruro de sodio NaCl para una mejor solubilización de las proteínas las cuales utilizan la fuerza iónica de la sal para facilitar la extracción de las mismas, porque la actividad de la enzima depende de los iones de hidrogeno del medio debido a que esto afecta el grado de ionización de los aminoácidos del sitio activo del sustrato o del complejo enzima-sustrato esto influye dependiendo de la afinidad de la enzima por el sustrato. (Cazorla, Amarilis & Martinez, 2012) considerando los resultados de los estudios anteriormente citados en comparación con los obtenidos en la presente investigación se puede determinar que la adición de NaCl al buffer puede contribuir a una mejor disolución de las proteínas, cabe resaltar que se utilizaron diferentes buffers a lo reportado en la bibliografía encontrada con el fin de evaluar el contenido de enzima en otros medios de extracción.

Por otra parte, teniendo presente el factor del estado de fruta (bueno y malo) se encuentra que hay una diferencia significativa, es decir, que debemos tener presente bajo las condiciones de estudio que la enzima a extraer de fruta en mal estado permite obtener mayor contenido de proteína debido a la degradación de la membrana celular donde la solubilización de proteínas se da con mayor facilidad de enzimas pécticas (Sharma et al., 2014) (Martinez, K.; Cazorla, A.; Escobar, J.; Alvarado, 2017).

Por otro lado, estos resultados difieren de los encontrados por Janampa Huaytalla, (2017) en el cual afirman que no fue detectada la actividad de PE en ningún estado de madurez fisiológico estudiado para los frutos de lúcuma cosechados en estado previo a la madurez fisiológica (pMF) y cosechados en estado de madurez fisiológica (MF) provenientes de cuatro árboles, esto posiblemente se dio porque esta enzima tiene como principal función el ablandamiento de los frutos durante su maduración y estos aún no habían alcanzado un grado de madurez óptimo para la degradación enzimática (Janampa Huaytalla, 2017).

Por los resultados obtenidos en la presente investigación es importante indicar que el tiempo empleado para extraer la enzima PE de guanábana (*annona muricata L*) y chirimoya (*annona cherimola*) en buen y mal estado fue de 60 min el mismo que se utilizó para extraer PE en el trabajo de Rodriguez Nieto, J. M, & Restrepo Sánchez, (2011) del epicarpio de lulo (*Solanum quitoense Lam*) al igual que el pH (7,01) del buffer fosfato utilizado en este trabajo en el proceso de extracción así como la concentración del buffer 0,2M.

Cabe destacar que según los datos obtenidos en el presente estudio el contenido de proteína en el extracto crudo de guanábana (*annona muricata L*) y chirimoya (*annona cherimola*) buena y mala varía en rangos desde $104,9 \pm 33,1$ mg/mL para BF-CHB siendo el valor más bajo y $283,6 \pm 76,7$ mg/mL para BF-CHM el valor más alto con porcentajes de 5,3% y 17,9% respectivamente, valores que difieren de lo encontrado por Khatri, Bhattarai, Shrestha, & Maharjan, (2015) donde exponen en su estudio que obtuvieron 52,5 mg (0,525 mg/mL) de proteína total en el extracto crudo después de la extracción de pectinasa a partir de la cepa MCAS2 de aspergillus Níger, cabe destacar que se utilizó el mismo método (método de biuret) para la determinación de la concentración de proteína, por lo tanto se puede deducir que el % o cantidad de proteína varía dependiendo de la fuente de extracción. Así mismo Amid, Manap, & Zohdi, (2014) afirma que extrajo en tampón Tris-HCl pH 8,0, 46,4 mg de pectinasa de cáscara de pitaya roja (*Hylocereus polyrhizus*) de esta forma este resultado difiere del encontrado en la presente investigación en donde los mg de proteína para cada una de las muestras es más alto aunque el porcentaje fue menor, de esta manera podemos deducir que la metodología empleada es más eficiente en el proceso de extracción de contenidos proteicos.

7.3. Purificación de la enzima del extracto crudo por precipitación

La primera purificación se llevó a través de la precipitación con acetona en frío. En la Imagen 17 e Imagen 18 se ve la apariencia de las muestras durante y después de la purificación, donde se observa la interacción de la muestra con el solvente (acetona) por la formación de una especie de hilos. Después de centrifugar se observa la muestra de un aspecto semisólido de color blanco para la guanábana y de color café para la chirimoya, finalmente al secar las muestras extraídas tomaron una apariencia vidriosa para la guanábana (*annona muricata L*) y pegajoso para la chirimoya (*annona cherimola*).

De acuerdo con el trabajo de Handa, (2016), se recomienda para la purificación de proteínas los solventes orgánicos como acetona ya que actúan reduciendo el medio dieléctrico y en consecuencia la solubilidad de las proteínas en el medio, al favorecer las interacciones proteína-proteína y no proteína-solvente. En el caso de la pectinasa esta enzima ha presentado alta tolerancia a los solventes orgánicos como la acetona, metanol y etanol respectivamente los cuales no interfieren en gran medida en su actividad debido a que la purificación de proteínas en solventes hidrofóbicos conserva su estructura nativa como resultado de la cinética de atrapamiento que resulta de un enlace de hidrógeno más fuerte entre los átomos de proteínas y una estructura más rígida en ausencia de agua. (Handa, 2016)



Imagen 17. Apariencia de la muestra durante (izquierda) y después (derecha) de la purificación por precipitación de las muestras de guanábana. Fuente: autoría propia.



Imagen 18. Apariencia de la muestra durante (izquierda) y después (derecha) de la purificación por precipitación de las muestras de chirimoya. Fuente: autoría propia.

Después del secado de la muestra, se determinó el contenido de proteína por el método de Biuret. La Tabla 6 y Figura 12 presentan los resultados para cada una de las muestras de guanábana (*annona muricata L.*) y chirimoya (*annona cherimola*) en buen estado y mal estado. Dentro de los resultados observamos que después de la purificación por precipitación se ve una diferencia significativa en el contenido de proteína entre frutas. De acuerdo con los resultados estadísticos desarrollados a través de un ANOVA simple (ANEXO 2) con un nivel de confianza de 95%, donde se compararon los factores estado de fruta y pH con respecto al contenido de proteína se encontró que no hay una diferencia significativa en estas dos variables y se podría inferir que en los parámetros evaluados en este estudio no son determinantes para evaluar el contenido y obtención de la enzima pectinasa a partir de pulpa de chirimoya (*annona cherimola*) y guanábana (*annona muricata L.*) en buen estado y mal estado. Por otro lado según los resultados expuestos en la tabla Tabla 6 se observan cambios en la actividad de las muestras evaluada a la temperatura de 40°C entre la muestra BA-CHM y BA-CHB y entre BF-GM y BA-CHM comportamiento que puede estar dado por la concentración de enzima PE extraída puesto que al evaluar la actividad enzimática se desarrolló una metodología para esta enzima, por lo tanto no se puede afirmar que todo el contenido de proteína extraído corresponda a la enzima de estudio.

Tabla 6. Contenido de proteína después de la purificación por precipitación de guanábana en buen estado (GB) y en mal estado (GM); y chirimoya en buen estado (CHB) y en mal estado (CHM).

Muestra	Proteína (mg)	%Proteína (precipitado)*	%Proteína (pulpa)**	Actividad 40°C
BF-GB	95,1 ± 12,2	19,0 ± 2,4	0,19 ± 0,02	1,92
BA-GB	120,8 ± 8,4	24,2 ± 1,7	0,24 ± 0,02	1,5
BF-GM	91,7 ± 16,7	18,3 ± 3,3	0,18 ± 0,03	2,17
BA-GM	89,7 ± 8,5	17,9 ± 1,7	0,18 ± 0,02	1,83
BF-CHB	274,4 ± 35,2	54,9 ± 7,0	0,55 ± 0,07	0,92
BA-CHB	333,2 ± 13,4	66,6 ± 2,7	0,67 ± 0,03	1,58
BF-CHM	325,9 ± 25,6	65,2 ± 5,1	0,65 ± 0,05	0,92
BA-CHM	314,8 ± 8,8	63,0 ± 1,8	0,63 ± 0,02	0,67

*Porcentaje de proteína con respecto al peso del precipitado. **Porcentaje de proteína con respecto a los 50g de pulpa.

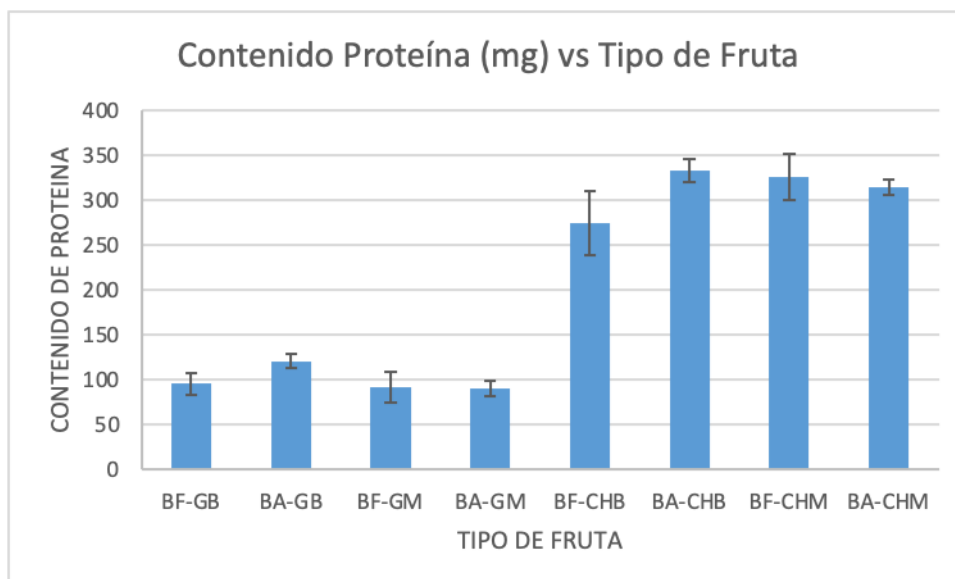


Figura 12. Contenido de proteína después de la purificación por precipitación de guanábana en buen estado (GB) y en mal estado (GM); y chirimoya en buen estado (CHB) y en mal estado (CHM) en BA Y BF.

Por su parte, el tipo de fruta si es una variable importante en el proceso al momento de evaluar el contenido de proteína en frutas de guanábana (*annona muricata L.*) y chirimoya (*annona cherimola*) en buen estado y mal estado a diferencia de la etapa anterior, donde se determinó que el estado de fruta era una variable significativa al evaluar el contenido de proteína esto se debe posiblemente a factores como: **1.** Presencia de compuestos fenólicos o polifenólicos en las muestras al momento de evaluar el contenido de proteína

después de la extracción **2**. Al momento de la extracción se pudo haber obtenido un concentrado de enzimas pécicas u otras proteínas que pueden haber sido eliminadas.(Sharma et al., 2014) (Martinez, K.; Cazorla, A.; Escobar, J.; Alvarado, 2017)

En los resultados obtenidos después de la purificación parcial con acetona fría el porcentaje de proteína obtenido es relativamente más bajo que el obtenido después de la extracción, estos resultados son similares a los encontrados por Khatri et al., (2015) donde después de la purificación parcial con acetona para la pectinasa extraída de la cepa MCAS2 de *Aspergillus Níger* se obtuvo menor cantidad de proteína total en comparación con la encontrada en el extracto crudo la cual fue de 52,5 mg con respecto a 8,4 mg de proteína total y rendimiento del 19% después de la purificación; cabe destacar que estos resultados pueden deberse al desarrollo del precipitado el cual depende de la proteína y los componentes que pueden precipitar al mismo tiempo en la muestra , además parte de la enzima pudo perderse parcialmente por factores como una fase de almacenamiento entre la obtención y el tratamiento de purificación por precipitación lo que pudo derivar en la desnaturalización parcial de la enzima.

Por su parte los resultados encontrados por Arbaisah et al., (1997) al purificar enzima pectinesterasa de guanábana (*annona muricata*) madura con sulfato de amonio $((NH_4)_2SO_4)$ con fraccionamiento del 40 a 90% de la sal, la proteína total encontrada fue de 210 mg que corresponde al 86,7 % de rendimiento, valores que difieren a los encontrados en la presente investigación para la misma fruta guanábana (*annona muricata*) buena y mala donde se utilizó el método de purificación con solvente (acetona fría), como se muestra en la Tabla 6 y Figura 12 para BF-GB 95,1 mg, BA-GB 120,8 mg, BF-GM 91,7 mg y para BA-GM 89,7 mg valores que corresponde a rendimiento entre el 17,9 y 24,2 % . Por otro lado Amid et al., (2014) en la extracción de pectinasa de cáscara de pitaya roja (*Hylocereus polyrhizus*) obtuvieron después de la purificación con $((NH_4)_2SO_4)$ 4,3 mg de proteína total que corresponden al 84,4% de rendimiento. Esto muestra que la purificación por el método con precipitación salina tiene un mayor rendimiento con respecto al método de purificación con solventes orgánicos, que según revisiones bibliográficas una de las desventajas que presenta es el bajo rendimiento en la purificación y posible desnaturalización de la enzima, aunque ayuda a conservar mejor las propiedades de las proteínas. Por su parte, la purificación con $((NH_4)_2SO_4)$ contribuye a recuperar en gran medida la actividad enzimática pero puede alterar la cuantificación de proteína total debido a la presencia de los iones de amonio (David & Betancourt, 2019)(Cucaita Vasquez N A, 2010)

En el estudio realizado para la producción, purificación y aplicación de pectinasa en la preparación de jugos de fruta funcionales, los extractos crudos libres de células de la enzima de *S. violaceoruber S5* and *R. sexualis C4* se sometieron a fraccionamiento secuencial con acetona en diferentes proporciones donde *S. violaceoruber S5* se precipitó con una relación 4:6 de acetona obteniéndose 30mg de proteína y una actividad específica

de 31,25 UI/mg y *R. sexualis* C4 se precipitó la pectinasa con una relación 5:5 de acetona obteniendo 21,25 mg de proteína con una actividad específica de 12,4 UI/mg logrando un rendimiento de pectinasa del 78 y 80% respectivamente (Handa, 2016). Lo anterior evidencia que el contenido de proteína depende de la fuente de extracción, pues es bien conocido que las extracciones con hongos, y bacterias presentan mayor rendimiento. Por otro lado, de acuerdo a esto y los resultados obtenidos se puede analizar que el método de purificación por precipitación con acetona permite obtener un concentrado enzimático que conserva la actividad de la enzima la cual no se ve significativamente afectada durante este proceso.

7.4. Purificación de la enzima por cromatografía de intercambio iónico (CII)

Las técnicas cromatografías se aplican ampliamente para la separación y purificación de proteínas. Los datos representados en la Figura 13 muestran que se obtuvieron 13 fracciones donde las muestras con mayor contenido de proteína fueron encontradas en las fracciones de 1-3 para todas las muestras BF-CHB, BF-GB, BF-CHB, BF-CHM y BA-CHB. Además, se pudo observar que en las fracciones de BF-CHB y BA-CHB se presentaron los valores más altos en comparación de las muestras de BF-GB, BF-CHB y BF-CHM, lo cual está de acuerdo con lo encontrado en el contenido de proteína cuantificado después de purificar por precipitación para la muestra de BF-CHB, pero no para BA-CHB el cual presenta un valor menor.

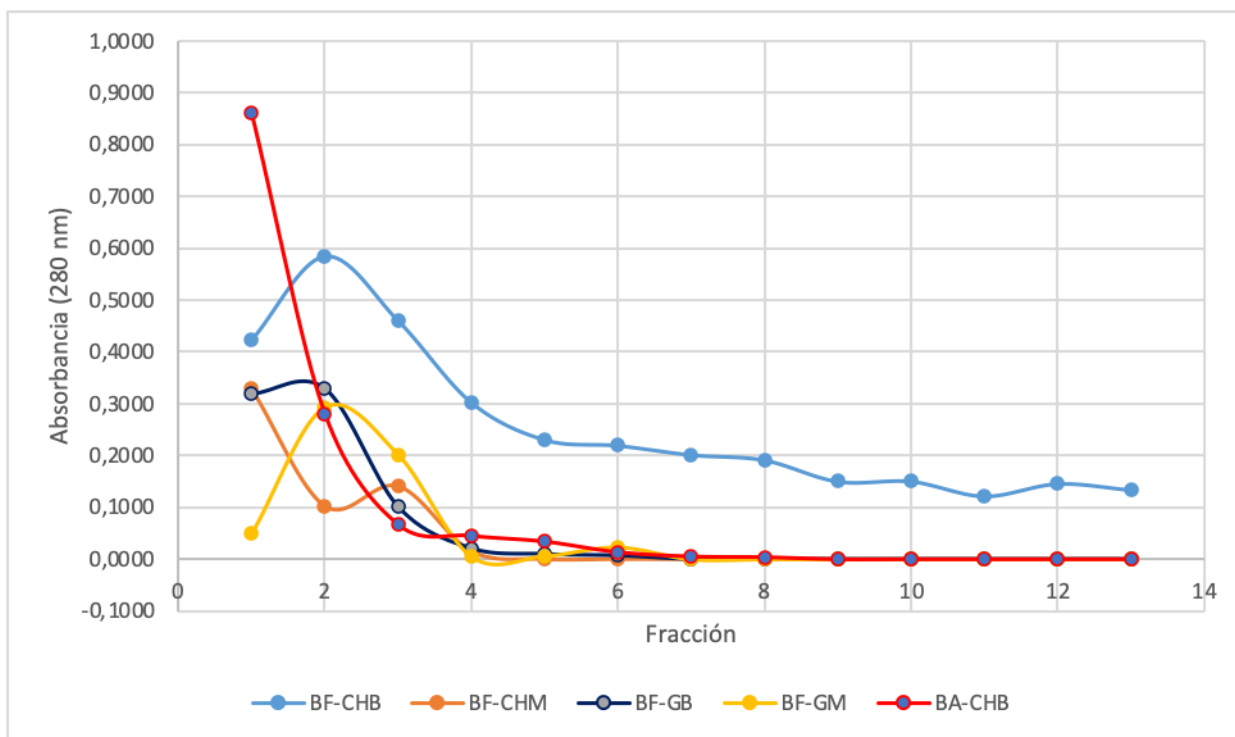


Figura 13. Curvas de la purificación Fracción vs Absorbancia (280 nm) para las muestras BF-GB, BF-GB, BF-GM, BA-GM, BF-CHB, BA-CHB, BF-CHM y BA-CHM.

El resultado obtenido de las mediciones de cada fracción nos permitió establecer que las corridas cromatográficas iónica de la pectinasa eluyeron con un pico único a una concentración de 0,05 M de NaCl, este resultado difiere en la concentración de la sal, al encontrado por Vita, (2013) en el proceso de purificación de PE extraída de *Aspergillus Kawachii*, la cual eluyó a una concentración de 0,3 M de NaCl, por otro lado los perfiles de elución en la cromatografía con Sepharose-Q mostraron un único pico con distribución simétrica de la actividad la cual también ha sido encontrada en PE de *A. Níger*, *A. foetidus*, *Clostridium multifementans* en papaya (Vita, 2013). Sin embargo, es importante resaltar que las proteínas con pocos grupos cargados eluyen a baja concentración de sales, mientras que las proteínas con muchos grupos cargados eluyen a altas concentraciones de sales y tienen un mayor tiempo de retención, según lo anterior y los resultados obtenidos con la metodología utilizada se pudo inferir que la proteína posiblemente tiene pocos grupos cargados ya que se utilizaron sales a bajas concentraciones y el tiempo de elución fue corto.

Por otro lado, de acuerdo con los resultados estadísticos desarrollado a través de un ANOVA simple (ANEXO 3) con un nivel de confianza de 95%, donde se compararon los factores tipo de fruta y estado de fruta con respecto clarificación para las muestras de guanábana (*annona muricata L.*) y chirimoya (*annona cherimola*) en buen estado y mal estado a pH 7,1 se encontró que no hay una diferencia estadísticamente significativa en estas dos variables y se podría inferir que no son determinantes para evaluar la clarificación de jugo de mora con la enzima pectinasa.

Por otro lado, en el análisis de proteína en relación con el tipo y estado de la fruta desarrollado a través de ANOVA simple (ANEXO 3) donde se evaluaron estos dos factores con un nivel de confianza de 95% para las muestras de guanábana (*annona muricata L.*) y chirimoya (*annona cherimola*) en buen estado y mal estado a pH 7,1 BF se encontró que no hay una diferencia estadísticamente significativa en estas dos variables de lo que se puede inferir que no son determinantes para evaluar el contenido de proteína después de la purificación por cromatografía de intercambio iónico, pero es importante resaltar como lo muestra la Tabla 7 que técnicamente hay una diferencia en los valores de contenido de proteína con respecto a las variables evaluadas. Cabe destacar dentro de estos resultados que la muestra que mayor presenta contenido de proteína es la muestra de BF-CHM y la que presenta un valor menor es BA-CHB.

Tabla 7. Contenido de proteína después de la purificación por Sephadex, % proteína en 0,05g purificados con acetona y % proteína relación proteína-pulpa

Muestra	Proteína (mg)	%Proteína (0,05g)	%Proteína-pulpa
BF-GB	4,1	8,1	0,02
BF-GM	1,6	3,2	0,01
BF-CHB	12,5	25,0	0,05
BF-CHM	6,8	13,6	0,03
BA-CHB	1,03	2,05	0,00

En la Tabla 8 se observa que los valores de proteína total (mg) varía de acuerdo al proceso tanto de extracción como en la purificación en cada una de las muestras de GB, GM, CHB y CHM extraídas a pH 7,1 en buffer fosfato y CHB en buffer acetato, resultado que está de acuerdo a lo encontrado por Khatri et al., (2015) después de la purificación con sephadex G-75 obtuvieron 0,15 mg que corresponde al 16% de rendimiento de la enzima pectinasa obtenida, además se encontró que los valores de proteína total (mg) varía de acuerdo a cada proceso tanto en la extracción (52,5 mg), después de la purificación por precipitación con acetona fría (8,4 mg).

Tabla 8. Comparación del contenido de proteína en el extracto crudo, después de precipitar con acetona y después de purificar por Sephadex

Muestra	Proteína después de la extracción (mg)	Proteína después de purificar por precipitación (mg)	Proteína después de purificar por CII* (mg)	Actividad 40°C purificar por precipitación U/mg	Actividad a 40°C después de purificar por CII U/mg
BF-GB	153,0±22,5	95,11±12,20	4,06	1,92	No se realizo
BA-GB	143,0±10,8	120,81±8,43	No se realizó	1,5	No se realizo
BF-GM	186,0±43,0	91,72±16,65	1,60	2,17	No se realizo
BA-GM	183,1±9,6	89,72±8,45	No se realizó	1,83	No se realizo
BF-CHB	105±33,1	274±35	12,5	0,92	9,04
BA-CHB	122,4±32	333±13	1,03	1,58	No se realizo
BF-CHM	283,6±76,6	325,9±25,6	6,80	0,92	No se realizo
BA-CHM	277,4±40,3	314,8±8,8	No se realizó	0,67	No se realizo

*Cromatografía de intercambio iónico (CII)

Por otro lado, en el estudio de Arbaisah et al., (1997) encontraron después de la purificación con cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex C-50 dos picos de actividad de pectinesterasa extraída de pulpa de guanábana madura los cuales llamaron PE I y PE II de lo que obtuvieron 4mg y 6,4mg respectivamente por lo que afirman que las

plantas contienen múltiples formas de pectinesterasa incluso en el tejido vegetal. Por otra parte, en la extracción de la enzima pectinasa de cáscara de pitaya roja (*Hylocereus polyrhizus*) estudio de Amid et al., (2014) obtuvieron después de la purificación por cromatografía de intercambio iónico 0,1 mg de proteína total, valores que son similares a los encontrados en este trabajo en las frutas en buen estado y mal estado.

En la purificación de enzimas por lo general se utilizan diferentes métodos, en la Tabla 9 se puede observar dos de ellos: por precipitación y cromatografía de intercambio iónico para diferentes muestras de origen vegetal y fúngica donde se evidencia que el contenido de proteína total (mg) es mayor en la purificación por precipitación en comparación a la obtenida por purificación con sephadex, además la actividad enzimática (U/mg) es inversamente proporcional a la masa de la proteína porque a mayor grado de purificación mayor actividad presenta la enzima. Cabe resaltar que esto se debe posiblemente a que después de la purificación por precipitación el extracto queda con gran cantidad de agentes contaminantes de índole proteica y por esta razón al aplicar técnicas cromatografías para posterior purificación estas ayudan a eliminar contaminantes de bajo peso molecular que no pudieron ser eliminados por la precipitación (Cazorla, Amarilis & Martinez, 2012).

De acuerdo con los resultados de actividad obtenido de la enzima después de purificación por precipitación y de una muestra por cromatografía de intercambio iónico (Tabla 8) se puede concluir que una vez realizados los procesos de purificación la concentración de la proteína es mayor y por ende mejora la actividad enzimática de la pectinasa sin embargo se hace necesario el desarrollo de todos los ensayos de actividad para las muestras purificadas por Sephadex para poder concluir de forma más coherente y precisa pero estos resultados tienen una tendencia similar a lo observado en la Tabla 9.

Tabla 9: comparación de actividad enzimática de diferentes fuentes de extracción de pectinasa después de los métodos de purificación por precipitación y CII.

FUENTE DE EXTRACCION Pectinasa	Método de purificación	Proteína total mg	Temperatura óptima	pH óptimo	Actividad U/mg	Referencia
Cáscara de pitaya roja (<i>Hylocereus polyrhizus</i>)	Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.3 ± 1.1	75°C	8,0	144.4	(Amid et al., 2014)
	Cromatografía de intercambio iónico (CII)	0,1 ± 0.2	75°C	8.0	3554,2	(Amid et al., 2014)
Guanábana (<i>annona muricata</i>)	Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	210	60°C	7,5-8,0	1.92	(Arbaisa h et al., 1997)
	Cromatografía	4,1	60°C	7,5-8,0	81,7	(Arbaisa

	de intercambio iónico	6,1			439	h et al., 1997)
Chirimoya en buen estado (BF) (<i>annona cherimola</i>)	Precipitación con acetona	274±35	40°C		0,92	Autoría propia
	Cromatografía de intercambio iónico	12,5	40°C		9,04	Autoría propia
pectinasa termoestable alcalina de la cepa MCAS2 de <i>Aspergillus Niger</i>	Precipitación con acetona	8,4	50°C	8,2	8,33	(Khatri et al., 2015)
	Purificación por cromatografía de intercambio iónico Sephadex	0,15	50°C	8,2	60	(Khatri et al., 2015)
Pectinasa extraída de la cepa de <i>Trichoderma viridi</i>	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄	120	40°C	5,5	23,6	(Irshad, Anwar, Mehmod, & Nawaz, 2014)
	Purificación por cromatografía de intercambio iónico Sephadex- G-100)	18	40°C	5,5	97,2	(Irshad et al., 2014)

7.5. Actividad enzimática: efecto del pH y la temperatura

7.5.1. Efecto de la temperatura

Los efectos de la temperatura sobre la actividad de una enzima son complejos y a su vez pueden ser considerados como dos fuerzas que actúan simultáneamente, pero en direcciones opuestas, porque a medida que la temperatura aumenta la actividad aumenta, pero al mismo tiempo hay una inactivación progresiva (desnaturalización) de la proteína de modo que es importante establecer la temperatura óptima, es decir, donde la proteína exprese su mayor actividad. El comportamiento de la temperatura sobre la

actividad de la pectinasa purificada por precipitación de las muestras extraídas con buffer fosfato a partir de GM, GB, CHB y CHM mostraron un claro aumento en la actividad enzimática a una temperatura de 40°C como se puede evidenciar en la Figura 14, la actividad más alta de la enzima se observó en la muestra de guanábana (*annona muricata L*) en mal estado (GM) con un valor de $2,17 \pm 0,14$ UI/mL, seguida de la muestra de guanábana (*annona muricata L*) en buen estado (GB) para la cual se obtuvo una actividad de $1,92 \pm 0,29$ UI/mL, pero así mismo cuando la temperatura aumenta por encima de la óptima (40°C) se denota una rápida inactivación o desnaturalización de la enzima, mientras que para las muestras de chirimoya (*annona cherimola*) en buen (CHB) y mal estado (CHM) su actividad aumenta gradualmente hasta los 40 °C mostrando un valor de $0,92 \pm 0,14$ UI/mL el cual es relativamente bajo en comparación con las muestras de guanábana (*annona muricata L*), por otro lado, en temperaturas por encima a esta actividad de la enzima se vio afectada negativamente reduciéndose gradualmente.

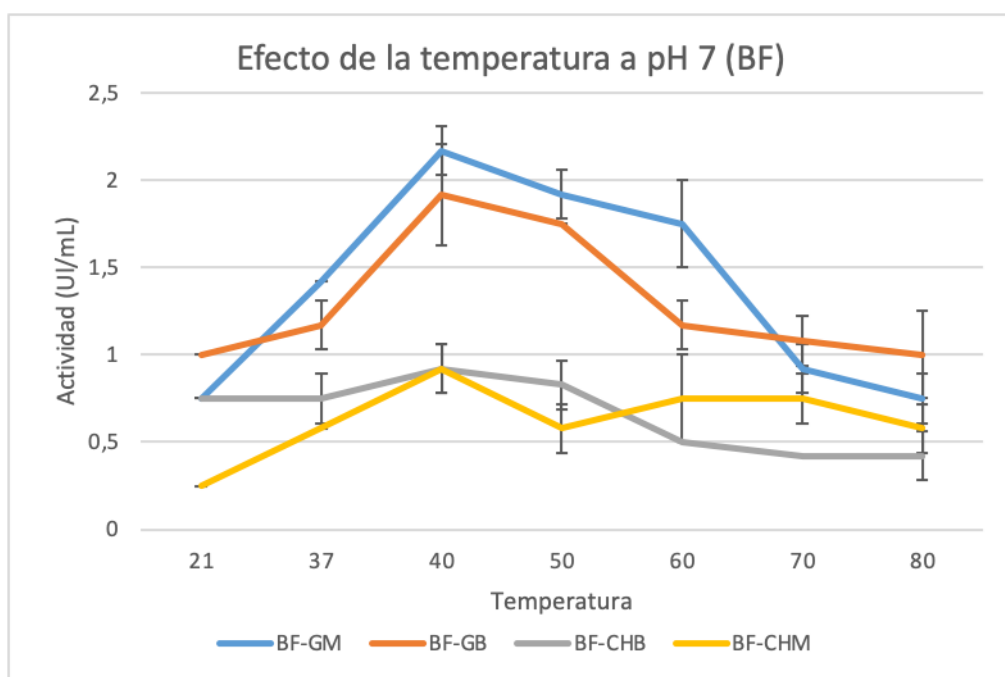


Figura 14. Curvas de Actividad enzimática Buffer Fosfato para las muestras BF-GM, BF-GM, BF-CHB, BF-CHM.

Los resultados encontrados en la actividad enzimática con respecto al comportamiento de la temperatura sobre la actividad de la pectinasa purificada por precipitación con acetona de las muestras extraídas con buffer acetato de CHB, CHM, GB y GM, mostraron un claro aumento en la actividad enzimática a una temperatura de 40°C como se puede evidenciar en la Figura 15, se observó que a una temperatura superior a 40 °C la enzima pierde actividad progresivamente, la muestra que presento mayor actividad fue la de guanábana (*annona muricata L*) en mal estado GM ($1,83 \pm 0,14$ UI/mL) seguida de chirimoya en buen

estado CHB ($1,58 \pm 0,14$ UI/mL) y guanábana (*annona muricata* L) en buen estado GB ($1,5 \pm 0,25$ UI/mL) por otro lado, presentó un menor rango de actividad la muestra de chirimoya (*annona cherimola*) en mal estado CHM ($0,67 \pm 0,14$ UI/mL).

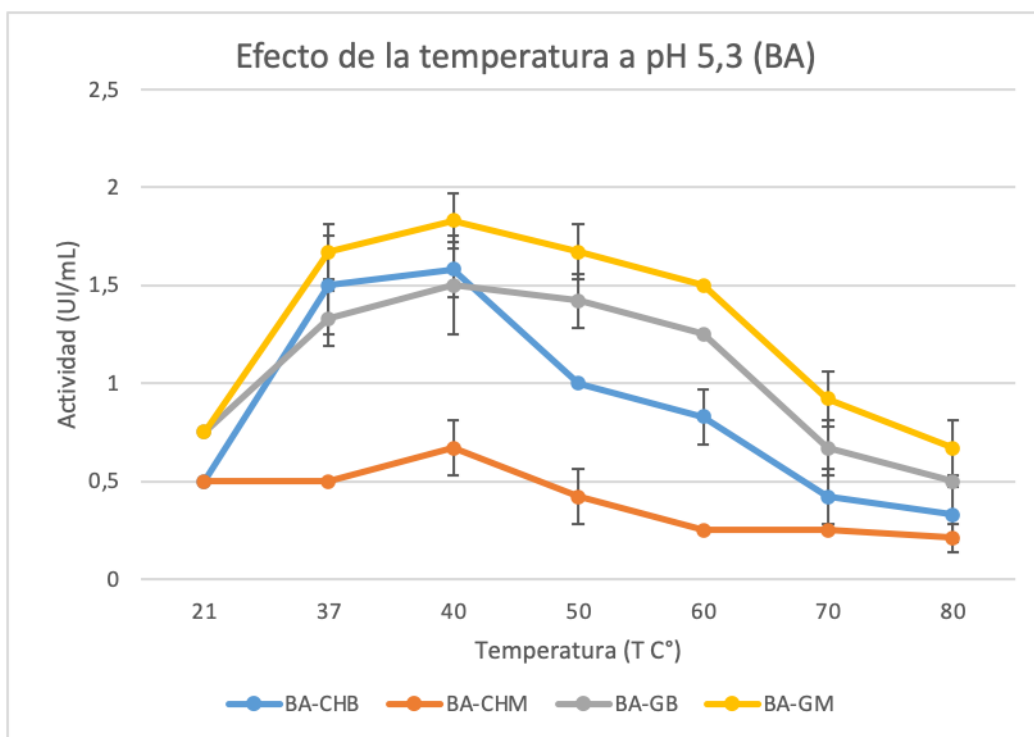


Figura 15. Curvas de Actividad enzimática Buffer Acetato para las muestras BA-CHB, BA-CHM, BA-GB, BA-GM.

De lo anterior se infiere que las enzimas extraídas de las muestras de guanábana (*annona muricata* L) con buffer fosfato presentaron mayor actividad enzimática (GM $2,17 \pm 0,14$ UI/mL, GB $1,92 \pm 0,29$ UI/mL), mientras que la enzima en la muestra de chirimoya (*annona cherimola*) en buen estado si hay variabilidad siendo la que se extrajo en buffer acetato la que presenta mayor actividad (CHB $1,58 \pm$ UI/mL) con respecto a la extraída en buffer fosfato ($0,92 \pm$ UI/mL). Este resultado está de acuerdo con el estudio de Jiménez-zurita et al., (2017), donde la actividad de esta enzima aumenta cuando el fruto ha llegado a madurez de consumo con respecto al fruto con madurez fisiológica debido a la degradación de las sustancias pécticas.

La desnaturalización de la proteína se produce a temperaturas elevadas que según el tipo de enzima pueden ir de rangos mayores a 70°C cuando las moléculas adquieren una alta energía cinética que lleva al rompimiento de los enlaces que mantienen unida la macromolécula y pierde su forma específica (Handa, 2016). Cabe destacar que en el estudio de Rodríguez Nieto, Jeimy Marcela, & Restrepo Sánchez, (2011) encontraron que la temperatura óptima de incubación para lograr mayor eficiencia de la enzima

pectinesterasa extraída del epicarpio de lulo (*Solanum quitoense Lam*) fue 37°C. Por otro lado, en el estudio de Ünal & Aysun, (2015) establecieron que la actividad máxima de la PME extraída de albaricoque Alyanak (*prunus armeniaca L*) se encontraba en temperaturas de 30 a 40°C; los cuales son valores cercanos a los encontrados en este trabajo.

Por otra parte los resultados encontrados por Arbaisah et al., (1997) establecen que la enzima pectinasa extraída de guanábana (*annona muricata*) presenta una temperatura optima de 60°C con actividad máxima de 1,92 U/mg⁻¹ después de la purificación con (NH₄)₂SO₄, difiere del encontrado en la presente investigación donde se estableció una temperatura optima de 40°C y una actividad enzimática máxima para la muestra de BF-GM de 2,17 ± 0,14 UI/mL, después de la purificación con acetona fría, por otro lado el valor de la actividad enzimática es similar al de la muestra de BF- GB 1,92 ± 0,29UI/mL.

Por otro lado, los resultados de este trabajo evidencian una mayor actividad que la encontrada por Garcia Calvo, (2015), donde se reportó que la actividad de la PE extraída de manzanas Grammy Smith fue de 0,030 UPE/mL, a una temperatura optima de 30°C y pH de 7,5. Sin embargo, usando *Aspergillus Niger* se ha encontrado que la actividad máxima de la enzima es de 160,31 µg/mL por segundo a una temperatura optima de 40°C con un tiempo de incubación de 96 horas (Dhembare et al., 2015). Estas diferencias se pueden dar por la variedad de la fruta o por lo métodos utilizados para purificar la proteína, ya que mientras más pura sea la enzima expresa mayor actividad por miligramo de proteína, además, se dice que las propiedades como pH y temperatura de las enzimas difieren dependiendo de la variedad del medio de obtención. Como lo muestra el estudio realizado por Mangesh N Kothari & Baig, (2013) donde se encontró que la actividad máxima de la enzima pectinesterasa se presenta a los 27°C esto puede deberse al medio de obtención debido a que su estudio fue desarrollado con incubación en estado líquido en proceso de fermentación sumergida de una bacteria del género *Erwinia*. Por otro lado, Makky, (2015) desarrolló un estudio en purificación de pectinasas y aplicación en residuos fermentados de *Thermomyces Lanuginosus* donde exponen que la enzima alcanzó su actividad máxima a 50°C (4,433 ± 0,001 U/MI) cabe resaltar que este experimento se diseñó con una enzima extraída de un hongo el cual fue incubado en un medio que contenía bagazo de caña. En otro estudio desarrollado por Oumer & Abate, (2017) encontraron que la actividad alcanzada por la enzima PE caracterizada de *Bacillus subtilis Strain Btk 27*, fue a una temperatura de 50°C. En el estudio para la producción de pectinasas a partir de *Bacillus subtiles EFRL 01* se muestra que la temperatura a la que alcanzó la actividad óptima de fermentación fue a 45°C (Sattar et al., 2012).

Por lo tanto, ha sido soportado en la literatura que la actividad óptima de la pectinasa se presenta en el rango 30-60°C aproximadamente, que depende de la fuente de extracción de la enzima y del proceso de purificación, por ejemplo, en el estudio de (Irshad et al., 2014) revelaron que la pectinasa obtenida de residuos agroindustriales de cáscara de

naranja por tratamiento con *Trichoderma viridi*, alcanzó su máxima actividad (325 U/mL) a 30°C, pero después de purificada su temperatura de mayor actividad fue a 60°C. Lo anterior indica que esta enzima es termoestable pues trabaja en rangos de temperatura hasta los 60 °C, lo que es una propiedad atractiva para la industria de alimentos. Además (Kc, Upadhyaya, Joshi, & Lekhak, 2020) reportaron una temperatura óptima de 30°C con un valor de actividad enzimática de 75,4 U/mL para la enzima pectinasa extraída de hongos *Aspergillus pps* de la cepa Gm.

Por otro lado, se ha demostrado que para buscar mejores condiciones en la medida de actividad de las enzimas es necesario un cofactor como el ion sodio (Na) en concentración de 0,15 M de NaCl en donde se sugiere que esta concentración es necesaria para que la enzima alcance su máxima velocidad esto se debe probablemente a la saturación con el cofactor resultado que difiere al utilizado en la presente investigación 0,2 M de NaCl el cual no muestra que afecte de manera significativa el valor de actividad enzimática por lo tanto es importante mencionar que es posible que un exceso en la concentración de cofactor tenga un efecto inhibitorio en la unión con el sustrato. (Rodríguez Nieto, Jeimy Marcela, & Restrepo Sánchez, 2011)

De acuerdo con los resultados estadísticos desarrollados a través de un ANOVA simple (ANEXO 4) donde se compararon factores como: tipo de fruta, estado de fruta, el pH y temperatura con respecto a la actividad enzimática se encontró que hay una diferencia estadísticamente significativa sobre la actividad con dos de estas variables (tipo de fruta y temperatura); de esta manera, es importante resaltar que estas variables son determinantes para evaluar la actividad de la enzima pectinasa obtenida a partir de pulpa de chirimoya (*annona cherimola*) y guanábana (*annona muricata L*) en buen estado y mal estado. Por otro lado, se determinó que factores como el tipo de buffer (pH) y estado de fruta no son variables determinantes para establecer diferencias estadísticamente significativas en la obtención de la actividad enzimática de la enzima extraída.

la enzima extraída de la guanábana en cualquiera de los dos estados y a cualquier pH tienen mayor actividad.

7.5.2. Efecto del pH

El comportamiento del pH sobre la actividad de la pectinasa purificada por precipitación de las muestras extraídas con buffer fosfato a partir de GM, GB, CHB y CHM mostraron su máxima actividad a pH 4,0 como se puede observar en la Figura 16, adicionalmente se puede evidenciar descenso de la actividad a pH superiores a este, donde muestra una rápida inactivación de la enzima. La actividad más alta de la enzima se observó en la muestra de guanábana (*Annona muricata L*) en mal estado (GM) con valor de $27,00 \pm 0,87$ UI/mL, seguida de la muestra de guanábana (*Annona muricata L*) en buen estado (GB) $26,5 \pm 0,87$ UI/mL, por otro lado se observa en las muestras extraídas de chirimoya

(*Annona cherimola*) en buen estado y mal estado un descenso más significativo de la actividad enzimática en comparación con las muestras de guanábana (*annona muricata L*) en los rangos de pH 6,0-8,0.

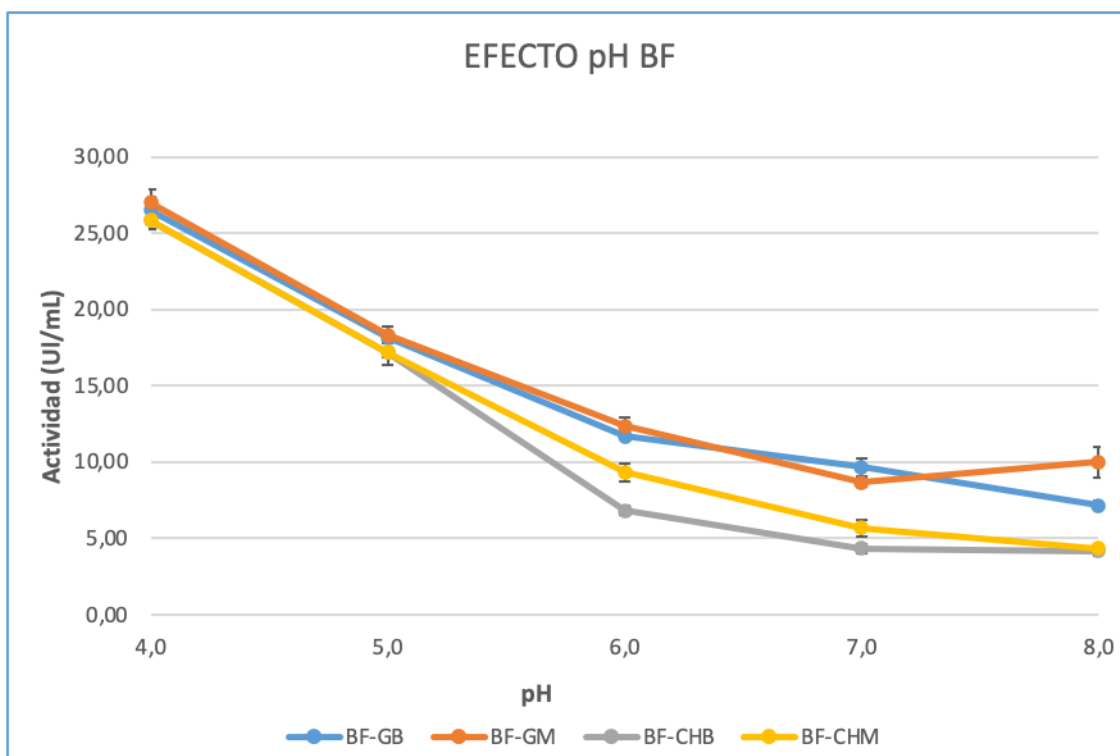


Figura 16. Curvas de Actividad enzimática pH Buffer Fosfato para las muestras BF-GM, BF-GM, BF-CHB, BF-CHM.

Los resultados encontrados en la actividad enzimática con respecto al comportamiento del pH sobre la actividad de la pectinasa purificada por precipitación con acetona fría de las muestras extraídas con buffer acetato de CHB, CHM, GB y GM, mostraron un claro aumento en la actividad enzimática a pH 4,0 como se puede evidenciar en la Figura 17, además se observó que a un pH superior a este, la enzima presentó un descenso significativo de su actividad en los rangos de pH 6,0-8,0, las muestras de chirimoya (*Annona cherimola*) en buen estado y mal estado en comparación con las de guanábana (*annona muricata L*) en buen estado y mal estado presenta menor actividad enzimática, por lo que se evidencia una alta tendencia a desnaturalización de la enzima pectinasa extraída de chirimoya (*Annona cherimola*) a pH alcalinos. La muestra que presentó mayor actividad fue la de chirimoya *Annona cherimola*) en buen estado CHB ($27,33 \pm 0,29$ UI/mL) seguida de guanábana (*Annona muricata L.*) en buen estado GB ($26,83 \pm 0,29$ UI/mL) y chirimoya (*Annona cherimola*) en mal estado CHM ($26,67 \pm 0,29$ UI/mL).

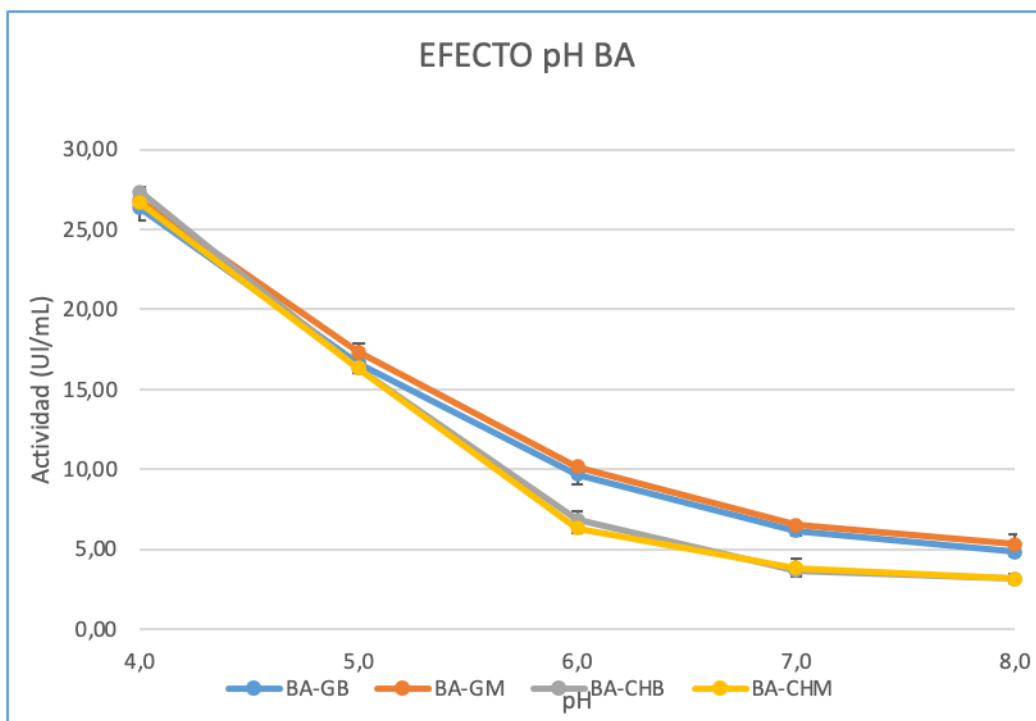


Figura 17. Curvas de Actividad enzimática pH Buffer Acetato para las muestras BA-CHB, BA-CHM, BA-GB, BA-GM.

Las diferencias de pH óptimo podrían deberse a las diferencias en el tipo de enzima, al modo de acción o a la fuente de extracción. El pH óptimo obtenido para la pectinasa extraída del epicarpio de lulo (*Solanum quitoense* Lam) fue de 7,0 (Rodríguez Nieto, Jeimy Marcela, & Restrepo Sánchez, 2011). Así mismo, en un estudio realizado por Ünal & Aysun, (2015) encontraron que la actividad enzimática máxima de la pectina metilesterasa de albaricoque Alyanak (*Prunus armeniaca* L) se encuentra a pH 7,5, para guayaba y papaya se determinó un valor de pH de 7,8 donde la actividad enzimática es óptima, además obtuvieron valores de actividad máxima para guayaba de 1,3 (UPE/mL) y papaya 5,3 (UPE/mL) (Cazorla, Amarilis & Martinez, 2012). Por su parte Arbaisah et al., (1997) en su estudio sobre la extracción de pectinasa de guanábana (*Annona muricata*) estableció un pH óptimo para esta enzima de 7,5 a 8,0 presentando actividad específica de $81,7 \text{ U/mg}^{-1}$, además Amid et al., (2014) extrajeron la enzima pectinasa de la cáscara de pitaya roja (*Hylocereus polyrhizus*) y determinaron un pH óptimo para la enzima de 8,0 donde se obtuvo la actividad enzimática más alta (92%). Valores que difieren con los resultados obtenidos en esta investigación debido a que se encontró pH óptimo de 4,0 donde la enzima presenta mayor actividad enzimática, los demás valores evaluados no favorecen la actividad de la enzima probablemente por la modificación del sitio activo.

Cualquier cambio en la concentración de iones hidrógeno (pH) puede afectar profundamente la actividad de la enzima y estos cambios no solo afectan la forma de la enzima sino que pueden cambiar la forma o las propiedades de la carga del sustrato para que no pueda unirse al sitio activo o no pueda sufrir catálisis, la pérdida de actividad enzimática en condiciones extremas de pH puede atribuirse a la desnaturalización de proteínas que puede ser una desnaturalización ácida o alcalina dependiendo del rango de estabilidad de la enzima. En general la enzima tiene un pH óptimo que no es lo mismo para cada enzima algunas son bastante estables en rangos de pH más bajos y algunas son bastante estables en rangos de pH más altos (Handa, 2016).

Se ha logrado establecer que la pectinasa fúngica, especialmente la de especies *Aspergillus*, es activa en un rango de pH de 4,0 a 6,0, es decir que la enzima aquí es de naturaleza ácida (Handa, 2016). Por otro lado, A. Kumar & Sharma, (2012) & Ahlawat, Battan, Sudha, & Jitender, (2014); en sus estudios han demostrado que la pectinasa alcalina es producida por bacterias, principalmente *Bacillus* y *Streptomyces sp*, Mangesh N Kothari & Baig, (2013) establecieron en su estudio un rango ácido de pH de 5,2 para poligalacturonasa extraída de *Erwinia carotovora* MTCC 1428 el cual es concordante con el establecido por Makky, (2015) donde explican que el valor de pH en el que la enzima alcanza mayor actividad fue en pH 5,0 que por encima y por debajo de este la actividad enzimática disminuye gradualmente. Por otro lado, la enzima pectinasa caracterizada de *Bacillus subtilis* Strain Btk 27 registró actividad máxima a pH 7,5 (Oumer & Abate, 2017). En el estudio de Handa, (2016) encontró que para la pectinasa extraída con *B. parabrevis* el rango de pH óptimo abarca un rango de 5,0 a 7,0 con actividad máxima en pH 7,0.

Por otro lado, en el estudio de Khatri et al., (2015) se reportó la extracción de pectinasa de un cultivo celular de *Aspergillus niger* MCAS2 el cual purificaron parcialmente con acetona fría, seguido de una purificación por cromatografía en columna Sephadex G-75 donde se encontró que la enzima parcialmente purificada es significativamente activa en un rango de temperatura entre 50-70°C y pH 6,2-9,2 encontrando como temperatura y pH óptimos 50°C y 8,2; lo que indicó que es una enzima termoestable de naturaleza alcalina, además de la enzima purificada parcialmente con acetona fría presentó actividad específica de 8,33 U/mg y 60 U/mg usando el método de Sephadex. Estos valores difieren de los reportados en esta investigación, aunque se utilizó el mismo método de purificación el valor de pH óptimo para la enzima extraída de guanábana (*annona muricata* L) y chirimoya en mal estado y buen estado fue de 4,0 esto puede atribuirse a que la fuente de extracción es diferente.

Además, en el estudio de Kc et al., (2020) acerca del aislamiento de pectinasa de *Aspergillus* pps, encontraron que la enzima aislada de la cepa Gm y purificada parcialmente con acetona fría tiene actividad en un amplio rango de pH (3,2-9,0) pero su actividad enzimática óptima se presenta a pH 5,8 con valor de 72,3 U/mL, es decir que su actividad está en un rango ligeramente ácido. Por otra parte, según los resultados de los

estudios encontrados se puede determinar que las pectinasas fúngicas son estables en rangos de pH ácidos a alcalinos.

Se puede analizar en la Tabla 10 donde se reportan los valores de pH óptimos para la enzima pectinasa extraída de diferentes fuentes vegetales que es una enzima de naturaleza alcalina que presenta su máxima actividad enzimática en rangos de pH de 5,0 a 8,0, resultados que difieren al obtenido en la presente investigación donde se determinó un pH óptimo para la enzima de 4,0 esto posiblemente a: **1.** La enzima se comporta de forma diferente frente al pH dependiendo del sistema buffer empleado. **2.** Como lo indica Paola, Castro, Eduardo, Cuenca, & Sc, (2006) donde determinaron la actividad para pH con buffer Acetato y citratos encontrando mayor actividad de la enzima con citratos y establecen que esta diferencia depende de las especies que se pueden ionizar en función del pH ya que varía la conformación de las proteínas y sus cargas eléctricas, por lo anterior se podría inferir que lo que ocurrió al preparar el sustrato en esta investigación en el buffer fue una ionización diferente para cada caso, favoreciendo la reacción enzimática con el buffer citratos a diferencia de los resultados obtenidos con el buffer fosfato.

por otro lado, es importante resaltar que según los resultados reportados por cada uno de estos estudios la pectinasa extraída de fuentes vegetales es termoestable es decir presenta actividad enzimática en un amplio rango de temperatura que va de 30°C a 75°C, por lo que puede satisfacer la demanda de muchos procesos industriales como la industria del jugo de frutas y aplicaciones biotecnológicas.

Tabla 10. Actividad de pectinasa de diferentes fuentes vegetales y diferentes condiciones de extracción.

Tipo de fruta	Buffer	Tiempo de extracción	Temperatura óptima	pH óptimo	Actividad específica	Referencia
Guanábana (annona muricata)	NaCl 1,92 M	1min	60°C	7,5-8,0	81,7 U/mg	(Arbaisah et al., 1997)
Pulpa de mango	Buffer borato acetato a pH 8.2 conteniendo 0.2 M NaCl	N.R	N.R	7,0	0,35 UPME/mL	(Díaz-Cruz, C. A; Regalado, C; Morales-Sánchez, E; Velazquez, G; Amaya-Llano, 2016)
Bagazo de mango (<i>Mangifera indica</i> var. <i>Keitt</i>)	Buffer a pH 8.2 conteniendo 0.2 M NaCl	N.R	N.R	7,5	0,41 UPME/mL	(Díaz-Cruz, C. A; Regalado, C; Morales-Sánchez, E; Velazquez, G; Amaya-Llano, 2016)
EPICARPIO DE LULO (<i>Solanum</i>	Buffer fosfato 20	60 min	37°C	7.0	N.R	(Rodriguez Nieto,

quitoense Lam)	Mm- pH 7 + NaCl 0,06 M					Jeimy Marcela, & Restrepo Sánchez, 2011)
Níspero	Buffer Tris HCl	2 horas	N.R	8,0	0,42 μmol ácido min^{-1} ,	(Jaume, Luis, Graterol, & Lara, 2014)
Níspero	(Buffer Tris-HCl + N2L	2 horas	N.R	8,0	1,97 μmol ácido min^{-1}	(Jaume et al., 2014)
Cascara de lima (<i>Citrus aurantifolia Swingle</i>)	Agua + NaCl (0,5 \pm 0,3 M)	5 min	N.R	7,0	N.R	(Contreras-Esquivel et al., 1999)
Nopal (<i>Opuntia fcus indica L.</i>)	Agua + NaCl (0,5 \pm 0,3 M)	N.R	30°C	7,0	N.R	(Contreras-Esquivel et al., 1999)
Pitaya Amarilla (<i>Acanthocereus pitajaya</i>)	buffer fosfato 20 mM, NaCl 1M, pH 7,0	24 h	45°C	8,0	N.R	(Carabali Miranda, I. L; Narvaez Cuenca, 2009)
Pitaya roja (<i>Hylocereus polyrhizus</i>) Peel	Buffer Tris-HCl (pH 8,0)	N.R	75°C	8,0	15,31 U/mg	(Amid et al., 2014)
Papaya	NaCl 1,5 M	45 min	N.R	7,8	5,3333	(Cazorla, Amarilis & Martinez, 2012)
Guayaba	NaCl 1,5 M	45min	N.R	7,8	1,3333	(Cazorla, Amarilis & Martinez, 2012)
albaricoque Alyanak (<i>Prunus armeniaca L</i>)	Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) + NaCl 1 M	30 min	40 °C	7,5	N.R	(Ünal & Aysun, 2015)
Papaya (<i>Carica papaya L.</i>)	NaCl 1,5 M	N.R	55°C	7,0	5,83 U/mg	(Foda, Saad, Attia, & Eid, 2016)
Patata (<i>Solanum</i>	Tampón fosfato pH	12 horas	60°C	8,0	5185,2 U/mg de	(Sáenz et al., 1999)

<i>tuberosum L.)</i>	7,0				proteína	
Cascara de naranja	H ₂ O destilada fría.	24h	50°C	4,1	2,18 U	(Aviles Muso, 2016)

*N. R: No reporta.

De acuerdo con los resultados de este trabajo, la pectinasa obtenida de las frutas en buen estado y mal estado provenientes de la familia Anonácea presentan una actividad enzimática en un rango de temperatura de 37-50 °C, lo cual es coherente con los resultados de previos estudios de pectinasas extraídas de diferentes fuentes, como lo observado en la Tabla 10.

De acuerdo con los resultados estadísticos desarrollados a través de un ANOVA simple (ANEXO 5) donde se compararon factores como: tipo de fruta, estado de fruta y el pH con respecto a la actividad enzimática se encontró que hay una diferencia estadísticamente significativa sobre la actividad con una de estas variables (temperatura); de esta manera, es importante resaltar que esta variable es determinante para evaluar la actividad de la enzima pectinasa obtenida a partir de pulpa de chirimoya (*Annona cherimola*) y guanábana (*Annona muricata L*) en buen estado y mal estado. Por otro lado, se determinó que factores como estado de fruta y tipo de fruta no son variables determinantes para establecer diferencias estadísticamente significativas en la obtención de la actividad enzimática de la enzima extraída.

7.6. Aplicación de la enzima

7.6.1. Comportamiento del pH de la pectina en el tiempo (Desesterificación)

Una manera de evidenciar la actividad de la enzima de forma indirecta es observar el proceso de desesterificación que sufre la pectina, al observar cambios de pH en el tiempo. Los resultados obtenidos al caracterizar la desesterificación o comportamiento de pH en un período de tiempo donde se construyó la curva de pH vs tiempo, Figura 19, Figura 20 y Figura 21 evidencian que la enzima extraída es pectinestereasa, pues la disminución en el pH se debe a la reacción donde se libera metanol y se forman grupos ácidos carboxílicos en la estructura de la pectina, como lo muestra la reacción de la Figura 18, (Danalache, Mata, Alves, & Moldão-martins, 2018) (Cazorla, Amarilis & Martinez, 2012) (Martinez, K.; Cazorla, A.; Escobar, J.; Alvarado, 2017). Es evidente de la Figura 19, Figura 20 y Figura 21 que la enzima extraída de la guanábana (*annonna muricata L*) en buen y mal estado, y a cualquier pH de extracción (5,3 o 7,1), tiende a tener una reacción más rápida para hidrolizar los grupos éster de la pectina en comparación con la enzima extraída de chirimoya (*annonna cherimola*) en buen y mal estado en el mismo lapso de tiempo, pero aun así a medida que avanza el tiempo el pH es más ácido, es decir, se observaron valores de pH menores.

Estos resultados están de acuerdo con la actividad encontrada en el efecto de la temperatura, donde la enzima extraída de guanábana presentó una mayor actividad, lo cual explica el comportamiento de mayor hidrólisis ácida en el tiempo.

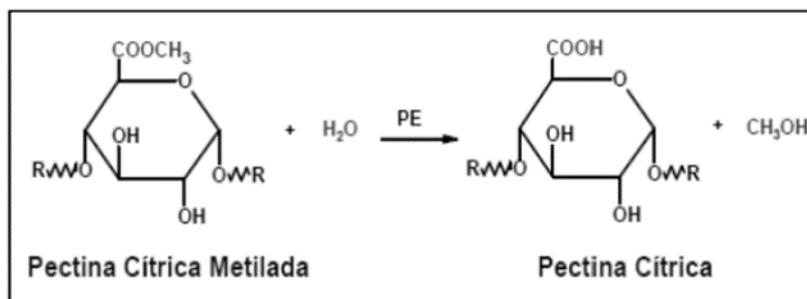


Figura 18. degradación de la pectina por acción de la pectinestereasa mediante hidrolisis. (Martinez, K.; Cazorla, A.; Escobar, J.; Alvarado, 2017)

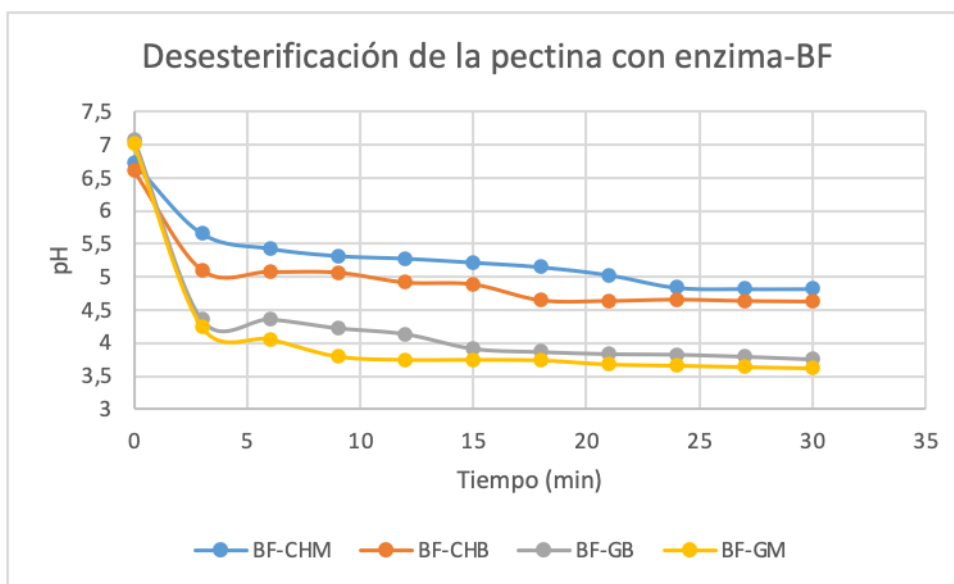


Figura 19. Efecto de la desesterificación de la pectina, por acción de la enzima extraída a pH 7,1 BF con GB, GM, CHB y CHM, en el tiempo.

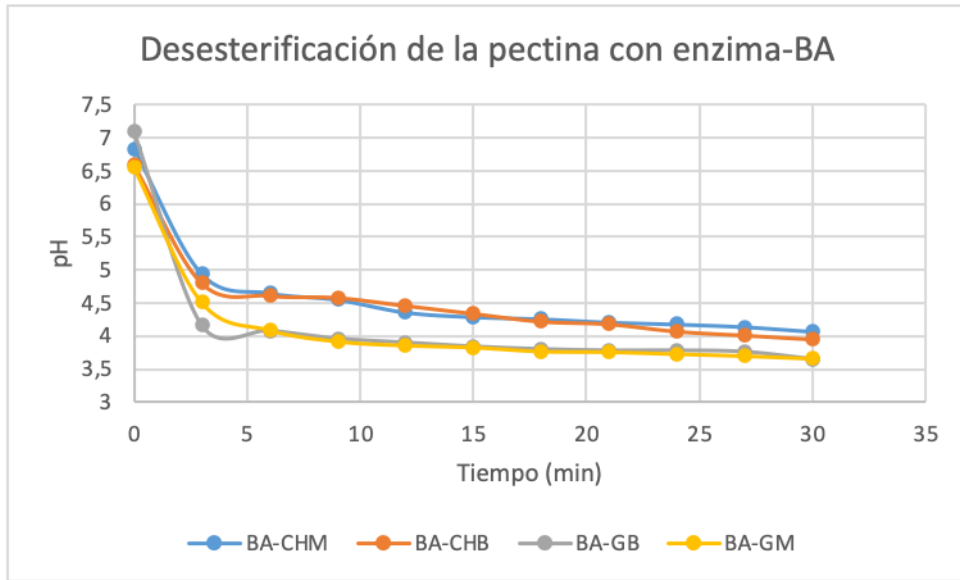


Figura 20. Efecto de la desesterificación de la pectina, por acción de la enzima extraída a pH 5,3 BA con GB, GM, CHB y CHM, en el tiempo.

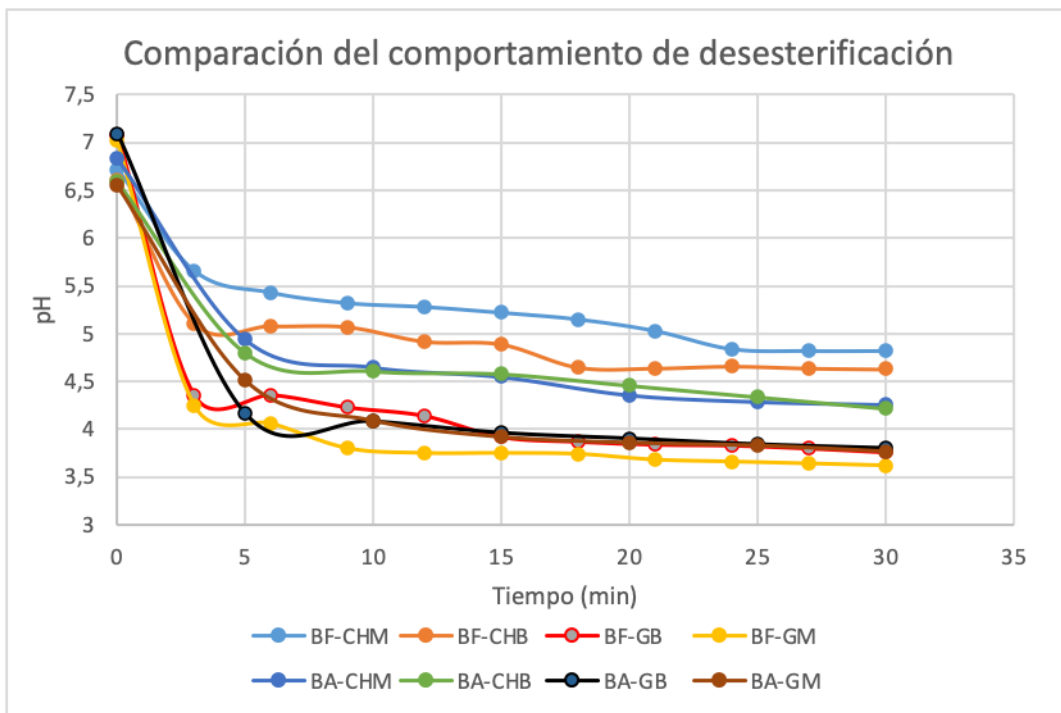


Figura 21: Comparación del efecto de la desesterificación en la pectina, por acción de las enzimas extraídas a pH diferente con GB, GM, CHB y CHM, en el tiempo.

7.6.2. Extracción de jugo de mora

Según los resultados obtenidos se puede indicar que hay un efecto de la enzima en la clarificación de jugo, Tabla 11 e Imagen 19. El jugo de mora tratado con la enzima pectinasa demostró un valor más bajo de absorbancia (0,10 – 0,15) en relación al que estaba sin tratamiento enzimático (0,15±0,03); además, de manera cualitativa podemos observar en la Imagen 19 e Imagen 20 que la muestra con agua presenta mayor turbidez que la muestra tratada con la enzima extraída con GB-BF y pectinasa comercial, respectivamente; lo cual indica que la enzima si ejerce su acción de clarificación, este proceso se da debido por la presencia de coloides como la pectina, celulosa, hemicelulosa, almidón, proteína, lignina, etc., (F Danalache; P, 2018) y la enzima a su temperatura óptima logra una reactividad enzimática que ayuda a la eliminación del material que genera turbidez, debido a que las enzimas pecticas solubilizan parte de la pectina presente en los sólidos suspendidos, ya que al desesterificar la pectina se hace más soluble en el medio y disminuye su absorción a 630 nm, un indicativo de la acción de la enzima obtenida (Sandri et al., 2011)(Cazorla, Amarilis & Martinez, 2012)

Tabla 11. Resultados clarificación del jugo de mora

Muestra	pH inicial*	pH final**	Absorbancia U/mL
BF-GB	4,2	3,5	0,10±0,02
BF-GM	3,8	3,7	0,13±0,02
BF-CHB	3,9	3,7	0,14±0,01
BF-CHM	3,8	3,5	0,15±0,03
BA-CHB	4,3	3,8	0,11±0,00
Blanco	2,8	2,8	0,15±0,03
Pectinasa comercial	4,0	2,7	0,08

*Medida realizada después de adicionar la enzima. **Medida realizada después de medir la absorbancia.



Imagen 19. Clarificación de jugo de mora con la enzima pectinasa extraída por Sephadex. Fuente Autoría propia

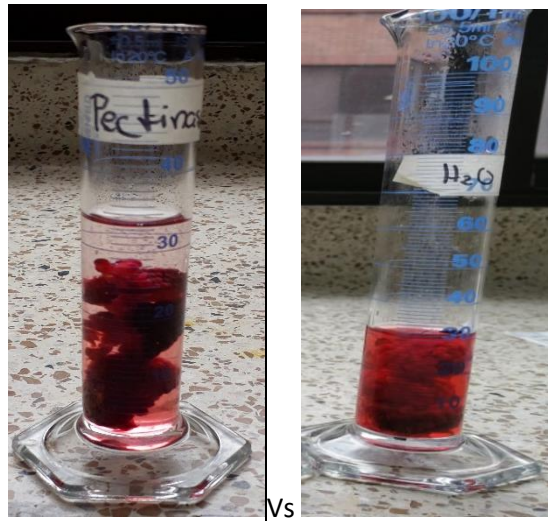


Imagen 20. Jugo de mora con la enzima pectinasa Vs jugo de mora sin adición de enzima pectinasa. Fuente autoría propia.

Por su parte, se observa de la Tabla 11, que se dan cambios de pH entre el pH inicial y el pH final los cuales tiende a disminuir esta variación de pH entre el inicial y el final de cada muestra se debe al grado de acidez; según el estudio de Meijide, R.; Rubín, G.; Alvarado, (2016) como el mecanismo de acción de la pectinesterasa sobre la molécula de la pectina o sustancias pecticas se da al reaccionar hidrolíticamente sobre los grupos éster de la molécula de la pectina, produce metanol e iones hidronio (H_3O^+), protones causantes de la disminución del pH, por otro lado la conversión de pectina a pectato por los grupos carboxilato, provoca la disminución del pH en los jugos (García Calvo, 2015). Otra de las razones es el valor del pH del jugo de la fruta, pues la mora es una fruta ácida, y esto se evidencia con el blanco, el cual presenta un valor mayor de acidez (Danalache et al., 2018) (Joshi et al., 2011). Por otro lado La clarificación se ve afectada por factores como el pH, la temperatura, el tiempo y la concentración de enzimas (Handa, 2016), (Sharma et al., 2014).

Otra explicación a la variación de pH es la encontrada por Sharma et al., (2014) en su investigación acerca de extracción enzimática y clarificación de jugos de frutas en donde explica que uno de los efectos de la concentración del tratamiento enzimático es la disminución del ácido ascórbico que podría deberse a la oxidación de este, durante la clarificación enzimática del jugo, además, afirman que mientras se lleva a cabo el proceso de clarificación la cantidad de pectina en el jugo disminuye y por lo tanto se ve reducida la turbidez en los jugos. En el estudio de Maryani & Meryandini, (2017) afirman que cuando trataron jugo de manzana para el proceso de clarificación con la enzima pectinasa este se volvió más ácido lo que indica que la enzima es capaz de hidrolizar el polímero de pectina

en solución en su forma monomérica llamada ácido galacturónico, además también explican que la disminución del pH se debe a la cantidad creciente de contenido de ácido galacturónico resultado de la hidrólisis de pectina por la pectinasa. Resultados que están de acuerdo a los encontrados en el presente estudio ya que al tratar el jugo de mora con la enzima pectinasa este se volvió más ácido como se refleja en el cambio en el valor del pH después de agregar la encima con respecto al que se tomó después de pasado 1 hora.

Por otro lado, se ha establecido en la literatura que el proceso de clarificación enzimática también podría estar relacionado con otras características del jugo como el nivel de pectina, polifenol y proteína, además que otros factores como la composición química del jugo y la presencia de otras enzimas además de las pectinasas durante el tratamiento de clarificación enzimática podrían interferir significativamente en este proceso (Nadiah, Karim, & Rahman, 2015). Sin embargo, en este estudio no se observó cambios en el nivel del jugo, posiblemente por el tipo de enzima obtenida, es decir, la enzima obtenida fue la pectinesterasa, y la enzima que permite mejorar el rendimiento de extracción es la depolimerasa (poligalacturonasa). Cabe resaltar, que la acción de la enzima no fue evaluada con todas las muestras purificadas con Sephadex debido a razones expuestas anteriormente.

8. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en la etapa de purificación por precipitación con acetona fría se obtuvo una diferencia significativa en el contenido de proteína entre frutas, siendo las muestras de chirimoya (*annona cherimola*) en buen estado y mal estado las muestras con mayor contenido de la enzima pectinasa siendo los valores representativos BA-CHB $333,2 \pm 13,4$ mg , para BF- CHM $325,9 \pm 25,6$ mg, BF-CHB $274,4 \pm 35,2$ mg y BA-CHM $314,8 \pm 8,8$. Por otro lado, también se pudo establecer este mismo comportamiento después de la purificación por Sephadex donde se obtuvo para BF-CHB 12,5 mg de la enzima y para BF-CHM 6,8 mg, por lo tanto se puede concluir que se extrajo un mayor contenido de la enzima pectinasa de chirimoya (*Annona cherimola.*) en comparación con lo obtenido de guanábana (*Annona muricata L.*).

La pectinasa (PE) extraída de chirimoya (*Annona cherimola.*) y guanábana (*Annona muricata L.*) en dos estados de madurez buena y mala presentó su máxima actividad enzimática a temperatura optima de 40°C, al aumentar se observó una rápida inactivación, además, se puede concluir que la pectinasa extraída de guanábana fue la que presentó mayor actividad enzimática, para guanábana (*annona muricata L*) en mal estado (GM) fue de $2,17 \pm 0,14$ UI/mL, seguida de la muestra de guanábana (*annona muricata L*) en buen estado (GB) $1,92 \pm 0,29$ UI/mL , para las muestras de chirimoya (*annona cherimola*) en buen (CHB) y mal estado (CHM) su actividad más alta fue de $0,92 \pm 0,14$ UI/mL. Lo anterior evidencia que un mayor contenido de proteína no garantiza una mayor actividad, dado que posiblemente la proteína de chirimoya puede haber presentado un proceso de desnaturalización que disminuyó su actividad durante el proceso calentamiento cuando se determinó la actividad enzimática por temperatura, pues para disolverla este proceso fue largo (40 minutos).

La enzima pectinasa, presentó un pH óptimo de 4,0, en el cual su actividad enzimática es estable, si se somete a pH por encima o por debajo de este valor, la enzima sufre una desnaturalización la cual se da con la pérdida de la actividad enzimática. Las muestras con mayor actividad fueron ($27,33 \pm 0,29$ UI/mL), y guanábana (*annona cherimola L.*) en mal estado extraída en buffer fosfato ($27,00 \pm 0,87$ UI/mL), lo que evidencia que la enzima extraída tiene una tendencia ácida a diferencia con lo reportado en la literatura para pectinasas extraídas de fuentes vegetales, lo que se pudo deber a que la enzima tubo un proceso de ionización en función del pH ya que esto hace que varíe la conformación de las proteínas y sus cargas eléctricas.

Se observó una mejor apariencia y disminución de turbidez en el jugo de mora que contenía el concentrado enzimático. Además, el pH del jugo disminuyó durante el proceso de la catálisis del sustrato péctico. Por lo tanto, se puede concluir que la pectinasa extraída A pH 7 de guanábana (*annona muricata L*) en mal estado (GM) y en buen estado, y de chirimoya (*annona cherimola*) en buen (CHB) y mal estado (CHM) puede ser utilizada

en la extracción de un jugo clarificado de fruta. Y que la enzima extraída y purificada es la pectinestereasa, dado que mostró su acción al disminuir el pH de la solución de pectina.

9. PERSPECTIVAS

Para el proceso de obtención de la enzima pectinasa de guanábana (*annona muricata*), es adecuado apoyar de manera mecánica para romper la estructura de la pared vegetal.

Al iniciar el proceso de extracción de la enzima se debe tener en cuenta el pH inicial de la fruta chirimoya (*annona cherimola*) y guanábana (*annona muricata L*) para determinar el grado de madurez.

Al medio de extracción (buffer) adicionar NaCl para mejorar la solubilidad de la enzima, y así obtener mayor rendimiento de proteína ya que las enzimas utilizan la fuerza iónica de la sal para facilitar la extracción.

Al iniciar el proceso de extracción tener en cuenta el pH inicial de la relación Buffer-fruta para evitar una variabilidad significativa que pueda afectar la enzima (desnaturalización).

Implementar más tiempo en la interacción de las muestras de pulpa de chirimoya (*annona cherimola*) y guanábana (*annona muricata*), con el medio de extracción.

Realizar la purificación del concentrado enzimático en el menor tiempo posible después de la extracción, es decir, no almacenar por largos períodos el extracto.

Purificar todas las muestras por la técnica de Sephadex y por triplicado, para lograr resultados que permitan una comparación más clara.

Medir actividad enzimática para determinar si hay presencia de otro tipo de pectinesterasa a parte de la PE en las frutas guanábana (*annona muricata*) y chirimoya (*annona cherimola*) (poligalacturonasas o pectato liasas), a través del desarrollo de medidas de viscosidad.

Medir la acción de la enzima en otras frutas para analizar la variabilidad de la acción frente al tipo de fruta.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A Ramdas Shet; S. Vijaykumar Desai, S. A. (2018). Pectinolytic enzymes: Classification, production, 4(337), 337–348. <https://doi.org/10.26479/2018.0403.30>
- Abdul Karim, N; Abdul Rahman, R; Shamsuddin, R; Mohd Adzahan, N. (2015). Effects of pectinase clarification treatment on phenolic compounds of pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) fruit juice. *J Food Sci Technol*, 52(August), 5057–5065. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1554-9>
- Agudelo Betancourt, M. D., & Alfonso Herrera, J. B. (2019). Evaluación de la obtención de bromelina por los métodos de extracción: bifases acuosas y salting out contenida en los corazones de las tres variedades de piña procesadas en la empresa Betters International S.A.S. Fundación Universidad de América.
- Ahlawat, S., Battan, B., Sudha, S., & Jitender, D. (2014). Production of thermostable pectinase and xylanase for their potential application in bleaching of kraft pulp. *J Ind Microbiol Biotechnol*, (January). <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0251-3>
- Ahmed, I; Zia, M. A; Hussain, M. A; Akram, Z; Naveed, M. T. & Nowrouzi, A. (2016). Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(2), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.11.003>
- Alimardani Theuil, P., Gainvors Claisse, A., & Duchiron, F. (2011). Yeasts: An attractive source of pectinases — From gene expression to potential applications: A review. *Process Biochemistry*, 46(8), 1525–1537. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.010>
- Amid, M., Manap, Y., & Zohdi, K. (2014). Purification and characterisation of thermo-alkaline pectinase enzyme from *Hylocereus polyrhizus*. *European Food Research and Technology*, 239(1), 21–29. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2188-x>
- Aponte, L; Guadarrama, A. (2015). Actividad de las enzimas pectinmetilesterasa, poligalacturonasa y celulasa durante la maduración de frutos de parchita maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). *Rev. Fac. Agron*, 29(December), 146–160.
- Arbaisah, S. M., Asbi, B. A., Junainah, A. H., & Jamilah, B. (1997). Purification and properties of pectinesterase from soursop (*Anona muricata*) pulp. *Food Chemistry*, 59(1), 33–40. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00043-X)
- Arellano Barragán, J., Zerpa Ilich, S., Salazar Castillo, M., Rodríguez Haro, I., Alarcón Gutiérrez, W., & Gasco Álvarez, F. (2014). Efecto de la temperatura y pH sobre la

actividad y estabilidad de pectinasas producidas por *Bacillus*. Revista Científica de La Facultad de Ciencias Biológicas., 34(1), 33–41.

Arribasplata Carrasco, R. (2013). Efecto de la aplicación foliar de calcio, en pre cosecha, en la calidad de fruta del cultivo C: e chirimoya (*Annona cherimola* Mili.). Universidad Nacional de Cajamarca. Facultad de ciencias agrarias.

Ávila de Hernández, R. (2014). Comparación de la acción enzimática de tres preparados comerciales en el tratamiento de la pulpa de Guanábana. ASA/EX. 2014-6.

Aviles Muso, N. T. R. N. (2016). “Obtención de dos tipos de enzima pectinasa (cáscara de naranja) celulasa (cáscara de plátano) y su evaluación en pulpa de manzana (*Malus domestica*) y pera (*Pyrus communis*).

Badrie, N, & Schauss, A. G. (2010). Soursop (*Annona muricata* L.): Composition, nutritional value, medicinal uses, and toxicology. *Bioactive Foods in Promoting Health* (First Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374628-3.00039-6>

Badui Dergal, S. (2006). Química de los alimentos. (E. Q. Duarte, Ed.), Ed. Pearson educación (cuarta edi). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Barragán, J. C; Zerpa, S. A; Castillo, M. L; Haro, M. R, Alarcón, W. N, & Gasco, F. O. (2014). Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de pectinasas producidas por *Bacillus*. Revista Científica de La Facultad de Ciencias Biológicas., 34(1), 33–41.

Bhardwaj, V., Degrassi, G., & Bhardwaj, R. K. (2017). Microbial Pectinases and their applications in industries: A review. *International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)*, 4(8), 829–836. Retrieved from <https://www.irjet.net/archives/V4/i8/IRJET-V4I8144.pdf>

Biz A, Farias F.C, Motter F.A, de Paula D.H, Richard P, et al. (2014) Pectinase Activity Determination: An Early Deceleration in the Release of Reducing Sugars Throws a Spanner in the Works. *PLoS ONE* 9(10): e109529. doi: 10.1371/journal.pone.0109529

Carbajal, A. (2016). Purificación de proteínas. *Materials and Methods es.* /method/Protein-Purification.html

Carrasco, R. A. (2013). Efecto de la aplicación foliar de calcio, en pre cosecha, en la calidad de fruta del cultivo C: e chirimoya (*Annona cherimola* Mili.). Universidad Nacional de Cajamarca. Facultad de ciencias agrarias.

Cazorla, Amarilis & Martínez, K. (2012). Preparación de un jugo clarificado de frutas utilizando un concentrado enzimático de guayaba y papaya. Universidad de Carabobo.

- Cevallos, G; Chafra, A. (2015). Caracterización de pectinasas antárticas y su aplicación en la clarificación de jugo de manzana. *Espol*, 1, 1. Retrieved from <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/88508/D-88056.pdf>
- Chaudhri, A., & Suneetha, V. (2019). Microbially Derived Pectinases: A Review. *Pharmacy and Biological Sciences (IOSRJPBS)*, (September).
- Chellegatti Cunha, M, A., Vieira Fonseca, M, & Said, S. (2012). Purification and partial characterization of exopolygalacturonase I from *Penicillium frequentans*. *Microbiological Research*, 157, 19–24. Retrieved from file:///D:/TESIS 2019/rer1-s2.0-S0944501304700567-main.pdf%0D
- Chihuaua, A. (2018, febrero 20). Preparación reactiva de biuret. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=xPqrhgTyaUA>
- Coria Téllez, A, Montalvo González, E., Yahia, E, & Obledo Vázquez, E. (2016). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, (March). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>
- Cucaita Vásquez N A. (2010). Separación y caracterización bioquímica de la enzima 1,3-propanodiol oxidoreductasa proveniente de una cepa nativa de *Clostridium spp* IBUN 158. Universidad nacional de Colombia.
- Danalache, F; Mata, P; Alves, V & Moldao Martins, M. (2018). Enzyme-Assisted extraction of fruit juices. Chapter 10, 183–199. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00010-2>
- Dasaesamoh, R., Youravong, W. and Wichienchot, S. (2016). Optimization on pectinase extraction and purification by yeast fermentation of oligosaccharides from dragon fruit (*Hyloceus undatus*). *International Food Research Journal* 23(6)
- David, M, & Betancourt, A. (2019). Evaluación de la obtención de bromelina por los métodos de extracción: bifases acuosas y salting out contenida en los corazones de las tres variedades de piña procesadas en la empresa Betters International S.A.S.
- Dehkordi M and Javan F A. 2013. Application of pectinase in biotechnology. *Journal of Biology and Today's World* 1(1): 39-50.
- Dhembare, A. J., Kakad, S, & Rana, R. (2015). Effect of pH, temperature and kinetics of pectinase enzyme using *Aspergillus Niger* by solid-state fermentation. *Der Pharmacia Sinica*, 6(8), 1–5. Retrieved from <http://www.imedpub.com/articles/effect-of-ph-temperature-and-kinetics-of-pectinase-enzyme-using-aspergillus-niger-by-solidstate-of-fermentation.pdf>

- Díaz Cruz, C. A; Regalado, C; Morales Sánchez, E; Velázquez, G; Amaya Llano, S. (2016). Determinación de actividad de pectin metilesterasa parcialmente purificada de bagazo y pulpa de mango. (*Mangifera indica* L.), 1(1), 6–10.
- Díaz, N, A., Ruiz Bárcena, J. A., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A., Jorrín Novo, J., Peinado, J, Túnez Fiñana, I. (2011). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, 1–8.
- Esquivel JCC, Voget CE. 2014. Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *Journal of Biotechnology* 110: 21-28.
- F Danalache; P, M. V. D. A. & M. M. (2018). Enzyme-assisted extraction of fruit juices. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00010-2>
- Farfán Rodríguez, L. (2018). “Efecto del pelado semiautomatizado sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de pulpa de chirimoya (*annona cherimola* m.)” Universidad Nacional agraria la molina facultad de industrias alimentarias. Retrieved from file:///D:/TESIS 2019/ guía chirimoya farfan-rodriguez-lucero.pdf%0D
- Fayyaz, A., Asbi, B. A., Ghazali, H. M., Man, Y. B. C., & Jinap, S. (1994). Purification and molecular properties of papaya pectinesterase. *Food Chemistry*, 49, 373–378.
- Florina Danalache, Paulina Mata, Vítor D. Alves and Margarida Moldao-Martins. (2018). Chapter 10-Enzyme-assisted extraction of fruit juices. 183-200.
- Franchi, M. L. (2016). Aplicación de pectinasas a procesos industriales que involucran la producción frutihortícola: PPasa-SE de *Geotrichum klebahnii*, PGI de *Aspergillus kawachii* y PGzyme de *Asperillus sojae*.
- García Calvo, M. A. (2015). Evaluación de la actividad pectinesterasa y los cambios de las propiedades sensoriales en el jugo de manzana de la variedad granny smith. Universidad autónoma agraria Antonio Narro.
- García, G., & Chafla, A. (2015). “Caracterización de pectinasas antárticas y su uso en la clarificación de jugo de manzana.” Escuela superior politécnica del litoral Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Retrieved from file:///D:/TESIS 2019/414275916-Pectinasa (1).pdf%0D
- Garg, G, Singh, A, Kaur, A, Singh, R, Kaur, J, & Mahajan, R. (2016). Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0371-4>

- Guadarrama, A. (2015). Actividad de las enzimas pectinmetilesterasa, poligalacturonasa y celulasa durante la maduración de frutos de parchita maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener), (December).
- Guan, L. (2010). Cultivo de la guanábana. *Noticias Sephu*, 1–15.
- Handa, S. (2016). Production and purification of pectinase and its application in preparation of probiotic fortified functional fruit juices. Microbiology department of basic sciences.
- Irshad, M, Anwar, Z., Mehmood, Z, Aqil, T; Aqil, T; Mehmmod, S; & Nawaz, H. (2014). Research Article [Araştırma Makalesi] Bio-processing of agro-industrial waste orange peel for induced production of pectinase by *Trichoderma viridi*; its purification and characterization, (October 2015). <https://doi.org/10.5505/tjb.2014.55707>
- Janampa Huaytalla, C. (2017). Determinación de metabolitos primarios, actividades enzimáticas y características fisicoquímicas de la lúcuma (*Pouteria lúcuma*) en dos estados fisiológicos. Universidad Nacional Agraria la Molina. Retrieved from [file:///C:/Users/wind/Downloads/Determinación de metabolitos primarios.pdf%0D](file:///C:/Users/wind/Downloads/Determinación%20de%20metabolitos%20primarios.pdf)
- Jiménez Zurita, J. O., Balois Morales, R., Alia Tejacal, I., Juárez López, P., & Jiménez Ruíz, E. I. (2017). Tópicos del manejo poscosecha del fruto de guanábana (*Annona muricata* L). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(September). <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i5.115>
- Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., Juárez-López, P., Jiménez-Ruíz, E., & Sumaya-Martínez, M. T. (2017). Tópicos del manejo poscosecha del fruto de guanábana (*Annona muricata* L.), 14.
- Joshi, V. K., Parmar, M., & Rana, N. (2011). Purification and characterization of pectinase produced from apple pomace and evaluation of its efficacy in fruit juice extraction and clarification. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2(2), 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1866>
- KC, S, Upadhyaya, J, Joshi, D. R., Lekhak, B, Chaudhary, D. K, Pant, B. R., Raghavan, V. (2020). Production, Characterization, and Industrial Application of Pectinase Enzyme Isolated from Fungal Strains. *Fermentation*.
- Khan, M., Nakkeeran, E., & Umesh-kumar, S. (2013). Potential Application of Pectinase in Developing Functional Foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182525>
- Khatri, B. P, Bhattarai, T, Shrestha, S, & Maharjan, J. (2015). Alkaline thermostable pectinase enzyme from *Aspergillus Niger* strain MCAS2 isolated from Manaslu

- Conservation Area, Gorkha, Nepal. SpringerPlus. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1286-y>
- Kohli, P., & Gupta, R. (2015). Alkaline pectinases: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.07.001>
- Kothari, M. N., & Baig, M. M. V. (2013). Production and characterization of extracellular polygalacturonase by *Erwinia Carotovora* MTCC 1428. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 4(1), 118–122. Retrieved from file:///D:/TESIS 2019/production_and_characterization_of_extra.pdf
- Kothari, M. N., Kulkarni, J. A., Maid, P. M., & Baig, M. M. V. (2013). Clarification of apple juice by using enzymes and their mixture. *J Food Sci Techno*, (December).
- Kumar, A., & Sharma, R. (2012). Production of alkaline pectinase by bacteria (Cocci sps.) isolated from decomposing fruit materials, 4(1), 1–5.
- Kumar, P., & Suneetha, V. (2014). A Cocktail Enzyme – Pectinase from Fruit Industrial Dump Sites: A Review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(1252), 1252–1258.
- Lo, H. L.; Perea, C. O. (2013). Pectin Esterase Activity in Soursop (*Anona muricata*) Juice. *Food Science and Technology Program, Department of Chemistry*, 1–4.
- Maca, M. P., & Osorio, O. (2013). Inactivación Térmica de Pectinmetilesterasa en Tomate de Árbol (*Solanum betaceum*) Thermal Inactivation of Pectinmethylesterase in Tree Tomato (*Solanum betaceum*), m, 41–50. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000300006>
- Macdonald, H. M., Evans, R., & Spencer, W. J. (1993). Purification and properties of the major pectinesterases in lemon fruits (*Citrus lemon*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62(2), 163–168. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740620209>
- Makky, E. A. (2015). Bioeconomy: Pectinases Purification and Application of Fermented Waste from *Thermomyces Lanuginosus*. *Journal of Medical and Bioengineering*, 4(1), 76–80. <https://doi.org/10.12720/jomb.4.1.76-80>
- Martinez, K.; Cazorla, A.; Escobar, J.; Alvarado, C. (2017). Preparación de un jugo clarificado de frutas utilizando un concentrado enzimático de guayaba y papaya. *Centro de Investigaciones Químicas. Laboratorio de Biotecnología Industrial (LABIOT)*, 12(1).
- Maryani, C. A; Fahrurrozi; Meryandini, A. (2017). Pectinase production and Clarification treatments of apple (*Malus domestica*) juice. *Annales Bogorienses*, 21(2001), 63–68.
- Mayolo Deloisa, K. & Martínez, L.M., & Rito Palomares, M. (2012). Técnicas cromatograficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad

- y replegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(3),415-429, 11.
- Mayolo Deloisa, K., & Martínez, L.M., & Rito-Palomares, M. (2012). Técnicas cromatografías y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(3),415-429, 11.
- Meijide, R.; Rubín, G.; Alvarado, C. (2016). Obtención de un concentrado de pectinasas utilizando fuentes vegetales de procedencia nacional. *Centro de Investigaciones Químicas*, 11(1), 46–54. Retrieved from file:///D:/TESIS 2019/art04 2016 papaya y guayaba.pdf%0D
- Montañez Sáenz, J., Téllez, A., de la Garza, H., de la Luz Reyes, M., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2000). Purification and some properties of pectinesterase from potato (*Solanum tuberosum* L.) alpha cultivar. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 43(4), 0–0. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132000000400007>
- Moral, S., Ramírez Coutiño, L. P., & García Gómez, M. J. (2015). Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(3), 87–102. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2088.7200>
- Nadiah, N., Karim, A., & Rahman, R. A. (2015). Effects of pectinase clarification treatment on phenolic compounds of pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) fruit juice, 52(August), 5057–5065. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1554-9>
- Neela B., and Alexander G. S. (2010). Chapter 39-Soursop (*Annona muricata* L.): Composition, Nutritional Value, Medicinal Uses, and Toxicology.
- Nor, K. Z. and Mehrnoush A. (2013) Optimization of Extraction of Novel Pectinase Enzyme Discovered in Red Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Peel. *Molecules*, 18, 14366-14380
- Ochoa, S. H. (2010). Precipitación Planta Piloto de Fermentaciones Precipitación. *Planta Piloto de Fermentación*, Departamento de Biotecnología.
- On, Y. S. U. A., & Whitaker, S. (2012). Técnicas cromatografías y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas, 11(3), 415–429.
- Orozco, A. (2012). *Enzimas*. 1, 1(1), 99. Retrieved from [https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/14292/4-](https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/14292/4-Capitulo%20I.%20Las%20enzimas.pdf) Capítulo I. Las enzimas. pdf sequence=4
- Oumer, O. J., & Abate, D. (2017). Characterization of Pectinase from *Bacillus subtilis* Strain Btk 27 and Its Potential Application in Removal of Mucilage from Coffee Beans. *Hindawi*, 2017. Retrieved from <https://doi.org/10.1155/2017/7686904>

- Özler, A., Karakuş, E., & Pekyardimci, Ş. (2008). Purification and biochemical characteristics of pectinesterase from malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 38(4), 358–375. <https://doi.org/10.1080/10826060802325469>
- Paola, J., Castro, R., Eduardo, C., Cuenca, N., & Sc, M. (2006). Estudio de la actividad enzimática de poligalacturonasa en la corteza de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*).
- Patil, N. P., & Chaudhari, B. L. (2010). Production and purification of pectinase by soil isolate penicillium Sp and Search for better agro-residue for its SSF. *Recent Research in Science and Technology*, 2(7), 36–42.
- Patil, N. P., & Chaudhari, B. L. (2010). Production and purification of pectinase by soil Isolate penicillium s p and s earch for b etter a gro -r esidue for its ssf. *Recent Research in Science and Technology*, 2(7), 36–42.
- Peña, C., & Quirasco, M. (2014). ¿Enzimas en los alimentos? *Bioquímica de lo comestible. Revista Digital Universitaria*, 15, 2–13. Retrieved from <http://www.revista.unam.mx>
- Pressey, R., & Woods, F. M. (1992). Purification and properties of two pectinesterases from tomatoes. *Phytochemistry*, 31(4), 1139–1142. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80248-D](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80248-D)
- Proteínas, B. D. E. (2017). Purificación de proteínas. Métodos – Principios - Equipamiento. Retrieved from file:///D:/TESIS 2019/1490964566.pdf purificación 2017.pdf%0D
- Quesada, M. C. (2013). Determinación de condiciones óptimas del tratamiento enzimático acoplado a un proceso de micro filtración tangencial a ser aplicado en una empresa procesadora de fruta y vegetales para la obtención de jugo clarificado de piña (*Ananas comosus*). Universidad de Costa Rica, facultad de ciencias agroalimentarias.
- Quinde Fuentes, C., & Sánchez, N. (2013). Extracción, purificación parcial y secado de la enzima Bromelina obtenida a partir del corazón de la piña (*Ananas comosus*). Escuela superior politécnica del litoral.
- Rajdeo, K., & w. Fadnavis, N. (2016). Immobilization of pectinase on reusable polymersupport for clarification of apple juice. *Food and bioproducts processing*, 99, 12–19.
- Ramdas Shet, A; Vijaykumar Desai, S; Achappa, S. (2018). Pectinolytic enzymes: cassification, production, purification and applications. *Research Journal of Life Science, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 4(337), 337–348. <https://doi.org/10.26479/2018.0403.30>

- Rillo, L., Castaldo, D., Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, C., & Quagliuolo, L. (1992). Purification and Properties of Pectin Methylesterase From Mandarin Orange Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(4), 591–593. <https://doi.org/10.1021/jf00016a012>
- Rodríguez Castro, J. P., Narvaez Cuenca, C. E., & P, R. S. L. (2006). Estudio de la actividad enzimática de la poligalacturonasa en la corteza de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.
- Rodríguez Nieto, J. M, & Restrepo Sánchez, L. P. (2011). Extracción de enzimas pecticas del epicarpio de lulo (*Solanum quitoense* Lam) involucradas en el proceso de ablandamiento. *Acta Biológica Colombiana*, 16, 193–204. ISSN: 0120-548X. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=3190/319028008015>
- Rojas Muñoz, V. R. (2009). Evaluación de métodos de extracción y purificación de enzimas pectinolíticas obtenidas por fermentación en estado semisólido del *Aspergillus niger*. Universidad Eafit. Escuela de Ingenierías. Retrieved from file:///D:/TESIS 2019/47237251.pdf purificacion enzimas.pdf%0D
- Sandri, I. G., Fontana, R.-, Barfknecht, D. ., & Moura, M.-. (2011). Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2217–2222. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.02.008>
- Sattar Qureshi, A., Aqeel Bhutto, M., Chisti, Y., Khushk, I., Dahot, M. U., & Bano, S. (2012). Production of pectinase by *Bacillus subtilis* EFRL 01 in a date syrup medium. *Afr. J. Biotechnol*, 11(62), 12563–12570. <https://doi.org/10.5897/AJB11.4236>
- Skoog, D. A., Holler, J. H., Nieman, T. A. “Principios de Análisis Instrumental”, 5a Edición. McGraw Hill. Madrid, España. 2001.
- Sharma, H. P., Patel, H., & Sharma, S. (2014). Enzymatic extraction and clarification of juice from various fruits-A review. *Trends in Post Harvest Technology*, 2(1), 1–14. Retrieved from file:///D:/TESIS 2019/Enzymatic extraction and clarification of juice from various fruits-A review.pdf%0D
- Silvarrey, C [sección bioquímica (FCien)] (2017, marzo 12) en el ciclo practico/1/ cromatografía de intercambio iónico [archivo video]. Recuperado de <https://vimeo.com/208062413>
- Sucapuca, M. (2013). “Evaluación de la vida en anaquel de la chirimoya (*annona cherimola* mill) mínimamente procesada con el uso de antioxidantes envasada al vacío y almacenada a temperatura baja. Universidad Nacional del Altiplano. Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial. Retrieved from file:///D:/TESIS 2019/chirimoya Sucapuca_Cayo_Mirian_Bianca.pdf%0D

- Valiño Llamazares, V; Valiente Barroso, R., & San Roman, M; Ibañez Mendizabal, R & Ortiz Uribe, I. (2014). Método espectroscópico para la determinación de proteínas en medios complejos. Oficina Española de Patentes y Marcas.
- Vita, C. E. (2013). Enzimas pécticas de *Aspergillus kawachii*: aislamiento, purificación y caracterización de pectinesterasa. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Retrieved from file:///D:/TESIS 2019/Documento completo (1).pdf
- Walker, J. M. (1948). The protein protocols handbook. (W. John M, Ed.) (Second Edi).
- Yanira, G, & Jabel, F. (2014). Caracterización fisicoquímica y contenido de proteínas de extractos fluidos del ostión de mangle (*Crassostrea rizophorae*). Revista Cubana de Química, 26, 66–74. Retrieved from file:///D:/TESIS 2019/443543737009.pdf biuret 2014.pdf%0D
- Zienkiewicz, A, Rejón, J. D, Alché, J. D. D, Rodríguez García, M. I., & Castro, A. J. (2013). A Protocol for Protein Extraction from Lipid-Rich Plant Tissues Suitable for Electrophoresis, (May 2014). <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-631-3>
- Zohdi, N. K., & Amid, M. (2013). Optimization of extraction of novel pectinase enzyme discovered in red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel. *Molecules*, 18(11), 14366–14380. <https://doi.org/10.3390/molecules181114366>

11. ANEXOS

ANEXO 1 – Análisis estadístico

Etapa 1: extracción de pectinesterasa de guanábana y chirimoya en buen y mal estado

1.1. ANOVA Simple - contenido de proteína por estados de fruta

Tabla 10.1.1: ANOVA para contenido de proteína por estados de fruta (GB-GM-CHB-CHM)

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	20665	1	2066,4	11,68	0,0142
Intra grupos	10617,8	6	1769,63		
Total (Corr.)	31283,2	7			

La razón-F, que en este caso es igual a 11,6778, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de contenido proteína entre un nivel de Estado de fruta y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

El sesgo estandarizado y/o la curtosis estandarizada se encuentra fuera del rango de -2 a +2 para los 1 niveles de Estado de fruta. Esto indica algo de no normalidad significativa en los datos, lo cual viola el supuesto de que los datos provienen de distribuciones normales. Tal vez quisiera transformar los datos, o utilizar la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las medianas en lugar de las medias.

Tabla 10.1.2: Prueba de Kruskal -Wallis para contenido de proteína por estado de fruta (GB-GM-CHB-CHM)

Estado de fruta	Tamaño de muestra	Rango Promedio
B	4	2,5
M	4	6,5

Estadístico = 5,33333 Valor-P = 0,0209186

La prueba de Kruskal-Wallis evalúa la hipótesis de que las medianas de contenido proteína dentro de cada uno de los 2 niveles de Estado de fruta son iguales. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

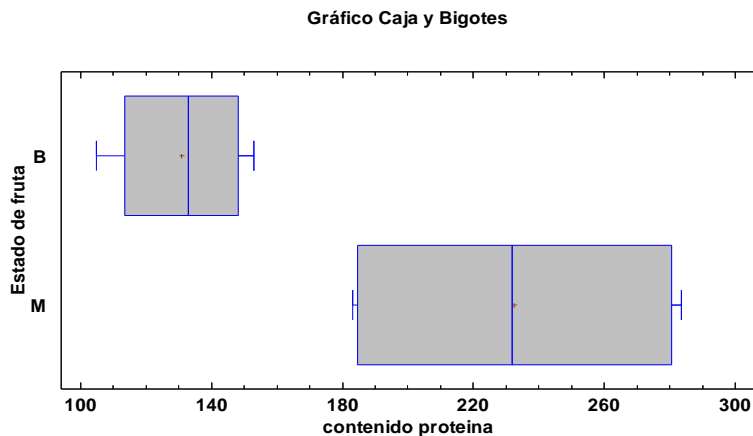


Figura 10.1.1: Grafico Caja de Bigotes contenido de proteína VS estados de fruta (GB-GM-CHB-CHM)

1.2. ANOVA Simple - contenido proteína por Tipo de fruta

Tabla 10.1.3: ANOVA para contenido proteína por Tipo de fruta (G-CH)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1891,13	1	1891,13	0,39	0,5572
Intra grupos	29392,1	6	4898,68		
Total (Corr.)	31283,2	7			

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de contenido proteína entre un nivel de Tipo de fruta y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.1.4: Prueba de Kruskal-Wallis para contenido proteína por Tipo de fruta (G – CH)

Tipo de fruta	Tamaño Muestra	Rango Promedio
CH	4	4,5
G	4	4,5

Estadístico = 0 Valor-P = 1,0

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

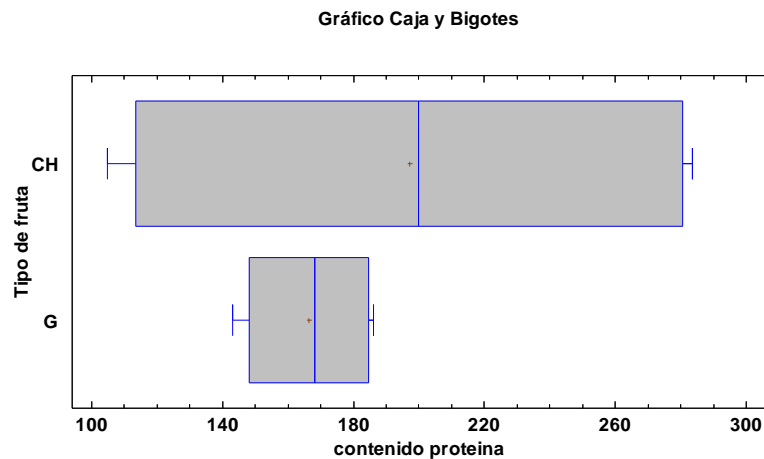


Figura 10.1.2: grafico Caja de Bigotes contenido de proteína VS tipo de fruta (G – CH)

1.3. ANOVA Simple - contenido proteína por pH (buffer)

Tabla 10.1.5: ANOVA para contenido proteína por pH (buffer)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,245	1	0,245	0,00	0,9948
Intra grupos	31283,0	6	5213,83		
Total (Corr.)	31283,2	7			

La razón-F, que en este caso es igual a 0,0000469904, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de contenido proteína entre un nivel de pH (buffer) y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.1.6: Prueba de Kruskal-Wallis para contenido proteína por pH (buffer)

pH (buffer)	Tamaño Muestra	Rango Promedio
BA	4	4,25
BF	4	4,75

Estadístico = 0,0833333 Valor-P = 0,77283

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

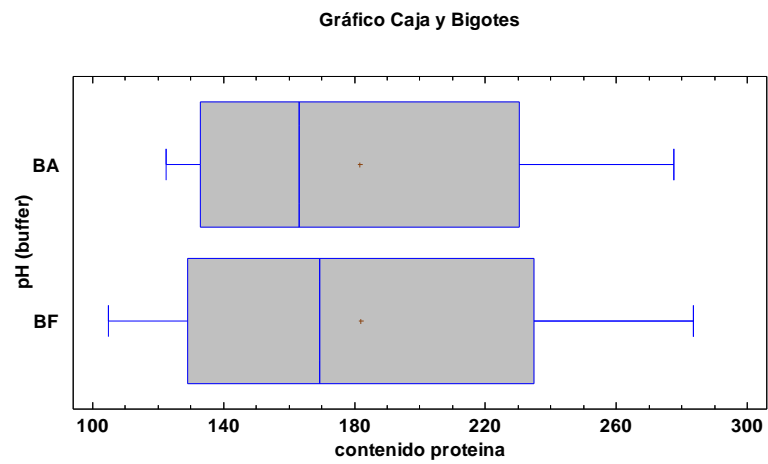


Figura 10.1.3: grafico Caja de Bigotes contenido de proteína VS pH (buffer)

ANEXO 2 – Análisis estadístico

Etapa 2: purificación por solvente de pectinestereasa de guanábana y chirimoya en buen y mal estado

2.1. ANOVA Simple - contenido de proteína por Tipos de fruta

Tabla 10.2.1: ANOVA para contenido de proteína por Tipos de fruta (G – CH)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	90525,1	1	90525,1	201,61	0,0000
Intra grupos	2694,04	6	449,006		
Total (Corr.)	93219,2	7			

La razón-F, que en este caso es igual a 201,612, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de contenido de proteína entre un nivel de Tipos de fruta y otro, con un nivel del 95,0% de confianza

Tabla 10.2.2: Prueba de Kruskal-Wallis para contenido de proteína por Tipos de fruta (G – CH)

Tipos de fruta	Tamaño Muestra	Rango Promedio
CH	4	6,5
G	4	2,5

Estadístico = 5,33333 Valor-P = 0,0209186

Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medianas son significativamente diferentes de otras, seleccione Gráfico de Caja y Bigotes,

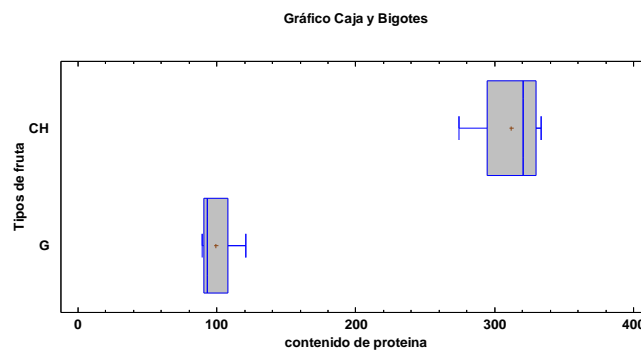


Figura 10.2.1: grafico caja y bigotes contenido de proteína VS tipo de fruta.

2.2. ANOVA Simple - contenido de proteína por estados de fruta

Tabla 10.2.3: ANOVA para contenido de proteína por estados de fruta (GB-GM-CHB-CHM)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,245	1	0,245	0,00	0,9970
Intra grupos	93218,9	6	15536,5		
Total (Corr.)	93219,2	7			

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de contenido de proteína entre un nivel de estados de fruta y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.2.4: Prueba de Kruskal-Wallis para contenido de proteína por estados de fruta (GB-GM-CHB-CHM)

estados de fruta	Tamaño Muestra	Rango Promedio
B	4	5,0
M	4	4,0

Estadístico = 0,333333 Valor-P = 0,563702

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

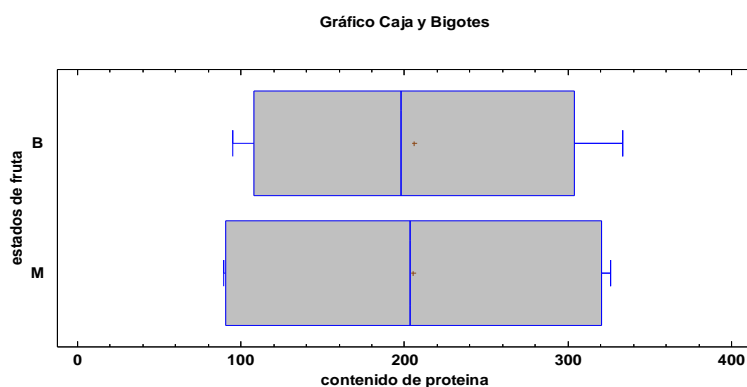


Figura 10.2.2: Grafico Caja y Bigotes contenido de proteína VS estado de fruta

2.3. ANOVA Simple - contenido de proteína por pH (buffer)

Tabla 10.2.5: ANOVA para contenido de proteína por pH (buffer)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	637,245	1	637,245	0,04	0,8457
Intra grupos	92581,9	6	15430,3		
Total (Corr.)	93219,2	7			

La tabla 19 ANOVA muestra La razón-F, que en este caso es igual a 0,0412982, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de contenido de proteína entre un nivel de pH (buffer) y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.2.6: Prueba de Kruskal-Wallis para contenido de proteína por pH (buffer)

pH (buffer)	Tamaño Muestra	Rango Promedio
BA	4	4,75
BF	4	4,25

Estadístico = 0,0833333 Valor-P = 0,77283

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

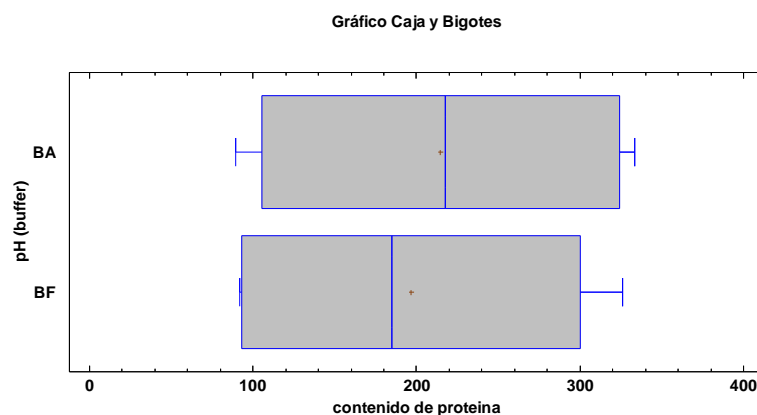


Figura 10.2.3: Grafico Caja y Bigotes contenido de proteína VS pH (buffer)

ANEXO 3 – Análisis estadístico

Etapa 3: Purificación de la enzima por cromatografía de intercambio iónico (CII)

3.1. ANOVA Simple - Mg proteína por Estado de fruta después de la purificación por CII

Tabla 10.3.1: ANOVA para Mg proteína por Estado de fruta

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	16,81	1	16,81	0,69	0,4938
Intra grupos	48,8	2	24,4		
Total (Corr.)	65,61	3			

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de mg proteína entre un nivel de Estado de fruta y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.3.1: Prueba de Kruskal-Wallis para Mg proteína por Estado de fruta

Estado de fruta	Tamaño Muestra	Rango Promedio
B	2	3,0
M	2	2,0

Estadístico = 0,6 Valor-P = 0,438577

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

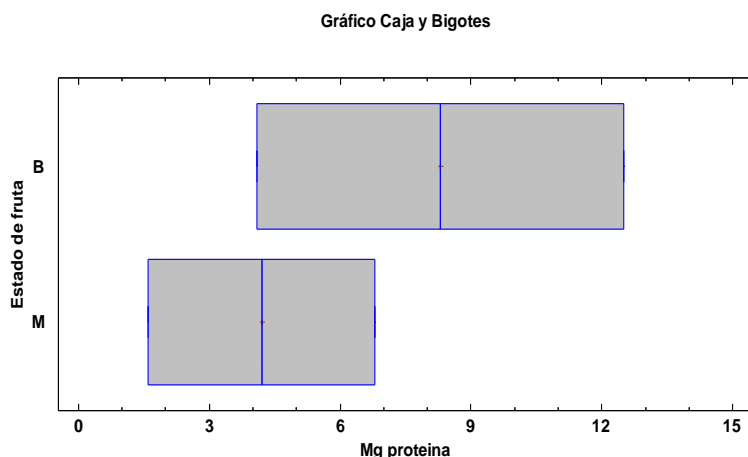


Figura 10.3.3: Grafico caja y bigotes contenido de proteína después de purificación por CII con respecto al estado de la fruta.

3.2. ANOVA Simple - Mg proteína por Tipo de fruta después de la purificación por CII

Tabla 10.3.3: ANOVA para Mg proteína por Tipo de fruta

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	46,24	1	46,24	4,77	0,1605
Intra grupos	19,37	2	9,685		
Total (Corr.)	65,61	3			

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Mg proteína entre un nivel de Tipo de fruta y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.3.4: Prueba de Kruskal-Wallis para Mg proteína por Tipo de fruta

Tipo de fruta	Tamaño Muestra	Rango Promedio
CH	2	3,5
G	2	1,5

Estadístico = 2,4 Valor-P = 0,121332

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

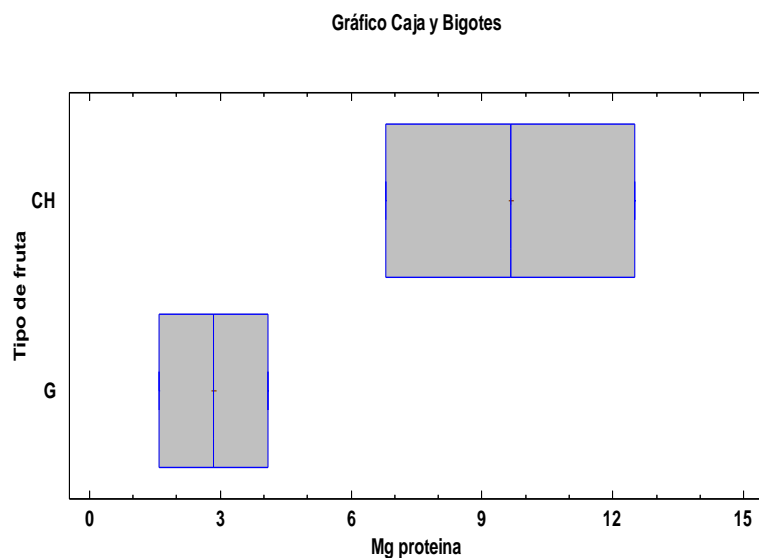


Figura 10.3.2: grafico caja y bigotes contenido de proteína después de purificación por CII con respecto al tipo de fruta

ANEXO 4 – Análisis estadístico

Etapa 4: Efecto de la Temperatura en la actividad enzimática

4.1. Efecto de la temperatura para chirimoya y guanábana en buen estado buffer fosfato

ANOVA Simple - Actividad por Temperatura

Tabla 10.4: ANOVA para Actividad por Temperatura

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5,14439	6	0,857399	4,69	0,0008
Intra grupos	8,9608	49	0,182873		
Total (Corr.)	14,1052	55			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad entre un nivel de Temperatura y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.4.1: Prueba de Kruskal-Wallis para Actividad por Temperatura

Temperatura	Tamaño Muestra	Rango Promedio
21	8	20,125
37	8	34,125
40	8	42,6875
50	8	36,0
60	8	30,875
70	8	20,5625
80	8	15,125

Estadístico = 18,3452 Valor-P = 0,00542498

Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza

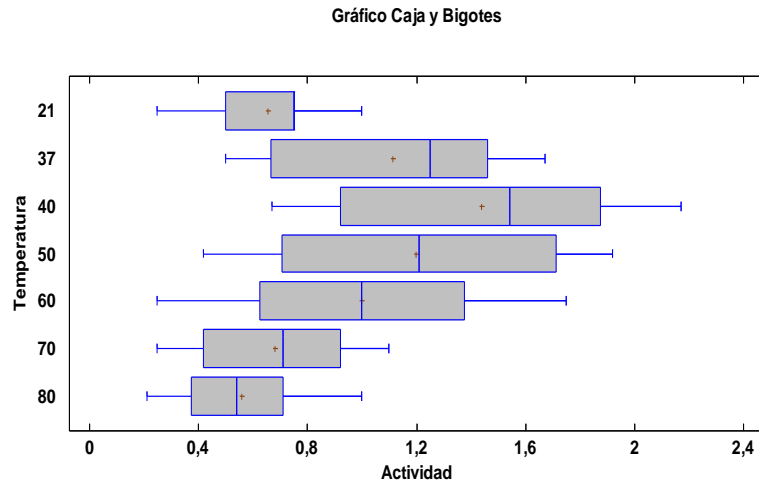


Figura 10.4.1: Grafico caja y bigotes actividad enzimática Vs Temperatura

ANOVA Simple - Actividad enzimática por Tipo de fruta

Tabla 10.4.2: ANOVA para actividad enzimática por tipo de fruta (G y CH)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5,31978	1	5,31978	32,70	0,0000
Intra grupos	8,78541	54	0,162693		
Total (Corr.)	14,1052	55			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad entre un nivel de Tipo de fruta y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.4.3: Prueba de Kruskal-Wallis para actividad enzimática por tipo de fruta (G y CH)

Tipo de fruta	Tamaño Muestra	Rango Promedio
CH	28	18,2857
G	28	38,7143

Estadístico = 22,0777 Valor-P = 0,00000261831

Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medianas son significativamente diferentes de otras, seleccione Gráfico de Caja y Bigotes, de la lista de Opciones Gráficas,

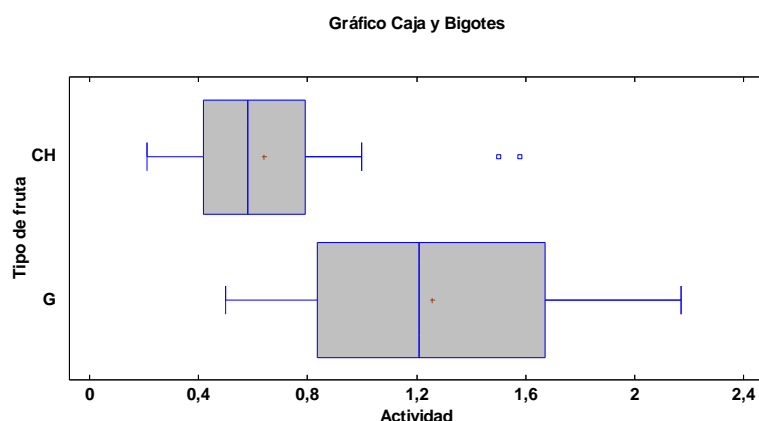


Figura 10.4.2: Grafico caja y bigotes actividad enzimática VS tipo de fruta (G y CHB)

ANOVA Simple - Actividad enzimática por Estado de fruta

Tabla 10.4.4: ANOVA para Actividad por Estado fruta (GB-GM-CHM-CHB)

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0185786	1	0,0185786	0,07	0,7906
Intra grupos	14,0866	54	0,260863		
Total (Corr.)	14,1052	55			

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad entre un nivel de Estado fruta y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.4.5: Prueba de Kruskal-Wallis para Actividad por Estado fruta (GB-GM-CHM-CHB)

Estado fruta	Tamaño Muestra	Rango Promedio
B	28	29,9821
M	28	27,0179

Estadístico = 0,464856 Valor-P = 0,495362

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

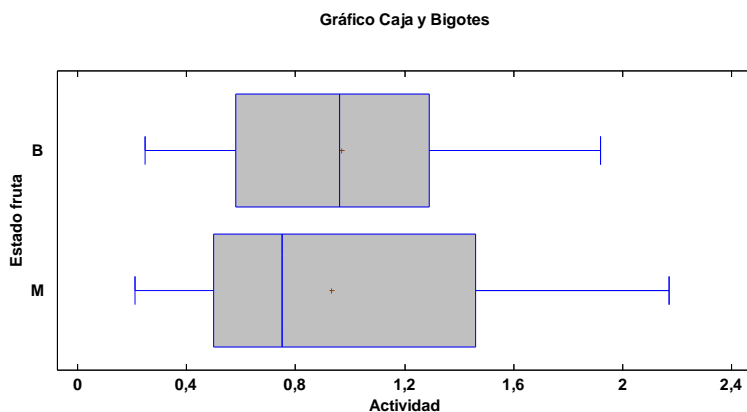


Figura 10.4.3: Grafico caja y bigotes actividad enzimática VS Estado de fruta (GB-GM y CHB-CHM)

ANOVA Simple - Actividad por pH

Tabla 10.4.6: ANOVA para Actividad por pH

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,102857	1	0,102857	0,40	0,5315
Intra grupos	14,0023	54	0,259303		
Total (Corr.)	14,1052	55			

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.4.7: Prueba de Kruskal-Wallis para Actividad por pH

pH	Tamaño Muestra	Rango Promedio
BA	28	26,5536
BF	28	30,4464

Estadístico = 0,801707 Valor-P = 0,370582

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

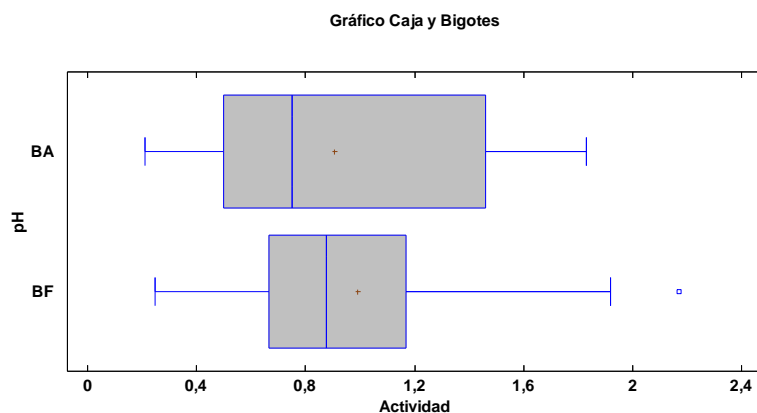


Figura 10.4.4: Grafico caja y bigotes actividad enzimática Vs pH (BF-BA)

ANEXO 5 - Análisis estadístico

Etapa 5: Efecto del pH en la actividad enzimática

ANOVA Simple - Actividad enzimática por pH para chirimoya y guanábana en buen estado buffer fosfato

Tabla 10.5.1. ANOVA para Actividad enzimática por pH

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	597,607	4	149,402	23,95	0,0019
Intra grupos	31,1951	5	6,23901		
Total (Corr.)	628,802	9			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad enzimática entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla: 10.5.2. Prueba de Kruskal-Wallis para Actividad enzimática por pH

pH	Tamaño Muestra	Rango Promedio
4	2	9,5
5	2	7,5
6	2	4,5
7	2	3,5
8	2	2,5

Estadístico = 7,41818 Valor-P = 0,115372

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

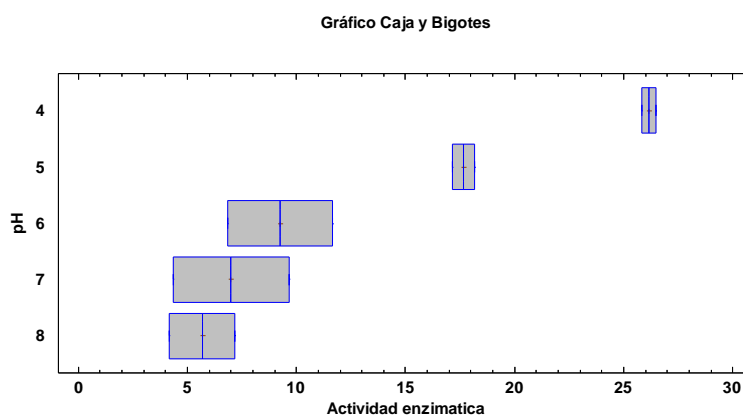


Figura 10.5.1. Grafico caja y bigotes actividad enzimática Vs pH

ANOVA Simple - Actividad enzimática por TIPO DE FRUTA para chirimoya y guanábana en buen estado buffer fosfato

Tabla 10.5.3. ANOVA para Actividad enzimática por tipo de fruta

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	22,0523	1	22,0523	0,29	0,6044
Intra grupos	606,75	8	75,8437		
Total (Corr.)	628,802	9			

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad enzimática entre un nivel de TIPO DE FRUTA y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.5.4. Prueba de Kruskal-Wallis para Actividad enzimática por tipo de fruta

TIPO DE FRUTA	Tamaño Muestra	Rango Promedio
BFCHB	5	4,4
BFGB	5	6,6

Estadístico = 1,32 Valor-P = 0,25059

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

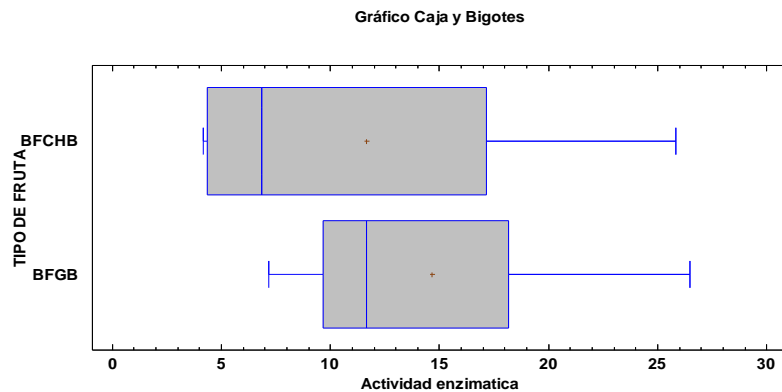


Figura 10.5.2 Grafico caja y bigotes actividad enzimática Vs tipo de fruta (BFGB-BFCHB)

ANOVA Simple - Actividad enzimática por pH para guanábana y chirimoya en mal estado buffer fosfato

Tabla 10.5.5. ANOVA para Actividad enzimática por pH

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	543,04	4	135,76	25,68	0,0016
Intra grupos	26,4317	5	5,28634		
Total (Corr.)	569,472	9			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad enzimática entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.5.6. Prueba de Kruskal-Wallis para Actividad enzimática por pH

pH	Tamaño Muestra	Rango Promedio
4	2	9,5
5	2	7,5
6	2	5,0
7	2	2,5
8	2	3,0

Estadístico = 7,74545 Valor-P = 0,10136

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

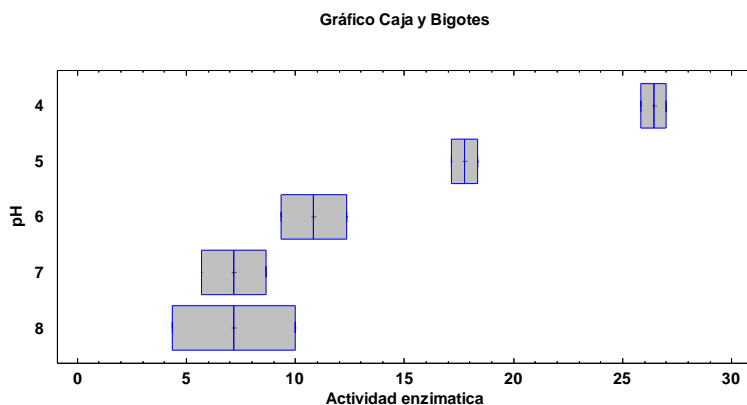


Figura 10.5.3. Grafico caja y bigotes actividad enzimática Vs pH

ANOVA Simple - Actividad enzimática por TIPO DE FRUTA para guanábana y chirimoya en mal estado buffer fosfato

Tabla 10.5.7 ANOVA para Actividad enzimática por TIPO DE FRUTA

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	19,6	1	19,6	0,29	0,6079
Intra grupos	549,872	8	68,734		
Total (Corr.)	569,472	9			

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad enzimática entre un nivel de TIPO DE FRUTA y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.5.8. Prueba de Kruskal-Wallis para Actividad enzimática por TIPO DE FRUTA

TIPO DE FRUTA	Tamaño Muestra	Rango Promedio
BFCHM	5	4,6
BFGM	5	6,4

Estadístico = 0,883636 Valor-P = 0,347206

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

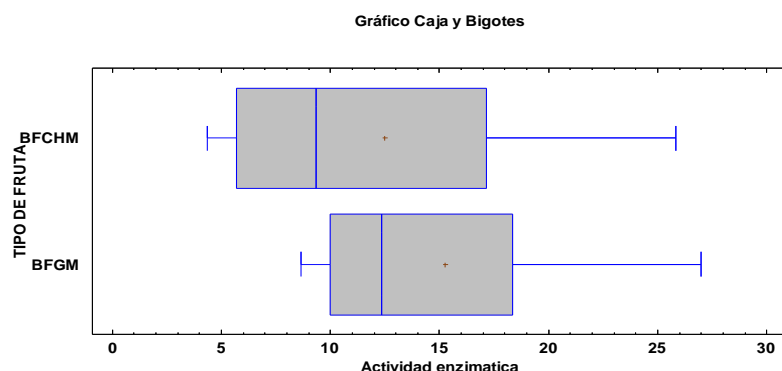


Figura 10.5.4. Grafico caja y bigotes actividad enzimática Vs tipo de fruta

ANOVA Simple - Actividad enzimática por pH para buffer acetato guanábana y chirimoya buena

Tabla 10.5.9 ANOVA para Actividad enzimática por pH

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	736,636	4	184,159	101,26	0,0001
Intra grupos	9,0934	5	1,81868		
Total (Corr.)	745,729	9			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad enzimática entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.5.10 Prueba de Kruskal-Wallis para Actividad enzimática por pH

pH	Tamaño Muestra	Rango Promedio
4	2	9,5
5	2	7,5
6	2	5,5
7	2	3,0
8	2	2,0

Estadístico = 8,4 Valor-P = 0,077977

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

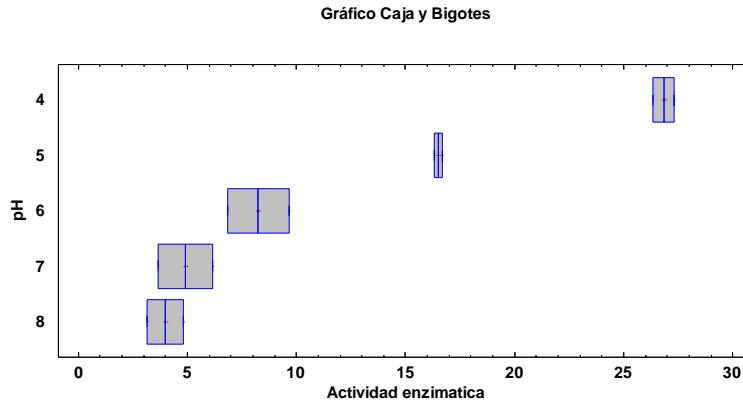


Figura 10.5.5. Grafico caja y bigotes actividad enzimática Vs pH

ANOVA Simple - Actividad enzimática por TIPO DE FRUTA para buffer acetato guanábana y chirimoya buena

Tabla 10.5.11 ANOVA para Actividad enzimática por TIPO DE FRUTA

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4,01956	1	4,01956	0,04	0,8403
Intra grupos	741,709	8	92,7137		
Total (Corr.)	745,729	9			

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad enzimática entre un nivel de TIPO DE FRUTA y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.5.12. Prueba de Kruskal-Wallis para Actividad enzimática por TIPO DE FRUTA

TIPO DE FRUTA	Tamaño Muestra	Rango Promedio
BACHB	5	5,0
BAGB	5	6,0

Estadístico = 0,272727 Valor-P = 0,601508

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

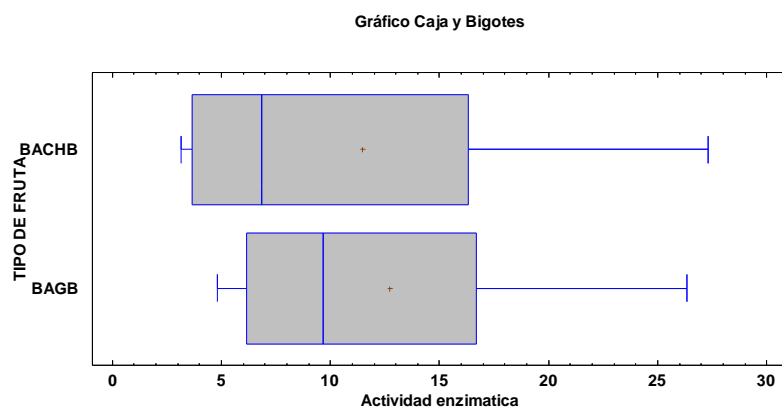


Figura 10.5.6. Grafico caja y bigotes actividad enzimática Vs tipo de fruta

ANOVA Simple - Actividad enzimática por pH para chirimoya y guanábana en mal estado Buffer acetato

Tabla 10.5.13. ANOVA para Actividad enzimática por pH

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	722,847	4	180,712	65,56	0,0002
Intra grupos	13,7829	5	2,75657		
Total (Corr.)	736,63	9			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad enzimática entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.5.14. Prueba de Kruskal-Wallis para Actividad enzimática por pH

pH	Tamaño Muestra	Rango Promedio
4	2	9,5
5	2	7,5
6	2	5,0
7	2	3,5
8	2	2,0

Estadístico = 7,96364 Valor-P = 0,0929194

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

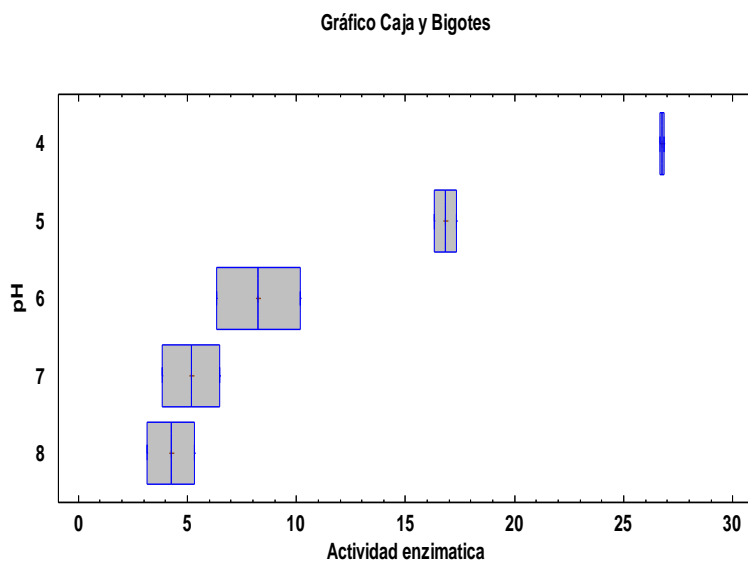


Figura 10.5.7. Grafico caja y bigotes actividad enzimática Vs pH

ANEXO 6 – Análisis estadístico

Aplicación de la enzima

11.1.1. Extracción de jugo de mora

6.1. ANOVA Simple - Clarificación por Estado de fruta

Tabla 10.6.1: ANOVA para Clarificación por Estado de fruta

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0001	1	0,0001	0,15	0,7327
Intra grupos	0,0013	2	0,00065		
Total (Corr.)	0,0014	3			

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Clarificación entre un nivel de Estado de fruta y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.6.2: Prueba de Kruskal-Wallis para Clarificación por Estado de fruta

Estado de fruta	Tamaño Muestra	Rango Promedio
B	2	2,5
M	2	2,5

Estadístico = 0 Valor-P = 1,0

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

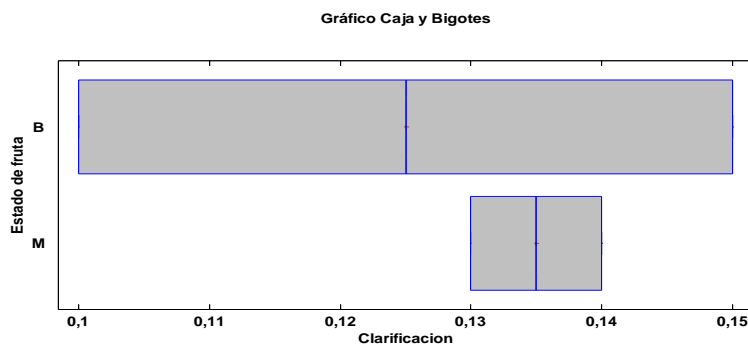


Figura 10.6.1: Grafico caja y bigotes clarificación por estado de fruta

6.2. ANOVA Simple - Clarificación por Tipo de fruta

Tabla 10.6.3: ANOVA para Clarificación por Tipo de fruta

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0009	1	0,0009	3,60	0,1982
Intra grupos	0,0005	2	0,00025		
Total (Corr.)	0,0014	3			

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Clarificación entre un nivel de Tipo de fruta y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 10.6.4: Prueba de Kruskal-Wallis para Clarificación por Tipo de fruta

Tipo de fruta	Tamaño Muestra	Rango Promedio
CH	2	3,5
G	2	1,5

Estadístico = 2,4 Valor-P = 0,121332

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

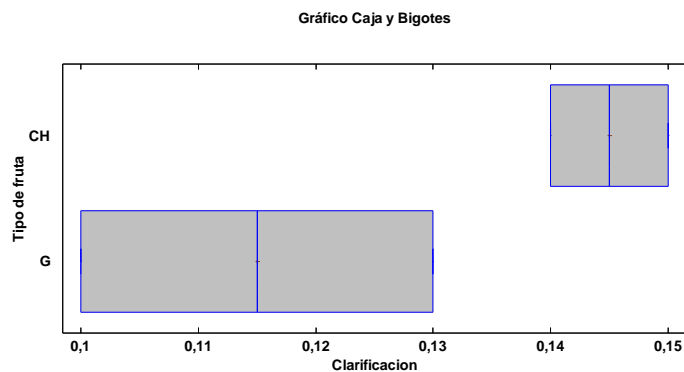


Figura 10.6.2: Grafico caja y bigotes clarificación por tipo de fruta

ANEXO 7 - Cálculos para la preparación de reactivos

1. Buffer acetato de sodio pH 5.5 concentración [0,1M] para 1 L de solución

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$5.5 = 4.76 + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$\log \frac{[A^-]}{[HA]} = 5.5 - 4.76$$

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = 10^{0.74} = 5.5$$

- **Ácido acético (CH₃COOH) [HA]**

Para 1000 mL

$$0,1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} * 1\text{L} * 60 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 6\text{g} * \frac{1\text{mL}}{1,05\text{g}} = 5,7 \text{ mL (CH}_3\text{COOH)}$$

Para 100 ml

$$\frac{5,7 \text{ (CH}_3\text{COOH)mL}}{X} \begin{array}{l} \rightarrow \\ \leftarrow \end{array} \frac{1000\text{mL}}{100\text{mL}} = 0,57 \text{ mL (CH}_3\text{COOH)}$$

- **Acetato de sodio (CH₃COO⁻Na⁺) [A⁻]**

Para 1000 mL

$$[A^-] = 5,5 \quad [HA] = 5,5 * 6\text{g} = 33\text{g}$$

Para 100 mL

$$\frac{33\text{g (CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+)}{X} \begin{array}{l} \rightarrow \\ \leftarrow \end{array} \frac{1000\text{mL}}{100\text{mL}} = 3,3 \text{ g (CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+)$$

2. Buffer fosfato pH 7,5 [0,1 M] para 1L de solución

KH₂PO₄ monopotásico P.M= 136,09 g/mol [AH]

K₂HPO₄ Dipotasico

P.M= 174,18 g/mol [A⁻]

pKa = 7,2

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

$$7,5 - 7,2 = \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

$$0,3 = \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

$$10^{0,3} = \frac{[A^-]}{[AH]} = 1,99$$

$$[AH] * 1,99 = [A^-]$$

$$[A^-] + [AH] = 0,1M$$

$$1,99[AH] + [AH] = 0,1M$$

$$[AH] = \frac{0,1}{2,99} = 0,033 \frac{\text{moles}}{1L}$$

1000 mL

$$0,033 \frac{\text{moles}}{1L} * 1L * 136,09 \frac{g}{\text{mol}} = 4,49g \text{ KH}_2\text{PO}_4$$

100 mL

$$\frac{4,49g (\text{KH}_2\text{PO}_4)}{X} \begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix} \frac{1000mL}{100mL} = 0,449 g (\text{KH}_2\text{PO}_4)$$

1000 mL

$$[A^-] = 1,99 * [AH] = 1,99 * 0,033$$

$$[A^-] = 0,066 \frac{\text{moles}}{L} * 1L * 174,18 \frac{g}{\text{mol}} = 11,5 g \text{ K}_2\text{HPO}_4$$

100mL

$$\frac{11,5g (\text{K}_2\text{HPO}_4)}{X} \begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix} \frac{1000mL}{100mL} = 1,15 g (\text{K}_2\text{HPO}_4)$$

3. Hidróxido de sodio 5 M (NaOH)

$$NaOH \frac{5 \text{ moles}}{L} * 0,05L = 0,25 \text{ moles} * 40 \frac{g}{mol} = 10 g NaOH \text{ en } 50 \text{ mL de } H_2O$$

Tabla 10.7.1: datos para curva de calibración en OVA en Buffer Fosfato

Concentración (mg/mL)	OVA BF(μL)	Buffer Fosfato (μL)	Reactivo Biuret (μL)
0,2	400	1100	500
0,3	600	900	500
0,4	800	700	500
0,5	1000	500	500
0,6	1200	300	500
Blanco		1500	500

Tabla 10.7.2: datos para curva de calibración en OVA en Buffer Acetato

Concentración (mg/mL)	OVA BA(μL)	Buffer Acetato (μL)	Reactivo Biuret (μL)
0,2	400	1100	500
0,3	600	900	500
0,4	800	700	500
0,5	1000	500	500
0,6	1200	300	500
Blanco		1500	500